

Aus der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dietrich von Schweinitz

Epigenetische Veränderungen des Hedgehog-Signalwegs in embryonalen Tumoren

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Beate Hagl
aus
Landshut
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. – Doz. Dr. rer. nat. Roland Kappler
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Cremer
Prof. Dr. Heiko Hermeking
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2011

Für meine Lieben

Ich weiß nicht, wie mich die Welt einst sehen wird.
Was mich betrifft, so komme ich mir vor wie ein kleiner Junge,
der am Strand spielt und ab und zu einen Stein oder eine Muschel findet,
die schöner als die gewöhnlichen sind,
während der große Ozean der Wahrheit unentdeckt vor mir liegt.

(Sir Isaak Newton, 1643 – 1727)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epigenetische Genregulation	1
1.2	Der Hedgehog-Signalweg	4
1.2.1	Der Hedgehog-Signalweg unter physiologischen Bedingungen	4
1.2.2	Der Hedgehog-Signalweg unter pathologischen Bedingungen	7
1.3	Embryonale Tumore	11
1.3.1	Das Hepatoblastom	11
1.3.2	Das Rhabdomyosarkom	13
2	Aufgabenstellung	15
3	Verwendete Materialien	16
3.1	Zelllinien.....	16
3.2	Kulturmedien	16
3.3	Antibiotika	17
3.4	Enzyme.....	17
3.5	Plasmide.....	17
3.6	Größenstandards	18
3.7	Primer	18
3.8	Rekombinante Proteine.....	19
3.9	Chemikalien und Reagenzien	20
3.10	Puffer	21
3.11	Kits	21
3.12	Verbrauchsmaterial	22
3.13	Geräte	22
4	Methoden.....	24
4.1	Zellbiologische Methoden	24
4.1.1	Kultivieren und Passagieren eukaryotischer Zellen	24
4.1.2	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	24
4.1.3	Stabile Transfektion.....	24
4.1.4	Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin	25
4.1.5	Luciferase Reporter-Assay.....	25
4.1.6	Proliferationsassay	26
4.1.7	Annexin V-Färbung.....	27
4.1.8	Transformation.....	28
4.1.9	Blau-Weiß-Selektion.....	28
4.2	Molekularbiologische Methoden	29
4.2.1	DNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen und Gewebe.....	29
4.2.2	DNA-Isolierung aus humanem Blut.....	29
4.2.3	RNA-Isolierung aus adhärenenten Zellen.....	29
4.2.4	cDNA-Synthese	31
4.2.5	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	31
4.2.6	Präparation von Plasmid-DNA.....	32
4.2.7	TA-Klonierung.....	33
4.2.8	Restriktionsverdau	33
4.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	34
4.2.10	Agarosegel-Extraktion	34

4.3	Epigenetische Methoden.....	35
4.3.1	<i>In vitro de novo</i> Methylierung.....	35
4.3.2	Bisulfit-Konvertierung	35
4.3.3	Bisulfitsequenzierung.....	36
4.3.4	Methylspezifische PCR (MSP).....	38
5	Ergebnisse	39
5.1	Reaktivierung von Hh-assoziierten Genen durch Demethylierung.....	39
5.2	Etablierung der Bisulfitsequenzierung inhibitorischer Komponenten des Hedgehog-Signalwegs	41
5.3	Keine Regulation inhibitorischer Komponenten des Hedgehog-Signalwegs über DNA-Methylierung in RMS-Zelllinien.....	43
5.4	Methylierungsanalyse inhibitorischer Komponenten des Hedgehog-Signalwegs in HB-Zelllinien.....	44
5.5	Regulation der HHIP-Expression mittels DNA-Methylierung in HB-Zelllinien.....	45
5.6	Klinische Relevanz der Promotor-Methylierung am HHIP-Lokus.....	47
5.7	Deaktivierung des Hh-Signalwegs durch rekombinantes Hip	48
5.8	Rekombinantes Hip reprimiert den Hh-Signalweg in HUH6-Zellen	49
5.9	Proliferationsanalysen mit rekombinantischem Hip und HB-Zelllinien	50
5.10	Rekombinantisches Hip induziert Apoptose in HUH6-Zellen	51
5.11	Rekombinantisches Hip erhöht die Expression anti-apoptischer Gene in HepG2-Zellen.....	52
5.12	Proliferationsanalyse stabil mit HHIP transfizierter HepG2-Zellen	53
6	Diskussion.....	54
6.1	Methylierungsstatus Hh-inhibierender Gene in RMS-Zelllinien	54
6.2	Methylierungsstatus Hh-inhibierender Gene in Hepatoblastomen.....	57
6.3	HHIP als therapeutisches Ziel in Hepatoblastomen	61
7	Zusammenfassung.....	66
8	Literaturverzeichnis.....	68
9	Lebenslauf	81
10	Danksagung	82

1 Einleitung

Solide Tumore des Kindesalters entstehen nach einer relativ kurzen Latenz und tragen im Gegensatz zu Tumoren Erwachsener [1] nur wenige Mutationen [2]. Aber nicht nur genetische Veränderungen tragen zur Tumorentstehung bei. Bei immer mehr Tumoren wird von epigenetischen Fehlregulierungen berichtet. Dabei spielt vor allem die DNA-Methylierung eine entscheidende Rolle. Aberrante Methylierung von normalerweise unmethylierten CpG-Inseln in den Promoterregionen von Tumorsuppressorgenen führt zu deren transkriptioneller Inaktivierung [3].

Der Hedgehog-Signalweg ist in vielen Tumoren aktiviert (siehe Tabelle 1), so auch häufig im Rhabdomyosarkom und im Hepatoblastom, und trägt auf diese Weise zu deren Pathogenese bei. Während Berichte über Mutationen in den verschiedenen beteiligten Genen existieren, ist die Epigenetik dieses Signalwegs bisher kaum erforscht. Dabei stellt sich die Frage, ob nach der embryonalen Entwicklung, der dafür essentielle Hedgehog-Signalweg unvollständig ausgeschaltet wird und es so zu unkontrollierter Proliferation kommt.

1.1 *Epigenetische Genregulation*

Conrad Hal Waddington prägte den Begriff der Epigenetik bereits bevor die Struktur der DNA bekannt war. Seine Definition von Epigenetik aus dem Jahre 1942 bedeutete mehr oder minder dasselbe wie Embryologie bzw. Entwicklungsbiologie. Sicher beschreibt Epigenetik teilweise auch die Entfaltung des genetischen Programms während der Entwicklung, aber der Begriff der Epigenetik, wie er heute verstanden wird, geht weit darüber hinaus [4]. Nach moderner Definition beschreibt Epigenetik Information, die während der Zellteilung vererbt wird und nicht durch die DNA-Sequenz selbst kodiert ist [5].

Demzufolge kann die Expression von Genen mittels epigenetischer Mechanismen ohne eine Veränderung in der DNA-Sequenz reguliert werden. Die DNA nimmt dabei verschiedene Konformationszustände ein, die durch chemische Modifikation des DNA-Moleküls selbst oder der Proteine, die an der Verpackung der DNA beteiligt sind, entstehen. Bekannte epigenetische Veränderungen sind DNA-Methylierung und posttranslationelle Histonmodifikationen (Acetylierung, Methylierung, Phosphory-

lierung etc.) [6]. Diese werden nicht nur bei der Mitose vererbt, sondern können auch von einer Generation auf die nächste übertragen werden [7, 8].

DNA-Methylierung ist für das Stilllegen von Genen [9, 10], die X-Chromosom-Inaktivierung [11-14], das Ausschalten repetitiver Sequenzen [15] und die parentale Prägung [16, 17] von großer Bedeutung. Hierbei wird mittels DNA-Methyltransferasen (DNMT) eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf das 5'-Kohlenstoffatom eines Cytosins der Dinukleotidsequenz CpG übertragen [18]. Es ist zu beachten, dass der Großteil aller CpG-Dinukleotide methyliert ist, lediglich sogenannte CpG-Inseln liegen vorwiegend unmethyliert vor. Dabei handelt es sich um DNA-Abschnitte mit einem sehr hohen Anteil an CpG-Dinukleotiden, die meist mit Genen assoziiert sind und Promotoren enthalten [19-23].

Die Expression eines jeden Gens ist gekoppelt an einen bestimmten Zeitpunkt und ein spezielles Gewebe. Um diese Spezifität zu gewährleisten, ist DNA in Euchromatin und Heterochromatin organisiert. Veränderungen in der Struktur des Chromatins beeinflussen dabei die Genexpression. Gene werden transkribiert, wenn die DNA als offenes, locker gepacktes Euchromatin vorliegt und sind inaktiv, liegt die DNA als kompaktes Heterochromatin vor, an das weder die RNA-Polymerase noch Transkriptionsfaktoren binden können [24, 25]. Wie in Abbildung 1 dargestellt, werden diese dynamischen Chromatinzustände durch reversible epigenetische Modifikationen kontrolliert. Die verschiedenen Verpackungszustände der DNA werden dabei von DNMTs, Histondeacetylasen (HDACs), Histonacetylasen (HATs) und den methyl-CpG binding domain-Proteinen (MBD), wie MBD1 und MECP2, vermittelt [25].

Anhand ihrer Funktion werden zwei Arten von DNMTs voneinander unterschieden – die sogenannte Erhaltungs- oder Maintenance-DNMT Dnmt1 und die *de novo* DNMTs Dnmt3a und Dnmt3b [26, 27]. Bereits 1975 gingen Riggs und Holliday von einer Erhaltungs-Methyltransferase aus, die unmethylierte Bereiche nur schwer, aber problemlos hemi-methylierte DNA-Abschnitte methyliert [28, 29]. Die Existenz einer solchen Maintenance-DNMT-Aktivität wurde anschließend durch Experimente gezeigt, welche die Vererbung von Methylierungsmustern in Säugetierzellen nachwies [30, 31] sowie durch die Klonierung der ersten Säugetier-DNMT *Dnmt1* [26]. Des Weiteren konnte *in vitro* bestätigt werden, dass Dnmt1 hemi-methylierte DNA effizienter methyliert als unmethylierte DNA [32].

Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Dnmt1 mittels einer proteolytischen Spaltung ebenfalls eine *de novo* Methylierungsaktivität aufweisen kann [32]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, wie es zu ektoptischer DNA-Methylierung in Zusammenhang mit dem Altern und der Tumorentstehung kommt.

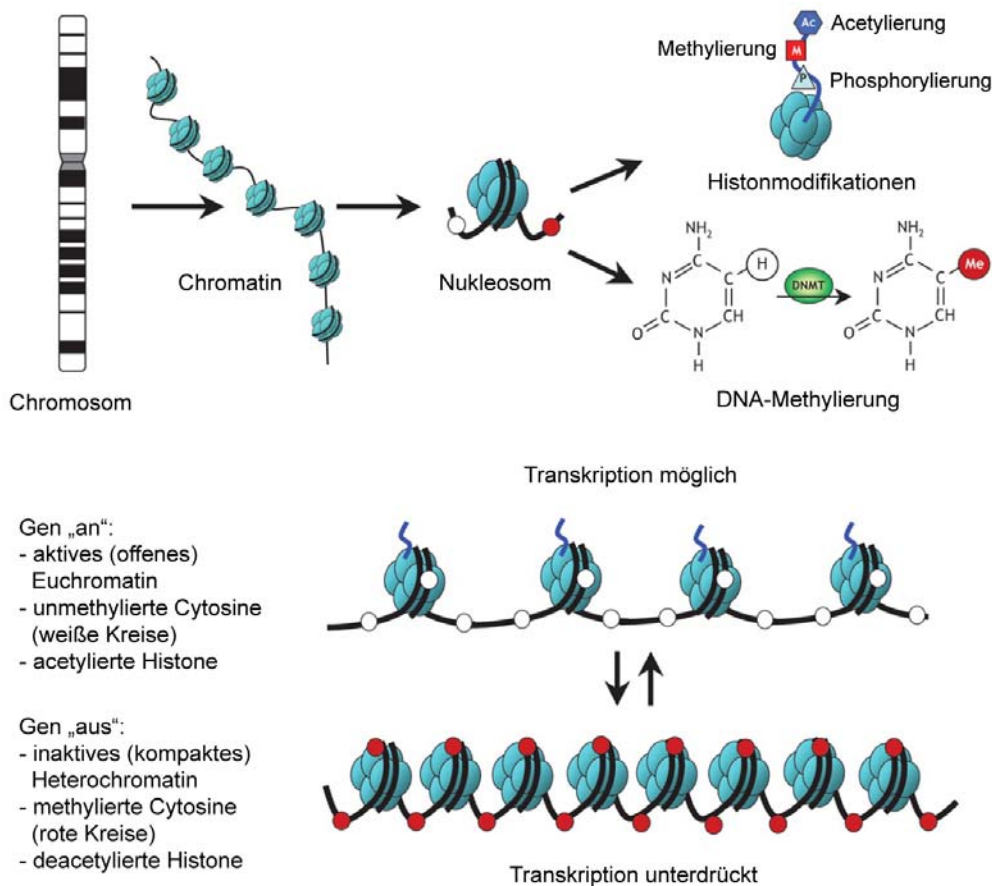


Abbildung 1: Epigenetische Regulation der Genexpression.

Im Zellkern liegt DNA größtenteils in ihrer verpackten und organisierten Form als Chromatin vor. Chromatin besteht aus einer Vielzahl von Nucleosomen, die aus einem Histonoktamer und dem darum gewickelten DNA-Strang gebildet werden. Mögliche epigenetische Modifikationen an den Histonen sind: Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung. Der DNA-Strang selbst kann durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) an Cytosinen methyliert werden. Zusammen beeinflussen Histonmodifikationen und DNA-Methylierung die Organisation des Chromatins und die Genexpression. Liegt die DNA als sogenanntes Euchromatin vor, ist Transkription möglich. Die DNA ist dabei unmethyliert und die Histone häufig acetyliert. Kompaktes Heterochromatin ist meist methyliert und die Histone werden über Histondeacetylasen (HDACs) deacetyliert. Es findet keine Transkription statt. Weiße Kreise: unmethylierte Cytosine, rote Kreise: methylierte Cytosine. Abbildung modifiziert nach Rodenhiser *et al.* 2006 [33]

Epigenetische Veränderungen können auch eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren spielen. Die genomweite Abnahme der Methylierung (Hypomethylierung) in Krebszellen im Vergleich zu Normalgewebe kann zur aberranten Expression von potentiellen Onkogenen führen und zur häufig beschriebenen Chromosomen-Instabilität in Tumoren beitragen [33-35]. Auch Hypermethylierung der Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen wurde bereits für viele Tumorarten

beschrieben. So ist z.B. die Transkription von *RASSF1A* u.a. im Neuroblastom, im Medulloblastom, im Rhabdomyosarkom und im Hepatoblastom epigenetisch reprimiert [36-39].

Die Identifizierung von epigenetischen Veränderungen und deren genaues Studium könnten dazu beitragen, neue Diagnostik-, Behandlungs- und Präventionsstrategien zu entwickeln.

1.2 Der Hedgehog-Signalweg

1995 erhielten Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus den Nobelpreis für Medizin für ihre herausragende Arbeit über die genetische Kontrolle der frühen Embryonalentwicklung in *Drosophila*. Eines der bis dahin unbekanntenen Gene benannten sie entsprechend dem stacheligen Phänotyp der *Drosophila*-Mutante *hedgehog* (Englisch für Igel) [40, 41]. Der mit diesem Gen assoziierte Signalweg – der Hedgehog-Signalweg – spielt eine fundamentale Rolle in der Entwicklung. So führt der Verlust während der embryonalen Entwicklung dieses Signalwegs zu Zyklopie und anderen schwerwiegenden Entwicklungsstörungen [42, 43]. Eine Überaktivierung des Signalwegs wiederum ist mit verschiedenen Tumorarten assoziiert [44-51].

1.2.1 Der Hedgehog-Signalweg unter physiologischen Bedingungen

Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass durch den Hedgehog-Signalweg die Ausbildung des Neuralrohrs, des axialen Skeletts, der Gliedmaßen, der Haut, der Haare und der Zähne in der embryonalen Entwicklung definiert wird [52-56].

Während für *Drosophila* nur ein *Hedgehog*-Gen beschrieben ist, wurden in Vertebraten bisher drei Homologe identifiziert – *Sonic (Shh)*, *Desert (Dhh)* und *Indian hedgehog (Ihh)* [57]. Diese induzieren in unterschiedlichen Geweben den Signalweg und können sowohl autokrin als auch parakrin wirken. Am besten beschrieben ist *Shh*, das während der Entwicklung in großen Teilen des zentralen Nervensystems, den Gliedmaßen, der Lunge, des Darms, der Zähne und der Haarfollikel exprimiert wird [52-56, 58, 59]. *Dhh* und *Ihh* dagegen sind in erster Linie bei der Entwicklung von Keimbahn und Skelett beteiligt [60-62].

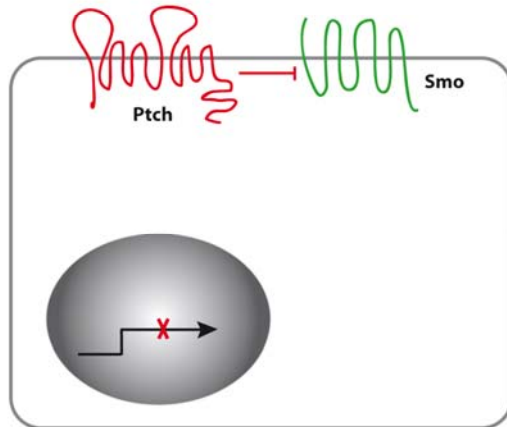
Der Hedgehog-Ligand wird als Vorläuferprotein mittels seiner C-terminalen Domäne autoproteolytisch gespalten [63-65]. An den verbliebenen N-terminalen Teil des Proteins bindet am C-Terminus ein Cholesterinmolekül kovalent [66], welches für die durch Dispatched vermittelte Sekretion eine wichtige Rolle spielt [67, 68]. Des Weiteren wird der N-Terminus mit einem Palmitatrest versehen und glykosyliert. Das auf diese Weise prozessierte Protein dient als Signaldomäne für den Hedgehog-Signalweg und wird im Falle von Shh auch mit Shh-N bezeichnet. Die Abkürzung „Shh“ bezieht sich in dieser Arbeit grundsätzlich auf die prozessierte, aktive Form des Proteins.

Der Signalweg (Abbildung 2) wird durch die Bindung des Liganden Hedgehog an seinen Rezeptor Patched (PTCH) aktiviert [69-71]. *Patched* kodiert für ein 12-spänniges Transmembranprotein [72, 73], das in Abwesenheit von Hedgehog Smoothened – ein 7-spänniges Transmembranprotein – inhibiert. Sobald Hedgehog einen Komplex mit Patched bildet, wird voraussichtlich durch eine Konformationsänderung seine Interaktion mit Smoothened und damit seine antagonistische Wirkung aufgehoben [71, 74, 75]. Eine andere Theorie hierzu besagt, dass Ptch, welches sowohl mit einem Cholesterin-Transporter als auch einer Familie von Proteinpumpen verwandt ist [76, 77], als Sterol-, im Speziellen Oxysterol-Pumpe wirkt und so für die Aktivierung von Smoothened möglicherweise direkt oder indirekt nötige Sterole aus der Umgebung entfernt [78, 79]. Als Folge dieser Interaktion aktiviert Smoothened die Signalkaskade, die vermittelt durch Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie zur Expression verschiedenster Zielgene führt. Gli bindet zunächst an einen Komplex aus Costal 2 bzw. einem dazu orthologen Protein, Fused und Suppressor of Fused [80-82] und wird in den Zellkern transportiert. In Vertebraten wirkt hierbei Gli1 als obligatorischer Aktivator, Gli2 und Gli3 können sowohl als C-terminal-prozessierte transkriptionelle Repressoren, als auch in voller Länge als Aktivatoren vorliegen [83, 84].

Hedgehog-Signale werden über positive Rückkopplung durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Gli1* oder der Liganden *Shh*, *Ihh* und *Dhh* und negative Rückkopplung über *Patched*, das *Hedgehog interacting protein (Hip)* oder *Suppressor of Fused (Sufu)* zusätzlich reguliert [47, 85]. Weitere Zielgene sind proliferatorische Komponenten wie *N-Myc* [86], *Igf2* [87], *Cyclin D1* sowie *Cyclin D2* [88], anti-apoptotisch wirkende Gene wie *Bcl2* und Transkriptionsfaktoren wie *Foxf1* [89].

Der Hedgehog-Signalweg

(a) in Abwesenheit des Liganden Hh



(b) in Anwesenheit des Liganden Hh

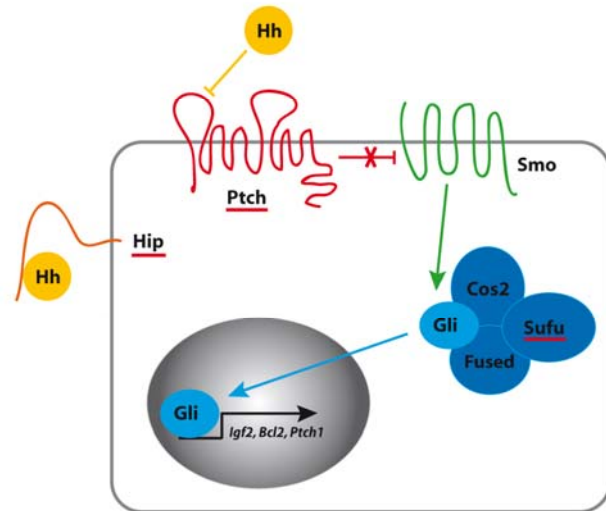


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Hedgehog-Signalwegs.

(a) In Abwesenheit des Liganden Hedgehog inhibiert Patched Smoothened. Somit kommt es zu keiner Aktivierung des Signalwegs. (b) Ist Hedgehog vorhanden, bindet dieses an seinen Rezeptor Patched. Dadurch wird die Interaktion mit Smoothened unterdrückt und die nachfolgende Signalkaskade über einen Proteinkomplex aus Glioma-associated (Gli), Costal2 (Cos2) bzw. einem dazu orthologen Protein, Fused und Suppressor of Fused (Sufu) aktiviert. Der Transkriptionsfaktor Gli wandert daraufhin in den Zellkern und verschiedenste Zielgene – wie z.B. *Igf2*, *Bcl2* und *Ptch1* – werden exprimiert. Negative Regulatoren des Signalwegs sind Patched (Ptch), Suppressor of fused (Sufu) und das Hedgehog interacting Protein (Hip) (rot unterstrichen). Ptch inhibiert in Abwesenheit des Liganden Hedgehog Smo, Sufu hält den Transkriptionsfaktor Gli im Zytoplasma zurück und Hip fängt den Liganden Hedgehog ab.

Der Hedgehog-Signalweg wird durch verschiedene Mechanismen negativ reguliert. Wie bereits beschrieben interagiert der Rezeptor Patched mit Smoothened und inhibiert so die Aktivierung des Signalwegs [71, 74, 75]. Das Hedgehog-Interacting Protein (Hip) bindet alle drei Hedgehog-Proteine mit einer ähnlichen Affinität wie ihr Rezeptor Patched [90] und reprimiert dadurch indirekt die Signalkaskade. Sowohl Hip als auch Ptch sind dem Hh-Signalweg vorgeschaltet, wohingegen die Wirkung von Suppressor of fused (Sufu) erst nach initialer Aktivierung durch den Liganden zum Tragen kommt. Sufu interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Gli1, hält diesen im Zytoplasma zurück und verhindert auf diese Weise die Expression von Hh-Zielgenen [81, 91, 92].

1.2.2 Der Hedgehog-Signalweg unter pathologischen Bedingungen

Genetische Veränderungen des Hedgehog-Signalwegs können schwere Folgen haben. Dies trifft sowohl auf aberrante Aktivierungen als auch Inhibitionen des Signalwegs zu. Mögliche Folgen einer Überaktivierung sind eine Vielzahl von Tumorerkrankungen [44-51] (Tabelle 1). Entwicklungsstörungen hingegen treten bei aberranter Repression des Signalwegs auf [42, 43].

Tabelle 1: Mutationsabhängige Fehlregulationen des Hh-Signalwegs und daraus resultierende Erkrankungen.

Erkrankung	Mutationen beschrieben in	Referenzen
Holoprosencephalie	<i>SHH</i> <i>PTCH</i> <i>GLI2</i>	[93-96] [97] [98]
Basalzellnävussyndrom	<i>PTCH</i> <i>PTCH2</i>	[46, 48, 99, 100] [101, 102]
Greig Cephalopolysyndaktylie	<i>GLI3</i>	[43, 103]
Pallister-Hall-Syndrom	<i>GLI3</i>	[43, 104]
Basalzellkarzinom	<i>PTCH</i> <i>PTCH2</i> <i>SHH</i> <i>SMO</i>	[45, 48, 105] [102] [106] [51, 107, 108]
Hepatozelluläres Karzinom	<i>SMO</i>	[109]
Medulloblastom	<i>PTCH</i> <i>PTCH2</i> <i>SMO</i> <i>SUFU</i> <i>GLI3</i>	[49, 50, 105] [102] [108] [110] [111]
Meningiom	<i>PTCH</i>	[112]
Primitiv neuroektodermaler Tumor	<i>PTCH</i>	[105, 113]
Mammakarzinom	<i>SHH</i> <i>PTCH</i>	[106] [112]
Spinozelluläres Karzinom	<i>PTCH</i>	[114, 115]
Trichoepitheliom	<i>PTCH</i>	[116]
Ösophaguskarzinom	<i>PTCH</i>	[117]
Fetales Rhabdomyom	<i>PTCH</i>	[118, 119]

Es sind mögliche Krankheiten genannt, die durch Mutationen im Hh-Signalweg entstehen können. Für manche Mutationen ist bisher nur ein Fall beschrieben.

Die bekannteste Entwicklungsstörung, die mit dem Hh-Signalweg assoziiert wird, ist die Ausbildung einer Holoprosencephalie. Hierbei handelt es sich um eine klinisch

variable und genetisch heterogene Fehlbildung, bei der sich das Prosencephalon (Vorderhirn) während der Entwicklung nicht in rechte und linke Hemisphäre aufteilt [120]. Als Auslöser für diese Erkrankung wurde die Repression des Hedgehog-Signalwegs durch inaktivierende Mutationen in *SHH* [93-96] und *GLI2* [98] sowie aktivierende Mutationen in *PTCH* [97], die eine erhöhte inhibitorische Wirkung zur Folge haben, beschrieben.

Weitere vom Hh-Signalweg abhängige Fehlbildungen, die ebenfalls auf einen Verlust des Signalwegs zurückzuführen sind, sind Greig Cephalopolysyndaktylie – gekennzeichnet durch Polysyndaktylie, Macrocephalie und Hypertelorismus [43, 121] und das Pallister-Hall-Syndrom, welches durch Polydaktylie und meist durch eine im Hypothalamus liegende, gutartige Gewebswucherung (hypothalamisches Hamartom) charakterisiert ist [43, 104].

Der Zusammenhang zwischen einer aberranten Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs und der Entstehung von Tumoren wurde 1996 durch die Arbeitsgruppe um Heidi Hahn anhand des Basalzellnävussyndroms erstmals beschrieben [46] und zeigte die enorme Wichtigkeit der kontrollierten Repression durch die inhibitorischen Komponenten des Signalwegs auf. So konnten Hahn *et al.* zu einem Zeitpunkt, an dem die Signalkaskade des Hedgehog-Signalwegs noch nicht vollständig aufgeklärt war, explizit darlegen, dass das Basalzellnävussyndrom auf einer inaktivierenden Mutation des negativen Regulators *PTCH1* basiert.

In den darauffolgenden Jahren konnten immer mehr aktivierende Fehlregulationen des Hedgehog-Signalwegs mit der Entstehung verschiedenster Tumore assoziiert werden. So wurden inaktivierende Mutationen in *PTCH1* und aktivierende Mutationen in *SMO* in Basalzellkarzinomen [45, 46, 48, 51, 105, 107, 108] und ebenfalls inaktivierende Mutationen in *PTCH1* und einem weiteren negativen Regulator des Signalwegs, nämlich *SUFU*, in Medulloblastomen [50, 110] gefunden. In diesen Fällen ist die aberrante Aktivierung des Signalwegs ligandenunabhängig (Typ I; Abbildung 3), da sie auf die fehlende Repression durch *PTCH1* und *SUFU* sowie die ständige Aktivierung des Signalwegs durch *SMO* zurückzuführen ist und damit die Anwesenheit des Hh-Liganden keinen Einfluss hat. Eine autokrine und somit ligandenabhängige Regulation (Typ II) des Hedgehog-Signalwegs wurde bisher für kleinzellige Bronchialkarzinome [122], Mammakarzinome [123], Adenokarzinome des Pankreas [124, 125] und für Tumore der Speiseröhre, des Magens und des Gallengangs [125] sowie der Prostata [126-129], des Kolons [130-132] und der Leber

[133] beschrieben. Diese und zusätzliche Modelle einer aberranten Regulierung des Hedgehog-Signalwegs, die in Zusammenhang mit der Tumorentwicklung stehen könnten, sind in Abbildung 3 dargestellt und näher erläutert.

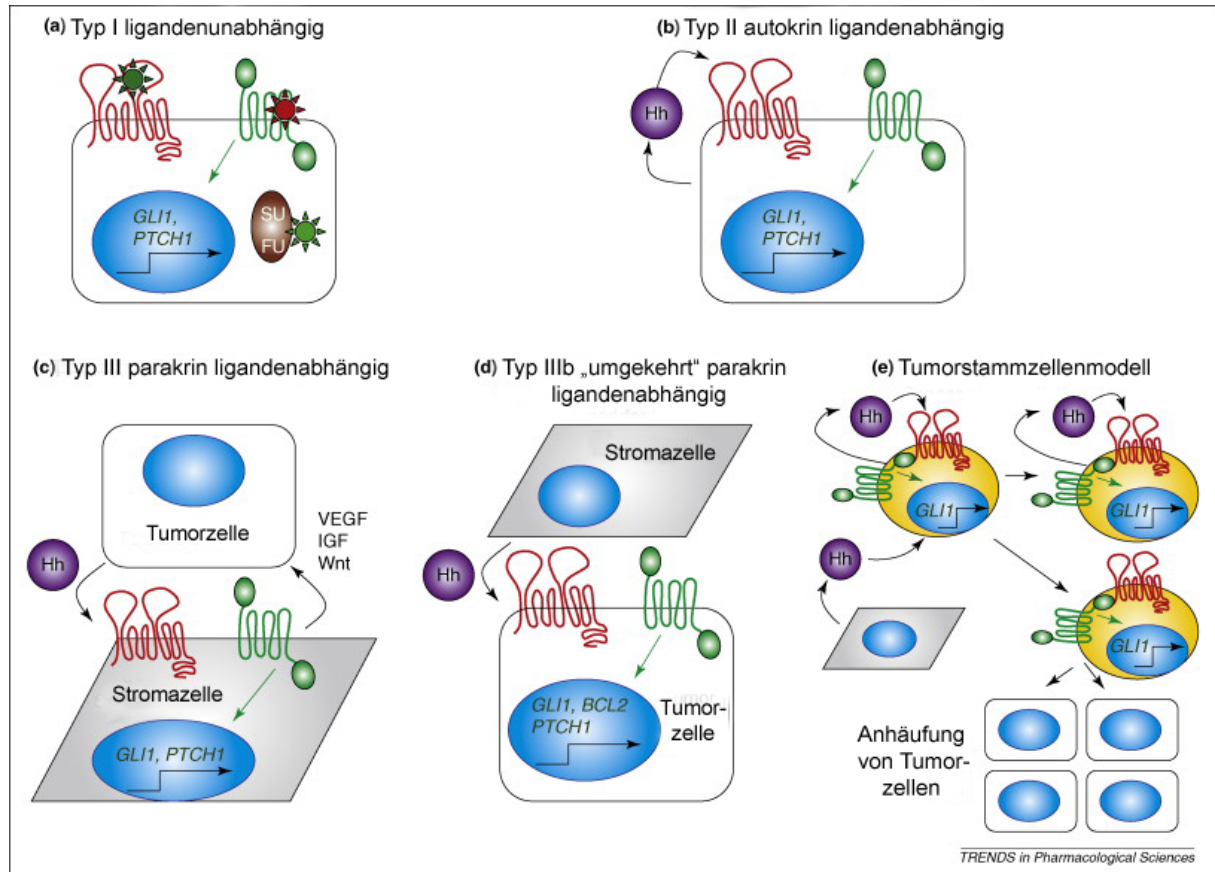


Abbildung 3: Schematische Darstellung möglicher Aktivierungsarten des Hedgehog-Signalwegs bei der Tumorentstehung.

(a) Typ I ligandenunabhängige Tumore tragen inaktivierende Mutationen (grüner Stern) in den negativen Regulatoren PTCH1 oder SUFU oder aktivierende Mutationen (roter Stern) in SMO, welche zur autonomen Aktivierung des Signalwegs auch in Abwesenheit des Liganden und als Folge daraus zur Expression von Zielgenen wie GLI1 und PTCH1 führen. (b) Typ II ligandenabhängige, autokrine Tumore sezernieren Hedgehog und reagieren selbst darauf. Dies führt ebenfalls zu einer autonomen Aktivierung des Signalwegs. (c) Typ III ligandenabhängige, parakrine Tumore sezernieren Hedgehog, das an den Rezeptor PTCH1 stromaler Zellen bindet. Daraus resultiert eine Aktivierung des Signalwegs in diesen Stromazellen. Die Stromazellen antworten darauf mit der Sekretion von Wachstumsfaktoren (wie IGF, VEGF und WNT). (d) Typ IIIb ligandenabhängige, „umgekehrt“ parakrine Tumore werden durch Hh, das von Stromazellen (wie dem Knochenmark oder den Lymphknoten) sezerniert wird, stimuliert, wodurch der Signalweg aktiviert wird und Überlebensgene wie BCL2 zusammen mit GLI1 und PTCH1 exprimiert werden. (e) Das Tumorstammzellenmodell postuliert, dass der Hh-Signalweg nur in sich selbsterneuernden, putativen Tumorstammzellen (gelb), die entweder selbst Hh-Ligand produzieren oder diesen von Stromazellen empfangen, aktiv ist. Ein Teil der Tumorstammzellen differenziert dann zu Zellen aus, in denen der Hh-Signalweg nicht mehr aktiv ist und welche die Tumormasse ausmachen. Legende: PTCH1, rot; SMO, grün; SUFU, braun; Hh, violett; Zellkern, blau; Tumorzelle, weißes Rechteck; Stromazelle, graue Raute; Tumorstammzelle, gelber Kreis. Schema modifiziert nach Scales et al. 2009 [134]

Die Vielzahl der Erkrankungen, die auf eine Beteiligung des Hedgehog-Signalwegs zurückzuführen sind, führte schnell zur Erforschung möglicher Therapieansätze. Die

erste vielversprechende Substanz wurde aufgrund von Ereignissen in den 50er Jahren entdeckt. Farmer in Idaho, USA, waren ratlos, als immer wieder Schafe mit schweren Geburtsdefekten, u.a. Zyklopie, geboren wurden (Abbildung 4). Forscher benötigten mehrere Jahre um einen Zusammenhang zwischen diesen Fehlbildungen und einem Liliengewächs namens *Veratrum californicum* herzustellen. Wurde diese Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt der Gestation von den Mutterschafen gefressen, kamen deren Lämmer mit schweren Fehlbildungen zur Welt [135-137]. Die ursächliche Substanz war bald gefunden [138]. Aufgrund der häufig auftretenden Zyklopie wurde diese Cyclopamin genannt.

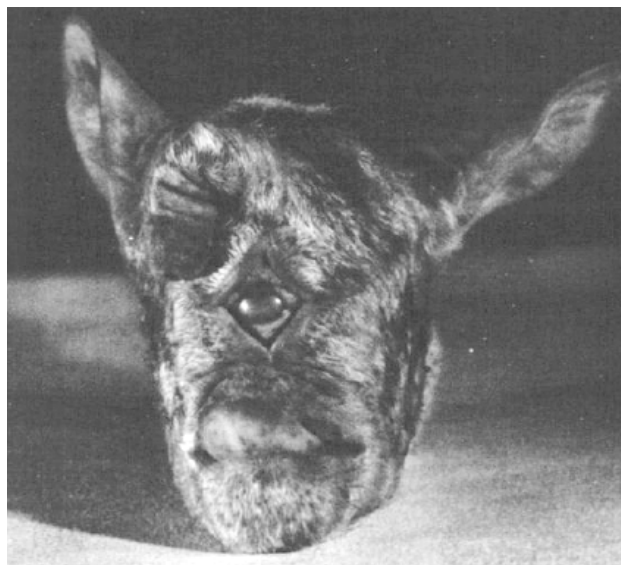


Abbildung 4: Fehlgebildetes Lamm.

Dieses Bild zeigt ein Lamm, welches nach maternaler Ingestion von *Veratrum californicum* während der Trächtigkeit mit Cyclopie geboren wurde. Abbildung übernommen von Binns *et al.* [139]

Jedoch erst 1998 wurde Cyclopamin mit der Inaktivierung des Hedgehog-Signalwegs assoziiert [140]. Zwei Jahre später konnte nachgewiesen werden, dass Cyclopamin auf Smoothened inhibierend wirkt und wurde damit als möglicher gezielter Repressor bei aberranter Hedgehog-Aktivierung in Tumoren entdeckt [141]. Daraufhin wurde Cyclopamin als mögliches Mittel zur Behandlung von verschiedenen Tumorarten, die mit einer Überaktivierung des Hedgehog-Signalwegs assoziiert werden, analysiert. Erste klinische Erfolge wurden im Herbst 2009 in der Behandlung von Basalzellkarzinomen mit dem Cyclopamin-Derivat GDC-0449 gefeiert [142]. Mehr als die Hälfte der Patienten, die fortgeschrittenen oder inoperablen Hautkrebs hatten, reagierten positiv auf die Behandlung. Eine Fallstudie eines 26-jährigen Patienten mit metastasenbildendem Medulloblastom, welches hohe Resistenz gegen eine Vielzahl

von Therapien aufwies, zeigte eine rasche Regression des Tumors und eine starke Verbesserung der Symptome durch GDC-0449 [143]. Dieser Effekt kehrte sich jedoch um, als der Patient eine Mutation entwickelte, die ihn gegen das Cyclopamin-Derivat resistent machte. Dennoch verdeutlichen diese ersten klinischen Erfolge die große Relevanz möglicher gegen den Hedgehog-Signalweg gerichteter Therapeutika.

1.3 Embryonale Tumore

Embryonale Tumore entstehen während der Ausdifferenzierung von Organen oder Geweben aus Vorläuferzellen – sogenannten blastemalen Zellen oder Blasten – und werden infolgedessen häufig als Blastome bezeichnet, wie z.B. das Hepatoblastom, das Nephroblastom und das Neuroblastom. Charakteristisch ist der geringe Differenzierungsgrad, der embryonalem Gewebe sehr ähnlich ist und den Stammzellcharakter dieser Tumorzellen bedingt.

Patienten mit embryonalen Tumoren sind ausschließlich Kinder. Im Gegensatz zu Tumoren bei Erwachsenen weisen diese nur wenige Mutationen auf [2]. Dies macht die Erforschung von embryonalen Tumoren besonders interessant, da es nur einer sehr geringen Zahl genetischer oder auch epigenetischer Veränderungen bedarf, um ein aberrantes Proliferationsverhalten auszulösen. Mit dieser Arbeit werden embryonale Tumore der Leber und des Skelettmuskels näher untersucht – das Hepatoblastom und das Rhabdomyosarkom.

1.3.1 Das Hepatoblastom

Hepatoblastome (HB) sind klassisch embryonale Tumore, die bei Kindern meist in einem Alter von 6 bis 36 Monaten auftreten [144, 145]. Folglich sind diese unterschiedlich stark ausdifferenziert und können verschiedene Stadien der Leberentwicklung repräsentieren. So sind beim rein epithelialen Typ stark ausdifferenzierte fetale oder nur kaum differenzierte, aggressiver wachsende embryonale Leberzellen und Bereiche primitiver blastemaler Zellen erkennbar [44, 145]. Der gemischte Typ hingegen weist epitheliales Gewebe auf, welches von mesenchymalen Elementen wie unausgereiftem fibrösem Gewebe, Spindelzellen und Osteoid durchsetzt ist [44, 145]. Diese gemischt epithelial-mesenchymalen Neoplasien beinhalten häufig hämatopoetische Bereiche. Manche HB beinhalten

außerdem teratoides Gewebe mit Zellen, die neuronalen oder endokrinen Zellabkömmlingen ähneln [145].

Mit einer Inzidenz von 0,5 bis 2,5 pro einer Million Kinder ist das Hepatoblastom einer der seltensten soliden Tumore im Kindesalter (ca. 0,3% – 2,0%) [145, 146]. Die Zahl steigt jedoch kontinuierlich. Dies wird mit einer erhöhten Überlebensrate von Frühgeburten, die ein sehr geringes Geburtsgewicht aufweisen, in Zusammenhang gebracht [147, 148]. Die meisten Hepatoblastome werden bei Kindern unter 18 Monaten diagnostiziert. Hier beträgt die Inzidenz 11,2 Fälle pro Million. Jungen sind dabei häufiger betroffen als Mädchen (1,2 – 3,6:1) [149].

Hepatoblastome sind trotz des geringen Vorkommens durchaus klinisch relevant, zumal zwei Drittel bösartig sind und der Verlauf bei Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasenbildendem HB nach wie vor fatal sein kann. Dies gilt ungeachtet des hohen 3 Jahres-Überlebens von über 70%, welches auf große Verbesserungen in der Therapie zurückzuführen ist, die aktuell aus einer Kombination von Chemotherapie (z.B. Cisplatin, Doxorubicin), Resektion und selten auch Transplantation besteht [149, 150].

Ein großer Anteil von Hepatoblastomen weist aktivierende Mutationen im *β-Catenin*-Gen [151-154] mit daraus resultierenden Fehlregulationen des Wingless (Wnt)-Signalwegs auf. Auch inaktivierende Mutationen der negativen Regulatoren des Wnt-Signalwegs *AXIN1* und *AXIN2* [154, 155] wurden berichtet. Ebenfalls beschrieben sind der Verlust der Heterozygotie sowie der Verlust von Prägung am *IGF2/H19*-Lokus auf Chromosom 11 [156, 157], Amplifikation und Überexpression des positiven *IGF2*-Regulators *PLAG1* [158] sowie Trisomien von Chromosom 2, 8 und 20 [153, 159-162] und Deletionen in Chromosom 4 [153, 163, 164].

Desweiteren werden Hepatoblastome mit verschiedenen Syndromen, z.B. dem Beckwith-Wiedemann Syndrom, in Zusammenhang gebracht [165]. Ferner ist die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung eines Hepatoblastoms bei Kindern aus Familien mit Fällen familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) 750- bis 7500-mal höher [166-168], woraus sich für Kinder von FAP-Patienten eine Inzidenz zwischen 0,42 % und 0,75 % ergibt [166, 168].

1.3.2 Das Rhabdomyosarkom

Mit einer Inzidenz von 5,3 pro einer Millionen und einem Anteil von 4-5% an allen pädiatrischen Malignomen ist das Rhabdomyosarkom (RMS) der häufigste Weichteiltumor bei Kindern [169]. Da RMS aus primitiven mesenchymalen Zellen entsteht, kann es überall im Körper auftreten. Die häufigsten Vorkommen sind: urogenital (24%), parameningeal (16%), an den Extremitäten (19%), orbital (9%), andere Bereiche an Kopf und Nacken (10%) und sonstige andere Regionen (22%) [170-174]. Je nach Lokalisation des Tumors variieren die Symptome und Beschwerden der Patienten [175]. Treten klinisch detektierbare Metastasen auf (bei ca. 15-20%) [170-172], befinden sich diese meist in Lunge, Knochenmark und Knochen [176].

Es wurden Zusammenhänge von RMS mit verschiedenen Syndromen berichtet, wie z.B. der Neurofibromatose Typ 1 [177], dem Beckwith-Wiedemann Syndrom [178, 179] und dem Li-Fraumeni-Syndrom [180, 181]. Trotzdem scheint der Großteil der Fälle sporadisch aufzutreten [175].

Allen Tumoren ist eine positive immunohistochemische Färbung bestimmter struktureller Proteine des Skelettmuskels, wie α -Aktin, schnelles Myosin sowie die schwere Kette des Myosins und bestimmter Proteine, die nicht spezifisch für Muskelgewebe sind, wie Desmin und Vimentin, gemein [182-184]. Es werden zwei histologische Hauptklassen unterschieden – das alveoläre Rhabdomyosarkom (ARMS) und das embryonale Rhabdomyosarkom (ERMS), zu dem auch botryoide Varianten gezählt werden [185].

Die häufigste Form von RMS (über 50%) ist das embryonale Rhabdomyosarkom (ERMS), das vermehrt bei Kindern bis zu einem Alter von 10 Jahren und sogar bereits intrauterin auftreten kann [175, 185]. Mit einem 3-Jahre-tumorfreien-Überleben von 83% ist die Prognose bei ERMS verhältnismäßig gut [186].

Die Histologie ist durch primitive Spindelzellen, häufig mit myxoiden Bereichen, charakterisiert. Selten treten auch botryoide Varianten auf, die makroskopisch als traubenartige Masse erkennbar sind. Genetisch ist ERMS durch einen Verlust der Heterozygotie des kurzen Arms von Chromosom 11 (11p15.5) charakterisiert [187-189]. Diese Region beinhaltet das Gen *IGF2*, welches in RMS überexprimiert wird [190].

Das seltener auftretende alveoläre Rhabdomyosarkom ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (66% 3-Jahre-tumorfreies-Überleben) [186] und wird hauptsächlich bei Jugendlichen diagnostiziert [185]. Es ist charakterisiert durch PAX3- bzw. PAX7-FKHR-Fusionsproteine, die durch reziproke Translokationen von Chromosom 2 bzw. auch Chromosom 1 mit Chromosom 13 entstehen (Abbildung 5) [191, 192].

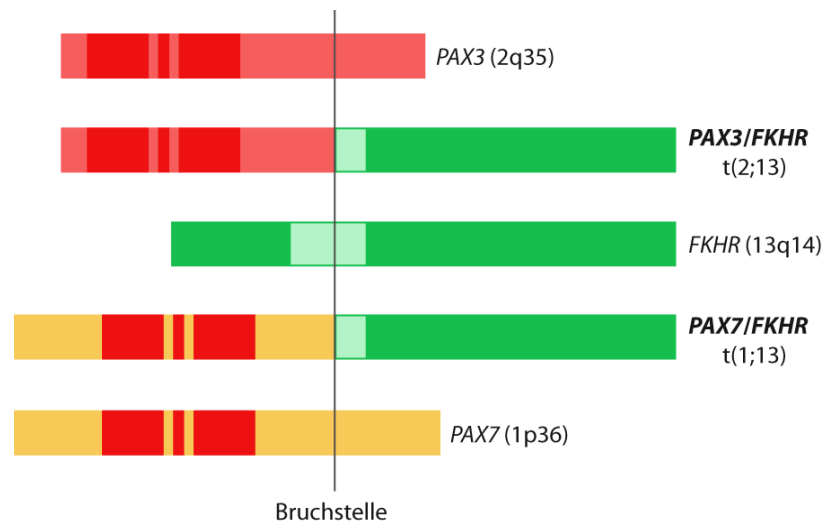


Abbildung 5: PAX3/FKHR- und PAX7/FKHR-Fusionsgene im alveolären Rhabdomyosarkom.

PAX3/FKHR-Proteine entstehen durch die Fusion von PAX3, lokalisiert auf 2q35 und FKHR, lokalisiert auf 13q14. PAX7/FKHR-Fusionsproteine wiederum entstehen durch die reziproke Translokation von Chromosom 1 und 13. Modifiziert nach Meyer *et al.* 2004 [175]

Histologisch ist ARMS – wie auch bereits der Name sagt – durch runde oder ovale Tumoraggregate gekennzeichnet, die oft mit einem Verlust zellulärer Adhäsion verbunden sind und so alveoläre Räume, die von fibrösen Septen umgeben sind, ausbilden [175].

2 Aufgabenstellung

Der Hedgehog-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung. Während durch einen reprimierten Hh-Signalweg schwerwiegende Entwicklungsstörungen entstehen, wird durch eine Überaktivierung des Signalwegs die Tumorentstehung begünstigt. Die Feinabstimmung der Aktivität des Hh-Signalwegs durch verschiedenste Komponenten ist somit von enormer Bedeutung. Die Hypothese, die mit dieser Arbeit geprüft werden sollte, geht davon aus, dass der Hedgehog-Signalweg in embryonalen Tumoren aufgrund epigenetischer Fehlregulierung auch nach Beendigung der embryonalen Entwicklung aktiv bleibt und dies zur Tumorentstehung beiträgt.

Deshalb sollten in dieser Arbeit Rhabdomyosarkom- und Hepatoblastomzelllinien zunächst auf eine durch Promotor-Methylierung reprimierte Expression Hh-assoziiertes Komponenten analysiert werden. Hierzu sollten die Zelllinien unter Einsatz eines demethylierenden Agens auf eine mögliche Reaktivierung der Gene *HHIP*, *IHH*, *SPRY2*, *FOXA2*, *SUFU*, *PTCH1* und *ULK3* untersucht werden. Für eine anschließende detaillierte Analyse des Methylierungsgrades sollte die Methode der Bisulfitsequenzierung etabliert und angewandt werden.

Nach erfolgreicher Identifizierung durch DNA-Methylierung reprimierter Gene und der Validierung ihrer klinischen Relevanz anhand von Primärtumoren sollten diese durch Gabe von rekombinantem Protein sowie durch Transfektion exogen wieder eingebracht werden. Anhand dieser Experimente sollten mögliche Auswirkungen auf Proliferation und Apoptose der Tumorzellen analysiert werden.

Zusammenfassend sollten diese Ergebnisse eine Aussage über einen möglichen Einsatz demethylierender Agenzien in der Tumorthherapie ermöglichen.

3 Verwendete Materialien

3.1 Zelllinien

Prokaryotische Zellen:

TOP10F' Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Die verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in der nachstehenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten eukaryotischen Zelllinien.

Bez	Ursprung	Bezogen von	Kultivierungsmedium
HUH6	Humanes Hepatoblastom	JCRB, Osaka, Japan	RPMI + 10 % FBS
HepT1	Humanes Hepatoblastom	Prof. Dr. Torsten Pietsch [193]	RPMI + 10 % FBS
HepT3	Humanes Hepatoblastom	Prof. Dr. Torsten Pietsch [193]	RPMI + 10 % FBS
HepG2	Humanes Hepatoblastom	ATCC, Manassas, VA, USA	RPMI + 10 % FBS
RD	Humanes ERMS	ATCC, Manassas, VA, USA	D-MEM + 10 % FBS
RH-30	Humanes ARMS	DSMZ GmbH, Braunschweig	RPMI + 10 % FBS
RMS13	Humanes ARMS	ATCC, Manassas, VA, USA	RPMI + 10 % FBS
Shh Light II	Stabil transfizierte murine Fibroblasten (NIH/3T3)	ATCC, Manassas, VA, USA	D-MEM + 10 % FBS + 0,4 mg/ml G418 + 0,15 mg/ml Zeocin

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), der Ursprung, die Bezugsstelle und das verwendete Kultivierungsmedium genannt. Bei der Shh Light II-Zelllinie handelt es sich um NIH/3T3-Zellen, die stabil mit einem Gli-responsivem Firefly Luciferase-Reporter [194], pSV-Neo (Neomycinresistenz-Plasmid), pRL-TK (Renilla Luciferase-Expressionsplasmid) und pVgRXR (Zeocinresistenz-Plasmid) transfiziert wurden.

3.2 Kulturmedien

Medien für prokaryotische Zellen:

LB-Medium (Luria/Miller) Carl Roth GmbH, Karlsruhe

LB-Agar (Luria/Miller) Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Medien für eukaryotische Zellen:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (1x), liquid (High Glucose) – with GlutaMAX™ I Invitrogen GmbH, Karlsruhe

RPMI 1640 Medium (1x), liquid – with GlutaMAX™ I Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Einfriermedium: 50 ml FBS
 40 ml DMEM
 12,5 ml DMSO

3.3 Antibiotika

Antibiotika zur Selektion prokaryotischer Zellen:

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Antibiotika zur Selektion eukaryotischer Zellen:

G418	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zeocin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.4 Enzyme

CpG Methyltransferase (M.SssI)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
<i>EcoRI</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Maxima Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ribonuclease H (RNase H)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

3.5 Plasmide

pcDNA3	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pcDNA3Hip	zur Verfügung gestellt von Dr. Andrew McMahon, Harvard University Biolabs, Cambridge, MA, USA [90]
pDEST26	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pEGFP-N1	Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA
RZPDo839G01142-pDEST26 (pDEST26HHIP)	imaGenes GmbH, Berlin

3.6 Größenstandards

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

3.7 Primer

Für die cDNA-Synthese wurden „random“ Primer von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim verwendet. Die Primersequenzen für die anderen Anwendungsbereiche sind in den nachstehenden Tabellen aufgelistet und wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen:

Tabelle 3: Auflistung aller für die quantitative *real-time* PCR verwendeten Expressionsprimer.

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev	AL	Lok
FOXA2	GACTGGAGCAGCTACTATGCAGAG	CATGCCGTTTCATCCCCA	81	Ex2/3
BCL2	CGCCCTGTGGATGACTGAGTAC	CAAACAGAGGCCGCATGCT	113	Ex2/3
BCL-XL	GGGACAGCATATCAGAGCTTTGA	AGCGTTCCTGGCCCTTTC	91	Ex2/3
BIRC5	GGACAGAGAAAGAGCCAAGAACAA	CCAGCTGCTCGATGGCAC	134	Ex3/4
GLI1	AGCTACATCAACTCCGGCCA	GCTGCGGCGTTCAAGAGA	115	Ex11/12
HHIP	TGTACATCATTCTTGGTGATGGG	AGCCGTAGCACTGAGCCTGT	91	Ex6/7
IGF2	CCTCCGACCGTGCTTCC	GGTGGACTGCTTCCAGGTGT	81	Ex3/4
IGFBP3	GTCCAAGCGGGAGACAGAATAT	CCTGGGACTCAGCACATTGA	91	Ex2/3
IHH	GGCTTTGACTGGGTGTATTACGA	AGCAGCCGCCCGTCTT	91	Ex2/3
PTCH1	TTGATTGTGGGTGGCACAGT	GCTTGGGAGTCATTAAGTGAAC	89	Ex7/8
RASSF1A	GGCGTCGTGCGCAA	GATCTTCTGCTCAATCTCAGCTTG	91	Ex1/2
SPRY2	GCCCTCACCCAGCAGGTAC	GGACGACAGTAGGCCCTCT	91	Ex2
SUFU	ATGCTGCTGACAGAGGACCC	CTTCAGTGCAGACACCAACGAT	91	Ex4/5
ULK3	ATCCTCAAGGGCATTTCGACA	CGCAAACCTCCATGATGAGGT	92	Ex2/3
TBP	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	72	Ex4/5
mHip	TGTACATCATCCTTGGGGATGG	AGCCTCAGCACAGAGCCTGT	91	Ex6/7

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (Sequenz fw) und des Rückwärts-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung, die Amplikonlänge (AL) in Basenpaaren und die Lokalisation (Lok) der Primer innerhalb des Gens anhand der Exons (Ex) angegeben. Alle genannten Primer bis auf mHip sind spezifisch für humane Gene. Die mHip-Primer sind spezifisch für murines Hip.

Tabelle 4: Auflistung aller für die methylspezifische PCR verwendeten Primer.

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev	AL	Lok
HHIP				
M	AGTAGTCGGGTAGTTTCGGAATTTTC	GAACCTTCGAAACCAACCTCG	143	230
U	TTGTAGTAGTTGGGTAGTTTTCGGAATTTT	AAACCTTCAAACCAACCTCAAAA	144	231
PTCH1				
M	CGCGCGCGTGTGTGC	CCTCGACTTCGAAACAACCTCTAAAAAC	150	1062
U	TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAA	TCCTCAACTTCAAACAACCTCTAAAAAC	155	1066

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (Sequenz fw) und des Rückwärts-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung, die Amplikonlänge (AL) in Basenpaaren und die Lokalisation (Lok) in Basenpaare 5' vom Transkriptionsstart angegeben. Die Hybridisierungs-Temperaturen der *HHIP*-Primer lagen bei 58 °C und der *PTCH1*-Primer bei 62 °C.

Tabelle 5: Auflistung aller für die Bisulfitsequenzierungs-PCR verwendeten Primer.

Bez	Sequenz fw	Sequenz rev	AL	Lok
HHIP	GGGAGATAAAGGGTTTAAAAG	TACAACCTTCACACAACCTCTC	627	- 467 – +160
PTCH1 R1	GTTGTAGTTTGAGGTTAAGGTGTTTT	CTATCAAATAACTTAAATTTCTA	422	-1193 – - 771
PTCH1 R2	GTAGAAATTTAAGTTATTTGATAGT	CTCCAAAACTACTACT	359	- 795 – - 420
PTCH1 R3	GAGTATAAGAAAGTAGAGTT	CCTTCCATTACCACATTAC	477	- 523 – - 46
SUFU	ATATTAGTTAATGGGTGTTTG	AAAAAACTAAAAAAAACAAA	241	- 117 – +124

Es sind jeweils die Bezeichnung (Bez), die Sequenz des Vorwärts-Primers (Sequenz fw) und des Rückwärts-Primers (Sequenz rev) in 5'-3'-Richtung, die Amplikonlänge (AL) in Basenpaaren und die Lokalisation (Lok) in Basenpaare relativ zum Transkriptionsstart angegeben.

Für die Bisulfitsequenzierung wurde folgender Primer zur Sequenzierung des jeweiligen Inserts verwendet:

M13 fw 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

3.8 Rekombinante Proteine

Recombinant Mouse Hip (rmHip)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Recombinant Mouse Sonic Hedgehog	
N-Terminus (rmShh-N)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden

3.9 Chemikalien und Reagenzien

6x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
5-Aza-2'-deoxycytidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calcein, AM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Cyclopamin	Toronto Research Chemicals, Inc., Toronto, Kanada
Dimethylformamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTPs (100 mM)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1x), without CaCl ₂ , MgCl ₂	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetracyanat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
FuGENE [®] 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SAM (S-adenosylmethionine)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TRI Reagent [®] RNA Isolation Reagent	Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled	
Water	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
X-Gal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.10 Puffer

STE-Puffer: 10 mM TRIS, pH 8,0
 0,1 M NaCl
 1 mM EDTA
 1 % SDS

TBE-Puffer: 89 mM TRIS, pH 8,0
 2 mM EDTA
 89 mM Borsäure

TE-Puffer: 10 mM TRIS, pH 8,0
 1 mM EDTA

3.11 Kits

Annexin V-Cy5 Apoposis Detection Kit	BioVision, Mountain View, CA, USA
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega GmbH, Mannheim
EpiTect Bisulfite Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
FlexiGene DNA Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
TA Cloning® Kit (with pCR®2.1 vector)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.12 Verbrauchsmaterial

5er Reihe 0,2 ml PCR Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg
BD Falcon™ Round-Bottom 14 ml Tubes	BD, Heidelberg
Biosphere® Filterspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
EasyFlasks™ Zellkulturflaschen	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
LumiNunc™ Microwell Plates	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Multidishes Nunclon™	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold
Nalgene® Kryoröhrchen	Schubert & Weiss GmbH, München
PP-Schraubverschluss Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Standard 96 Well PCR Plates	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Costar® Stripette® Serological Pipets	Corning GmbH, Wiesbaden
Zellschaber	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.13 Geräte

2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Biofuge fresco	Heraeus GmbH, Hanau
Biofuge pico	Heraeus GmbH, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge 5702	Eppendorf AG, Hamburg
Centrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Centrifuge LMC-3000	Kisker-Biotech, Steinfurt
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Excella® E24 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Feinwaage Te1245	Sartorius AG, Göttingen
GelJet Imager	Intas Science Imaging GmbH, Göttingen
GENios Microplatereader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Homogenisator Miccra	ART Labortechnik, Mühlheim
Magnetrührer MR 3001	Heidolph-Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskop IX50	Olympus Europa GmbH, Hamburg

Mini[®]-Sub Cell GT

pH-Meter inoLab pH720

PowerPac Basic[™]

Sicherheitswerkbank Hera Safe

Thermomixer Comfort

Thermomixer Compact

Waage Vic-1501

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

WTW Wissenschaftlich-Technische

Werkstätten GmbH, Weilheim

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf AG, Hamburg

Acculab, Edgewood, NY, USA

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivieren und Passagieren eukaryotischer Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden möglichst rasch in der Hand aufgetaut und in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem mit 10 % FBS versetztem Zellkulturmedium 5 Min. bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer 25 cm²-Zellkulturflasche über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

Bei einer Konfluenz von 90 bis 100 % wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden sie mit D-PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin 3 – 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit FBS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde dann je nach Bedarf aufgeteilt und mit frischem Medium aufgefüllt.

HepT3-Zellen wurden als einzige Zelllinie durch Abschaben und anschließendes starkes Resuspendieren passagiert, da diese Zellen in Multi-Layern wachsen und dadurch nicht für das Abtrypsinieren geeignet waren.

4.1.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden zur Konservierung abtrypsiniert (→4.1.1) und das Pellet in einer adäquaten Menge Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und mindestens 24 Stunden bei -80 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.1.3 Stabile Transfektion

Um HepG2-Zellen stabil mit den Plasmiden pcDNA3, pcDNA3Hip, pDEST26, pDEST26HHIP und pEGFP-N1 zu transfizieren, wurden pro Ansatz 2 x 10⁵ Zellen/Well in einer 6-Well-Platte über Nacht kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit Fugene[®] 6 Transfection Reagent nach folgendem Protokoll:

- 3 µl Fugene[®] 6 in 100 µl RPMI-Medium (ohne Zusätze) geben, gut mischen und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubieren

- 1 µg Plasmid-DNA zugeben, gut mischen und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- 1,9 ml frisches RPMI-Medium (+ 10 % FBS) und den Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen geben

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde parallel eine Transfektion mit pEGFP-N1 durchgeführt. Alle verwendeten Plasmide tragen ein Neomycin-Resistenzgen. Deshalb wurde nach 48 Stunden zur Selektion stabil transfizierter Zellen eine Behandlung mit 400 µg/ml des Neomycin-Analogons G418 durchgeführt. Anhand der Kontroll-Transfektion mit pEGFP-N1 wurde in regelmäßigen Abständen der Anteil stabiler Zellen an der Gesamtzellpopulation mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Dem Zellkulturmedium wurde so lange G418 zugesetzt, bis 100 % der pEGFP-N1-transfizierten ein EGFP-Fluoreszenzsignal zeigten. Die Zellen wurden anschließend kryokonserviert (→4.1.2) oder mittels verschiedener Experimente analysiert. Bei der weiteren Kultivierung der stabil transfizierten Zellen wurde dem Medium ebenfalls G418 zugesetzt.

4.1.4 Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Zur Demethylierung wurde 5-Aza-2'-deoxycytidin (kurz: Aza) verwendet. Aza weist eine ähnliche Struktur wie Cytosin auf und wird bei der Replikation in die DNA integriert. DNA-Methyltransferasen werden durch die Bindung an solche Cytosin-Analoga inaktiviert. Eine passive Demethylierung ist die Folge.

Aza wurde in Pulverform bezogen und in 50 % Essigsäure gelöst (Stock: 50 mM). RMS-Zellen wurden fünf Tage mit 1 µM Aza, HB-Zellen mit 2 µM Aza oder der entsprechenden Menge reinem Lösungsmittel behandelt. Hierzu wurden die Zellen vor der Behandlung bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % – 80 % kultiviert. Das mit Aza versetzte Medium wurde alle 24 Stunden gewechselt.

4.1.5 Luciferase Reporter-Assay

Die inhibierende Wirkung von rekombinantem Hip wurde anhand eines Luciferase Reporter-Assays mit Shh Light II-Zellen untersucht. Hierzu wurden 2×10^5 Zellen/Well in einer 24-Well-Platte ausgesät und 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit D-PBS gewaschen, zwei Stunden mit D-MEM mit 0,5 % FBS erneut inkubiert. rmShh-N und rmHip wurden in 1 % BSA

(Stock jeweils 250 µg/ml), Cyclopamin in Methanol gelöst (Stock: 10 mM) und die Zellen 30 Stunden mit 2 µg/ml rmShh-N, 7,5 µM Cyclopamin und 0,5 bzw. 5 µg/ml rmHip behandelt.

Die von einem Gli-abhängigen Reporter gesteuerte Expression der Firefly Luciferase wurde mit dem Dual-Glo™ Luciferase Assay System detektiert. Hierzu wurden die behandelten Shh Light II-Zellen mit 50 µl D-MEM und 50 µl Dual-Glo™ Luciferase Reagent 10 Min. unter Schütteln lichtgeschützt inkubiert und anschließend durch Resuspendieren lysiert. 90 µl des Lysats wurden in eine LumiNunc™ Microwell Platte überführt und die Emission der Firefly Luciferase im GENios Microplatereader gemessen ($\lambda = 562 \text{ nm}$).

Zur Normierung wurde zusätzlich die Emission der Renilla Luciferase bestimmt. Hierzu wurden 50 µl Dual-Glo™ Stop & Glo® Reagent zugegeben, der Ansatz 10 Min. inkubiert und die Emission gemessen.

4.1.6 Proliferationsassay

Um die Auswirkungen von rekombinantem Hip auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurde ein MTT Assay mit 0,5 µg/ml rmHip, 5 µg/ml rmHip und mit 7,5 µM Cyclopamin als Positivkontrolle durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten die Lösungsmittel 1 % BSA und Methanol. Hierzu wurde mit Hilfe des Cell Proliferation Kit I (MTT) die Umsetzung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (gelb) zu Formazan (violett) untersucht. Je höher die Umsetzungsrate umso höher ist die Zellviabilität. Hierzu wurden pro Ansatz achtmal 5×10^3 Zellen/Well in einem Gesamtvolumen von 100 µl Zellkulturmedium in eine 96-Well-Platte ausgesät. Jeweils zwei Wells mit Zellen wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ und alle 24 Stunden bis zum Zeitpunkt $t = 72$ Stunden mit 10 µl MTT Labeling Reagent versetzt. Nach vier Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden 100 µl Solubilization Solution zugegeben und über Nacht erneut inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im GENios Microplatereader gemessen.

Das Proliferationsverhalten der stabil transfizierten HepG2-Zellen (→4.1.3) wurde ebenfalls mittels MTT Assay analysiert. Hierzu wurden wiederum 5×10^3 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und die MTT-Reaktion wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Der Zeitpunkt $t = 0$ Stunden war abhängig von der Art der Analyse. Bei den stabil transfizierten HepG2-Zellen war dies 4 Stunden nach dem Aussäen. Zellen, die mit rekombinantem Protein behandelt wurden, wurden zunächst über Nacht bei 37 °C und 5,0 % kultiviert. Hier wurde am nächsten Tag sofort nach der Behandlung die erste MTT-Reaktion angesetzt.

4.1.7 Annexin V-Färbung

Die Auswirkung von rekombinantem Hip (rmHip) auf die Apoptose von HB-Zellen wurde mittels Annexin V-Färbung untersucht. Dazu wurden je 5×10^5 HUH6-, HepT1- und HepG2-Zellen in jeweils zwei Wells einer 6-Well-Platte in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit 10 % FCS versetztem RPMI-Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen und zwei Stunden mit 1 ml RPMI-Medium mit 0,5 % FCS inkubiert. Darauf folgten 30 Stunden Behandlung mit 5 µg/ml rmHip bzw. mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel (1 % BSA). Mit der anschließenden Annexin V-Calcein-Färbung wurde der Anteil der apoptotischen Zellen in der Population aller lebenden Zellen bestimmt. Lebende Zellen sind dabei Calcein-positiv. Frühe Stadien der Apoptose können mittels Annexin V-Nachweis aufgezeigt werden. Annexin V hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen, die zu Beginn der Apoptose an der Zelloberfläche präsentiert werden. Zellen, die sowohl eine Calcein-Färbung als auch eine Bindung eines fluoreszenzmarkierten Annexin V-Antikörpers aufweisen, befinden sich in einer frühen Phase der Apoptose.

Die Annexin V-Calcein-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Abtrysinierte Zellen mit 1 ml D-PBS waschen und 3 Min. mit 2000 rpm zentrifugieren
- Zellpellet in 500 µl Bindepuffer resuspendieren, 2,5 µl 1 mM Calcein AM zugeben und Ansatz 20 Min. bei 37 °C inkubieren
- 5 µl Cy5-Annexin V-Antikörper zugeben, weitere 10 Min. bei 37 °C inkubieren und 3 Min. mit 2000 rpm abzentrifugieren
- Pellet in 25 µl Zellpuffer resuspendieren und im 2100 Bioanalyzer mit dem Programm „Apoptosis fast assay“ messen

Zur Auswertung wurden die Calcein-positiven und somit lebenden Zellen gegatet. Alle Calcein- und zugleich Cy5-Annexin V-positiven Zellen wurden als apoptotisch gewertet.

4.1.8 Transformation

Für die Transformation von Bakterienzellen wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Pro Ansatz ein 50 µl-Aliquot kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10F') auf Eis auftauen, 4 µl des Plasmids zugeben und 30 Min. auf Eis inkubieren
- Nach 90 Sek. Hitzeschock bei 42 °C, die Zellen 5 Min. auf Eis inkubieren und anschließend in 2 ml vorgewärmtem LB-Medium (ohne Antibiotikum) zwei Stunden bei 37 °C unter Schütteln vermehren
- 100 µl der Bakterienkultur auf eine im Verhältnis 1:1000 mit Antibiotikum der Konzentration 50 mg/ml versetzte LB-Platte ausstreichen, kurz trocknen lassen und über Nacht über Kopf bei 37 °C inkubieren

Die restliche Flüssigkultur wurde maximal einen Monat bei 4 °C gelagert und konnte nach erneutem Schütteln von ca. einer Stunde bei 37 °C wiederverwendet werden. Die LB-Platten wurden ebenfalls bei 4 °C gelagert. Klone konnten noch ca. drei Monate nach Transformation von der Platte gepickt und kultiviert werden.

4.1.9 Blau-Weiß-Selektion

Der für die Klonierung (→4.2.7) verwendete pCR[®]2.1-Vektor beinhaltet ein *lacZ*-Gen, das für β-Galaktosidase kodiert. Dieses ist unterbrochen, wenn ein DNA-Fragment erfolgreich mit dem linearisierten Vektor ligiert. Kommt es zu einer Religation des pCR[®]2.1-Vektors ohne Insertion, wird das *lacZ*-Gen exprimiert. Klone mit Insert können von Klonen ohne Insert mit Hilfe des β-Galaktosidase-Substrats X-Gal voneinander unterschieden werden. Wird das *lacZ*-Gen exprimiert, wird X-Gal umgesetzt und es entsteht ein blauer Farbstoff. Ist das *lacZ*-Gen unterbrochen, kann X-Gal nicht gespalten werden und die Bakterienkolonien bleiben weiß.

Für diese Blau-Weiß-Selektion wurden vor dem Ausstreichen der Transformation auf mit Antibiotikum versetzten LB-Platten 40 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) verteilt. Weiße Klone wurden gepickt und weiter kultiviert (→4.2.6).

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 DNA-Isolierung aus adhärennten Zellen und Gewebe

Um DNA aus Tumorgewebe oder Normalgewebe zu isolieren, wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Zellen bzw. kleines Stück Gewebe (ca. 5 mm³) durch Zugabe von 1 ml STE-Puffer und 100 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C lysieren
- 1 ml Phenol zugeben, 5 Min. per Hand mischen und mit 8000 rpm 10 Min. bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand mit einem Volumen Chloroform 5 Min. per Hand mischen und mit 8000 rpm 10 Min. bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand in 2,5 ml 100 % Ethanol geben und vorsichtig mischen
- DNA für 5 Min. bei Raumtemperatur fällen und durch vorsichtiges Schwenken mischen, bis DNA-Knäuel entsteht
- DNA vorsichtig mit einer Pipette ansaugen, in 70 %igen Ethanol überführen und mit 12000 rpm 10 Min. bei 4 °C zentrifugieren
- DNA-Pellet erneut mit 70 %igem Ethanol waschen und anschließend lufttrocknen
- DNA je nach Größe des Pellets in 50 – 150 µl TE-Puffer für 10 Min. bei 60 °C lösen

Die Konzentration der DNA wurde anschließend mit einem BioPhotometer bestimmt. Daraufhin wurde die DNA direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

4.2.2 DNA-Isolierung aus humanem Blut

Genomische DNA wurde aus 14 ml Blut einer gesunden Kontrollperson mit Hilfe des FlexiGene DNA Kit nach Angaben des Herstellers isoliert und die DNA-Konzentration anschließend mit einem BioPhotometer gemessen.

4.2.3 RNA-Isolierung aus adhärennten Zellen

Die Isolierung von mRNA aus adhärennten Zellen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Zellen mit 2 ml Tri Reagent[®] lysieren und in zwei Ansätze aufteilen

- Jeweils 400 µl Chloroform zugeben, 15 Sek. vortexen und nach 3 Min. Inkubation bei Raumtemperatur mit 12000 rpm 10 Min. bei 4 °C zentrifugieren
- Die obere wässrige Phase abnehmen, mit einem Volumen Isopropanol mischen und nach 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur mit 12000 rpm 15 Min. bei 4 °C zentrifugieren
- Das RNA-Pellet mit 1,5 ml gekühltem 70 %igem Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation mit 7500 rpm für 5 Min. bei 4 °C waschen
- Das RNA-Pellet lufttrocknen lassen und danach in 50 µl Aqua dest. 15 Min. bei 55 °C lösen

Durch einen anschließenden Verdau mit DNase wurden verbliebene Spuren von DNA beseitigt. Hierzu wurden das RNeasy® Mini Kit und das RNase-Free DNase Set folgendermaßen verwendet:

- Maximal 100 µg RNA mit DNase/RNase-freiem Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 100 µl auffüllen
- Ansatz mit 350 µl RLT-Puffer (mit β-Mercaptoethanol in einem Verhältnis von 1:10 versetzt) mischen
- 250 µl Ethanol zugeben, mischen, den Ansatz auf eine RNeasy-Säule geben und mit 8000 rpm 15 Sek. bei Raumtemperatur zentrifugieren
- 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben und erneut mit 8000 rpm 15 Sek. zentrifugieren
- 10 µl DNase-Lösung mit 70 µl RDD-Puffer vorsichtig mischen, direkt auf die Membran geben und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren
- Nach Zugabe von weiteren 350 µl RW1-Puffer mit 8000 rpm 15 Sek. bei Raumtemperatur zentrifugieren
- 500 µl RPE-Puffer zugeben und mit 8000 rpm 2 Min. zentrifugieren
- Nach Verwerfen des Durchflusses erneut mit 12000 rpm 1 Min. zentrifugieren
- RNA durch Zugabe von 30 µl DNase/RNase-freiem Aqua dest., Inkubation für 1 Min. bei Raumtemperatur und Zentrifugation mit 8000 rpm für 1 Min. eluieren. Dieser Schritt wird anschließend wiederholt, um verbliebene RNA zu lösen.

Die RNA-Konzentration wurde anschließend mit dem BioPhotometer bestimmt. Daraufhin wurde die RNA weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

4.2.4 cDNA-Synthese

mRNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA nach folgendem Protokoll umgeschrieben:

- 2 µg RNA mit DNase/RNase-freiem Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 7 µl auffüllen und mit 5 µl 20 ng/µl „random“ Primer 10 Min. bei 70 °C inkubieren
- 4 µl 5x 1st Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTPs zugeben, 10 Min. bei 25 °C bzw. Raumtemperatur inkubieren
- Nach 2 Min. Inkubation bei 42 °C 1 µl SuperScript[®] II zugeben, vorsichtig mischen und eine Stunde bei 42 °C inkubieren
- SuperScript[®] II 10 Min. bei 70 °C inaktivieren
- Verbliebene RNA durch Zugabe von 1 µl RNase H und Inkubation für 20 Min. bei 37 °C verdauen
- Für eine Endkonzentration von 20 ng/µl cDNA 79 µl DNase/RNase-freies Aqua dest. zugeben

Die cDNA wurde anschließend verwendet oder bei -20 °C gelagert.

4.2.5 Quantitative *real-time* PCR

Expressionsanalysen wurden mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR durchgeführt. Hierzu wurden für jede zu untersuchende Probe in zwei Wells einer 96 Well-PCR-Platte jeweils 2 µl cDNA der Konzentration 20 ng/µl pro Gen vorgelegt, folgende Komponenten zugegeben:

- 10 µl 2x iTaq SYBR-Green
Supermix with ROX
- 1 µl Vorwärts-Primer (10 mM)
- 1 µl Rückwärts-Primer (10 mM)
- 6 µl Aqua dest.

und die PCR gemäß nachstehendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	2 Min. 95 °C
40 Zyklen: Denaturierung:	15 Sek. 95 °C
Hybridisierung:	15 Sek. 55 °C
Elongation:	20 Sek. 68 °C
Schmelzkurve:	15 Sek. 95 °C
	20 Min. 55 – 95 °C
	15 Sek. 95 °C
Hold:	4 °C

Die Schmelzkurve ermöglicht dabei die Analyse der Spezifität der Primerbindung. Zur Normierung der einzelnen Werte wurde zusätzlich die Expression des Haushaltsgens *TATA-Box-Binding Protein (TBP)* bestimmt. Die zu *TBP* relative Expression wurde gemäß folgender Gleichung nach Paffl *et al.* 2001[195] berechnet:

$$\text{Expression relativ zu Referenzgen} = 2^{-[\text{Ct zu untersuchendes Gen} - \text{Ct TBP}]}$$

Für Expressionsanalysen der Auswirkungen von rekombinantem Hip auf mit rmShh-N stimulierte Zellen, wurden 2×10^5 Zellen/Well HUH6-Zellen, 1×10^5 Zellen/Well HepT1-Zellen und 4×10^5 Zellen/Well HepG2-Zellen in einer 24-Well-Platte ausgesät und 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit D-PBS gewaschen, zwei Stunden mit RPMI mit 0,5 % FBS erneut inkubiert, anschließend für 30 Stunden mit 2 µg/ml rmShh-N, 7,5 µM Cyclopamin und 5 µg/ml rmHip behandelt und die Expression verschiedener Gene mittels quantitativer *real-time* PCR analysiert.

4.2.6 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden *E. coli*-Zellen transformiert (→ 4.1.8), gegebenenfalls selektioniert (→ 4.1.9) und anschließend in LB-Medium vermehrt. Je nach Antibiotikaresistenz des zu gewinnenden Plasmids wurde das LB-Medium zuvor 1:1000 mit einer Stammlösung von 50 mg/ml Kanamycin bzw. 50mg/ml Ampicillin versetzt. Plasmid Midi Präparationen wurden folgendermaßen durchgeführt:

- Kultivieren von 5 ml Vorkultur (= 5 ml LB-Medium + 5 µl Antibiotikum + ein transformierter Klon) für ca. 3 – 4 Stunden bei 37 °C im Schüttler mit 200 rpm

- 100 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) mit 2 ml der Vorkultur versetzen und über Nacht bei 37 °C schütteln

Alle weiteren Schritte wurden gemäß den Angaben des Plasmid Midi Kits durchgeführt.

Für Plasmid Mini Präparationen wurden 5 ml mit Antibiotikum-versetztes LB-Medium mit einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur gemäß den Angaben des Plasmid Mini Kits weiterverarbeitet.

4.2.7 TA-Klonierung

Zur direkten Insertion von PCR-Produkten in einen Plasmidvektor zur weiteren Amplifikation in Bakterien wurde der TA Cloning[®] Kit (mit pCR[®]2.1 Vector) verwendet. Bei diesem Verfahren macht man sich zu Nutze, dass *Taq* Polymerase an das 3'-Ende jedes Strangs des PCR-Produktes unspezifisch ein Adenosin anhängt. Dies ermöglicht eine Bindung an 3' Thymidin-Reste des linearisierten pCR[®]2.1-Vektors. Hierfür wurde das zu untersuchende DNA-Fragment zunächst mittels Agarosegel-Extraktion (→4.2.10) aufgereinigt und anschließend folgender Ligationsansatz über Nacht bei 14 °C inkubiert:

- 6 µl DNA (100 ng/µl)
- 1 µl Ligation Buffer (10x)
- 2 µl pCR[®]2.1-Vektor (25 ng/µl)
- 1 µl T4 DNA Ligase (4 Weiss units/µl)

Das Ligationsprodukt wurde anschließend weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

4.2.8 Restriktionsverdau

Zur Kontrolle der TA-Klonierung wurde ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt. *EcoRI* schneidet im pCR[®]2.1-Vektor wenige Basen vor und nach der Insertionsstelle, so dass bei einer erfolgreichen Ligation des gewünschten DNA-Fragments in den Vektor nach dem Verdau zwei Fragmente entstehen. Das größere Fragment ist wie der leere pCR[®]2.1-Vektor ca. 3,9 kb groß, das zweite entspricht bis auf wenige Basen der Größe des eingefügten PCR-Produkts.

Für diesen Testverdau wurde nach Amplifikation der Plasmid-DNA und anschließender Plasmid Mini Präparation (→4.2.6) folgender Restriktionssatz zwei Stunden bei 37 °C inkubiert:

- 2 µl Plasmid-DNA (0,5 µg/µl)
- 2 µl *EcoRI* Buffer (10x)
- 2 µl *EcoRI* (10 U/µl)
- 14 µl Aqua dest.

Anschließend wurde das Restriktionsenzym 20 Min. bei 65 °C inaktiviert und der Verdau mittels Agarose-Gelelektrophorese (→4.2.9) analysiert.

4.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden 1 – 1,5 %ige Agarose-TBE-Gele hergestellt, die mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der DNA-Fragmente. Hierbei wurden für Fragmente < 200 bp 1,5 %ige Agarose-TBE-Gele verwendet.

Die DNA-Proben wurden mit 6x Loading Dye Solution versetzt und zusätzlich ein Massenstandard aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte horizontal in TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 90 V für 30 – 60 Min. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels UV-Licht detektiert.

4.2.10 Agarosegel-Extraktion

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit durchgeführt. Dazu wurde die Bande, welche die gewünschte Fragmentgröße aufwies, aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert.

4.3 Epigenetische Methoden

4.3.1 *In vitro de novo* Methylierung

Eine vollständige Methylierung aller CpG-Dinukleotide wurde mittels Behandlung genomischer DNA eines gesunden Probanden mit CpG Methyltransferase (M.SssI) erreicht. Dazu wurden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge nacheinander zugegeben:

10 µg DNA in Aqua dest.

1/10 Vol. NEBuffer2 (10x)

1/10 Vol. SAM (1:20)

40 U M.SssI (4 U/µl)

Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt, vier Stunden bei 37 °C und zur Inaktivierung des Enzyms anschließend 20 Min. bei 65 °C inkubiert. Die DNA wurde dann über Nacht bei -20 °C mit 50 µl 3 M Natriumacetat und 750 µl 100 %igem Ethanol gefällt. Am nächsten Tag wurde die DNA durch 10 Min. Zentrifugation mit 13000 rpm pelletiert, mit 500 µl Ethanol und erneuter Zentrifugation für 10 Min. mit 13000 rpm gewaschen und anschließend getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 20 µl Aqua dest. gelöst und sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

4.3.2 Bisulfit-Konvertierung

Durch die Behandlung von DNA mit Bisulfit-Salzen werden unmethylierte Cytosine zu Uracil konvertiert. 5-Methylcytosine sind aufgrund ihrer Methylierung geschützt und bleiben als Cytosine erhalten. Der resultierende Sequenzunterschied zwischen methylierter und unmethylierter DNA wird anschließend für eine methylspezifische PCR (→4.3.4), bei der entweder nur methylierte oder nur unmethylierte DNA amplifiziert wird, oder für die Bisulfitsequenzierung (→4.3.3) eingesetzt.

Die Bisulfit-Konvertierung wurde mit Hilfe des EpiTect Bisulfite Kit gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden jedoch 3 µg DNA eingesetzt und die Elution zweimal mit 20 µl Aqua dest. durchgeführt, woraus sich ein Gesamtvolumen konvertierter DNA von 40 µl ergab.

4.3.3 Bisulfitsequenzierung

Die beste Methode, um viele CpGs gleichzeitig auf ihren Methylierungsstatus zu untersuchen, bietet die Bisulfitsequenzierung. Für die Festlegung des zu untersuchenden DNA-Abschnitts wurde der 5'-Bereich der einzelnen Gene auf CpG-Inseln untersucht. Parameter für die Definition einer CpG-Insel wurden dabei in Anlehnung an Bird *et al.* 1986 [19] verwendet. Der Anteil an Cytosinen und Guanosinen sollte über 55 % aller Basen betragen. Der Anteil der gefundenen CpG-Dinukleotide im Vergleich mit den zu erwartenden CpGs sollte höher als der Faktor 0,65 sein. Mit Hilfe des Programms Methyl Primer Express[®] Software v1.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) konnte die Suche nach CpG-Inseln automatisiert werden. Es wurden nur CpG-Inseln berücksichtigt, die mindestens 300 bp und maximal 2000 bp lang waren.

Wurden im 5'-Bereich eines Gens eine oder mehrere CpG-Inseln gefunden, wurden Primer für die Amplifikation dieses DNA-Abschnittes designt, die selbst keine CpG-Dinukleotide beinhalten, um sicherzustellen, dass ihre spezifische Bindung durch die Bisulfitkonvertierung nicht gestört wird.

Zunächst wurde das zu untersuchende Fragment mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden für einen Gesamtansatz von 40 µl 4 µl bisulfitkonvertierte DNA vorgelegt, folgende Komponenten zugegeben:

- 4 µl Hot Start Buffer (10x)
- 2,4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2 µl Vorwärts-Primer (10 mM)
- 2 µl Rückwärts-Primer (10 mM)
- 0,8 µl dNTPs (10 mM)
- 0,4 µl Hot Start *Taq* (5 U/µl)
- 24,4 µl Aqua dest.

und die PCR gemäß nachstehendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	4 Min. 94 °C
45 Zyklen: Denaturierung:	1 Min. 94 °C
Hybridisierung:	2 Min. 50 °C
Elongation:	2 Min. 72 °C
Finale Elongation:	10 Min. 72 °C
Hold:	4 °C

Anschließend wurden die einzelnen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (→4.2.9) aufgetrennt und das Amplikon mit der richtigen Länge ausgeschnitten. Dieses wurde in einem nächsten Schritt aus dem Gel extrahiert (→4.2.10) und in einen pCR[®]2.1-Vektor mittels TA-Klonierung (→4.2.7) ligiert. Um nur Klone mit Insert zu amplifizieren, wurden diese mittels X-Gal selektioniert (→4.1.8 und 4.1.9). Positive weiße Klone wurden vermehrt, die DNA durch Plasmid Mini Präparation (→4.2.6) isoliert und mit Hilfe eines Testverdaus mit dem Enzym *EcoRI* (→4.2.8) erneut bewertet. Bei den gewählten Fragmenten lag keine *EcoRI*-Schnittstelle innerhalb des Fragments vor. Alle Klone, die ein Insert der richtigen Größe aufwiesen, wurden von Eurofins MWG Operon, Ebersberg sequenziert. Dazu wurden die Proben folgendermaßen vorbereitet:

1,5 µl M13 fw Primer (10 µM)
2 µl Plasmid-DNA (0,5 µg/µl)
11,5 µl Aqua dest.
<hr style="width: 10%; margin-left: 0;"/> 15 µl Gesamtvolumen

Die resultierenden Sequenzen wurden mit der Originalsequenz aus der Ensembl-Gen-Datenbank (www.ensembl.org) verglichen. Jede Veränderung von einem Cytosin zu einem Thymin (ersetzt Uracil in der DNA) innerhalb eines CpG-Dinukleotides lässt darauf schließen, dass dieses CpG unmethyliert vorliegt. Bleibt jedoch das Cytosin als solches erhalten, ist das entsprechende CpG-Dinukleotid methyliert.

4.3.4 Methylspezifische PCR (MSP)

Um einen schnellen Überblick über den Methylierungsstatus einer Promotorregion zu bekommen, wurde die methylspezifische PCR (MSP) verwendet. Bei dieser Methode gibt es ein spezifisches Primerpaar für unmethylierte CpGs und ein spezifisches Primerpaar für methylierte CpGs. Demnach werden mit diesen Primern nur Fragmente amplifiziert, die dem jeweiligen Methylierungsstatus entsprechen.

Hierzu wurden mit Hilfe des Programms Methyl Primer Express[®] Software v1.0 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) zunächst CpG-Inseln in Anlehnung an die Parameter von Bird *et al.* 1986 [19] identifiziert (detaillierte Beschreibung unter 4.3.3) und anschließend MSP Primer designt. Dabei wurde darauf geachtet, dass jeder Primer mindestens drei CpG-Dinukleotide abdeckt.

Zunächst wurde das zu untersuchende Fragment mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden für einen Gesamtansatz von 20 µl 3 µl bisulfitkonvertierte DNA vorgelegt, folgende Komponenten zugegeben:

- 2 µl Hot Start Buffer (10x)
- 1,2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl Vorwärts-Primer (10 mM)
- 1 µl Rückwärts-Primer (10 mM)
- 0,4 µl dNTPs (10 mM)
- 0,2 µl Hot Start *Taq* (5 U/µl)
- 11,2 µl Aqua dest.

und die PCR gemäß nachstehendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	4 Min. 94 °C
38 Zyklen: Denaturierung:	30 Sek. 94 °C
Hybridisierung:	30 Sek. variabel
Elongation:	45 Sek. 72 °C
Finale Elongation:	10 Min. 72 °C
Hold:	4 °C

Die Hybridisierungstemperatur variierte dabei je nach Primerpaar (Tabelle 4).

5 Ergebnisse

5.1 Reaktivierung von Hh-assoziierten Genen durch Demethylierung

Aus der Literatur ist bekannt, dass einige embryonale Tumore einen aberrant aktivierten Hedgehog-Signalweg aufweisen. Bei etlichen Tumorarten konnte dies durch *PTCH1*-Mutationen erklärt werden, so z.B. bei Medulloblastomen [49, 50] (siehe Tabelle 1). Bei Rhabdomyosarkomen [196] und Hepatoblastomen [44] ist bisher jedoch nicht bekannt, woraus diese Aktivierung resultiert. Eine mögliche epigenetische Regulation mittels DNA-Methylierung wurde im Folgenden untersucht. RMS-Zellen und HB-Zellen wurden fünf Tage mit 1 μ M bzw. 2 μ M des demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin (kurz: Aza) oder der gleichen Menge reinem Lösungsmittel behandelt. Anschließend wurde die mRNA isoliert und mittels quantitativer real-time PCR mögliche Expressionsänderungen folgender Hedgehog-assoziiierter Gene untersucht: *HHIP*, *IHH*, *SPRY2*, *FOXA2*, *SUFU*, *PTCH1* und *ULK3*.

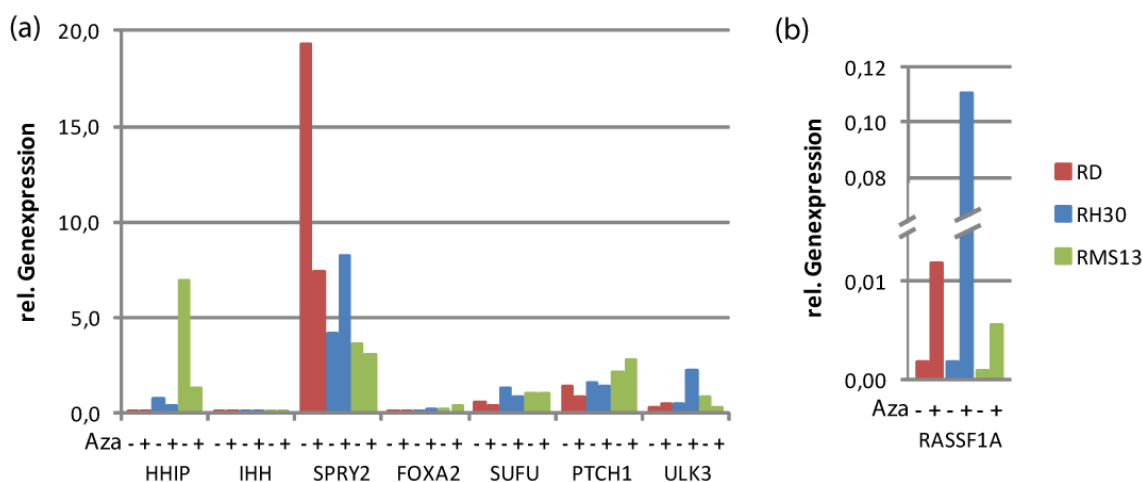


Abbildung 6: Expression von Hedgehog-assoziierten Genen in RMS-Zelllinien nach Aza-Behandlung bzw. mit Lösungsmittel.

Dargestellt ist die zu dem Haushaltsgen *TATA-Box-Binding Protein (TBP)* relative Expression der einzelnen Gene nach Behandlung der Zelllinien RD, RH-30 und RMS13 mit 1 μ M Aza bzw. dem Lösungsmittel. (a) Expression Hedgehog-assoziiierter Zielgene. (b) Reaktivierung der Positivkontrolle *RASSF1A*.

Sind Gene durch DNA-Methylierung in der Promotorregion runterreguliert, bewirkt die Behandlung mit Aza durch indirekte Demethylierung eine Reexpression dieser Gene bzw. eine erhöhte Genexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine signifikante Reaktivierung der Genexpression nach Aza-Behandlung konnte in den RMS-Zelllinien RD, RH-30 und RMS13 für keines der untersuchten Gene gezeigt werden (Abbildung 6). Nur *RASSF1A*, welches in Rhabdomyosarkomen häufig

methyliert vorliegt [36, 37], zeigte als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Reaktivierung epigenetisch regulierter Gene eine deutliche Erhöhung der Genexpression.

Ein ähnliches Bild präsentiert sich bei den Hepatoblastom-Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 (Abbildung 7). Neben der Positivkontrolle *IGFBP3* weist hier jedoch ein weiteres Gen eine signifikant erhöhte Expression nach Behandlung der Zellen mit Aza auf: das *Hedgehog-Interacting Protein 1 (HHIP)*, ein negativer Regulator des Hedgehog-Signalwegs. Dies und die weiteren inhibitorischen Komponenten des Signalwegs *SUFU* und *PTCH1* wurden daraufhin genauer auf mögliche Promotor-Methylierungen untersucht.

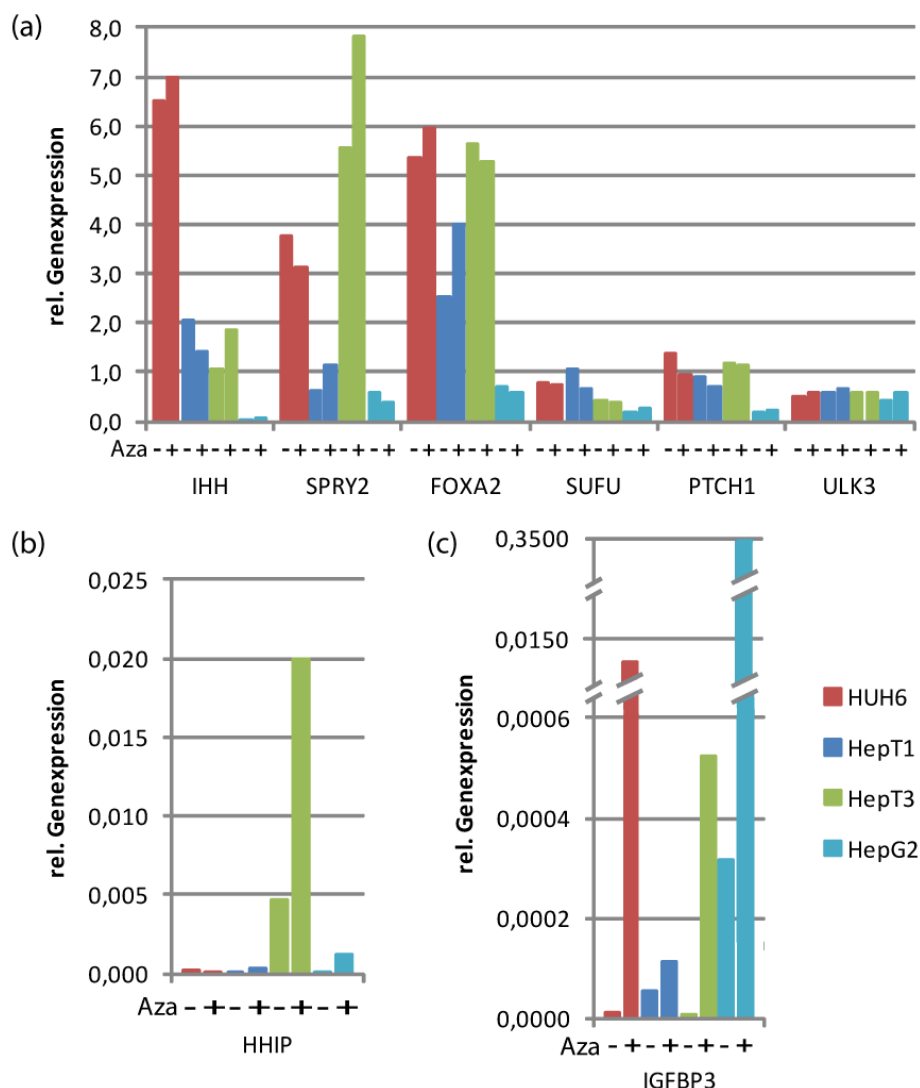


Abbildung 7: Expression von Hedgehog-assoziierten Genen in HB-Zelllinien nach Aza-Behandlung bzw. mit Lösungsmittel.

Dargestellt ist die zu *TBP* relative Expression der einzelnen Gene nach Behandlung der Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 mit 2 μ M Aza bzw. dem Lösungsmittel. (a) Expression Hedgehog-assoziiierter Zielgene. (b) Reaktivierung von *HHIP*. (c) Reaktivierung der Positivkontrolle *IGFBP3*.

5.2 Etablierung der Bisulfitsequenzierung inhibitorischer Komponenten des Hedgehog-Signalwegs

Mit Hilfe der Bisulfitsequenzierung können größere DNA-Abschnitte auf den Methylierungsstatus ihrer einzelnen CpGs untersucht werden. Diese Methode musste jedoch in unserem Labor erst etabliert werden. Hierzu wurde die Promotorregion jedes Gens auf das Vorhandensein von CpG-Inseln überprüft. Die gefundenen CpG-Inseln wurden je nach Größe in mehrere Abschnitte unterteilt bzw. nur ein Abschnitt untersucht (Abbildung 8).

Die detektierte CpG-Insel im Promotorbereich von *SUFU* erstreckte sich von ca. 400 bp 5' des Transkriptionsstarts bis wenige Basen 5' des Startcodons. Dieser Bereich konnte mit den designten Primern nahezu komplett abgedeckt und 27 CpGs analysiert werden.

Im Promotorbereich von *HHIP* konnte eine CpG-Insel gefunden werden, die sich von 1200 Basen 5' des Transkriptionsstarts bis etwas über das Startcodon hinaus erstreckte. Diese sehr große CpG-Insel wies einen ca. 600 bp langen Bereich mit einer sehr hohen Dichte an CpG-Dinukleotiden (63 CpGs) auf. Folglich wurde dieser für die Untersuchungen gewählt und von Primern flankiert.

Für *PTCH1* wurde eine sehr große CpG-Insel detektiert, welche sich von knapp 1200 Basen 5' des Transkriptionsstarts bis ins erste Intron erstreckte. Hier wurden drei einander überlappende Regionen untersucht. Diese wurden in 5'-3'-Richtung mit Region 1 bis 3 bezeichnet. Region 1 und Region 2 erstrecken sich jeweils über 21 CpG-Dinukleotide und Region 3 umfasst 63 CpGs, so dass insgesamt ein Bereich von 99 CpGs abgedeckt werden konnte. In Region 1 befindet sich außerdem eine GLI1-Bindestelle der Sequenz 5'-TGGGTGGTC-3' [197].

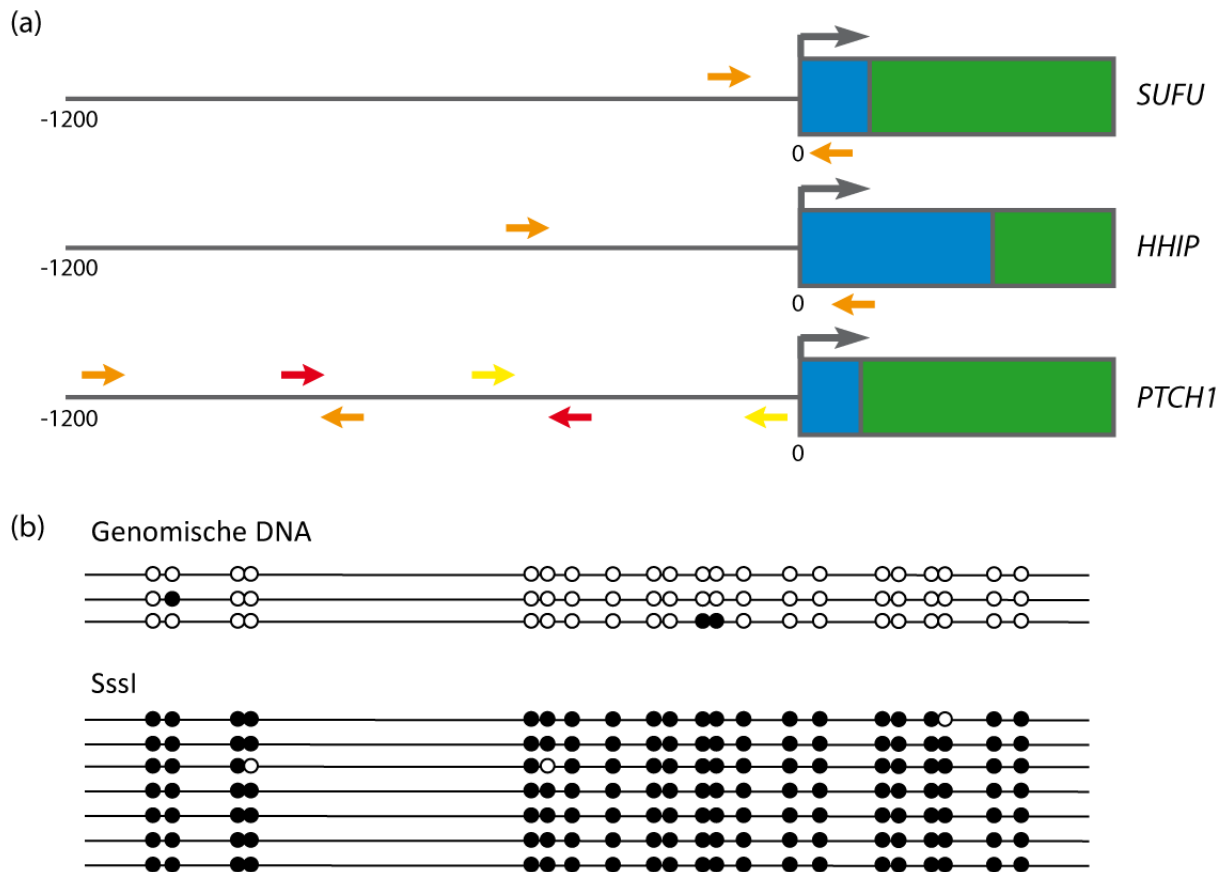


Abbildung 8: Primerpositionen und exemplarisches Ergebnis der Bisulfidsequenzierung.

(a) Positionen der einzelnen Primer für die initiale PCR der Bisulfidsequenzierung. Der Beginn des transkribierten Bereichs des jeweils untersuchten Gens wird als Position 0 definiert und ist als Rechteck dargestellt, blau markiert der nicht kodierende Bereich, grün der kodierende. Der Transkriptionsstart ist mit einem grauen Pfeil dargestellt. Die PCR-Primer sind als orange (bei PTCH1 auch rote und gelbe) Pfeile abgebildet. (b) Ergebnis der Bisulfidsequenzierung genomischer DNA einer gesunden Kontrolle und SssI behandelte genomischer Kontroll-DNA exemplarisch gezeigt für Patched Region 2.

5.3 Keine Regulation inhibitorischer Komponenten des Hedgehog-Signalwegs über DNA-Methylierung in RMS-Zelllinien

Nach erfolgreicher Etablierung der Bisulfitsequenzierung konnten mit dieser Methode die Promotorregionen der inhibitorischen Komponenten des Hedgehog-Signalwegs *PTCH1*, *SUFU* und *HHIP* untersucht werden. In den Rhabdomyosarkom-Zelllinien waren die untersuchten DNA-Abschnitte aller drei untersuchten Gene größtenteils unmethyliert (Abbildung 9), mit einem maximalen Methylierungsgrad aller untersuchten CpGs bei RD-Zellen in der Promotorregion von *HHIP* von 19 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Analyse in RMS-Zelllinien nicht weiter fortgeführt.

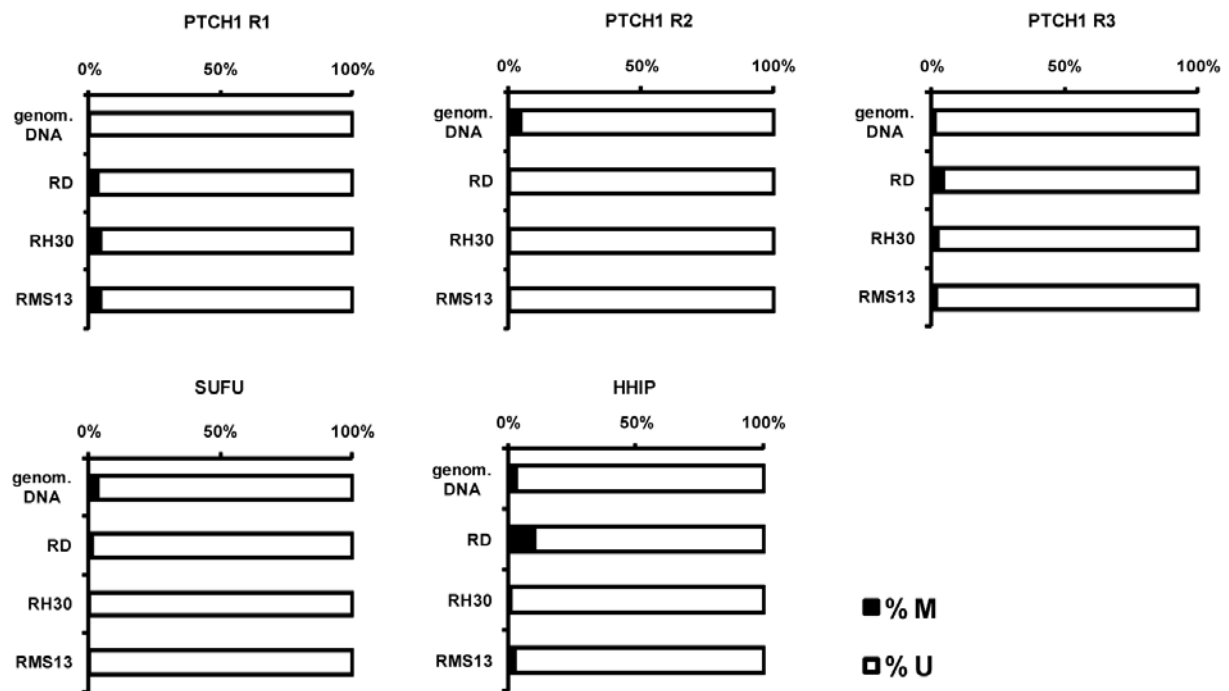


Abbildung 9: Methylierungsanalyse inhibitorischer Komponenten des Hh-Signalwegs in RMS-Zelllinien.

Es ist jeweils der prozentuale Anteil methylierter und unmethylierter CpGs an der Gesamtzahl der CpGs für die drei RMS-Zelllinien RD, RH-30 und RMS13 sowie für genomische DNA einer gesunden Kontrolle angegeben. Weiße Balken stehen dabei für unmethylierte CpG-Dinukleotide, schwarze Balken für methylierte.

5.4 Methylierungsanalyse inhibitorischer Komponenten des Hedgehog-Signalwegs in HB-Zelllinien

Zwar zeigten die Hepatoblastom-Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 ebenfalls nur sehr schwache Methylierung der CpG-Inseln im 5' *upstream*-Bereich der Gene *PTCH1* und *SUFU*, aber im Gegensatz zu den untersuchten RMS-Zelllinien wiesen alle vier HB-Zelllinien starke bis zum Teil sehr starke Methylierung der Promotorregion von *HHIP* auf (Abbildung 10). Die Werte reichten hierbei von 28 % Methylierung bei HepG2-Zellen bis hin zu 98 % bei HepT3-Zellen. Die genomische DNA einer gesunden Kontrolle hingegen wies gerade mal 3 % methylierte CpG-Dinukleotide auf.

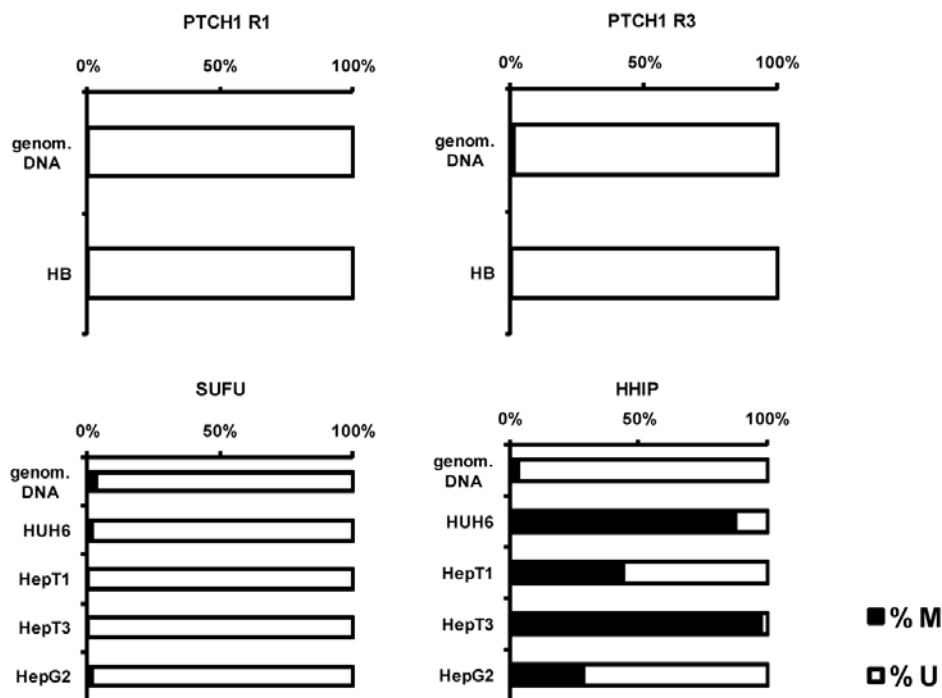


Abbildung 10: Methylierungsanalyse inhibitorischer Komponenten des Hh-Signalwegs in HB-Zelllinien.

Es ist jeweils der prozentuale Anteil methylierter und unmethylierter CpGs an der Gesamtzahl der CpGs für die vier HB-Zelllinien HUH6, HepT1, HepT3 und HepG2 sowie für genomische DNA einer gesunden Kontrolle angegeben. Weiße Balken stehen dabei für unmethylierte CpG-Dinukleotide, schwarze Balken für methylierte.

5.5 Regulation der HHIP-Expression mittels DNA-Methylierung in HB-Zelllinien

Um die sehr interessanten Methylierungsergebnisse in der Promotorregion von *HHIP* näher zu validieren und einen eventuellen Zusammenhang der geringen *HHIP*-Expression in den HB-Zelllinien mit der gefundenen Methylierung zu untersuchen, wurden diese erneut fünf Tage lang mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt. Anschließend wurde die Reaktivierung der *HHIP*-Expression mittels quantitativer *real-time* PCR analysiert. Hierbei konnte ein signifikanter Anstieg der Expression nach Aza-Behandlung sowohl bei HepT3- als auch bei HepG2-Zellen gezeigt werden (Abbildung 11a). Ob diese Reaktivierung auf die Demethylierung der Promotorregion von *HHIP* zurückzuführen ist, wurde mittels Bisulfitsequenzierung untersucht. Hierbei konnte eine starke Demethylierung bei HepT3-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 11b).

Zwei Regionen waren hauptsächlich von dieser Demethylierung betroffen: CpG 17-29 und CpG 47-55 (Abbildung 11c). Hier wiesen über 42 % bzw. über 51 % der zuvor methylierten Cytosine eine Demethylierung auf (Abbildung 11d). Eine mögliche Bedeutung dieser Regionen wurde mittels *in silico*-Analyse untersucht. Interessanterweise liegen in diesen stark demethylierten Bereichen drei Bindestellen für Sp1-Transkriptionsfaktoren der Sequenz 5'-cccgcc-3' bzw. 3'-ggcggg-5' (Abbildung 11e).

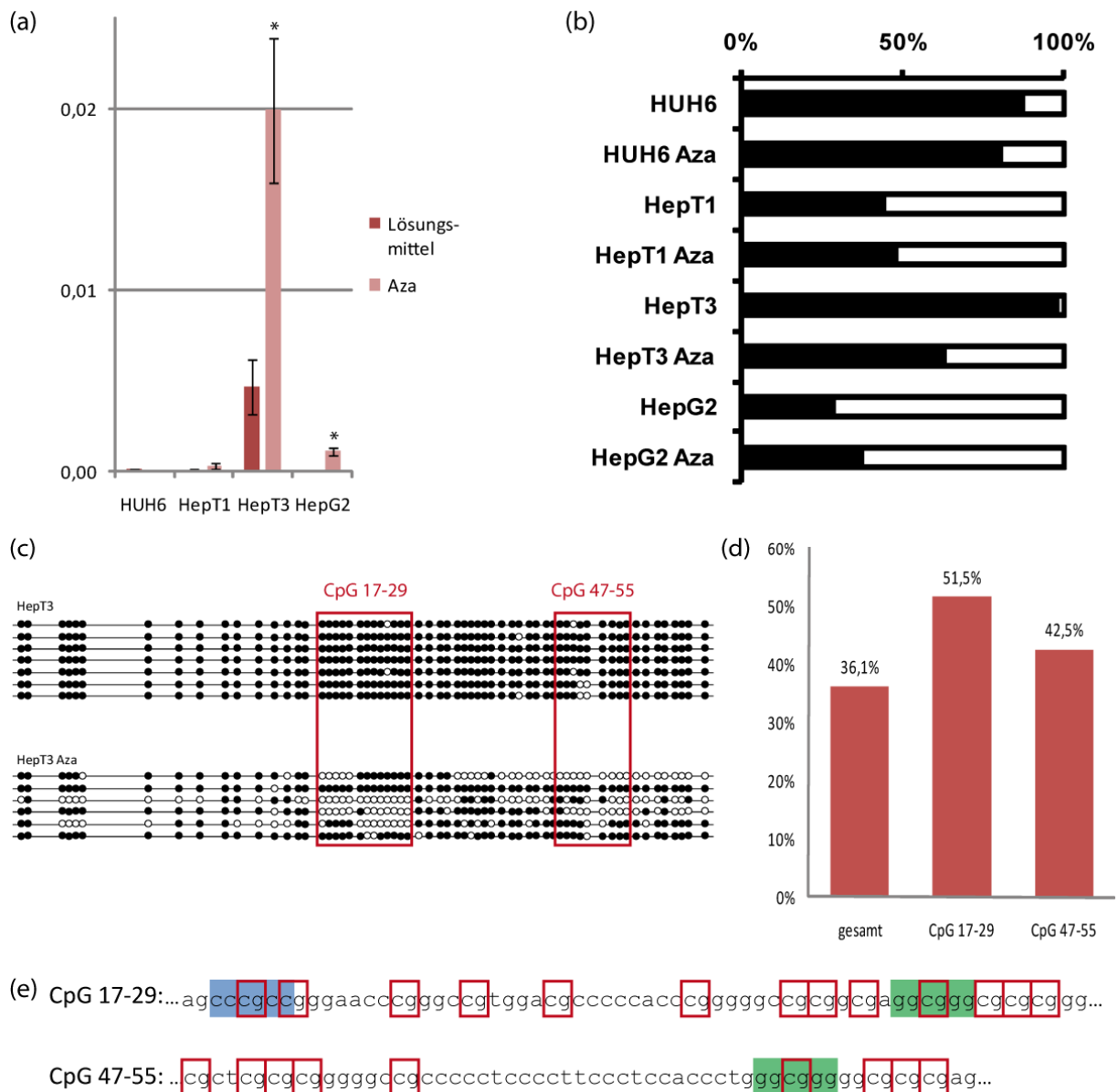


Abbildung 11: Reaktivierung der *HHIP*-Expression durch Demethylierung.

Hepatoblastom-Zellen wurden fünf Tage mit 2 μ M 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) behandelt und anschließend analysiert. (a) Signifikante Reaktivierung der *HHIP*-Expression nach Aza-Behandlung in HepT3- und HepG2-Zellen. Die Messung erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR. Dargestellt ist die Expression relativ zu *TBP*. (b) Methylierungsanalyse mittels Bisulfitequenzierung aller vier HB-Zelllinien nach Behandlung mit und ohne Aza. (c) Detailliertes Ergebnis der Bisulfitequenzierung von HepT3-Zellen vor und nach Aza-Behandlung. Die rot umrahmten Bereiche markieren CpG 17-29 und CpG 47-55. (d) Prozentuale Demethylierung der HepT3-Zellen der gesamten untersuchten Region im Vergleich zu CpG 17-29 und CpG 47-55. (e) Sequenzausschnitte der untersuchten Region. CpGs sind rot umrahmt. Bindestellen für Sp1-Transkriptionsfaktoren sind blau bzw. grün hinterlegt (blau in 5'-3'-Orientierung; grün in 3'-5'-Orientierung).

5.6 Klinische Relevanz der Promotor-Methylierung am HHIP-Lokus

Für Methylierungsstudien in primären Tumoren und Normalgewebe wurde die Methode der methylspezifischen PCR gewählt. Als Negativkontrolle diente hierbei normales Lebergewebe, als Positivkontrolle wiederum genomische DNA einer gesunden Kontrolle, die einer Sssl-Behandlung unterzogen wurde. Diese bewirkt eine komplette Methylierung der DNA. Dabei zeigten 22 % der Tumore eine Methylierung am *HHIP*-Lokus (Abbildung 12). Als zusätzliche Kontrolle sei der *PTCH1*-Lokus erwähnt, der wie bereits in den HB-Zelllinien auch in den Tumoren keine Methylierung aufweist (Abbildung 12a).

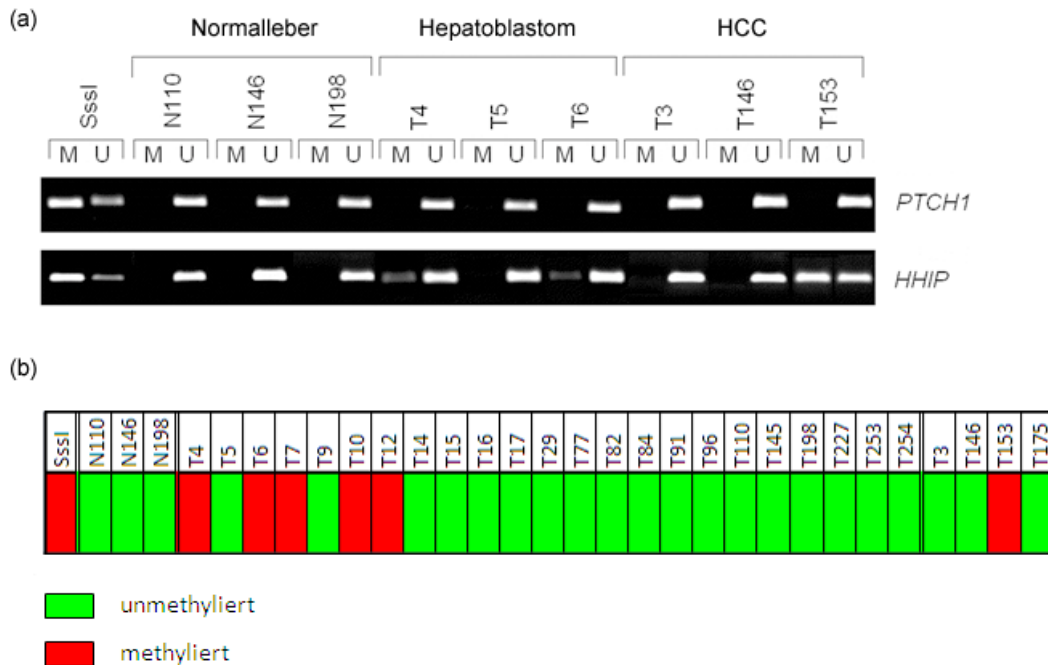


Abbildung 12: Methylspezifische PCR primärer Tumore.

(a) Exemplarische Darstellung der Ergebnisse der MSP primärer Tumore und von Normalgewebe für die Promotorregionen von *PTCH1* und *HHIP* anhand dreier Normallebern, dreier Hepatoblastome und dreier Hepatozellulärer Karzinome (HCC). Als Positivkontrolle wurde Sssl behandelte genomische DNA einer gesunden Kontrolle verwendet (Sssl). M: methyliert, U: unmethyliert. (b) Vereinfachte Darstellung der Gesamtergebnisse der MSP für *HHIP* bei insgesamt 27 Tumoren und drei Normallebern. 23 Tumore wurden als Hepatoblastome diagnostiziert, vier als Hepatozelluläre Karzinome (T3, T146, T153, T175).

5.7 Deaktivierung des Hh-Signalwegs durch rekombinantes Hip

Da die Runterregulierung von *HHIP* sowohl in Hepatoblastomzelllinien als auch in primären Hepatoblastomen eine Rolle spielt, stellte sich die Frage, wie sich Tumorzellen verhalten, wenn man Hip exogen wieder in die Zelle einbringt. Um rekombinantes murines Hip auf seine Wirksamkeit zu testen, wurden Shh Light II-Zellen verwendet. Diese 3T3-Zelllinie ist stabil mit einem GLI-responsiven Firefly Luciferase-Reporterkonstrukt und einem konstitutiven Renilla Luciferase-Expressionsvektor transfiziert. Somit wird bei Aktivierung des Hh-Signalwegs Firefly Luciferase exprimiert und kann detektiert werden.

Zur Stimulation wurde rekombinantes Shh-N (rmShh-N) verwendet, welches eine sehr hohe Steigerung der Firefly Luciferase-Aktivität gegenüber unstimulierten Shh Light II-Zellen zeigte. Wurden nun stimulierte Shh Light II-Zellen zusätzlich mit Cyclopamin behandelt, welches den Hh-Signalweg über eine Inaktivierung von Smoothened inhibiert, wurde auch das Firefly Luciferase-Signal reprimiert. Einen ähnlichen Effekt zeigte die Inkubation mit rekombinatem Shh-N zusammen mit einer geringen Konzentration von rekombinatem Hip (rmHip; 0,5 µg/ml). Dieser war bei einer Steigerung der Konzentration um den Faktor 10 auf 5 µg/ml noch wesentlich stärker (Abbildung 13).

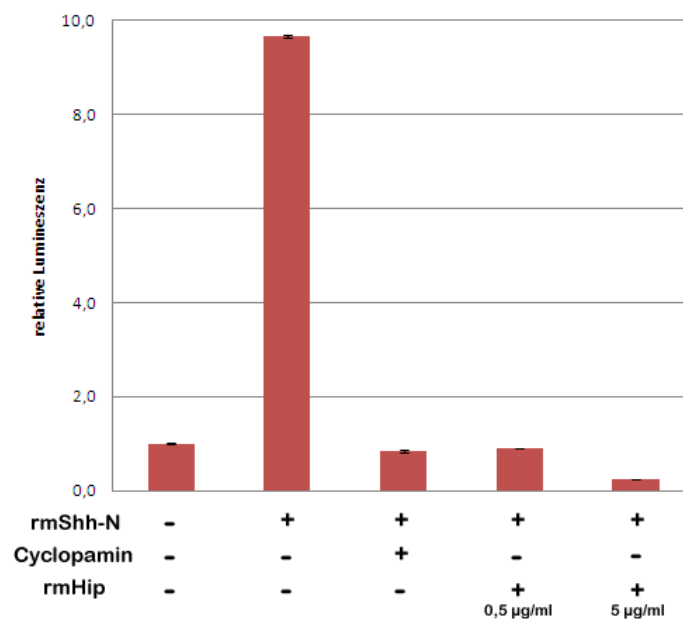


Abbildung 13: Reporter-Assay mit Shh Light II-Zellen.

Shh Light II-Zellen wurden mit rmShh-N stimuliert und zusätzlich mit Cyclopamin oder verschiedenen Konzentrationen von rmHip (0,5 µg/ml und 5 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde die Firefly Luciferase-Aktivität gemessen.

5.8 Rekombinantes Hip reprimiert den Hh-Signalweg in HUH6-Zellen

Welchen Effekt rekombinantes Hip auf den Hedgehog-Signalweg hat, wurde anhand einer 30-stündigen Inkubation der HUH6-, HepT1- und HepG2-Zellen mit rmShh-N allein oder zusammen mit 5 µg/ml rmHip oder der Positivkontrolle Cyclopamin mit anschließender Isolierung der mRNA, cDNA-Synthese und darauf folgender quantitativer *real-time* PCR untersucht. Für diesen Versuch wurde ebenfalls die höhere Menge an rmHip gewählt.

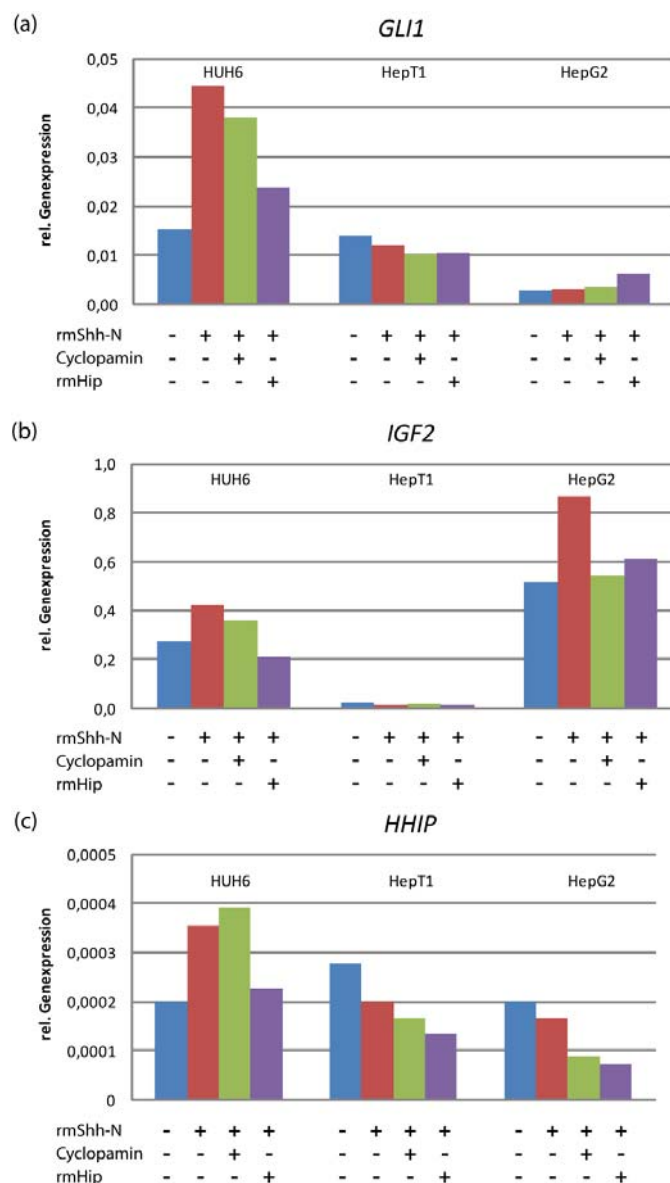


Abbildung 14: Q-PCR-Analyse Hedgehog-assoziiierter Gene nach Behandlung mit rmShh-N und rmHip.

Zellen wurden 30 Stunden mit rmShh-N, Cyclopamin und/oder rmHip behandelt (+ steht für eine der drei Substanzen, - für das jeweilige Lösungsmittel). Anschließend wurde die Expression mittels Q-PCR analysiert. Alle Werte sind als relative Expression zu *TBP* dargestellt.

rmShh-N induzierte nur in HUH6-Zellen beide untersuchten Zielgene des Hh-Signalwegs (*Gli1* und *Igf2*). In dieser Zelllinie ist auch eine Repression der Expression durch die zusätzliche Behandlung mit rmHip zu beobachten. Weder bei HepT1- noch bei HepG2-Zellen konnte die Expression von *Gli1* durch rmShh-N angeregt werden. *Igf2* hingegen zeigte in HepG2-Zellen interessanterweise eine gesteigerte Expression nach Behandlung mit rmShh-N, die sowohl durch Cyclopamin als auch durch rmHip wieder gesenkt wurde.

Die Expression von *HHIP* selbst ist mit und ohne Induktion bei allen drei HB-Zelllinien extrem gering. Eventuelle Abweichungen dieser Ergebnisse voneinander können nicht gewertet werden, da diese im Bereich von herkömmlichen Messschwankungen liegen.

5.9 Proliferationsanalysen mit rekombinantem Hip und HB-Zelllinien

Die Auswirkungen von rekombinantem Hip auf die Proliferation von HB-Zelllinien wurden nun an HUH6-, HepT1 und HepG2-Zellen ausgetestet. HepT3-Zellen wurden aufgrund ihres Wachstums in Multilayern von diesen Versuchen ausgeschlossen.

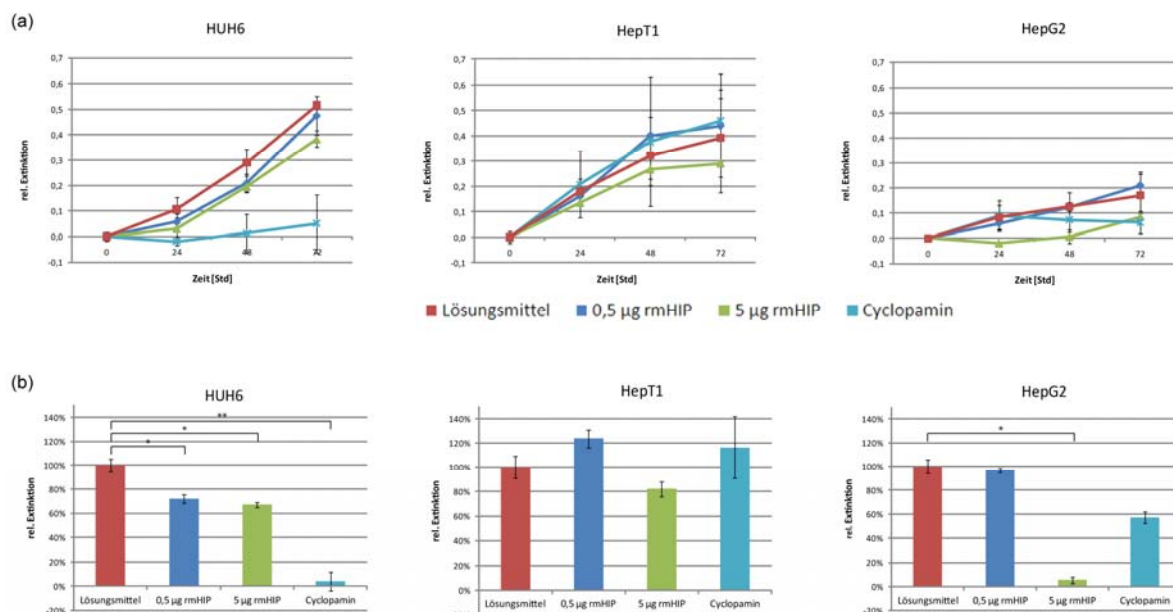


Abbildung 15: Proliferationsanalyse mittels MTT nach Behandlung mit rmHip

Zellen wurden mit Lösungsmittel, 0,5 µg/ml rmHip, 5 µg/ml rmHip oder Cyclopamin behandelt und ihr Proliferationsverhalten alle 24 Stunden bis 72 Stunden nach der Behandlung mittels MTT analysiert. (a) Ergebnisse aller Messungen normiert zum Zeitpunkt der Behandlung (t=0 Std). (b) Vergleich der einzelnen Substanzen mit dem Lösungsmittel 48 Stunden nach der Behandlung. *: t-Test < 0,05; **: t-Test < 0,005

Die Zellen wurden 72 Stunden mit rekombinantem Hip zweierlei Konzentration (0,5 µg/ml und 5 µg/ml), Cyclopamin oder Lösungsmittel behandelt. Das Lösungsmittel diente als Negativkontrolle bzw. als Normierungswert. Cyclopamin

hingegen war die Positivkontrolle für eine Abnahme der Proliferation bei Hedgehog-responsiven Zellen. HepT1-Zellen zeigten bei allen vier Werten hohe Schwankungen und keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Lösungen. Im Gegensatz dazu reagierten HUH6-Zellen sehr stark auf Cyclopamin und wiesen eine signifikant reduzierte Proliferation bei beiden rmHip-Konzentrationen auf. Die Proliferation der HepG2-Zellen wurde interessanterweise nur durch hohe Konzentrationen von rmHip (5 µg/ml), jedoch nicht von Cyclopamin, signifikant herabgesetzt.

5.10 Rekombinantes Hip induziert Apoptose in HUH6-Zellen

Um zu klären, welcher Mechanismus ursächlich für die herabgesetzte Proliferation durch die Gabe von rmHip vor allem in HUH6-Zellen ist, wurden HUH6-, HepT1- und HepG2-Zellen jeweils mit 5 µg/ml rmHip bzw. der dementsprechenden Menge Lösungsmittel (1 % BSA) für 30 Stunden inkubiert. Es wurde die höhere rmHip-Konzentration gewählt, da diese den stärksten Effekt zeigte. Anschließend wurde Annexin V als Marker für die Frühphase der Apoptose auf den Zellen angefärbt. Desweiteren wurde Calcein eingesetzt, um nur lebende Zellen zu detektieren. Alle Annexin V- und Calcein-positiven Zellen wurden als apoptotisch eingestuft. Dabei konnte bei HUH6-Zellen eine erhöhte Apoptoserate der rmHip-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten HepT1-Zellen ein entgegengesetztes Ergebnis. Bei den HepG2-Zellen wiederum war keinerlei Unterschied zwischen den beiden Proben zu erkennen.

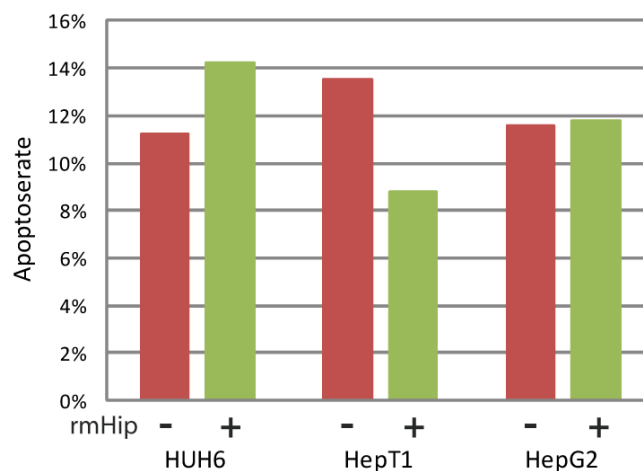


Abbildung 16: Annexin V-Assay zur Detektion von Apoptose nach Behandlung mit rmHip.

Zellen wurden 30 Stunden mit Lösungsmittel (-) oder mit 5 µg/ml rmHip (+) inkubiert und anschließend gegen Annexin V angefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen an der Gesamtzahl der lebenden Zellen.

5.11 Rekombinantes Hip erhöht die Expression anti-apoptotischer Gene in HepG2-Zellen

Zur weiteren Validierung der bisherigen Ergebnisse für die Inkubation von HB-Zellen mit rekombinatem Hip wurden die behandelten HUH6-, HepT1- und HepG2-Zellen auf Expression anti-apoptotischer Gene untersucht. HUH6-Zellen, die – wie bereits in 5.9 gezeigt – apoptotisch reagieren sowie HepT1-Zellen wiesen keinerlei Veränderungen der Expression auf. Lediglich in HepG2-Zellen wurde durch rmHip eine Expressionssteigerung der anti-apoptotischen Gene *BCL-XL*, *BCL2* und *BIRC5* induziert.

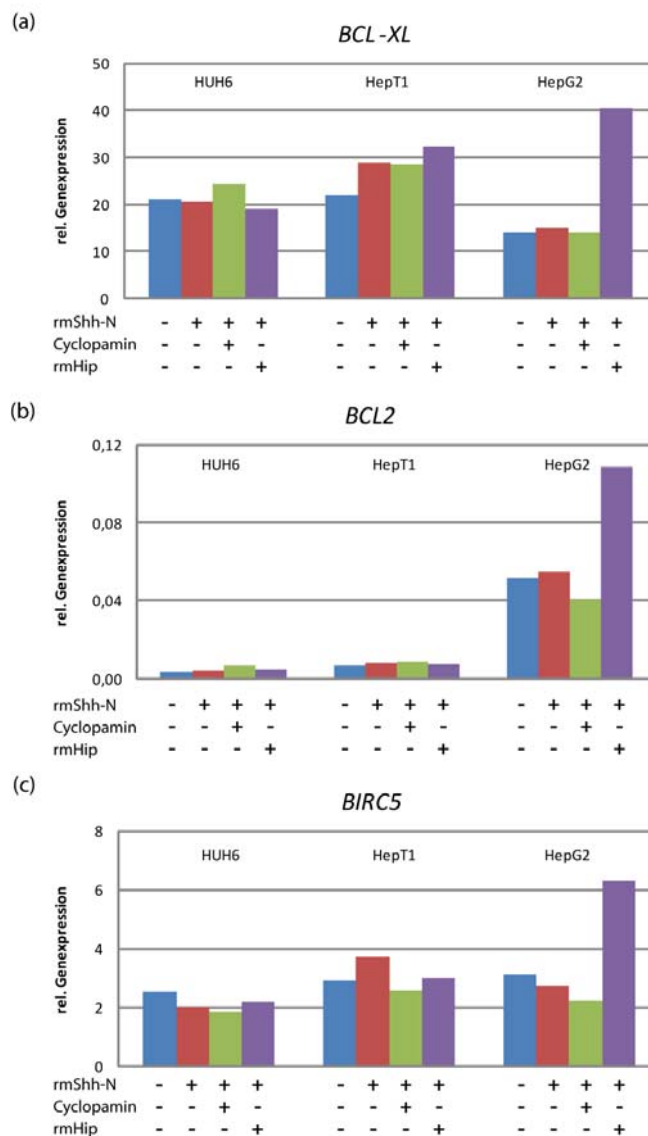


Abbildung 17: Q-PCR-Analyse anti-apoptotischer Gene nach Behandlung mit rmShh-N und rmHip.

Zellen wurden 30 Stunden mit rmShh-N, Cyclopamin und/oder rmHip behandelt (+ steht für eine der drei Substanzen, - für das jeweilige Lösungsmittel). Anschließend wurden die Ergebnisse mittels Q-PCR analysiert. Alle Werte sind als relative Expression zu *TBP* dargestellt.

5.12 Proliferationsanalyse stabil mit HHIP transfizierter HepG2-Zellen

Um diese doch sehr kontroversen Ergebnisse der HepG2-Zellen näher zu untersuchen, wurden diese stabil sowohl mit einem Expressionsvektor für humanes *HHIP* (pDEST26HHIP) als auch mit einem für murines *Hip* (pcDNAHip) und den jeweiligen Leervektoren transfiziert. Die Induktion der *Hip*-Expression war bei dem murinen Plasmid sehr gering. pDEST26HHIP-transfizierte HepG2-Zellen hingegen zeigten einen starken Anstieg der *HHIP*-Expression. Interessanterweise konnte hier in einem Vergleich mit den HepG2-Zellen, die mit dem Leervektor stabil transfiziert wurden, nach einer Wachstumsphase von 72 Stunden eine signifikant verringerte Proliferation festgestellt werden (Abbildung 18b).

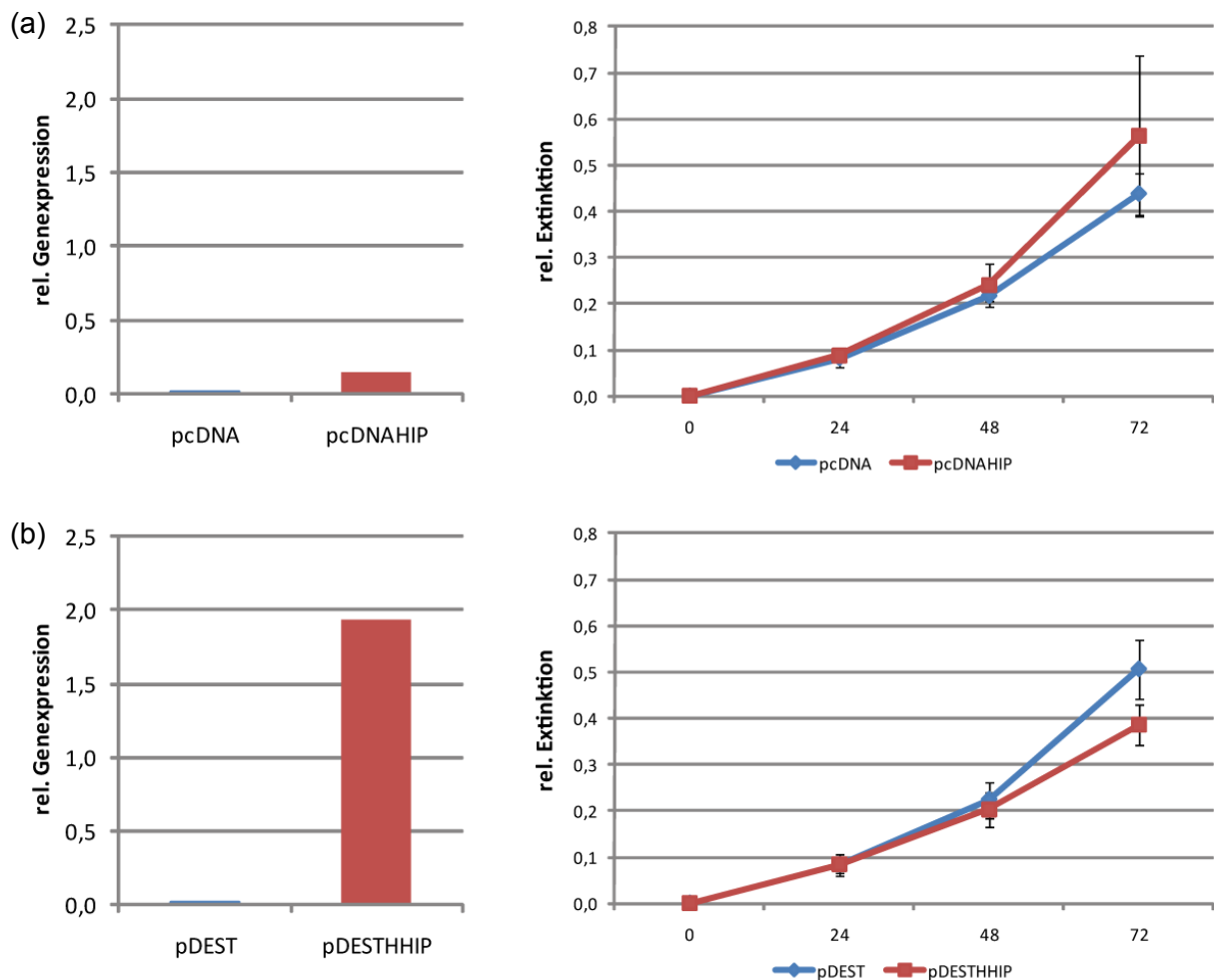


Abbildung 18: Reexpression von Hip durch stabile Transfektion von HepG2-Zellen.

HepG2-Zellen wurden jeweils mit einem Expressionsvektor für murines (a) oder humanes (b) Hip sowie den entsprechenden Leervektoren transfiziert und selektiert. Die Induktion der Reexpression ist links dargestellt. Rechts sind die Ergebnisse der MTT-Analysen dargestellt. Hierzu wurden die stabil transfizierten Zellen ausgesät und nach 4 Stunden zum ersten Mal mit MTT-Lösung versetzt ($t = 0$ Std.) und dann für weitere 72 Stunden analysiert.

6 Diskussion

Negative Regulatoren des Hedgehog-Signalwegs haben eine wichtige Bedeutung als Tumorsuppressorgene [46, 198]. So wurde für das Tumorsuppressorgen *PTCH1* in Zusammenhang mit der Tumorigenese sowohl von Mutationen (Tabelle 1) als auch von Hypermethylierung berichtet [199-202]. Auch für *SUFU* konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Inaktivierung dieses Gens und der Entwicklung von Tumoren gezeigt werden [110].

Nur für das Hedgehog-Interacting Protein (*HHIP*) wurde eine Funktion als Tumorsuppressorgen noch nicht eindeutig beschrieben, obgleich auch für dieses Gen tumorbegünstigende Inaktivierungen sowohl durch Mutationen des Gens und Deletion am *HHIP*-Lokus auf Chromosom 4 als auch aufgrund von Promotorhypermethylierung bekannt sind [153, 163, 164, 203-207]. Diese Arbeit zeigt, welche große Bedeutung auch dieser Inhibitor für die Tumorentwicklung spielt und durch welche Mechanismen seine Repression in embryonalen Tumoren möglicherweise erfolgt.

6.1 Methylierungsstatus Hh-inhibierender Gene in RMS-Zelllinien

Rhabdomyosarkome weisen häufig eine stark erhöhte Expression der Hedgehog-Zielgene *PTCH1* und *GLI1*, und somit einen aberrant aktiven Hedgehog-Signalweg, auf [196]. Im Tiermodell Maus kann dies zum Teil durch die Inaktivierung eines *Ptch1*-Allels erklärt werden. So entwickeln *Ptch1*^{neo67/+}-Mäuse Medulloblastome, aber auch Rhabdomyosarkome [208, 209]. Dieser Zusammenhang konnte beim Menschen bisher nicht gefunden werden. Patienten, die am Basalzellnävussyndrom erkrankt sind, dem eine inaktivierende *Ptch1*-Mutation zu Grunde liegt, entwickeln zwar in sehr seltenen Fällen ein Rhabdomyosarkom [210], der Großteil der Rhabdomyosarkome jedoch tritt sporadisch auf [175].

Der Methylierungsstatus in Rhabdomyosarkomen wurde bisher kaum untersucht. Zu den wenigen beschriebenen aberranten Methylierungen zählen die Hypermethylierung von *RASSF1A* [36] und die Hypermethylierung von *PAX3* (hauptsächlich in ERMS) [211]. Der Transkriptionsfaktor *PAX3* spielt physiologisch eine wichtige Rolle in der Regulation von Stammzellen und der Differenzierung von Gewebe während der Myogenese [212]. In alveolären Rhabdomyosarkomen wird

häufig ein Fusionsprodukt aus PAX3 und FKHR gefunden. Der daraus resultierende Transkriptionsfaktor weist eine 10 – 100fach höhere Aktivität als PAX3 allein auf. In ERMS könnte das Gegenteil – das epigenetische Ausschalten dieses Transkriptionsfaktors – die Tumorigenese durch die fehlende Ausdifferenzierung von Muskelvorläuferzellen begünstigen [211]. Dieses Beispiel soll verdeutlichen, welche enormen Auswirkungen sowohl die Überexpression oder verstärkte Aktivität eines Proteins aber auch das Abschalten eines Gens haben kann.

Erkenntnisse über den Methylierungsstatus entwicklungs-genetisch wichtiger Gene können somit eine wichtige Grundlage für eine mögliche Therapie embryonaler Tumore liefern. Ein erster Schritt zur Analyse der Methylierung Hedgehog-assoziiierter Gene in Rhabdomyosarkomen war eine Behandlung von RMS-Zelllinien mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin. Es wurden Gene überprüft, von denen bekannt ist, dass sie in anderen Tumoren zum Teil hypermethyliert vorliegen. Diese sind: *HHIP* [203-205], *IHH* [213], *SPRY2* [214-216], *FOXA2* [217, 218], *SUFU* [219] und *PTCH1* [200, 201, 220, 221]. *ULK3* wurde zwar bisher nicht auf Methylierung untersucht, wurde aber mit in die Analyse aufgenommen, da dieses Gen erst vor kurzem mit dem Hedgehog-Signalweg assoziiert wurde [222].

Sämtliche untersuchten Gene zeigten jedoch keine signifikant erhöhte Expression nach Demethylierung (Abbildung 6). Lediglich das bekanntermaßen in RMS hypermethylierte Gen *RASSF1A* [36] zeigte als Positivkontrolle die hier zu erwartende Reaktivierung der Genexpression. Daraus lässt sich schließen, dass es in RMS-Zelllinien keine Regulation der Expression der analysierten Hedgehog-assoziierten Gene *HHIP*, *IHH*, *SPRY2*, *FOXA2*, *SUFU*, *PTCH1* und *ULK3* durch Hypermethylierung gibt.

Um eine Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs aufgrund aberranter Methylierung der regulatorisch sehr wichtigen inhibitorischen Komponenten dieses Signalwegs eindeutig ausschließen zu können, wurden Bisulfitsequenzierungen in den Promotorregionen von *HHIP*, *PTCH1* und *SUFU* durchgeführt. Sowohl bei *HHIP* als auch bei *PTCH1* und *SUFU* ist nur ein minimaler Anteil der untersuchten CpG-Dinukleotide methyliert (Abbildung 9). Somit kann eine negative Regulation der Genexpression durch Hypermethylierung für diese Gene ausgeschlossen werden. Mögliche Ursachen der Aktivierung des Hh-Signalwegs in RMS müssen folglich weiter erforscht werden.

Entgegen dieser Ergebnisse zeigt eine aktuelle Studie mit *Ptch1*^{neo67/+}-Mäusen Erfolge in der Prävention der Ausbildung von Rhabdomyosarkomen und Medulloblastomen durch die kombinierte Gabe des Dnmt1-Inhibitors 5-Aza-2'-deoxycytidin und dem Histondeacetylase-Inhibitor Valproinsäure [223]. Eine Reduktion bereits vorhandener Tumore konnte aber auch anhand dieser Studie nicht gezeigt werden.

Der Nutzen einer Therapie von Rhabdomyosarkomen mit demethylierenden Agenzien wie 5-Aza-2'-deoxycytidin evtl. in Kombination mit Histondeacetylase-Inhibitoren muss weiter evaluiert werden, bevor eine klare Aussage darüber getroffen werden kann. Zumindest für eine gegen den überaktivierten Hedgehog-Signalweg gerichtete Therapie scheint eine Inhibierung der Erhaltungs-DNA-Methyltransferase Dnmt1 nicht sinnvoll.

Auch andere gegen den Hedgehog-Signalweg gerichtete Therapieversuche zeigen bisher wenig Erfolg. So reagieren zwar RMS-Zellen auf die Gabe von Cyclopamin mit verringerter Proliferation und Apoptose. Bei ausgebildeten Tumoren jedoch ist kein Effekt auf Proliferation oder Apoptose zu beobachten [224].

Dies wirft die Frage auf, ob der Hh-Signalweg allgemein kein gutes Ziel für eine Therapie von RMS ist. Arbeiten in unserem Labor zeigen jedoch, dass Betulinsäure Apoptose in RMS-Zellen und ebenfalls bei RMS-Xenografts im Mausmodell induziert [225]. Interessanterweise konnte außerdem ein möglicher Zusammenhang der Wirkung von Betulinsäure und dem Hh-Signalweg aufgezeigt werden [226]. So verringert Betulinsäure die Expression der Hh-Zielgene *GLI1*, *PTCH1* und *IGF2* in HepT3-Zellen.

Der Hedgehog-Signalweg könnte folglich durchaus als mögliches Ziel einer Therapie dienen. Jedoch ist eine Kombination mehrerer Therapeutika, die unterschiedliche fehlregulierte Mechanismen des Tumors angreifen, erstrebenswert. So könnte auch 5-Aza-2'-deoxycytidin, wenn diese Substanz auch keinen Effekt auf den Hedgehog-Signalweg hat, auf bereits beschriebene oder bisher unbekannte in RMS durch Methylierung regulierte Gene eine positive Wirkung haben und in einer Kombinationstherapie zum Einsatz kommen.

6.2 Methylierungsstatus Hh-inhibierender Gene in Hepatoblastomen

In Hepatoblastomen sind ebenfalls aberrante DNA-Methylierungen bekannt und können für Patienten von großer Bedeutung sein. So scheint die Hypermethylierung des *RASSF1A*-Gens prognostische Aussagekraft zu haben. Es wird von einer Korrelation der Hypermethylierung an diesem Gen-Lokus mit dem Ansprechen auf Chemotherapie und einer möglichen Heilung sowie mit einem gegebenenfalls fatalen Ausgang der Erkrankung berichtet [38, 39]. Dies zeigt die enorme Wichtigkeit der Analyse möglicher Hypermethylierungen.

Hepatoblastome weisen häufig wie auch Rhabdomyosarkome eine Überaktivierung des Hedgehog-Signalwegs auf, wie anhand der Überexpression der Zielgene *GLI1*, *GLI2*, *PTCH1* und *BCL2* sowie des Liganden *IHH* durch Arbeiten in unserem Labor gezeigt werden konnte [44]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Lebertumore bei Erwachsenen publiziert [109, 133, 227, 228]. Mutationen, die diese aberrante Aktivierung in Hepatoblastomen erklären könnten, sind bisher nicht bekannt.

Somit könnten auch hier epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle spielen. Um einen möglichen Einfluss einer Hypermethylierung von Promotoren zu untersuchen, wurden deshalb ebenfalls putativ epigenetisch regulierte Gene, die mit dem Hedgehog-Signalweg assoziiert werden, durch Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin auf eine mögliche Reaktivierung der Genexpression analysiert. Es handelte sich hierbei wieder um die bereits genannten Gene *HHIP*, *IHH*, *SPRY2*, *FOXA2*, *SUFU*, *PTCH1* und *ULK3*.

Bis auf ein Gen konnte auch hier keine signifikant gesteigerte Genexpression nach Demethylierung detektiert werden (Abbildung 7). Die Positivkontrolle *IGFBP3* jedoch, welche – wie bisher unveröffentlichte Arbeiten in unserem Labor zeigen – in allen vier verwendeten HB-Zelllinien methyliert vorliegt, zeigte eine deutliche Reaktivierung (Abbildung 7c). Auch die Expression des negativen Regulators des Hedgehog-Signalwegs *HHIP* wurde durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin in HepT3- und HepG2-Zellen signifikant erhöht (Abbildung 7b).

Aufgrund dieses Ergebnisses und der möglichen Rolle inhibitorischer Komponenten des Hedgehog-Signalwegs bei der aberranten Aktivierung des Signalwegs in Hepatoblastomen wurden die Promotorregionen von *PTCH1*, *SUFU* und *HHIP* mittels Bisulfitsequenzierung genauer untersucht. Hierbei konnte bestätigt werden, dass

weder bei *PTCH1* noch bei *SUFU* eine Hypermethylierung vorliegt. Beide Gene wiesen nur sehr wenige bis keine 5-Methylcytosine auf (Abbildung 10).

Für *HHIP* ist bereits bekannt, dass dieses Gen in den untersuchten HB-Zelllinien nicht oder nur sehr wenig exprimiert wird. Dies konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene durch Arbeiten in unserem Labor gezeigt werden [44]. Wie aufgrund der Reaktivierung der Expression durch Demethylierung erwartet, wies die *HHIP*-Promotorregion in allen untersuchten HB-Zelllinien starke, zum Teil sogar sehr starke (HepT3) Methylierung auf. Dies steht im Gegensatz zu dem Methylierungsstatus genomischer DNA einer gesunden Kontrolle, die nur sehr wenige methylierte CpG-Dinukleotide aufwies (Abbildung 10). Die stärkste Methylierung zeigten mit 98 % der untersuchten CpG-Dinukleotide HepT3-Zellen. Weiter hervorzuheben ist, dass HepT3 die einzige Zelllinie war, bei der eine starke Demethylierung durch 5-Aza-2'-deoxycytidin beobachtet werden konnte. Diese war zwar nicht vollständig, aber ausreichend für die Reaktivierung der *HHIP*-Expression (Abbildung 11a-c).

Zwei Regionen waren hauptsächlich von der Demethylierung betroffen: die CpGs 17-29 und CpGs 47-55 (Abbildung 11c-d). Interessanterweise liegen in diesen DNA-Abschnitten insgesamt drei Bindestellen des Transkriptionsfaktors Sp1 (Abbildung 11e). Die Demethylierung an genau diesen Stellen könnte eine mögliche Erklärung für die gezeigte signifikant erhöhte Expression von *HHIP* in HepT3-Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin liefern. So berichten auch Tamada *et al.* von einer Sp1-Bindestelle in der Promotorregion von *BMP6* mit einer wichtigen Rolle in der Expressionregulation. Diese Arbeit beschreibt eine Hypomethylierung der Transkriptionsfaktor-Bindestelle und der daraus resultierenden Überexpression des Gens in Prostatakrebszellen [229]. Für humane extrazelluläre Superoxid-Dismutase (*EC-SOD*) wurde ebenfalls ein starker Zusammenhang zwischen der Genexpression und der Methylierung von Sp1- sowie Sp3-Bindestellen gefunden [230]. Diese Studie ergab außerdem, dass nicht die Methylierung der Bindestelle der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 allein für die verminderte Bindung verantwortlich ist, sondern dass für die Genrepression zusätzlich MeCP2-Proteine nötig sind. Diese Versuche wurden jedoch in Insektenzellen durchgeführt. In humanen Zellen konnte weder eine Bindung von MeCP2- noch von MBD-Proteinen an den *EC-SOD*-Promotor detektiert werden.

Ähnliche Untersuchungen, wie von Zelko *et al.* kürzlich durchgeführt [230], könnten auch im Fall der Methylierung des *HHIP*-Promotors aufschlussreich sein. Durch

einen Reporter-Assay in Insektenzellen könnte ebenfalls geklärt werden, ob die Expression allein durch eine von Sssl-Methyltransferase vermittelte Methylierung der Promotorregion reprimiert wird oder ob das Einbringen zusätzlicher Komponenten wie Proteine, die an methylierte Bereiche binden (MeCP2, MBD), für diesen Effekt notwendig sind. Desweiteren könnte anhand einer Transfektion dieser Insektenzellen mit Sp1 und dem Reporterkonstrukt geklärt werden, ob tatsächlich dieser Transkriptionsfaktor entscheidend ist und die Methylierung der Sp1-Bindestellen den Auslöser für die stark verminderte Expression von *HHIP* in HepT3-Zellen darstellt.

Festzuhalten ist, dass in HepT3-Zellen durch Behandlung mit dem Dnmt1-Inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidin eine signifikant erhöhte Reexpression von *HHIP* resultierte und diese möglicherweise in Zusammenhang mit der Demethylierung dreier Sp1-Bindestellen steht.

Eine stärkere Demethylierung in allen Zelllinien hätte möglicherweise durch höhere Aza-Konzentrationen erreicht werden können. Dabei muss jedoch immer beachtet werden, dass globale Demethylierung mit genetischer Instabilität assoziiert wird und diese das Tumorstadium wiederum begünstigen kann [231, 232]. Hier ist es sehr wichtig, genau zwischen Schaden und Nutzen einer möglichen Therapie abzuwägen. Untersuchungen zur klinischen Relevanz der Hypermethylierung der *HHIP*-Promotorregion unterstreichen die Bedeutsamkeit der genannten Ergebnisse. Von 23 Hepatoblastomen und 4 Hepatozellulären Karzinomen wiesen insgesamt 6 Tumore eine Hypermethylierung auf (Abbildung 12). Dies entspricht ca. 22 % der untersuchten pädiatrischen Lebertumore. Über die Repression durch Hypermethylierung hinaus scheint *HHIP* auch aufgrund anderer Mechanismen eine wichtige Rolle in der Tumorigenese zu haben. So wurde in 10 bis 18 % der Hepatoblastome eine große Deletion in Chromosom 4 (q28-32) entdeckt, die unter anderem den *HHIP*-Lokus beinhaltet [153, 163, 164]. Daten von Untersuchungen von Hepatozellulären Karzinomen weisen ähnliche Ergebnisse auf. Hier wird ebenfalls von einem Verlust der Heterozygotie am *HHIP*-Lokus berichtet [203, 206, 207].

Neueste Erkenntnisse ebenfalls in HCCs zeigen einen Zusammenhang der Infektion mit dem Hepatitis B-Virus (HBV) und der Methylierung von *SUFU*, einem weiteren Inhibitor des Hh-Signalwegs [219]. Durch die Infektion mit HBV bzw. aufgrund der Replikation des Virus kommt es zu einer Überexpression von DNA-Methyltransferasen und der Methylierung sowohl von viraler DNA, aber interessanterweise auch von zellulärer DNA. Da vielen Lebertumoren bei

Erwachsenen eine durch eine solche Virusinfektion ausgelöste Leberzirrhose vorausgeht, legen diese Erkenntnisse zusammen mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen einen möglichen Verlust der negativen Regulation des Hedgehog-Signalwegs in einem Teil der pädiatrischen und auch adulten Lebertumore mit aberrant aktiviertem Hh-Signalweg nahe.

Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass Lebertumore im Kindesalter bereits intrauterin entstehen können und ihnen nur sehr selten eine Leberzirrhose vorangeht. In manchen Gebieten mit endemischer Hepatitis B – wie dem subsaharischen Afrika – werden jedoch eine sehr frühe, möglicherweise von der Mutter übertragene HBV-Infektion und eine stark verkürzte Latenzzeit mit der Ausbildung pädiatrischer HCCs assoziiert [144, 233]. Dennoch entsteht der Großteil pädiatrischer Lebertumore *de novo* oder ist auf andere chronische Lebererkrankungen zurückzuführen [145, 149, 234].

Einen weiteren Hinweis für einen möglichen Verlust der negativen Regulation des Hedgehog-Signalwegs geben die Resultate einer Untersuchung, die zeigen konnten, dass bereits die Haploinsuffizienz von *PTCH1* die Tumorentwicklung auslösen kann [235, 236]. Uhmann *et al.* stellten hierzu die These auf, dass zunächst ein Allel mittels Hypermethylierung inaktiviert wird und später das verbliebene aktive Allel mutiert, so dass nur das mutierte Allel transkribiert wird [199]. Diese Ereignisse können selbstverständlich auch in umgekehrter Reihenfolge auftreten. Die einzelnen Inaktivierungsmechanismen könnten somit gepaart auftreten. Ein Verlust der Heterozygotie zusammen mit einer Hypermethylierung des zweiten Allels oder möglicherweise einer Genmutation könnte die Funktion des entsprechenden negativen Regulators komplett reprimieren.

Welche Ursache aberrante Promotormethylierungen haben, ist bisher weitestgehend unklar. Bekannt ist jedoch, dass Dnmt1 mittels einer proteolytischen Spaltung ebenfalls eine *de novo* Methylierungsaktivität aufweisen kann [32]. Dies könnte ein möglicher Hinweis darauf sein, wie es zu ektopischer DNA-Methylierung in Zusammenhang mit dem Altern und auch der Tumorentstehung kommt. So wird auch von einer Korrelation der Überexpression von *DNMT1* und dem Methylator-Phänotyp berichtet [237].

6.3 HHIP als therapeutisches Ziel in Hepatoblastomen

Welche Auswirkungen hat aber nun das exogene Wiedereinbringen von Hip? Dies wurde durch die Behandlung von Hepatoblastom-Zellen mit rekombinatem Hip untersucht. Hierdurch sollte es möglich sein, Hedgehog-Liganden in der Umgebung der Zellen abzufangen und so den Hedgehog-Signalweg negativ zu beeinflussen. Dieser Effekt konnte in einem Vorversuch mit Shh Light II-Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Mit rekombinatem Shh-Liganden stimulierte Zellen zeigten sowohl mit dem bekannten Hh-Inhibitor Cyclopamin, als auch mit einer geringen Menge (0,5 µg/ml) rekombinatem Hip eine bis zum Grundlevel der unstimulierten Zellen erniedrigte Expression eines GLI-Reporters (Abbildung 13). Dieser Effekt konnte durch höhere Konzentrationen von Hip (5 µg/ml) noch weiter verstärkt werden. Hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass rekombinantes Hip in der Lage ist, die inhibitorische Funktion von endogenem HHIP in dessen Abwesenheit zu übernehmen.

Um in einem nächsten Schritt die Eignung von rekombinatem Hip als Therapeutikum zu testen, wurde dessen Wirkung auf die Proliferation von HB-Zellen untersucht. Wie bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, weisen HepT1-Zellen nur eine sehr geringe Aktivität des Hh-Signalwegs auf und reagieren nicht auf den SMO-Inhibitor Cyclopamin [44]. Hierzu entsprechend hat auch die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von rmHip keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten von HepT1-Zellen (Abbildung 15). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Inhibition eines zuvor nicht oder nur kaum aktiven Signalwegs selbstverständlich nichts an dem Verhalten der Zelle ändert. Jedoch bei HepG2-Zellen, die ebenfalls nur eine schwache Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs aufweisen [44], ließ sich mit einer hohen Konzentration an rmHip (5 µg/ml) eine reduzierte Proliferation feststellen.

HUH6 – die Zelllinie, die von den drei untersuchten HB-Zelllinien die stärkste Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs zeigte – war konsistenterweise am sensitivsten gegenüber der Behandlung mit rmHip. Hier reichten bereits geringe Mengen, um eine signifikant niedrigere Proliferationsrate zu induzieren (Abbildung 15). Eine höhere Konzentration zeigte keinen stärkeren Effekt, jedoch eine längere Wirkung. Dies könnte darauf beruhen, dass eine Absättigung durch die Bindung des

Hh-Liganden bei einer größeren Menge rmHip erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt.

Wie bereits erwähnt, ist in den einzelnen Zelllinien die Aktivität des Hedgehog-Signalwegs sehr unterschiedlich und damit auch die Reaktion der Zellen auf die Gabe eines Hh-Inhibitors. Diese Unterschiede konnten auch mittels einer Expressionsanalyse von Hedgehog-Zielgenen nach Inkubation der Zellen mit rmHip bestätigt werden (Abbildung 14). So induziert die Stimulation mit Hh-Ligand die Expression der Transkriptionsfaktoren *GLI1* und *IGF2* in HUH6-Zellen und eine Repression dieser beiden Hh-Zielgene nach rmHip-Behandlung kann beobachtet werden. HepT1-Zellen hingegen reagieren weder auf Stimulation noch auf die Inhibierung des Hh-Signalwegs. Diese Ergebnisse sind mit den zuvor beschriebenen Resultaten stimmig.

Die Folgen von rekombinantem Hip auf HepG2-Zellen sind etwas kontroverser. So ließ sich in diesen Zellen durch Stimulation mit rmShh-N nur eine Induktion von *IGF2*, aber keine erhöhte Expression von *GLI1* messen. Wurde nun eine hohe Konzentration des negativen Hh-Regulators rmHip zugegeben, verringerte sich die Expression von *IGF2* ebenso stark wie durch eine Behandlung mit Cyclopamin. Aufgrund der mangelnden Stimulation zeigten beide Substanzen keine Wirkung auf die *GLI1*-Expression. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass der Hedgehog-Signalweg in geringem Maße in HepG2-Zellen aktiv ist, aber die Expression von *GLI1* durch bisher unbekannte Mechanismen stark eingeschränkt ist [133, 238]. Eine sehr geringe *GLI1*-Expression wiederum könnte im Umkehrschluss gleichzeitig die Ursache für den trotz der Expression der Liganden *SHH* und *IHH* sowie des positiven Regulators *SMO* [44] nur sehr schwach aktiven Signalweg sein.

IGF2 wird von HepG2-Zellen auch ohne zusätzliche Stimulation des Hh-Signalwegs im Vergleich zu HUH6- und HepT1-Zellen stark exprimiert. Eine Erklärung hierfür ist die von Zatkova *et al.* beschriebene starke Überexpression des positiven *IGF2*-Regulators *PLAG1* in diesen Zellen [158]. Dass sich die Expression von *IGF2* durch Stimulation mit rmShh-N weiter steigern lässt – wenn auch nur um den Faktor zwei – deutet darauf hin, dass eine Induktion des Hh-Signalwegs zumindest bis zu einem gewissen Grad möglich ist. So könnte eine nur sehr geringe Steigerung der *GLI1*-Expression, die relativ zu dem stark exprimierten Haushaltsgen *TBP* gemessen nicht detektierbar ist, bei einem leicht aktivierbaren *IGF2*-Promotor diese geringe Expressionserhöhung von *IGF2* bewirken. Die Einschränkung der Aktivierbarkeit der

GLI1-Expression könnte dabei einerseits auf eine starke, aber nicht vollständige Repression des *GLI1*-Promotors oder aber auch auf das Fehlen eines für die Expression von *GLI1* wichtigen Enhancers zurückzuführen sein.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Expressionssteigerung von *IGF2* durch rmShh-N ohne eine detektierbare Erhöhung der *GLI1*-Expression bieten alternative Hh-Signalwege. So konnten Anfang 2010 Chinchilla et al. die Aktivierung eines *GLI1*-unabhängigen, nicht-kanonischen, über die GTPase RhoA vermittelten Signalwegs durch Hedgehog-Proteine aufzeigen [239].

Die Expression von *HHIP* war in allen drei untersuchten Zelllinien, wie in unserem Labor auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte, extrem gering bzw. nicht detektierbar [44] und zeigte keinerlei aussagekräftige Reaktion auf Stimulation oder Inhibition des Hh-Signalwegs. Dies bekräftigt die Ergebnisse, dass ein endogener Defekt – wie Promotormethylierung oder eine Deletion – am *HHIP*-Lokus möglicherweise die Expression verhindert.

Desweiteren konnte in der gleichen Arbeit unseres Labors gezeigt werden, dass die anti-proliferatorische Wirkung von Cyclopamin auf HUH6- und HepG2-Zellen auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen sind [44], auch wenn dies für HepG2 nur mittels einem Detektionsverfahrens für ein sehr frühes Stadium der Apoptose gezeigt werden konnte. Ob rekombinantes Hip in diesen beiden Zelllinien ähnliche Wirkmechanismen in Gang setzt wie Cyclopamin, wurde mittels Annexin V-Färbung untersucht. Für HUH6-Zellen ließ sich diese Vermutung bestätigen (Abbildung 16). Dies kann über die pro-apoptotische Funktion des Rezeptors Patched in Abwesenheit von Hh-Ligand erklärt werden [240, 241]. HepG2-Zellen jedoch zeigten im Vergleich mit dem reinen Lösungsmittel keinerlei Erhöhung der Apoptoserate nach rmHip-Gabe.

Interessanterweise steigt in dieser Zelllinie nach Behandlung mit rekombinantem Hip die Expression anti-apoptotischer Gene an (Abbildung 17). Dies könnte bedeuten, dass durch die Inhibition des Hedgehog-Signalwegs ein anderer aberrant aktiver Signalweg gegensteuert. So ist einerseits bekannt, dass HepG2-Zellen eine Deletion in β -Catenin und somit einen überaktivierten Wnt-Signalweg aufweisen [152, 242] und dass das anti-apoptotische Gen *BIRC5* u.a. ein Zielgen dieses Signalwegs ist [243].

Van den Brink *et al.* berichten von einer Repression von Zielgenen des Wnt-Signalwegs durch Indian Hedgehog [244]. Dies könnte darauf hinweisen, dass durch

die Inhibition des Hedgehog-Signalwegs mittels rmHip eine mögliche partielle Repression des Wnt-Signalwegs aufgehoben wird. Die Tatsache, dass die Behandlung mit Cyclopamin keine ähnlichen Resultate zeigte, lässt vermuten, dass nicht die Repression des Hh-Signalwegs, sondern das Abfangen von Hh-Liganden diesen Effekt hervorruft und IHH selbst möglicherweise direkt auf den Wnt-Signalweg wirkt.

Wieso nun trotz der Aktivierung anti-apoptotischer Gene die Zellproliferation mittels rmHip in HepG2-Zellen reduziert werden konnte, bedarf weiterer Klärung, v.a. da diese Ergebnisse durch ebenfalls vermindertes Zellwachstum in Zellen mit stabiler Reexpression von *HHIP* weiter bekräftigt werden konnten (Abbildung 18). Ein Effekt durch *HIP* auf die Proliferation einiger HB-Zelllinien ist damit unstrittig erwiesen. Bei HUH6-Zellen lässt sich dieser durch die Induktion von Apoptose erklären. Bei HepG2-Zellen jedoch bleibt unklar woraus dieser resultiert. Einen Teil trägt hierzu sicher die verminderte Expression des pro-proliferatorisch wirkenden Transkriptionsfaktors *IGF2* bei. *IGF2* spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Hh-assoziierten Tumoren und somit sicherlich auch in deren Progression. So wird durch den Verlust von funktionellem *Igf2* die Entwicklung von Medulloblastomen in *Ptch1^{neo67/+}*-Mäusen verhindert [245]. Außerdem konnten Shimizu *et al.* eine Repression des *IGF2*-Gens durch Behandlung mit einem Bestandteil des grünen Tees – Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) – aufzeigen [246] und in diesem Zusammenhang ein vermindertes Zellwachstum detektieren. In diesem Fall ist dieses zumindest zum Teil (ca. 10 – 15 % der Zellen) auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen. Neueste Erkenntnisse stellen außerdem eine repressive Wirkung von EGCG auf den Hedgehog-Signalweg und seine Zielgene dar [247, 248].

Ein möglicher noch zu untersuchender Mechanismus wäre das Auslösen von Seneszenz oder zumindest temporärem Zellzyklus-Arrest durch das Einbringen von *HHIP*. Eine chinesische Forschungsgruppe konnte diesen Effekt durch eine Behandlung mit Teepigmenten für HepG2-Zellen zeigen [249]. Jedoch wurde in diesem Fall auch Apoptose ausgelöst.

HepG2-Zellen scheinen über andere Mechanismen bei einer Behandlung mit rmHip gegenzusteuern. Trotzdem kann mit entsprechend hohen Konzentrationen dieses Inhibitors oder der Reexpression durch stabile Transfektion ein Effekt erzielt werden. In Kombination mit anderen Substanzen könnte also *HHIP* einen Beitrag zur

Tumortherapie leisten, zumal in einer HB-Zelllinie auch geringe Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Zellproliferation auslösten.

Die ersten klinischen Erfolge des Smoothened-Inhibitors Cyclopamin bzw. dessen Derivat GDC-0449 [142, 143] zeigen, dass es sich lohnt, weiter in Therapien zu investieren, die eine Inhibition des aberrant aktiven Hedgehog-Signalwegs ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Aus der Literatur ist bekannt, dass einige embryonale Tumore einen aberrant aktivierten Hedgehog-Signalweg aufweisen. Bei etlichen Tumorarten konnte dies durch Mutationen in dem negativen Regulator des Signalwegs *PTCH1* erklärt werden, jedoch nicht bei Rhabdomyosarkomen und Hepatoblastomen. Ob mögliche epigenetische Fehlregulationen dieses und anderer inhibitorischer Komponenten eine mögliche Erklärung darstellen, wurde anhand dieser Arbeit untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass in Rhabdomyosarkomen kein Effekt auf die Expression einer gezielten Auswahl von Genen, die mit dem Hh-Signalweg assoziiert sind, durch Demethylierung auftritt. Die untersuchten Gene waren *HHIP*, *IHH*, *SPRY2*, *FOXA2*, *SUFU*, *PTCH1* und *ULK3*. Für die inhibitorischen Komponenten des Hedgehog-Signalwegs *HHIP*, *SUFU* und *PTCH1* wurde dies mittels Bisulfitsequenzierung ihrer Promotorregionen näher validiert und zusätzlich bestätigt. Ähnliche Ergebnisse traten bei Hepatoblastomen auf. Jedoch war die Expression von *HHIP* nach Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin signifikant erhöht. Diese Ergebnisse wurden für die negativen Regulatoren *HHIP*, *SUFU* und *PTCH1* wiederum mit Bisulfitsequenzierung genauer untersucht. Dadurch konnte eine starke bis sehr starke Methylierung der Promotorregion von *HHIP* gezeigt und die geringe Methylierung am *SUFU*- und am *PTCH1*-Lokus bestätigt werden. Der demethylierende Effekt war für die Zelllinie HepT3 am größten. Hierbei fielen zwei Regionen mit besonders starker Demethylierung auf. Interessanterweise beinhalten diese drei Bindestellen des Transkriptionsfaktors Sp1, die eine mögliche Erklärung für die Reaktivierung der *HHIP*-Expression nach Demethylierung liefern.

Um *HHIP* als mögliches therapeutisches Ziel weiter zu bewerten, wurde dieses exogen zugeführt. Dies geschah zum einen über eine Behandlung mit rekombinantem Hip. Hierbei konnte ein anti-proliferatorischer Effekt auf zwei der drei untersuchten HB-Zelllinien gezeigt werden. HepG2-Zellen reagierten jedoch erst bei einer hohen Konzentration des Proteins und zeigten in einer Analyse von Hedgehog-Zielgenen nur für *IGF2* eine verminderte Expression nach Inhibition des Signalwegs, während keine Veränderung der Expression von *GLI1* detektiert werden konnte. HUH6-Zellen dagegen reagierten auch bereits bei geringer rmHip-Konzentration und zeigten zudem die zu erwartende erniedrigte Expression der Zielgene *GLI1* und

IGF2. Die Repression der Proliferation schien in dieser Zelllinie auf eine Induktion von Apoptose zurückzuführen zu sein. Im Gegensatz dazu wiesen HepG2-Zellen eine erhöhte Expression anti-apoptotischer Gene nach Behandlung mit rmHip auf. Dies könnte ein Hinweis auf das Entgegensteuern eines anderen aberrant aktiven Signalwegs, z.B. des Wnt-Signalwegs, in diesen Tumorzellen sein. Ob der anti-proliferatorische Effekt in diesen Zellen tatsächlich auf HHIP zurückzuführen ist, konnte durch eine stabile Transfektion der HepG2-Zellen mit einem *HHIP*-Expressionsplasmid zusätzlich bestätigt werden. So wiesen HepG2-Zellen mit stabiler stark erhöhter Expression von humanem *HHIP* im Vergleich mit Kontrollzellen ebenfalls wie mit rmHip behandelte Zellen eine verminderte Proliferation auf.

Sowohl die Reaktivierung der Genexpression von *HHIP* in HepT3-Zellen durch Demethylierung als auch die verminderte Proliferation von HUH6- und HepG2-Zellen nach Behandlung mit rekombinantem Protein und stabiler Transfektion zeigen, dass HHIP als negativer Regulator des Hedgehog-Signalwegs durchaus für einen Therapieansatz bei Hepatoblastomen von Interesse sein könnte.

8 Literaturverzeichnis

1. Loeb, L.A., *A mutator phenotype in cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(8): p. 3230-9.
2. van den Berg, H., *Biology and therapy of malignant solid tumors in childhood*. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, 2003. **21**: p. 683-707.
3. Baylin, S.B., et al., *Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia*. *Adv Cancer Res*, 1998. **72**: p. 141-96.
4. Holliday, R., *Epigenetics: a historical overview*. *Epigenetics*, 2006. **1**(2): p. 76-80.
5. Feinberg, A.P., *Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease*. *Nature*, 2007. **447**(7143): p. 433-40.
6. Dolinoy, D.C., J.R. Weidman, and R.L. Jirtle, *Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease*. *Reprod Toxicol*, 2007. **23**(3): p. 297-307.
7. Rakyan, V.K., et al., *Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2538-43.
8. Anway, M.D., et al., *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility*. *Science*, 2005. **308**(5727): p. 1466-9.
9. Tate, P.H. and A.P. Bird, *Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression*. *Curr Opin Genet Dev*, 1993. **3**(2): p. 226-31.
10. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. *Genes Dev*, 2002. **16**(1): p. 6-21.
11. Beard, C., E. Li, and R. Jaenisch, *Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells*. *Genes Dev*, 1995. **9**(19): p. 2325-34.
12. Csankovszki, G., A. Nagy, and R. Jaenisch, *Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(4): p. 773-84.
13. Panning, B. and R. Jaenisch, *DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes*. *Genes Dev*, 1996. **10**(16): p. 1991-2002.
14. Panning, B. and R. Jaenisch, *RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 305-8.
15. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, *Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites*. *Trends Genet*, 1997. **13**(8): p. 335-40.
16. Li, E., C. Beard, and R. Jaenisch, *Role for DNA methylation in genomic imprinting*. *Nature*, 1993. **366**(6453): p. 362-5.
17. Feil, R. and S. Khosla, *Genomic imprinting in mammals: an interplay between chromatin and DNA methylation?* *Trends Genet*, 1999. **15**(11): p. 431-5.
18. Cheng, X., *Structure and function of DNA methyltransferases*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1995. **24**: p. 293-318.
19. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. *Nature*, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
20. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. *J Mol Biol*, 1987. **196**(2): p. 261-82.
21. Larsen, F., et al., *CpG islands as gene markers in the human genome*. *Genomics*, 1992. **13**(4): p. 1095-107.

22. Macleod, D., R.R. Ali, and A. Bird, *An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class II I-Abeta gene: implications for the origin of CpG islands*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4433-43.
23. Adachi, N. and M.R. Lieber, *Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome*. Cell, 2002. **109**(7): p. 807-9.
24. Peterson, C.L. and M.A. Laniel, *Histones and histone modifications*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. R546-51.
25. Rountree, M.R., et al., *DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3156-65.
26. Bestor, T., et al., *Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases*. J Mol Biol, 1988. **203**(4): p. 971-83.
27. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
28. Riggs, A.D., *X inactivation, differentiation, and DNA methylation*. Cytogenet Cell Genet, 1975. **14**(1): p. 9-25.
29. Holliday, R. and J.E. Pugh, *DNA modification mechanisms and gene activity during development*. Science, 1975. **187**(4173): p. 226-32.
30. Wigler, M., D. Levy, and M. Perucho, *The somatic replication of DNA methylation*. Cell, 1981. **24**(1): p. 33-40.
31. Stein, R., et al., *Clonal inheritance of the pattern of DNA methylation in mouse cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(1): p. 61-5.
32. Bestor, T.H., *Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain*. Embo J, 1992. **11**(7): p. 2611-7.
33. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. Cmaj, 2006. **174**(3): p. 341-8.
34. Riggs, A.D. and P.A. Jones, *5-methylcytosine, gene regulation, and cancer*. Adv Cancer Res, 1983. **40**: p. 1-30.
35. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 143-53.
36. Wong, I.H., et al., *Ubiquitous aberrant RASSF1A promoter methylation in childhood neoplasia*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 994-1002.
37. Harada, K., et al., *Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines*. Oncogene, 2002. **21**(27): p. 4345-9.
38. Sugawara, W., et al., *Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma*. Pediatr Blood Cancer, 2007. **49**(3): p. 240-9.
39. Honda, S., et al., *The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients*. Int J Cancer, 2008. **123**(5): p. 1117-25.
40. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
41. Mohler, J., *Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of Drosophila*. Genetics, 1988. **120**(4): p. 1061-72.
42. Chiang, C., et al., *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 407-13.
43. Biesecker, L.G., *Strike three for GLI3*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 259-60.

44. Eichenmuller, M., et al., *Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth*. Hepatology, 2009. **49**(2): p. 482-90.
45. Gailani, M.R., et al., *The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas*. Nat Genet, 1996. **14**(1): p. 78-81.
46. Hahn, H., et al., *Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Cell, 1996. **85**(6): p. 841-51.
47. Hahn, H., et al., *The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models*. J Mol Med, 1999. **77**(6): p. 459-68.
48. Johnson, R.L., et al., *Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome*. Science, 1996. **272**(5268): p. 1668-71.
49. Pietsch, T., et al., *Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched*. Cancer Res, 1997. **57**(11): p. 2085-8.
50. Raffel, C., et al., *Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 842-5.
51. Xie, J., et al., *Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 90-2.
52. Bellusci, S., et al., *Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis*. Development, 1997. **124**(1): p. 53-63.
53. Hardcastle, Z., et al., *The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants*. Development, 1998. **125**(15): p. 2803-11.
54. Marigo, V. and C.J. Tabin, *Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9346-51.
55. Riddle, R.D., et al., *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1401-16.
56. St-Jacques, B., et al., *Sonic hedgehog signaling is essential for hair development*. Curr Biol, 1998. **8**(19): p. 1058-68.
57. Echelard, Y., et al., *Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1417-30.
58. Goodrich, L.V., et al., *Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog*. Genes Dev, 1996. **10**(3): p. 301-12.
59. Litingtung, Y., et al., *Sonic hedgehog is essential to foregut development*. Nat Genet, 1998. **20**(1): p. 58-61.
60. Bitgood, M.J., L. Shen, and A.P. McMahon, *Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline*. Curr Biol, 1996. **6**(3): p. 298-304.
61. St-Jacques, B., M. Hammerschmidt, and A.P. McMahon, *Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation*. Genes Dev, 1999. **13**(16): p. 2072-86.
62. Vortkamp, A., et al., *Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein*. Science, 1996. **273**(5275): p. 613-22.
63. Lee, J.J., et al., *Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis*. Science, 1994. **266**(5190): p. 1528-37.
64. Lee, J.J., et al., *Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene hedgehog*. Cell, 1992. **71**(1): p. 33-50.
65. Porter, J.A., et al., *The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling*. Nature, 1995. **374**(6520): p. 363-6.

66. Porter, J.A., et al., *Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain*. Cell, 1996. **86**(1): p. 21-34.
67. Burke, R., et al., *Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells*. Cell, 1999. **99**(7): p. 803-15.
68. Ma, Y., et al., *Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched*. Cell, 2002. **111**(1): p. 63-75.
69. Ingham, P.W., A.M. Taylor, and Y. Nakano, *Role of the Drosophila patched gene in positional signalling*. Nature, 1991. **353**(6340): p. 184-7.
70. Marigo, V., et al., *Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 176-9.
71. Stone, D.M., et al., *The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 129-34.
72. Hooper, J.E. and M.P. Scott, *The Drosophila patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning*. Cell, 1989. **59**(4): p. 751-65.
73. Nakano, Y., et al., *A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the Drosophila segment polarity gene patched*. Nature, 1989. **341**(6242): p. 508-13.
74. Alcedo, J. and M. Noll, *Hedgehog and its patched-smoothened receptor complex: a novel signalling mechanism at the cell surface*. Biol Chem, 1997. **378**(7): p. 583-90.
75. Chen, Y. and G. Struhl, *In vivo evidence that Patched and Smoothened constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex*. Development, 1998. **125**(24): p. 4943-8.
76. Davies, J.P., B. Levy, and Y.A. Ioannou, *Evidence for a Niemann-pick C (NPC) gene family: identification and characterization of NPC1L1*. Genomics, 2000. **65**(2): p. 137-45.
77. Taipale, J., et al., *Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened*. Nature, 2002. **418**(6900): p. 892-7.
78. Corcoran, R.B. and M.P. Scott, *Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(22): p. 8408-13.
79. Dwyer, J.R., et al., *Oxysterols are novel activators of the hedgehog signaling pathway in pluripotent mesenchymal cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(12): p. 8959-68.
80. Lum, L. and P.A. Beachy, *The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers*. Science, 2004. **304**(5678): p. 1755-9.
81. Svard, J., et al., *Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway*. Dev Cell, 2006. **10**(2): p. 187-97.
82. Hooper, J.E. and M.P. Scott, *Communicating with Hedgehogs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(4): p. 306-17.
83. Nguyen, V., et al., *Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis*. Development, 2005. **132**(14): p. 3267-79.
84. Marigo, V., et al., *Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development*. Dev Biol, 1996. **180**(1): p. 273-83.
85. Katoh, Y. and M. Katoh, *Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation*. Curr Mol Med, 2009. **9**(7): p. 873-86.

86. Kenney, A.M., M.D. Cole, and D.H. Rowitch, *Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors*. *Development*, 2003. **130**(1): p. 15-28.
87. Hahn, H., et al., *Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(37): p. 28341-4.
88. Kenney, A.M. and D.H. Rowitch, *Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(23): p. 9055-67.
89. Madison, B.B., et al., *FoxF1 and FoxL1 link hedgehog signaling and the control of epithelial proliferation in the developing stomach and intestine*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(9): p. 5936-44.
90. Chuang, P.T. and A.P. McMahon, *Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein*. *Nature*, 1999. **397**(6720): p. 617-21.
91. Ding, Q., et al., *Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1*. *Curr Biol*, 1999. **9**(19): p. 1119-22.
92. Kogerman, P., et al., *Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(5): p. 312-9.
93. Belloni, E., et al., *Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly*. *Nat Genet*, 1996. **14**(3): p. 353-6.
94. Nanni, L., et al., *The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(13): p. 2479-88.
95. Roessler, E., et al., *Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly*. *Nat Genet*, 1996. **14**(3): p. 357-60.
96. Roessler, E., et al., *Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(11): p. 1847-53.
97. Ming, J.E., et al., *Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly*. *Hum Genet*, 2002. **110**(4): p. 297-301.
98. Roessler, E., et al., *Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13424-9.
99. Lench, N.J., et al., *Characterisation of human patched germ line mutations in naevoid basal cell carcinoma syndrome*. *Hum Genet*, 1997. **100**(5-6): p. 497-502.
100. Wicking, C., et al., *Most germ-line mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident*. *Am J Hum Genet*, 1997. **60**(1): p. 21-6.
101. Fan, Z., et al., *A missense mutation in PTCH2 underlies dominantly inherited NBCCS in a Chinese family*. *J Med Genet*, 2008. **45**(5): p. 303-8.
102. Smyth, I., et al., *Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32*. *Hum Mol Genet*, 1999. **8**(2): p. 291-7.
103. Wild, A., et al., *Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(11): p. 1979-84.

104. Kang, S., et al., *GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 266-8.
105. Wolter, M., et al., *Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Cancer Res, 1997. **57**(13): p. 2581-5.
106. Oro, A.E., et al., *Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog*. Science, 1997. **276**(5313): p. 817-21.
107. Lam, C.W., et al., *A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas*. Oncogene, 1999. **18**(3): p. 833-6.
108. Reifenberger, J., et al., *Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Cancer Res, 1998. **58**(9): p. 1798-803.
109. Sicklick, J.K., et al., *Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis*. Carcinogenesis, 2006. **27**(4): p. 748-57.
110. Taylor, M.D., et al., *Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma*. Nat Genet, 2002. **31**(3): p. 306-10.
111. Erez, A., et al., *GLI3 is not mutated commonly in sporadic medulloblastomas*. Cancer, 2002. **95**(1): p. 28-31.
112. Xie, J., et al., *Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors*. Cancer Res, 1997. **57**(12): p. 2369-72.
113. Vorechovsky, I., et al., *Somatic mutations in the human homologue of Drosophila patched in primitive neuroectodermal tumours*. Oncogene, 1997. **15**(3): p. 361-6.
114. Ahmadian, A., et al., *Genetic instability in the 9q22.3 region is a late event in the development of squamous cell carcinoma*. Oncogene, 1998. **17**(14): p. 1837-43.
115. Ping, X.L., et al., *PTCH mutations in squamous cell carcinoma of the skin*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(4): p. 614-6.
116. Vorechovsky, I., et al., *Trichoepitheliomas contain somatic mutations in the overexpressed PTCH gene: support for a gatekeeper mechanism in skin tumorigenesis*. Cancer Res, 1997. **57**(21): p. 4677-81.
117. Maesawa, C., et al., *Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in esophageal squamous cell carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. **21**(3): p. 276-9.
118. DiSanto, S., et al., *Fetal rhabdomyoma and nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Pediatr Pathol, 1992. **12**(3): p. 441-7.
119. Klijanienko, J., et al., *[Basal-cell neviomatosis associated with multifocal fetal rhabdomyoma. A case]*. Presse Med, 1988. **17**(42): p. 2247-50.
120. Geng, X. and G. Oliver, *Pathogenesis of holoprosencephaly*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1403-13.
121. Biesecker, L.G., *The Greig cephalopolysyndactyly syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2008. **3**: p. 10.
122. Watkins, D.N., et al., *Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer*. Nature, 2003. **422**(6929): p. 313-7.
123. Kubo, M., et al., *Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6071-4.
124. Thayer, S.P., et al., *Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 851-6.
125. Berman, D.M., et al., *Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 846-51.

126. Karhadkar, S.S., et al., *Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis*. Nature, 2004. **431**(7009): p. 707-12.
127. Sanchez, P., et al., *Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12561-6.
128. Sheng, T., et al., *Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer*. Mol Cancer, 2004. **3**: p. 29.
129. Fan, L., et al., *Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth*. Endocrinology, 2004. **145**(8): p. 3961-70.
130. Qualtrough, D., et al., *Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment*. Int J Cancer, 2004. **110**(6): p. 831-7.
131. Oniscu, A., et al., *Expression of Sonic hedgehog pathway genes is altered in colonic neoplasia*. J Pathol, 2004. **203**(4): p. 909-17.
132. Monzo, M., et al., *Sonic hedgehog mRNA expression by real-time quantitative PCR in normal and tumor tissues from colorectal cancer patients*. Cancer Lett, 2006. **233**(1): p. 117-23.
133. Huang, S., et al., *Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas*. Carcinogenesis, 2006. **27**(7): p. 1334-40.
134. Scales, S.J. and F.J. de Sauvage, *Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(6): p. 303-12.
135. Binns, W., et al., *A congenital cyclopiantype malformation in lambs*. J Am Vet Med Assoc, 1959. **134**(4): p. 180-3.
136. Binns, W., et al., *A Congenital Cyclopiantype Malformation in Lambs Induced by Maternal Ingestion of a Range Plant, Veratrum Californicum*. Am J Vet Res, 1963. **24**: p. 1164-75.
137. Binns, W., et al., *Chronologic evaluation of teratogenicity in sheep fed Veratrum californicum*. J Am Vet Med Assoc, 1965. **147**(8): p. 839-42.
138. Keeler, R.F. and W. Binns, *Teratogenic compounds of Veratrum californicum (Durand). I. Preparation and characterization of fractions and alkaloids for biologic testing*. Can J Biochem, 1966. **44**(6): p. 819-28.
139. Binns, W., et al., *Effects of teratogenic agents in range plants*. Cancer Res, 1968. **28**(11): p. 2323-6.
140. Cooper, M.K., et al., *Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1603-7.
141. Taipale, J., et al., *Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine*. Nature, 2000. **406**(6799): p. 1005-9.
142. Von Hoff, D.D., et al., *Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(12): p. 1164-72.
143. Rudin, C.M., et al., *Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449*. N Engl J Med, 2009. **361**(12): p. 1173-8.
144. Weinberg, A.G. and M.J. Finegold, *Primary hepatic tumors of childhood*. Hum Pathol, 1983. **14**(6): p. 512-37.
145. von Schweinitz, D., *Management of liver tumors in childhood*. Semin Pediatr Surg, 2006. **15**(1): p. 17-24.
146. Mann, J.R., et al., *Malignant hepatic tumours in children: incidence, clinical features and aetiology*. Paediatr Perinat Epidemiol, 1990. **4**(3): p. 276-89.
147. Ross, J.A. and J.G. Gurney, *Hepatoblastoma incidence in the United States from 1973 to 1992*. Med Pediatr Oncol, 1998. **30**(3): p. 141-2.

148. Oue, T., et al., *Hepatoblastoma in children of extremely low birth weight: a report from a single perinatal center*. J Pediatr Surg, 2003. **38**(1): p. 134-7; discussion 134-7.
149. Emre, S. and G.J. McKenna, *Liver tumors in children*. Pediatr Transplant, 2004. **8**(6): p. 632-8.
150. Fuchs, J., et al., *Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94*. Cancer, 2002. **95**(1): p. 172-82.
151. Jeng, Y.M., et al., *Somatic mutations of beta-catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma*. Cancer Lett, 2000. **152**(1): p. 45-51.
152. Koch, A., et al., *Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene*. Cancer Res, 1999. **59**(2): p. 269-73.
153. Weber, R.G., et al., *Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 571-8.
154. Taniguchi, K., et al., *Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas*. Oncogene, 2002. **21**(31): p. 4863-71.
155. Koch, A., et al., *Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas*. J Pathol, 2004. **204**(5): p. 546-54.
156. Albrecht, S., et al., *Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma*. Cancer Res, 1994. **54**(19): p. 5041-4.
157. Rainier, S., C.J. Dobry, and A.P. Feinberg, *Loss of imprinting in hepatoblastoma*. Cancer Res, 1995. **55**(9): p. 1836-8.
158. Zatkova, A., et al., *Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2004. **39**(2): p. 126-37.
159. Mascarello, J.T., et al., *Hepatoblastoma characterized by trisomy 20 and double minutes*. Cancer Genet Cytogenet, 1990. **47**(2): p. 243-7.
160. Soukup, S.W. and B.L. Lampkin, *Trisomy 2 and 20 in two hepatoblastomas*. Genes Chromosomes Cancer, 1991. **3**(3): p. 231-4.
161. Bardi, G., et al., *Trisomy 2 as the sole chromosomal abnormality in a hepatoblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1992. **4**(1): p. 78-80.
162. Tonk, V.S., et al., *Trisomy 2, trisomy 20, and del(17p) as sole chromosomal abnormalities in three cases of hepatoblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 1994. **11**(3): p. 199-202.
163. Gray, S.G., et al., *Comparative genomic hybridization reveals population-based genetic alterations in hepatoblastomas*. Br J Cancer, 2000. **83**(8): p. 1020-5.
164. Suzuki, M., et al., *Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays*. Cancer Sci, 2008. **99**(3): p. 564-70.
165. Lapunzina, P., *Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2005. **137C**(1): p. 53-71.
166. Hughes, L.J. and V.V. Michels, *Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis*. Am J Med Genet, 1992. **43**(6): p. 1023-5.
167. Giardiello, F.M., et al., *Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis*. J Pediatr, 1991. **119**(5): p. 766-8.

168. Aretz, S., et al., *Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for hepatoblastoma and children with apparently sporadic hepatoblastoma be screened for APC germline mutations?* *Pediatr Blood Cancer*, 2006. **47**(6): p. 811-8.
169. *International Incidence of Childhood Cancer, Vol. II.* IARC Sci Publ, 1998(144): p. 1-391.
170. Maurer, H.M., et al., *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-I. A final report.* *Cancer*, 1988. **61**(2): p. 209-20.
171. Maurer, H.M., et al., *The Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-II.* *Cancer*, 1993. **71**(5): p. 1904-22.
172. Crist, W., et al., *The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study.* *J Clin Oncol*, 1995. **13**(3): p. 610-30.
173. Arndt, C.A. and W.M. Crist, *Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence.* *N Engl J Med*, 1999. **341**(5): p. 342-52.
174. Pappo, A.S., et al., *Biology and therapy of pediatric rhabdomyosarcoma.* *J Clin Oncol*, 1995. **13**(8): p. 2123-39.
175. Meyer, W.H. and S.L. Spunt, *Soft tissue sarcomas of childhood.* *Cancer Treat Rev*, 2004. **30**(3): p. 269-80.
176. Raney, R.B., Jr., et al., *Disease patterns and survival rate in children with metastatic soft-tissue sarcoma. A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study (IRS)-I.* *Cancer*, 1988. **62**(7): p. 1257-66.
177. Ooi, S.K., et al., *DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA.* *Nature*, 2007. **448**(7154): p. 714-7.
178. Cohen, P.R. and R. Kurzrock, *Miscellaneous genodermatoses: Beckwith-Wiedemann syndrome, Birt-Hogg-Dube syndrome, familial atypical multiple mole melanoma syndrome, hereditary tylosis, incontinentia pigmenti, and supernumerary nipples.* *Dermatol Clin*, 1995. **13**(1): p. 211-29.
179. Smith, A.C., et al., *Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome.* *Pediatr Dev Pathol*, 2001. **4**(6): p. 550-8.
180. Heyn, R., et al., *Second malignant neoplasms in children treated for rhabdomyosarcoma. Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Committee.* *J Clin Oncol*, 1993. **11**(2): p. 262-70.
181. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.* *Science*, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.
182. Fletcher, C.D., *Immunohistochemistry in diagnosis of soft tissue sarcomas and new techniques in soft tissue tumour pathology.* *Recent Results Cancer Res*, 1995. **138**: p. 17-24.
183. Wijnaendts, L.C., et al., *Expression of developmentally regulated muscle proteins in rhabdomyosarcomas.* *Am J Pathol*, 1994. **145**(4): p. 895-901.
184. Altmannsberger, M., et al., *Diagnosis of human childhood rhabdomyosarcoma of antibodies to desmin, the structural protein of muscle specific intermediate filaments.* *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1982. **39**(2): p. 203-15.
185. Qualman, S.J., et al., *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study: update for pathologists.* *Pediatr Dev Pathol*, 1998. **1**(6): p. 550-61.
186. Crist, W.M., et al., *Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease.* *J Clin Oncol*, 2001. **19**(12): p. 3091-102.
187. Visser, M., et al., *Allelotype of pediatric rhabdomyosarcoma.* *Oncogene*, 1997. **15**(11): p. 1309-14.

188. Scrable, H.J., et al., *Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping*. *Nature*, 1987. **329**(6140): p. 645-7.
189. Loh, W.E., Jr., et al., *Human chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(5): p. 1755-9.
190. Minniti, C.P., et al., *The insulin-like growth factor II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor mediates IGF-II-induced motility in human rhabdomyosarcoma cells*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(13): p. 9000-4.
191. Shapiro, D.N., et al., *Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma*. *Cancer Res*, 1993. **53**(21): p. 5108-12.
192. Davis, R.J., et al., *Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma*. *Cancer Res*, 1994. **54**(11): p. 2869-72.
193. Pietsch, T., et al., *Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma*. *Lab Invest*, 1996. **74**(4): p. 809-18.
194. Sasaki, H., et al., *A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro*. *Development*, 1997. **124**(7): p. 1313-22.
195. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
196. Tostar, U., et al., *Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development*. *J Pathol*, 2006. **208**(1): p. 17-25.
197. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(2): p. 634-42.
198. Cheng, S.Y. and S. Yue, *Role and regulation of human tumor suppressor SUFU in Hedgehog signaling*. *Adv Cancer Res*, 2008. **101**: p. 29-43.
199. Uhmman, A., et al., *A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(6): p. 1567-75.
200. Cretnik, M., et al., *The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas*. *Int J Mol Med*, 2007. **19**(6): p. 875-83.
201. Pritchard, J.I. and J.M. Olson, *Methylation of PTCH1, the Patched-1 gene, in a panel of primary medulloblastomas*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008. **180**(1): p. 47-50.
202. Wolf, I., et al., *Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **105**(2): p. 139-55.
203. Tada, M., et al., *Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(12): p. 3768-76.
204. Taniguchi, H., et al., *Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatic structure in human gastrointestinal cancer*. *J Pathol*, 2007. **213**(2): p. 131-9.
205. Martin, S.T., et al., *Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(7): p. 728-33.

206. Zimonjic, D.B., et al., *Novel recurrent genetic imbalances in human hepatocellular carcinoma cell lines identified by comparative genomic hybridization*. *Hepatology*, 1999. **29**(4): p. 1208-14.
207. Guan, X.Y., et al., *Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. **30**(1): p. 110.
208. Goodrich, L.V., et al., *Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants*. *Science*, 1997. **277**(5329): p. 1109-13.
209. Hahn, H., et al., *Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome*. *Nat Med*, 1998. **4**(5): p. 619-22.
210. Beddis, I.R., M.G. Mott, and J. Bullimore, *Case report: nasopharyngeal rhabdomyosarcoma and Gorlin's naevoid basal cell carcinoma syndrome*. *Med Pediatr Oncol*, 1983. **11**(3): p. 178-9.
211. Kurmasheva, R.T., et al., *Upstream CpG island methylation of the PAX3 gene in human rhabdomyosarcomas*. *Pediatr Blood Cancer*, 2005. **44**(4): p. 328-37.
212. Lagha, M., et al., *Regulation of skeletal muscle stem cell behavior by Pax3 and Pax7*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008. **73**: p. 307-15.
213. Fu, X., et al., *Distinct expression patterns of hedgehog ligands between cultured and primary colorectal cancers are associated with aberrant methylation of their promoters*. *Mol Cell Biochem*, 2010. **337**(1-2): p. 185-92.
214. Fong, C.W., et al., *Sprouty 2, an inhibitor of mitogen-activated protein kinase signaling, is down-regulated in hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2006. **66**(4): p. 2048-58.
215. McKie, A.B., et al., *Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer*. *Oncogene*, 2005. **24**(13): p. 2166-74.
216. Frank, M.J., et al., *Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas*. *Blood*, 2009. **113**(11): p. 2478-87.
217. Miyamoto, K., et al., *Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers*. *Int J Cancer*, 2005. **116**(3): p. 407-14.
218. Akagi, T., et al., *Induction of sodium iodide symporter gene and molecular characterisation of HNF3 beta/FoxA2, TTF-1 and C/EBP beta in thyroid carcinoma cells*. *Br J Cancer*, 2008. **99**(5): p. 781-8.
219. Vivekanandan, P., et al., *Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA*. *J Virol*, 2010. **84**(9): p. 4321-9.
220. Du, P., et al., *Methylation of PTCH1a gene in a subset of gastric cancers*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(30): p. 3799-806.
221. Diede, S.J., et al., *DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 234-9.
222. Maloverjan, A., et al., *Identification of a novel serine/threonine kinase ULK3 as a positive regulator of Hedgehog pathway*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(4): p. 627-37.
223. Ecke, I., et al., *Antitumor effects of a combined 5-aza-2'deoxyctidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in Ptch mutant mice*. *Cancer Res*, 2009. **69**(3): p. 887-95.
224. Ecke, I., et al., *Cyclopamine treatment of full-blown Hh/Ptch-associated RMS partially inhibits Hh/Ptch signaling, but not tumor growth*. *Mol Carcinog*, 2008. **47**(5): p. 361-72.
225. Eichenmuller, M., et al., *Betulinic acid induces apoptosis and inhibits hedgehog signalling in rhabdomyosarcoma*. *Br J Cancer*, 2010. **[in press]**.

226. Eichenmuller, M., D. von Schweinitz, and R. Kappler, *Betulinic acid treatment promotes apoptosis in hepatoblastoma cells*. *Int J Oncol*, 2009. **35**(4): p. 873-9.
227. Kim, Y., et al., *Selective down-regulation of glioma-associated oncogene 2 inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(8): p. 3583-93.
228. Patil, M.A., et al., *Hedgehog signaling in human hepatocellular carcinoma*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(1): p. 111-7.
229. Tamada, H., et al., *Epigenetic regulation of human bone morphogenetic protein 6 gene expression in prostate cancer*. *J Bone Miner Res*, 2001. **16**(3): p. 487-96.
230. Zelko, I.N., M.R. Mueller, and R.J. Folz, *CpG methylation attenuates Sp1 and Sp3 binding to the human extracellular superoxide dismutase promoter and regulates its cell-specific expression*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(7): p. 895-904.
231. Rodriguez, J., et al., *Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers*. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8462-9468.
232. Wilson, A.S., B.E. Power, and P.L. Molloy, *DNA hypomethylation and human diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(1): p. 138-62.
233. Moore, S.W., et al., *Hepatocellular carcinoma in children*. *Pediatr Surg Int*, 1997. **12**(4): p. 266-70.
234. Czauderna, P., *Adult type vs. Childhood hepatocellular carcinoma--are they the same or different lesions? Biology, natural history, prognosis, and treatment*. *Med Pediatr Oncol*, 2002. **39**(5): p. 519-23.
235. Zurawel, R.H., et al., *Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000. **28**(1): p. 77-81.
236. Calzada-Wack, J., et al., *Unbalanced overexpression of the mutant allele in murine Patched mutants*. *Carcinogenesis*, 2002. **23**(5): p. 727-33.
237. Kanai, Y. and S. Hirohashi, *Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(12): p. 2434-42.
238. Wang, Q., et al., *Down-regulation of Sonic hedgehog signaling pathway activity is involved in 5-fluorouracil-induced apoptosis and motility inhibition in Hep3B cells*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008. **40**(9): p. 819-29.
239. Chinchilla, P., et al., *Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(3): p. 570-79.
240. Thibert, C., et al., *Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog*. *Science*, 2003. **301**(5634): p. 843-6.
241. Mille, F., et al., *The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(6): p. 739-46.
242. Sangkhathat, S., et al., *In vitro RNA interference against beta-catenin inhibits the proliferation of pediatric hepatic tumors*. *Int J Oncol*, 2006. **28**(3): p. 715-22.
243. Zhang, T., et al., *Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**(24): p. 8664-7.

244. van den Brink, G.R., et al., *Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation*. Nat Genet, 2004. **36**(3): p. 277-82.
245. Corcoran, R.B., et al., *Insulin-like growth factor 2 is required for progression to advanced medulloblastoma in patched1 heterozygous mice*. Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 8788-95.
246. Shimizu, M., et al., *EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-1 receptor axis in human hepatocellular carcinoma cells*. Cancer Lett, 2008. **202**(1): p. 10-18.
247. Tang, G.Q., et al., *(-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and suppresses proliferation by inhibiting the human Indian Hedgehog pathway in human chondrosarcoma cells*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **[Epub ahead of print]**.
248. Slusarz, A., et al., *Common botanical compounds inhibit the hedgehog signaling pathway in prostate cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(8): p. 3382-90.
249. Jia, X.D., C. Han, and J.S. Chen, *Tea pigments induce cell-cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(34): p. 5273-6.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Beate Hagl

geboren am 22.03.1983
in Landshut
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

seit 02/2010 **Kinderklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Infektionsimmunologisches Forschungslabor – AG Renner**
wissenschaftliche Mitarbeiterin

Ausbildung

02/2008 bis 01/2010 **Kinderchirurgische Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Kinderchirurgisches Forschungslabor – AG Kappler**
wissenschaftliche Promotion mit dem Thema:
„Epigenetische Veränderungen des Hedgehog-
Signalwegs in embryonalen Tumoren“

10/2007 bis 03/2008 **Ludwigs-Maximilians-Universität München**
Studiengang: Statistik

10/2002 bis 09/2007 **Technische Universität München**
Studiengang: Biologie (Diplom Universität)
Hauptfach: Genetik (1,0)
Nebenfächer: Humanbiologie (1,0), Virologie (1,3)
Diplomarbeit: "Characterization of the Prion Protein
Interacting Protein 1" (1,0)

10 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt hierbei zunächst Herrn Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, Direktor der Kinderchirurgischen Klinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in den Kinderchirurgischen Forschungslaboratorien anzufertigen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Priv. – Doz. Dr. Roland Kappler für die intensive Betreuung, für seinen fachlichen Rat und für anregende Diskussionen.

Meinen Labormädels (sowohl der aktuellen Kappler-Crew als auch der ehemaligen) und im Besonderen Saskia und Johanna sowie der guten Seele im Labor Shiva danke ich für eine schöne Zeit, für viel Spaß, für Rat und Tat und für die über den Laboralltag hinausreichende Freundschaft. Natürlich nicht zu vergessen die zahlreichen Medizindoktoranden, allen voran Sebastian, und die forschenden Kinderchirurgen.

Mein Dank gilt auch meiner neuen Chefin Priv. – Doz. Dr. Ellen Renner für ihr entgegengebrachtes Vertrauen, für ihr großes Verständnis und ihr Entgegenkommen.

Großer Dank gebührt meiner Familie und Christian. Sie haben mir den Rücken frei gehalten, mich immer unterstützt, mir sehr viel Verständnis entgegengebracht und für die nötige Ablenkung gesorgt. Danke!