

Aus der Klinik für Visceral -, Thorax -, und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. D. K. Bartsch
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Evaluation des oral verfügbaren Smoothened-Antagonisten LDE225 zur
Therapie von Inselzelltumoren in der transgenen Rip1Tag2-Maus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Dominik Wiese aus Düsseldorf

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

20.11.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: apl. Prof. Dr. V. Fendrich

1. Korreferent: PD Dr. M. Buchholz

2. Korreferent: PD Dr. T. Wündisch

Inhalt

I. Einleitung	4
I. a) Pankreatische neuroendokrine Neoplasien	4
I. b) Therapieoptionen bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien	6
I. c) Der Hedgehog-Signalweg und LDE225 als Inhibitor	8
I. d) Das Rip1Tag2 Tumormausmodell	11
I. e) Fragestellung	12
II. Material und Methoden	13
II. a) Material	13
II. a) 1. Geräte	13
II. a) 2. Gebrauchsartikel	14
II. a) 3. Chemikalien, Lösungen und Seren	15
II. a) 4. Enzyme und Nukleotide	16
II. a) 5. Puffer	16
II. a) 6. Stammlösungen	16
II. a) 7. Primäre Antikörper	16
II. a) 8. Sekundäre Antikörper	17
II. a) 9. Sekundäre Konjugate	17
II. a) 10. PCR-Primer	17
II. a) 11. Gebrauchsfertige Systeme	17
II. a) 12. Software	17
II. a) 13. Sterilisation von Materialien	18
II. b) Methoden	18
II. b) 1. Versuchsaufbau	18
II. b) 2. Tierhaltung und Zucht	19
II. b) 3. Genotypisierung	19
II. b) 4. Herstellung des applikationsfähigen LDE225	22
II. b) 5. Herstellung der Ficoll-Lösung	23
II. b) 6. Isolation von Langerhans-Inseln	23
II. b) 7. RNA-Extraktion aus isolierten Pankreasinseln	25

II. b) 8. cDNA-Synthese aus Inselzell-RNA	26
II. b) 9. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	27
II. b) 10. Präparation und Entnahme des Pankreas	28
II. b) 11. Paraffineinbettung und Erstellen von histol. Schnitten	29
II. b) 12. Hämalaun-Eosin-Färbung von histol. Schnitten	30
II. b) 13. Immunhistochemische Färbung von histol. Schnitten	30
II. b) 14. Ausmessen der Tumorflächen an HE-Schnitten	31
II. b) 15. Statistische Datenauswertung	31
III. Ergebnisse	33
III. a) Nachweis des Hh-Signalweges in Inselzelltumoren der Rip1Tag2-Mäuse	33
III. b) LDE225 verringert das Tumorwachstum.	34
III. c) LDE225 senkt die Expression der Hh-Zielgene Gli1, Ptch1 und Hip1. Ebenso wird die Expression von Insulin-mRNA verringert.	36
III. d) Die Therapie mit LDE225 verlängert signifikant die Lebenszeit der Rip1Tag2-Maus.	37
IV. Diskussion	38
V. Zusammenfassung	41
V. a) Deutsche Zusammenfassung	41
V. b) Englische Zusammenfassung	41
VI. Literaturverzeichnis	43
VII. Anhang	49
VII. a) Abkürzungen und Sonderzeichen	49
VII. b) Publikationen, Vorträge	51
VII. c) Verzeichnis der akademischen Lehrer	51
VII. d) Danksagung	52

I. Einleitung:

I. a) Pankreatische neuroendokrine Neoplasien

Das Insulinom, eine im frühen 20. Jahrhundert als Hypoglykämien induzierende Raumforderung der im Pankreas befindlichen Langerhans-Inseln beschriebene Tumorentität (Wilder et al., 1927), die zwei Jahre später erstmals durch chirurgische Intervention geheilt werden konnte (Howland et al., 1929), stellt einen wichtigen Vertreter einer heterogenen Gruppe von Pankreastumoren dar. Diese als pankreatische neuroendokrine Neoplasien (PNENs) zusammengefassten Erkrankungen haben mit einer Prävalenz von 1-2/100.000 in der Literatur insgesamt lediglich einen Anteil von 1-2% an der Gesamtheit der Tumorerkrankungen des Pankreas (Öberg und Eriksson, 2005). Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die aktuelle Inzidenz durchaus höher liegt und in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen hat (Yao et al., 2008). Den weitaus größeren Anteil der pankreatischen Tumoren bilden weiterhin das aus dem exokrinen Gewebe entstehende duktales Adenokarzinom des Pankreas und seine Vorläuferläsionen.

Es kommen sowohl wenig invasive neuroendokrine Tumoren (PNETs) als auch entartete und invasiv wachsende neuroendokrine Karzinome (PNECs) vor. Allerdings besitzen paradoxerweise beide Gruppen ein Metastasierungspotenzial, vorzugsweise hepatisch. PNENs stellen durch ihre Diversität und große Bandbreite an Malignitätsgraden innerhalb der Tumorgruppe, gepaart mit verschiedensten hormoninduzierten Symptomkomplexen besondere Anforderungen an Diagnostik und Therapie.

Klassische Beispiele für die genannten hormoninduzierten Symptomkomplexe oder Syndrome stellen das Zollinger-Ellison-Syndrom mit gehäuftem Auftreten von gastrointestinalen Ulzera, Diarrhöen, Bauchschmerzen, Sodbrennen und Übelkeit als Ausdruck eines Gastrinoms (Zollinger und Ellison, 1955), oder der hier näher zu betrachtende organische Hyperinsulinismus als Ausdruck eines Insulinoms dar. Letztgenannter äußert sich klinisch durch Hypoglykämien mit Symptomen wie Tachykardie, Tremor und Schwitzen, sowie den sogenannten neuroglukopenischen Symptomen, die ein breites Spektrum an neurologisch/psychiatrischen Krankheitsbildern vortäuschen können. Hypoglykämien und dazugehörige Symptome

treten vor allem nach Nahrungsentzug und postprandial auf. Laborchemisch finden sich die entsprechend erniedrigten Blutglukosewerte. Ein weiteres wichtiges diagnostisches Kriterium ist die Reversibilität der Symptomatik nach Gabe von Glukose. In Zusammenschau dieser Symptome ergibt sich die Whipple-Trias, benannt nach ihrem Erstbeschreiber (Whipple, 1938).

Weitere Varianten von PNENs und zugehörigen Syndromen stellen Glukagonome und VIPome dar, die Glukagon bzw. vasoaktives intestinales Peptid produzieren. Hinzu kommen noch seltenere Vertreter wie Serotonin bildende Karzinoide, die deutlich häufiger als im Pankreas ihren Ursprung im Dünndarm haben, sowie Somatostatinome.

Eine Sonderstellung nehmen Tumoren ein, die aufgrund ihres Expressionsmusters ebenfalls den PNENs zugeordnet werden, jedoch keinerlei hormonelle Symptomatik verursachen und somit als nichtfunktionelle pankreatische neuroendokrine Neoplasien (NF-PNENs) bezeichnet werden. In vielen Fällen bilden NF-PNENs zwar Hormone oder sonstige Stoffwechselprodukte wie Glykoproteine, die jedoch nicht als klinisches Syndrom in Erscheinung treten. Produzierte Metabolite wie Chromogranin A können hier dennoch als Tumormarker in der Diagnostik und vor allem zur Verlaufskontrolle herangezogen werden. Die Symptomatik besteht bei den NF-PNENs dementsprechend eher aus typischen Effekten des verdrängenden bzw. invasiven Tumorwachstums oder allgemeinen Symptomen einer konsumierenden Erkrankung, die somit häufig erst in einem späteren Stadium zu Tage treten (Falconi et al., 2006).

Neben dem sporadischen Vorkommen von PNENs stellen auch hereditäre Tumorerkrankungen wie die Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN1) und das von-Hippel-Lindau-Syndrom wichtige Faktoren in der Genese dieser Tumoren dar. Beispielsweise treten 5-10% der Insulinome und 20-30% der Gastrinome im Rahmen einer MEN1 auf (de Herder et al., 2006; Jensen et al., 2006). Auch das Verhältnis zwischen benignen und malignen Tumoren schwankt zwischen den verschiedenen PNEN-Entitäten. Unter sporadischen Insulinomen zeigen sich über 90% der Tumoren benigne, wohingegen 60-90% der Gastrinome maligne Eigenschaften wie invasives Wachstum und Metastasierungspotenzial aufweisen (Öberg und Eriksson, 2005). Dementsprechend inhomogen zeigt sich die Prognose betroffener Personen. Während beispielsweise ein benignes Insulinom nach kompletter Resektion (R0) als geheilt

betrachtet werden kann, zeigen Patienten mit hepatisch metastasiertem NF-PNEN auch nach chirurgischer Resektion von Primarius und Metastasen eine 5-Jahres-Überlebensrate von lediglich 47-76% (Chen et al., 1998; Chamberlain et al., 2000). Bei fortgeschrittener Erkrankung ist die Prognose maßgeblich vom Vorliegen bzw. Ausmaß einer Lebermetastasierung abhängig (Weber et al., 1995)

I. b) Therapieoptionen bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Die zunächst anzustrebende Therapieform für PNENs stellt weiterhin die vollständige chirurgische Sanierung im Sinne einer R0-Resektion dar. Wird wie oben erwähnt bei benignem Tumorwachstum so eine fast sichere Heilung erreicht, führt auch bei fortgeschrittener Erkrankung ein möglichst radikales chirurgisches Vorgehen zu häufig guten Langzeitergebnissen (Fendrich et al., 2006; Norton et al., 2011).

Bei nicht vollständig resektablen Tumoren bzw. Metastasen sowie bei Inoperabilität der Patienten waren die Möglichkeiten konservativer Therapiemaßnahmen lange Zeit begrenzt. Als ein wesentliches Problem für die nötige klinische Evaluation von potenziellen Therapeutika stellte sich die Seltenheit der Tumoren mit ihrer großen Heterogenität dar. Dies ermöglichte in der Vergangenheit häufig nur Studien mit geringen Fallzahlen und geringer statistischer Aussagekraft. Nachdem die häufig langsam wachsenden Tumoren über Jahrzehnte als wenig sensibel für Chemotherapeutika galten, zeigen sich jedoch inzwischen mehr und mehr Ansatzpunkte für medikamentöse Interventionsmöglichkeiten. Eine mögliche Wirksamkeit, auch gegen das maligne Insulinom, wurde erstmals 1968 für Streptozotocin, ein speziell auf die Betazellen der Langerhans-Inseln toxisch wirkendes Zytostatikum, beschrieben (Murray-Lyon et al., 1968). Die Chemotherapie mit Streptozotocin in Kombination mit 5-Fluorouracil oder Doxorubicin gilt auch nach heutiger Datenlage als antiproliferative Therapie der ersten Wahl bei metastasierten, nicht resektablen PNENs (Moertel et al., 1980; Pavel et al., 2012). Als alternative Zytostatika-Therapien haben sich zudem die Gabe von Temozolomid mit oder ohne Capecitabine, sowie bei schlecht differenzierten PNECs (G3) Cisplatin plus Etoposid

herauskristallisiert (Moertel et al., 1991; Mitry et al., 1999). Besonders zu Temozolomid stehen jedoch prospektive Studien noch aus (Strosberg et al., 2011).

Als inzwischen etablierte Therapieform zur Symptomkontrolle bei hormonellem Syndrom gilt die Gabe von Somatostatin-Analoga wie Octreotid. Für die auch antiproliferative Wirksamkeit dieser liegt, zumindest bei Midgut-NETs, inzwischen ebenfalls eine sehr gute Evidenz vor (Rinke et al., 2009). In der näheren Vergangenheit wurden zudem für den mTOR-Inhibitor Everolimus und für den Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib vielversprechende randomisierte Phase-III Studien veröffentlicht (Raymond et al., 2011; Yao et al., 2011). Dies führte in den USA, zumindest für Everolimus, zur Zulassung für die Therapie fortgeschrittener PNENs durch die FDA (FDA, 2011). In der EU wurden sowohl Everolimus als auch Sunitinib für die Therapie nicht resektabler, progredienter, gut bis mäßig differenzierter PNENs zugelassen (www.ema.europa.eu). Die hier beschriebene Entwicklung wurde in der Fachliteratur wiederholt als ein Exempel gelungener Integration der sogenannten targeted-therapy von der Grundlagenforschung bis in den klinischen Alltag gelobt (Feldmann et al., 2012). Ebenfalls untersucht werden entsprechende Kombinationen der genannten Arzneimittel. So konnte für Octreotid plus Everolimus gegenüber Octreotid plus Placebo ein Vorteil der Zweifach-Therapie nachgewiesen werden (Pavel et al., 2011).

Für alle oben genannten medikamentösen Therapieformen gilt, dass durch sie in der Regel keine Heilung sondern lediglich ein längeres Intervall ohne Progress der Erkrankung, bzw. eine Lebenszeitverlängerung erzielt werden kann. Dieses „progression-free survival“ wird in den entsprechenden Untersuchungen meist als primärer Endpunkt definiert. (Plöckinger und Wiedenmann, 2007; Raymond et al., 2011; Yao et al., 2011).

Insbesondere Lebermetastasen der NENs werden zudem bisweilen mittels Radiofrequenzablation und Chemoembolisation, bei geeigneter Verteilung bzw. anatomischer Lage, therapiert. Die Datenlage hierzu ist jedoch deutlich weniger aussagekräftig. Insbesondere fehlen randomisierte kontrollierte Studien (Gurusamy et al., 2009).

I. c) Der Hedgehog-Signalweg und LDE225 als Inhibitor

Der Hedgehog-Signalweg (Hh) ist Teil eines zellulären Regulationsmechanismus, der in der Embryogenese des Menschen, der Säugetiere im Allgemeinen und anderer Mehrzeller eine wichtige Funktion einnimmt. Dort trägt er entscheidend zur Ausdifferenzierung von Embryonalzellen in ihre jeweiligen Endformen bei. Untersucht wurden diese regulatorischen Mechanismen zunächst vorwiegend an *Drosophila* Spezies. An diesen konnte mehrfach eindrucksvoll die Rolle der Hh-Proteine bei der Aufteilung der Zellmasse in die verschiedenen Kompartimente gezeigt werden (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980; Mohler, 1988; Basler und Struhl, 1994; Blair und Ralston, 1997).

Bei Wirbeltieren fungieren die Proteine Indian Hedgehog (Ihh), Sonic Hedgehog (Shh) und Desert Hedgehog (Dhh) als Liganden dieses Signalweges. Ihre Sekretion und Bindung an den Hh-Rezeptor Patched (Ptc) hebt dessen inhibitorische Wirkung auf das 7-Transmembran-Protein Smoothed (Smo) auf, welches sodann die intrazelluläre Kaskade des Hh-Signalweges auslöst. Diese führt zur Aktivierung verschiedener DNA-bindender Zinkfinger-Proteine, die als Transkriptionsfaktoren fungieren. Ein wichtiges Beispiel hierfür bildet die Gli-Proteinfamilie. Ihre DNA-Bindung im Zellkern begünstigt die Expression der Hh-Zielgene. Hierzu zählen, neben anderen, auch das Gli1- und das Ptc-Gen, deren verstärkte Expression somit einen positiven bzw. negativen Feedback-Mechanismus bildet (Alexandre et al., 1996; Bitgood et al., 1996; Goodrich et al., 1996; Stone et al., 1996; Ingham, 1998).

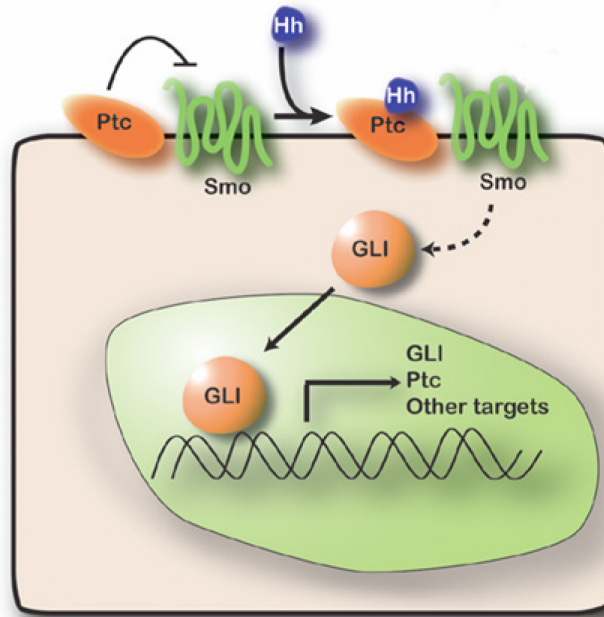


Abb. 1: Schematische Darstellung der hier erläuterten Komponenten des Hh-Signalweges (Feldmann et al., 2007)

Auch die Differenzierung des Mesoderms ist von der Verteilung der Hh-Proteine abhängig. So ist beispielsweise die regelrechte Entwicklung und Funktion des Pankreas abhängig von der Abwesenheit des Liganden Shh. (Apelqvist et al., 1997; Kim et al., 1997; Hebrok et al., 1998).

Zusätzlich zu dieser wichtigen embryogenetischen Funktion wurde für die Genese und Proliferation verschiedener Tumorentitäten eine Rolle der Hh-Proteine und der durch sie beeinflussten Transkriptionsfaktoren nachgewiesen. So werden unter anderem Glioblastome (Clement et al., 2007), Melanome (Stecca et al., 2007), Basalzellkarzinome (Gailani et al., 1996), kolorektale Karzinome (Qualtrough et al., 2004), Adenokarzinome des Pankreas (Feldmann et al., 2007a) und neuroendokrine Neoplasien (Fendrich et al., 2007, 2009) durch die Aktivität des Hh-Signalweges in ihrer Genese beeinflusst..

Als Konsequenz dieser Erkenntnisse schloss sich die Evaluation der Hedgehog-Komponenten als mögliche Angriffspunkte für Tumorthapeutika bei o.g. Entitäten an. Cyclopamin, ein bereits zuvor entdecktes, teratogen wirkendes Alkaloid der Pflanze *Veratrum californicum* (Binns et al., 1963, 1964, 1965), das nach Erforschung des Hh-

Signalweges als Smo-Antagonist und somit Inhibitor der Hh-Kaskade identifiziert worden war (Cooper et al., 1998; Incardona et al., 1998; Chen et al., 2002), schien der geeignete Wirkstoff für erste Versuche zu sein.

Dementsprechend vielfältig waren die darauf folgenden Publikationen: Für mehrere der genannten Hh-abhängigen Tumorerkrankungen konnte die antiproliferative bzw. tumorstatische Wirkung von Cyclopamin in vitro (Berman et al., 2002; Kubo et al., 2004; Qualtrough et al., 2004; Sanchez et al., 2004; Clement et al., 2007), aber auch in vivo an Xenograft- und transgenen Tiermodellen gezeigt werden (Berman et al., 2003; Thayer et al., 2003; Athar et al., 2004; Tabs and Avci, 2004; Feldmann et al., 2007b, 2008; Stecca et al., 2007).

Für PNENs im Speziellen wurde in Marburg an dem auch in dieser Arbeit verwendeten transgenen Tumormausmodell die chemopräventive und chemotherapeutische Wirkung von intraperitoneal appliziertem Cyclopamin in vivo nachgewiesen (Fendrich et al., 2011).

Da die schlechte Bioverfügbarkeit, ungünstige Pharmakokinetik und schwache Bindung an den Smo-Rezeptor von Cyclopamin eine tatsächliche Behandlung beim Menschen verbat, wurden daraufhin neue synthetische Smo-Inhibitoren erforscht und entwickelt, die diese Schwäche beheben sollten. Der in dieser Arbeit verwendete, von der Firma Novartis Pharma bereitgestellte Wirkstoff NVP-LDE225 wirkt als oral bioverfügbarer, wasserlöslicher Smo-Antagonist (Pan et al., 2010).

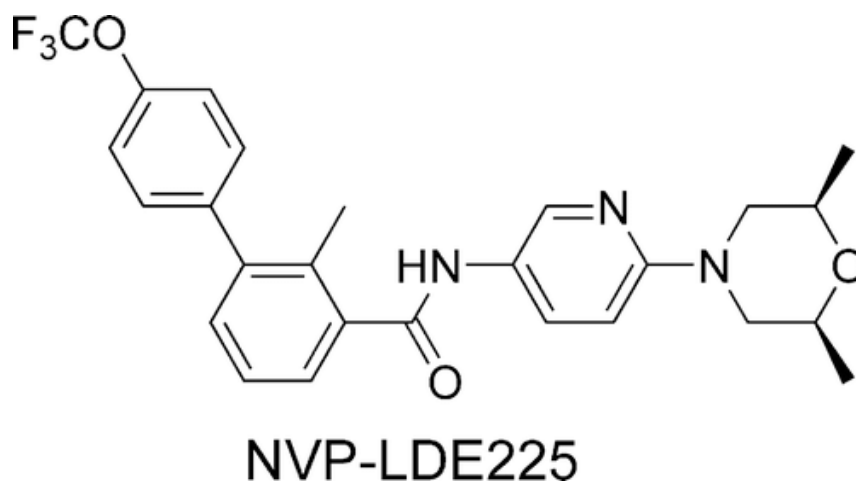


Abb. 2: Strukturformel des oral verfügbaren Smo-Antagonisten LDE225 (Pan et al., 2010)

I. d) Das Rip1Tag2 Tumormausmodell

Für die in vivo Evaluation des oral verfügbaren Smo-Antagonisten bietet sich das 1985 von Douglas Hanahan entwickelte transgene Mausmodell zur mehrstufigen Entstehung von Insulinomen an.

Hanahan hatte das von ihm fusionierte Rat-Insulin-Promotor-Gen (Rip1), eine Kombination aus dem Insulin-Gen einer Ratte und einem Promotor/Enhancer mit dem für das karzinogene Large-T-Antigen kodierenden Gen (Tag2) des Simian Virus 40 gekoppelt. Dieses neue Rip1Tag2-Gen sollte eine zellspezifische Expression des onkogenen Virusgens in den β -Zellen des Pankreas bewirken. Anschließend schleuste er das Rip1Tag2-Gen per Mikroinjektion in befruchtete Maus-Eizellen ein (Hanahan, 1985).

Die transgenen Tiere zeigen eine mehrstufige Tumorgenese in relativ fester zeitlicher Abfolge. So weisen die Langerhans-Inseln, mit einer IGF-2-Aktivierung einhergehend, ab der 5.-6. Lebenswoche hyperplastische Veränderungen auf (Christofori et al., 1994, 1995). Von der 6. Bis 12. Woche findet ein angiogenetisches und weiter proliferatives Wachstum statt, das zum Vorliegen von Inselzelladenomen und, im weiteren Verlauf, von invasiven Inselzellkarzinomen führt (Bergers et al., 1999). Schließlich versterben

die Mäuse in einer hypoglykämischen Krise. Zudem weist die Mutation einen autosomal-dominanten Erbgang auf. Es tragen somit durchschnittlich 50% der Nachkommen von einer transgenen und einer Wildtyp-Maus das Rip1Tag2-Gen. Von diesen durchlaufen bei hier vorliegender 100-prozentiger Penetranz alle Tiere die oben beschriebenen Krankheitsstadien. Die Lebenserwartung dieser Mäuse beträgt in der hier genannten Literatur 13,5 Wochen. Somit ergibt sich ein hervorragend geeignetes Modell zur in vivo Genese von PNENs, bzw. Insulinomen im Speziellen.

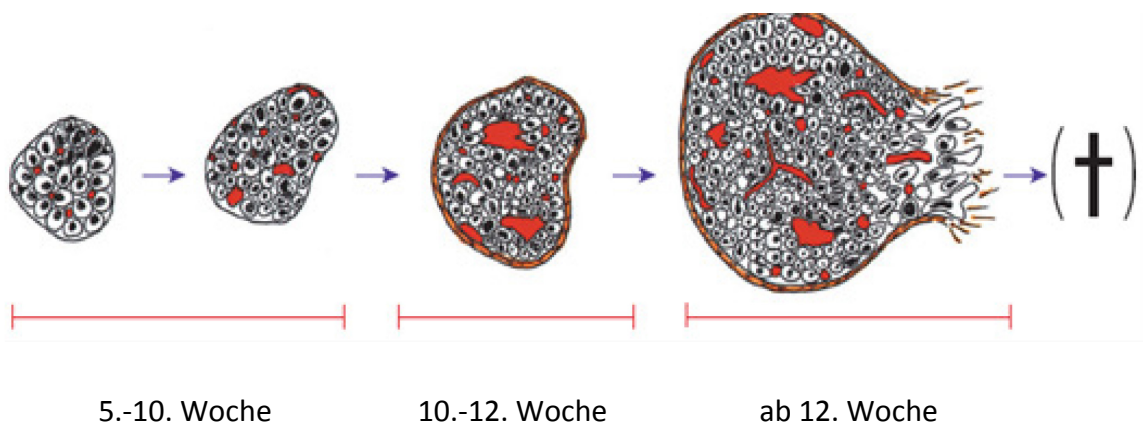


Abb. 3: Schematische Darstellung der Veränderung der Langerhans-Inseln von Rip1Tag2-Mäusen (Rehm 2010, modifiziert nach Bergers et al. 1998)

I. e) Fragestellung

Hat die orale Gabe des Smo-Inhibitors LDE225 Auswirkungen auf die Tumormasse bei Rip1Tag2-transgenen Mäusen?

Finden sich unter medikamentöser Therapie mit LDE225 in den murinen Inselzellen Veränderungen des Expressionsmusters von Hedgehog-Zielgenen?

Gibt es einen therapeutischen Effekt auf die Lebensdauer der transgenen Mäuse?

II. Material und Methoden

II. a) Material

(modifiziert nach Rehm 2010)

II. a) 1. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
- 20°C Schrank, Froster	Bosch, Gerlingen, D
- 80°C Schrank, Sepatch	Haraeus, Hanau, D
+ 4°C Schrank, KGS 3213 - 5	Liebherr, Biberach, D
Agarosegelträger, Maxi II	Labortechnik, Wasserburg, D
Analysenwaage, Explorer	Ohaus, Gießen, D
Analysenwaage, 572	Kern, Albstadt, D
Autoklav	Biomedis, Gießen, D
Destilliere, Arium 611	Sartorius, Göttingen, D
Dichtemessgerät, Density Meter DMA 35	Anton Paar, Graz, A
Digitalkamera, Dimage X 50	Konica Minolta, Unterföhring, D
Eismaschine, 072816	ZIEGRA, Isernhagen, D
Elektrophoresenetzgerät, Power Pac 300	BioRad, München, D
Elektrophoreselaufkammer, Sub - Cell GT	BioRad, München, D
Heizblock, Dri - Block DB	Techne, Princeton, USA
Kühlplatte, Tissue-Tek	Sakura, Torrance, USA
Magnetrührer, MR 2002	Heidolph, Kehlheim, D
Drainagesauger, MEDAP P 4010	Maquet, Rastatt, D
Mikroskop (binokular), 020-519.511	Leica, Bensheim, D
Mikroskopkamera, DFC 290	Leica, Bensheim, D
Mikrotom, RM 2155	Leica, Bensheim, D
Markerstift, Super PAP Pen	Zymed, San Francisco, USA
Spektrometer, NanoDrop	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraffinspender/ Ausgießstation, Tissue-Tek TEC	Sakura, Torrance, USA
Paraffinstreckbad, WB 24	Medax, Rendsburg, D
Paraffinwärmeplatte, 13501	Medax, Rendsburg, D
pH-Meter, Ultra Basic	Denver Instruments, Göttingen, D
Pipetten, Reference 2,5 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten, Pipetman 20 µl, 200 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen, D
qRT-PCR-Gerät, 7500 FAST-Real-Time PCR System	Applied-Biosystems, Darmstadt, D
Sonicator, Labsonic U	B. Braun, Melsungen, D

Sterile Werkbank , Nunc 20229	Fisher Scientific, Langenselbold, D
Thermocycler, Mastercycler EP	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozentrifuge, Centrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg, D
Transluminator, Transluminator 4000	Stratagene, Heidelberg, D
Transilluminatorkamera, M 49	Hama, Monheim, D
Tubes, Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2 ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Vakuumentrifuge, Speed Vac Concentrator	Savant, Ramsey, D
Vortexer, REAX 1 DR	Heidolph, Kehlheim, D
Wasserbad, 1002	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge, Biofuge Pico	Hareaus, München, D

II. a) 2. **Gebrauchsartikel**

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Deckgläser, 24x24 mm, 24x46 mm	Menzel, Braunschweig, D
Einbettkassetten, Bio- Net Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermüde, D
Einmalspritzen 5 ml, 10 ml	Braun, Melsungen, D
Einmalspritzen/ Insulinspritze, 1 ml	Becton Dickinson, Madrid, E
Falcon- Tubes/ PP-Röhrchen, Cellstar 5 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Einmalkanüle, Sterican, 20G, 30G	B. Braun, Melsungen, D
Filtereinheit (steril), MILLEX GP, 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, D
Filtersystem (steril), Stericup Express PLUS 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, D
Handschuhe, puderfrei, Nobaglove	Kobe, Marburg, D
Knopfsonden (gebogen)	Heiland vet, Hamburg, D
Objektträger, SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, D
Einschlussmittel, Roti - Histokitt II	Roth, Karlsruhe, D
Ohrmarken, 1005 - 1 Manel	National Band&Tag, Newport, USA
Ohrmarkenzange	National Band&Tag, Newport, USA
Petrischalen, Tissue Culture Dishes (94 mm x 16 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen, ep T.I.P.S Standard 200 µl, 500 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipettenspitzen (gestopft), SafeSeal 20 µl, 100 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, Eppendorftubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2 ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, PP-PCR-Gefäß 0,2 ml	Greiner Bio-One, Frickenh., D
Skalpelle, steril, Surgical Disposable Scalpel (Gr. 22)	Aesculap, Tuttlingen, D

II. a) 3. Chemikalien, Lösungen und Seren

Die Chemikalien wurden, insofern nicht anders aufgeführt, in Analysequalität oder in Qualität für die molekularbiologische Forschung bezogen und verwendet. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die mit *gekennzeichneten Produkte wurden bei + 4° C gelagert.

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
β-Mercaptoethanol *	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aqua dest. (steril), Aqua ad iniectionabilia	Delta Select, Dreieich, D
Borsäure	Fisher Scientific, Schwerte, D
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Citrat	Sigma, München, D
DAB Chromogen *	Dako, Hamburg, D
Eosin Lösung, alkoholisch (0,5%)	Sigma - Aldrich, München, D
Ethanol, vergällt (≥ 99%)	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, absolut (≥ 99%)	JT Baker, Griesheim, D
Ethidiumbromid (1%) *	Roth, Karlsruhe, D
Euro-Collins-Lösung	Fresenius Biotech, Gräfelfing, D
Fetales bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin, D
Ficoll polysucrose	Sigma - Aldrich, München, D
Formaldehyd (3,5 – 3,7% neutral gepuffert)	Fischar, Saarbrücken, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Hämalaun, sauer nach Mayer	Dako, Glostrup, DEN
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Methylcellulose	MP Biomedicals, Heidelberg, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
NVP-LDE225-AZ	Novartis, Basel, CH
Paraffineinbettmedium, Hist- COMP (SP 56°C)	Vogel, Gießen, D
Salzsäure (1 mol/l)	Merck, Darmstadt, D
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (99% +)	Acros Organics, Geel, B
Tween (20%, 80%) *	Serva, Heidelberg, D
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt, D
Xylol (≥98%)	JT Baker, Griesheim, D
Wasser (PCR), steril	Sigma - Aldrich, München, D

II. a) 4. Enzyme und Nukleotide

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Collagenase P, lyophilisiert	Roche, Mannheim, D
DNA - Größenstandard, Gene Ruler 50bp (0,5 µg/ µg)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
Reverse Transkriptase, Super Script III (200 U/ µl)	Invitrogen, Karlsruhe, D

II. a) 5. Puffer

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
DAB Substrat Puffer	Dako, Hamburg, D
PBS - Dulbecco (1 x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, D
HEPES	Sigma - Aldrich, München, D

II. a) 6. Stammlösungen

<i>Art der Lösung</i>	<i>Inhalt</i>
Blocking Solution (10%)	1 g BSA ad 10 ml PBST
PBST (1%)	500 µl Tween ad 500 ml PBS
TBE (10x)	108 g Tris (hydroxymethyl) amino-methane 55 g Borsäure 8,2 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ad 1 l H ₂ O
Wasch-/Isolationspuffer (Inselisolation)	HBSS + HEPES 10 mM + MgCl ₂ 1 mM + Glucose 5 mM + CaCl ₂ 1 mM (nur Waschpuffer) sterile Filtration
Citratpuffer (pH 6,0)	2,94 g Citrat ad 1 l H ₂ O

II. a) 7. Primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Spezifität</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
α – Ihh	Ziege	polyklonal	1: 200	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Patched 1	Ziege	polyklonal	1: 200	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Shh	Ziege	polyklonal	1: 50	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Smo	Ziege	polyklonal	1: 100	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Vimentin	Ziege	polyklonal	1: 50	Santa Cruz, Heidelberg, D

II. a) 8. Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
α – Ziege	Peroxidase	1: 250	Vectastain, Burlingame, USA

II. a) 9. Sekundäre Konjugate

<i>Konjugatkomplex</i>	<i>Kopplung</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Hersteller</i>
Avidin – Biotin	Peroxidase	1: 40	Vectastain, Burlingame, USA

II. a) 10. PCR-Primer (Fa. Eurofins MWG, Ebersberg, D)

<i>Genotyp</i>	<i>Primername</i>	<i>5`-3`- Primersequenz</i>
Rip1Tag2	TAG 1 (forward)	GGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG CAG
	TAG 2 (reverse)	CAG AGC AGA ATT GTG GAG TGG

II. a) 11. Gebrauchsfertige Systeme

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Micro Kit (50)	Qiagen, Hilden, D
SYBR [®] GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
DreamTaq Green PCR Master Mix	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
Vectastain ABC Kit Peroxidase Goat IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Super Script III First-Strand Synthesis S. for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe, D

II. a) 12. Software

<i>Programm</i>	<i>Hersteller</i>
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmont, USA
Leica Qwin 1.0	Leica Imaging Syst., Bensheim, D
Leica QGo 1.0	Leica Imaging Syst., Bensheim, D
SPSS Statistics 15.0 for Windows	SPSS, Chicago, USA
Zotero citation tool	George Mason University, Fairfax, USA

II. a) 13. **Sterilisation von Materialien**

Alle Medien, die in einem sterilen Zustand verwendet wurden, wurden entweder mit einer Porengröße von 0,2 µm steril- filtriert, oder im Autoklav bei 120° C für 20 Minuten Hitze- inaktiviert. Glas- und Plastikmaterialien wurden ebenfalls autoklaviert. Die Präparationsinstrumente zur Gewebeentnahme wurden mit Hilfe von Ethanol gereinigt und im Autoklav sterilisiert.

II. b) **Methoden**

II. b) 1. **Versuchsaufbau**

45 Rip1Tag2-Mäuse wurden in eine Behandlungsgruppe aus 20 Tieren und eine Kontrollgruppe aus 25 Tieren aufgeteilt. Die Mäuse in der Behandlungsgruppe erhielten ab der fünften Lebenswoche LDE225 in der Dosierung 80 mg/kg/d bis zu ihrem Tod. Zeigten die Mäuse im präfinalen Stadium ausgeprägte Kachexie oder Zeichen von Stress wurden die entsprechenden Tiere eingeschläfert und dies als Todeszeitpunkt vermerkt. Bei Mäusen, die tot im Käfig gefunden wurden, wurde der Tag des Auffindens als Todeszeitpunkt protokolliert. Alle eingeschlossenen Mäuse gingen in die statistische Auswertung der Überlebenszeit ein. Die Medikation wurde peroral mittels gebogenen Knopfsonden appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt die Vehikellösung für den Wirkstoff in gleicher Menge. Zusätzlich wurden 6 in gleicher Weise mit LDE225 behandelte und 6 nicht behandelte Mäuse, die nicht in die Überlebensstatistik eingingen, separat geführt und kurz vor ihrem Versterben mittels zervikaler Dislokation getötet, um die Pankreata entweder für die Inselisolation oder die histologische Aufarbeitung zu gewinnen. Diese genauer untersuchten Tiere wurden nicht aus den zwei Gruppen der Survival-Analyse rekrutiert, um einen Bias in den Überlebenszeiten durch zu frühes Einschlafen und Sezieren zu vermeiden.

II. b) 2. **Tierhaltung und Zucht**

Alle Tierversuche erfolgten im Einklang mit dem geltenden Tierschutzgesetz und den ethischen Richtlinien. Die im Rahmen dieses Versuches verwendeten Mäuse wurden im Tierstall des BMFZ der Universität Marburg gehalten. In steril belüfteten Käfigen zusammen mit maximal 5 Artgenossen wurden die Tiere bei 21°C einem Tag-Nacht Rhythmus von jeweils zwölf Stunden ausgesetzt, erhielten pelletiertes Zucht- oder Haltungsfutter und angesäuertes Wasser ad libitum. Ein Rip1Tag2-transgenes Männchen wurde ab Erreichen des geschlechtsreifen Alters mit maximal zwei Weibchen des Wildtyp-Stammes C57BL/6 verpaart. Die etwa drei Wochen darauf geborenen Jungtiere wurden im Alter von drei Wochen von den Muttertieren getrennt und separiert nach Geschlecht in neue Käfige abgesetzt. Nach spätestens einer weiteren Woche wurden die noch nicht genotypisierten Jungtiere mit einem nummerierten Ohrclip markiert und ein wenige Millimeter messendes Stück Gewebe von der Schwanzspitze abgeschnitten, welches in einem gleichsam nummerierten Eppendorf-Tube für die weitere Aufarbeitung verwahrt wurde.

II. b) 3. **Genotypisierung**

Die Unterteilung neu gezüchteter Versuchstiere in Rip1Tag2- und Wildtyp-Mäuse wurde durch den Nachweis transgener DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vorgenommen. Hierzu musste zunächst das von den Jungtieren gewonnene Gewebematerial lysiert und die DNA extrahiert werden. Anschließend wurde diese in der PCR amplifiziert und in einem Gelelektrophorese-Verfahren aufgetrennt. Die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Genabschnitte wurden im Transilluminator sichtbar gemacht und photographisch ausgewertet.

Für die Extraktion der Maus-DNA wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit der Fa. Qiagen verwendet. Zunächst wurde das Gewebe zersetzt, indem das 1,5 ml Eppendorfgefäß, das die Schwanzspitze beinhaltete mit 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K aus dem Kit befüllt wurde. Nach kurzem Mischen wurden die Proben bei 56°C bis zum nächsten Morgen inkubiert. Zu dem nun lysierten Gewebe wurden am Folgetag 200 µl AL Puffer und 200 µl Ethanol 70% hinzupipettiert. Nach ausgiebigem Vortexen wurden

die gesamten 600 µl in eine spin column mit enthaltener Membran pipettiert. Nach Zentrifugation bei 8000 U/Min. für eine Minute wurde das Sammelröhrchen unter der spin column mitsamt Durchfluss verworfen. Die Membran mit der nun an ihr haftenden DNA wurde im Anschluss mit 500µl AW1 Puffer und 500 µl AW2 Puffer gewaschen, indem diese in die spin column pipettiert und die Proben mit 8000 U/Min. für eine Minute, bzw. 13000 U/Min für drei Minuten bei AW2 zentrifugiert wurden. Der Durchfluss und das Sammelröhrchen wurden jeweils verworfen. Nun wurden 200 µl des vorher auf 56°C erwärmten AE Puffers auf die Membran pipettiert und die DNA durch erneute Zentrifugation bei 8000 U/Min. für eine Minute aus der Membran eluiert, wo sie von einem unter der spin column platzierten 1,5 ml Eppendorf-Tube aufgefangen wurde. Sofern nicht die sofortige Verwendung in einer PCR folgte wurden die 200 µl DNA-Proben bei -20°C gelagert.

Um die gewonnene DNA in einer PCR zu amplifizieren und somit untersuchen zu können, wurden 2 µl der jeweiligen Maus-DNA-Lösung mit 10 µl PCR Reaktions-Puffer (Ready Mix), 6 µl DNase-freiem Wasser, 1 µl Forward Primer und 1 µl Reverse Primer zusammengeführt. Alle obigen Substanzen, außer der Maus-DNA wurden dafür in der benötigten Gesamtmenge nach dem hier beschriebenen Verhältnis zusammenpipettiert und auf Eis gelagert. Zu den fertigen Proben á 20 µl (nach Hinzugeben der DNA) kamen eine weitere Probe mit vorbekannt transgener DNA als Positiv- und eine weitere Probe mit vorbekannt Wildtyp-DNA als Negativkontrolle. Als Kontrolle für eine eventuelle Verunreinigung der PCR-Mischung diente zudem eine Probe, die statt DNA lediglich 2 µl H₂O zusätzlich zu den PCR-Reagenzien enthielt. Alle zu bearbeitenden Proben wurden anschließend im Thermocycler nach einem vorher definierten Algorithmus erwärmt und abgekühlt um die eigentliche Polymerase-Kettenreaktion mit mehreren Zyklen aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation zu erzeugen (Mullis et al., 1986; Cha und Thilly, 1993). Die unten aufgeführte Tabelle veranschaulicht das verwendete PCR-Protokoll im Thermocycler.

<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
1 x	94° C	3,0 Min.
2 x	94° C	0,5 Min.
	70° C	0,5 Min.
	72° C	1,0 Min.
2x	94° C	0,5 Min.
	67° C	0,5 Min.
	72° C	1,0 Min.
2 x	94° C	0,5 Min.
	64° C	0,5 Min.
	72° C	1,0 Min.
2x	94° C	0,5 Min.
	61° C	0,5 Min.
	72° C	1,0 Min.
2x	94° C	0,5 Min.
	58° C	0,5 Min.
	72° C	1,0 Min.
19x	94° C	0,5 Min.
	72° C	1,0 Min.
1x	72° C	7,0 Min.
1x	4° C	unendlich

Die aus der PCR gewonnene DNA musste anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Das hierfür verwendete Agarosegel wurde wie folgt hergestellt. Durch Hinzugabe von 3,4 g Agarose in 170 ml 10-fach verdünnten TBE Puffers und darauf folgendes Erhitzen des Gemisches in der Mikrowelle entstand ein homogenes Gel, das in seinem noch flüssigen Zustand mit 15 µl Ethidiumbromid versetzt wurde. Nach vorsichtigem Schwenken wurde das fertige Gel in die Gelplatten-Form gegossen und die Kämme für die späteren Probenfächer in das Gel getaucht. Nach einer halben Stunde wurden die Kämme und die Form entfernt und die entstandene Gelplatte in die mit TBE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt.

Die fertigen 20 µl-Proben wurden nach Durchlaufen der PCR in die Probenfächer pipettiert. In die jeweils erste Tasche einer Zeile wurden 20 µl eines Markers zur Etablierung eines Größenstandards der DNA-Fragmente (GeneRuler) gegeben. An die Elektrophorese-Laufkammer wurde sodann für 40 Minuten eine Spannung von 120 Volt angelegt. Hierunter wanderten die enthaltenen DNA-Fragmente entsprechend

ihrer Ladung und angereichert mit dem nun eingelagerten Ethidiumbromid horizontal durch die Gelplatte. Danach wurde die Platte auf einen UV-Transilluminator gelegt, über dem eine Kamera die durchleuchtete Platte abfilmte. Die digitalisierten Aufnahmen wurden schließlich nach Überprüfung der Negativ- und Positivkontrollen hinsichtlich vorhandener Rip1Tag2-Banden in der entsprechenden Position ausgewertet. Nach Feststellung des Genotyps wurden die Versuchstiere entsprechend ihrer Zugehörigkeit in die Versuchsgruppen aufgeteilt oder zur Zucht verwendet.

II. b) 4. Herstellung des applikationsfähigen LDE225

Das von der Fa. Novartis (Basel, Schweiz) bereitgestellte NVP-LDE225-AZ wurde entsprechend den Herstellerangaben für die orale Applikation aufbereitet. Hierzu wurde zunächst die Vehikellösung angesetzt. 1 l H₂O wurde mit 5 g Methylcellulose und 5 ml Tween 80 versetzt und bis zum Entstehen einer klaren Lösung verrührt. Aus diesem Vehikel und dem pulverförmigen NVP-LDE225-AZ wurde jede Woche eine von der Zahl der noch verbliebenen zu behandelnden Mäuse abhängige Menge der fertigen Suspension hergestellt. Bei vom Hersteller empfohlenen Dosierungen zwischen 20 und 80 mg/kg/d wurde sich vor Versuchsbeginn für 80 mg/kg/d entschieden. Zur Kalkulation der zu applizierenden Menge wurde ein Durchschnittsgewicht von 25 g herangezogen und die Konzentration so gewählt, dass die gewünschte Dosis von 80 mg/kg in Portionen von 250 µl pro Maus appliziert werden konnte. Für die wöchentliche Herstellung der Suspension wurde zunächst die jeweils benötigte Menge NVP-LDE225-AZ abgewogen und in die entsprechende Menge Vehikellösung gegeben. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurde das Gemisch für 2-3 Minuten mit dem Sonicator homogenisiert und nach kurzem Abkühlen dieser Vorgang wiederholt bis keine größeren Partikel mehr sichtbar waren. Nach Einschleusen des Medikamentes in den Tierstall wurde es nach o.g. Zeitschema peroral verabreicht.

II. b) 5. Herstellung der Ficoll-Lösung

Ficoll-Lösung wurde für die Inselisolation in 4 speziellen Dichten benötigt, um die Inseln von anderen Gewebe- und Zellanteilen zu trennen. Hierzu wurde zunächst eine Ficoll-Stocklösung angesetzt. 500 ml Euro-Collins-Lösung wurden in ein großes autoklaviertes Becherglas gefüllt und auf der Rührplatte ein Rührstäbchen bei geringer Drehzahl hinzugegeben. Nun wurden langsam 190 g Ficoll in Pulverform hinzugegeben und das Einrühren der zähflüssigen Masse über Nacht fortgesetzt. Am Folgetag wurden 2,98 g HEPES abgewogen und in die Lösung eingerührt. Zudem wurde unter Messung mit einer pH-Sonde der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 titriert. Die fertige Stocklösung wurde sodann durch ein 0,22 µm Filtersystem in ein steriles Becherglas filtriert und bei 4°C gelagert. Nach mindestens einer Nacht Abkühlzeit auf 4°C wurde mit dem Densitometer die Dichte der Stocklösung bestimmt. Diese lag üblicherweise zwischen 1,120 und 1,132 g/cm³.

Um die 4 gewünschten Dichten (1,108; 1,096; 1,069 und 1,037 g/cm³) zu erhalten wurde die benötigte Menge Stocklösung für einen 50 ml Ansatz mit 1 ml FBS versetzt und je nach Dichtestufe, sowie abhängig von der gemessenen Dichte der vorliegenden Ficoll-Stocklösung mit Euro-Collins-Lösung verdünnt. Die 50 ml Tubes mit Ficoll-Lösung plus FBS in fertiger Verdünnung wurden bei 4°C aufbewahrt.

II. b) 6. Isolation von Langerhans-Inseln

Die Inselisolation wurde nach dem Protokoll von Szot und Kollegen durchgeführt (Szot et al., 2007). Dieses beruht auf der konventionellen Methode des Collagenase-Verdau von exokrinem Pankreasgewebe, kombiniert mit der Verwendung eines Ficoll-Gradienten, um die so herausgelösten Inseln hochselektiv vom restlichen Gewebe zu separieren.

Zu Beginn wurde die für die jeweilige Anzahl Mäuse benötigte Collagenase P (0,8 mg/ml bei 5 ml Lösung pro Maus) in ein 50 ml Tube gegeben, mit Isolationspuffer (Zusammensetzung siehe II. a) 6.) auf die entsprechende Gesamtmenge aufgefüllt und per Vortexer gemischt. Von dieser Collagenase-Lösung wurden pro Maus 3 ml in eine 5 ml Spritze aufgezogen und 2 ml in ein Plastik-Reaktionsgefäß mit Verschluss gefüllt. Alle Reaktionsgefäße und Spritzen wurden sodann auf Eis gelagert und die Spritzen mit 30 G Kanülen versehen.

Die betreffende Maus wurde per zervikale Dislokation getötet. Nachdem das Fell mit Ethanol 70% eingesprüht worden war erfolgte ein V-förmiger Schnitt, am Unterbauch beginnend zum Rippenbogen hin, um das Peritoneum zu eröffnen. Der gesamte Darm wurde, soweit als möglich, nach links lateral aus dem Abdomen heraus luxiert um den Blick auf den Ductus choledochus und das Duodenum mit Pankreas freizulegen. Der Darm wurde mit 2 kleinen Klemmen proximal und distal der Papilla duodeni major besetzt, um einen übermäßigen Abfluss von Collagenase-Lösung in das Darmlumen zu verhindern. Über die Gallenblase als Eintrittspforte wurde eine der Spritzen mit Collagenase-Lösung in den Ductus cysticus eingeführt und unter Aufspritzen des Ganges vorgeschoben. Durch Applikation der restlichen Lösung in den Ductus choledochus wurde das Pankreas retrograd mit Collagenase gefüllt und distendiert. Anschließend wurde das aufgefüllte Organ vorsichtig vom Dünndarm abgeschoben und mit der Mikroschere die Gangstrukturen durchtrennt. Das Pankreasgewebe wurde in das vorbereitete Reaktionsgefäß mit Collagenase-Lösung auf Eis überführt.

Das Reaktionsgefäß mit distendiertem Pankreasgewebe wurde für 17 Minuten in einem Wasserbad mit 37°C inkubiert und anschließend sanft geschüttelt, bis das Pankreasgewebe zerfiel. Dieses wurde sodann durch ein autoklaviertes grobmaschiges Sieb in ein Becherglas geschüttet. Die Gewebereste, die im Sieb hängen blieben, wurden mit einer Spritze mit Waschpuffer (Zusammensetzung siehe II. a) 6.) gewaschen, das Reaktionsgefäß ebenfalls mit Waschpuffer gespült und anschließend der Durchfluss im Becherglas in ein 50 ml Tube überführt. Dieser Arbeitsschritt wurde auf Eis durchgeführt.

Das Tube mit dem Durchfluss wurde sodann bis 1300 rpm zentrifugiert, die Zentrifuge gestoppt und der Überstand bis auf 5 ml abpipettiert. Der Bodensatz wurde aufgelockert und das Tube neu mit Waschpuffer befüllt. Nach Wiederholen dieses Waschvorganges wurde der Bodensatz in ein 15 ml Tube überführt, dieses ebenfalls mit Waschpuffer aufgefüllt und zentrifugiert. Nachdem der Überstand erneut möglichst vollständig abpipettiert worden war, wurden nach Auflockern des Bodensatzes zunächst 7 ml Ficoll mit einer Dichte von $1,108 \text{ g/cm}^3$ in das Tube gegeben und der Bodensatz darin aufgelöst. Anschließend erfolgte die langsame Aufschichtung von jeweils 2 ml großen Ficoll-Phasen mit Dichten von $1,096$; $1,069$ und $1,037 \text{ g/cm}^3$ in dieser Reihenfolge. Es folgte die Zentrifugierung des Tubes bei 1800 rpm und 4°C für 15 Minuten. Die oberste Ficoll-Phase wurde anschließend komplett aspiriert und verworfen. Die zwischen den zwei mittleren Phasen scheibenförmig akkumulierten Inseln wurden mit einer Plastikpipette eingesaugt und in ein neues 50 ml Tube mit kaltem Waschpuffer gegeben. Nach Ausspülen der Plastikpipette mit Waschpuffer und Auffüllen des neuen Tubes wurde der oben beschriebene Waschvorgang hiermit dreimal wiederholt und nach dem letzten, möglichst vollständigen Entfernen des Überstandes die pelletierten Inseln für die RNA-Extraktion weiter verwendet.

II. b) 7. RNA-Extraktion aus isolierten Pankreasinseln

Die RNA-Extraktion erfolgte mit dem RNeasy Micro Kit von Qiagen nach dem darin enthaltenen Protokoll. Die benötigte Menge des enthaltenen RLT Puffers wurde vor Beginn mit $10 \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol pro ml versetzt. Zu den isolierten Pankreasinseln einer Maus wurden $350 \mu\text{l}$ des präparierten RLT Puffers hinzugegeben. Durch Vortexen des Gemisches wurden die Inselzellen lysiert und homogenisiert und das Lysat in eine gDNA Eliminator spin column mit 2 ml Sammeltube pipettiert. Nach Zentrifugieren für 30 Sekunden bei 10.000 U/Min. wurde die spin column verworfen und $350 \mu\text{l}$ Ethanol 70% zu dem Durchfluss hinzugegeben und per Pipettieren vermischt. Die Probe wurde daraufhin in eine RNeasy MinElute spin column transferiert und erneut für 15 Sekunden bei 10.000 U/Min. zentrifugiert. Der Durchfluss wurde anschließend

verworfen und die spin column wieder in das Sammel tube gestellt. Nun wurden 700 µl RW1 Puffer in die spin column pipettiert und für 15 Sekunden bei 10.000 U/Min. zentrifugiert. Wieder wurde der Durchfluss verworfen, das Sammel tube weiterverwendet und in die spin column anschließend 500 µl RPE Puffer gegeben. Nach gleichartiger Zentrifugierung wie zuvor wurde der Durchfluss verworfen und 500 µl RNase-freies Ethanol 80% in die spin column pipettiert. Jetzt wurde bei 10.000 U/Min. für zwei Minuten zentrifugiert und die spin column anschließend auf einem neuen Sammel tube platziert. Zum Trocknen der spin column Membran wurde bei geöffneten Verschlusskappen für fünf Minuten mit 13.000 U/Min. zentrifugiert. Nachdem die spin column in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gestellt worden war, wurden 14 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Anschließend wurde für eine Minute bei 13.000 U/Min. zentrifugiert und so die DNA aus der Membran eluiert. Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes wurden 1,5 µl der Probe auf den NanoDrop gegeben und mit dessen Messroutine die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Die RNA wurde anschließend bei -80°C gelagert.

II. b) 8. cDNA-Synthese aus Inselzell-RNA

Die Herstellung von cDNA aus der RNA isolierter Inselzellen wurde mit Hilfe des „SuperScript III First-Strand Synthesis System“ der Fa. Invitrogen durchgeführt. Entsprechend dem beiliegenden Protokoll wurde zunächst die RNA mit den zusätzlich für die Synthese von cDNA benötigtem dNTP, Oligo(dT) als Primer und DEPC-H₂O in folgendem Verhältnis kombiniert:

<i>Bestandteil</i>	<i>Menge</i>
10 mM dNTP	1 µl
Oligo(dT)	1 µl
Proben-RNA	max. 8 µl
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl

Das Gemisch wurde für fünf Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend für eine Minute auf Eis abgekühlt. Parallel wurde der Synthese-Mix in folgender Form angesetzt:

<i>Bestandteil</i>	<i>Menge</i>
10x RT Puffer	2 µl
25 µM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT	1 µl
SS-III Reverse Transkriptase	1 µl

Der Mix wurde mit der vorbereiteten RNA-Probe zusammenpipettiert und, die Probe mit der Pipette vermischt und anschließend kurz zentrifugiert. Um die Primeranlagerung und die Synthese durch die Reverse Transkriptase zu ermöglichen, wurde die Probe im Thermocycler zunächst für 50 Minuten bei 50° inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 85°C für fünf Minuten beendet. Nach Hinzugabe von 1 µl RNase H und Inkubation bei 37°C für 20 Minuten, um RNA-Reste aus der Probe zu entfernen, wurde die fertige cDNA bei -20°C gelagert.

II. b) 9. **Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR wurde durch den Kooperationspartner Dr. Matthias Lauth am Marburger Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung durchgeführt und ausgewertet.

Die Messung erfolgte mit Hilfe des 7500 Fast Sequence Detection System der Fa. Applied Biosystems. Die Messung wurde in einer 96- Wells- Platte mit zwei Replikaten für jede cDNA- Probe durchgeführt. Als Vorlage für die Amplifikation des Zielgens wurde 1 µl cDNA verwendet.

<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
1 x	50° C	2 min
1 x	95° C	10 min.
40 x	95° C	15 sek.
	60° C	1 min
1 x	95° C	15 sek.
	60° C	1 min.
	95° C	15 sek.
	60° C	15 sek.

qRT- PCR Programm mit SYBR Green 7500 Fast SDS (Rehm 2010)

<i>Substanz</i>	<i>Menge pro Well</i>
POWER SYBR® GREEN PCR Master Mix	10 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,1 µl
Reverse-Primer (10 pmol/ µl)	0,1 µl
cDNA	1µl
dH ₂ O	ad 20 µl

qRT- PCR Reaktionsansatz mit SYBR Green (Rehm 2010)

Die Ergebnisse wurden mit der 2^{-Delta Delta C(T)} - Methode ausgewertet (Livak und Schmittgen, 2001). Die berechneten Werte entsprechen der relativen Expression des Zielgens. Die relative Expression erlaubt wiederum Rückschlüsse auf die Menge des Zielgens in der jeweiligen cDNA - Probe und somit auf den ursprünglichen mRNA - Gehalt in der Zelle.

II. b) 10. Präparation und Entnahme des Pankreas

Für die histologische Aufarbeitung erfolgte die Tötung und Sektion der Maus wie unter II. b) 6. beschrieben. Jedoch wurde keinerlei Manipulation oder Aufspritzen des Organes wie dort genannt durchgeführt, sondern das Pankreas lediglich in toto exzidiert und in Formaldehyd 4% eingelegt in Eppendorf-Tubes aufbewahrt.

II. b) 11. Einbetten von Gewebe in Paraffin und Erstellen von histologischen Schnitten

Um eine Veränderung der zellulären Strukturen zu vermeiden, wurde das frisch entnommene Pankreasgewebe, welches für die Paraffineinbettung bestimmt war, in 1,5 ml Tubes mit Formaldehyd gegeben und über Nacht bei 4° C fixiert. Um das Gewebe für die Einbettung vorzubereiten, musste es am nächsten Tag in einer aufsteigenden Alkohol-/ Xylol- Reihe entwässert werden. Dazu wurde es in verschließbare Einbettkassetten gelegt und in einen Dehydrierungsautomaten gegeben, der mit folgendem Programm gestartet wurde:

<i>Substanz</i>	<i>Zeit</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zyklen</i>
Formaldehyd	1 h	40° C	1 x
Alkohol 96%	1 h	40° C	2 x
Alkohol 100%	1 h	40° C	3 x
Xylol	1 h	40° C	4 x
Paraffin	45 min.	60° C	1 x
Paraffin	1 h	60° C	3 x

Das für die Einbettung vorbereitete Pankreasgewebe wurde nun über Nacht zur Vorbehandlung in ein 60° C warmes Paraffinbad gelegt. Am nächsten Tag wurden die Gussformen mit dem Pankreasgewebe aus dem Bad genommen und mit Paraffin übergossen, bis das Gewebe vollständig davon umgeben war. Nach dem Erkalten auf der Kühlplatte, wurden die Blöcke aus der Gussform entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4° C gelagert.

Die Paraffinblöcke wurden mit Hilfe eines Mikrotoms in 4 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden sofort in ein 41° C warmes Paraffinstreckbad gelegt. Nachdem sich die Schnitte vollständig entfaltet hatten wurden sie auf Objektträger übertragen. Diese Objektträger wurden zur Trocknung für etwa 1 Stunde auf eine Paraffinwärmeplatte gelegt. Nach der Herstellung wurden die Gewebeschnitte bei RT bis zur Färbung gelagert. (zitiert aus Rehm 2010)

II. b) 12. **Hämalaun-Eosin-Färbung von histologischen Schnitten**

Das auf dem Objektträger haftende Gewebe wurde durch zweimaliges fünfminütiges Eintauchen in Xylol von Paraffin befreit. Die anschließende Hydrierung wurde mit einer Ethanolreihe in der Abfolge 100%, 85%, 75% und danach mit ddH₂O in zweiminütigen Intervallen durchgeführt. Sodann wurde der Objektträger fünf Minuten in Hämalaun-Lösung nach Mayer getaucht und für zehn Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Die Gegenfärbung geschah mit Eosin 0,5% für 30 Sekunden, bevor zweimal mit ddH₂O gewaschen wurde. Nun wurde der Schnitt dehydriert indem die o.g. Ethanolreihe in entgegengesetzter Abfolge wiederholt wurde. Zuletzt wurde durch erneute zweimalige Behandlung mit Xylol das Ethanol entfernt, Histokitt Einschlussmittel auf das gefärbte Gewebe aufgetragen und mit einem Deckglas versiegelt.

II. b) 13. **Immunhistochemische Färbung von histologischen Schnitten**

Analog zur Hämalaun-Färbung wurde am ersten Tag das Präparat zunächst mit Xylol zweimal fünf Minuten entparaffiniert. Die Hydrierung erfolgte jedoch in mehr Schritten mit Ethanolkonzentrationen von 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30% zu jeweils zwei Minuten mit zweimal darauf folgendem, ebenfalls zweiminütigen, Eintauchen in ddH₂O. Anschließend wurde der Objektträger in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 gestellt. Durch zehnminütiges Erhitzen in der Mikrowelle und anschließendes Abkühlen auf Eis für 20 Minuten wurden die zellulären Antigene demaskiert. Sodann wurde erneut dreimal mit ddH₂O gespült und durch darauf folgendes Behandeln mit Wasserstoffperoxid 3% für 10 Minuten die endogene Peroxidase blockiert. Nach erneutem Spülen mit ddH₂O wurde der Objektträger in einer feuchten Kammer platziert und das Präparat mit einem speziellen Markerstift eingekreist. Der Schnitt wurde für fünf Minuten mit PBST benetzt und daraufhin für 60 Minuten mit BSA 10% bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Entfernen der BSA-Lösung wurde der verdünnte primäre Antikörper auf das Gewebe pipettiert und die feuchte Kammer mit dem Objektträger über Nacht bei 4°C gelagert.

Der zweite Tag der Färbung begann mit der Entfernung des primären Antikörpers und drei fünfminütigen Waschschritten mit PBST. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Darauf folgte eine weitere 60-minütige Inkubation nach Entfernen des Antikörpers und Applikation des ABC-Reagenz. Nach nochmals drei Waschschritten mit PBST wurde das Präparat unter ein Lichtmikroskop gelegt. Unter Sicht wurde DAB-Chromogen appliziert und der Objektträger bei Erreichen einer ausreichenden aber noch spezifischen Braunfärbung in ddH₂O getaucht, um die Färbung zu stoppen. Im folgenden Schritt wurde eine 15-sekündige Färbung mit Hämalaun durchgeführt und das Präparat für 5 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. In der entgegengesetzten Alkoholreihe wurde das Gewebe wieder dehydriert und nach zweimaliger fünfminütiger Xylol-Behandlung mittels Histokitt und Deckglas versiegelt.

II. b) 14. **Ausmessen der Tumorflächen an HE-Schnitten**

Mit Hilfe der Software Leica QWin wurden mit einer Mikroskopkamera aufgenommene HE-Schnitte von behandelten und unbehandelten Rip1Tag2-Mäusen hinsichtlich der Ausmaße des Inselgewebes untersucht. Hierzu wurde mit einem für solche Messungen vorgesehenen Tool jede unauffällige wie auch pathologische Insel, die in dem Schnitt zu sehen war, umfahren. Dies konnte für das gesamte Inselgewebe eines histologischen Schnittes durchgeführt werden. Die Software gab daraufhin die in diesem Schnitt gemessene Gesamtfläche in μm^2 aus. Die für die Messung verwendeten Serienschnitte wurden bei jedem verwendeten Pankreaspräparat nach einem vorher festgelegten Schema gewonnen.

II. b) 15. **Statistische Datenauswertung**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit den Programmen *Microsoft Excel* und *SPSS*.

Die Signifikanztestung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde mit dem *t-Test* durchgeführt. Die graphische Auswertung der Überlebenskurven basierte auf der Methode nach Kaplan- Meier. Hierfür gingen sowohl die aus ethischen Gründen eingeschlaferten, als auch die tot im Käfig gefunden Tiere der Überlebens-Gruppen (20 bzw. 25 Mäuse) in die statistische Analyse ein.

Vor Beginn des Versuches wurden folgende Signifikanzniveaus definiert:

$p \geq 0,05$ entspricht keiner nachgewiesenen Signifikanz;

$p < 0,05$ entspricht einer Signifikanz;

III. Ergebnisse

III. a) Nachweis des Hh-Signalweges in Inselzelltumoren der Rip1Tag2-Mäuse

Um die Expression des Hh-Signalweges in den Inselzelltumoren der transgenen Mäuse nachzuweisen führten wir nach oben genanntem Protokoll immunhistochemische Färbungen für die Hh-Liganden Sonic (Shh) und Indian (Ihh), sowie für den Rezeptor Smo durch. Hierbei zeigten die Tumorzellen erwartungsgemäß eine deutliche Anfärbung von Ihh und Smo. Somit werden diese Bestandteile des Hedgehog-Signalweges in den Tumoren der behandelten Mäuse exprimiert und stellen einen möglichen Angriffspunkt für die Therapie mit LDE 225 dar. Die Shh-Färbung zeigte im Pankreasnormalgewebe ein erwartungsgemäß negatives Ergebnis.

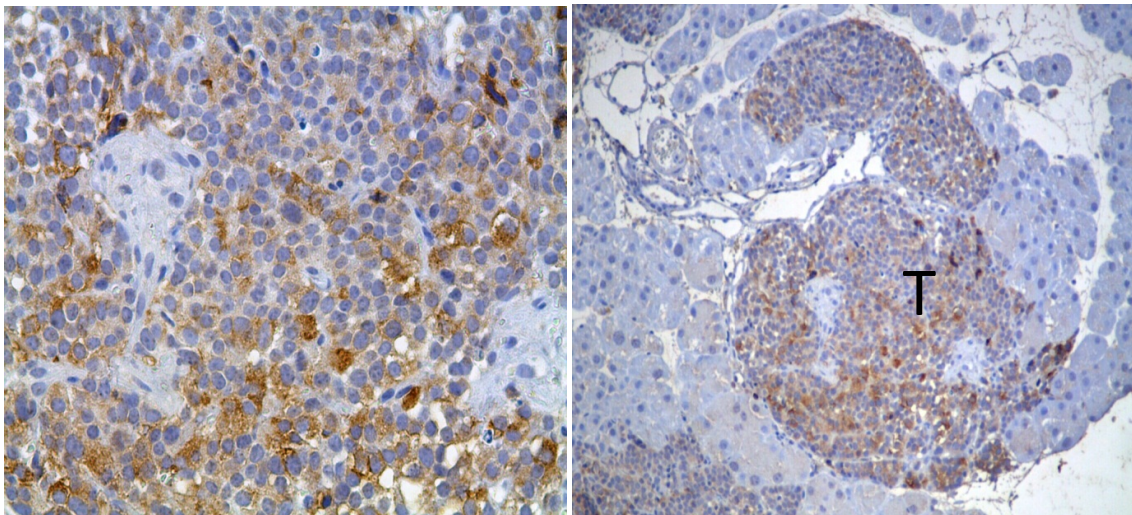


Abb. 4: Positive immunhistochemische Färbung gegen Ihh (40x u. 10x; T=Inselzelltumor)

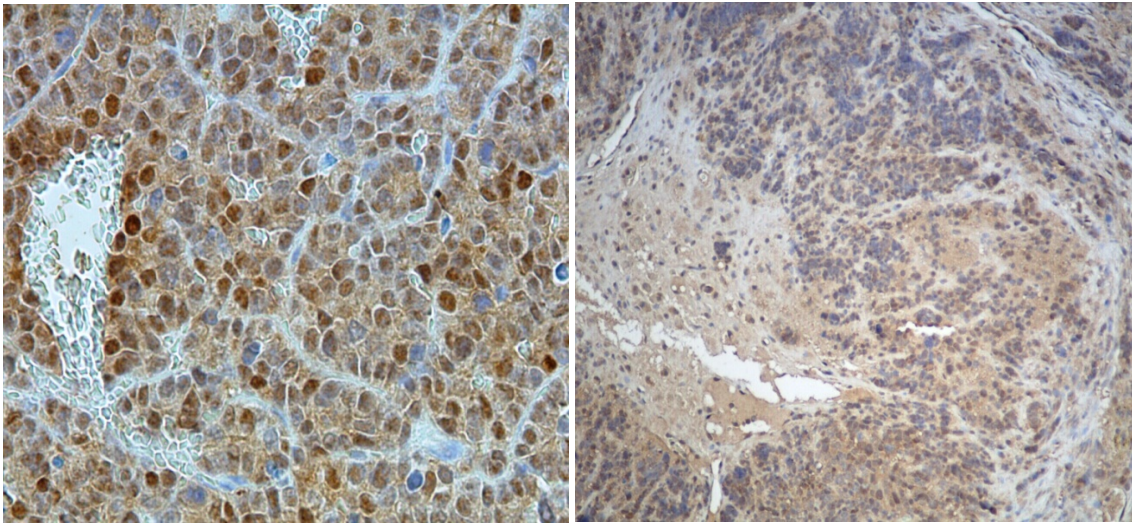


Abb. 5: Immunhistochemische Färbung eines Inselzellkarzinoms gegen Smo (40x u. 10x)

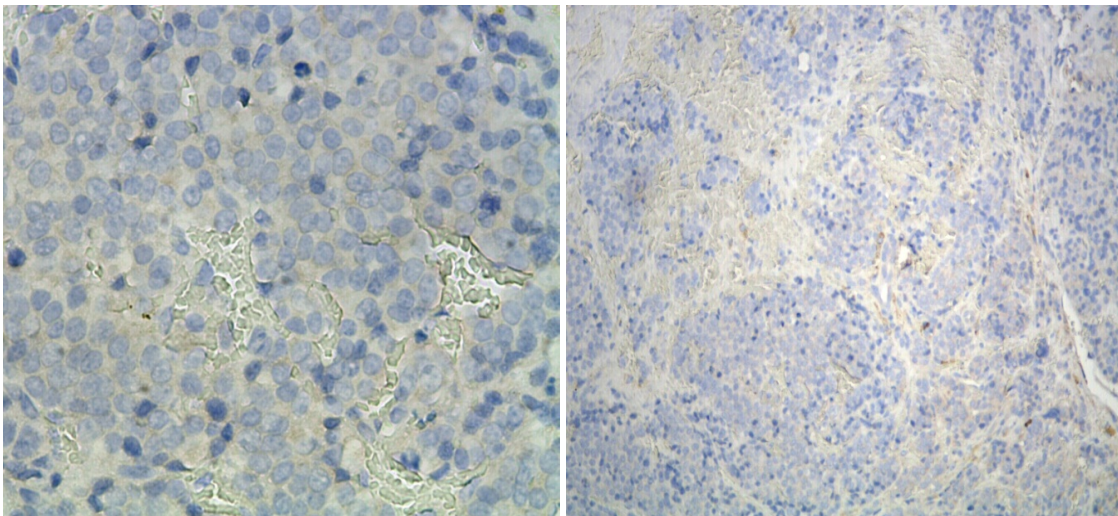


Abb. 6: Negative immunhistochemische Färbung gegen Shh (40x u. 10x)

III. b) LDE225 verringert das Tumorwachstum

In den histologischen Schnitten der resezierten Pankreata wurden wie oben beschrieben nach vorgegebenem Schema die Tumorflächen vermessen und die Ergebnisse aus Therapie- und Kontrollgruppe verglichen. Es fand sich ein signifikanter

Unterschied bei $603 \mu\text{m}^2$ in Therapie- und $10.387 \mu\text{m}^2$ in der Kontrollgruppe. Dies entspricht einer Reduktion der Tumor-Schnittflächen um 95,7%. ($p = 0,00002$)

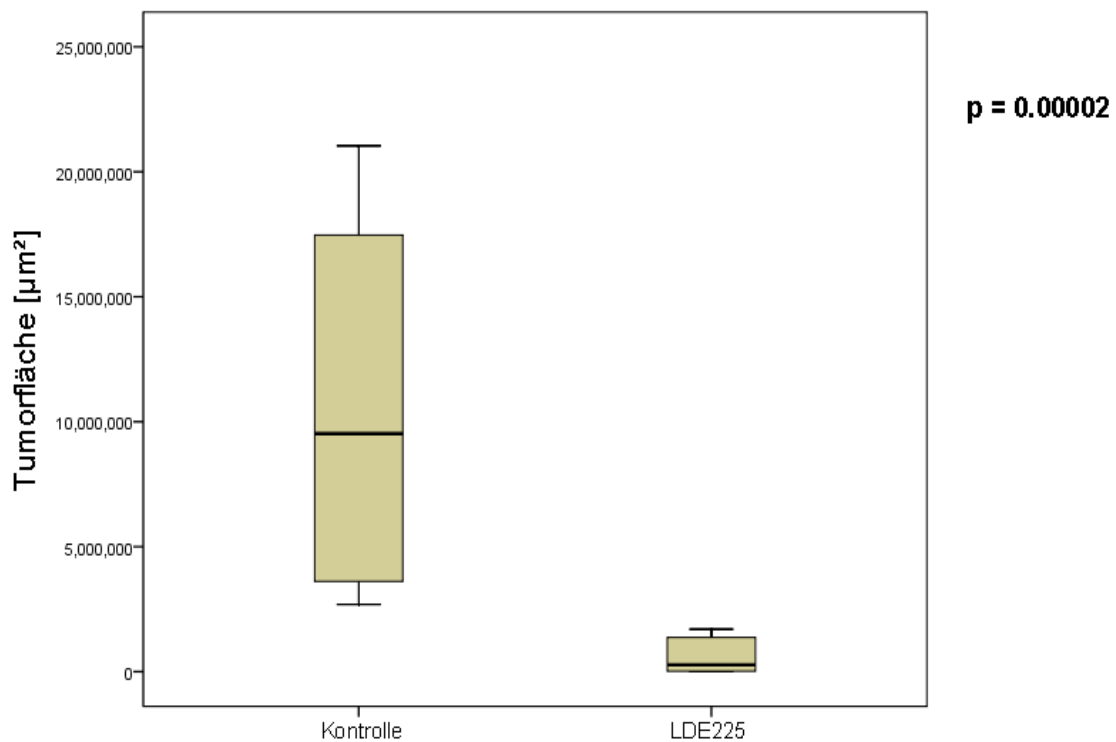


Abb. 7: Statistische Analyse der gemessenen Tumorflächen in HE-Schnitten beider Gruppen

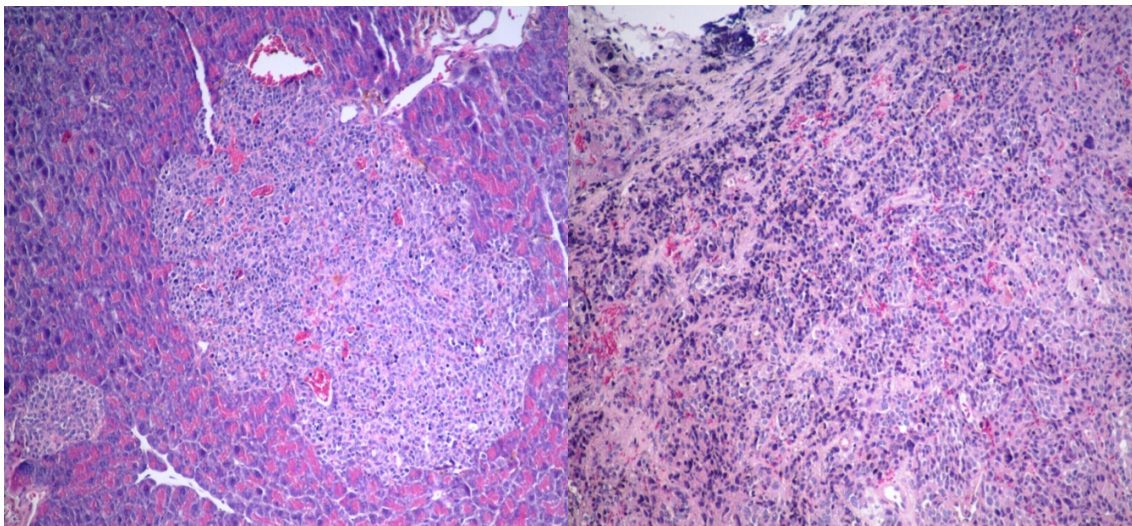


Abb. 8: Exemplarisch zwei HE-gefärbte histologische Schnitte; links das typische Pankreas einer mit LDE225 behandelten Maus im Alter von 13-14 Wochen: hyperplastische und hypervaskularisierte Langerhans-Insel in Nachbarschaft mit unauffälliger Insel; rechts ein Ausschnitt aus einem für die Kontrollgruppe im Endstadium typischen großen, invasiv wachsenden Inselzellkarzinom. (HE, 10x vergrößert)

III. c) LDE225 senkt die Expression der Hh-Zielgene Gli1, Ptch1 und Hip1. Ebenso wird die Expression von Insulin-mRNA verringert.

Die quantitative real-time-PCR der cDNA, die aus mRNA isolierter Langerhans-Inseln der Kontroll- bzw. Therapiegruppe synthetisiert worden war, ergab für das Hedgehog-Zielgen Gli1 eine signifikante Reduktion der Expression in therapierten Mäusen ($p < 0,05$). Seitens der weiteren Hh-Zielgene Ptch1 und Hip1 fand sich ein konkordantes Ergebnis. Zudem fiel eine ebenfalls deutliche Reduktion der Expression von Insulin-mRNA (Ins1 und Ins2) auf.

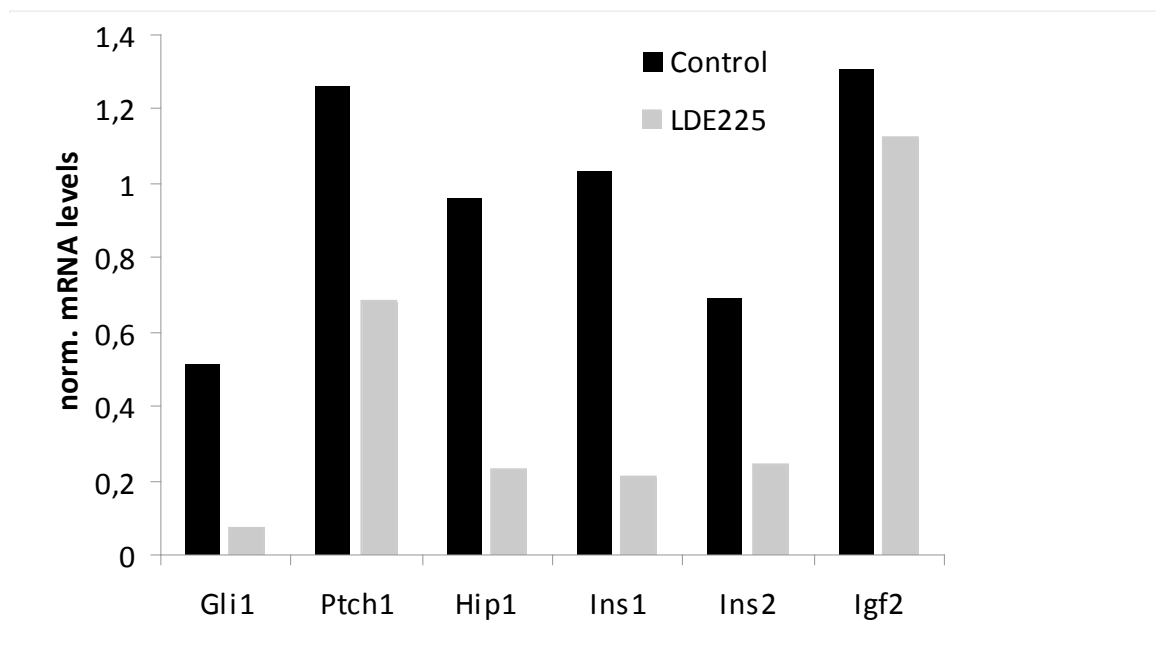


Abb. 9: mRNA-Gehalt der isolierten Inselzellen aus Kontroll- bzw. Therapiegruppe

III. d) Die Therapie mit LDE225 verlängert signifikant die Lebenszeit der Rip1Tag2-Maus.

Die mediane Überlebenszeit der behandelten Mäuse übertraf die der Kontrollgruppe um 11 Tage (116 u. 105 Tage, $p < 0,05$). Dies entspricht einem signifikanten Überlebensvorteil.

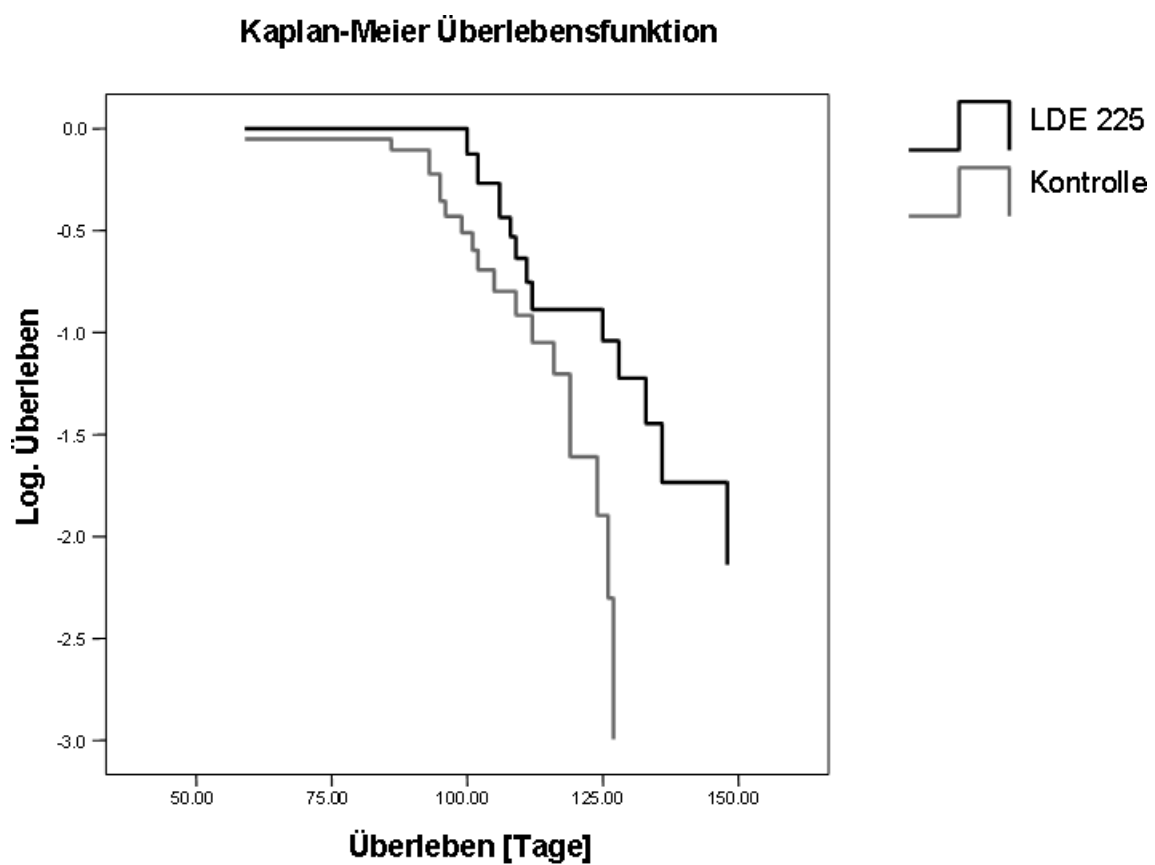


Abb. 10: Kaplan-Meier-Funktion zur Darstellung der Überlebenszeit von mit LDE225 behandelten Mäusen und Kontrolltieren.

IV. Diskussion

Das in diesem Versuch verwendete Rip1Tag2 Mausmodell findet seit seiner Entwicklung 1985 Verwendung für die Erforschung der mehrstufigen Entstehung von PNENs auf molekularer und zellulärer Ebene einerseits, sowie für die Evaluation verschiedener Tumorthérapeutika bei PNENs andererseits. So belegten Hanahan, Bergers und Kollegen beispielsweise die angiogenetischen Veränderungen der Inselzelltumoren in ihrer Genese, als auch deren mögliche Therapierbarkeit mittel Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren (Bergers et al., 1999, 2000).

Auch der Hh-Signalweg wurde mehrfach, so er aberrant reaktiviert wird, oder auch in seiner natürlichen Funktionsweise als mit der Entwicklung verschiedenster Tumoren in Verbindung stehend beschrieben (Berman et al., 2003; Thayer et al., 2003; Fendrich et al., 2007). In kürzlich aus Marburg publizierten Untersuchungen von Fendrich, Rehm und Kollegen konnte erstmals ein deutlicher Effekt von intraperitoneal appliziertem Cyclopamin als Hh-Inhibitor sowohl auf das Tumorwachstum, als auch auf die Lebenserwartung bei Rip1Tag2-Mäusen nachgewiesen werden (Fendrich et al., 2011).

Die Wirkweise der Hh-Inhibition durch Cyclopamin wird durch seine antagonistische Wirkung am Smo-Rezeptor erklärt (Chen et al., 2002). Die spezifische Affinität zu diesem Rezeptor ist jedoch gering und Cyclopamin weist u.a. deswegen ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften auf und müsste in toxisch hohen Dosen verabreicht werden, um beim Menschen eine ausreichende Wirkung am Smo-Rezeptor zu erzielen (Weber et al., 1995). So war eine weitere Translation dieses Wirkmechanismus in ein klinisches Setting bisher nicht möglich.

Die Entwicklung neuer, spezifisch wirkender Smo-Antagonisten wie das hier verwendete LDE225 mit einer Bindung an humane Plasmaproteine von >99% und guter Wasserlöslichkeit eröffnet die Möglichkeit zur weiteren Erforschung von Hh-Inhibition als Therapieoption bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien und anderen Entitäten (Pan et al., 2010).

In der hier vorliegenden Arbeit können zu den 2011 von Fendrich, Rehm und Kollegen veröffentlichten Daten konkordante Ergebnisse gezeigt werden. Auch unter der oralen Gabe von LDE225 kam es bei den Rip1Tag2 Mäusen mit hier nochmals nachgewiesener

Aktivität des Hh-Signalweges zu einem ausgeprägt geringeren Tumorwachstum. In der histologischen Aufarbeitung wurde bei keiner mit LDE225 behandelten Maus ein invasives Inselzellkarzinom gefunden. Die gemessene Tumorgroße zeigte sich zudem bei behandelten Mäusen im Mittel um 95% kleiner als bei unbehandelten. In der cDNA aus RNA hochselektiv isolierter Langerhans-Inseln der Mäuse ergab die quantitative real-time-PCR eine parallele Herunterregulation der Expression der Hh-Zielgene Gli1, Ptch1 und Hip1 in der Therapiegruppe. Hinzu kommt die statistisch signifikante Verlängerung des Überlebens in der Therapiegruppe, die die mögliche positive Auswirkung der Medikation nochmals unterstreicht. Diese Beobachtungen führen zu der Schlussfolgerung, dass die Behandlung mit oralen Smo-Antagonisten wie LDE225 eine vielversprechende neue Therapieoption bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien darstellt. Zu den Daten der oben genannten Untersuchung von Fendrich, Rehm und Kollegen 2011 liegt bzgl. der antiproliferativen Wirkung und der Lebenszeitverlängerung im Rip1Tag2-Mausmodell eine große Konkordanz vor. Die potenzielle Wirksamkeit von Inhibitoren des Hh-Signalweges bei PNENs wurde auch in der hier vorliegenden Untersuchung bestätigt. Bezüglich der hier überprüften Wirksamkeit von oralen Hh-Antagonisten gegen PNENs im Speziellen gab es vor der hier vorliegenden Arbeit keine in vivo Daten, so dass ein Vergleich mit gleichartigen Untersuchungen nicht zu führen ist. Basierend auf den oben genannten Ergebnissen und aufgrund der Verwendbarkeit dieses neuen Wirkstoffes beim Menschen sollten jedoch klinische Studien zur weiteren Evaluation baldmöglichst folgen. Diese sind laut Informationen des Herstellers für das Medulloblastom und das Basalzellkarzinom bereits in Arbeit und zeigen bei letzterem erste Erfolge in der topischen Behandlung. (Skvara et al., 2011).

Bereits vor einigen Jahren war eine regulierende Wirkung des Hh-Signalweges auf die Insulinsekretion und Insulin-mRNA-Expression der pankreatischen β -Zellen bei in-vitro Versuchen beschrieben worden (Thomas et al., 2000, 2001). Zudem fand sich in den genannten Arbeiten eine Verminderung der Insulin-Expression bei Behandlung der dort verwendeten Zellen mit Cyclopamin. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen fand sich in der hier durchgeführten Realtime-PCR ebenfalls ein geringerer Gehalt von Insulin-mRNA bei den behandelten Rip1Tag2-Mäusen. Dies wirft die Frage einer möglichen symptomatischen Therapie von Hypoglykämie-Symptomen

bei Insulinompatienten im Endstadium auf. Hier gibt es zuvor auch am Tiermodell Potenzial für weitere Untersuchungen, bspw. des Blutglukosespiegels unter Therapie mit Smo-Antagonisten. Genauso sollte jedoch bei einer zukünftigen Behandlung mit LDE225 auf die Möglichkeit eines iatrogen verursachten Diabetes mellitus geachtet werden, insbesondere bei Patienten die nicht an einem Insulinom erkrankt sind.

Eine eventuelle Problematik in der zukünftigen Übertragung in die Klinik scheint das Potenzial einer Resistenzbildung gegen Smo-Antagonisten darzustellen. So wurde in einem Fallbericht von einer Resistenzentwicklung unter Therapie eines Medulloblastoms mit dem Hh-Inhibitor Vismodegib bei ursprünglich gutem Ansprechen berichtet und bereits mögliche Erklärungen für dieses Phänomen erörtert (Rudin et al., 2009; Buonamici et al., 2010; Metcalfe and Sauvage, 2011). Nach Ansicht der Autoren stellt die weitere Überwachung solcher Fälle und die parallele Erforschung und Behandlung verschiedener Angriffspunkte von gezielten medikamentösen Therapien einen dringend zu beachtenden Aspekt dar. Als Beispiel für die Möglichkeiten einer solchen Kombinationstherapie hat bereits die gleichzeitige Gabe von Everolimus und Octreotid mögliche Vorteile gegenüber einer Octreotid-Monotherapie in der Behandlung eines Karzinoid-Syndromes gezeigt (Pavel et al., 2011). So stellt auch für den Autor dieser Schrift die Evaluation von Kombinationen aus LDE225 und bereits etablierten Therapeutika einen wichtigen Schritt in der ferneren Forschung dar.

V. Zusammenfassung

V. a) Deutsche Zusammenfassung

Der Hedgehog-Signalweg und sein Rezeptor Smoothed konnten in vorausgegangenen Studien als potenzieller therapeutischer Angriffspunkt bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien identifiziert werden. Ziel dieser Arbeit war die Evaluation des oral bioverfügbaren Smo-Antagonisten LDE225 als neue Therapieoption. Dies war an einem Modell für Inselzelltumoren bisher nicht erfolgt. Um die in vivo Wirksamkeit zu untersuchen fand das transgene Rip1Tag2-Mausmodell für Inselzelltumoren Verwendung. Die Tiere der Therapiegruppe wurden mit LDE225 in der Dosierung 80mg/kg/d von der fünften Lebenswoche an, bis zu ihrem Tod behandelt. Die von therapierten und nicht therapierten Mäusen gewonnenen Pankreata wurden immunhistochemisch und histologisch aufgearbeitet. Zudem wurde aus isolierter Inselzell-RNA synthetisierte cDNA mittels quantitativer real-time-PCR auf die Expression der Hh-Zielgene untersucht. Histologisch verringerte die Behandlung die Tumorfläche um 95% gegenüber unbehandelten Rip1Tag2-Mäusen. Zudem überlebten im Survival-Versuch die therapierten Mäuse im Median signifikant länger als die Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die quantitative real-time-PCR zeigte eine deutliche Expressions-Minderung der Hh-Zielgene Gli1, Ptch1 und Hip1, was ein Vorliegen effektiver Dosen des Wirkstoffes im Zielgewebe in vivo bestätigte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der oral verfügbare Smo-Antagonist LDE225 tatsächlich einen neuen Therapieansatz bei pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien darstellen könnte.

V. b) Englische Zusammenfassung

Recent studies were able to identify the Hedgehog-pathway and its receptor Smoothed as a potential therapeutic target in pancreatic neuroendocrine neoplasms. The goal of this study was to evaluate the orally bioavailable Smo-antagonist LDE225 as a new therapeutic agent. Such an evaluation had not been

performed for islet cell tumors. To investigate in vivo effectiveness, Rip1Tag2 transgenic mice were treated from week 5 till death with a dose of 80 mg/kg/d. Resected pancreata from treated and untreated mice were microscopically and immunohistochemically evaluated. Additionally, quantitative real-time-PCR for Hh target genes was performed on cDNA synthesized from isolated islet RNA. Microscopically, the treatment reduced tumor size by 95%. Median survival was significantly prolonged in treated mice ($p < 0,05$). Quantitative real-time-PCR showed a clear downregulation of Hh target genes Gli1, Ptch1 and Hip1, confirming effective pharmacologic levels within the desired tissue site in vivo. The findings of this study suggest that the orally bioavailable Smo-antagonist LDE225 might provide new options in the therapy of pancreatic neuroendocrine neoplasms.

VI. Literaturverzeichnis

- Alexandre, C., Jacinto, A., and Ingham, P.W. (1996). Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* *10*, 2003–2013.
- Apelqvist, A., Ahlgren, U., and Edlund, H. (1997). Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr. Biol.* *7*, 801–804.
- Athar, M., Li, C., Tang, X., Chi, S., Zhang, X., Kim, A.L., Tying, S.K., Kopelovich, L., Hebert, J., Epstein, E.H., Jr, et al. (2004). Inhibition of smoothed signaling prevents ultraviolet B-induced basal cell carcinomas through regulation of Fas expression and apoptosis. *Cancer Res.* *64*, 7545–7552.
- Basler, K., and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* *368*, 208–214.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* *2*, 737–744.
- Bergers, G., Javaherian, K., Lo, K.M., Folkman, J., and Hanahan, D. (1999). Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* *284*, 808–812.
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Hallahan, A.R., Pritchard, J.I., Eberhart, C.G., Watkins, D.N., Chen, J.K., Cooper, M.K., Taipale, J., Olson, J.M., et al. (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* *297*, 1559–1561.
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs, K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N., et al. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* *425*, 846–851.
- BINNS, W., JAMES, L.F., and SHUPE, J.L. (1964). TOXICOSIS OF VERATRUM CALIFORNICUM IN EWES AND ITS RELATIONSHIP TO A CONGENITAL DEFORMITY IN LAMBS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *111*, 571–576.
- BINNS, W., JAMES, L.F., SHUPE, J.L., and EVERETT, G. (1963). A CONGENITAL CYCLOPIAN-TYPE MALFORMATION IN LAMBS INDUCED BY MATERNAL INGESTION OF A RANGE PLANT, VERATRUM CALIFORNICUM. *Am. J. Vet. Res.* *24*, 1164–1175.
- Binns, W., Shupe, J.L., Keeler, R.F., and James, L.F. (1965). Chronologic evaluation of teratogenicity in sheep fed *Veratrum californicum*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* *147*, 839–842.
- Bitgood, M.J., Shen, L., and McMahon, A.P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* *6*, 298–304.
- Blair, S.S., and Ralston, A. (1997). Smoothed-mediated Hedgehog signalling is required for the maintenance of the anterior-posterior lineage restriction in the developing wing of *Drosophila*. *Development* *124*, 4053–4063.

- Buonamici, S., Williams, J., Morrissey, M., Wang, A., Guo, R., Vattay, A., Hsiao, K., Yuan, J., Green, J., Ospina, B., et al. (2010). Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med* 2, 51ra70.
- Cha, R.S., and Thilly, W.G. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *Genome Res.* 3, S18–S29.
- Chamberlain, R.S., Canes, D., Brown, K.T., Saltz, L., Jarnagin, W., Fong, Y., and Blumgart, L.H. (2000). Hepatic neuroendocrine metastases: does intervention alter outcomes? *J. Am. Coll. Surg.* 190, 432–445.
- Chen, H., Hardacre, J.M., Uzar, A., Cameron, J.L., and Choti, M.A. (1998). Isolated liver metastases from neuroendocrine tumors: does resection prolong survival? *J. Am. Coll. Surg.* 187, 88–92; discussion 92–93.
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., and Beachy, P.A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev.* 16, 2743–2748.
- Christofori, G., Naik, P., and Hanahan, D. (1994). A second signal supplied by insulin-like growth factor II in oncogene-induced tumorigenesis. *Nature* 369, 414–418.
- Christofori, G., Naik, P., and Hanahan, D. (1995). Deregulation of both imprinted and expressed alleles of the insulin-like growth factor 2 gene during beta-cell tumorigenesis. *Nat. Genet.* 10, 196–201.
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., and Ruiz i Altaba, A. (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr. Biol.* 17, 165–172.
- Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. (1998). Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* 280, 1603–1607.
- Falconi, M., Plöckinger, U., Kwekkeboom, D.J., Manfredi, R., Körner, M., Kvols, L., Pape, U.F., Ricke, J., Goretzki, P.E., Wildi, S., et al. (2006). Well-Differentiated Pancreatic Nonfunctioning Tumors/Carcinoma. *Neuroendocrinology* 84, 196–211.
- FDA press release, 2011.
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm254350.htm>
- Feldmann, G., Bisht, S., Schütte, U., Haarmann, J., and Brossart, P. (2012). Everolimus for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *Expert Opin Pharmacother.*
- Feldmann, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C., Jimeno, A., et al. (2007a). Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res.* 67, 2187–2196.
- Feldmann, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C., Jimeno, A., et al. (2007b). Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res.* 67, 2187–2196.

- Feldmann, G., Habbe, N., Dhara, S., Bisht, S., Alvarez, H., Fendrich, V., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Bardeesy, N., et al. (2008). Hedgehog inhibition prolongs survival in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Gut* *57*, 1420–1430.
- Fendrich, V., Langer, P., Celik, I., Bartsch, D.K., Zielke, A., Ramaswamy, A., and Rothmund, M. (2006). An aggressive surgical approach leads to long-term survival in patients with pancreatic endocrine tumors. *Ann. Surg.* *244*, 845–851; discussion 852–853.
- Fendrich, V., Ramerth, R., Waldmann, J., Maschuw, K., Langer, P., Bartsch, D.K., Slater, E.P., Ramaswamy, A., and Rothmund, M. (2009). Sonic hedgehog and pancreatic-duodenal homeobox 1 expression distinguish between duodenal and pancreatic gastrinomas. *Endocr. Relat. Cancer* *16*, 613–622.
- Fendrich, V., Rehm, J., Waldmann, J., Buchholz, M., Christofori, G., Lauth, M., Slater, E.P., and Bartsch, D.K. (2011). Hedgehog inhibition with cyclopamine represses tumor growth and prolongs survival in a transgenic mouse model of islet cell tumors. *Ann. Surg.* *253*, 546–552.
- Fendrich, V., Waldmann, J., Esni, F., Ramaswamy, A., Mullendore, M., Buchholz, M., Maitra, A., and Feldmann, G. (2007). Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum. *Endocr. Relat. Cancer* *14*, 865–874.
- Gailani, M.R., Stähle-Bäckdahl, M., Leffell, D.J., Glynn, M., Zaphiropoulos, P.G., Pressman, C., Undén, A.B., Dean, M., Brash, D.E., Bale, A.E., et al. (1996). The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat. Genet.* *14*, 78–81.
- Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A., and Scott, M.P. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.* *10*, 301–312.
- Gurusamy, K.S., Ramamoorthy, R., Sharma, D., and Davidson, B.R. (2009). Liver resection versus other treatments for neuroendocrine tumours in patients with resectable liver metastases. *Cochrane Database Syst Rev* CD007060.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* *315*, 115–122.
- Hebrok, M., Kim, S.K., and Melton, D.A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* *12*, 1705–1713.
- de Herder, W.W., Niederle, B., Scoazec, J.-Y., Pauwels, S., Kloppel, G., Falconi, M., Kwekkeboom, D.J., Oberg, K., Eriksson, B., Wiedenmann, B., et al. (2006). Well-differentiated pancreatic tumor/carcinoma: insulinoma. *Neuroendocrinology* *84*, 183–188.
- Howland, G., Campbell, W.R., Maltby, E.J., and Robinson, W.L. (1929). DYSINSULINISM: CONVULSIONS AND COMA DUE TO ISLET CELL TUMOR OF THE PANCREAS, WITH OPERATION AND CURE. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* *93*, 674–679.
- Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P., and Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* *125*, 3553–3562.
- Ingham, P.W. (1998). Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.* *17*, 3505–3511.

- Jensen, R.T., Niederle, B., Mitry, E., Ramage, J.K., Steinmuller, T., Lewington, V., Scarpa, A., Sundin, A., Perren, A., Gross, D., et al. (2006). Gastrinoma (duodenal and pancreatic). *Neuroendocrinology* *84*, 173–182.
- Kim, S.K., Hebrok, M., and Melton, D.A. (1997). Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* *124*, 4243–4252.
- Kubo, M., Nakamura, M., Tasaki, A., Yamanaka, N., Nakashima, H., Nomura, M., Kuroki, S., and Katano, M. (2004). Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res.* *64*, 6071–6074.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* *25*, 402–408.
- Metcalfe, C., and Sauvage, F.J. de (2011). Hedgehog Fights Back: Mechanisms of Acquired Resistance against Smoothed Antagonists. *Cancer Res* *71*, 5057–5061.
- Mitry, E., Baudin, E., Ducreux, M., Sabourin, J.C., Rufié, P., Aparicio, T., Aparicio, T., Lasser, P., Elias, D., Duvillard, P., et al. (1999). Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *Br. J. Cancer* *81*, 1351–1355.
- Moertel, C.G., Hanley, J.A., and Johnson, L.A. (1980). Streptozocin alone compared with streptozocin plus fluorouracil in the treatment of advanced islet-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *303*, 1189–1194.
- Moertel, C.G., Kvols, L.K., O’Connell, M.J., and Rubin, J. (1991). Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer* *68*, 227–232.
- Mohler, J. (1988). Requirements for hedgehog, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* *120*, 1061–1072.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *51 Pt 1*, 263–273.
- Murray-Lyon, I.M., Eddleston, A.L., Williams, R., Brown, M., Hogbin, B.M., Bennett, A., Edwards, J.C., and Taylor, K.W. (1968). Treatment of multiple-hormone-producing malignant islet-cell tumour with streptozotocin. *Lancet* *2*, 895–898.
- Norton, J.A., Harris, E.J., Chen, Y., Visser, B.C., Poultides, G.A., Kunz, P.C., Fisher, G.A., and Jensen, R.T. (2011). Pancreatic endocrine tumors with major vascular abutment, involvement, or encasement and indication for resection. *Arch Surg* *146*, 724–732.
- Nüsslein-Volhard, C., and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795–801.
- Oberg, K., and Eriksson, B. (2005). Endocrine tumours of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* *19*, 753–781.
- Pan, S., Wu, X., Jiang, J., Gao, W., Wan, Y., Cheng, D., Han, D., Liu, J., Englund, N.P., Wang, Y., et al. (2010). Discovery of NVP-LDE225, a Potent and Selective Smoothed Antagonist. *ACS Med. Chem. Lett.* *1*, 130–134.

Pavel, M., Baudin, E., Couvelard, A., Krenning, E., Öberg, K., Steinmüller, T., Anlauf, M., Wiedenmann, B., and Salazar, R. (2012). ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology* 95, 157–176.

Pavel, M.E., Hainsworth, J.D., Baudin, E., Peeters, M., Hörsch, D., Winkler, R.E., Klimovsky, J., Lebwohl, D., Jehl, V., Wolin, E.M., et al. (2011). Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 378, 2005–2012.

Plöckinger, U., and Wiedenmann, B. (2007). Neuroendocrine tumors. *Biotherapy. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21, 145–162.

Qualtrough, D., Buda, A., Gaffield, W., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2004). Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int. J. Cancer* 110, 831–837.

Raymond, E., Dahan, L., Raoul, J.-L., Bang, Y.-J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C., Valle, J., Metrakos, P., Smith, D., Vinik, A., et al. (2011). Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N. Engl. J. Med.* 364, 501–513.

Rehm, J. (2010). Die Blockade des Hedgehog Signalweges mit Cyclopamin als neue Therapieoption bei neuroendokrinen Pankreastumoren. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin

Rinke, A., Müller, H.-H., Schade-Brittinger, C., Klose, K.-J., Barth, P., Wied, M., Mayer, C., Aminossadati, B., Pape, U.-F., Bläker, M., et al. (2009). Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J. Clin. Oncol.* 27, 4656–4663.

Rudin, C.M., Hann, C.L., Laterra, J., Yauch, R.L., Callahan, C.A., Fu, L., Holcomb, T., Stinson, J., Gould, S.E., Coleman, B., et al. (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* 361, 1173–1178.

Sanchez, P., Hernández, A.M., Stecca, B., Kahler, A.J., DeGueme, A.M., Barrett, A., Beyna, M., Datta, M.W., Datta, S., and Ruiz i Altaba, A. (2004). Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12561–12566.

Skvara, H., Kalthoff, F., Meingassner, J.G., Wolff-Winiski, B., Aschauer, H., Kelleher, J.F., Wu, X., Pan, S., Mickel, L., Schuster, C., et al. (2011). Topical treatment of Basal cell carcinomas in nevoid Basal cell carcinoma syndrome with a smoothed inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1735–1744.

Stecca, B., Mas, C., Clement, V., Zbinden, M., Correa, R., Piguet, V., Beermann, F., and Ruiz i Altaba, A. (2007). Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5895–5900.

Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., et al. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 129–134.

- Strosberg, J.R., Fine, R.L., Choi, J., Nasir, A., Coppola, D., Chen, D.-T., Helm, J., and Kvols, L. (2011). First-line chemotherapy with capecitabine and temozolomide in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *Cancer* 117, 268–275.
- Szot, G.L., Koudria, P., and Bluestone, J.A. (2007). Murine Pancreatic Islet Isolation. *J Vis Exp*.
- Tabs, S., and Avci, O. (2004). Induction of the differentiation and apoptosis of tumor cells in vivo with efficiency and selectivity. *Eur J Dermatol* 14, 96–102.
- Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernández-del Castillo, C., Yajnik, V., et al. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 851–856.
- Thomas, M.K., Lee, J.H., Rastalsky, N., and Habener, J.F. (2001). Hedgehog signaling regulation of homeodomain protein islet duodenum homeobox-1 expression in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 142, 1033–1040.
- Thomas, M.K., Rastalsky, N., Lee, J.H., and Habener, J.F. (2000). Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49, 2039–2047.
- Weber, H.C., Venzon, D.J., Lin, J.T., Fishbein, V.A., Orbuch, M., Strader, D.B., Gibril, F., Metz, D.C., Fraker, D.L., and Norton, J.A. (1995). Determinants of metastatic rate and survival in patients with Zollinger-Ellison syndrome: a prospective long-term study. *Gastroenterology* 108, 1637–1649.
- Whipple (1938). The surgical therapy of hyperinsulinism. *J Int Chir*.
- Wilder, R.M., Allan, F.N., Power, M.H., and Robertson, H.E. (1927). CARCINOMA OF THE ISLANDS OF THE PANCREAS: HYPERINSULINISM AND HYPOGLYCEMIA. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 89, 348–355.
- Yao, J.C., Hassan, M., Phan, A., Dagohoy, C., Leary, C., Mares, J.E., Abdalla, E.K., Fleming, J.B., Vauthey, J.-N., Rashid, A., et al. (2008). One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J. Clin. Oncol.* 26, 3063–3072.
- Yao, J.C., Shah, M.H., Ito, T., Bohas, C.L., Wolin, E.M., Van Cutsem, E., Hobday, T.J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E.G.E., et al. (2011). Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N. Engl. J. Med.* 364, 514–523.
- ZOLLINGER, R.M., and ELLISON, E.H. (1955). Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. *Ann. Surg.* 142, 709–723; discussion, 724–728.

VII. Anhang

VII. a) Abkürzungen und Sonderzeichen

<i>Abkürzung</i>	<i>Ausgeschriebene Form</i>
°C	Grad Celsius
&	und
%	Prozent
μ	Mikro-
A	Österreich
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin - Biotin - Complex
B	Belgien
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
Ca ²⁺	Calcium
D	Deutschland
DAB	3,3'- Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEN	Dänemark
dest.	destillata
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
E	Spanien
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
et al.	und andere
F	Frankreich
g	Gramm
h	Stunden
H	Wasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hh	Hedgehog
HIP	Hedgehog Interacting Protein

IGF-2	Insulin - like Growth Factor - 2
Ihh	Indian Hedgehog
k	Kilo-
l	Liter
m	Meter
M	molar
MEN1	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1
Mg ²⁺	Magnesium
Min.	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian target of Rapamycin
n	Nano-
NaOH	Natriumhydroxid
NEN	neuroendokrine Neoplasie
NET	neuroendokriner Tumor
NF-	nicht funktionelle(r)
PBS	phosphate-buffered saline
PBST	phosphate-buffered saline with Tween
PCR	polymerase chain reaction
PNEC	Pankreatisches neuroendokrines Carcinom
PNEN	Pankreatische neuroendokrine Neoplasie
PNET	Pankreatischer neuroendokriner Tumor
pH	pondus hyrogenii
Ptch	Patched
Rip1Tag2	Rat Insulin Promotor1 T-Antigen2
RNA	ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
sek.	Sekunden
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
U/Min.	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika

VII. b) **Publikationen, Vorträge**

1.

Vortrag auf dem 128. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie mit dem Titel:

„Der oral verfügbare Smo-Antagonist LDE225 in einem transgenen Mausmodell für Inselzelltumoren“ D. Wiese, J. Waldmann, M. Lauth, A. Heverhagen, J. Rehm, D. K. Bartsch, V. Fendrich

2.

Volker Fendrich M.D.* , Dominik Wiese* , Jens Waldmann M.D., Matthias Lauth PhD, Anna E. Heverhagen M.D., Johannes Rehm M.D., Detlef K. Bartsch M.D. * VF and DW contributed equally to this work; „Hedgehog inhibition with the orally bioavailable Smo antagonist LDE225 represses tumor growth and prolongs survival in a transgenic mouse model of islet cell tumors“ Annals of Surgery 2011

VII. c) **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren Damen/ Herren:

Adamkiewicz, Alter, Aumüller, Bahr, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Behr, Berger, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, del Rey, Dodel, Donner-Banzhoff, Eberhardt, Eilers, Engenhardt- Cabillic, Fendrich, Feuser, Geks, Görg, Greger, Gress, Grimm, Groß, Grundmann, Grzeschik, Hamer, Hasilik, Hertl, Hegele, Hofmann, Höffken, Hoyer, Hundt, Kalinowski, Kann, Kill, Kircher, Kim-Berger, Klose, Klaus, Köhler, König, Koolmann, Kühnert, Langer, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Maier, Mandrek, Meier, Maisch, Mennel, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Rausch, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Roeper, Rosenow, Ruchholtz, Schäfer, Schofer, Seitz, Sekundo, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schrader, Sesterhenn, Skwara, Sommer, Steiniger, Steinkamp, Stiller, Tackenberg, Teymoortash, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf, Zemlin, Zovko

in Marburg, Deutschland

VII. d) **Danksagung**

Zuvorderst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Volker Fendrich. Die vorliegende Dissertation und die mit ihr verbundenen, gemeinsamen Publikationen wurden mir vor allem durch ihn ermöglicht. Unter meinen zahlreichen akademischen Lehrerinnen und Lehrern, sowie als Oberarzt der Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, hat er wie kein Zweiter meinen wissenschaftlichen und beruflichen Weg geprägt und mich stets gefordert und gefördert.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Detlef K. Bartsch ganz herzlich für die Ermöglichung der Promotion in seinem Labor und seiner Abteilung danken.

Insbesondere der Einstieg in die praktische Laborarbeit und der Umgang mit den Versuchstieren wurden mir dadurch erleichtert, dass mein Vorgänger Dr. Johannes Rehm mir mit viel Geduld und Gründlichkeit die etablierten Arbeitsschritte und Verhaltensweisen näherbrachte. Auch ihm möchte ich herzlich danken. Die Zusammenarbeit mit den anderen Doktoranden der Abteilung und insbesondere der AG Fendrich war stets von guter Kooperation und einem harmonischen Arbeitsklima geprägt. Hier gilt mein besonderer Dank für die vielen gegenseitigen Hilfestellungen und die kurzweiligen gemeinsamen Stunden im Labor Frau Stephanie Düringer, Frau Petra Volkmann, Herrn Lars Plaßmeier, Herrn Richard Knoop, Herrn Moritz Sparn und Herrn Nei-Ming Chen.

Ebenfalls danke ich den an der Entstehung dieser Arbeit beteiligten Kooperationspartnern: Herrn Dr. Matthias Lauth, Herrn PD Dr. Jens Waldmann und Frau Dr. Anna Heverhagen. Dies gilt ebenso für die stets hilfsbereiten Mitarbeiterinnen des VTG-Labors: Frau Brunhilde Chaloupka, Frau Carmen Bollmann, Frau Susanne Lingelbach, Frau Elvira Matthäi, Frau Silvia Roth, Frau Dr. Emily Slater und Frau Dr. Annette Wunderlich. Auch Frau dipl.-chem. Elvira Przypadlo danke ich ganz herzlich für die allzeit schnelle Hilfe bei EDV-Fragen.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich an meine Eltern, meine Freundin und meine Freunde aussprechen. Ihre ständige Unterstützung und Zuneigung hat mich stets motiviert und angespornt, auch meine beruflichen und akademischen Ziele weiter zu verfolgen.