

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik

# Induktion von Apoptose in embryonalen Tumoren

Melanie Eichenmüller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Küster

2. Priv.- Doz. Dr. R. Kappler

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 16.04.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.08.2010 angenommen.



Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,  
das gelöst werden will.

*Galileo Galilei (1564-1642)*

MEINEN ELTERN

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>14</b>
3.1	VERWENDETE ORGANISMEN .....	14
3.1.1	<i>Prokaryotische Zellen</i> .....	14
3.1.2	<i>Eukaryotische Zellen</i> .....	14
3.1.3	<i>Mäuse</i> .....	15
3.2	MEDIEN .....	15
3.2.1	<i>Medien für Bakterienkulturen</i> .....	15
3.2.2	<i>Medien für Zellkulturen</i> .....	16
3.3	REAGENZEN UND MATERIALIEN .....	16
3.3.1	<i>Reagenzien</i> .....	16
3.3.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	18
3.3.3	<i>Geräte</i> .....	18
3.4	ALLGEMEINE LÖSUNGEN UND PUFFER .....	20
3.5	VERWENDETE KITS .....	22
3.6	LÄNGEN- UND MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS .....	22
3.6.1	<i>DNA-Längenstandards</i> .....	22
3.6.2	<i>Protein-Molekulargewichtstandards</i> .....	22
3.7	NUKLEINSÄUREN .....	23
3.7.1	<i>Plasmide</i> .....	23
3.7.2	<i>Primer</i> .....	23
3.8	ENZYME .....	25
3.9	ANTIKÖRPER .....	25
3.9.1	<i>Primäre Antikörper</i> .....	25
3.9.2	<i>Sekundäre Antikörper</i> .....	26
<b>4</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>27</b>
4.1	PROKARYOTISCHE KULTUREN .....	27
4.1.1	<i>Lagerung von E. coli-Zellen</i> .....	27
4.1.2	<i>Transformation von kompetenten E. coli-Zellen</i> .....	27
4.2	EUKARYOTISCHE ZELLKULTUREN .....	27
4.2.1	<i>Allgemeine Zellkulturbedingungen</i> .....	27
4.2.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Zelllinien</i> .....	28
4.3	PROLIFERATIONSASSAY .....	28

4.4	CELLSCREEN ASSAY .....	29
4.5	KLONOGENER ASSAY .....	29
4.6	LUCIFERASE ASSAY .....	29
4.7	MITOCHONDRIENISOLIERUNG.....	30
4.8	DNA-METHODEN.....	31
4.8.1	<i>DNA-Isolierung</i> .....	31
4.8.2	<i>Isolierung von Plasmid-DNA</i> .....	31
4.8.3	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i> .....	32
4.8.4	<i>Fällung von DNA</i> .....	32
4.8.5	<i>Analytische Gelelektrophorese</i> .....	32
4.8.6	<i>DNA-Transfektion</i> .....	32
4.9	RNA-METHODEN.....	33
4.9.1	<i>Isolierung von RNA</i> .....	33
4.9.2	<i>DNase-Verdau von RNA</i> .....	34
4.9.3	<i>Konzentrationsbestimmung von RNA</i> .....	34
4.9.4	<i>cDNA-Synthese</i> .....	34
4.9.5	<i>Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)</i> .....	35
4.9.6	<i>Quantitative RT-PCR (Q-PCR)</i> .....	35
4.10	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	36
4.10.1	<i>Proteinisolierung</i> .....	36
4.10.2	<i>Proteinmengenbestimmung</i> .....	36
4.10.3	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese</i> .....	37
4.11	IMMUNOLOGISCHE NACHWEISMETHODEN .....	37
4.11.1	<i>Westernblot</i> .....	37
4.11.2	<i>Immunfluoreszenzen</i> .....	37
4.11.3	<i>Immunhistochemie</i> .....	38
4.12	APOPTOSE ASSAYS.....	38
4.12.1	<i>Annexin V Färbung</i> .....	38
4.12.2	<i>Indirekte Apoptosemessung mittels Propidiumjodid</i> .....	39
4.12.3	<i>Mitochondrienmembranpotentialmessung</i> .....	39
4.13	XENOGRAFT MAUSMODELL.....	40
4.14	STATISTISCHE ANALYSEN .....	41
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
5.1	AKT-AKTIVIERUNG IN EMBRYONALEN TUMORZELLINIEN.....	42
5.2	WIRKSTOFF-SCREENING ZUR BEHANDLUNG EMBRYONALER TUMORERKRANKUNGEN.....	43
5.3	INHIBIERUNG DES HH-SIGNALWEGS UND INDUKTION VON APOPTOSE IN HEPATOBLASTOMEN DURCH CYCLOPAMIN .....	46
5.3.1	<i>Aktivität des Hh-Signalwegs in Hepatoblastomzelllinien</i> .....	46
5.3.2	<i>Aktivität des Hh-Signalwegs in Primärtumoren</i> .....	47
5.3.3	<i>Inhibierung des Hh-Signalwegs durch Cyclopamin</i> .....	48

5.3.4	<i>Induktion von Apoptose durch Cyclopamin</i> .....	50
5.4	INDUKTION VON APOPTOSE DURCH BETULINSÄURE .....	52
5.4.1	<i>Betulinsäure reduziert die Zellvitalität und das Überleben von Rhabdomyosarkom- und Hepatoblastom-Zellen</i> .....	52
5.4.2	<i>Betulinsäure induziert Apoptose in Rhabdomyosarkom- und Hepatoblastom-Zellen</i> ....	55
5.4.3	<i>Antiapoptotische Mechanismen</i> .....	59
5.4.4	<i>Apoptoseinduktion über den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg</i> .....	63
5.5	BEEINFLUSSUNG DES HH-SIGNALWEGS DURCH BETULINSÄURE .....	65
5.6	WIRKUNG VON BETULINSÄURE <i>IN VIVO</i> .....	68
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>72</b>
6.1	APOPTOSE REGULIERENDER PI3K/AKT-SIGNALWEG IN EMBRYONALEN TUMOREN .....	72
6.2	HH-SIGNALWEG UND HHIP IN HEPATOBLASTOMEN .....	74
6.3	WIRKUNG VON PHYTOTHERAPEUTIKA .....	75
6.4	APOPTOSE-INDUKTION DURCH BETULINSÄURE .....	75
6.5	PRO- UND ANTI-APOPTOSEFAKTOREN .....	76
6.6	ANGIOGENESE UND BETULINSÄURE .....	77
6.7	BEEINFLUSSUNG DES HH-SIGNALWEGS DURCH BETULINSÄURE .....	78
6.8	BETULINSÄURE UND DIE INTERAKTION MIT ANDEREN SIGNALWEGEN .....	80
6.9	REZEPTOREN VON BETULINSÄURE .....	81
6.10	DERIVATE VON BETULINSÄURE .....	81
6.11	KLINISCHE RELEVANZ UND BETULINSÄURE .....	83
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>84</b>
<b>8</b>	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>REFERENZLISTE</b> .....	<b>92</b>

## 1 Einleitung

Tumorerkrankungen des Kindesalters sind glücklicherweise relativ selten und unterscheiden sich gravierend von den meisten Tumorerkrankungen Erwachsener. So treten im Erwachsenenalter hauptsächlich Karzinome auf, während im Kindesalter meist eine heterogene Gruppe von Neoplasien, wie z. B. Erkrankungen hämatologischen Ursprungs (Leukämien), Erkrankungen des zentralen Nervensystems oder Blastome, zu finden ist. Während man bei Erwachsenen von einer „Multiple Hit“ Hypothese bei der Entstehung der Tumoren ausgeht, wird vermutet, dass für die Entstehung kindlicher Tumorerkrankungen weit weniger zelluläre Prozesse bis zum tumorigenen Status notwendig sind. So wird beispielsweise von Knudson und seiner Arbeitsgruppe spekuliert, dass ein Minimum von zwei Ereignissen ausreichend ist für die Entstehung von bestimmten embryonalen Tumoren (KNUDSON 1992). In westlichen Industrieländern werden etwa 2 % aller Tumorerkrankungen vor Erreichen des 15. Lebensjahres diagnostiziert (SCOTTING *et al.* 2005). Die Überlebensraten der Kinder mit malignen Erkrankungen sind seit 1960 ständig gestiegen und erreichen heutzutage eine 5-Jahresüberlebensrate von bis zu 80 % (KURMASHEVA and HOUGHTON 2007). Jedoch gibt es immer noch einige kindliche Tumorerkrankungen, wie z. B. Hirntumoren, bei denen die Überlebensraten unverändert schlecht sind. Eines der Hauptprobleme bei der Behandlung dieser Tumore ist vor allem ihre Lokalisation im sich noch entwickelnden Gewebe, wobei die Tumore auch histologisch große Ähnlichkeit mit embryonalen Geweben zeigen und durch ein ähnliches Muster der Aktivität verschiedener Gene charakterisiert sind. Die meisten Therapeutika aber eliminieren proliferierende Zellen, was fatal für die Entwicklung der heranreifenden Organe ist. Daher ist es bei kindlichen Tumoren besonders wichtig, die Entstehung dieser Tumore besser zu verstehen, um neue Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können. Da während der prä- und postnatalen Entwicklungsperiode Prozesse des Wachstums und der Differenzierung durch komplexe zelluläre Mechanismen der Zellteilung und Apoptose genauestens reguliert werden, können Defekte in Signalwegen, die diese Prozesse regulieren, zur Transformation der Zellen und zur Tumorentstehung führen (SCOTTING *et al.* 2005). Als Ursache bei der Entstehung kindlicher Tumore werden hauptsächlich zwei Signalwege diskutiert, die während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielen; der WNT/ $\beta$ -Catenin und der Sonic Hedgehog/Patched-Signalweg (TOFTGARD 2000; TURASHVILI *et al.* 2006). Darüber hinaus findet man in diesen Tumoren oft eine Aktivierung des über den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 2 (IGF2) vermittelten Signalwegs, was meist durch Überexpression von *IGF2* oder durch Verlust der genomischen Prägung am *IGF2*-Lokus auf 11p15 verursacht wird. Dies führt zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs und schließlich zu Apoptose-Inhibierung (FOULSTONE *et al.* 2005). Auch eigene Vorarbeiten haben gezeigt, dass eine Aktivierung von anti-apoptotischen Signalen ein Charakteristikum dieser frühen

Tumorerkrankungen darstellt (KAPPLER *et al.* 2003). Im Folgenden sollen die in diesem Projekt untersuchten Tumoren und molekularen Mechanismen zunächst näher erläutert werden.

### **Tumorerkrankungen im Kindesalter**

Man spricht ganz allgemein von einem Tumor, wenn es zu einer unkontrollierten Gewebezunahme kommt. Tumoren können jedes Gewebe befallen und sind entweder gutartig (benigne) oder bösartig (maligne), wobei man dann von Krebs spricht. In Krebszellen findet man häufig Veränderungen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen, die als sogenannte „Wächtergene“ fungieren. Dies und zusätzliche Mutationen in anderen Genen führen dann zu einer Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen dem Zellzyklus (Wachstum und Teilung) und dem programmierten Zelltod (Apoptose). Bei der Krebsentstehung in Erwachsenen geht man von einem Mehrstufen-Prozess aus, da mehrere Veränderungen in unterschiedlichen Genen nötig sind, bis es zur Entstehung der Tumoren kommt (HANAHAH and WEINBERG 2000). Dieser Prozess benötigt etwa vier bis sieben Ereignisse und scheint zudem mit zunehmendem Alter gehäuft aufzutreten (RENAN 1993). In einigen embryonalen Tumoren hingegen scheint für die Tumorentstehung ein Minimum von zwei Mutationsereignissen ausreichend zu sein (KNUDSON 1992). Dies würde sich dadurch erklären lassen, da das Gewebewachstum und die Differenzierung während der pränatalen und postnatalen Entwicklung durch komplexe zelluläre Signalwege reguliert wird, die eine genaue Kontrolle zwischen Zellteilung und Apoptose erlauben. Kleinste Störungen in einem dieser Signalwege können dabei leicht zu unkontrolliertem Wachstum und somit zur Tumorentstehung führen (SCOTTING *et al.* 2005). Zu den häufigsten embryonalen Tumoren zählen in absteigender Prävalenz das Neuroblastom, das Nephroblastom, das Medulloblastom, das embryonale Rhabdomyosarkom und das Hepatoblastom (www.kinderkrebsregister.de, Jahresbericht 2008, Systemische Darstellung, Tabelle A1-2). In unserer Arbeitsgruppe beschäftigen wir uns hauptsächlich mit dem Hepatoblastom und dem Rhabdomyosarkom, worauf ich im Folgenden näher eingehen möchte.

**Das Hepatoblastom (HB)** ist ein hochmaligner embryonaler Tumor der Leber, welcher meist bei sehr jungen Kindern im Alter zwischen 6 Monaten und 3 Jahren auftritt (WEINBERG and FINEGOLD 1983). Neben dem HB werden auch hepatozelluläre Karzinome (HCC) diagnostiziert, allerdings meist bei älteren Kindern oder jungen Erwachsenen (MEYERS 2007). Die Inzidenz für das HB liegt bei etwa 1:1.000.000 Kindern (MANN *et al.* 1990), wobei Jungen häufiger ein HB entwickeln als Mädchen. Histopathologisch erfolgt eine Einteilung der HB in fünf verschiedene Subtypen: fetal, embryonal, gemischt (epithelial/mesenchymal), trabekulär und anaplastisch (undifferenziert). Patienten mit dem fetalen Subtyp weisen dabei die beste und Patienten mit dem anaplastischen Subtyp die schlechteste Prognose auf (VON SCHWEINITZ *et al.* 1997). Die Einteilung der Tumore in verschiedene Stadien erfolgt nach



dem chirurgischen Eingriff. Standard-Risiko-Patienten (SR) werden je nach Resezierbarkeit in die Stadien I – III unterteilt. Im Stadium I konnte der Tumor bei der Operation primär komplett entfernt werden, wohingegen im Stadium II ein mikroskopischer und im Stadium III ein makroskopischer Resttumor nachweisbar ist. Bei Hoch-Risiko-Patienten (HR), bei welchen sich bereits Metastasen gebildet haben spricht man von einem Tumor des Stadiums IV. Die Dreijahres-Überlebensraten liegen dabei bei SR-Patienten bei etwa 91 % und bei HR-Patienten nur etwa bei 53 % (PERILONGO *et al.* 2004). In den meisten Fällen treten HB sporadisch auf, jedoch gibt es auch eine Assoziation mit familiären Krankheitssyndromen wie der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAD) und dem Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS), die eine erhöhte Inzidenz für HB aufweisen (BUENDIA 2002). Auf molekularer Ebene findet man in HB häufig Mutationen im *APC* Gen des WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs sowie im  $\beta$ -Catenin (*CTNNB1*) Gen selbst. Außerdem wird eine Deregulation in anderen WNT-Signalweg beeinflussenden Genen wie *AXIN* (TANIGUCHI *et al.* 2002) und *Dickkopf* (*DKK*) (WIRTHS *et al.* 2003) beschrieben. Zudem scheinen epigenetische Aspekte bei der Entstehung von Lebertumoren eine wichtige Rolle zu spielen, wie beispielweise die Methylierung von *RASSF1A* in HB (SUGAWARA *et al.* 2007) oder verschiedener *SFRPs* (1; 2; 5) in HCC (TAKAGI *et al.* 2008). Ebenfalls betroffen ist der IGF-Signalweg durch einen in diesen Tumoren gehäuft auftretenden Verlust der Prägung am *IGF2/H19*-Lokus (RAINIER *et al.* 1995). Zusätzlich wird oft eine Amplifikation des IGF2-Regulators *PLAG1* in HB beobachtet (ZATKOVA *et al.* 2004). Da beschrieben wurde, dass es in HCC häufig zu einer Deregulation des Hedgehog-Signalweg kommt (SICKLICK *et al.* 2006), ist es durchaus möglich, dass bei der Entstehung von HB auch dieser Signalweg eine wichtige Rolle spielt.

**Das Rhabdomyosarkom (RMS)** ist das häufigste Weichteilsarkom des Kindesalters und repräsentiert etwa 5-10 % der pädiatrischen Tumoren (PAPPO 1995). RMS entstehen aus entarteten Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur durch Störungen in der normalen myogenen Entwicklung und Differenzierung (MERLINO and HELMAN 1999). Nach dem allgemein gültigen histologischen Klassifizierungsschema wird das RMS hauptsächlich in zwei verschiedene Subtypen unterteilt (ANDERSON *et al.* 1999). Das embryonale RMS (ERMS) wird in den meisten Fällen bei Kindern unter 10 Jahren im Hals- und Kopfbereich sowie im Urogenitalbereich diagnostiziert. Es hat eine generell bessere Prognose als das aggressivere alveoläre RMS (ARMS), welches oft erst bei Jugendlichen oder jungen Erwachsenen im Bereich des Rumpfes und der Extremitäten auftritt. Die Einteilung in die verschiedenen Stadien des Tumors wird wie folgt vorgenommen. Im Stadium I ist der Tumor im Bereich der Augen, des Kopf und/oder des Hals, oder in der Nähe der Geschlechtsorgane und der Harnblase zu finden. Im Stadium IIA verbleiben mikroskopische feingewebliche Reste nach Resektion (< 5 cm) und die Lymphknoten sind nicht befallen, wohingegen sie im Stadium IIB befallen waren, aber operativ entfernt wurden. Beim Stadium III ist der Tumor bereits größer 5 cm und die Lymphknoten enthalten Tumorzellen. Befallen Metastasen entfernt gelegene Lymphknoten oder andere Organe, wie zumeist Lunge, Gehirn, Knochen

oder Beckenorgane, so spricht man vom Stadium IV des Tumors. Die Heilungschancen variieren zwischen 80 % im Stadium I und nur noch etwa 20 % im Stadium IV ([www.dr-gumpert.de/html/rhabdomyosarkom.html](http://www.dr-gumpert.de/html/rhabdomyosarkom.html)). In einigen Fällen kommt es auch zur Bildung von Rezidiven. Da trotz sorgfältiger chirurgischer Entfernung des Tumors, kombiniert mit Bestrahlung und Chemotherapie die mittlere 5-Jahresüberlebensrate von 70 % bei aggressiven ARMS oder späten Stadien von RMS sogar auf unter 20 % sinkt (BARLOW *et al.* 2006), ist es wichtig, die Behandlungsmöglichkeiten zu verbessern und die molekularen Entstehungsmechanismen genauer zu analysieren. Die wenigen bisher vorliegenden Erkenntnisse über die Entstehung von RMS werden recht kontrovers diskutiert. So sind zwar einige molekulare Läsionen, wie der Verlust der Prägung des *IGF2*-Gens in ERMS oder die chromosomale Translokationen t(2;13) (*PAX3-FKHR*) und t(1;13) (*PAX7-FKHR*) in ARMS bereits beschrieben worden (XIA *et al.* 2002), aber bei der Übertragung dieser genetischen Veränderungen in entsprechende Mausmodelle konnten jedoch keine Hinweise auf die Entwicklung myogener Tumoren gefunden werden. RMS bei familiären Krankheits-syndromen findet man bei dem Basalzell-Nävus-Syndrom (NBCCS), bei dem eine Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen *PATCHED* vorliegt oder dem Li-Fraumeni-Syndrom (LFS) mit einer Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen *TP53*. In beiden Fällen haben Mausmodelle (*Ptch*<sup>+/-</sup> und *TP53*<sup>+/-</sup>) eine hohe Inzidenz für die Entstehung von RMS (HAHN *et al.* 2000; WHITE *et al.* 2002). Daher werden unter anderem Komponenten des Hedgehog-Signalwegs bei der Entstehung von RMS diskutiert (KAPPLER *et al.* 2003; TOSTAR *et al.* 2006).

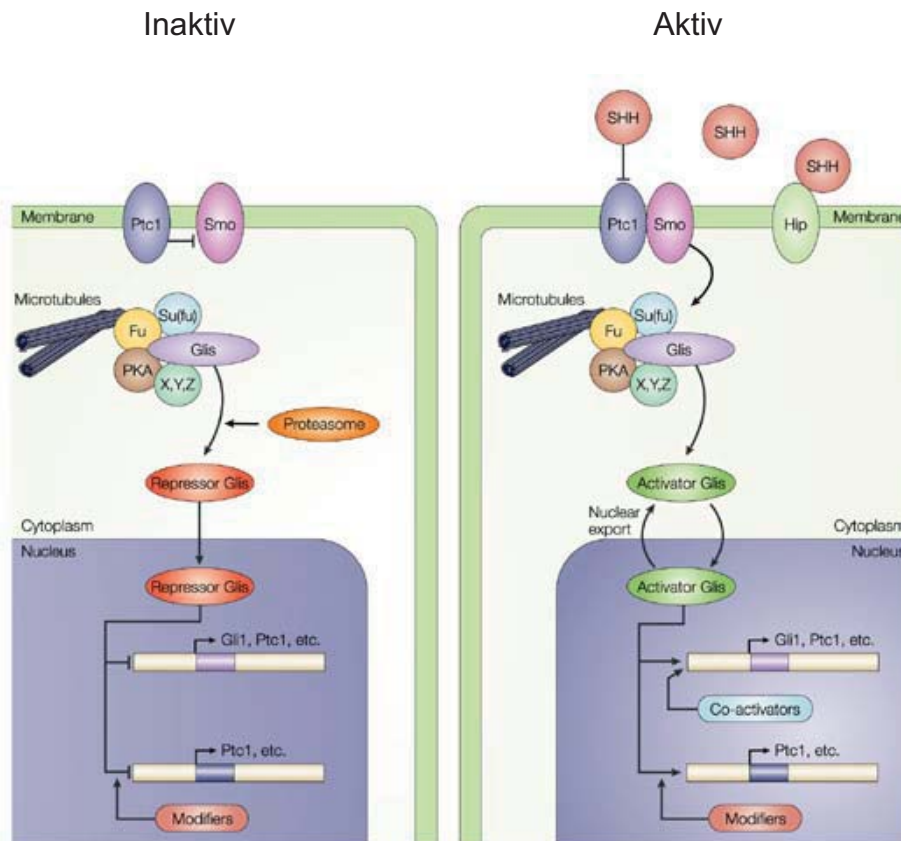
### **Relevante Signalwege bei der Entstehung von kindlichen Tumorerkrankungen**

Nahezu alle zellulären Prozesse werden über Signalwege reguliert. Auch in der Embryonalentwicklung spielen Signalwege eine entscheidende Rolle. Hierbei sind vor allem fünf intrazelluläre Signalwege von großer Bedeutung: der WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg, der TGF $\beta$ -Signalweg, der Notch-Signalweg, der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Signalweg (PI3K/AKT) und der Sonic-Hedgehog Signalweg (GERHART 1999). Auf die beiden in dieser Arbeit näher untersuchten Signalwege, den Hedgehog und den PI3K/AKT-Signalweg, möchte ich nun im folgenden weiter eingehen.

### **Der Hedgehog Signalweg**

Der Hedgehog (Hh)-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung von Invertebraten und Vertebraten (RUIZ I ALTABA *et al.* 2002a; VARJOSALO and TAIPALE 2008). In den Fokus der Wissenschaft rückte dieser Signalweg, als Christiane Nüsslein-Vollhard zusammen mit Edward B. Lewis und Eric F. Wieschaus für ihre Arbeit an Mutationsanalysen von Genen, die für die Entwicklung der Segmente der anterior-posterior Achse in *Drosophila* verantwortlich sind, 1995 den Nobelpreis verliehen bekamen (NUSSLEIN-VOLHARD and

WIESCHAUS 1980). Wesentlicher Bestandteil dieses Signalweges ist der Ligand Hedgehog (Hh), nach dem dieser Signalweg auch benannt wurde. Von diesem Liganden gibt es drei Formen, Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) und Desert Hedgehog (DHH), wobei SHH das bekannteste und bestuntersuchte Protein dieser Homologen ist. SHH wird als Vorläuferprotein translatiert und erlangt seine Funktionalität durch autokatalytische Spaltung, wobei das N-terminale Fragment die Signaldomäne aufweist. Shh bindet an den Rezeptor Patched-1 (Ptch1, Ptc1), der eine inhibierende Wirkung auf ein transmembranes Protein namens Smoothend (Smo) hat. Neben Ptch1 gibt es bei Wirbeltieren noch einen



**Abb.1: Hedgehog Signalweg in Vertebraten:** Dargestellt ist eine nach (RUIZ I ALTABA *et al.* 2002a) modifizierte Abbildung des inaktiven (links) und aktiven (rechts) Hh-Signalwegs. In Abwesenheit des Liganten Shh verhindert Ptch1 die Aktivierung der Signaltransduktion durch Inhibition von Smo. Dadurch wird Gli in seine Repressorform überführt und die Expression der Zielgene unterdrückt. Durch die Bindung von SHH an den Rezeptor Ptch1 wird diese Repression aufgehoben und der Signalweg aktiviert. Der Transkriptionsfaktor Gli kann daraufhin in den Zellkern gelangen und reguliert dort durch Bindung an entsprechende Promotoren die Expression verschiedener Zielgene. SHH kann zudem an Hip (Hedgehog interacting protein) binden, wobei es zu einer negativen Regulation des Signalweges kommt.

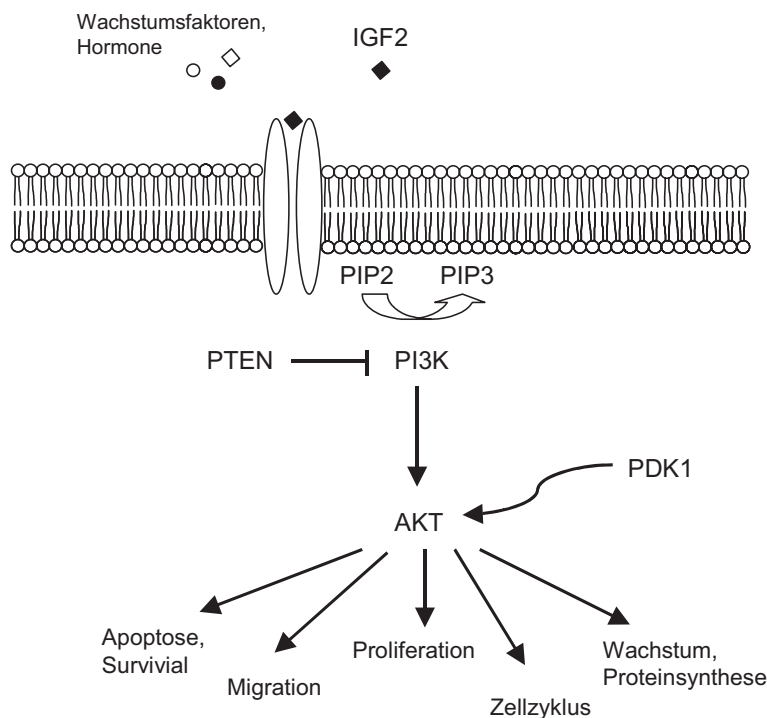
zweiten Rezeptor, Patched-2 (Ptch2), der eine 54 %ige Sequenzhomologie zu Ptch1 hat (CARPENTER *et al.* 1998). Alle drei Hh-Homologe sind in der Lage, mit ähnlicher Affinität an beide Rezeptoren zu binden. Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor wird die Repression von Smo aufgehoben und der Signalweg aktiviert (Abb. 1). Dies geschieht über einen Multiproteinkomplex (bestehend aus dem Suppressor of Fused (SuFu), Fused (Fu), Protein Kinase A (PKA), Gli-Proteinen und einigen zusätzlichen Komponenten, wie beispielsweise die Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in *Drosophila* (LUM and BEACHY

2004)), aus dem heraus sich der Transkriptionsfaktor Gli löst und im Kern die Expression verschiedener Zielgene reguliert (*Ptch1*, *Gli1* und *Igf2*) (HAHN *et al.* 2000; WICKING *et al.* 1999). Von den GLI-Transkriptionsfaktoren sind drei verschiedene bekannt, wobei GLI1 und GLI2 Aktivatoren sind und GLI3 als Repressor fungiert. Ein weiteres interessantes mit dem Hh-Signalweg in Zusammenhang stehendes Protein ist das *Hedgehog interacting protein* (Hip), welches den Signalweg negativ reguliert (CHUANG and MCMAHON 1999). Außerdem werden weitere den Hh-Signalweg beeinflussende Moleküle diskutiert: Megalin, Rab23, GAS1, PKA, GSK3, CK1, Slimb, SAP18 und CBP (COHEN 2003). Ist der Hh-Signalweg dereguliert, also beispielsweise dauerhaft aktiviert, so findet man zudem häufig eine Überexpression von *GLI1* (KINZLER *et al.* 1987) oder Mutationen von *PTCH1* (HAHN *et al.* 1996; RAFFEL *et al.* 1997), wichtige Komponenten des Hh-Signalwegs. Eine Deregulation dieser Signalkaskade führt beim Mensch und der Maus zur Entstehung von Tumoren der Haut, des Gehirns und der quergestreiften Muskulatur (RUIZ I ALTABA *et al.* 2002b). Interessanterweise entwickeln heterozygote *Ptch1*<sup>+/-</sup> Knockout-Mäuse innerhalb eines Jahres in bis zu 63 % aller Fälle RMS, wodurch dieses genetische Modell Aufschluss über die molekularen Entstehungsmechanismen von RMS gibt und für die Erprobung präklinischer Therapiestudien herangezogen werden kann (HAHN *et al.* 1998).

### **Der Phosphatidylinositol-3 Kinase / AKT Signalweg**

Die Serin/Threonin Kinase Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von zellulären Prozessen (CHEN *et al.* 2009; LOPEZ-KNOWLES *et al.* 2009; PORTA and FIGLIN 2009; QIAN *et al.* 2009). Aktiviert wird PI3K durch diverse Wachstumsfaktoren und Hormone. PI3K phosphoryliert dann Phosphatidylinositollipide an der D-3 Position (3'-OH-Gruppe) des Inositolrings, wodurch der „second Messenger“ Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3) entsteht. Auf der cytoplasmatischen Seite haben viele Signalproteine wie Serin/Threonin-Kinasen, Tyrosin-Kinasen und G-Protein regulierende Faktoren, Domänen, mit welchen sie spezifisch an D-3 phosphorylierte Phosphatidylinositole binden können. Dadurch werden sie aktiviert und können ihrerseits nun Prozesse wie Aktinpolymerisierung, Aggregation von Signalkomplexen oder Aktivierung von Signalkaskaden in Gang setzen (CANTLEY 2002). Die PI3K beeinflusst letztendlich viele zelluläre Funktionen wie das Zellwachstum, die Proliferation, die Differenzierung, die Zellmotilität, den intrazellulären Transport und das Überleben der Zellen. Eine spezielle Funktion ist dabei beispielsweise die Aktivierung der Protein-Kinase B (PKB), auch bekannt unter dem Namen AKT (Abb. 2). Dies geschieht indirekt dadurch, dass die PI3K PIP3 generiert und in Anwesenheit dieses Moleküls sowie einer weiteren Kinase, genannt *Phosphoinositide dependent kinase 1* (PDK1), AKT phosphoryliert wird. Dieser PI3K/AKT-Signalweg spielt vor allem eine Rolle bei der Zellproliferation und dem Überleben der Zelle. Da eine genaue Regulation dieser Prozesse für eine gesunde intakte Zelle essentiell ist, ist es nicht überraschend, dass eine Deregulation des Signalwegs häufig mit dem Auftreten von Tumoren assoziiert ist (HARTMANN *et al.* 2006; HO *et al.* 2005). In einigen Tumoren ist

beispielsweise  $p110\alpha$ , eine katalytische Untereinheit der PI3K mutiert, in anderen ist AKT mutiert und in wieder anderen ist der PI3K-Antagonist PTEN, ein Tumorsuppressorgen, herunterreguliert (YUAN and CANTLEY 2008). Weiterhin wurden  $p110\alpha$ -Mutationen und Amplifikationen bei Brust-, Kolorektal-, Urogenital-, Magen- und Zervikaltumoren sowie Lungenkarzinom, *AKT*-Mutationen bei Pankreas- und Ovarialkarzinom sowie Brust- und Kolorektaltumoren; und *PTEN*-Mutationen bei Tumoren des Nervensystems, der Haut, Prostata und Brust beobachtet. (CARPTEN *et al.* 2007; ENGELMAN *et al.* 2006; SALMENA *et al.* 2008; SAMUELS and ERICSON 2006). Mutationen in diesen Genen führen zu einer gesteigerten Aktivität der Kinase und dadurch kommt es letztendlich zur Tumorentstehung.



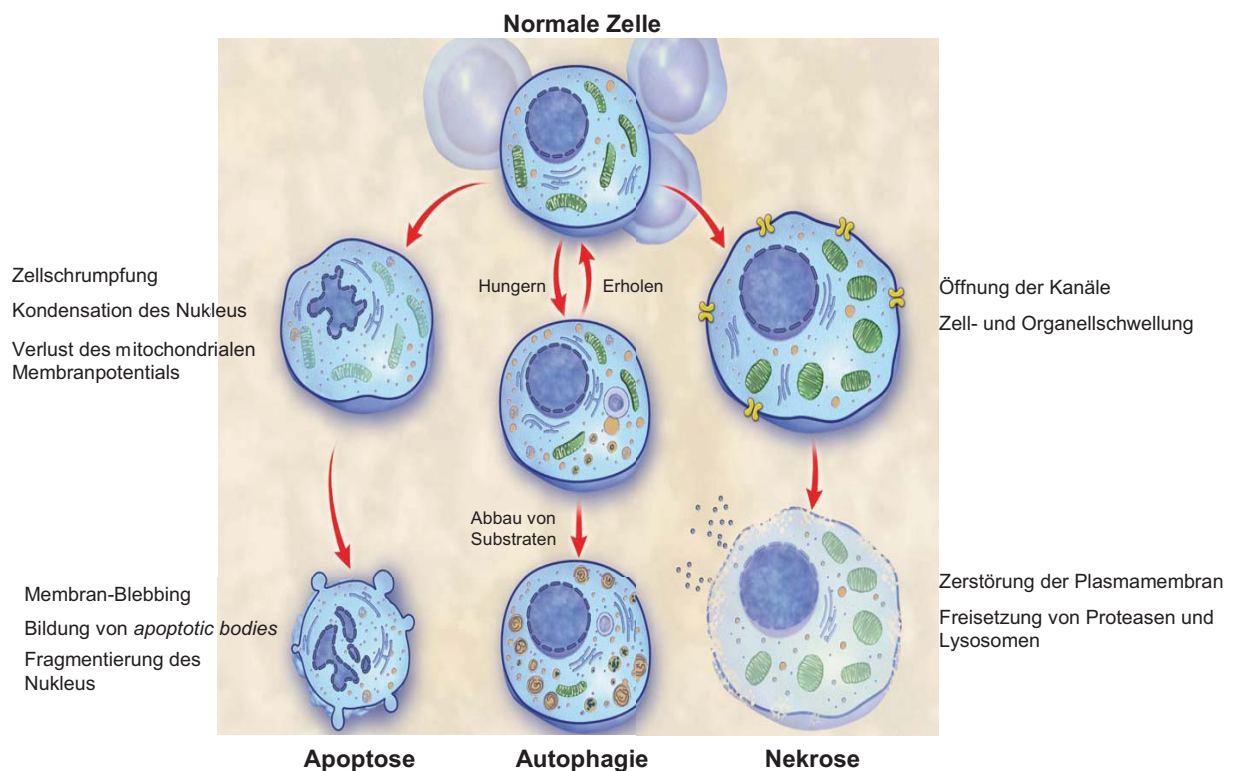
**Abb. 2: Der PI3K / AKT Signalweg**

Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise IGF2, oder Hormone binden an ihre entsprechenden Rezeptoren meist mit Rezeptor Tyrosin Kinase Aktivität. PI3K wird aktiviert und kann ihrerseits andere Kinasen aktivieren. AKT wird dabei indirekt durch PI3K aktiviert, indem sie PIP3 zur Verfügung stellt. Dies führt zur Aktivierung der PDK1 Kinase, die wiederum AKT phosphoryliert. AKT beeinflusst dann wichtige zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, den Zellzyklus, die Proteinbiosynthese, Migration und das Überleben der Zelle durch Kontrolle von apoptotischen und survival Mechanismen. PTEN, ein bekannter Tumorsuppressor, kann dabei PI3K negativ regulieren.

Aktiviert werden kann der Signalweg aber nicht nur durch Mutationen in den genannten Genen, sondern auch durch eine Überexpression von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise *IGF2*. Eine gesteigerte oder veränderte *IGF2*-Expression wurde unter anderem auch in RMS (Verlust der Prägung am *IGF2/H19* Locus, ERMS spezifische gesteigerte *IGF2*-Expression (XIA *et al.* 2002)) und in HB (Verlust der Prägung am *IGF2/H19* Locus (RAINIER *et al.* 1995)) dokumentiert. Da ein deregulierter PI3K/AKT-Signalweg im Zusammenhang mit vielen Tumorerkrankungen steht, ist es wichtig, die Zusammenhänge zwischen dem PI3K/AKT-Signalweg und der Tumorentstehung genauer zu untersuchen und den Signalweg inhibierende neue Substanzen zu identifizieren, um in Zukunft eventuell den Signalweg als therapeutische Zielstruktur bei Tumorerkrankungen zu inhibieren (FRESNO VARA *et al.* 2004).

## Der programmierte Zelltod - Apoptose

Da eigene Vorarbeiten gezeigt haben, dass ein aktiver PI3K/AKT-Signalweg, sowie die Rekrutierung anti-apoptotischer Proteine, wie beispielsweise BCL2 (KAPPLER *et al.* 2004), die Tumorzellen der Fähigkeit berauben, in Apoptose zu gehen, ist es sinnvoll, nach Substanzen zu suchen, die eine Reaktivierung der Apoptose in den Tumoren ermöglichen. Unter Apoptose versteht man allgemein eine koordiniert ablaufende Form des programmierten Zelltods, bei dem die Zellen aktiv und unter Energieaufwand sterben. Eingeführt wurde der Begriff Apoptose 1972 (KERR *et al.* 1972) zur Abgrenzung des programmierten Zelltods vom



**Abb. 3: Verschiedene Arten des Zelltods**

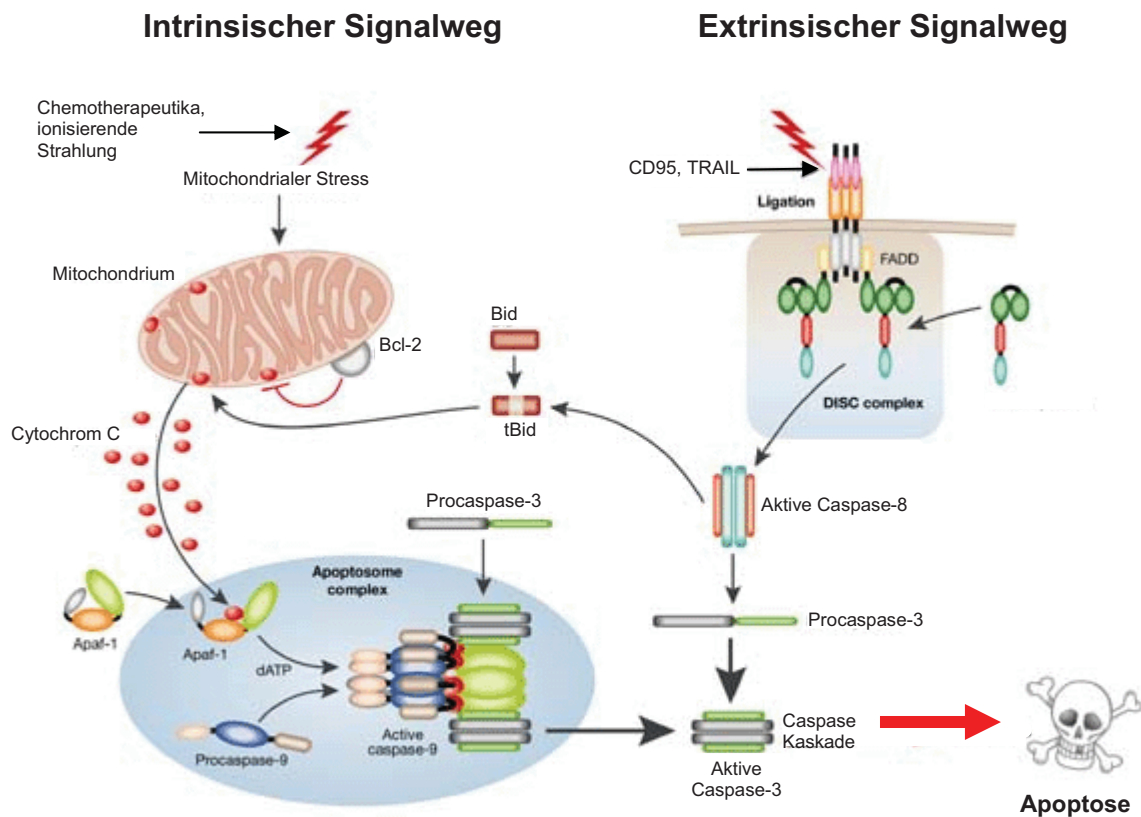
Dargestellt sind die drei Hauptwege des Zelltods (modifiziert nach: (HOTCHKISS *et al.* 2009)) Apoptose zeichnet sich dabei durch massive Zellschrumpfung, Kondensation und Fragmentierung des Nukleus, Membran-Blebbing und Bildung von *apoptotic bodies* aus und wird hauptsächlich durch Chemotherapeutika oder  $\gamma$ -Strahlen verursacht. Nekrose führt zur Öffnung der Plasmamembrankanäle, zur Schwellung der Zelle und der Organellen und letztendlich zur Freisetzung von Proteasen und Lysozymen und zur Zerstörung der Plasmamembran. Bei der Autophagie kommt es zu einem kontrollierten Abbau von Substraten und zum Tod der Zelle.

Unfalltod der Zelle, der Nekrose. Bei nekrotischen Prozessen kommt es zum Ausfall zellulärer Ionenpumpen ( $K^+$ - und  $Na^+$ -Pumpen), was zum osmotischen Einstrom von Wasser gefolgt von der Schwellung der Zelle und der Organellen und so zum Platzen der Zelle führt. Durch den austretenden Zellinhalt werden dann Zellen des Immunsystems aktiviert, wodurch es zu entzündlichen Prozessen kommt. Bei der Autophagie, einer Art des programmierten Zelltods innerhalb der Zelle, kommt es durch ein Überangebot oder einem Mangel an Nährstoffen zum Abbau zelleigener Bestandteile und somit zur Apoptose in der Zelle selbst. Bei der reinen Apoptose hingegen kommt es nicht wie bei der Nekrose zum Zerplatzen,

sondern zum Schrumpfen der Zellen (Abb. 3). Dies geschieht durch einen aktiven Ionenstrom, vor allem durch einen  $K^+$ -Ionen Ausstrom, was zur Kontraktion des Zytoskeletts führt (MCCARTHY and COTTER 1997). Weiter charakteristisch für Apoptose ist der genetisch determinierte und geordnete Ablauf des Zelltods. Im Verlauf dieses Prozesses kommt es zur Abnahme des Zellvolumens, zur Kondensation des Zellkerns, zur enzymatischen DNA-Fragmentierung, zum Abbau des Zytoskeletts, zur Bildung von Membranausstülpungen bzw. „*apoptotic bodies*“, welche von Makrophagen phagozytiert werden (HOTCHKISS *et al.* 2009; SANDRI and CARRARO 1999). Im Gegensatz zur Nekrose wird hierbei keine entzündliche Reaktion induziert. Ausgelöst wird Apoptose durch fehlerhafte Reparaturmechanismen, durch Virusinfektionen, als Antwort auf ionisierende Strahlung, durch toxische Substanzen oder durch andere Stresssituationen (EVERETT and MCFADDEN 1999; KULTZ 2005; LIU *et al.* 2006). Die Entscheidung darüber, ob Apoptose ausgelöst wird oder nicht, kann entweder von der Zelle selbst, vom umgebenden Gewebe oder Zellen des Immunsystems getroffen werden. Trotz des offensichtlichen Schutzcharakters kann Apoptose aber nicht nur vorteilhaft für den Organismus oder die Zelle sein, sondern auch mit erheblichen Nachteilen einhergehen. So ist bei der Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen wie Chorea Huntington oder Amyotrophe Lateralsklerose massive Apoptose in den betroffenen Arealen zu beobachten.

Dieser zelluläre Selbstmord wird hauptsächlich durch zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst (Abb. 4). Bei dem über Todesrezeptoren vermittelten extrinsischen Weg wird Apoptose durch die Bindung von bestimmten Liganden, beispielsweise CD95L, TRAIL oder  $TNF\alpha$ , an sogenannte Todesrezeptoren ausgelöst (PAPENFUSS *et al.* 2008). Durch Bindung der Liganden an die Rezeptoren wird auf der cytoplasmatischen Seite ein Adaptermolekül (FADD) gebunden, wodurch es zur Aktivierung der für den extrinsischen Apoptoseweg charakteristischen Caspasen, Caspase 8 und 10, und letztendlich zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und den dazugehörigen Caspasen, Caspase 3 und PARP, kommt. Beim intrinsischen Weg, dem mitochondrialen Weg, wird Apoptose durch zytotoxische Substanzen (Chemikalien, Zytostatika, Aktivierung von TP53 oder DNA-Schäden) direkt über das Mitochondrium initiiert. Ein entscheidender Schritt dabei ist die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytoplasma, wobei unter anderem Apaf1 gebunden wird und es zur Bildung eines katalytischen Komplexes, dem Apoptosom, kommt. Anschließend wird ebenfalls die Caspase-Kaskade von Caspase 3 abwärts aktiviert (HAIL *et al.* 2006). Dieser intrinsische Signalweg kann außerdem über einen positiven Feedback-Loop ausgelöst werden, der dann die Induktion über den mitochondrialen Apoptosesignalweg mimikriert (CHEN *et al.* 2000). Beide Wege führen aber gleichermaßen zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und letztendlich definitiv zum Absterben der Zelle. Ein dritter Apoptose-induzierender Weg führt über das Endoplasmatische Retikulum (PUTHALAKATH *et al.* 2007; SHIRAISHI *et al.* 2006). Unabhängig davon aber, welches Apoptoseprogramm involviert ist, kann die Inhibition des Apoptoseprogramms zu

ungehemmter Proliferation und zur Entstehung von Tumoren führen. Daher ist es wichtig, dass gehemmte Apoptoseprozesse erkannt und mit entsprechenden Induktoren zu therapeutischen Zwecken genutzt werden können.



**Abb. 4: Mechanismen der Apoptoseinduktion**

Prinzipiell lassen sich zwei Hauptwege der Apoptoseinduktion unterscheiden; der extrinsische und der intrinsische Signalweg (modifiziert nach: (MACFARLANE and WILLIAMS 2004)). Der extrinsische Signalweg ist durch die Todesrezeptor-vermittelte Initiation der Caspase-Kaskade und die direkte Aktivierung der Caspase-3 durch die Caspase-8 charakterisiert. Der intrinsische Signalweg, ausgelöst durch Chemotherapeutika, ionisierende-Strahlung oder Stress, wird hingegen mitochondrial vermittelt und führt über die Ausschüttung von Cytochrom C und Bildung eines Apoptosomkomplexes ebenfalls zur Aktivierung der Caspase 3 und damit zur Apoptose.

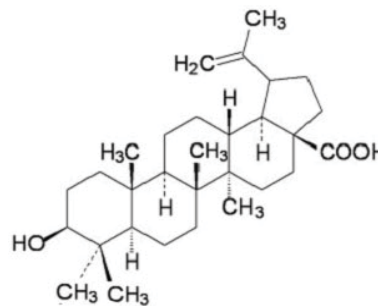
### Phytotherapeutika

Bei der Therapie von kindlichen Tumorerkrankungen führt man gewöhnlich vor der chirurgischen Entfernung des Tumors eine Chemotherapie und/oder eine Strahlentherapie durch. Jede dieser Maßnahmen geht allerdings mit Nachteilen einher. Operative Eingriffe hinterlassen beispielsweise ein Trauma, können zu massiven Verletzungen gesunden Gewebes führen und der Tumor wird oft nicht vollständig entfernt. Chemotherapie und Strahlentherapie sind weiterhin wenig zielgerichtet und zerstören in hohem Maße auch gesundes Gewebe, so dass die Entdeckung und Etablierung neuer tumorspezifischer Behandlungsmöglichkeiten ein großer Vorteil für die Patienten wäre. In diesem Zusammenhang werden immer mehr naturheilkundliche Präparate, oder darin enthaltene Inhaltsstoffe, auf ihre anti-tumorigene Wirkung hin analysiert. In Frage kommen hierbei neben Kräutern aus der chinesischen Medizin (SU *et al.* 2009) auch Inhaltsstoffe des grünen



(BOEHM *et al.* 2009; BUTT and SULTAN 2009) oder schwarzen Tees (LARSSON *et al.* 2009), verschiedene Früchte wie Trauben (KAUR *et al.* 2009) oder Äpfel (YANG and LIU 2009), Extrakte aus Gemüse wie Brokkoli oder Blumenkohl (CHINNI *et al.* 2001), Knoblauch (RASSOUL *et al.* 2006), Nüsse (CHEN and BLUMBERG 2008), Honig (JAGANATHAN and MANDAL 2009), Resveratrol aus Wein (GOSWAMI and DAS 2009), sowie verschiedene Flavonoide (KIM *et al.* 2009; PATIL *et al.* 2009; WANG *et al.* 2009), Curcumin (LOPEZ-LAZARO 2008) und sogar Weihrauch (FRANK *et al.* 2009). Im Folgenden möchte ich nun auf zwei dieser natürlichen Substanzen, die in dieser Arbeit weiter analysiert werden, Betulinsäure und Cyclopamin, näher eingehen.

**Bei der Betulinsäure (BA)** handelt es sich um ein pentazyklisches Triterpenoid aus der Birkenrinde oder der Platanenborke (Abb. 5). Es ist bekannt, dass BA wirksam ist gegen Malaria (BRINGMANN *et al.* 1997) und sowohl anti-bakterioide als auch anti-fungale Wirkung



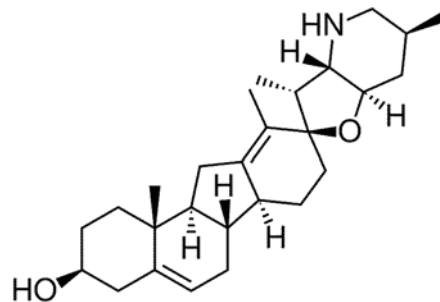
**Abb. 5: Betulinsäure**

Dargestellt ist links das Bild eines Birkenstammes, aus dessen Rinde Betulin isoliert und zu Betulinsäure oxidiert werden kann, und rechts die Strukturformel von Betulinsäure.

aufweist (ROCHA *et al.* 1994; SCHUHLY *et al.* 1999; SHAI *et al.* 2008). BA hat außerdem eine inhibierende Wirkung auf die Maturation des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (DANG *et al.* 2009; SMITH *et al.* 2007). Zudem ist BA als chemopräventives Agens mit einer anti-tumoralen Wirkung gegen eine Vielzahl von Tumoren wie Melanome (PISHA *et al.* 1995), neuroektodermale Tumore (FULDA *et al.* 1999a) und Tumore der Lunge, des Colons, der Prostata und der Eierstöcke (ALAKURTTI *et al.* 2006) bekannt. Interessanterweise zeigt BA nur eine minimale Toxizität gegenüber normalen Zellen (ZUCO *et al.* 2002). Die zytotoxische Wirkung von BA wird durch Induktion von Apoptose erreicht, wobei es offenbar gezielt in Tumorzellen Apoptose zu induzieren vermag. Bei dieser Induktion wird der intrinsische Apoptoseweg aktiviert, gefolgt von der Aktivierung spezifischer Caspasen (FULDA and DEBATIN 2000; FULDA *et al.* 1997; FULDA *et al.* 1998). BA scheint dabei nicht nur selektiv auf Tumorzellen zu wirken, sondern zeigt auch einen vorteilhaften Effekt in Chemotherapie-

resistenten Tumorzelllinien (SAREK *et al.* 2003). Dadurch könnte BA zu einem vielversprechenden Ansatz bei der Behandlung von Tumorerkrankungen werden.

**Bei Cyclopamin (CyC)** handelt es sich um einen Wirkstoff aus dem Liliengewächs *Veratrum californicum*, der zur Gruppe der steroidal Alkaloide gehört (Abb. 6). CyC besitzt teratogene Wirkung und verursacht in Embryonen schwerwiegende Schäden, da es zur Zyklopie (Einäugigkeit) und Neuralrohrdefekten führen kann (INCARDONA *et al.* 1998). CyC hat aber nicht nur diesen negativen Effekt, denn es kann zu einem späteren



**Abb. 6: Cyclopamin**

Dargestellt ist links das Bild einer *Veratrum californicum* Pflanze ([http://www.flowersociety.org/corn\\_lily\\_heyns.htm](http://www.flowersociety.org/corn_lily_heyns.htm)), und rechts die Strukturformel von Cyclopamin.

Entwicklungsstadium auch zur Tumorthherapie eingesetzt werden. Dabei wurde es unter anderem bereits erfolgreich zur Behandlung von Hh-assoziierten Tumorarten wie den Basalzell-Karzinomen, Medulloblastomen, Glioblastomen und Myelomen verwendet (TAIPALE *et al.* 2000). Dieser anti-tumorigene Mechanismus beruht darauf, dass CyC durch die Blockade von Smo den Hh-Signalweg inhibiert und damit Apoptose induzieren kann. Neben den bereits genannten Tumoren, bei denen man es bereits zu therapeutischen Zwecken einsetzen kann, wurden auch Liganden-getriebenen Hh-assoziierten Tumore oder Zelllinien dieser Tumoren wie beispielsweise Leukämien (WARZECHA *et al.* 2008), Osteosarkome (WARZECHA *et al.* 2007), Brustkrebs (ZHANG *et al.* 2009) oder Colonkarzinome (QUALTROUGH *et al.* 2004) erfolgreich auf CyC getestet. Der anti-tumorigene Effekt scheint dabei direkt durch die Induktion von Apoptose in CyC-behandelten Geweben oder Zellen ausgelöst zu werden. Da diese Substanz nicht nur Apoptose induziert, sondern effektiv auch den Hh-Signalweg hemmt, eignet sich CyC nicht nur zur Therapie von Tumorerkrankungen, sondern auch hervorragend für wissenschaftliche Fragestellungen, bei denen die Aktivität des Hh-Signalwegs untersucht werden soll.

## 2 Aufgabenstellung

Bei Tumorerkrankungen des Kindesalters handelt es sich meist um sehr unreife Tumoren, deren maligne Zellen eine große morphologische Ähnlichkeit mit ihren embryonalen Vorläuferzellen zeigen. Eine frühe Manifestation dieser Tumore und eine häufig auftretende spontane Regression deuten darauf hin, dass nur wenige genetische Veränderungen für die Ausbildung des malignen Phänotyps nötig sind. Studien unserer Arbeitsgruppe am *Patched1* knock-out Mausmodell haben im Vorfeld gezeigt, dass es in Hh-assoziierten embryonalen Tumoren der Skelettmuskulatur zur Rekrutierung anti-apoptotischer Signale und zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs kommt. Dies resultiert in der Unfähigkeit der Tumorzellen, in Apoptose zu gehen und könnte ein Charakteristikum für die Entstehung kindlicher Tumoren sein.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst der Frage nachgegangen werden, inwiefern es sich bei der Aktivierung der PI3K/AKT-Signalkaskade um ein generelles Phänomen embryonaler Tumoren handelt. Da eine Aktivierung dieses Signalwegs dazu führt, dass die Tumorzellen nicht mehr in Apoptose gehen können, sollten in einem weiteren Schritt Wirkstoffe identifiziert werden, die in der Lage sind, gezielt die Vitalität der embryonalen Tumorzelllinien zu inhibieren und Apoptose auszulösen. Desweiteren galt es zu analysieren, über welchen Signalweg es zur Induktion von Apoptose kommt und welche pro- oder anti-apoptotischen Mechanismen dies gegebenenfalls beeinflussen. Außerdem sollte untersucht werden, ob wichtige Signalwege der Embryonalentwicklung, wie beispielsweise der Hedgehog-Signalweg, durch die gefundenen Apoptose-induzierenden Substanzen inhibiert werden können. Schließlich sollten erfolgreich *in vitro* getestete Substanzen auch im kliniknahen Tiermodell *in vivo* überprüft werden. Insgesamt sollte eine auf der Apoptose-Induktion beruhende Therapieoption gefunden und bis ins präklinische Modell getragen werden.

### 3 Material

#### 3.1 Verwendete Organismen

##### 3.1.1 Prokaryotische Zellen

DH5 $\alpha$  kompetente *Escherichia coli* Zellen (Invitrogen, Karlsruhe)

(Genotyp: F-  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-,mk+) *phoAsupE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ -)

##### 3.1.2 Eukaryotische Zellen

**RMS-13:** Humane alveoläre Rhabdomyosarkomzelllinie, *GLI1*-Amplifikation, *PAX3-FKHR*-Translokation t(2;13)(q35;14), (*The American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, VA, USA)

**RH-30:** Humane alveoläre Rhabdomyosarkomzelllinie, *TP53* Mutation (Arg<sup>273</sup>  $\rightarrow$  Cys (CGT-TGT) und Arg<sup>280</sup>  $\rightarrow$  Ser (AGA-AGT), beide heterozygot (BARLOW *et al.* 2006)), hohe Expressionslevel von *Myogenin* und *MyoD*, *PAX3-FKHR*-Translokation t(2;13)(q35;14), (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ), Braunschweig)

**RD:** Humane embryonale Rhabdomyosarkomzelllinie, etabliert aus Tumorgewebe eines 7 jährigen kaukasischen Mädchens, *TP53* Mutation (Arg<sup>248</sup>  $\rightarrow$  Trp C-T) und T-C 9 bp 3' Exon 7, beide homozygot (BARLOW *et al.* 2006)), (ATCC, Manassas, VA, USA)

**RH-1:** Humane Ewingsarkom Zelllinie, ursprünglich klassifiziert als embryonale Rhabdomyosarkomzelllinie, *TP53* Mutation (homozygot Tyr<sup>220</sup>  $\rightarrow$  Cys (TAT-TGT) (BARLOW *et al.* 2006)), (DSMZ, Braunschweig)

**A673:** Humane Ewingsarkom Zelllinie, *TP53* Mutation (Exon 4 GA Insertion und T-C 9 bp 3' Exon 7, beide homozygot (BARLOW *et al.* 2006), (ATCC, Manassas, VA, USA)

**HUH6:** Humane Hepatoblastomzelllinie (*Japanese Collection of Research Bioresources*, Osaka, Japan)

**HepT1:** Humane Hepatoblastomzelllinie mit überwiegend embryonaler Differenzierung (PIETSCH *et al.* 1996)

**HepT3:** Humane epitheliale Hepatoblastomzelllinie (HARTMANN *et al.* 2000)

**HepG2:** Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie, etabliert aus Tumorgewebe eines 15 jährigen argentinischen Jungen, 1975, (ATCC, Manassas, VA, USA)

- NB11** Humane Neuroblastomzelllinie, *NMYC*-Amplifikation, (PIETSCH *et al.* 1988)
- NIH-3T3** Embryonale Mausfibroblasten (DSMZ, Braunschweig)
- MB627** Medulloblastomzelllinie aus *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen (zur Verfügung gestellt von: Pablo Hernáis Driever, Charité Berlin)
- MB723** Medulloblastomzelllinie aus *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen (zur Verfügung gestellt von: Pablo Hernáis Driever, Charité Berlin)
- MB794** Medulloblastomzelllinie aus *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen (zur Verfügung gestellt von: Pablo Hernáis Driever, Charité Berlin)
- Feja** Humane primäre Fibroblastenzelllinie aus einer Hautbiopsie eines gesunden Spenders
- T264:** Humane Primärzelllinie eines epitheloiden Sarkoms

### 3.1.3 Mäuse

6-8 Wochen alte weibliche NMRI Nacktmäuse (Charles River, Sulzfeld)

Nacktmausfutter, steril (SSNIFF, Soest)

Tierversuchsantrag Regierung von Oberbayern: Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-73-08

## 3.2 Medien

### 3.2.1 Medien für Bakterienkulturen

#### **LB-Medium (Luria / Miller):**

10 g/l Select Pepton 140, 5 g/l Select Hefeextrakt und 5 g/l NaCl (Roth, Karlsruhe), pH 7,2, wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Vor Gebrauch wurde wenn nötig dem LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

#### **LB-Agarplatten (Luria / Miller):**

18 g Agar (Roth, Karlsruhe) wurde in 500 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 100 µg/ml Ampicillin zugegeben und die Platten gegossen.

### 3.2.2 Medien für Zellkulturen

#### ***RPMI-1640 Medium (engl. Roswell Park Memorial Institute Medium):***

RPMI-1640 Medium (1x), liquid - with GlutaMAX™ I (Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit 1 % (v/v) fötalem Rinderserum (FBS, Invitrogen, Karlsruhe) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt.

#### ***DMEM Medium (engl. Dulbecco`s Modified Eagle Medium):***

DMEM Medium (1x) mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit 10 % (v/v) FBS (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt.

***Einfriermedium:***                    50 ml FBS  
     40 ml DMEM Medium (ohne FBS, mit 1% Penicillin/Streptomycin)  
     12,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

### 3.3 Reagenzien und Materialien

#### 3.3.1 Reagenzien

Aceton	SAV LP, Flintsbach
Acetylesther Betulinsäure	BioSolutions, Halle
Agarose	PeqLab, Erlangen
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Betulinsäure	BioSolutions, Halle
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau Natriumsalz	Merk, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calcein	Invitrogen, Karlsruhe
ChemMate™ Antibody Diluent	DakoCytomation, Hamburg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cyclopamin	Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada
Cyclin dependent kinase inhibitors (Olomoucine-II, (R)-Roscovitine, (S)-Roscovitine, CAN-508, OSW-1, LGR-1406 / -1407 / -1431 / -1492, HMBAPR, 2CI-HMBAPR)	Kooperation mit Herrn Prof. Miroslav Strnad (Palacky Universität Olomouc, Tschechien)
ddH <sub>2</sub> O	Invitrogen, Karlsruhe

dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim
Dihexaoxacarbocyaninjodid (DiOC <sub>6</sub> (3))	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetracyanat (EDTA), 99,5 %	Roth, Karlsruhe
Eosin Y-Lösung, alkalisch, 0,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
(-)-Epigallocatechin Gallat	Calbiochem (Merck), Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr), 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fugene 6	Roche Diagnostics, Mannheim
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glycergel Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isofluran (99,9 % (w/w))	Abbott, Wiesbaden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Fluka, Buchs, Schweiz
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Loading Dye Solution (6x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
o-Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe
O <sub>2</sub> Oxeane Supra Light	Linde AG, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Peroxidase Block	DakoCytomation, Hamburg
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) (-CaCl <sub>2</sub> und -MgCl <sub>2</sub> ), (1x)	Invitrogen, Karlsruhe
PolyMAG Transfektionsreagenz	Acris Antibodies, Hiddenhausen
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Random-Hexamere	Roche Diagnostics, Mannheim
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sodiumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tri Reagent	Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectashield Mounting Medium with DAPI	VectorLaboratories, Burlingame, CA, USA
X-Ray Entwicklerlösung Roentoroll 25	Tetental AG, Schützenwall

X-Ray Fixierungslösung Superfix 25  
Xylol  
zVAD.fmk

Tetental AG, Schützenwall  
Roth, Karlsruhe  
Bachem, Weil am Rhein

### 3.3.2 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon™ Round-Bottom Tubes  
Deckgläser  
Filtertips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)  
Histowax  
Hybond-C extra Nitrocellulosemembran  
Hyperfilm™ MP  
Kanülen (G20, G24, G26, G30)  
KOVA Glasstic slide 10 with grids  
Kryoröhrchen  
Lab-Tek II Chamber Slide  
Objekträger  
PCR 5-strip tubes  
PCR 96 well Platten  
Plastik-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)  
Plastik-Reaktionsgefäße (10 ml, 15 ml, 50 ml)  
Quarzküvette QS 10 mm  
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)  
Spritzen (1 ml, 10 ml, 50 ml)  
Zellkultur Flaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>)  
Zellkultur Platten (6, 12, 24, 48, 96 well)  
Zellkultur Platten schwarz (96 well)  
Zellkultur Platten weiß (96 well)  
Zellschaber  
12 % SDS-Tris-Glycin Gele

BD, Heidelberg  
Menzel-Gläser, Braunschweig  
Sarstedt, Nümbrecht  
Leica, Nussloch  
Amersham, Buckinghamshire, UK  
Amersham, Buckinghamshire, UK  
BD, Heidelberg  
Hycor Biomedical (Stratagene), Kassel  
Schubert&Weiss, Iphofen  
NUNC, Langenselbold  
Menzel-Gläser, Braunschweig  
Eppendorf, Hamburg  
PeqLab, Erlangen  
Eppendorf, Hamburg  
Greiner Bio-One, Frickenhausen  
Hellma, Mühlheim  
Costar, Corning, NY, USA  
BD, Heidelberg  
NUNC, Langenselbold  
NUNC, Langenselbold  
Costar, Corning, NY, USA  
NUNC, Langenselbold  
Greiner Bio-One, Frickenhausen  
Invitrogen, Karlsruhe

### 3.3.3 Geräte

Absaugsystem EcoVac  
Bioanalyser 2100  
Biofuge fresco, Heraeus  
Biofuge pico, Heraeus  
BioPhotometer  
Cellscreen Olympus IX50  
Centrifuge 5702

Schütt Labortechnik, Göttingen  
Agilent, Böblingen  
Kendro, Langenselbold  
Kendro, Langenselbold  
Eppendorf, Hamburg  
Innovatis AG, Bielefeld  
Eppendorf, Hamburg



Centrifuge J2-21	Beckman Coulter, Krefeld
Centrifuge LMC-3000	G. Kisker, Steinfurt
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Tokio, Japan
Entwicklermaschine CP1000	AGFA, Köln
Excella E24 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific, Nürtingen
FACScan	BD, Heidelberg
Feinwaage Te1245	Sartorius, Göttingen
GelJet Imager Version 2004	Intas, Göttingen
GENios Microplatereader	Tecan, Crailsheim
Heizblock MR 3001	Heidolph, Kelheim
Homogenisator Miccra	ART, Mühlheim
Intensivpflegeinkubator 7520	Drägerwerk AG, Lübeck
Isofluranvapor vet. med.	Drägerwerk AG, Lübeck
Kamera AxioCam MRm	Zeiss, Jena
Kamera PowerShot G6	Canon, Krefeld
Luftstromschrank UNI Protect IP20	Ehret, Emmerdingen
Magnetplatte	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Mikroliterzentrifuge MZ014	G. Kisker, Steinfurt
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Mikrotom Leica SM 2000R	Leica, Solms
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Mini <sup>®</sup> -Sub Cell GT	Biorad, München
Paraffinmaschine Leica EG 1120	Leica, Solms
pH-Meter inoLab pH720	WTW, Weilheim
Pipetten (10µl, 100µl, 1000µl, Multipette plus, PysioCare Mehrkanalpipette)	Eppendorf, Hamburg
Pipette Accu-Jet	Brand, Wertheim
PowerPac Basic <sup>™</sup>	Biorad, München
Schieblehre	Black&Decker, Towson, MD, USA
Schüttler Rock-N-Roller	G. Kisker, Steinfurt
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Kendro, Hanau
Stickstofftank ARPEGE 140 / 170	Air Liquide, Kirchen
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments Inc., Neu-Isenburg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg

Vortex-Genie 2	Scientific Industries, NY, USA
Waage Kern EMB 220-1	Kern, Balingen-Frommern
Waage Vic-5101	Acculab, Edgewood, NY, USA
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbad GFL 1083	GFL, Wien, Österreich
XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.4 Allgemeine Lösungen und Puffer

<b>Blockierungspuffer:</b>	0,1 % (v/v)	Tween 20 in PBS
	5 % (w/v)	Magermilchpulver
<b>Citratpuffer:</b>	0,1 M	Citronensäurelösung
	0,1 M	tri-Natriumcitratlösung
	pH 6,0	
<b>Hämalaunlösung:</b>	0,1 % (w/v)	Hämatoxylin
	1 mM	Natriumjodat
	0,1 M	Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat
	0,3 M	Chloralhydrat
	5 mM	Citronensäure-Monohydrat
<b>Kristallviolettlösung:</b>	20 % (v/v)	Methanol
	0,5 % (w/v)	Kristallviolett
<b>Laufpuffer:</b>	25 mM	TRIS
	250 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
<b>Lysispuffer:</b>	0,5 % (v/v)	Triton X-100
	1 mM	Sodiumorthovanadat in PBS
<b>Lysispuffer (für Gewebe):</b>	0,2 M	Kaliumchlorid
	0,03 M	TRIS
	pH 7,25	
	1 x Proteaseinhibitortablette pro 10 ml dH <sub>2</sub> O (complete mini, Roche Diagnostics, Mannheim)	

<b>Nicoletti-Puffer:</b>	0,1 % (v/v)	Triton X-100
	0,1 % (w/v)	Natriumcitrat
<b>5xSDS-Probenpuffer:</b>	2 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	10 % (w/v)	Glycerin
	1 mM	EDTA
	0,005 % (w/v)	Bromphenolblau
	62,5 mM	TRIS-HCl (pH 6,8)
<b>STE-Puffer:</b>	10 mM	TRIS
	0,1 M	Natriumchlorid
	1 % (w/v)	SDS
	1 mM	EDTA
	pH 8,0	
<b>Strippingpuffer:</b>	0,2 M	Glycin / HCl (pH 2,0)
	1 % (w/v)	SDS
<b>TBE-Puffer:</b>	2 mM	EDTA
	89 mM	TRIS
	89 mM	Borsäure
<b>TE-Puffer:</b>	1 M	EDTA
	10 mM	TRIS-HCl (pH 8,0)
<b>Transferpuffer:</b>	48 mM	TRIS
	39 mM	Glycin
<b>Trichromlösung:</b>	12,8 mM	Chromotrop 2R
	3,7 mM	Fast Green FCF (Lichtgrün o. Anilinblau)
	0,24 mM	Wolframatophosphorsäure
	1 % (v/v)	Eisessig
<b>TRIS-Waschpuffer:</b>	7,5 mM	TRIS
	44 mM	TRIS-Hydrochlorid
	0,15 mM	Natriumchlorid
<b>Waschpuffer für WB:</b>	0,1 % (v/v)	Tween 20 in PBS

### 3.5 Verwendete Kits

Alle verwendeten Reaktionssysteme wurden gemäß den Angaben der Herstellerfirmen verwendet. Änderungen im Protokoll werden in den entsprechenden Kapiteln im Methodenteil erwähnt.

Agilent Cell Kit	Agilent, Böblingen
Annexin V-Cy5 Apoposis Detection Kit	BioVision, Mountain View, CA, USA
ApoAlert™ Cell Fractionation Kit	Clontech, Mountain View, CA, USA
BIO-RAD Protein Assay	Biorad, München
Biotin Blocking System	DakoCytomation, Hamburg
Cell Proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Buckinghamshire, UK
Envision™-Peroxidase System	DakoCytomation, Hamburg
LSAB™ HRP Detection Kit	DakoCytomation, Hamburg
Mycoplasma PCR ELISA	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

### 3.6 Längen- und Molekulargewichtstandards

#### 3.6.1 DNA-Längenstandards

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

#### 3.6.2 Protein-Molekulargewichtstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
See Blue Plus2 Pre-stained standard	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.7 Nukleinsäuren

#### 3.7.1 Plasmide

pGL3-TK (5.600 bp)	pGL3-Basic mit Thymidin-Kinase-Promotor <i>upstream</i> des Firefly-Luciferase-Gens, Promega, Mannheim
pGL3 control (5.256 bp)	pGL3 Vektor mit SV40 Promotor und Enhancer <i>upstream</i> des Firefly-Luciferase-Gens, Promega, Mannheim
p11xGli-BS (5.925 bp)	pGL3-TK Plasmid mit 9xGli-Bindestelle
pRL-TK (4.045 bp)	Promega, Mannheim
pEGFP-N1 (4.700 bp)	Clontech, Mountain View, CA, USA
mShh	Expressionsplasmid mit murinem Sonic Hedgehog (zur Verfügung gestellt von Prof. R. Toftgard, Karolinska Institute, Stockholm, Schweden)

#### 3.7.2 Primer

Die verwendeten Primer wurden mittels PRIMER-EXPRESS 2.0 Programm (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) designt oder nach den angegebenen Literaturangaben übernommen und von der Firma OPERON (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) hergestellt. Die Primer wurden wie von der Firma angegeben in ddH<sub>2</sub>O zu 100 µM gelöst. Für alle PCR-Reaktionen wurden jeweils 10 µM Primerlösungen verwendet.

Tabelle 1: Humane Primer zur reversen Transkription PCR

Gen	Primer fw 5` - 3`	Primer rev 5` - 3`	Prod.	Temp.
<i>Desmin</i>	AGTGGCCGAGCTCTACGAGG	TGGTCTCATACTGAGCCCGG	401	55 °C
<i>EWS-FLI1</i>	TCCTACAGCCAAGCTCCAAGTC	GCGCCTGGCCACCTCATCGG	Var.	62 °C
<i>GAPDH</i>	TGAAGGTCGGAGTCAACGGA	ATGGTTCACACCCATGACGA	401	58 °C
<i>MyoD1</i>	TTGCCCAAGGTGGAGATCC	TTTAAAGCGCTGTTGGGAGG	634	55 °C
<i>Myogenin</i>	CGGCCACACTGAGGGAGA	GGAGGCCCTGCTACAGAAG	501	55 °C
<i>PAX3-FKHR</i>	GCACTGTACACCAAAGCACG	AACTGTGATCCAGGGCTGTC	409	60 °C

Angegeben sind die jeweiligen Gene, die Sequenzen der „forward“ (fw) und „reverse“ (rev) Primer, sowie die Produktlänge (Prod.) in Basenpaaren (bp) und den Genen entsprechenden Annealingtemperaturen (Temp.). Die *EWS-FLI1* Primer wurden von (SMITH *et al.* 2008) und die *PAX3-FKHR* Primer von (GALILI *et al.* 1993) übernommen. Die Länge des Fusionstranskriptes *EWS-FLI1* ist abhängig von der jeweiligen Translokationsstelle und daher variabel (var.).

Tabelle 2: Humane Primer für quantitative *realtime* PCR

Gen	Primer fw 5` - 3`	Primer rev 5` - 3`	Prod.	Lkl.
<b>AKT1</b>	TTGCTTTCAGGGCTGCTCA	CAAAGAAGCGATGCTGCATG	91	Ex 12/13
<b>BAD</b>	GGAGGATGAGTGACGAGTTTGTG	GAGCTTTGCCGCATCTGC	91	Ex 3/4
<b>BAX</b>	CGGGTTGTCGCCCTTTT	AGCCCATGATGGTTCTGATCA	91	Ex 3/4
<b>BID</b>	AGACTGATGGCAACCGCAG	CTGGCAATATTCCGGATGATG	91	Ex 3/4
<b>BCL-XL</b>	GGGACAGCATATCAGAGCTTTGA	AGCGTTCCTGGCCCTTTC	91	Ex 2/3
<b>BCL2</b>	CGCCCTGTGGATGACTGAGTAC	CAAACAGAGGCCGCATGCT	113	Ex 2/3
<b>BIRC2</b>	GATGAAAAAAGAGAAGAGGAGAA GGA	AGAGAGCCATTCTGTTCTTCCG	91	Ex 6/7
<b>BIRC4 (XIAP)</b>	TCTAGTGAATGCTCAGAAAGACA GTATG	GCGCCTTAGCTGCTCTTCAG	91	Ex 6/7
<b>BIRC5 (Survivin)</b>	GGACAGAGAAAGAGCCAAGAACA A	CCAGCTGCTCGATGGCAC	134	Ex 3/4
<b>CCND1</b>	TCACACGCTTCCTCTCCAGA	AGGCTTGACTCCAGCAGGG	91	Ex 4/5
<b>CCND2</b>	AAGCTGTCTCTGATCCGCAAG	CGATCATCGACGGTGGGTAC	91	Ex 3/4
<b>FAS</b>	TGATGGCCAATTCTGCCATA	GGGCACGCAGTCTGGTTC	91	Ex 2/3
<b>FASLR</b>	CAGTCCACCCCCTGAAAAAA	GTCTTCCCATTCCAGAGGCA	91	Ex 3/4
<b>GLI1</b>	AGCTACATCAACTCCGGCCA	GCTGCGGCGTTCAAGAGA	115	Ex 11/12
<b>GLI2</b>	TTCTCCAACGCCTCGGAC	GCCTGGGATCTTGCAATGT	81	Ex 8/9
<b>GLI3</b>	TCAAAGCGGGAAGAATGCC	CTGACCACCAGGGCTTGG	81	Ex 12/13
<b>HHIP</b>	TGTACATCATTCTTGGTGATGGG	AGCCGTAGCACTGAGCCTGT	91	Ex 6/7
<b>IGF1</b>	TGGTGGATGCTCTTCAGTTCG	TGAGGCGCCCTCCGA	91	Ex 2/3
<b>IGF1R</b>	CGATGTGTGAGAAGACCACCA	CCACACGTGCTTGGGCA	91	Ex 2/3
<b>IGF2</b>	CCTCCGACCGTGCTTCC	GGTGGACTGCTTCCAGGTGT	81	Ex 3/4
<b>IRS2</b>	CGGTTGTCCTGGGAGCG	CCTCACGTCGATGGCGAT	91	Ex 1
<b>IHH</b>	GGCTTTGACTGGGTGTATTACGA	AGCAGCCGCCCGTCTT	91	Ex 2/3
<b>MDM2</b>	TAGCAGTGAATCTACAGGGACGC	AACTGAATCCTGATCCAACCAATC	91	Ex 8/9
<b>PTCH1</b>	TTGATTGTGGGTGGCACAGT	GCTTGGGAGTCATTAAGTGAAC	98	Ex 7/8
<b>PTEN</b>	ACCAGTGGCACTGTTGTTTCAC	TCACCTTAGCTGGCAGACCA	101	Ex 6/7
<b>TP53</b>	TGAATGAGGCCCTTGGAACTCAA	GGAGGTAGACTGACCCTTTTTGGA	141	Ex 10/11
<b>SHH</b>	CTGGGTGTACTACGAGTCCAAGG	CAGCCTCCCGATTTGGC	81	Ex 2/3
<b>SMO</b>	GGAGAGGAGCCATACTGCC	TCAACCAGCCACAGGTTGG	91	Ex 11/12
<b>TLR2</b>	TCCTGTGCCACCGTTTCC	GCTTTCCTGGGCTTCTTTT	82	Ex 1
<b>TLR4</b>	AGAGTTTCTGCAATGGATCAAG	TTATCTGAAGGTGTTGCACATTCC	82	Ex 3
<b>TBP</b>	GCCCGAAACGCCGAATAT	CCGTGGTTCGTGGCTCTCT	72	Ex 4/5

Tabelle 3: Murine Primer für quantitative *realtime* PCR

Gen	Primer fw 5` - 3`	Primer rev 5` - 3`	Prod.	Lkl.
<i>Gli1</i>	GAATCGGACCCACTCCAATG	GTGTTTGCGGAGCGAGCT	91	Ex 10/11
<i>Gli2</i>	GTCCTGAAGGATTCTGCTCG	CAGGACAGAACCATTGACTGGA	102	Ex 13/14
<i>Igf2</i>	CGGAGAGACTCTGTGCGGA	ACGGCTTGAAGGCCTGC	91	Ex 2/3
<i>Ptch1</i>	CTCCTGAAACCCAAAGCCAA	CGTCTCTCACTCGGGTGGTC	91	Ex 14/15
<i>Shh</i>	GGGAGCAGACCGGCTGAT	CAGCTTCACTCCAGGCCACT	91	Ex 1/ 2
<i>Tbp</i>	TCACTCCTGCCACACCAGC	TCAAGTTTACAGCCAAGATTCACG	91	Ex 3/ 4

Angegeben sind die jeweiligen Gene, die Sequenzen der „forward“ (fw) und „reverse“ (rev) Primer sowie die Produktlänge (Prod.) in Basenpaaren (bp) und die Lokalisation (Lkl.) der Primer in den entsprechenden Exons (Ex).

Beim Design der quantitativen *realtime*-Primer wurde darauf geachtet, dass die Annealingtemperatur für sämtliche verwendete humane und murine Primer konstant bei 55°C lag.

### 3.8 Enzyme

Accutase	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
MangoTaq™ DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Protease XXIV	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase H	Roche Diagnostics, Mannheim
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Hot Start <i>Taq</i> DNA - Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Biorad, München
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

### 3.9 Antikörper

#### 3.9.1 Primäre Antikörper

Alle verwendeten Primärantikörper von Cell Signaling Technology wurden 1:1.000 nach Angaben des Herstellers in PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20 (PBS/T) mit 5 % (v/v) BSA oder PBS/T mit 5 % (v/v) Magermilchpulver verdünnt, mit Ausnahme des  $\beta$ -Aktin Antikörpers, der 1:2.000 eingesetzt wurde. Die Antikörper gegen GLI-1 und HHIP von Santa Cruz Biotechnology wurden 1:200 in PBS/T / 5 % (v/v) Magermilchpulver verdünnt, die Antikörper COX4 und Cytochrome C wurden 1:500 bzw. 1:100 in PBS/T / 5 % (v/v) BSA nach Angaben

des Herstellers verdünnt eingesetzt. Die restlichen Antikörper gegen Ki-67, CD31 und Myogenin wurden für immunhistologische Färbungen 1:50 in 50 mM TRIS-Puffer (pH 6,0) / 5 % (v/v) BSA oder Antibody Dilution Reagent (Dako) verdünnt.

Monoklonal <i>mouse</i> $\alpha$ Caspase 3	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Monoklonal <i>mouse</i> $\alpha$ Caspase 8	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Monoclonal <i>mouse</i> $\alpha$ Ki-67	BD PharMingen, San Diego, CA, USA
Monoklonal <i>mouse</i> $\alpha$ <i>human</i> COX4	Clontech, Mountain View, CA, USA
Monoklonal <i>mouse</i> $\alpha$ <i>human</i> Myogenin	DakoCytomation, Hamburg
Polyklonal <i>rabbit</i> $\alpha$ <i>human</i> cytochrome C	Clontech, Mountain View, CA, USA
Polyklonal <i>rabbit</i> $\alpha$ <i>cleaved</i> Caspase 3	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Polyklonal <i>rabbit</i> $\alpha$ Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Polyklonal <i>rabbit</i> $\alpha$ Akt	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Polyklonal <i>rabbit</i> $\alpha$ PARP	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Polyklonal <i>rabbit</i> $\alpha$ $\beta$ -Aktin	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Polyklonal <i>rabbit</i> $\alpha$ HHIP (H-280)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Polyklonal <i>goat</i> $\alpha$ GLI-1 (C-18)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Monoklonal <i>rat</i> $\alpha$ - <i>mouse</i> CD31	Acris, Herford

### 3.9.2 Sekundäre Antikörper

Die HRP-gekoppelten Sekundärantikörper von DakoCytomation wurden 1:1.000 – 1:10.000 nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der für Immunfluoreszenz verwendete FITC-gekoppelte Antikörper wurde 1:320 und der TRITC-gekoppelte Antikörper 1:200 in PBS / 0,5 % (v/v) BSA verdünnt.

$\alpha$ <i>rabbit</i> IgG FITC	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\alpha$ <i>mouse</i> IgG TRITC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyklonal <i>goat</i> $\alpha$ <i>mouse</i> IgG / HPR	DakoCytomation, Hamburg
Polyklonal <i>goat</i> $\alpha$ <i>rabbit</i> IgG / HPR	DakoCytomation, Hamburg
Polyklonal <i>rabbit</i> $\alpha$ <i>goat</i> IgG / HPR	Biozol, Eching



## 4 Methoden

### 4.1 Prokaryotische Kulturen

#### 4.1.1 Lagerung von *E. coli*-Zellen

Damit kompetente *E. coli*-Zellen ihre Kompetenz nicht verlieren, DNA aufzunehmen, müssen sie bei -80 °C gelagert werden. Nach erfolgreicher Transformation und nach Anlegen einer Übernachtskultur in LB-Medium kann man von den Zellen einen Bakterienstock anlegen. Hierfür wird ein Aliquot der *E. coli*-Übernachtskultur in einem Verhältnis von 1:1 (v/v) mit 85 % (v/v) Glycerol als Gefrierschutz versetzt und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### 4.1.2 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Bei der chemischen Transformation wurden pro Ansatz 25 µl kompetente *E. coli* DH5α Zellen auf Eis aufgetaut, vorsichtig 10 - 50 ng Plasmid-DNA zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA wurden die *E. coli*-Zellen für 45 sec einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C ausgesetzt und für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde pro Ansatz 200 - 500 µl LB-Medium zugegeben und 1 - 2 h bei 37 °C im Heizblock bei 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl der Bakterienkultur auf einer LB-Selektionsagarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 4.2 Eukaryotische Zellkulturen

#### 4.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Als Kulturgefäße dienten Zellkulturflaschen und Platten entsprechender Größe. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zelllinien entsprechend Tabelle 4 mit den angegebenen Medien und Methoden kultiviert.

#### **Primärzellen:**

Humane Fibroblasten wurden aus einer Hautbiopsie eines gesunden Spenders gewonnen und in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die T246-Zellen wurden aus einem humanen epitheloiden Sarkom gewonnen und in RPMI-Medium mit 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Beide Primärzellkulturen wurden 1x wöchentlich mit Trypsin-EDTA passagiert.

### **Etablierte Zelllinien:**

Alle verwendeten permanente Zelllinien wurden nach folgenden, tabellarisch aufgeführten Bedingungen kultiviert.

Tabelle 4: Zelllinien und deren Kultivierung

<b>Zelltyp</b>	<b>Medium</b>	<b>Splittverhältnis</b>	<b>Methode</b>
<b>A673</b>	DMEM +10%FBS +1% PS	1:10, 2-3x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>HepG2</b>	RPMI +10%FBS +1% PS	1:5, 2x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>HepT1</b>	RPMI +10%FBS +1% PS	1:10, 2-3x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>HepT3</b>	RPMI +10%FBS +1% PS	1:2, 1x wöchentlich	Abschaben und verdünnen
<b>HUH6</b>	RPMI +10%FBS +1% PS	1:5, 2x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>MB627</b>	DMEM +10%FBS +1% PS	1:10, 2-3x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>MB723</b>	DMEM +10%FBS +1% PS	1:10, 2-3x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>MB794</b>	DMEM +10%FBS +1% PS	1:10, 2-3x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>NB11</b>	RPMI +10%FBS +1% PS	1:5, 2x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>NIH-3T3</b>	DMEM +10%FBS +1% PS	1:10, 2-3x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>RD</b>	DMEM +10%FBS +1% PS	1:5, 2x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>RH1</b>	RPMI +10%FBS +1% PS	1:10, 2-3x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>RH30</b>	RPMI +10%FBS +1% PS	1:5, 2x wöchentlich	Trypsin-EDTA
<b>RMS13</b>	RPMI +10%FBS +1% PS	1:5, 2x wöchentlich	Trypsin-EDTA

#### **4.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien**

Die Zellen wurden wie beim Passagieren (4.2.1.) mit Trypsin-EDTA abgelöst und die Reaktion mit Medium/FBS abgestoppt. Anschließend wurde die gesamte Zellsuspension bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert und in Einfriermedium ( $\sim 1 \times 10^7$  Zellen/ml) resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen für 24 h bei  $-80$  °C gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryokulturen in 37 °C warmes Medium mit 10 % (v/v) FBS 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt.

#### **4.3 Proliferationsassay**

Zell-Vitalitätstests wurden mittels *Cell Proliferation Kit I (MTT)* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass lebende Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem violetten Formazanfarbstoff metabolisieren. Die metabolische Aktivität der Zellen korreliert dann mit der Intensität der Färbung. Für den Assay wurden  $5 \times 10^3$  Zellen/100  $\mu$ l in einer 96-well Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Wirkstoffe behandelt und die Vitalität der Zellen über

einen Zeitraum von 0 – 72 h gemessen. Hierzu wurden je 10 µl *MTT labeling reagent* zu den Zellen gegeben und die Reaktion 4 h nach Zugabe des MTT-Reagenz mit 100 µl *Solubilization solution* gestoppt. 24 h nach Zugabe der Agenzien wurde die Absorption durch eine photometrische Messung bei 595 nm im *Tecan GENios Microplatereader* gemessen.

#### 4.4 Cellscreen Assay

Um das Wachstumsverhalten der Zellen nach Behandlung mit einem Wirkstoff zu testen, kann zudem ein „*Cellscreen assay*“ durchgeführt werden. Dabei wird die Zunahme der Zellkonfluenz nach Behandlung optisch über die Zeit erfasst. Für den Assay wurden  $5 \times 10^3$  Zellen/100µl in einer 96-well-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit verschiedenen Konzentrationen des zu testenden Wirkstoffes behandelt. Das Wachstum der Zellen wurde über einen Zeitraum von 0 - 72 h mittels Cellscreen Olympus IX50 dokumentiert und mit der zugehörigen CS-Software ausgewertet.

#### 4.5 Klonogener Assay

Mit einem klonogenen Assay werden adhärente Zellen auf ihr Langzeitüberleben untersucht. Dafür wurden  $5 \times 10^3$  Zellen/6-well Platte ausgesät und nach 24 h für weitere 48 h mit verschiedenen Konzentrationen des zu untersuchenden Wirkstoffs kultiviert. Nach 8 – 10 d wurden die gewachsenen Zellkolonien zunächst mit PBS gewaschen, 2 x 5 min in Methanol fixiert und dann getrocknet. Anschließend wurden die Kolonien 5 min mit Kristallviolettlösung gefärbt, danach ausgiebig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. Die gefärbten Kolonien wurden für die Dokumentation mittels GelJet Imager Version 2004 fotografiert und ausgezählt.

#### 4.6 Luciferase Assay

Reportergenassays stellen eine sehr sensitive Methode zur quantitativen Messung der Aktivierung von Genen oder deren Expression dar. Neben dem Reportergen lacZ, das für die β-Galactosidase kodiert, und Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), die in bakteriellen Systemen verwendet werden, wird in eukaryotischen Zellsystemen hauptsächlich das *Green fluorescent protein* (GFP) oder das Luciferase-System benutzt. Dabei wird zunächst ein geeigneter Promotor mit dem Reporter-Gen, z. B. Luciferase, gekoppelt. Bei Aktivierung des Promoters wird dann das Luciferase-Gen exprimiert und in einer Adenosintriphosphat katalysierten Reaktion Luciferin zu Oxyluciferin metabolisiert. Die dabei entstehende

Lichtemission kann bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden. Zur Normalisierung dient ein zweites, „non-reporter“ Plasmid, welches beispielsweise eine zweite Luciferase trägt. Für den hier durchgeführten Reporterassay wurden  $5 \times 10^4$  Zellen/12-well ausgesät und am darauffolgenden Tag mit den Reporterplasmiden (*Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle einer Gli-Bindestelle zur Expressionsmessung und *Renilla*-Luciferase zum Normalisieren und zur internen Transfektionskontrolle) mit dem Transfektionsreagenz *FuGENE 6* transfiziert (siehe 4.8.6.). Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte 24 - 48 h später mit dem *Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Assay System* nach Angaben des Herstellers. Damit alle Zellen, auch apoptotische Zellen, analysiert werden konnten, wurde von den transfizierten und behandelten Zellen das Medium entfernt und dieser Überstand dann 5 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Die Zellen des Überstands wurden in 100 µl Kulturmedium resuspendiert und zu den Zellen in der Zellkulturplatte gegeben. Durch Zugabe von 100 µl *Dual-Glo<sup>TM</sup> Luciferase Reagent* wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden 180 µl der Zellsuspension in eine weiße 96-well Platte überführt, für mindestens 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert und danach mit dem Tecan *GENios Microplatereader* die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase bestimmt. Durch Zugabe von 90 µl *Dual-Glo<sup>TM</sup> Stop & Glo<sup>®</sup> Reagent* wurde die *Firefly*-Luciferase Aktivität gestoppt und die *Renilla*-Luciferase Aktivität angeregt. Diese Lumineszenz wurde nach weiteren 10 min Inkubation bei RT ebenfalls mit dem *GENios Microplatereader* gemessen.

#### **4.7 Mitochondrienisolierung**

Zur Isolierung von Mitochondrien wurde der *ApoAlert<sup>TM</sup> Cell Fractionation Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieser Kit ermöglicht es, die mitochondrielle und die cytosolische Fraktion zu trennen. Zur Trennung der Fraktionen wurden zunächst  $2 \times 10^6$  Zellen in mittleren Zellkulturflaschen ausgesät und nach Anheften der Zellen über einen Zeitraum von 0 – 24 h mit dem Wirkstoff Betulinsäure behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet und für 5 min bei 1.500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem Waschpuffer (Clontech) gewaschen, die Zellen danach in 800 µl kaltem *Fractionation Puffer* mit Proteaseinhibitorcocktail und DTT (Clontech) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Homogenisierung der Zellen mittels 26G Kanüle auf Eis wurden die Zellfragmente für 10 min bei 2.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 25 min bei 13.000 rpm und 4 °C, wobei die mitochondrielle Fraktion von der cytosolischen Fraktion getrennt wurde. Die Detektion von Cytochrom C erfolgte im Anschluss mittels Westernblot (siehe 4.11.1).

## 4.8 DNA-Methoden

### 4.8.1 DNA-Isolierung

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus Gewebe oder aus Zelllinien wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dafür wurde ein Gewebestück (~0,5 cm<sup>3</sup>) oder die Zellen über Nacht in 0,5 - 1 ml STE-Puffer zusammen mit 50 µl Proteinase K (0,5 mg/ml) bei 55 °C verdaut. Anschließend wurde 1 Vol. Phenol zugegeben, der Ansatz 5 min per Hand gemischt, für 10 min bei 8.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurde 1 Vol. Chloroform zugegeben, der Ansatz erneut für 5 min per Hand gemischt und für 10 min bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die extrahierte DNA wurde mit 2,5 Vol. 100% Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde je nach Größe des DNA-Pellets in 50 - 100 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien wurde eine einfache Isopropanolfällung durchgeführt. Dafür wurde ein Schwanzstück ebenfalls in 500 µl STE-Puffer und 50 µl Proteinase K über Nacht bei 55 °C verdaut. Danach wurden die verbliebenen Gewebestücke bei 12.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit 1 Vol. Isopropanol versetzt. Die Ansätze wurden 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol wurden die Pellets luftgetrocknet, in entsprechender Menge dH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C gelagert.

### 4.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Im präparativen Maßstab erfolgte die DNA-Extraktion mittels *Plasmid Midi Kit* aus 100 ml Übernachtskulturen nach Angaben des Herstellers. Dafür wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur (LB-Medium mit Selektionsantibiotikum) mit einer isolierten Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft und für 4 - 8 h bei 37 °C im Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur in 100 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt und weiter über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler bei 200 rpm kultiviert. Zur Plasmid-DNA Isolierung wurden die Kulturen nach 12 - 16 h bei 4 °C für 15 min bei 5.000 rpm (Rotor: JA-25.50, Fuge: J2-21, Beckman Coulter, Krefeld) zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Pellet in 4 ml kaltem P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml P2-Lysispuffer und vorsichtigem Mischen durch Invertieren wurden die Ansätze für 5 min bei RT inkubiert. Die Lysereaktion wurde mit 4 ml P3-Puffer für 20 min auf Eis neutralisiert und anschließend für 30 min bei 15.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Damit alle Präzipitate entfernt werden konnten wurde der Überstand nach der Zentrifugation filtriert, auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip 100 Säule geladen und 2x mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml QF-Puffer. Nach Präzipitation der DNA durch Zugabe von 3,5 ml raumtemperiertem Isopropanol wurde die DNA für 30 min bei 15.000 rpm

und 4 °C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen (10 min, 15.000 rpm, 4 °C) und für 10 – 15 min luftgetrocknet. Die DNA wurde je nach Größe des DNA-Pellets in 100 – 200 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

#### 4.8.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde mit dem *BioPhotometer* bestimmt. Da DNA bei 260 nm ein Absorptionsmaximum besitzt, kann mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Nukleinsäurekonzentration errechnet werden. Mit einer zusätzlichen Messung bei 280 nm kann man eine Aussage über Protein- oder Phenolverunreinigungen treffen. Der Quotient  $A^{260}/A^{280}$  sollte für DNA in dH<sub>2</sub>O bei 1,6 liegen.

Lambert-Beersches Gesetz:  $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$

$E_{\lambda}$ : Extinktion  
 $\epsilon_{\lambda}$ : Extinktionskoeffizient  
c: Konzentration  
d: Schichtdicke

#### 4.8.4 Fällung von DNA

Zu der DNA-Lösung wurden 2 Vol. 100 % Ethanol und 1/10 Vol. 5 M NH<sub>4</sub>Ac gegeben und für mindestens 1 h bei –20 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA bei 13.000 rpm, 30 min und 4 °C pelletiert, der Überstand verworfen, das DNA-Pellet luftgetrocknet und in entsprechender Menge TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration der gefällten DNA wurde photometrisch bestimmt und die DNA bei -20 °C gelagert.

#### 4.8.5 Analytische Gelelektrophorese

DNA-Produkte wurden der Größe nach in einem 1 – 2 %igen Agarosegel mit 0,25 µg/ml Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit *6x Loading Dye Solution* versetzt und die Auftrennung erfolgte in einer TBE-Puffer gefüllten *Mini<sup>®</sup>-Sub Cell GT* Apparatur und der dazugehörigen Spannungsquelle *PowerPac Basic<sup>TM</sup>* bei ~90 V für ca. 30 min. Nach der Elektrophorese wurden die Banden mittels des UV-Transilluminator *GelJet Imager* detektiert. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente und zur Größenordnung wurden jeweils 5 µl DNA-Längenstandard *Gene Ruler<sup>TM</sup> 100bp DNA Ladder* (0,1 µg/µl) oder *Gene Ruler<sup>TM</sup> 1kb DNA Ladder* (0,5 µg/µl) verwendet.

#### 4.8.6 DNA-Transfektion

Am Vortag der Transfektion wurden je  $5 \times 10^4$  Zellen/*well* in einer 12 *well*-Platte ausgesät, um bei Durchführung der Transfektion eine Konfluenz von 60 – 75 % zu erhalten.

### **Lipofektion**

Die meisten verwendeten eukaryotischen Zellen wurden mit dem liposomalen Transfektionsreagenz *FuGENE 6* nach Angaben des Herstellers transfiziert. Das Transfektionsreagenz wurde dabei im Verhältnis 3:1 gegenüber der Menge an Plasmid-DNA eingesetzt. Es wurden pro Ansatz in einem 12-well je 1,5 µl *FuGENE 6* in 50 µl serumfreien Medium für 5 min bei RT vorinkubiert, dann mit je 450 ng Reporterplasmid oder Leervektor und 100 ng Referenzplasmid pRL-TK für weitere 30 – 45 min bei RT inkubiert, und der Ansatz anschließend vorsichtig auf die Zellen pipettiert. 24 h nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel (ja nach Fragestellung mit 0,5 % oder 10 % FBS) oder eine Behandlung der Zellen mit den zu testenden Wirkstoffen in Vollmedium für weitere 24 - 72 h. Zur Auswertung der Transfektion wurde im Anschluss ein Luciferase Assay durchgeführt (siehe 4.6). Als Transfektionskontrolle wurde ein Luciferase-Kontrollplasmid oder pEGFP transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde dann entsprechend entweder durch die Messung der Luciferase-Aktivität oder das Auszählen GFP-positiver Zellen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

### **Magnetofektion**

Ließen sich Zellen mittels *FuGENE 6* nicht oder nur sehr schlecht transfizieren, wurde die Methode der Magnetofektion gewählt. Dabei wird die DNA an Magnetkügelchen gebunden und durch Anlegen eines magnetischen Feldes in die Zellen transferiert. Dafür wurde pro 12-well je 1 µl PolyMAG-Kügelchen in 9 µl PBS gegeben sowie je 900 ng Reporterplasmid oder Leervektor und 100 ng Referenzplasmid pRL-TK in 9 µl PBS. Die Ansätze wurden gemischt und für 30 – 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen gegeben, für 30 min im Brutschrank auf einer Magnetplatte inkubiert und nach 4 h das Medium gewechselt. Die Zellen wurden wie bei der Lipofektion im Anschluss mit den Wirkstoffen behandelt und mittels Luciferase Assay analysiert. Zur Transfektionskontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit einem Luciferase-Kontrollplasmid oder pEGFP transfiziert.

## **4.9 RNA-Methoden**

### **4.9.1 Isolierung von RNA**

Für die Gewinnung von RNA aus Gewebe wurde ein Gewebestück (~0,2 g) in *Tri Reagent* überführt und mit einem Homogenisator *Micra* homogenisiert. Bei der Isolierung von RNA aus Zelllinien wurde das *Tri-Reagent* direkt auf die Zellen gegeben. Dem Lysat wurden 0,4 Vol. Chloroform hinzugefügt und die Proben 15 sec gevortext. Nach 3 minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Phasentrennung für 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C. Die obere klare Phase, welche die RNA enthält, wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt und mit 1 Vol.

Isopropanol gemischt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei RT inkubiert und 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) kaltem Ethanol gewaschen und nach dem Lufttrocknen je nach RNA-Menge in 25-100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

#### 4.9.2 DNase-Verdau von RNA

Um die isolierte RNA von Ionen, Proteinen und DNA-Verunreinigungen zu befreien, wurde eine Aufreinigung der Proben mit dem *RNeasy Mini Kit* in Kombination mit einem DNase-Verdau mittels *RNase-Free DNase Set* durchgeführt. Die Bindung der RNA an eine Silicium-Gel Membran wurde nach Angaben des Herstellers mit dem *RNeasy Mini Kit* durchgeführt. Nach einem Waschschrift wurde der DNase-Verdau direkt auf der Säule durchgeführt. Dafür wurden 10 µl der DNase I Stammlösung aus dem *RNase-Free DNase Set* mit 70 µl RDD Puffer vorsichtig gemischt, auf die Säule gegeben und für 15 min inkubiert. Nach mehreren Waschschriften wurde die RNA mit RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O eluiert, photometrisch vermessen und bei -80 °C gelagert.

#### 4.9.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration von RNA wurde mit dem *BioPhotometer* bestimmt. RNA besitzt wie DNA bei 260 nm ein Absorptionsmaximum und die Konzentration wird auch hier mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes errechnet. Der Quotient  $A^{260}/A^{280}$  sollte für RNA in dH<sub>2</sub>O bei 1,8 liegen.

#### 4.9.4 cDNA-Synthese

Für anschließende Expressionsanalysen wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 2 µg DNase-verdaute, aufgereinigte total-RNA eingesetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 7 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 µl Random-Hexameren (20 ng/µl) wurde der Ansatz für 10 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 4 µl 5x *First Strand Buffer*, 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl dNTPs (10 mM) zugegeben und für 10 min bei 25 °C inkubiert. Nach Inkubation der Reaktion für 2 min bei 42 °C wurde die Synthese der cDNA durch Zugabe von 1 µl (200 U) *SuperScript™ II Reverse Transkriptase* gestartet. Die Synthesephase wurde nach 60 min bei 42 °C durch Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C gestoppt. Für den folgenden RNase-Verdau wurde 1 µl (1U) *RNase H* hinzugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 20 ng/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert.



#### 4.9.5 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt, der dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt (<http://www.nobelpreis.org/chemie.html>, (SHAMPO and KYLE 2002)). Sie dient der gezielten Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente.

Zum Nachweis der Expression bestimmter Gene wurde als Template cDNA verwendet, die zuvor mittels reverser Transkription aus RNA transkribiert wurde. Pro PCR-Ansatz wurden in einem Volumen von 20 µl je 40 ng cDNA, 500 nM Primer (Tab. 1), 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x *Hot Start PCR Puffer* und 1U/µl *Hot Start Taq DNA - Polymerase* eingesetzt. Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet.

<i>PCR-Programm:</i>	Initiale Denaturierung	5 min bei 95 °C	} 32 - 38 Zyklen
	Denaturierung	30 sec bei 95 °C	
	Annealing	30 sec bei X °C	
	Extension	45 - 60 sec bei 72 °C	
	Finale Extension	10 min 72°C	
	Hold	4° C	

Die Zeit der einzelnen Phasen war dabei abhängig von der Größe der zu amplifizierenden Fragmente und die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Primern (Tab. 1) bestimmt. Die Zyklenanzahl betrug für *GAPDH*, *PAX3-FKHR* und *EWS-FLI1* 35, *Desmin*, *Myogenin* und *MyoD1* 38. Für die PCRs wurde der *Mastercycler personal* verwendet. Nach der PCR wurden die Proben mit *6x Loading Dye Solution* versehen und je nach Größe des Amplifikates auf ein 1 - 2 % analytisches Agarosegel aufgetragen.

#### 4.9.6 Quantitative RT-PCR (Q-PCR)

Zur Quantifizierung der genspezifischen Expression wurde eine quantitative realtime PCR (Q-PCR) durchgeführt. Das Prinzip der Q-PCR beruht darauf, dass sich ein Fluoreszenzfarbstoff, z. B. SYBR Green, in das entstehende Produkt einlagert und die Fluoreszenz im Laufe der PCR-Zyklen proportional zur Produktmenge zunimmt. Zur Quantifizierung der Produktmengen wurde in der exponentiellen Phase der Amplifikation ein konstanter Schwellenwert festgelegt, wodurch man für alle Reaktionen vergleichbare *ct*-Werte (*Threshold-Cycle*) erhielt. Für jede Probe wurde immer das *Housekeeping Gen TBP* (*TATA-Box Binding Protein*) mitbestimmt und die zu untersuchenden Kandidatengene auf *TBP* normiert. Um die Expression der Proben mit Kontrollzellen oder Normalgewebe vergleichen zu können, wurde wie von Pfaffl und Kollegen beschrieben, die relative Expression aus  $\Delta Ct \text{ Probe} / \Delta Ct \text{ Kontrolle}$  berechnet (PFAFFL 2001). Alle Ansätze wurden stets in Dubletten durchgeführt und aus den *ct*-Werten die Mittelwerte,

Standardabweichungen und die Signifikanz bestimmt. Pro PCR-Ansatz wurden in einem Volumen von 20 µl je 40 ng cDNA, 500 nM „forward“ und „reverse“ Primer (Tab. 2+3) und 2x *iTaq SYBR Green Supermix with ROX* in folgendem PCR-Programm eingesetzt.

<i>PCR-Programm:</i>	Initiale Denaturierung	2 min bei 95 °C	} 40 Zyklen
	Denaturierung	15 sec bei 95 °C	
	Annealing	15 sec bei 55 °C	
	Extention	20 sec bei 68 °C	
	Schmelzkurve	15 sec bei 60 °C	
		20 min von 60 °C – 95 °C	
		15 sec bei 95 °C	
	Hold	4° C	

Die Quantifizierung der Reaktionskurven erfolgte mittels *Mastercycler ep gradient S* und der dazugehörigen *realplex* Software. Um die Spezifität der Primer zu beurteilen, wurde für jeden Ansatz stets eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Effektivität und die Reinheit der Produkte wurde bei Bedarf mittels eines 2 %igen analytischen Agarosegels überprüft.

## 4.10 Proteinbiochemische Methoden

### 4.10.1 Proteinisolierung

Für die Gewinnung von Protein aus Gewebe wurde ein Gewebestück (~0,2 g) in 1 ml Lysepuffer überführt und mit einem Homogenisator *Micra* homogenisiert. Zur Proteinisolierung aus Zellen wurden diese zunächst abgeschabt, in PBS gewaschen, das Zellpellet je nach Größe in einer adäquaten Menge Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate, sowohl aus Gewebe als auch aus Zellen, 30 min bei 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der die lysierten Proteine enthaltende Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinproben wurden bei –20 °C und zur längeren Konservierung bei -80 °C gelagert.

### 4.10.2 Proteinmengenbestimmung

Zur Proteinmengenbestimmung wurde ein BIO-RAD Protein Assay in 96 *well*-Platten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden je 5 µl der Proteinprobe bzw. 5 µl BSA-Standardlösung (200-1200 µg/ml) mit 200 µl einer 1:5 (v/v) verdünnten Bradfordlösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT erfolgte die Detektion mittels photometrischer Messung bei 595 nm. Anhand der Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen der zu analysierenden Proben errechnet.

### 4.10.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 5 x SDS Probenpuffer versetzt und bei 99 °C 10 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und auf SDS-TRIS-Glycin-Gele geladen. Die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach dem Lämmli-System erfolgte bei 125 V, 30 mA für 1,5-2 h in TRIS-Glycin-Laufpuffer.

## 4.11 Immunologische Nachweismethoden

### 4.11.1 Westernblot

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem SDS-Gel bei 25 V und 100 mA für 1 - 2 h auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Membran wurde 3 x für 10 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und anschließend, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde zuerst eine Inkubation mit dem Primäantikörper für 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen und dann mit einem HRP (Meerrettichperoxidase)-gekoppelten Sekundäantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte über die HRP-vermittelte Chemilumineszenz mittels ECL Plus *Detection Reagent* und Entwicklermaschine CP1000. Als Standards wurden der Page Ruler™ Prestained Protein Ladder oder See Blue Plus2 Pre-stained standard verwendet.

### 4.11.2 Immunfluoreszenzen

2 x 10<sup>4</sup> Zellen wurden auf Lab-Tek II Chamber Slides ausgesät und nach 24 h mit den zu testenden Wirkstoffen behandelt. Nach weiteren 24 – 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit je 100 µl 4 % (w/v) Paraformaldehyd für 15 min bei RT auf den Objektträgern fixiert. Die Zellen wurden erneut 3 x mit PBS gewaschen und für 5 min bei RT mit 0,1% Triton-X 100 (v/v) in PBS permeabilisiert. Danach wurden die Ansätze mit PBS + 0,05 % Tween 20 (v/v) gewaschen und für 1 h bei RT in 1 % FCS + 0,05 % Tween 20 (v/v) in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primäantikörper in PBS + 0,1 % Tween 20 (v/v) bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundäantikörper in PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20 im Dunkeln für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C. Nach erneutem Waschen der Objektträger wurden die gefärbten Ansätze mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI eingedeckelt und die Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 ausgewertet. Die Datenverarbeitung wurde mit dem Programm AxioVision Release 4.5 durchgeführt.

### 4.11.3 Immunhistochemie

Tumorgewebe wurde für 1 – 3 d in 4 % neutral-gepufferter Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Hierfür wurden die Proben mittels einer aufsteigender Alkoholreihe entwässert (jeweils 2 x 30 min: 50 % EtOH, 70 % EtOH, 96 % EtOH und 100 % EtOH) und anschließend für 15 min in Xylol fixiert. Nach jeweils zwei Waschschritten in Xylol, Xylol:Paraffin (1:1, v/v) und Paraffin wurden die Gewebe in Einbettungsschälchen in Histowachs eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden nach dem Erstarren der Paraffinblöcke von den Proben 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert, mittels abfallender Alkoholreihe rehydriert und zur histopathologischen Auswertung mit Hämatoxylin & Eosin (HE) oder Gomori's Trichrom gefärbt. Bei der HE-Färbung werden dabei mittels Hämalaun (H) alle sauren beziehungsweise basophilen Strukturen, wie Zellkerne und darin enthaltene DNA, blau gefärbt, während man mit Eosin (E) vor allem basische beziehungsweise acidophile Strukturen, wie Zellplasmaproteine, rot färbt. Bei der Trichromfärbung nach Gomori wird vor allem Muskelgewebe gefärbt, wobei Kerne mittels Weigerts Eisenhämatoxylin blauschwarz, Cytoplasma und Muskulatur mittels Bouinsche Lösung rot und Bindegewebe mittels Trichromlösung grün beziehungsweise blau sichtbar werden. Zur Antigen-Demaskierung für die immunhistochemische Färbung wurden die Proben zuerst in Citratpuffer für 3 x 5 min in der Mikrowelle bei 600 Watt behandelt oder für 15 min bei 37 °C mit Protease XXIV (0,1 mg/ml) verdaut. Um endogene Peroxidaseaktivität zu unterbinden, wurden die Präparate für 10 min mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung (Peroxidase Block) blockiert und gründlich mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte für 2 h die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern, um Apoptose (polyclonal *rabbit* α Cleaved Caspase 3), Zell-Proliferation (monoclonal *mouse* α Ki-67), oder die Gefäßdichte (*rat* α-*mouse* CD31) zu messen. Nach dreimaligem Waschen der Proben erfolgte die Signaldetektion mittels Envision™-Peroxidase System nach Angaben des Herstellers, wobei Diaminobenzidin als Chromogen verwendet wurde. Die Gewebe wurden im Anschluss mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Glycergel eingedeckelt. Die Auswertung der Färbungen erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 CFL und einer PowerShot G6 Kamera bei 400 x Vergrößerung. Die Färbungen zur Zell-Proliferation und der Bestimmung der Gefäßdichte wurden in Kooperation mit PD Dr. Bernhard Hemmerlein (Institut für Pathologie, Krefeld) durchgeführt.

## 4.12 Apoptose Assays

### 4.12.1 Annexin V Färbung

Zu Beginn der Apoptose kommt es zu einer Translokation des Phosphatidylserins von der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran zur Zelloberfläche. Da Annexin V eine starke  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Affinität zu Phosphatidylserin hat, kann es zur Detektion früher

Apoptosestadien herangezogen werden. Für die Annexin V basierte Analyse der Apoptose wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/6-well ausgesät. Nach Anwachsen der Zellen wurden sie für 24 – 48 h mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffs behandelt, trypsiniert, in PBS gewaschen und in 500 µl Bindepuffer resuspendiert. Dazu wurden 2,5 µl (5 µM) des Lebendfarbstoffes Calcein gegeben und die Zellen für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde 5 µl Cy5-konjugiertes Annexin V (1:100, v/v) für weitere 10 min zu den Zellen gegeben. Die gefärbten Zellen wurden für 5 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert und je nach Pelletgröße in 15 – 40 µl Agilent Zellpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf einen Chip aufgetragen und frühe apoptotische Zellen (Annexin V und Calcein positive Zellen) mittels 2100 Bioanalyzer detektiert.

#### **4.12.2 Indirekte Apoptosemessung mittels Propidiumjodid**

Eine weitere Methode zur Apoptosebestimmung ist die indirekte Apoptosemessung nach Nicoletti (NICOLETTI *et al.* 1991). Dieses Prinzip nutzt die Tatsache, dass während der Apoptose die DNA von Endonukleasen in Fragmente bestimmter Größe geschnitten wird. Mittels eines hypotonischen, tensidhaltigen Nicoletti-Puffers werden die Zellmembranen lysiert und die genomische DNA des Zellkerns kann mit dem in die DNA interkalierenden, rot fluoreszierenden Farbstoff Propidiumjodid angefärbt werden. Mittels einer durchflußzytometrischen Messung am FACScan erhält man dann ein charakteristisches Histogramm, das die unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus widerspiegelt. Nach Induktion von Apoptose nimmt der sogenannte sub- $G_1$  Peak im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu, wodurch man indirekt an der Abnahme der Normalzellpopulation die Zunahme an apoptotischen Zellen messen kann. Zur Analyse der Apoptose nach Nicoletti wurden  $5-10 \times 10^4$  Zellen/24-well ausgesät und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden sie für 0 – 72 h mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt, trypsinisiert, in PBS gewaschen und in 300 µl Nicoletti-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15µl Propidiumjodid (1:20, v/v einer 1 mg/ml Stocklösung) wurden die apoptotischen Zellen mittels FACScan analysiert.

#### **4.12.3 Mitochondrienmembranpotentialmessung**

Beim intrinsischen Apoptosesignalweg kommt es zu einer Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials. Dihexaoxacarbocyaninjodid DiOC<sub>6</sub>(3), ein positiv geladenes, planares und lipophiles Molekül mit grüner Fluoreszenz, kann auf Grund der negativ geladenen Membranen durch die Plasmamembran diffundieren und akkumuliert in niedrigen Konzentrationen in den Mitochondrien, wodurch lebende und intakte Zellen von apoptotischen unterschieden werden können. Veränderungen im mitochondrialen Membranpotential können so als Verschiebung des Fluoreszenz-1-Peaks durchflußzytometrisch gemessen werden. Für die Messung dieses mitochondrialen

Membranpotentials wurden  $5-10 \times 10^4$  Zellen/24-well ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen für 0 – 18 h mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffs behandelt. Zur Analyse wurden etwa  $5 \times 10^5$  Zellen trypsiniert, mit PBS gewaschen und in 100 µl 40 nM DiOC<sub>6</sub>(3) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37 °C wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend im Durchflusscytometer FACScan analysiert.

#### 4.13 Xenograft Mausmodell

Um Wirkstoffe zur Therapie von Krebserkrankungen näher am Menschen als in *in vitro* Zellkulturexperimenten austesten zu können, werden präklinische Studien oft an Modellorganismen wie der Nacktmaus durchgeführt. Bei einer Nacktmaus handelt es sich um eine genetisch veränderte Maus, bei der es aufgrund einer Mutation im *FOXP1* Gen zum Fehlen des Thymus kommt (MECKLENBURG *et al.* 2005). Zudem hat eine athymische Maus weitere phänotypische Veränderungen, wie unterentwickelte Brustdrüsen der Weibchen und vor allem fehlende Körperbehaarung, was letztendlich zur Namensgebung beigetragen hat. Durch das Fehlen des Thymus, der für die Reifung der T-Lymphozyten verantwortlich ist, besitzt die Nacktmaus, trotz ausgereifter B-Lymphozyten, ein stark eingeschränktes Immunsystem, wodurch sie aufgrund der verringerten Abstoßungsreaktion des Fremdgewebes zu einem idealen Wirt für xenogene Transplantationen (sogenannte *Xenografts*) wird. Für die hier durchgeführten Xenograft-Experimente wurden 6 – 8 Wochen alte, weibliche NMRI Nacktmäuse von Charles River erworben und in einem HEPA-gefilterten UNI-Protect Luftstromschrank gehalten. Nach einer Adaptationsphase der Mäuse von mindestens 1 Woche an die neuen Laborbedingungen wurden die Nacktmäuse mittels eines Isofluran-Sauerstoffgemisches (0,8 - 2 %) narkotisiert und jeder Maus 100 µl einer RMS-13 Zellsuspension in PBS, ca.  $2 \times 10^7$  Zellen, in die Flanke des rechten Oberschenkels subkutan mit einer G24-Kanüle injiziert. Bereits nach etwa 1 Woche wurden erste Tumore erkennbar. Die Mäuse wurden 10 Tage nach Injektion in zwei Gruppen von je fünf Mäusen aufgeteilt und zu diesem Zeitpunkt wurde mit der Behandlung begonnen. Dabei wurde eine Gruppe mit Lösungsmittel und die andere Gruppe mit einer Dosis von 20 mg BA/kg Körpergewicht/d mittels G26-Kanüle jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von insgesamt 16 Tagen intraperitoneal behandelt. Die Tumorgöße wurde jeden Tag mittels Schieblehre gemessen und das Volumen mittels folgender Formel kalkuliert:  $(X/2) \cdot (Y/2) \cdot (Z/2) \cdot (4/3 \cdot 3.1415)$ . Das Körpergewicht der Mäuse wurde jeden Tag bestimmt und dokumentiert, ebenso wie das Verhalten der Mäuse (Wasser- und Futteraufnahme, Aktivität und klinische Symptome). Zu Versuchsende wurden die Mäuse euthanasiert und die Tumore entnommen. Dabei wurde ein Teil des Tumors in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und ein Teil zur Einbettung in Paraffin für 1 – 3 d in 4 % neutral-gepuffertem Formalin fixiert. Die Tumore wurden im Anschluss molekularbiologisch und immunhistologisch analysiert.

#### 4.14 Statistische Analysen

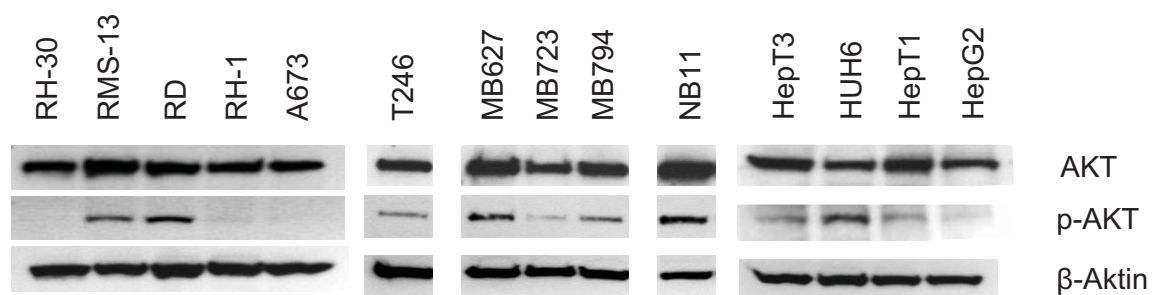
Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's unpaired *t*-test. Ein Wert von  $P < 0,05$  wurde als signifikant eingestuft, Werte  $< 0,01$  als hochsignifikant.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 AKT-Aktivierung in embryonalen Tumorzelllinien

Es ist bekannt, dass in vielen Tumoren eine Überexpression von IGF2 zu beobachten ist (GRAY *et al.* 2000; MORISON and REEVE 1998; PACHER *et al.* 2007; POLLAK 2004). IGF2 bindet an den IGF1-Rezeptor und beeinflusst das Tumorstadium durch die Aktivierung des PI3-Kinase (PI3K)/AKT-Signalwegs. Dieser spielt eine wichtige Rolle beim Zellwachstum, der Differenzierung, bei Survivalprozessen und der Tumorentstehung. Dabei besitzen Tumorzellen vor allem deshalb einen deutlichen Überlebensvorteil, weil der PI3K/AKT-Signalweg Prozesse wie die Apoptoseinduktion reguliert und aktiviertes p-AKT zur Hemmung der Apoptose führt (MANNING and CANTLEY 2007; YUAN and CANTLEY 2008). Zudem haben eigene Vorarbeiten gezeigt, dass der PI3K/AKT-Signalweg in Rhabdomyosarkomen (RMS) von *Ptch1*<sup>+/-</sup> mutanten Mäusen aktiv ist und somit durch Inhibierung der Apoptose das Tumorstadium begünstigt. Außerdem konnte in diesen Tumoren ein erhöhter Gehalt des anti-apoptischen Proteins BCL2 detektiert werden (KAPPLER *et al.* 2003).

Da eine Aktivierung von anti-apoptischen Signalen ein Charakteristikum früher Tumorerkrankungen darstellt und dies zur Unfähigkeit der entarteten Zellen führt, in Apoptose zu gehen, haben wir zunächst untersucht, inwiefern embryonale Tumorzelllinien einen aktivierten PI3K/AKT-Signalweg aufweisen. In diesem Zusammenhang analysierten wir den Phosphorylierungsstatus des Schlüsselproteins des PI3K/AKT-Signalwegs, die Serin/Threonin Kinase AKT, mittels Westernblot. Dabei konnten wir in 10 von 14 getesteten embryonalen Tumorzelllinien aktiviertes p-AKT nachweisen (Abb. 7). Unter den aktiven Zelllinien waren 2 von 3 RMS- (RMS-13 und RD), 3 von 3 Hepatoblastom (HB)- (HepT3, HUH6 und HepT1), 3 von 3 Medulloblastom- (MB627, MB723 und MB794), eine



**Abb. 7: Aktivierung von AKT in embryonalen Tumorzelllinien**

Verschiedene embryonale Tumorzelllinien wurden mittels Westernblotanalyse auf die Aktivierung des AKT-Proteins hin untersucht. β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.



Neuroblastomzelllinie (NB11), sowie ein primäres epitheloides Sarkom (T264). Dabei war die Aktivierung des Signalwegs offensichtlich unabhängig vom jeweiligen histologischen Subtyp einiger Tumorerkrankungen. Denn unter den 3 getesteten RMS war sowohl die embryonale RMS-Zelllinie RD als auch die alveoläre RMS-Zelllinie RMS-13 positiv für p-AKT, wohingegen eine weitere alveoläre RMS-Zelllinie RH-30 keine Phosphorylierung aufwies. Ähnliches war auch bei den 3 positiven HB-Zelllinien HepT3, HUH6 und HepT1 zu beobachten, die unterschiedlicher histologischer Herkunft (epithelial bzw. epithel / mesenchymal gemischt) sind. Einen inaktiven PI3K/AKT-Signalweg fanden wir nur in einer RMS-Zelllinie (RH-30), den beiden getesteten Ewingsarkomzelllinien RH-1 und A673 sowie der Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms (HepG2).

Obwohl ein aktivierter PI3K/AKT-Signalweg nicht in allen Tumoren eine Rolle zu spielen scheint, ist es dennoch so, dass in einer überwiegenden Zahl von embryonalen Tumorzelllinien eine Aktivierung von AKT nachgewiesen werden konnte. Da ein aktivierter PI3K/AKT-Signalweg die Induktion der Apoptose verhindert, wäre es demnach ein vielversprechender Therapieansatz, in diesen Tumorzellen gezielt Apoptose zu induzieren.

## **5.2 Wirkstoff-Screening zur Behandlung embryonaler Tumorerkrankungen**

Da verschiedene Tumore einen erheblichen Überlebensvorteil gegenüber normalen Zellen aufweisen, weil sie beispielsweise nicht mehr in Apoptose gehen können, sollten nun Substanzen identifiziert werden, die in der Lage sind, in embryonalen Tumoren gezielt Apoptose zu induzieren.

In diesem Zusammenhang sollten verschiedene Zelllinien (RMS-, Ewingsarkom- und HB-Zelllinien) 48 h mit unterschiedlichen Wirkstoffen behandelt und die Vitalität der Zelllinien dokumentiert werden. Hierfür wurden zunächst in Kooperation mit Herrn Prof. Miroslav Strnad (Palacky Universität Olomouc, Tschechien) diverse Cyclin-abhängige Kinase- (CDK)-Inhibitoren getestet. Bei den verwendeten Wirkstoffen handelte es sich um Olomoucine-II, (R)-Roscovitine, (S)-Roscovitine, CAN-508, OSW-1, LGR-1406 / -1407 / -1431 / -1492, HMBAPR und 2CI-HMBAPR. Obwohl für einige dieser Inhibitoren, speziell für Olomoucine, Roscovitine und OSW-1 in der Vergangenheit bereits eine anti-tumorale Aktivität beschrieben wurde, beispielsweise durch Blockade der Zellproliferation und Induktion von Apoptose (ISEKI *et al.* 1997; MONACO *et al.* 2004; ZHOU *et al.* 2005), konnten wir in Vitalitätstests keine eindeutig selektive Wirksamkeit dieser Substanzen gegen die getesteten embryonalen Tumorzelllinien im Vergleich zu den Kontrollzellen (humane Fibroblasten) feststellen (Abb. 8). Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) diskriminierte zwar bei den Substanzen LGR-1407 und -1492 zumindest bei einem Teil der getesteten Zelllinien zwischen den Tumorzelllinien und den Fibroblasten, nicht wesentlich aber bei all den

anderen CDK-Inhibitoren (Tabelle 5). Aus diesem Grund wurde der Ansatz mit den CDK-Inhibitoren nicht weiterverfolgt.

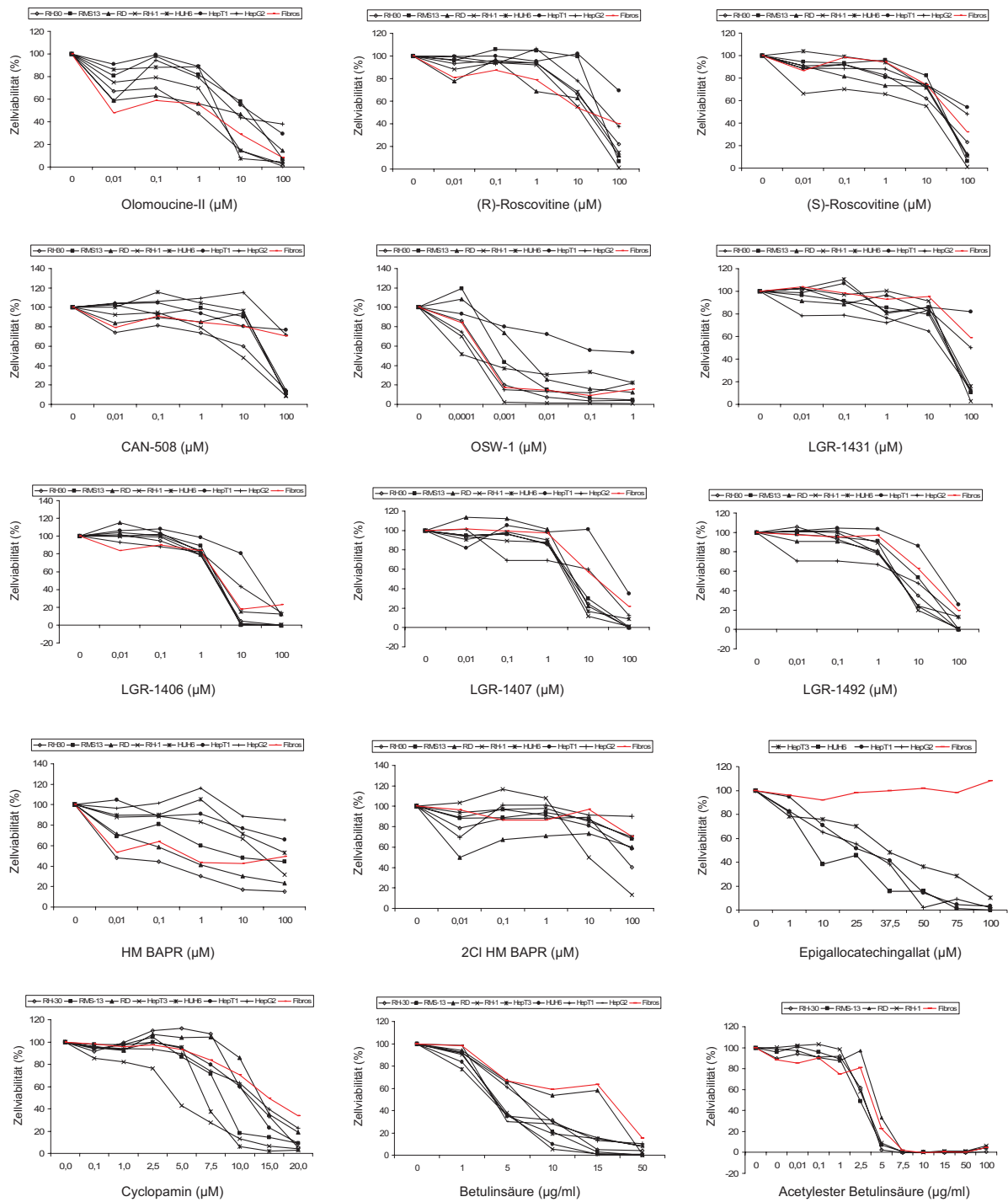
In weiteren Versuchen sollten anschließend Substanzen getestet werden, die speziell Signalwege der Embryonalentwicklung, wie den WNT-Signalweg oder den Hh-Signalweg, hemmen und damit Apoptose auslösen können. Als Inhibitor des WNT/ $\beta$ -Catenin Pathways wurde dabei Epigallocatechingallat (EGCG) verwendet (DASHWOOD *et al.* 2002; KIM *et al.* 2006; PATEL *et al.* 2008), und als Inhibitor des Hh-Signalwegs Cyclopamin (CyC) (TAIPALE *et al.* 2000). In Vitalitätstest bei HB- und RMS-Zellen wurde festgestellt, dass EGCG und Cyclopamin selektiv die Vitalität von HB-Zellen herabsetzt (Abb. 8). EGCG beeinflusste dabei die Vitalität aller getesteten HB-Zelllinien, wohingegen es auf humane Fibroblasten

Tabelle 5: IC50 Werte der getesteten Wirkstoffe

	RH-30	RMS-13	RD	RH-1	HepT3	HUH6	HepT1	HepG2	Fibroblasten
<b>Olomoucine-II</b>	0,90	24,42	6,76	4,25	n.d.	5,29	27,50	8,35	2,72
<b>(R)-Roscovitine</b>	43,10	58,07	32,69	18,78	n.d.	40,54	> 100	72,73	36,16
<b>(S)-Roscovitine</b>	37,49	48,43	44,39	18,93	n.d.	41,89	> 100	93,96	61,51
<b>CAN-508</b>	29,81	56,32	60,21	9,44	n.d.	57,97	> 100	> 100	> 100
<b>OSW-1</b>	0,06	0,09	0,54	0,04	n.d.	0,02	> 1	0,05	0,06
<b>LGR-1406</b>	4,46	5,36	4,60	4,40	n.d.	5,41	49,78	8,50	5,62
<b>LGR-1407</b>	6,27	6,80	6,81	5,46	n.d.	5,90	79,39	29,23	28,75
<b>LGR-1431</b>	35,82	48,44	51,55	51,89	n.d.	56,36	> 100	> 100	> 100
<b>LGR-1492</b>	6,84	16,49	5,91	6,07	n.d.	5,77	63,73	8,98	36,39
<b>HM BAPR</b>	0,01	8,65	0,54	53,24	n.d.	> 100	> 100	> 100	0,71
<b>2 CI-HM BAPR</b>	82,07	> 100	> 100	9,95	n.d.	> 100	> 100	> 100	> 100
<b>Epigallocatechingallat</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	35,10	9,20	25,80	30,40	> 100
<b>Cyclopamin</b>	12,02	8,79	14,25	n.d.	4,94	7,29	11,52	16,93	18,53
<b>Betulinsäure</b>	8,54	12,04	20,80	7,03	4,75	6,54	13,43	7,23	21,61
<b>Acetylerster Betulinsäure</b>	5,20	4,70	7,56	5,35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,16

Dargestellt sind alle verwendeten Wirkstoffe und Ihre IC50-Werte für die entsprechenden Zelllinien in  $\mu\text{M}$  nach 48 h Inkubation. n.d. = not determined

keinen Einfluss hatte. Dies zeigen auch eindeutig die IC50-Werte, welche bei den HepT3 Zellen bei 35,10  $\mu\text{M}$ , HUH6-Zellen bei 9,20  $\mu\text{M}$ , HepT1-Zellen bei 25,80  $\mu\text{M}$  und den HepG2-Zellen bei 30,40  $\mu\text{M}$  lagen, während Fibroblasten IC50-Werte von >100  $\mu\text{M}$  aufwiesen (Tabelle 5). CyC beeinflusste dagegen nicht nur HB-Zellen, sondern zudem in geringem Ausmaß auch die Vitalität der *GLI1*-amplifizierten RMS-Zelllinie RMS-13. Diese Selektivität gegenüber Tumorzelllinien ließ sich auch an den IC50-Werten ablesen (Tabelle 5). Hier lagen die Werte der responsiven Zelllinien HUH6 (7,29  $\mu\text{M}$ ), HepT3 (4,94  $\mu\text{M}$ ) und RMS-13 (8,79  $\mu\text{M}$ ) weit unter den Werten der Kontrollzellen, der humanen Fibroblasten (18,53  $\mu\text{M}$ ). Die Werte der CyC-insensitiven Zelllinien HepT1 (11,52  $\mu\text{M}$ ), HepG2 (16,93  $\mu\text{M}$ ), RH-30 (12,02  $\mu\text{M}$ ) und RD (14,25  $\mu\text{M}$ ) lagen dagegen annähernd im Bereich der Kontrollzellen.



**Abb. 8: Wirkstoff-Screening**

Für einen Vitalitätsassay wurden verschiedene embryonale Tumorzelllinien (RMS-, Ewingsarkom-, HB-Zelllinien) und normale Fibroblasten für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Substanzen (CDK-Inhibitoren, WNT-Signalweg Inhibitor (EGCG), Hh-Inhibitor (Cyclopamin) und einem Apoptoseinduktor (BA)) behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay bestimmt. Bei den EGCG behandelten Zellen wurde ein Cell Screen Assay durchgeführt und somit die Konfluenz der Zellen gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

Als ein Apoptoseinduktor wurde desweiteren Betulinsäure (BA) verwendet, der erwiesenermaßen in unterschiedlichen Tumorzelllinien Apoptose auszulösen vermag (EHRHARDT *et al.* 2004; FULDA *et al.* 1999a; FULDA *et al.* 1999b; PISHA *et al.* 1995; RABI *et al.* 2008; THURNHER *et al.* 2003). Auch hier konnten wir in Vitalitätsassays eine deutliche dosisabhängige Abnahme der Vitalität in HB- und RMS-Zellen beobachten, während die Kontrollzellen erst bei einer zytotoxischen Konzentration von 50 µg/ml BA starben (Abb. 8). In Kooperation mit Herrn Dr. Paschke (BioSolutions GmbH, Halle) wurde ein zusätzliches BA-Derivat, ein BA-Acetylerster, auf seine Wirksamkeit getestet. Allerdings konnten wir keine Tumorspezifität bzgl. dieses Wirkstoffes feststellen, so dass auch dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Die beiden positiv getesteten Wirkstoffe CyC und BA sollten nun im Verlauf dieser Arbeit genauer auf Ihr Apoptoseverhalten hin analysiert werden, während die Untersuchung des ebenfalls positiv getesteten Wirkstoffs EGCG für eine medizinische Doktorarbeit ausgegliedert wurde.

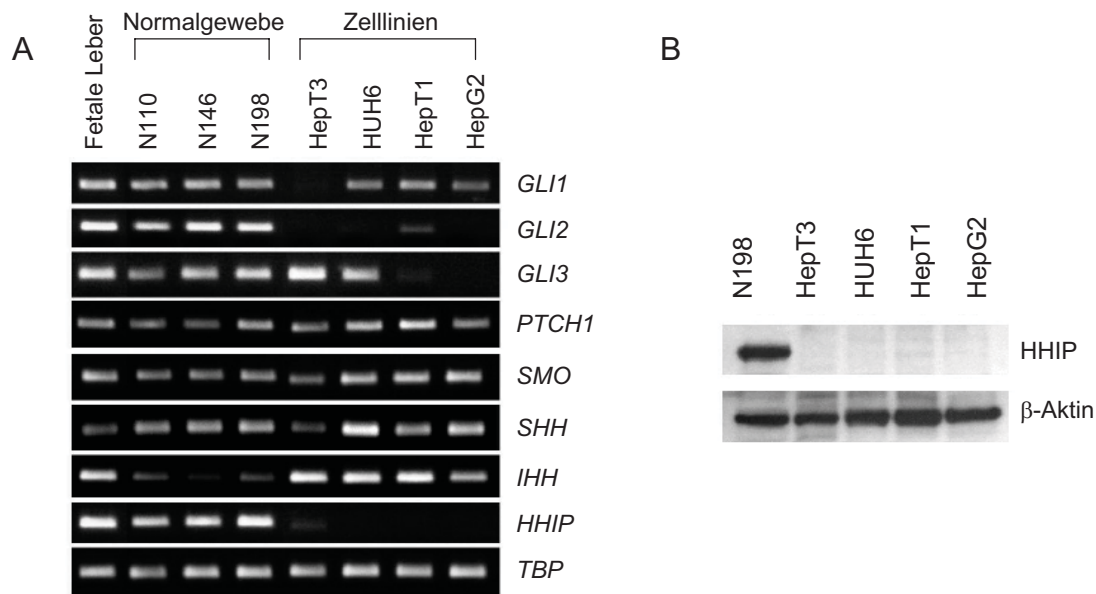
### **5.3 Inhibierung des Hh-Signalwegs und Induktion von Apoptose in Hepatoblastomen durch Cyclopamin**

Neueste Studien haben gezeigt, dass der Hh-Signalweg eine signifikante Rolle in der Entwicklung und der Regeneration der Leber spielt (HIROSE *et al.* 2009; OMENETTI and DIEHL 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine konstitutive Aktivierung des Hh-Signalwegs an der Entstehung von embryonalen Tumoren, beispielsweise der Skelettmuskulatur und des Gehirns (STECICA and RUIZ I ALTABA 2005) oder auch im Erwachsenenalter an der Entstehung von Tumoren der Prostata oder des Verdauungstraktes beteiligt ist (BERMAN *et al.* 2003; KARHADKAR *et al.* 2004). Interessanterweise spielt der Hh-Signalweg daher nicht nur eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Leber, sondern auch bei der Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Aktivierung des Signalwegs in adulten Lebertumoren, den hepatozellulären Karzinomen (HCC), beobachtet (PATIL *et al.* 2006; SICKLICK *et al.* 2006). Deshalb sollte hier der Signalweg und seine mögliche Inhibierung, beispielsweise durch den Hh-Inhibitor CyC, auch an kindlichen Lebertumoren, den Hepatoblastomen, genauer untersucht werden.

#### **5.3.1 Aktivität des Hh-Signalwegs in Hepatoblastomzelllinien**

Auf Grund der essentiellen Rolle des Hh-Signalwegs in adulten HCCs wollten wir die Aktivität des Signalwegs in früh-auftretenden, pädiatrischen Lebertumoren analysieren. Dazu wurde zunächst RNA aus vier verschiedenen kindlichen Lebertumorzelllinien, normaler fetaler Leber (Stratagene, La Jolla, CA, USA) und Normalgewebe verschiedener kindlicher Lebern isoliert. Die Analyse der Transkripte mittels RT-PCR zeigte die Expression der Hh-

Komponenten Sonic-Hedgehog (*SHH*) und Indian-Hedgehog (*IHH*) sowie des Transmembranproteins Smoothend (*SMO*) und der Zielgene des Hh-Signalwegs *GLI1* und



**Abb. 9: Expression der Komponenten des Hh-Signalwegs in pädiatrischen Lebertumorzelllinien**

(A) Die Expression der Gene *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCH1*, *SMO*, *SHH*, *IHH* und *HHIP* wurde in den vier Lebertumorzelllinien HepT3, HUH6, HepT1 und HepG2, sowie in fetaler Leber und den drei Normalgeweben (N110, N146 und N198) mittels RT-PCR analysiert. *TBP* diente dabei als interne Kontrolle für die Integrität der RNA. (B) Westernblot Analyse des Proteins HHIP in den vier Lebertumorzelllinien und in einem Normalgewebe (N198).  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

*PTCH1*. Dabei war eine leichte Tendenz einer erhöhten Expression dieser Komponenten in den Tumorzelllinien gegenüber der fetalen Leber und dem Normalgewebe zu erkennen (Abb. 9A). Außerdem wurde interessanterweise festgestellt, dass das Hh-Signalweg inhibierende *Human Hedgehog-Interacting-Protein (HHIP)* in den Zelllinien im Vergleich zum Normalgewebe kaum oder gar nicht nachweisbar war (Abb. 9A und 9B). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die Aktivierung des Hh-Signalwegs ebenfalls in die Entstehung kindlicher Lebertumoren involviert sein könnte.

### 5.3.2 Aktivität des Hh-Signalwegs in Primärtumoren

Da uns eine umfangreiche Sammlung an Primärtumormaterial kindlicher Lebertumore zur Verfügung stand, und um die *in vitro* Ergebnisse weiter zu eruieren, testeten wir eine Reihe von primären HB und HCC auf Ihre Expression von Komponenten des Hh-Signalwegs mittels quantitativer RT-PCR. Es zeigte sich, verglichen mit den mittleren Expressionslevels von drei Normalgeweben kindlicher Lebern, dass die Gene *GLI1* in 65 % (15 von 23), *GLI2* in 43 % (10 von 23) und *PTCH1* in 30 % (7 von 23) der getesteten Tumoren eine starke Überexpression (> 3-fach) aufwiesen. In Übereinstimmung mit der Literatur fanden wir auch eine deutliche Überexpression von *GLI1* in den getesteten HCC-Fällen (2 von 3). Interessanterweise ging die erhöhte Expression von *GLI1* in 7 Hepatoblastomen und den zwei *GLI1*-positiven HCC-Geweben einher mit der gesteigerten Expression von *BCL2*, einem

bekanntes Zielgen des Hh-Signalwegs (REGL *et al.* 2004). Weiterhin wurde eine relative Überexpression des *IHH*-Gens in 15 von 23 HB-Fällen gefunden, was eine autokrine Stimulation des Hh-Signalwegs nahelegt. Eine Überexpression von *SHH* wurde hingegen nicht nachgewiesen. Am interessantesten war allerdings, dass auch in den Primärtumoren,

**Tabelle 6: Relative mRNA Expressionslevel von Hh-assoziierten Genen und Zusammenfassung verschiedener klinischer und histopathologischer Daten**

Sample	Alter *	Geschlecht **	Tumor / Histologie §	Stadium#	Chemotherapie +	Outcome ++	Relative mRNA Expressionslevel °							
							<i>GLI1</i>	<i>GLI2</i>	<i>GLI3</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SHH</i>	<i>IHH</i>	<i>HHIP</i>	<i>BCL2</i>
T29	11	M	HB / mixed	I	No	NED	0,5	<u>0,2</u>	<u>0,2</u>	<b>4,5</b>	<u>0,3</u>	<b>15,7</b>	<u>0,0</u>	<u>0,3</u>
T77	16	F	HB / epith (F)	I	No	NED	1,6	0,6	0,9	1,2	1,5	<b>8,8</b>	<u>0,1</u>	0,5
T82	4	M	HB / epith	IV/HR	Yes	DOD	<b>28,3</b>	<b>17,5</b>	<b>15,0</b>	1,9	<u>0,0</u>	<b>4,6</b>	0,3	<b>7,6</b>
T84	1	M	HB / epith (F)	III SR	Yes	NED	<b>5,2</b>	2,1	2,4	0,9	0,8	0,8	0,8	<b>3,4</b>
T91	31	F	HB / epith (F)	IV/HR	Yes	NED	<b>6,8</b>	2,7	2,7	1,3	0,8	1,5	0,4	2,3
T96	13	M	HB / epith (F)	IV/HR	Yes	DOD	<b>42,1</b>	<b>3,3</b>	1,2	1,7	<u>0,0</u>	<u>0,0</u>	2,7	0,5
T145	9	F	HB / mixed (F/E)	III SR	Yes	NED	0,4	<u>0,1</u>	<u>0,2</u>	<b>4,5</b>	0,4	<b>9,6</b>	<u>0,0</u>	<u>0,2</u>
T198	10	F	HB / epith (F)	III SR	Yes	NED	<b>9,2</b>	<b>6,9</b>	<b>5,6</b>	1,7	0,9	2,1	0,8	<b>3,3</b>
T227	14	F	HB / epith (F)	IV/HR	Yes	DOD	0,4	0,0	<u>0,1</u>	<u>0,3</u>	0,8	0,4	<u>0,0</u>	<u>0,1</u>
T253	15	F	HB / epith (F/E)	IV/HR	Yes	NED	<b>3,8</b>	1,0	0,7	<b>7,9</b>	0,7	<b>6,4</b>	<u>0,0</u>	0,6
T254	6	M	HB / epith (F)	III SR	Yes	NED	<b>10,4</b>	2,4	2,3	2,0	1,2	<b>4,9</b>	<u>0,1</u>	1,3
T4	56	M	HB / epith (F/E)	IV/HR	Yes	DOD	<b>21,9</b>	<b>11,1</b>	<b>5,6</b>	1,7	0,4	<b>8,2</b>	0,6	<b>5,4</b>
T5	42	M	HB / mixed (E)	ND	ND	ND	<b>22,2</b>	<b>14,1</b>	<b>31,9</b>	2,8	0,4	<b>26,6</b>	0,5	<b>3,1</b>
T6	15	F	HB / epith (F)	IV/HR	Yes	NED	0,5	<u>0,1</u>	<u>0,2</u>	<b>5,1</b>	0,5	<b>7,3</b>	<u>0,0</u>	0,5
T7	22	M	HB / epith (F)	III SR	Yes	NED	<b>3,8</b>	1,5	1,6	0,6	1,0	<b>3,3</b>	<u>0,1</u>	1,0
T9	5	M	HB / epith (E)	III SR	Yes	NED	<b>20,0</b>	<b>5,8</b>	2,7	2,1	2,5	1,9	0,9	1,6
T10	29	M	HB / epith (F/E)	III SR	Yes	ND	2,1	<u>0,3</u>	1,3	<b>4,4</b>	<u>0,3</u>	<b>67,7</b>	<u>0,0</u>	0,4
T12	9	F	HB / epith (F)	ND	ND	ND	1,2	0,5	0,6	2,8	0,7	<b>4,7</b>	<u>0,1</u>	0,7
T13	54	F	HB / epith (F)	IV/HR	Yes	NED	1,5	0,6	1,0	0,8	1,7	<b>6,8</b>	<u>0,0</u>	1,0
T14	15	M	HB / epith (F)	III SR	Yes	NED	<b>56,9</b>	<b>21,9</b>	<b>8,1</b>	<b>7,2</b>	1,1	1,9	0,5	<b>3,7</b>
T15	7	M	HB / mixed	IV/HR	Yes	NED	<b>4,8</b>	<b>3,0</b>	<b>3,4</b>	<b>5,8</b>	<u>0,3</u>	<b>35,1</b>	<u>0,1</u>	0,6
T16	42	F	HB / epith (F)	IV/HR	Yes	DOD	<b>19,3</b>	<b>18,1</b>	<b>4,4</b>	1,8	<u>0,3</u>	<b>12,9</b>	<u>0,1</u>	2,6
T17	18	F	HB / mixed	III SR	Yes	NED	<b>12,6</b>	<b>9,4</b>	<b>43,7</b>	1,0	<u>0,1</u>	0,4	<u>0,0</u>	<b>14,3</b>
T175	96	M	TLCT	I	No	NED	0,4	<u>0,0</u>	0,3	0,4	0,6	1,5	<u>0,0</u>	0,8
T3	199	M	HCC	I	No	NED	<b>25,2</b>	<b>10,3</b>	<b>13,8</b>	1,0	<u>0,1</u>	<u>0,3</u>	<u>0,0</u>	<b>3,3</b>
T146	142	M	HCC	III A	No	NED	<b>4,3</b>	<b>6,5</b>	<b>3,9</b>	0,8	<u>0,2</u>	<u>0,1</u>	0,5	<b>5,9</b>
T153	218	F	HCC	IV	No	DOD	0,4	0,0	0,2	1,0	0,6	<b>22,7</b>	<u>0,0</u>	0,3
Fetal liver	16	M	—	—	—	—	<b>3,9</b>	1,2	1,2	0,7	<u>0,3</u>	<b>15,8</b>	0,5	1,0

\* Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose in Monaten, \*\* F=Female, M=Male

§ HB=Hepatoblastom, hauptsächlich mit epithelialen Komponenten, in Klammern: (F/E) fetale und embryonale Differenzierung vorhanden, (F) nur fetale Differenzierung, (E) nur embryonale Differenzierung

# Tumorstadieneinteilung I-IV, SR= Standardrisiko, HR=Hochrisiko

+ Präoperative Chemotherapie erhalten ja oder nein, ++ DOD=dead of disease, NED=no evidence of disease, ND=no data

° Schwangerschaftswoche

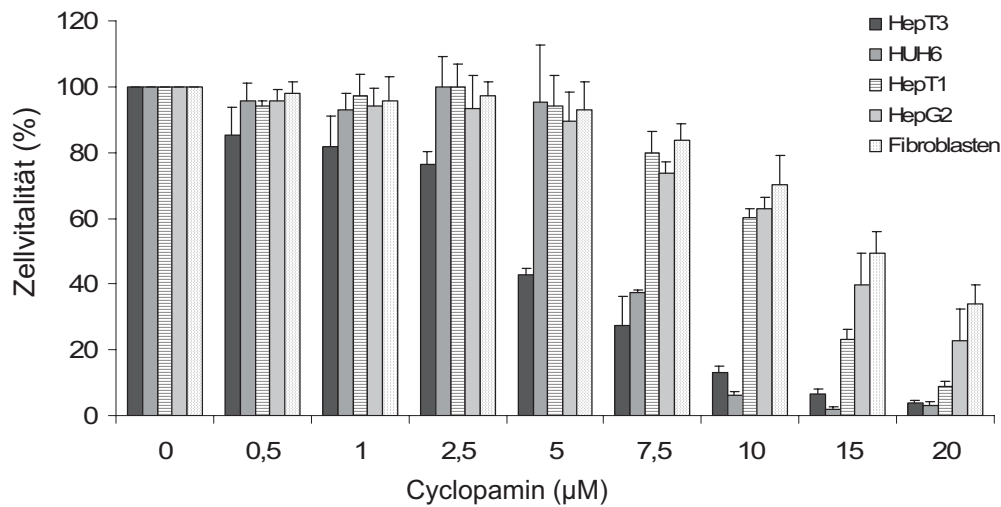
° relative mRNA Level im Vergleich zur gemittelten Expression von drei verschiedenen Normalgeweben aus Lebern (NL110, NL146, NL198), eine >3-fache Überexpression der Tumorproben ist dick hervorgehoben, eine Repression der Gene ist unterstrichen

ähnlich wie in den getesteten Zelllinien, eine deutliche Herabregulierung des *HHIP*-Gens zu beobachten war (14 von 23 HB-Fällen, 2 von 3 HCC-Fällen und einem transitionellen Lebertumor). Eine Korrelation bezüglich des Alters, des Geschlechts, der Tumordifferenzierung, des Tumorstadiums, einer chemotherapeutischen Vorbehandlung, pathologischer Merkmale oder des Therapieerfolges konnte jedoch nicht festgestellt werden (Tabelle 6). Auch diese Daten zeigten uns also, dass ein aktivierter Hh-Signalweg eine mögliche Ursache für die Entstehung von kindlichen Lebertumoren sein könnte.

### 5.3.3 Inhibierung des Hh-Signalwegs durch Cyclopamin

Zur Analyse, inwiefern ein aktivierter Hh-Signalweg essentiell für die Proliferation von Hepatoblastomazellen ist, wurden die Zellen mit CyC behandelt, einem bekannten Hh-Inhibitor (TAIPALE *et al.* 2000). In einem MTT-Proliferationsassay konnte dann gezeigt werden, dass CyC signifikant die Zellvitalität von zwei der vier getesteten HB-Zelllinien dosis-

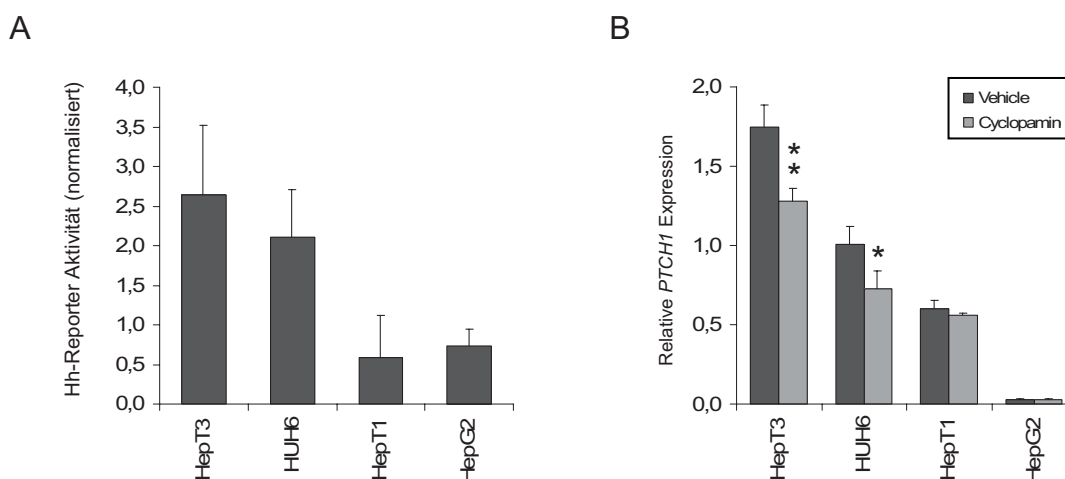
abhängig ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  CyC hemmt (Abb. 10). In Übereinstimmung mit der Literatur, wo bereits beschrieben wurde (HUANG *et al.* 2006), dass die HCC Zelllinie HepG2 nicht responsiv auf CyC reagiert, konnten wir bestätigen, dass der Hh-Signalweg in



**Abb. 10: Wachstumsinhibition in HB-Zellen durch Cyclopamin**

HB-Zellen und normale Fibroblasten wurden für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen des Hh-Inhibitors Cyclopamin behandelt. Anschließend wurde die Zellvitalität mittels MTT-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

HepG2-Zellen inaktiv ist, da sie sich auch hier ähnlich den Kontrollzellen, humanen Fibroblasten, verhielten. Da die HepT1 Zellen ein ähnliches Verhalten zeigten wie die HCC-Zelllinie HepG2, ist davon auszugehen, dass auch diese Zelllinie einen inaktiven Hh-Signalweg aufweist. Um sicher zu stellen, dass die Wachstumsinhibition vom Hh-Aktivierungsstatus der jeweiligen Zelllinien abhängig ist, untersuchten wir die Zellen auf Ihre



**Abb. 11: Aktivität des Hh-Signalwegs in HB-Zellen**

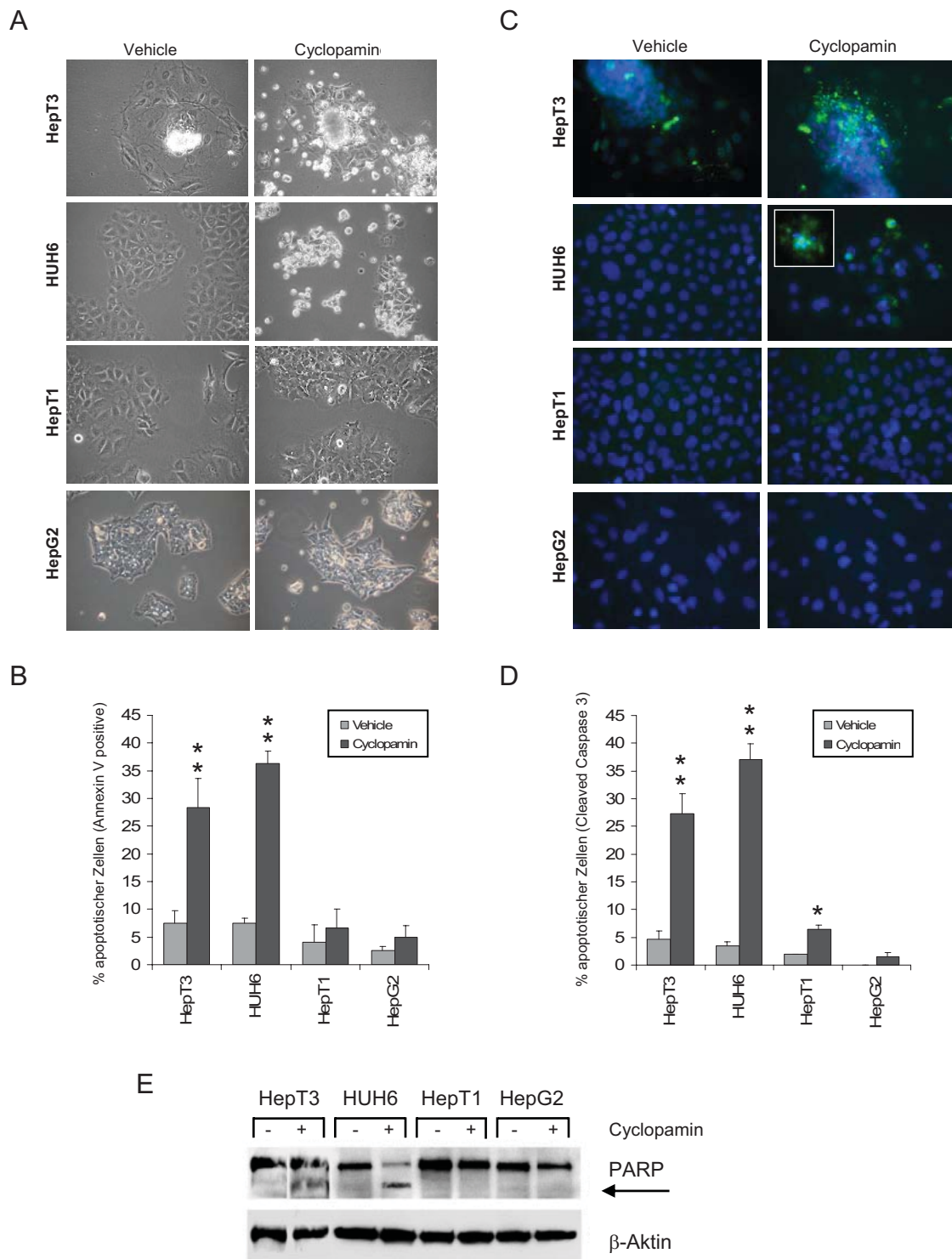
(A) Aktivität des Hh-Signalwegs: Transient mit einem Luciferase Hh-Reporter transfizierte HB-Zelllinien wurden 48 h nach Transfektion mittels Luciferase-Assay analysiert und gegen Renilla Luciferase normalisiert. Die Versuche wurden zweimal als Doppelbestimmung durchgeführt. (B) *PTCH1* Expression: HB-Zellen wurden 48 h mit 7,5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin (graue Balken) oder dem entsprechenden Lösungsmittel (schwarze Balken) behandelt. Die Expression des *PTCH1*-Gens wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR bestimmt und gegen das *Housekeeping* Gen TBP normalisiert. Statistische Analysen wurden mittels ungepaartem Student t-Test durchgeführt; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ .

Fähigkeit, einen Hh-Reporter zu aktivieren. In einem Luciferase-Assay konnten wir eindeutig zeigen, dass die beiden CyC-sensitiven Zelllinien HepT3 und HUH6 sehr viel aktiver sind als die CyC-insensitiven Zelllinien HepT1 und HepG2 (Abb. 11A). Bei der Expressionsanalyse Hh-relevanter Gene haben wir nicht nur festgestellt, dass die Expressionslevel der Hh-sensitiven Zelllinien sehr viel höher waren als in den insensitive Zelllinien, sondern auch, dass die Expression dieser Gene durch CyC (7,5 µM) signifikant gehemmt werden konnte. Hier exemplarisch gezeigt am *PTCH1*-Gen (Abb. 11B). Die Behandlung mit CyC führt also zu einer Wachstumsinhibierung in Hh-aktivierten HB-Zellen, wobei der Hh-Signalweg in HB-Zellen oberhalb Smoothend aktiviert sein sollte, da er sich durch CyC hemmen lässt.

#### **5.3.4 Induktion von Apoptose durch Cyclopamin**

Da bei Hh-aktiven Tumorzelllinien des Basalzellkarzinoms oder bei Kolorektaltumoren bereits beschrieben wurde (ATHAR *et al.* 2004; QUALTROUGH *et al.* 2004), dass CyC durch Hemmung des Hh-Signalwegs in diesen Zellen Apoptose auslöst, sollte im Weiteren untersucht werden, ob die Wachstumsinhibierung der CyC-sensitiven HB-Zelllinien durch Induktion von Apoptose initiiert wird. Um Apoptose in den Zellen nachzuweisen, beobachteten wir zunächst Apoptose-spezifische morphologische Veränderungen der HB-Zelllinien. Dabei konnten wir speziell in den CyC-sensitiven Zelllinien HepT3 und HUH6 Apoptose-typische Merkmale wie das Schrumpfen der Zellen, kondensiertes Chromatin und die Bildung von „*apoptotic bodies*“ (Ausstülpungen der Plasma- und Kernmembran) feststellen, wobei die Morphologie der insensitive Zelllinien HepT1 und HepG2 unbeeinflusst blieb durch die CyC-Behandlung (Abb. 12A). Ein direkter Nachweis der Apoptose zu einem sehr frühen Stadium wurde mittels Annexin V Färbung durchgeführt. Auch hier konnten wir nahezu keine Apoptosinduktion in den Hh-negativen Zelllinien HepT1 und HepG2 feststellen. Allerdings zeigten die CyC-sensitiven, Hh-positiven HepT3 und HUH6 Zellen erneut eine signifikante Induktion von Apoptose nach Behandlung mit CyC (Abb. 12B). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch zu späteren Stadien der Apoptose erzielt, wobei Immunfluoreszenzfärbungen gegen das Cleaved Caspase 3 Protein (Abb. 12C+12D) und Westernblots gegen PARP (Abb. 12E) gemacht wurden. Die CyC-vermittelte Wachstumsinhibierung der Hh-positiven HB-Zellen HepT3 und HUH6 ist daher eindeutig auf eine Induktion von Apoptose zurückzuführen.





**Abb. 12: Cyclopamin vermittelte Induktion von Apoptose in HB-Zellen**

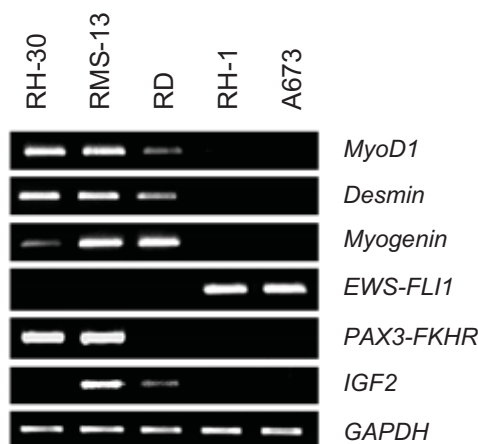
(A) Apoptose spezifische Veränderungen: HB-Zellen wurden 48 h mit 7,5  $\mu$ M Cyclopamin oder Lösungsmittel behandelt und anschließend mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert und photographiert (400 x Vergrößerung). (B) Annexin V Färbung: 48 h nach Inkubation der HB-Zellen mit 7,5  $\mu$ M Cyclopamin oder Lösungsmittel wurden die Zellen mit Cy5-markiertem Annexin V und Calcein gefärbt und mittels Bioanalyzer analysiert. Experimente wurden zweimal in Dupletten durchgeführt. Dargestellt sind Zellen zu einem frühen Stadium der Apoptose (Annexin V und Calcein positiv). Statistische Analysen wurden mittels eines ungepaarten Student t-Test gemacht; \*P < 0,05; \*\*P < 0,001. (C+D) Aktivierung von Caspase 3: Zellen wurden 48 h mit Cyclopamin oder Lösungsmittel behandelt und anschließend gemäß Immunfluoreszenzprotokoll mit einem Antikörper gegen das Apoptose-spezifische Cleaved Caspase 3 Protein gefärbt. Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und die Cleaved Caspase 3 positiven Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop photographiert (C) und ausgezählt (D). Statistische Analysen wurden auch hier anhand eines ungepaarten Student t-Tests durchgeführt; \*P < 0,05; \*\*P < 0,001. (E) Aktivierung von PARP: Nachdem die HB-Zellen für 48 h mit Cyclopamin oder Lösungsmittel inkubiert wurden, wurden die Zellen lysiert und mittels Westernblot analysiert. Aktiviertes, geschnittenes PARP ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet.

## 5.4 Induktion von Apoptose durch Betulinsäure

Da aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bekannt war, dass Betulinsäure (BA) bei einer Reihe von anderen Tumorzellen erfolgreich als Apoptoseinduktor eingesetzt werden konnte (CHINTHARLAPALLI *et al.* 2007b; EHRHARDT *et al.* 2004; FULDA *et al.* 1999a; FULDA *et al.* 1999b; PISHA *et al.* 1995), sollte die Wirkung von BA nun auch an embryonalen Tumorzelllinien getestet werden. In unseren ersten Screens (siehe 5.2) hatte sich bereits gezeigt, dass BA einen deutlichen Einfluss auf die Vitalität von embryonalen Tumorzelllinien des RMS und des HB hat. Daher sollte in weiteren Schritten nun die Wirkung von BA auf diese Zelllinien genauer analysiert werden.

### 5.4.1 **Betulinsäure reduziert die Zellvitalität und das Überleben von Rhabdomyosarkom- und Hepatoblastom-Zellen**

Um die Wirkung von BA auf embryonale Tumorzelllinien genauer zu untersuchen, wurden zunächst Vitalitätstests durchgeführt, um auch das zeitliche Wirkoptimum von BA näher zu bestimmen. In diesem Zusammenhang wurden zwei ARMS- (RH-30 und RMS-13) und zwei ERMS-Zelllinien (RD und RH-1) verwendet. Bei einer vorgeschalteten Routine-Analyse der Zelllinien stellte sich allerdings heraus, dass die Zelllinie RH-1 keinerlei myogene Marker wie MyoD1, Desmin oder Myogenin (LAWSON-SMITH and MCGEACHIE 1998; RIEDLINGER *et al.* 2005) exprimiert. Da wir in der Literatur Hinweise fanden, dass es sich bei dieser Zelllinie um ein Ewingsarkom handeln könnte (SMITH *et al.* 2008), haben wir die RH-1 Zellen auf das Ewingsarkom-spezifische Translokationsprodukt *EWS-FLI1* (BANDRES *et al.* 2005) hin untersucht und festgestellt, dass die RH-1 Zellen dieses Fusionsprodukt aufweisen, genau wie die für diesen Versuch als Positivkontrolle verwendete Ewingsarkomzelllinie A673 (Abb. 13). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die RH-1 Zelllinie dann auch zur Ewingsarkomzelllinie umklassifiziert. Durch diesen Befund sensibilisiert, wurden auch die verbliebenen drei RMS-Zelllinien genauer analysiert. Hier fanden wir entsprechend der Einteilung der RMS-Zelllinien das ARMS-spezifische Translokationsprodukt *PAX3-FKHR* in

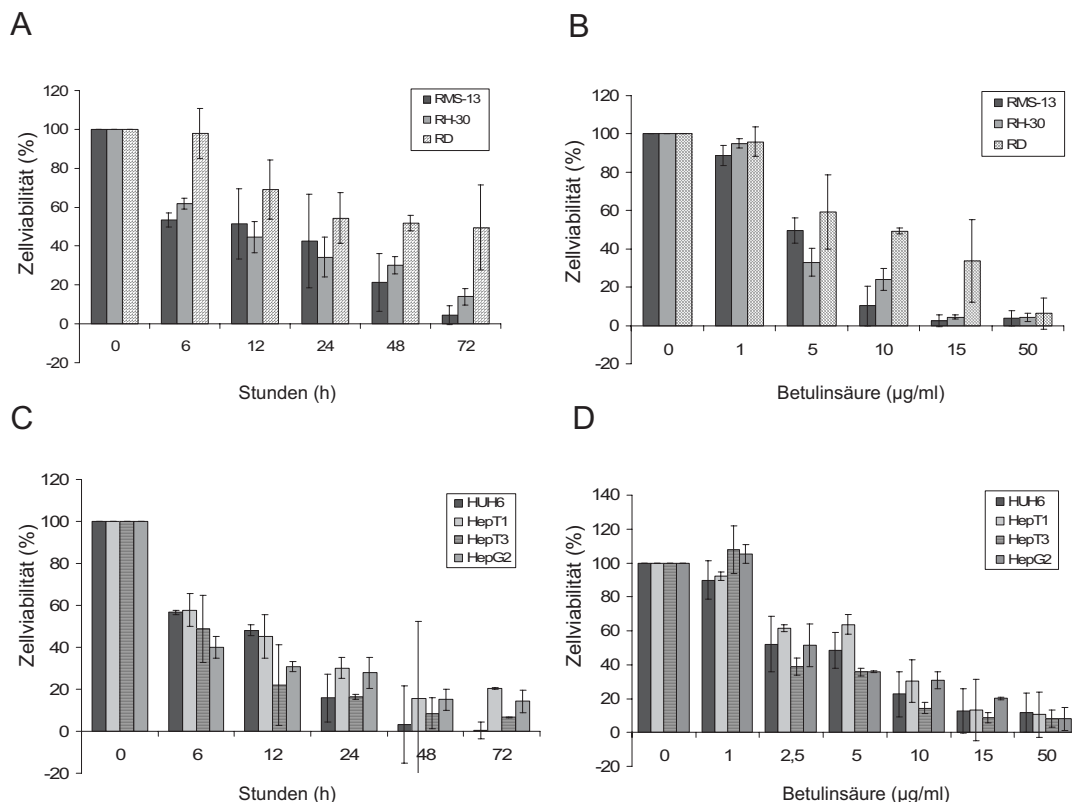


**Abb. 13: Expression von Weichteilsarkom spezifischen Markergenen**

Dargestellt sind mRNA Expressionslevel von verschiedenen RMS-spezifischen myogenen Markern (*MyoD1*, *Desmin* und *Myogenin*), das Ewingsarkom-spezifische Fusionsprodukt *EWS-FLI1*, das ARMS-spezifische Translokationsprodukt *PAX3-FKHR* und ERMS-spezifische hohe *IGF2* Expression. GAPDH wurde als interne Ladekontrolle und Kontrolle der RNA Integrität verwendet.

den beiden alveolären RMS-Zelllinien RH-30 und RMS-13 sowie ERMS-spezifische hohe Expression von *IGF2* in den RD-Zellen. Interessanterweise zeigte auch die alveoläre RMS-13 Zelllinie eine erhöhte Expression von *IGF2*. Dies lässt sich aber möglicherweise auf den in RMS-13 Zellen aktiven Hh-Signalweg zurückführen (ROBERTS *et al.* 1989), da *IGF2* ein *downstream* Zielgen dieses Signalwegs ist (HAHN *et al.* 2000). Da nun sichergestellt war, dass die drei RMS-Zelllinien richtig klassifiziert waren, konnte mit den weiteren Versuchen begonnen werden.

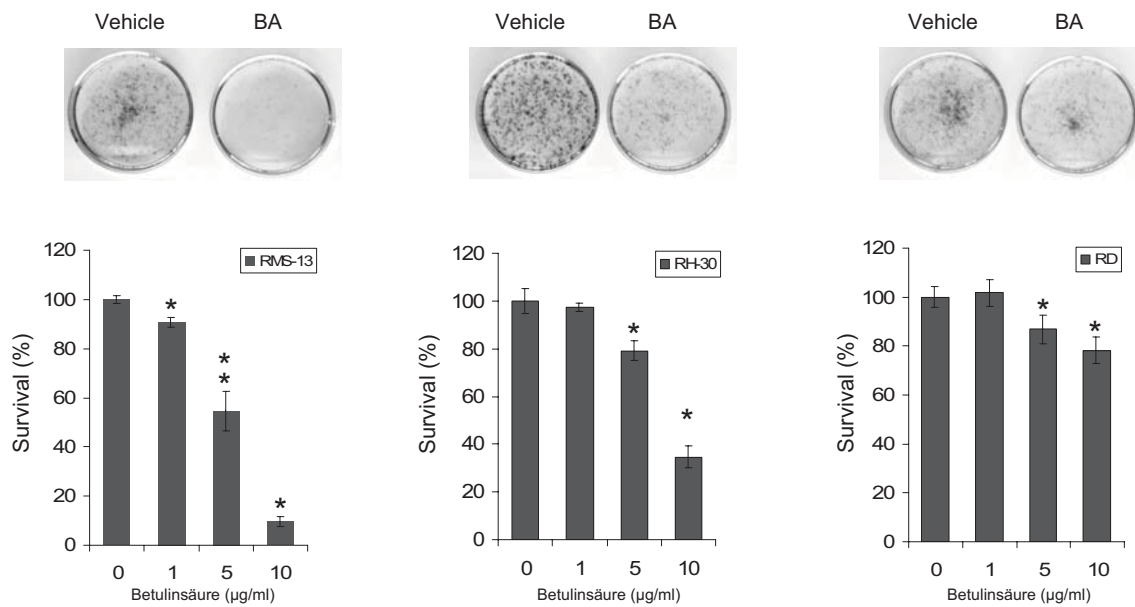
In Vitalitätsassays, in welchen verschiedene Konzentrationen von BA (0 – 50 µg/ml) in einem Zeitraum von 72 h getestet wurden, zeigte sich, dass die RMS-Zelllinien RH-30 und RMS-13 Zeit- und Dosis-abhängig auf BA reagierten (Abb. 14A+14B). Die embryonale RD-Zelllinie war dabei viel weniger responsiv gegenüber BA als die beiden ARMS-Zelllinien RH-30 und RMS-13 und erst sehr hohe Konzentrationen von BA waren für alle getesteten Zellen zytotoxisch. Da nach diesen Untersuchungen eine Konzentration von 10 µg/ml und eine Inkubationszeit von 48 h für RMS-Zellen am besten geeignet schien, wurden alle weiteren Versuche stets unter diesen Bedingungen durchgeführt. Die IC50-Werte der getesteten RMS-Zelllinien lagen bei 5,5 µg/ml BA in RMS-13 Zellen, bei 3,9 µg/ml BA in RH-30 Zellen



**Abb. 14: Wachstumsinhibierung in RMS- und HB-Zellen nach Behandlung mit Betulinsäure**

RMS- und HB-Zellen wurden für 0 – 72 h mit verschiedenen Konzentrationen Betulinsäure behandelt. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels MTT-Assay bestimmt. Bei der Auswertung wurde sowohl die zeitliche (A+C) als auch die konzentrations-abhängige Komponente (B+D) berücksichtigt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten in Duplikaten.

und bei 9,5  $\mu\text{g/ml}$  BA in RD Zellen. Um das Langzeitüberleben der RMS-Zellen zu analysieren, wurde ein klonogener Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen für 48 h mit 10  $\mu\text{g/ml}$  BA behandelt und das Überleben der Zellkolonien nach 8 d anhand einer Kristallviolett färbung ausgewertet. Dabei war ein Verlust des klonogenen Überlebens von 90 % in RMS-13 und von 65 % in RH-30 zu beobachten, während das Langzeitüberleben der RD Zellen kaum beeinflusst wurde (Abb. 15).



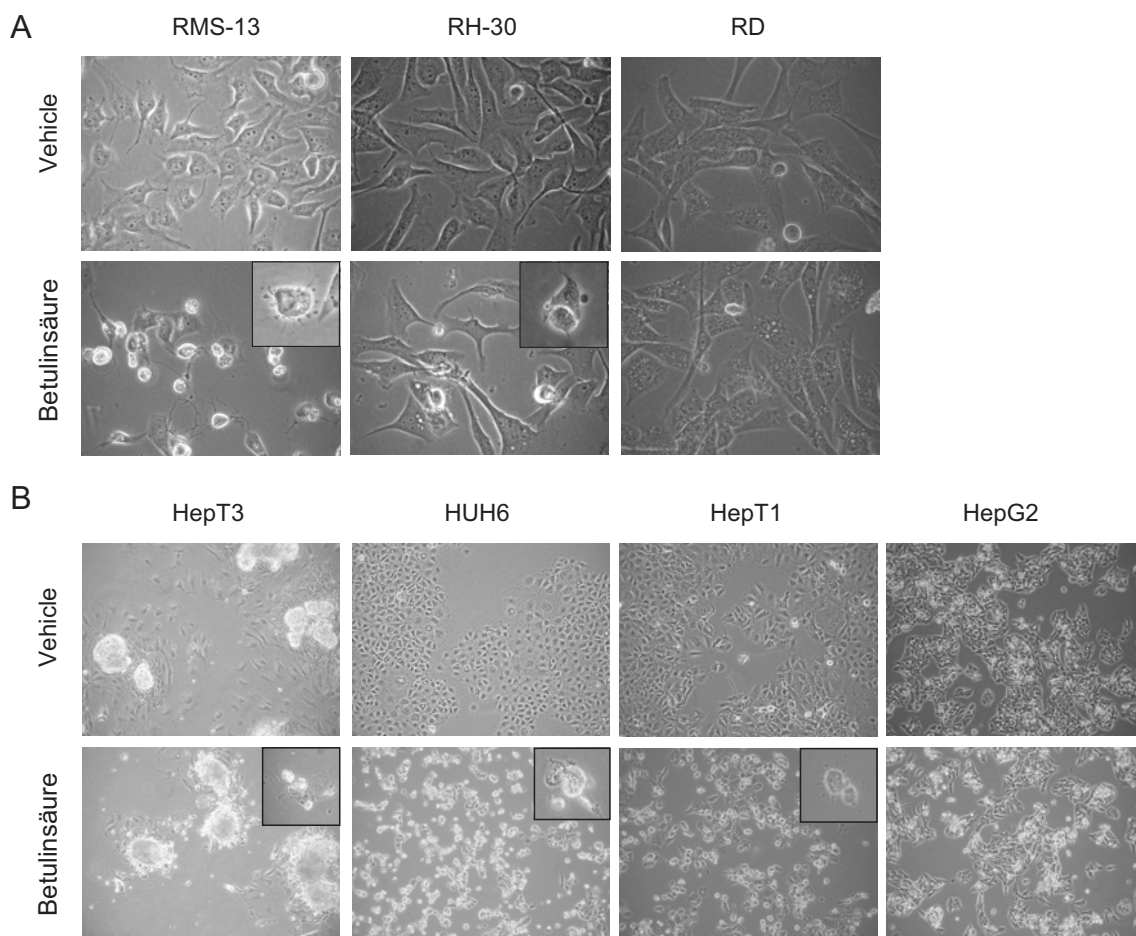
**Abb. 15: Inhibierung des klonogenen Überlebens durch Betulinsäure**

RMS-Zellen wurden für 48 h mit Lösungsmittel oder verschiedenen Konzentrationen Betulinsäure behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Vollmedium weiterkultiviert und nach 8 d mit Kristallviolett gefärbt. Dargestellt sind Bilder der Platten behandelt mit Lösungsmittel oder 10  $\mu\text{g/ml}$  BA eines repräsentativen Experiments. Darunter Mittelwerte und Standardabweichungen der Kolonienauszählung. Mittels ungepaarten Student t-Test wurden statistische Analysen durchgeführt; \*P < 0,05; \*\*P < 0,001.

Die HB-Zellen und die HCC-Zelllinie HepG2 reagierten in den Vitalitätstests, ähnlich den RMS-Zellen, ebenfalls deutlich auf die Behandlung mit BA (Abb. 14C+14D). Anhand der Kurven erschien eine Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  und eine Inkubationszeit von 24 h für HB-Zellen am besten geeignet zu sein. Daher wurden alle weiteren Versuche stets unter diesen Bedingungen durchgeführt. Die IC50-Werte lagen hier bei 2,17  $\mu\text{g/ml}$  BA in HepT3 Zellen, bei 4,70  $\mu\text{g/ml}$  BA in HUH6 Zellen, bei 6,95  $\mu\text{g/ml}$  BA in HepT1 Zellen und bei 2,89  $\mu\text{g/ml}$  BA in HepG2 Zellen. Diese IC50-Werte waren vergleichbar mit den IC50-Werten der auf BA reagierenden RMS-Zellen.

### 5.4.2 Betulinsäure induziert Apoptose in Rhabdomyosarkom- und Hepatoblastom-Zellen

Da in anderen Tumorerkrankungen der anti-tumorigene Effekt von BA durch Induktion von Apoptose hervorgerufen wird (EHRHARDT *et al.* 2004; FULDA and DEBATIN 2000; FULDA *et al.* 1997; PISHA *et al.* 1995), wurden verschiedene Nachweismethoden zur Detektion von Apoptose in RMS- und HB-Zelllinien angewandt. Zu Beginn wurden Apoptose-spezifische morphologische Veränderungen nach BA-Behandlung analysiert. Dabei konnten wir bei den beiden ARMS Zelllinien RH-30 und RMS-13 deutliche Apoptose-spezifische Veränderungen der Morphologie feststellen. So führte die Behandlung mit BA in diesen Zellen zur Zellschrumpfung, Ausstülpungen der Membran, Zellfragmentierung und zur Bildung von „apoptotic bodies“ (Abb. 16A). Die ERMS Zelllinie RD, welche auch schon in den Vitalitätstests insensitiv gegen BA war, zeigte keinerlei morphologische Veränderungen. Bei den HB-Zelllinien HepT3, HUH6 und HepT1 konnten ebenfalls deutliche Apoptose-spezifische morphologische Veränderungen detektiert werden (Abb. 16B). Dagegen konnten bei der HCC-Zelllinie HepG2 keine Morphologieveränderungen beobachtet werden, die auf

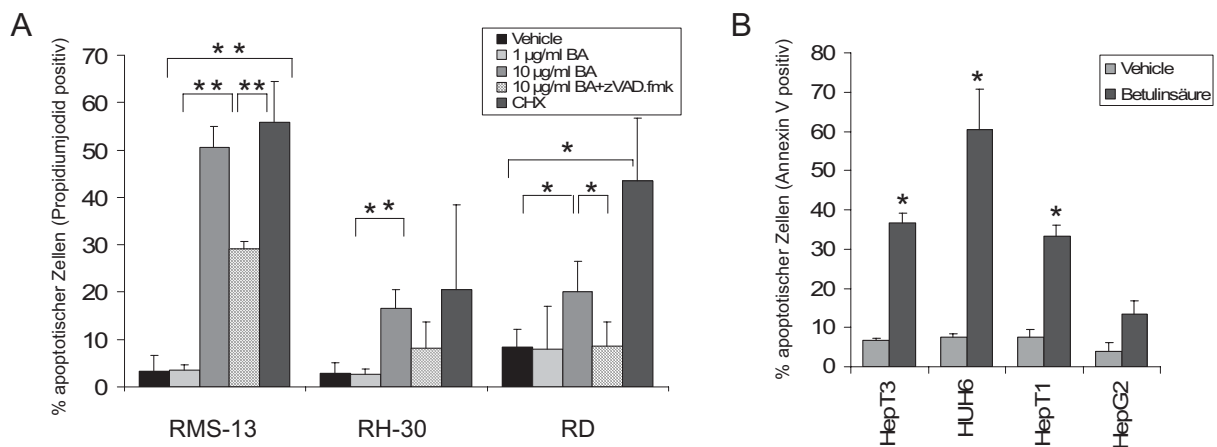


**Abb. 16: Apoptose-spezifische Morphologieänderung nach Betulinsäure-Behandlung**

RMS-Zellen wurden 48 h und HB-Zellen 24 h mit 10 µg/ml BA behandelt. Dargestellt sind typische Veränderungen der Morphologie nach Apoptoseinduktion, sichtbar in RMS-13 und RH-30 Zellen (A), sowie in den HB-Zelllinien HepT3, HUH6 und HepT1 (B). In der embryonalen RMS-Zelllinie RD und der HCC-Zelllinie konnten keine morphologischen Veränderungen detektiert werden. Einsätze zeigen apoptotische Zellen bei einer höheren Vergrößerung.

Apoptoseinduktion hindeuten könnten, obwohl die HCC-Zelllinie im Vitalitätstest ebenfalls eindeutig auf BA reagierte.

In weiteren Apoptoseassays wurden zunächst frühe Stadien der Apoptose untersucht. So wurde für die RMS-Zelllinien eine indirekte Apoptosemessung nach Nicoletti durchgeführt (NICOLETTI *et al.* 1991). Dabei kann anhand der Zunahme des sub-G<sub>1</sub> Peaks die spezifische Apoptoseinduktion bestimmt werden. In RMS-13 Zellen konnte so ein signifikanter Anstieg der DNA-Fragmentierung nach BA-Behandlung detektiert werden (Abb. 17A). Zu einem geringeren, aber ebenfalls signifikanten Prozentsatz konnte dies auch für die RMS-Zelllinien RH-30 und RD beobachtet werden. In allen drei getesteten Zelllinien konnte dieser Anstieg weitestgehend durch den Breitband-Caspase Inhibitor zVAD.fmk gehemmt werden, so dass davon auszugehen ist, dass die Inhibition tatsächlich auf apoptotischen Prozessen basiert. Als Positivkontrolle wurde zudem Cycloheximid (CHX) verwendet, was bei allen getesteten Zelllinien zu einer deutlichen Apoptoseinduktion führte. Bei den HB-Zellen wurde zur Detektion der Apoptose an Stelle des indirekten Nachweises der Apoptose nach Nicoletti ein direkter Apoptosenachweis mittels Annexin V Färbung durchgeführt. Dabei kann durch Bindung von Annexin V an die an die Zelloberfläche translozierten Phosphatidylserinreste die Apoptoseinduktion bestimmt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass es in den drei HB-Zelllinien HepT3, HUH6 und HepT1 zu einer signifikanten Apoptoseinduktion kommt, während in der HCC-Zelllinie HepG2 nahezu keine Apoptose nach Behandlung mit BA detektiert werden konnte (Abb. 17B).



**Abb. 17: Detektion früher Stadien der Apoptose**

(A) DNA Fragmentierung: RMS-Zellen wurden 48 h mit verschiedenen Konzentrationen BA, Lösungsmittel, 50 µM Caspaseinhibitor zVAD.fmk oder 10 µg/ml CHX (Positivkontrolle) inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose-spezifische DNA Fragmentierung mittels Propidiumjodid-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten. (B) Annexin V Färbung: 24 h nach Inkubation der HB-Zellen mit 10 µg/ml BA oder Lösungsmittel wurden die Zellen mit Cy5-markierten Annexin V und Calcein gefärbt und mittels Bioanalyzer analysiert. Experimente wurden zweimal in Dupletten durchgeführt. Dargestellt sind Zellen zu einem frühen Stadium der Apoptose (Annexin V und Calcein positiv). Statistische Analysen wurden in beiden Assays anhand eines ungepaarten Student's t-Test gemacht; \*P < 0,05; \*\*P < 0,001.

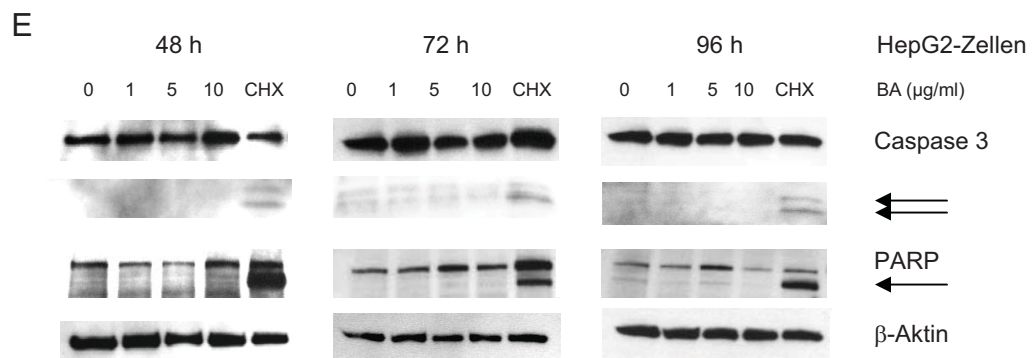
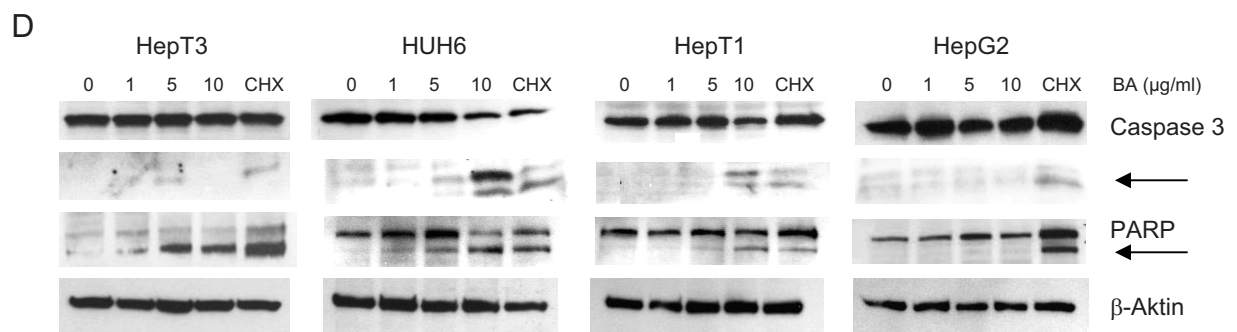
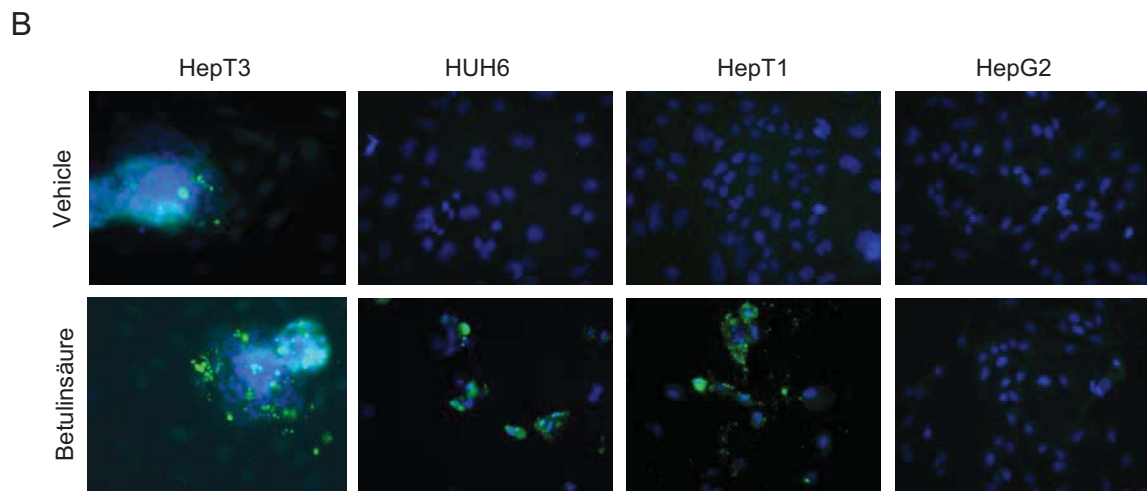
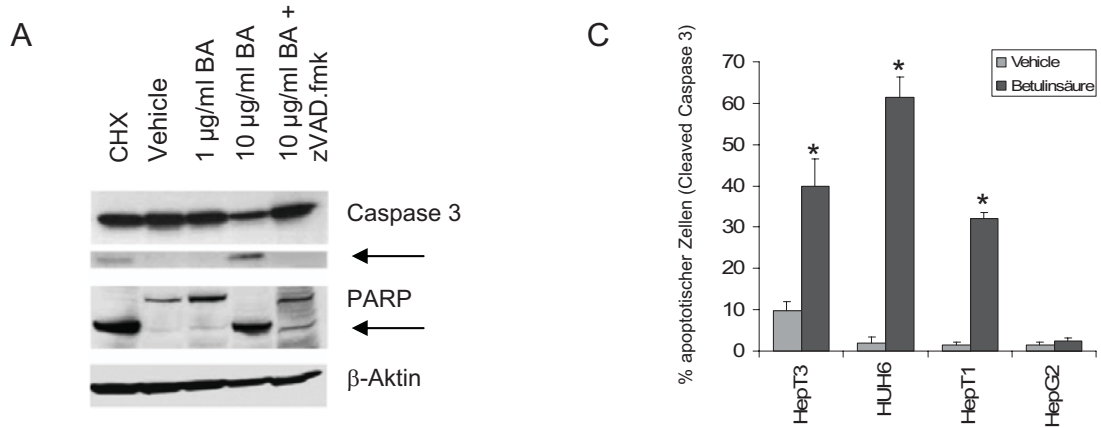
Im nächsten Schritt sollten spätere Stadien der Apoptose durch den Nachweis von Apoptose-spezifischen Proteinen mittels Westernblot analysiert werden. Da bei Induktion der

Apoptose eine Apoptosekaskade aktiviert wird, bei der es zur proteolytischen Spaltung von nacheinander geschalteten Caspasen kommt (CHEN and WANG 2002; KONOPLEVA *et al.* 1999; SOLDANI and SCOVASSI 2002), sollten hier hauptsächlich zwei Schlüsselproteine der Apoptose nachgewiesen werden, die aktivierte Caspase 3 und die durch Cleaved Caspase 3 aktivierte Poly(ADP-Ribose) - Polymerase (PARP). Bei den RMS-Zellen wurde hierfür nur die auf BA am sensitivsten reagierende RMS-13 Zelllinie verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass RMS-13 Zellen 48 h nach Inkubation mit BA sowohl eine Aktivierung von Caspase 3 als auch von PARP aufweisen. Bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Caspase-Inhibitor zVAD.fmk waren diese proteolytisch gespaltenen Proteine nicht mehr detektierbar (Abb. 18A). Als Positivkontrolle zur Induktion der Apoptose wurde auch hier CHX verwendet. BA ist also klar in der Lage, in RMS-Zellen Apoptose zu induzieren.

Des Weiteren wurden auch die HB-Zellen und die HCC-Zelllinie HepG2 auf die proteolytische Spaltung der Apoptose-spezifischen Proteine untersucht. Dabei konnte 24 h nach Inkubation mit BA eine dosisabhängige Aktivierung von Caspase 3 und PARP in den drei HB-Zelllinien HepT3, HUH6 und HepT1 nachgewiesen werden (Abb. 18D). Die HepG2-Zellen zeigten dagegen keine Aktivierung dieser Proteine, auch nicht wenn sie längere Zeit (48 – 92 h) mit BA inkubiert wurden (Abb. 18E). Da CHX als Positivkontrolle in den HepG2 Zellen allerdings Apoptose auslöste, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um einen methodischen Fehler handelt, sondern dass BA in den getesteten HCC-Zellen keine Apoptose zu induzieren vermag, obwohl es nachweislich die Vitalität der Zellen beeinflusst. Um dies nochmals zu bestätigen, wurden 24 h nach BA-Behandlung zusätzlich Immunfluoreszenzen der HB-Zellen angefertigt. Aber auch hier konnten wir nur in den drei HB-Zellen HepT3, HUH6 und HepT1 aktivierte Caspase 3 nachweisen, jedoch nicht in den HepG2-Zellen (Abb. 18B+18C).

**Abb. 18: Detektion Apoptose-spezifischer Proteine (Abb. Nächste Seite)**

(A) Aktivierung von Caspase 3 und PARP in RMS-Zellen: RMS-13 Zellen wurden 48 h mit 0 – 10 µg/ml BA in An- oder Abwesenheit des Breitband Caspaseinhibitors zVAD.fmk (50 µM) behandelt, lysiert und anschließend im Westernblot analysiert. Proteolytisch gespaltenene, aktivierte Caspase 3 und PARP sind mit Pfeilen markiert. CHX (10 µg/ml) diente als Positivkontrolle zur Apoptoseinduktion. Der Nachweis von β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (B+C) Immunfluoreszenz: HB-Zellen wurden 24 h mit BA behandelt und danach immunfluoreszent Cleaved Caspase 3 nachgewiesen. Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und mittels Immunfluoreszenzmikroskop analysiert (B). Die statistische Auswertung der Cleaved Caspase 3 positiven Zellen wurde anhand eines ungepaarten Student's t-Test gemacht (C); \*P < 0,05. (D) Aktivierung von Caspase 3 und PARP in HB-Zellen: Die drei HB-Zelllinien HepT3, HUH6 und HepT1 sowie die HCC-Zelllinie HepG2 wurden 24 h mit verschiedenen Konzentrationen BA behandelt, lysiert und im Westernblot analysiert. Aktive Caspase 3 und PARP sind mit Pfeilen gekennzeichnet. CHX fungierte als Positivkontrolle zur Induktion der Apoptose und β-Aktin als Ladekontrolle für äquivalente Proteinmengen. (E) Aktivierung von Caspase 3 und PARP in HepG2-Zellen: HepG2-Zellen wurden bis zu 96 h mit verschiedenen Konzentrationen von BA behandelt, lysiert und im Westernblot analysiert. Auch hier sind die proteolytisch gespaltenen, aktivierten apoptotischen Proteine mit Pfeilen gekennzeichnet und CHX und β-Aktin dienen zur Kontrolle für die Induktion der Apoptose bzw. für Proteinladung.

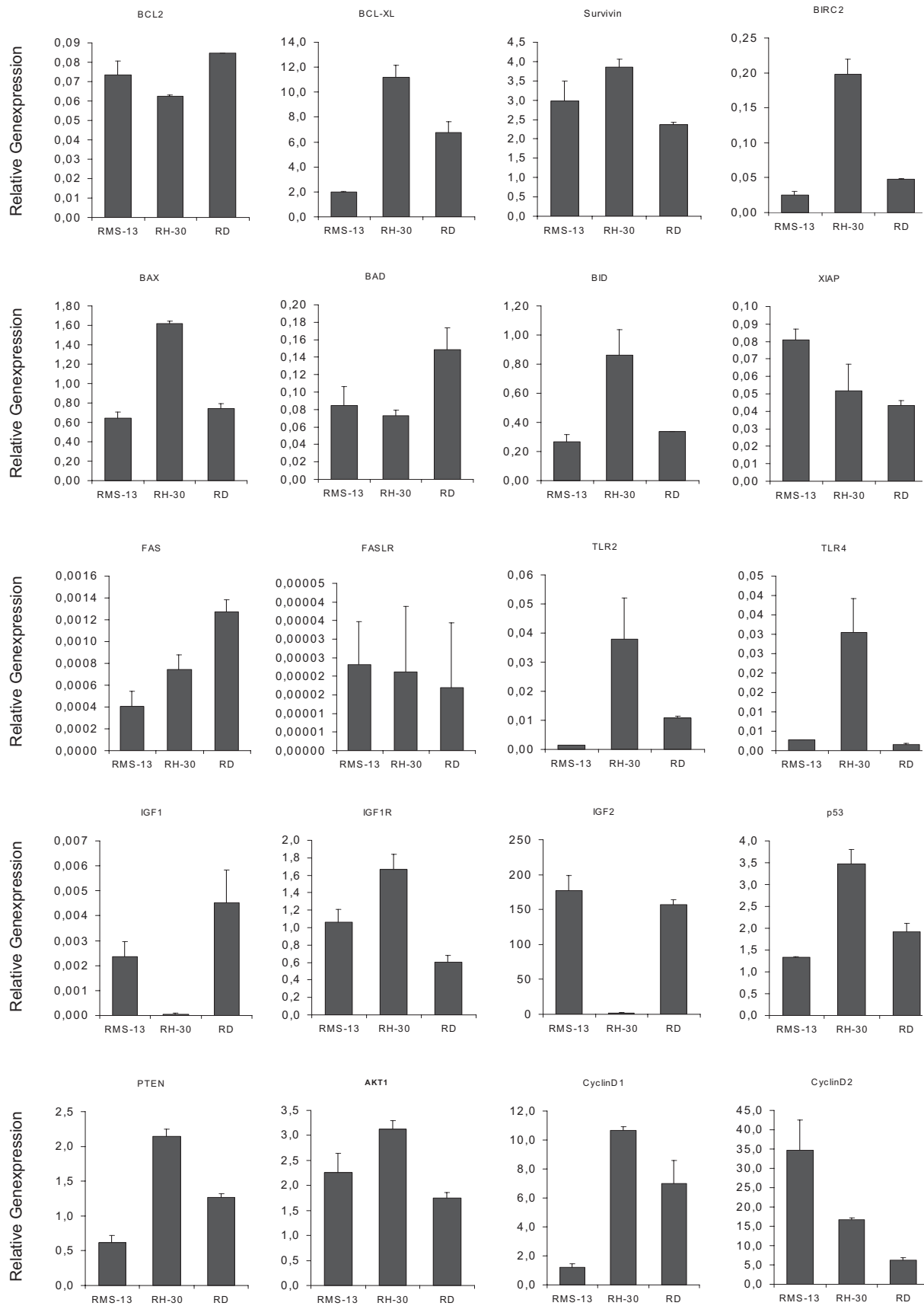




### 5.4.3 Antiapoptotische Mechanismen

Die Tatsache, dass BA die ERMS-Zelllinie RD und vor allem die im Vitalitätstest sensitiv reagierende HepG2-Zelllinie nicht durch Induktion von Apoptose beeinflusst, hat uns dazu veranlasst, den molekularen Hintergrund dieser Beobachtung genauer zu untersuchen. Da bekannt ist, dass ein erhöhtes Level an Survivalgenen Resistenz gegenüber Apoptose vermitteln kann (CORY *et al.* 2003; LI *et al.* 1998; NIEDZIELSKA and KOCKI 2000), wurden in diesem Zusammenhang pro- und anti-apoptotische Gene analysiert. Getestet wurden die pro-apoptotischen Gene *BAD*, *BAX*, *BID*, die anti-apoptotischen Gene *BCL2*, *BCL-XL*, *Survivin (BIRC5)*, *BIRC2*, *XIAP*, sowie andere Apoptose-beeinflussende Gene wie *TP53*, *TLR2*, *TLR4*, *FAS*, *FASLR*, *IRS2*, *MDM2*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGF2*, *PTEN*, *AKT1*, *CyclinD1 (CCND1)* und *Cyclin D2 (CCND2)*.

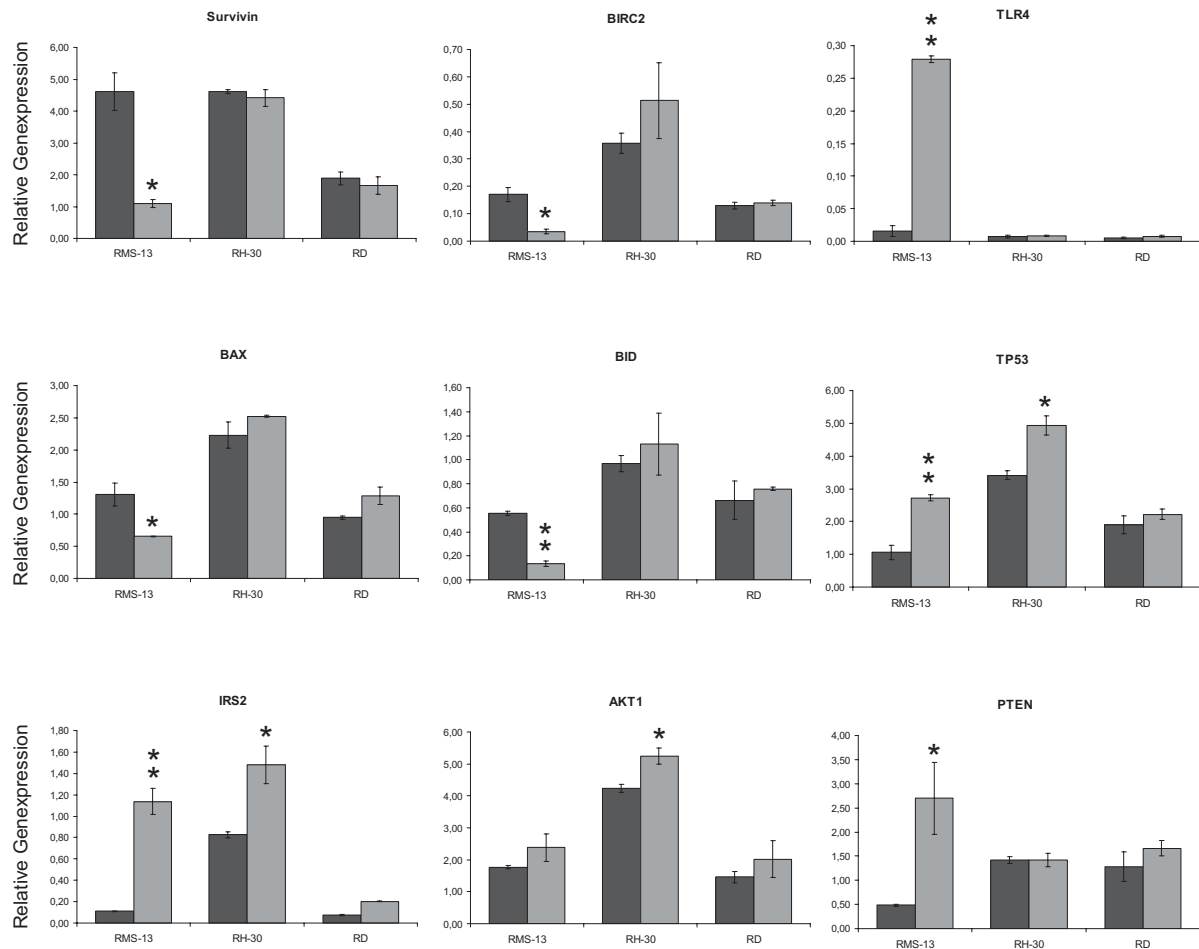
In den RMS-Zelllinien RMS-13, RH-30 und RD konnten wir allerdings keine Hinweise darauf finden, dass die Expression getesteter pro-apoptotischer Gene speziell die Induktion der Apoptose in der sensitivsten Zelllinie RMS-13 begünstigt. Lediglich die Expression der anti-apoptotischen Gene *BCL-XL* und *BIRC2* war verglichen zu den anderen RMS-Zelllinien in den RMS-13 Zellen stark vermindert, was eventuell die höhere Sensitivität der RMS-13 Zellen gegenüber BA erklären könnte. Allerdings fanden wir in den RH-30 Zellen erhöhte Level der pro-apoptotischen Gene *BAX*, *BID*, *TLR2*, *TLR4* und *PTEN*. Diese Apoptose-positiv beeinflussenden Faktoren würden dafür sprechen, dass die Induktion von Apoptose in den RH-30 Zellen erleichtert sein könnte. Was zwar im Vergleich zur BA-insensitiveren RD-Zelllinie durchaus zutrifft, aber nicht bezogen auf die BA-sensitivere RMS-13 Zellen. Außerdem fanden wir keine erhöhte Expression von anti-apoptotischen Genen in der ERMS-Zelllinie RD, die deren Resistenz gegenüber der BA-Behandlung erklären würde (Abb. 19). Insgesamt scheint es bei den RMS-Zellen daher keinen Einfluss pro- bzw. anti-apoptotischer Mechanismen auf die BA-induzierte Apoptose zu geben. Untersucht man allerdings die Expression der Apoptose-beeinflussenden Gene nach BA-Behandlung, so stellt man einige sehr interessante Dinge fest. Beispielsweise sind die anti-apoptotischen Gene *BCL2* (siehe Abb. 24), *Survivin* und *BIRC2* signifikant in RMS-13 Zellen nach BA-Behandlung reduziert (Abb. 20), während die beiden weniger sensitiven Zelllinien RH-30 und RD nicht beeinflusst werden. Allerdings sind auch die pro-apoptotischen Gene *BAX* und *BID* in der sensitiven RMS-13 signifikant reduziert und in den beiden anderen Zelllinien nicht reguliert (Abb. 20). Dies spricht aber dennoch dafür, dass BA gezielt apoptotische Mechanismen zu regulieren scheint. Interessanterweise sind wohl auch Gene des PI3K/AKT-Signalwegs und des TP53-Signalwegs durch BA beeinflusst. So konnte auch gezeigt werden, dass *IGF2* (siehe Abb. 24) runterreguliert wird, und *IRS2* und das inhibitorische Gen *PTEN* in der BA-sensitivsten Zelllinie RMS-13 am deutlichsten hochreguliert werden (Abb. 20). Da nebenbei auch die beiden Gene *IRS2* und *AKT1* in diesem Fall sowohl von der sensitiven RMS-Zelllinie RMS-13 als auch in den insensitiveren Zelllinien RH-30 und RD reguliert zu sein scheinen, ist



**Abb. 19: Expression Apoptose-assoziiierter Gene in Rhabdomyosarkomzellen**

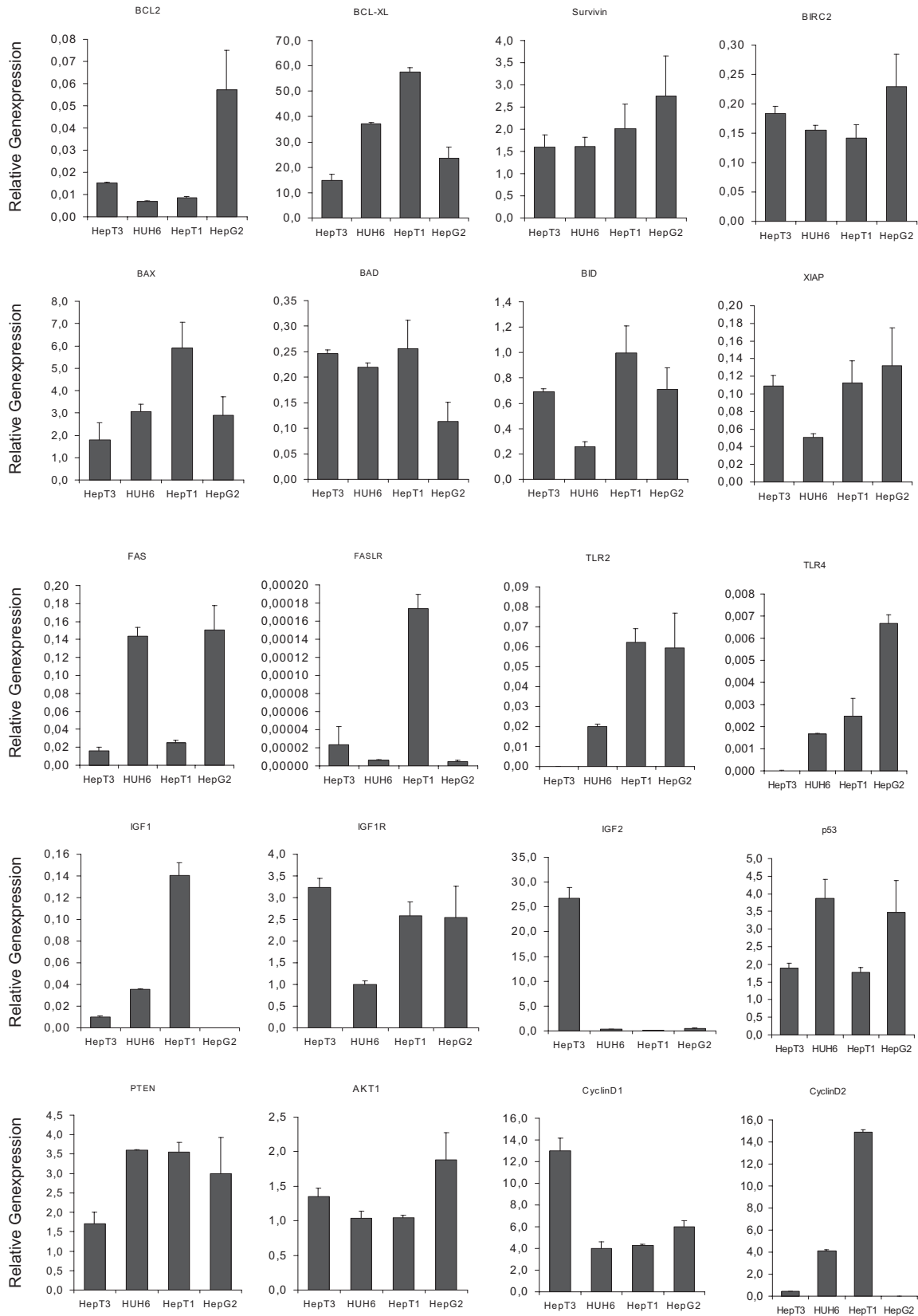
Mittels quantitativer RT-PCR wurden verschiedene Apoptose-relevante Gene in RMS-Zelllinien analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen einer Messung in Dubletten. Das *Housekeeping* Gen *TBP* wurde als Kalibrator verwendet.

davon auszugehen, dass BA prinzipiell diesen PI3K-Signalweg beeinflusst. Darüber hinaus ist interessant, dass das Tumorsuppressorgen *TP53* durch BA hochreguliert ist und zwar in Abhängigkeit der Sensitivität zu BA (Abb. 20). Interessant ist auch zu erwähnen, dass *TLR4* 14-fach hochreguliert wird nach Behandlung mit BA (Abb. 20). Ebenfalls reguliert ist das Zellzyklus-beeinflussende Gen *CCND2* (siehe Abb. 24). In allen anderen untersuchten Genen (*BAD*, *BCL-XL*, *XIAP*, *TLR2*, *FAS*, *FASLR*, *IGF1*, *IGF1R* und *CCND1*) konnte in diesem Zusammenhang kein Unterschied detektiert werden.



**Abb. 20: Beeinflussung Apoptose-assoziiierter Gene in Rhabdomyosarkomzelllinien durch BA**

RMS-Zelllinien wurden 48 h mit 10 µg/ml BA behandelt und anschließend die mRNA Expression der Gene *Survivin*, *BIRC2*, *TLR4*, *BAX*, *BID*, *TP53*, *IRS2*, *AKT1* und *PTEN* bestimmt. Dargestellt ist die *TBP* normierte Expression von unbehandelten (schwarze Balken) oder mit 10 µg/ml BA behandelten (graue Balken) RMS-Zelllinien. Statistische Signifikanz wurde anhand eines ungepaarten Student's t-Test bestimmt; \*P < 0,05; \*\*P < 0,001.



**Abb. 21: Expression Apoptose-assoziiierter Gene in Hepatoblastomzellen**

Mittels quantitativer RT-PCR wurden verschiedene Apoptose-relevante Gene in HB-Zelllinien analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen einer Messung in Dubletten. Das *Housekeeping* Gen *TBP* wurde als Kalibrator verwendet.

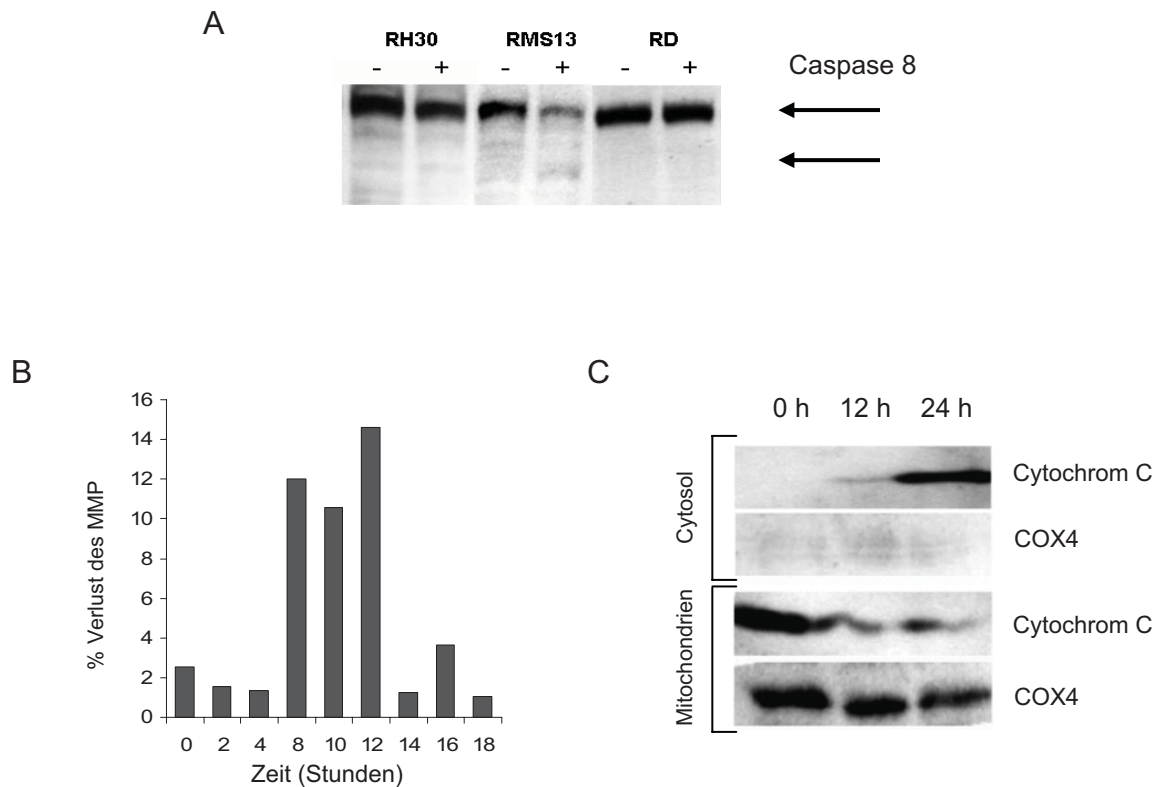
Bei der Analyse der HB-Zellen gegenüber der HCC-Zelllinie HepG2 machten wir allerdings interessante Beobachtungen. So konnten wir eine signifikante Überexpression der anti-apoptotischen Gene *BCL2*, *Survivin*, *BIRC2* und *AKT1* in HepG2-Zellen gegenüber den drei HB-Zelllinien HepT3, HUH6 und HepT1 beobachten (Abb. 21). Die Expression für *BCL2* war dabei bis zu 7-fach und die für *Survivin* 2,5-fach erhöht. Ebenfalls erhöht war die Expression von *TLR4* und tendenziell die des anti-apoptotischen Gens *XIAP*. Dagegen war die Expression des pro-apoptotischen Gens *BAD* um mehr als die Hälfte reduziert in HepG2-Zellen. Dies deutet alles darauf hin, dass die Überexpression von Survivalgenen bzw. die Reduktion von Apoptosegenen in HepG2 ein möglicher Mechanismus der verhinderten Apoptose in HepG2-Zellen sein könnte. In allen anderen untersuchten Genen (*BCL-XL*, *BAX*, *BID*, *FAS*, *FASLR*, *TLR2*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGF2*, *TP53*, *PTEN*, *CCND1* und *CCND2*) konnte in diesem Zusammenhang allerdings kein Unterschied detektiert werden.

#### 5.4.4 Apoptoseinduktion über den intrinsischen, mitochondrialen Signalweg

Prinzipiell kann Apoptose über den Todesrezeptor-vermittelten extrinsischen oder den mitochondrial-vermittelten intrinsischen Apoptosesignalweg induziert werden (MACFARLANE and WILLIAMS 2004; PUTCHA *et al.* 2002). Da aus der Literatur bekannt war, dass die BA-induzierte Apoptose bei anderen Tumoren über den intrinsischen Signalweg ausgelöst wird (FULDA and DEBATIN 2000), sollte hier exemplarisch an einer embryonalen Tumorzelllinie die Verwendung dieses Signalwegs nach Behandlung mit BA bestätigt werden. Um den intrinsischen Apoptoseweg zu untersuchen, kann man beispielsweise Analysen bezüglich der Änderung des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) machen oder die Ausschüttung von Cytochrom C messen. Dies ist möglich, da nach Induktion von Apoptose Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol freigesetzt wird, um dort an Apaf1 zu binden und die Caspasekaskade dadurch in Gang gesetzt wird (GREEN and REED 1998; HAIL *et al.* 2006). Daher kann der Nachweis von Cytochrom C in der cytosolischen Fraktion zur Untersuchung der Apoptoseinduktion herangezogen werden. Im Gegensatz dazu kann man durch den Nachweis von aktivierter Caspase 8, welche eine wichtige Rolle in der Induktion des extrinsischen Apoptosesignalwegs spielt, die Aktivierung dieses Signalwegs entweder bestätigen oder ausschließen.

Trotz der Hinweise aus der Literatur, dass BA Apoptose über den intrinsischen Apoptoseweg induziert, sollte hier zunächst untersucht werden, ob tatsächlich keine Aktivierung von Caspase 8 nach der Behandlung der RMS-Zelllinien mit BA zu beobachten ist. Da allerdings in keiner der getesteten Zelllinien eine Aktivierung von Caspase 8 nachgewiesen werden konnte (Abb. 22A), konnten wir somit eine Induktion von Apoptose über den extrinsischen Apoptoseweg ausschließen. Da der extrinsische Weg ausgeschlossen werden konnte, haben wir daraufhin den intrinsischen Apoptoseweg etwas genauer analysiert. Für die Analyse des intrinsischen Apoptosewegs wurde die äußerst responsiv reagierende RMS-Zelllinie RMS-13 verwendet. Bei der Untersuchung des MMPs stellten wir fest, dass es zu

einer deutlichen Asymmetrie in der Mitochondrienmembran kommt, was letztendlich zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt. Dabei war ein deutliches Maximum 8 – 12 h nach BA-Behandlung zu beobachten (Abb. 22B). Außerdem stellten wir nach Isolierung der Mitochondrien fest, dass es bereits 12 h nach Inkubation mit BA zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol kommt (Abb. 22C). Dieser Effekt war nach 24 h noch wesentlich stärker. COX4, ein Mitochondrien-spezifisches Protein wurde hierbei zur Kontrolle verwendet, um zu zeigen, dass die Auftrennung der mitochondrialen und cytosolischen Fraktionen erfolgreich war. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die BA-induzierte Apoptose auch in RMS-Zellen über den intrinsischen Apoptoseweg initiiert wird.

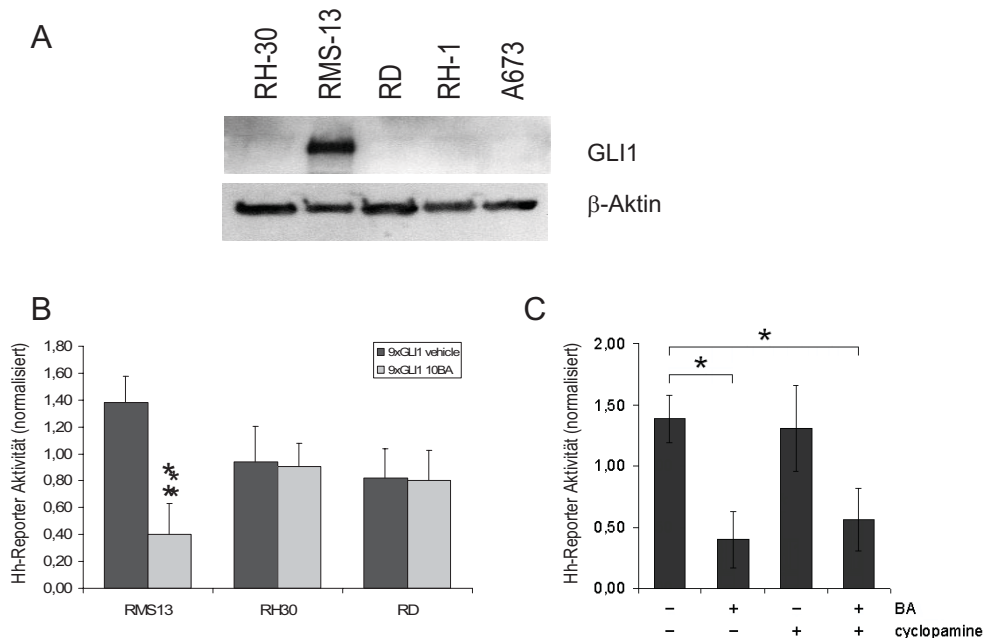


**Abb. 22: Analyse des Apoptose-Signalwegs**

(A) Aktivierung von Caspase 8 in RMS-Zellen: RMS-Zellen wurden 48 h mit 10 µg/ml BA oder Lösungsmittel behandelt, lysiert und anschließend im Westernblot analysiert. Proteolytisch gespaltene, aktivierte Caspase 8 ist mit Pfeilen markiert. (B) Verlust des mitochondrialen Membranpotentials: RMS-13 Zellen wurden für 0 – 18 h mit 10 µg/ml BA behandelt. Anschließend wurde mittels DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Cytochrom C Freisetzung: Nachdem RMS-13 Zellen für 12 bzw. 24 h mit 10 µg/ml BA behandelt wurden, wurde eine Fraktionierung in eine cytosolische und eine mitochondriale Fraktion vorgenommen. Danach wurde mittels Westernblot die Expression von Cytochrom C und eines Mitochondrien-spezifischen Proteins, COX4, in den beiden Fraktionen nachgewiesen.

## 5.5 Beeinflussung des Hh-Signalwegs durch Betulinsäure

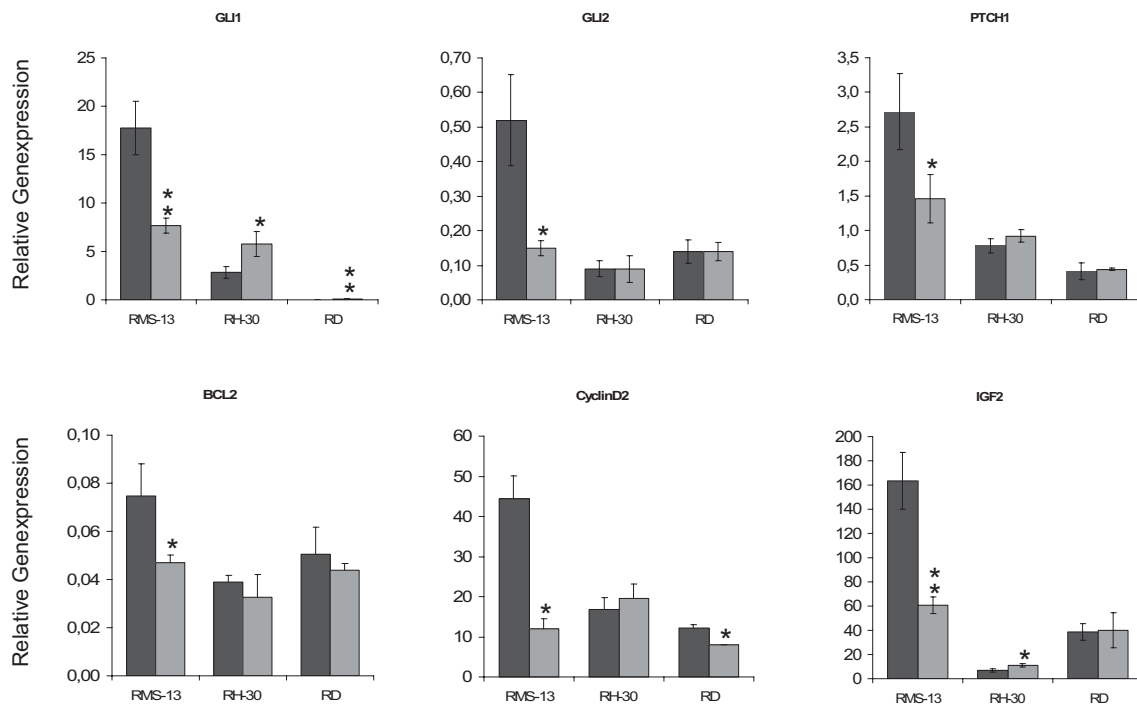
Der Hh-Signalweg spielt in der Embryogenese eine wichtige Rolle und eine Fehlregulation wird häufig im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen des Kindesalters beobachtet (EVANGELISTA *et al.* 2006; RUIZ I ALTABA *et al.* 2002b). Da die BA-sensitive ARMS-Zelllinie RMS-13 eine Amplifikation im *GLI1* Gen und somit einen konstitutiv aktiven Hh-Signalweg aufweist (ROBERTS *et al.* 1989), sollte auch der Einfluss von BA auf den Hh-Signalweg untersucht werden. Um dies zu untersuchen, vergewisserten wir uns, dass diese genomische Alteration wirklich zu einer starken Expression des GLI1-Proteins in RMS-13 Zellen führt. Mittels Westernblot konnten wir dies für die RMS-13 Zelllinie bestätigen (Abb. 23A), während alle anderen untersuchten Zelllinien (RH-30, RD, RH-1 und A673) negativ für GLI1 waren. Auch auf mRNA-Level konnten wir eine deutlich erhöhte Expression der Hh-Targetgene *GLI1*, *GLI2*, *PTCH1*, *BCL2*, *CyclinD2* und *IGF2* in RMS-13 Zellen gegenüber der anderen ARMS-Zelllinie RH-30 und der ERMS-Zelllinie RD feststellen (Abb. 24). Diese Überexpression der sechs untersuchten Gene lies sich durch Inkubation mit BA signifikant in RMS-13 hemmen, während die Expression bei den RH-30 und RD Zellen nahezu unbeeinflusst blieb (Abb. 24). Darüberhinaus konnten wir in einem Hh-responsiven Reporterassay zeigen, dass die RMS-13 Zellen nicht nur gegenüber den beiden anderen



**Abb. 23: Aktivität des Hedgehog Signalwegs in Rhabdomyosarkomen**

(A) In unbehandelten RMS- und Ewingsarkomzelllinien wurde mittels Westernblot die Expression von GLI1 bestimmt.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (B) RMS-Zelllinien wurden mit dem Reporterplasmid 9xGli transient transfiziert und für 48 h mit Lösungsmittel oder 10 mg/ml BA behandelt. Anschließend wurde ein Firefly-Luciferase-Assay durchgeführt und zu Renilla-Luciferase normalisiert. Statistische Analysen wurden anhand eines ungepaarten Student's t-Test durchgeführt; \*\*P < 0,01. (C) RMS-13 Zellen wurden transient mit dem Reporterplasmid 9xGLI1 transfiziert und für 48 h mit Lösungsmittel, 10 mg/ml BA, 7,5  $\mu$ M Cyclopamin oder mit BA und Cyclopamin behandelt. Anschließend wurde ebenfalls ein Luciferase-Assay durchgeführt und zu Renilla-Luciferase normalisiert. Statistische Analysen wurden anhand eines ungepaarten Student's t-Test durchgeführt; \*P < 0,05; \*\*P < 0,001.

RMS-Zelllinien einen aktiven Hh-Signalweg aufweisen, sondern auch, dass diese Aktivität durch BA inhibiert werden konnte (Abb. 23B). Um zu untersuchen, ob diese Inhibition des Signalwegs *upstream* oder *downstream* von GLI1 stattfindet, haben wir die RMS-13 Zellen zusätzlich mit 7,5  $\mu$ M des Smoothend-Inhibitors CyC behandelt. Da sich zeigte, dass die Hemmung des Signalwegs unabhängig von CyC ist (Abb. 23C), lässt sich vermuten, dass die Inhibierung auf der Ebene von GLI1 direkt stattfindet.



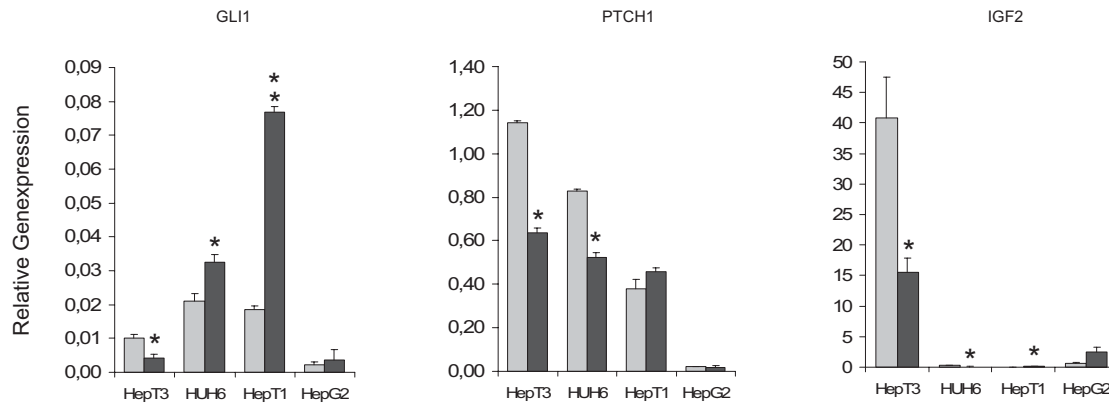
**Abb. 24: Beeinflussung von Hedgehog Zielgenen in Rhabdomyosarkomzelllinien durch BA**

RMS-Zelllinien wurden 48 h mit 10  $\mu$ g/ml BA behandelt und anschließend die mRNA Expression der Gene *GLI1*, *GLI2*, *PTCH1*, *BCL2*, *CyclinD2* und *IGF2* bestimmt. Dargestellt ist die *TBP* normierte Expression von unbehandelten (schwarze Balken) oder mit 10  $\mu$ g/ml BA behandelten (graue Balken) RMS-Zelllinien. Statistische Signifikanz wurde anhand eines ungepaarten Student's t-Test bestimmt; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

Auch bei den HB-Zelllinien sollte die Wirkung von BA auf diesen Signalweg näher untersucht werden, da wir zeigen konnten, dass eine Überexpression von *GLI1* und *PTCH1* in HB weitverbreitet ist, und die beiden HB-Zelllinien HepT3 und HUH6 ebenfalls einen aktiven Hh-Signalweg aufweisen (siehe 5.3.2, Abb. 11A) (EICHENMULLER *et al.* 2009a). Bei der mRNA-Analyse von *GLI1*, *PTCH1* und *IGF2* in HB-Zelllinien konnten wir ebenfalls eine signifikante Reduktion aller drei getesteten Gene in HepT3 und für *PTCH1* und *IGF2* in HUH6-Zellen beobachten (Abb. 25). Im Gegensatz dazu konnten wir in den HepT1- und HepG2-Zellen keine Reduktion des Expressionslevels dieser Gene erkennen, was konform ist mit dem Fehlen eines übermäßig aktivierten Hh-Signalwegs in der HB-Zelllinie HepT1 und der HCC-Zelllinie HepG2 (EICHENMULLER *et al.* 2009a; HUANG *et al.* 2006).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BA den Hh-Signalweg nicht nur bei RMS-Zelllinien, sondern auch bei HB-Zelllinien hemmt.

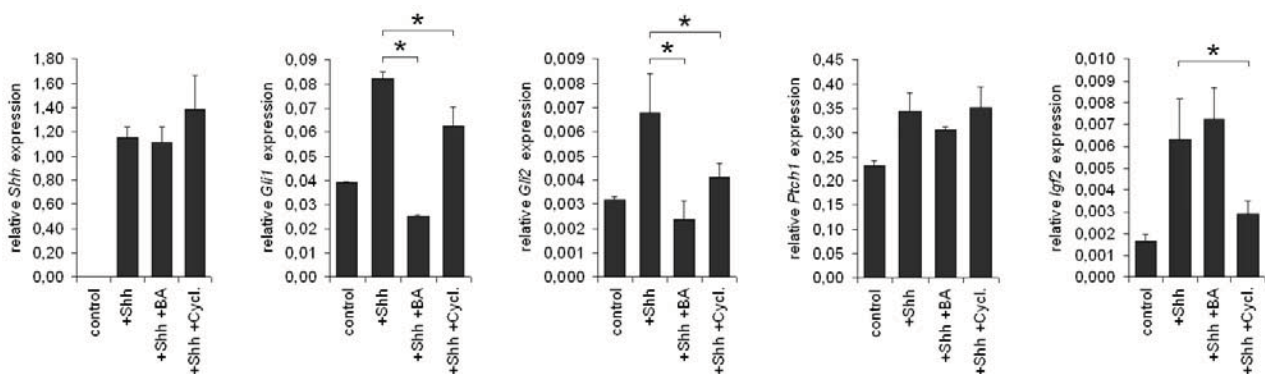




**Abb. 25: Beeinflussung von Hedgehog Zielgenen in Hepatoblastomzelllinien durch BA**

HB-Zelllinien wurden 24 h mit 10 µg/ml BA behandelt und anschließend die mRNA Expression der Gene *GLI1*, *PTCH1* und *IGF2* bestimmt. Dargestellt ist die *TBP* normierte Expression von unbehandelten (graue Balken) und mit 10 µg/ml BA behandelten (schwarze Balken) HB-Zelllinien. Statistische Signifikanz wurde anhand eines ungepaarten Student's t-Test bestimmt; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

Um das Prinzip der Inhibierung des Hh-Signalweges durch BA unter mehr physiologischen Bedingungen zu untersuchen, haben wir untransformierte murine NIH-3T3 Fibroblasten verwendet, die erwiesenermaßen Hh-responsiv sind und somit sensitiv auf eine Stimulierung dieses Signalweges reagieren (TAIPALE *et al.* 2000). Die Aktivierung des Signalweges erfolgte durch transiente Transfektion des *Shh*-Liganden. Dies führte zu einer gesteigerten Expression der Hh-Zielgene *Gli1*, *Gli2*, *Ptch1* und *Igf2* (Abb. 26). Erwartungsgemäß führte die Behandlung der Zellen mit dem Hh-Inhibitor CyC zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression in diesem Aktivitätstest. Interessanterweise zeigte BA einen sehr viel stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Expression der Zielgene *Gli1* und *Gli2*. Die beiden anderen untersuchten Zielgene *Ptch1* und *Igf2* blieben allerdings beinahe unbeeinflusst. Zusammenfassend kann man daraus schließen, dass BA selektiv den Hh-Signalweg beeinflussen kann und zwar wahrscheinlich direkt auf dem Level der Familie der GLI-Transkriptionsfaktoren.

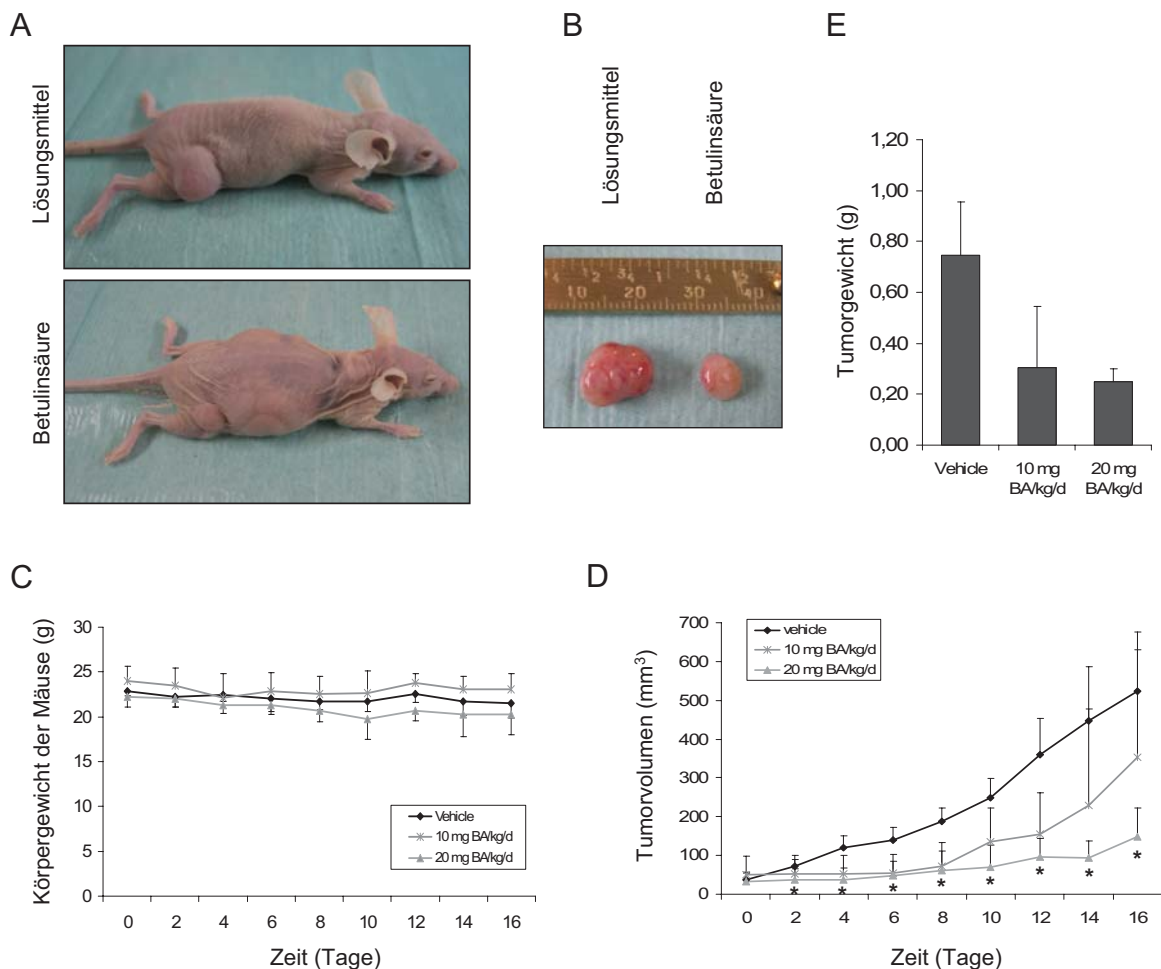


**Abb. 26: Beeinflussung von Hedgehog Zielgenen in NIH-3T3 Fibroblasten**

NIH-3T3 Fibroblasten wurden mit dem *Shh*-Liganden transfiziert, um den Hh-Signalweg zu aktivieren. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 h mit 10 µg/ml BA oder 7,5 µM Cyclopamin behandelt und anschließend die mRNA Expression der Gene *Shh*, *Gli1*, *Gli2*, *Ptch1* und *Igf2* bestimmt. Statistische Signifikanz wurde anhand eines ungepaarten Student's t-Test bestimmt; \*P < 0,05.

## 5.6 Wirkung von Betulinsäure *in vivo*

Nach den ausführlichen *in vitro*-Untersuchungen zur Vitalität, Apoptoseinduktion, der anti-apoptotischen Mechanismen und Analysen zum Signalweg der Apoptose sollte BA nun auch *in vivo* auf eine anti-tumorigene oder pro-apoptotische Wirkung hin getestet werden. In Ermangelung eines genetischen HB-Tiermodells wurde ein RMS-Xenograft Tiermodell etabliert. Zu diesem Zweck wurden BA-sensitive RMS-13 Zellen subkutan in die rechte Flanke (laterale Oberschenkelmuskulatur) narkotisierter, immunsupprimierter Nacktmäuse injiziert. Nach ein bis zwei Wochen kam es zur Manifestation eines deutlich erkenn- und tastbaren Tumors. Bei einer durchschnittlichen Tumorgöße von 0,5 cm Durchmesser wurden die Mäuse randomisiert und mit der BA-Therapie begonnen. Dabei wurde den Mäusen alle zwei Tage Lösungsmittel oder eine Dosis von 10 bzw. 20 mg BA / kg / d



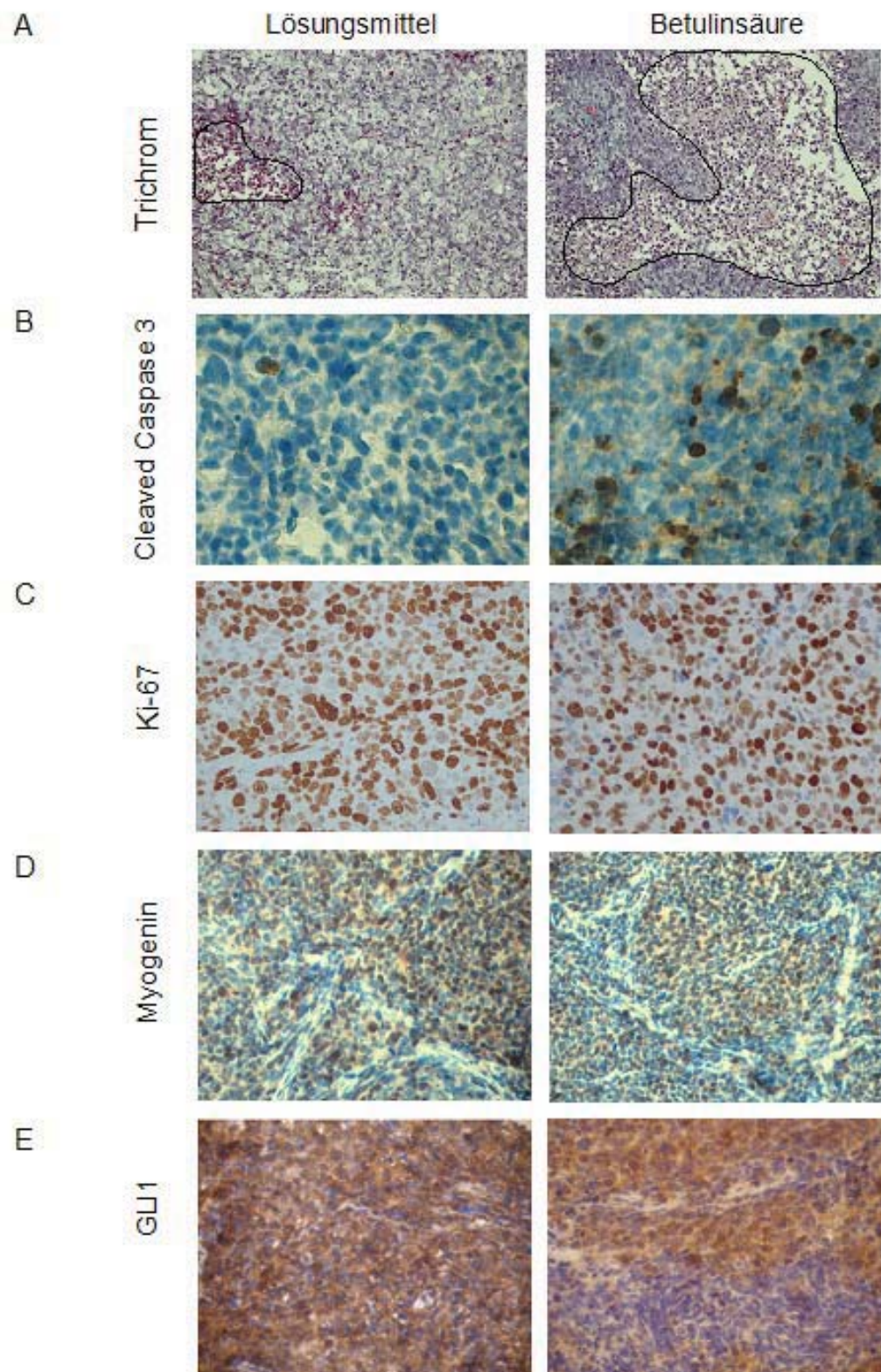
**Abb. 27: Hemmung des Tumorwachstums in RMS-13 Xenografttumoren durch BA**

Weibliche Nacktmäuse mit RMS-13 Xenografttumoren wurden mit 10 bzw. 20 mg BA/kg Körpergewicht/d oder Lösungsmittel behandelt. Nach einer Behandlungszeit von 16 d wurden die Tiere euthanasiert und die Tumore analysiert (A) Visueller Unterschied der 16 d mit Lösungsmittel oder mit 20 mg BA/kg/d behandelten Mäusen. (B) Visueller Größenunterschied der 16 d mit Lösungsmittel oder mit 20 mg BA/kg/d präparierten Tumoren. (C) Konstantes Körpergewicht der Mäuse über die gesamte Behandlungsdauer von 16 d. (D) Statistisch signifikante Reduktion des Tumorwachstums von Lösungsmittel oder mit 20 mg BA/kg/d behandelten Mäusen im Behandlungszeitraum von 16 d. Mäuse die mit 10 mg BA/kg/d behandelt wurden zeigten ebenfalls eine Hemmung des Tumorwachstums gegenüber Lösungsmittel behandelten Mäusen. Statistische Auswertungen wurden mittels ungepaarten Student's t-Test durchgeführt; \*P < 0,05. (E) Statistisch signifikanter Unterschied des Tumorgewichts frisch entnommener Tumore von unbehandelten oder mit 10 bzw. 20 mg BA/kg/d behandelten Mäusen nach 16 d. Die Statistische Auswertung wurde anhand eines ungepaarten Student's t-Test vorgenommen; \*P < 0,05.

intraperitoneal injiziert (jeweils: n=5). Zudem wurden die Mäuse täglich gewogen und die Tumorgroße dokumentiert. Während das Gewicht der Mäuse unabhängig von dem Behandlungsmittel über den Behandlungszeitraum weitestgehend konstant blieb (Abb. 27C), veränderte sich das Tumolvolumen deutlich, so dass zum Ende der Behandlung rein visuell ein deutlicher Unterschied zwischen Lösungsmittel- und mit 20 mg BA / kg / d behandelte Mäuse sichtbar war (Abb. 27A+B). Bei genauerer Messung des Tumolvolumens über den gesamten Behandlungszeitraum stieg das Tumolvolumen der Kontrollgruppe erheblich an, während die mit 20 mg BA / kg / d behandelten Mäuse ein signifikant reduziertes Wachstum zeigten. Das Tumolvolumen der mit 10 mg BA / kg / d behandelten Mäuse lag dabei stets zwischen den beiden Kurven der mit Lösungsmittel oder mit 20 mg BA / kg / d behandelten Mäusen (Abb. 27D). Entsprechend dem Tumolvolumen war auch ein signifikanter Abfall im Tumorgewicht am Ende der BA-Behandlung zu beobachten (Abb. 27E).

Weiterhin wurden molekularbiologische Untersuchungen bezüglich der Expression von Apoptose- oder Hh-assoziierten Genen durchgeführt. Da bei den analysierten Genen (*GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *PTCH1*, *PTCH2*, *SMO*, *SHH*, *IHH*, *N-MYC*, *IGF2*, *BCL2* und *Survivin*) auf RNA-Ebene allerdings kein Unterschied zwischen unbehandelten Tumoren und mit 10 oder 20 mg BA / kg / d behandelten Tumoren festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde in weiteren Experimenten die Expression auf Proteinebene an Hand von immunhistologischen Schnitten näher untersucht.

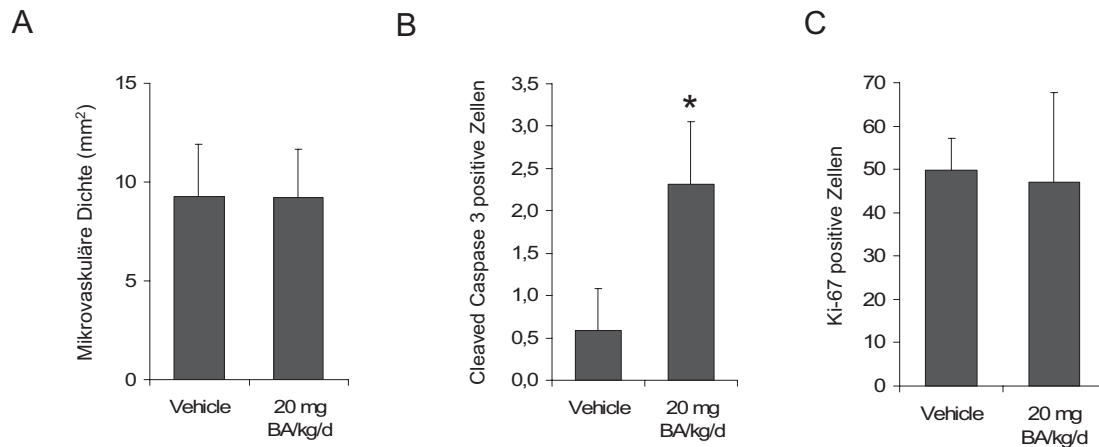
Bei den histologischen Analysen der Tumore wurde zunächst analysiert, ob es durch BA-Behandlung zur Änderung des Differenzierungsgrades der Tumoren kommt und die Tumoren tatsächlich einen myogenen Ursprung haben. Eine Myogenin-Färbung zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Tumoren (Abb. 28D). An histologischen Schnittpräparaten wurden desweiteren Analysen zur Proliferation und Angiogenese sowie zur Abgrenzung zwischen Apoptose und Nekrose durchgeführt. Untersuchungen hinsichtlich der Proliferationsrate mit einem Ki-67 Antikörper, einen Marker der Zellproliferation, zeigten allerdings keine Unterschiede zwischen BA-behandelten Tumoren und unbehandelten Tumoren (Abb. 28C + 29C). Bei der Analyse der mikrovaskulären Dichte, die Aussagen bezüglich der Angiogenese der Xenografttumoren zulässt, fanden wir ebenfalls wie bei der Proliferationsrate und dem Differenzierungsgrad keine Unterschiede zwischen Lösungsmittel- oder BA-behandelten Tumoren (Abb. 29A). Um herauszufinden, ob das verminderte Tumorstadium in den BA-behandelten Mäusen durch Nekrose oder Apoptose zu erklären ist, wurde eine Trichrom-Färbung, mit deren Hilfe man nekrotische Bereiche identifizieren kann, und eine Färbung des Apoptose-spezifischen Caspase 3 Proteins vorgenommen. Beide Färbungen zeigten ein deutlich positives Ergebnis. So waren beispielsweise bei einer Trichrom-Färbung in Tumoren BA-behandelter Mäuse weit größere nekrotische Gewebereiche sichtbar als in Tumoren unbehandelter Mäuse (Abb. 28A). Interessanter war allerdings auch, dass wir bei immunhistologischen Färbungen



**Abb. 28: Histologische Analyse der RMS-13 Xenografttumoren nach BA-Behandlung**

Repräsentative Fotografien von immunhistochemischen Färbungen von mit Lösungsmittel oder mit 20 mg BA/kg/d behandelten Tumoren. (A) Färbungen mit Trichrom zeigen große nekrotische Areale innerhalb der Tumore behandelt mit 20 mg BA/kg/d (markiert durch eine schwarze Linie). (B) Cleaved Caspase 3 positive Zellen weisen auf eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen hin. (C) Proliferation der Zellen, dargestellt durch Ki-67 Färbung; annähernd gleich in behandelten und unbehandelten Tumoren. (D) Nachweis des myogenen Markers Myogenin in mit Lösungsmittel oder mit 20 mg BA/kg/d behandelten Tumoren. (E) Reduktion des Hedgehog-Zielgenes GLI1 durch BA Behandlung.

gegen Cleaved Caspase 3 Bereiche mit einer signifikant erhöhten Apoptoserate in Tumoren BA-behandelter Mäuse gegenüber den Tumoren von unbehandelten Mäusen fanden (Abb. 28B + 29B). Dies würde die *in vitro* Ergebnisse bestätigen, dass BA in der Lage ist, Apoptose in RMS-Tumoren zu induzieren. Allerdings scheint in unserem Tiermodell teilweise auch Nekrose eine Rolle beim verringertem Wachstum der BA-behandelten Tumore zu spielen.



**Abb. 29: Histologische Veränderungen der RMS-13 Xenograftumoren nach BA-Behandlung**

Quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen von mit Lösungsmittel oder mit 20 mg BA/kg/d behandelten Tumoren. Dargestellt sind statistische Analysen von CD31- (A), Cleaved Caspase 3- (B) und Ki-67 (C) positiven Zellen; \*P < 0,05 (ungepaarter Student's t-Tests).

Da BA *in vitro* zur Inhibierung des Hh-Signalwegs führte (siehe Abschnitt 5.5.), sollten immunhistochemische Untersuchungen bzgl. der Hemmung dieses Signalwegs auch *in vivo* durchgeführt werden. Expressionanalysen des Gli-Transkriptionsfaktor zeigten auf Proteinebene eine leichte Reduktion von GLI1 in BA-behandelten Tumoren im Vergleich zu unbehandelten Tumoren (Abb. 28E). Dies würde sich auch mit den *in vitro* Daten über die Beeinflussung des Hh-Signalwegs durch BA decken.

Zusammenfassend deuten diese *in vivo* Ergebnisse im Tiermodell stark darauf hin, dass BA durch eine selektive Aktivierung von apoptotischen Mechanismen und durch Inhibierung des Hh-Signalwegs ohne Beeinflussung der Proliferation, Differenzierung oder Angiogenese, ein vielversprechender Inhibitor des RMS-Wachstums sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist.

## 6 Diskussion

Trotz der Entwicklung von multimodalen Therapien für aggressive kindliche Tumorerkrankungen basiert die aktuelle Therapie beispielsweise für das HB immer noch auf dem Zusammenwirken von Chemotherapie und der möglichst vollständigen operativen Entfernung des Tumors. Obwohl bei Hochrisikopatienten eine chemotherapeutische Vorbehandlung zur Reduktion des Tumors und der Metastasen unerlässlich ist (VON SCHWEINITZ 2006; VON SCHWEINITZ *et al.* 1995), kommt es dennoch häufig zur Entstehung von Metastasen, was die Heilungschancen verschlechtert und weitere Chemotherapiezyklen nötig macht. Die Heilungsrate für RMS liegt trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten noch unter 70 % (OBERLIN *et al.* 2008). Das Versagen der Therapie ist dabei meist auf die Entstehung von Resistenzen gegenüber den verwendeten chemotherapeutischen Substanzen zurückzuführen. Daher ist es unabdingbar, neue wirkungsvollere Substanzen zu entwickeln, um die Überlebenschancen der Kinder mit HB oder RMS zu verbessern. Da in Vergangenheit gezeigt werden konnte, dass es in RMS zu einer Aktivierung von Survivalfaktoren und anti-apoptischen Proteinen wie Akt und Bcl-2 kommt (ARMISTEAD *et al.* 2007; KAPPLER *et al.* 2003), wäre es möglich, dass die bei der Behandlung der Tumoren entstehenden Resistenzen mit der Unfähigkeit der Zellen in Apoptose zu gehen assoziiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir nun zeigen, dass der pflanzliche Wirkstoff CyC in der Lage ist, in HB-Zellen Apoptose zu induzieren und dass der ebenfalls pflanzliche Wirkstoff BA sowohl in HB- als auch in RMS-Tumorzellen Apoptose auslöst. Im Fall von BA wird die Apoptose dabei über den intrinsischen mitochondrialen Apoptosesignalweg ausgelöst. Dabei war der apoptotische Effekt nicht nur auf Tumorzellebene in Zellkultur beschränkt, sondern ließ sich auch in einem RMS-Xenograftmodell nachweisen. Interessanterweise konnten wir in HB- und RMS-Zellen einen inhibitorischen Effekt von BA auf den Hh-Signalweg beobachten, da BA das Expressionslevel der Hh-Zielgene *GLI1*, *GLI2*, *PTCH1* und *IGF2* signifikant reduzierte. Auch *in vivo* zeigte sich unter BA-Behandlung eine Abschwächung dieses Signalwegs. Diese Ergebnisse zeigen insgesamt, dass die Behandlung mit CyC oder mit BA ein großes Potential zur Therapie von HB und RMS besitzt.

### 6.1 Apoptose regulierender PI3K/AKT-Signalweg in embryonalen Tumoren

Im Zusammenhang mit dem Überlebensvorteil von Tumorzellen gegenüber normalen Zellpopulationen findet man in einer Vielzahl von humanen Tumorerkrankungen, speziell auch in frühen kindlichen Tumorerkrankungen, eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs und damit ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen (SCOTTING *et al.* 2005; YUAN and CANTLEY 2008). Dabei spielt vor allem die Aktivierung durch Phosphorylierung der Serin/Threonin Kinase-AKT durch andere Kinasen (PI3K, PDK1) eine zentrale Rolle. Da

dieser Signalweg in vielen Tumorerkrankungen dereguliert zu sein scheint, ist es nicht verwunderlich, dass Inhibitoren dieses Signalwegs als Therapeutika für Tumorerkrankungen erprobt werden (PORTA and FIGLIN 2009). Neben der Beeinflussung des Zellwachstums, der Proliferation, des Zellzyklus und der Differenzierung, löst die Aktivierung von AKT unter anderem eine Inaktivierung von pro-apoptotischen Faktoren aus, was wiederum einen Überlebensvorteil für die Tumorzellen darstellt (MANNING and CANTLEY 2007). In unseren Untersuchungen konnten wir nun zeigen, dass etwa 71 % (10 von 14) der getesteten kindlichen Tumorzelllinien (RMS, HB, Medulloblastom, Neuroblastom und ein epitheloides Sarkom) einen aktivierten PI3K/AKT-Signalweg aufweisen, wobei es weder bei den analysierten RMS- noch bei den HB-Zelllinien auf den histologischen Subtyp ankommen schien. Eine Erklärung für einen aktiven PI3K/AKT-Signalweg könnte beispielweise die Überexpression von *IGF2* sein. *IGF2* ist ein wichtiger fetaler Wachstumsfaktor, der durch Bindung an den IGF1-Rezeptor den PI3K/AKT-Signalweg beeinflusst und proliferative und anti-apoptotische Effekte auslöst. Daher könnte es sein, dass eine Überexpression von *IGF2*, welche weitverbreitet ist in HB (GRAY *et al.* 2000; HARTMANN *et al.* 2000) und auch im Rahmen dieser Arbeit in den AKT-aktivierten RMS-Zelllinien RMS-13 und RD nachgewiesen wurde, zu einem autokrinen Regulationskreislauf führt, der zu einer konstitutiven Aktivierung des Tumorwachstums beiträgt. Dennoch ist es nicht zwingend, dass die nachgewiesene *IGF2*-Überexpression primär und damit ursächlich für den Tumor ist. Eine vor kurzem erschienene Arbeit der Arbeitsgruppe Pietsch beschäftigte sich auch mit der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs in HB. Dabei konnten sie zeigen, dass 79 % der getesteten Primärtumore einen aktiven PI3K/AKT-Signalweg haben und Effektorproteine dieses Signalwegs wie p-GSK3 $\beta$  und p-mTOR vermehrt aktiviert sind. Dies ist konform mit unseren Ergebnissen, da auch wir in unseren drei getesteten Tumorzelllinien eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweg nachweisen konnten (siehe 5.1; (EICHENMULLER *et al.* 2009b)). Die Arbeitsgruppe von Pietsch hat in diesem Zusammenhang auch in einigen Tumoren eine PI3K/AKT-Signalweg aktivierende Mutation im *PI3KCA*-Gen gefunden. Eine Inhibierung des Signalwegs in den HB-Zelllinien HUH6 und HepT1, welche auch von uns verwendet wurden, zeigte zudem eine verminderte Proliferation der Zellen, verringerte Phosphorylierung der Zielproteine AKT und GSK3 $\beta$  sowie eine vermehrte Induktion von Apoptose. Diese Ergebnisse zeigen neben den von uns hier dargestellten Daten, dass der PI3K/AKT-Signalweg eine essentielle Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum vieler HBs zu haben scheint. Außerdem konnten Pietsch und Kollegen zeigen, dass die Inhibierung des PI3K/AKT-Signalwegs zu einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber der Behandlung mit anderen chemotherapeutischen Substanzen wie Cisplatin und Doxorubicin führt (HARTMANN *et al.* 2009). Somit könnten Inhibitoren des PI3K/AKT-Signalwegs sich nicht nur als eigenständige Substanzen, sondern auch durch ihre synergetische Wirkung mit herkömmlichen Chemotherapeutika als vielversprechenden Ansatzpunkt zur Therapie von Tumorerkrankungen mit aktiven PI3K/AKT-Signalweg herausstellen.

## 6.2 Hh-Signalweg und HHIP in Hepatoblastomen

In embryonalen Tumorerkrankungen spielen neben dem aktiven PI3K/AKT-Signalweg auch noch der WNT-Signalweg, der TGF $\beta$ -Signalweg, der Notch-Signalweg, und der Sonic-Hedgehog Signalweg (GERHART 1999) eine wichtige Rolle. In HB- und HCC- Tumoren haben wir nun interessanterweise festgestellt, dass auch der Hh-Signalweg aktiv ist und dass in diesen embryonalen Tumoren *HHIP* herunterreguliert ist. Die Aktivierung des Hh-Signalwegs wurde dabei durch erhöhte Expression der Hh-Zielgene *GLI1*, *GLI2*, *PTCH1* und *BCL2* detektiert und deckt sich zudem mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls, allerdings in Lebertumoren von Erwachsenen, eine Überexpression von *GLI1* und *PTCH1* beschrieben haben (HUANG *et al.* 2006; PATIL *et al.* 2006; SICKLICK *et al.* 2006). Als Aktivatoren des Signalwegs kommen hierbei beispielsweise die Hh-Liganden, *SHH*, *IHH* und *DHH* in Frage. In unseren Untersuchungen haben wir in den HB- und HCC-Tumoren eine Überexpression von *IHH* gegenüber normalen kindlichen Leberproben beobachtet. Dies legt den Schluss nahe, dass in embryonalen Tumoren *IHH* als Aktivator des Hh-Signalwegs fungieren könnte. Interessanterweise ist diese Funktionsweise tatsächlich für differenzierte Cholangiozyten beschrieben worden, da diese *IHH* und nicht *SHH* exprimieren (OMENETTI *et al.* 2007). Allerdings gibt es auch Belege für die Aktivität von *SHH* in der Leber und in Lebertumoren. So konnte eine weitere Arbeitsgruppen zeigen, dass *SHH* in vergleichbaren Mengen in fetaler und adulter Leber gebildet wird (KIM *et al.* 2007), während eine andere Gruppe signifikante Veränderungen der *SHH*-Expression in Tumor- und Normalgewebe aus der Leber zeigen konnten (HUANG *et al.* 2006). Welcher Ligand nun aber genau für die Aktivierung des Hh-Signalwegs in Lebertumoren verantwortlich ist, oder ob die Aktivierung abhängig vom Tumortyp ist, muss in Zukunft noch genauer untersucht werden.

Die beobachtete verminderte Expression von *HHIP* stellt einen alternativen Mechanismus der Aktivierung des Hh-Signalwegs dar und wird vermutlich durch Hypermethylierung der CpG-Inseln verursacht. Dies konnte beispielsweise in Tumoren des Pankreas (MARTIN *et al.* 2005) und für gastrointestinale Tumore (TANIGUCHI *et al.* 2007) oder HCC (TADA *et al.* 2008), bereits gezeigt werden, und konnte auch von unserer Arbeitsgruppe kürzlich für HCC und HB bestätigt werden (EICHENMULLER *et al.* 2009a). Neben der Methylierung von *HHIP* in Tumoren konnten auch Deletionen im *HHIP*-Lokus in HB Fällen (SUZUKI *et al.* 2008; WEBER *et al.* 2000) und LOH in HCC (TADA *et al.* 2008) nachgewiesen werden. Die Assoziation verschiedener Defekte in einem Locus legt den Schluss nahe, dass *HHIP* eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung bzw. in der Tumorermeidung spielt. Der aktivierte Hh-Signalweg käme dann demnach durch den Verlust des negativen regulatorischen Feedback-Loops durch *HHIP* zu Stande, da *HHIP* als negativer Regulator des Hh-Signalwegs diesen dann nicht mehr inhibieren kann. Die Wiederherstellung der Funktion von *HHIP* könnte daher eventuell auch ein weiterer Ansatz zur Therapie von Tumoren mit aktivem Hh-Signalweg sein.



### **6.3 Wirkung von Phytotherapeutika**

Basierend auf diesen beiden Beobachtungen haben wir verschiedene Substanzen untersucht, die möglicherweise in kindlichen Tumorerkrankungen gezielt Apoptose induzieren oder den Hh-Signalweg beeinflussen können. Dabei haben wir diverse CDK-Inhibitoren und andere selektiv wirksame Natursubstanzen wie EGCG, CyC oder BA getestet. In den untersuchten embryonalen Tumorzellen konnten wir allerdings bei keinem der getesteten CDK-Inhibitoren eine tumorspezifische Inhibition der Vitalität beobachten, da selbst die getesteten Normalzellen, in unserem Fall normale undifferenzierte Hautfibroblasten, in gleicher Weise wie die Tumorzelllinien auf die Behandlung mit den CDK-Inhibitoren reagierten. Dies steht im Kontrast zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die nachweislich in anderen Tumoren durch die Behandlung mit den CDK-Inhibitoren Olomoucine oder Roscovitine eine Inhibierung des Tumorwachstums und anti-proliferative Effekte zeigen konnten (BOUTIS *et al.* 2006; FESTA *et al.* 2009; GOODYEAR and SHARMA 2007; KRYSTOF *et al.* 2005), sich bei der Wirkungsanalyse aber nur auf Tumorzellen beschränkten. Sie kamen hierbei meist zu dem Schluß, dass die CDK-Inhibitoren den Effekt anderer Chemotherapeutika nur verstärken, bzw. nur in hohen Konzentrationen in der Lage sind, Apoptose zu induzieren (EDAMATSU *et al.* 2000). Der getestete WNT-Inhibitor EGCG, der Hh-Inhibitor CyC und der Apoptoseinduktor BA zeigten jedoch eine signifikante Reduktion der Zellvitalität in den untersuchten Tumorzelllinien. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen, die ebenfalls bestätigen konnten, dass sowohl EGCG (CHEN *et al.* 2008; WU *et al.* 2009), als auch CyC (WARZECHA *et al.* 2008; XU *et al.* 2009) und BA (FULDA *et al.* 1999b; SCHMIDT *et al.* 1997) in verschiedenen Tumoren die Zellproliferation beeinflussen bzw. Apoptose zu induzieren vermögen.

### **6.4 Apoptose-Induktion durch Betulinsäure**

Durch weitere Analysen bezüglich morphologischer Veränderungen, DNA-Fragmentierung und den Nachweis von proteolytischen Spaltprodukten von Caspase 3 und PARP konnten wir desweiteren eindeutig nachweisen, dass BA sowohl in den HB- als auch in RMS-Zellen Apoptose auslöst. Darüberhinaus konnte dieser apoptotische Effekt signifikant durch den Breitband-Caspaseinhibitor zVAD.fmk gehemmt werden. Bei der genaueren Analyse des durch BA ausgelösten Apoptose-Signalwegs konnten wir durch Nachweis des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials und der Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Cytosol in RMS-Zellen zeigen, dass durch BA-Behandlung der intrinsische Apoptoseweg induziert wird. Diese Ergebnisse decken sich mit Analysen aus der Literatur, in denen beschrieben wurde, dass die BA-induzierte Apoptose nicht durch den CD95- oder Todesrezeptor vermittelten extrinsischen Apoptoseweg, sondern über den mitochondrialen intrinsischen Weg ausgelöst wird (FULDA *et al.* 1997; FULDA *et al.* 1998; JOHNSTONE *et al.* 2002). Da auch von uns keine Aktivierung der Caspase 8 in BA-

behandelten Zellen nachgewiesen werden konnte, schließt das unsererseits, in Übereinstimmung mit der Literatur, eine Beteiligung des Todesrezeptor vermittelten extrinsischen Apoptose-Signalwegs in RMS-Zellen aus. So liegt der Schluss nahe, dass BA in den verschiedensten Tumoren immer auf dieselbe Art und Weise wirkt. Da BA einen direkten Einfluss auf die Mitochondrien-abhängige Apoptose hat, und daher auf einen weiter unten gelegenen Level als über Todesrezeptoren in die Induktion von Apoptose eingreift, wäre es vielleicht von Vorteil, gerade auch solche Tumore mit BA zu behandeln, bei denen *upstream* gelegene Signale des Apoptosewegs unterbrochen sind. In diesem Zusammenhang wäre beispielsweise das Tumorsuppressorprotein *TP53* zu erwähnen, welches als zelluläre Reaktion auf Stress, wie DNA-Schäden oder Hypoxie, oder Onkogenaktivierung, abhängig vom Zelltyp und den jeweilig vorherrschenden Bedingungen, entweder das Wachstum inhibieren oder Apoptose induzieren kann (VOUSDEN and LU 2002). In unseren Analysen der RMS-Zelllinien konnten wir nämlich zeigen, dass die BA-induzierte Apoptose *TP53* unabhängig zu sein scheint, da sowohl die RMS-13 Zelllinie mit Wildtyp *TP53* (MULLER *et al.* 2007) als auch die Zelllinie RH-30 mit mutiertem *TP53* (BARLOW *et al.* 2006) auf die BA-Behandlung reagierten, wohingegen die RD-Zelllinie mit ebenfalls mutierten *TP53* (BARLOW *et al.* 2006) nicht auf die Behandlung mit BA ansprach. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an Neuroblastomen, wo ebenfalls keine Assoziation zwischen den *TP53*-Status und der BA-induzierten Apoptose festgestellt wurde (FULDA *et al.* 1997). Um diesen Zusammenhang weiter zu belegen, wäre es allerdings notwendig, z. B. in den RD-Zellen einen weiteren Mechanismus zu entdecken, der die Apoptose noch unterhalb des Interaktionslevels von BA und *TP53* verhindern kann.

## 6.5 Pro- und Anti-Apoptosefaktoren

Die Unfähigkeit der RD und HepG2-Zellen nach BA-Behandlung in Apoptose zu gehen, zeigte uns, dass BA nicht ubiquitär wirksam ist und veranlasste uns dazu den möglichen Einfluss der Expression von pro- und anti-apoptotischen Genen auf die Apoptoseinduktion zu analysieren. Hinsichtlich der getesteten Gene konnten wir in den RD-Zellen, verglichen mit den anderen getesteten RMS-Zelllinien RMS-13 und RH-30 jedoch keinen richtungsweisenden Unterschied in der Expression dieser Gene detektieren. Bei den HCC-Zellen HepG2 fanden wir jedoch im Vergleich zu den HB-Zellen HUH6, HepT1 und HepT3 eine mögliche Erklärung für die Resistenz der HepG2-Zellen, nämlich die gesteigerte Expression der anti-apoptotischen Gene *BCL2* und *Survivin*. In diesem Zusammenhang konnten auch andere Arbeitsgruppen zeigen, dass sowohl *BCL2* als auch *Survivin* die Induktion von Apoptose über den intrinsischen mitochondrialen Apoptoseweg inhibieren kann (CERTO *et al.* 2006; DOHI *et al.* 2004). Außerdem zeigen die zahlreichen intensiven Bemühungen, die intrinsische Expression von *BCL2* und *Survivin* in pädiatrischen Lebertumoren zu modulieren, um die Insensitivität von einigen Chemotherapeutika oder

Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber Apoptose-induzierender Substanzen zu relativieren, dass diese beiden Gene eine nicht unwesentliche Relevanz hinsichtlich verminderter Apoptoseinduktion aufweisen (LI *et al.* 2003; WARMANN *et al.* 2008; ZHANG *et al.* 2003). Dies deutet darauf hin, dass eine gezielte Verminderung der Expression von Survivalgenen kombiniert mit einer konventionellen Chemotherapie ein Ansatz zur Behandlung von resistenten Tumoren sein könnte.

## **6.6 Angiogenese und Betulinsäure**

Neben der Induktion von Apoptose spielt auch die Inhibierung der Angiogenese eine wichtige Rolle bei Therapieansätzen einiger Tumoren, da die Angiogenese mit wachsender Größe des Tumors eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum ist (FOLKMAN 2002). Interessanterweise wurde beschrieben, dass BA nicht nur einen inhibitorischen Effekt auf die Angiogenese in Endothelzellen hat, sondern auch auf die Bildung der röhrenartigen Struktur von Aortenendothelzellen (KWON *et al.* 2002; MUKHERJEE *et al.* 2004). Eine erst kürzlich erschienene Arbeit berichtet darüberhinaus über einen BA-induzierten anti-Angiogenese Effekt in einem Xenograftmodell mit Prostata-Tumorzelllinien (CHINTHARLAPALLI *et al.* 2007b). Unsere Analysen der RMS-Xenografttumore zeigten jedoch nur einen wachstumsinhibitorischen Effekt basierend auf der Induktion von Apoptose, aber keine Beeinflussung der Proliferation oder der mikrovaskulären Dichte. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass in RMS-Tumoren andere Faktoren als der für Prostata-Tumoren beschriebene *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) eine essentielle Rolle in der Angiogenese spielen. So wurde beispielsweise beschrieben, dass der *Fibroblast growth factor* (FGF) und Interleukin-8 in RMS wichtig sind für das Gefäßwachstum und die Gefäßneubildung (PAVLAKOVIC *et al.* 2001; SCHWEIGERER *et al.* 1987). Zudem konnten Zhang und Kollegen zeigen, dass ein anti-VEGFR2 Antikörper allein kaum einen Effekt auf das Wachstum und die Angiogenese in RMS-Tumoren hat und nur eine Kombination von anti-VEGFR2 und Doxorubicin zur Remission der Tumore führt (ZHANG *et al.* 2002), während eine Behandlung mit VEGF-Antikörpern in Prostata-Tumoren erheblich zur Unterdrückung des Tumorwachstums und der Angiogenese beitragen konnte (BORGSTROM *et al.* 1998). Ob die Angiogenese in RMS eine Rolle spielt und welche anderen Faktoren für die Vaskularisierung in RMS im Vergleich zu Prostata-Tumoren benötigt werden, bedarf jedoch weiterer Analysen. Sollte sich herausstellen, dass BA in RMS sowohl anti-tumorogene als auch anti-angiogene Wirkung erzielen kann, wäre dies für die Therapierbarkeit der Tumore ein großer Vorteil und daher absolut erstrebenswert, da man dann mit nur einer Substanz den Tumor über zwei unterschiedliche Wege bekämpfen könnte.

## 6.7 Beeinflussung des Hh-Signalwegs durch Betulinsäure

In der embryonalen Entwicklung spielt insbesondere der Hh-Signalweg eine entscheidende Rolle. In unserer Untersuchung war ein interessanter Nebenaspekt, dass BA offensichtlich neben der Apoptose-Induktion auch diesen Signalweg beeinflusst, und der bei einer Reihe von Tumorerkrankungen aberrant aktiviert ist (EVANGELISTA *et al.* 2006). In Tumoren führt beispielsweise eine Überexpression von Hh-Liganden, *gain-of-function* Mutationen in *SMO* oder *loss-of-function* Mutationen in *SUFU* oder *PTCH1* zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und somit letztendlich zu einer konstitutiven Aktivierung des Hh-Signalwegs. Da beschrieben ist, dass Hh-Antagonisten oder SMO-Inhibitoren den Hh-Signalweg blockieren können, oder eine wachsende Anzahl an verschiedensten Proteinen den Signalweg modulieren können (DI MARCOTULLIO *et al.* 2004; KAESLER *et al.* 2000; KOGERMAN *et al.* 1999; NEILL *et al.* 2003; PRICE and KALDERON 2002), könnte es eventuell ein vielversprechender Ansatz zur Tumorthherapie sein, diesen Signalweg zu inhibieren. In diesem Zusammenhang wurden bereits erste Untersuchungen an hepatozellulären Tumoren (KIM *et al.* 2007), Tumoren der Prostata (SANCHEZ *et al.* 2004) und des Pankreas (LAUTH *et al.* 2007) durchgeführt. Unsere Ergebnisse haben nun gezeigt, dass in der *GLI1*-amplifizierten RMS-Zelllinie RMS-13 der apoptotische Effekt von BA mit der Inhibition der bekannten Zielgene des Hh-Signalwegs *GLI1*, *GLI2*, *PTCH1* und *IGF2* assoziiert ist. Da der SMO-Inhibitor CyC in unseren Experimenten keine Genexpressionsänderung oder Änderung der Reporteraktivität in RMS-13 Zellen herbeiführte, ist zudem davon auszugehen, dass BA den Hh-Signalweg direkt auf dem Level der Gli-Transkriptionsfaktoren hemmt. Dies könnte von Relevanz sein, da eine neue Studie belegt, dass die Mehrheit der RMS-Tumore erhöhte *GLI1*-Expressionslevel aufweisen (TOSTAR *et al.* 2006). Da Amplifikationen des *GLI1*-Gens (KHATIB *et al.* 1993) oder Mutationen im *PTCH1*-Gen (CALZADA-WACK *et al.* 2002) allerdings nur in einzelnen Fällen von RMS gefunden werden konnten, erscheint BA als ein vielversprechendes Therapeutikum zumindest für diese RMS. Genauere Untersuchungen zum Wirkmechanismus könnten im direkten Vergleich mit RMS-Zellen mit Mutationen im *GLI1*- oder *PTCH1*-Gen erfolgen, die sich dann aber als BA-resistent erweisen müssten. Neben den Hh-Genen hat die Behandlung mit BA in RMS-13 Zellen auch das Expressionslevel des anti-apoptostischen Gens *BCL2* reduziert. Diese Beobachtung haben auch Rzeski und Kollegen bei einer Vielzahl an Tumoren nach BA-Behandlung gemacht (RZESKI *et al.* 2006) und dies könnte womöglich dazu führen, dass Apoptose unter BA-Behandlung leichter induziert werden kann. Neben den RMS-Zellen haben wir natürlich auch den Einfluss von BA auf den Hh-Signalweg bei HB-Zelllinien untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass BA die Expression der Hh-Zielgene *GLI1*, *PTCH1* und *IGF2* in der HepT3-Zelllinie und von *PTCH1* und *IGF2* in der HUH6-Zelllinie herabreguliert, während die Expression der Hh-Zielgene in den Zelllinien HepT1 und HepG2 nahezu unbeeinflusst blieb. Diese Ergebnisse passen zu Analysen bezüglich der Hh-Aktivität in HB-Zellen, in denen

gezeigt werden konnte, dass die HepT3 und die HUH6-Zelllinie einen aktiven Hh-Signalweg aufweisen, während der Signalweg in den HepT1 und HepG2-Zellen inaktiv ist (Abb.11, sowie (EICHENMULLER *et al.* 2009a; HUANG *et al.* 2006)). Dies zeigt zudem, dass BA offenbar nur die erhöhte Aktivität des Hh-Signalwegs reduziert, nicht aber zu einer Verminderung der normalen Basisaktivität führt. Außerdem sind diese Ergebnisse im Einklang mit Untersuchungen von Arai und Kollegen, die ebenfalls schlussfolgern, dass BA den Hh-Signalweg auf dem Level des Transkriptionsfaktors GLI1 hemmt. In Ihren Analysen haben sie mit Hilfe eines GLI-abhängigen Reporter Assays verschiedene natürliche Substanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Hh-Signalweg zu inhibieren, und festgestellt, dass BA unter den getesteten Substanzen den größten inhibitorischen Effekt auf die GLI-vermittelte Transkription hat (ARAI *et al.* 2008). Auch wir haben anhand der Analysen in den RMS-13 Zellen zeigen können, dass der BA-vermittelte Einfluss auf den Hh-Signalweg unterhalb SMO stattfinden muss und dies eventuell direkt auf dem Level der Gli-Transkriptionsfaktoren. Der genaue molekulare Mechanismus ist bis jetzt allerdings noch unklar, aber es wäre möglich, dass BA nicht nur in der Lage ist, gezielt in Tumorzellen Apoptose zu induzieren, sondern auch den Hh-Signalweg zu inhibieren. Schon länger wird auch die Möglichkeit diskutiert, dass der Hh-Signalweg ein selektives Ziel bei der Therapie von einigen geeigneten Tumoren sein könnte (RUBIN and DE SAUVAGE 2006). Diese Diskussion wurde weiter angeheizt, als erste vielversprechende präklinische Studien bei Tumoren des Verdauungstrakts, sowie des Pankreas, bei kleinzelligen Lungentumoren und bei Medulloblastomen eine dramatische Retardierung des Tumorwachstums *in vivo* nach Blockierung des Hh-Signalwegs zeigen konnten (EVANGELISTA *et al.* 2006; RUIZ I ALTABA 2008). Tatsächlich wurden kürzlich einige Hh-Inhibitoren (IPI-926, XL-139, GDC0449) patentiert und Studien der Phasen I und II zur Verwendung von Hh-Inhibitoren bei fortgeschrittenen oder metastasierenden soliden Tumoren sind bereits im Gange ((EPSTEIN 2008; TREMBLAY *et al.* 2009); [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). So werden Hh-Signalweg-Inhibitoren möglicherweise schon bald eine Möglichkeit zur Behandlung von Hh-assoziierten Tumoren sein.

Aktuelle Forschungen zur Inhibierung des Hh-Signalwegs konzentrieren sich aber meist auf die Entwicklung von Inhibitoren für das Proto-Onkogen SMO. Ein in diesem Zusammenhang eingesetzter Wirkstoff ist beispielsweise CyC (BERMAN *et al.* 2002; TAIPALE *et al.* 2000). Aber es gibt auch einen anderen kürzlich von Curis (Cambridge, MA) entwickelten wirksamen SMO-inhibierenden Wirkstoff, GDC-0449, der sich nun in einer Studie der klinischen Phase I bewährt hat (RUDIN *et al.* 2009; VON HOFF *et al.* 2009) und sich nun in der Phase II befindet. Außerdem ist ein weiterer Hh-Inhibitor beschrieben, HhAntag, dessen Effektivität erfolgreich in Medulloblastomen getestet wurde (ROMER *et al.* 2004). Diese Wirkstoffe sind allerdings unwirksam, wenn der Hh-Signalweg unabhängig von SMO weiter *downstream* aktiviert ist, was z. B. durch Mutationen in *SUFU*, oder durch Amplifikation von *GLI1* der Fall sein kann (NESSLING *et al.* 2005; SASAI *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang haben Lauth und

Kollegen nach *small-molecule* Antagonisten gesucht, die die *GLI*-vermittelte Transkription inhibieren können (LAUTH *et al.* 2007). In Ihren Studien haben Sie zwei viel versprechende Wirkstoffe identifiziert, die *Gli*-ANTagonisten 61 und 58 (GANT61 und GANT58), und deren Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* getestet. Auch viele weitere Substanzen sind beschrieben (Zerumbon, Arcyriaflavin C, Physalin F), die ebenfalls als Antagonist zu *GLI* wirken können (HOSOYA *et al.* 2008) oder auch als *Hh*-Signalweg-Inhibitoren (*Hedgehog-Pathway Inhibitors*, HPI 1-4), die *Hh*-Zielgene ebenfalls *downstream* von *SUFU* herunterregulieren (HYMAN *et al.* 2009). Unsere Untersuchungen bezüglich der Interaktion von BA und dem *Hh*-Signalweg weisen, wie bereits berichtet, ebenfalls darauf hin, dass die Inhibierung des Signalwegs durch BA direkt auf dem Level von *GLI* stattfindet und nicht durch eine inhibierende Beeinflussung von *SMO*. In Anbetracht der Tatsache, dass in vielen Tumoren eine Aktivierung des *Hh*-Signalwegs unabhängig von *SMO* zu finden ist, erscheint die Charakterisierung von BA und anderen Substanzen, die den Signalweg auf anderer Ebene, beispielsweise auf der Ebene der *GLI*-Transkriptionsfaktoren inhibieren können, also sozusagen *downstream* *Hh*-Signalweg-Inhibitoren, außerordentlich erstrebenswert, und BA wäre in diesem Zusammenhang ein erstes vielversprechendes neues Agens.

## 6.8 Betulinsäure und die Interaktion mit anderen Signalwegen

Neben dem Einfluss von BA auf den *Hh*-Signalweg ist in der Literatur auch beschrieben, dass BA andere Signalwege beeinflussen kann. Beispielsweise scheint BA  $\text{NF}\kappa\text{B}$  zu regulieren, wobei es in dieser Hinsicht kontroverse Aussagen gibt. So beschreibt eine Arbeitsgruppe eine Aktivierung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  durch BA (KASPERCZYK *et al.* 2005), und eine andere eine Inhibierung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (TAKADA and AGGARWAL 2003). Ein weiterer Signalweg, der durch BA beeinflussbar scheint, ist der Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-Signalweg (TAN *et al.* 2003). Außerdem gibt es Untersuchungen darüber, dass BA den AKT-Signalweg durch Phosphorylierung von EGFR und AKT aktiviert und sogar schwach JNK und p38 aktiviert (QIU *et al.* 2005). Der AKT-Signalweg scheint außerdem nicht nur wie der *Hh*-Signalweg responsiv auf BA zu reagieren, sondern es wurde sogar auch berichtet, dass die beiden Signalwege miteinander interagieren. So wurde beschrieben, dass der AKT-Signalweg beispielsweise die nukleare Lokalisation und die Transkriptionsaktivität von Gli1 reguliert (STECCA *et al.* 2007). Die Möglichkeit gleich zwei für die Tumorentstehung ausschlaggebende, interagierende Signalwege mit BA attackieren zu können, eröffnet eventuell neue Möglichkeiten zur Therapie von Tumoren, in denen beide Signalwege dereguliert sind, so beispielsweise die hier untersuchten RMS und HB.

## 6.9 Rezeptoren von Betulinsäure

Wie gerade beschrieben scheint BA einen Einfluss auf verschiedene Signalwege zu haben. Darüber hinaus ist allerdings noch völlig unklar, an welchen Rezeptor BA genau bindet oder ob das strukturell steroidähnliche BA in die Zelle internalisiert wird. Einige Studien konnten jedoch zeigen, dass BA an humanes Serumalbumin (SUBRAMANYAM *et al.* 2009),  $\gamma$ -Aminobuttersäure-Rezeptoren (MUCENIECE *et al.* 2008) und Melanokortikoidrezeptoren (MUCENIECE *et al.* 2007) bindet. Weitere intrazelluläre Bindungspartner von BA sind allerdings nicht bekannt. Bei der Suche nach wirksamen Derivaten von BA wurden aber unter anderem Studien durchgeführt, um Bindungspartner dieses Derivates zu finden. Bei diesen MALDI-TOF Experimenten wurden Proteine identifiziert, an die dieses Derivat von BA bindet, nämlich beispielsweise an Apolipoprotein A1 (ApoA1) und dessen Vorläuferprotein (WILLMANN *et al.* 2009). ApoA1 ist ein Transportmolekül des Blutes und ist wichtig für den Fettstoffwechsel. Es ist dabei dafür verantwortlich, dass das HDL-Partikel, bestehend aus Cholesterin und Fettsäuren zusammengehalten und zur Leber transportiert wird, wo es abgebaut und ausgeschieden werden kann. Darüber hinaus sind weitere wichtige Funktionen von ApoA1 bekannt. Zum einen beeinflusst es die Motilität der Spermien, zum anderen verhindert es durch Bindung an Beta-Amyloid Schäden durch dieses Protein im Gehirn und es wird als Wirkstoff gegen Arteriosklerose gehandelt (FENG *et al.* 2009; PAULA-LIMA *et al.* 2009). Welchen Einfluss nun aber BA auf diese Funktionen von ApoA1 haben könnte, ist unklar.

## 6.10 Derivate von Betulinsäure

Die heilende Wirkung von BA ist in der Volksmedizin schon lange bekannt. BA wurde hier als Öl hauptsächlich zur Behandlung von Hauterkrankungen eingesetzt (Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Drogen A-D. Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, R., Schneider, G., 1992, Springer-Verlag, Berlin). Da BA allerdings nur in Pyridin- oder Essigsäure löslich ist, aber sehr schlecht löslich in organischen, alkoholhaltigen Lösungsmitteln wie MeOH, EtOH oder CHCl<sub>3</sub>, und auch nur geringlöslich in H<sub>2</sub>O, DMF oder DMSO (CICHEWICZ and KOUZI 2004), ist es dringend notwendig, besser lösliche Derivate von BA herzustellen, um BA auch in der Klinik als Therapeutikum einsetzen zu können. Als besonders geeignet für chemische Modifikationen haben sich hierbei die C-3 Hydroxyol, die C-20 Alken und die C-28 Carboxylsäure Positionen herausgestellt (SANTOS *et al.* 2009). In diesem Zusammenhang wurden verschiedenste Derivate von BA synthetisiert und deren Wirkung und Bioaktivität in unterschiedlichen Tumorzelllinien getestet (JEONG *et al.* 1999; KIM *et al.* 1998; SAREK *et al.* 2003). Bei der Derivatisierung des A-Rings von BA zu 2-cyano-lup-1-en-3-oxo-20-oid Säure und der Synthetisierung dessen Methylesters stellte sich heraus, dass diese beiden BA-Derivate nicht nur eine hohe Zytotoxizität gegenüber Pankreas- und Kolonkarzinomzellen aufwiesen, sondern auch Aktivität als *Peroxisom Proliferator-activated receptor gamma*

(PPAR $\gamma$ ) Agonist zeigen, welcher für die Differenzierung von Adipozyten eine wichtige Rolle spielt (CHINTHARLAPALLI *et al.* 2007a). Außerdem wurde gefunden, dass BA und Derivate von BA zudem das Proteasom beeinflussen (HUANG *et al.* 2007), die Topoisomerase I (CHOWDHURY *et al.* 2002; GANGULY *et al.* 2007) und die Acetyl-CoA-Cholesterol-Transferase (LEE *et al.* 2006) inhibieren. BA und seine Derivate wurden aber nicht nur *in vitro* getestet, sondern auch in mehreren *in vivo* Modellen. Dabei wurde BA unter anderem in Melanom-Mausmodellen erfolgreich getestet, in welchen Mäuse mit BA als Einzelgabe (PISHA *et al.* 1995) oder in Kombination mit einem anderen Chemotherapeutikum, Vincristine, behandelt wurden (SAWADA *et al.* 2004). In einem weiteren Xenograftmodell mit Kolontumoren zeigte beispielsweise 4-nitrobenzyl-oximino-BA bessere pharmakokinetische Eigenschaften als BA (RAJENDRAN *et al.* 2008). Ein weiteres Derivat von BA, 3-acetyl-BA-2-amino-3-hydroxy-2-hydroxymethyl-Propanoat (NVX-207), zeigte sich in einem anderen Tiermodell als wirksam gegenüber verschiedenen Tumoren bei Hunden (WILLMANN *et al.* 2009). Modifizierte Betulonsäure, die ebenfalls eine große strukturelle Ähnlichkeit zu BA aufweist, hatte zudem vielversprechende Erfolge in einem Xenograft-Modell von Prostata Tumoren (SAXENA *et al.* 2006). Neben der Derivatisierung wurde aber auch noch ein anderer Weg verfolgt, BA besser in Lösung zu bekommen. Hierbei wurde BA in einem Melanomamausmodell der Maus in einer speziellen Rezeptur zusammen mit Polyvinylpyrolidon (PVP) in Lösung gebracht und den Tumor-tragenden Mäusen gespritzt (UDEANI *et al.* 1999).

Aber nicht nur in der Tumorforschung ist man um die Derivatisierung von BA bemüht. So hat man beispielweise auch in der Virologie Behandlungsansätze mit BA und Derivaten versucht. Zum einen wurde ein Derivat von BA als Inhibitor des Semliki Forest Virus (SFV) erfolgreich getestet (POHJALA *et al.* 2009) und zum anderen verwendet man ein Derivat von BA in der HIV-Therapie. In der HIV-Forschung ist man diesbezüglich sogar schon soweit fortgeschritten, dass das Derivat von BA, 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) BA, auch bekannt unter den Handelsnamen Bevirimat, DSB oder PA-457, welches den Maturationsprozess von HIV hemmt, bereits in klinischen Studien der Phase I und II getestet wurde (SMITH *et al.* 2007). In diesem Zusammenhang wäre es zukünftig vielleicht auch interessant, da Bevirimat offensichtlich so erfolgreich in der HIV-Therapie eingesetzt werden kann, den Effekt von Bevirimat auch auf Tumorzellen zu testen.

Man kann also sagen, dass der Naturstoff BA oder BA-Derivate mit besserer Bioverfügbarkeit ein breites Wirkungsspektrum haben und nicht nur in der Tumorthherapie, sondern auch in anderen medizinischen Bereichen als ein vielversprechendes Phytotherapeutikum eingesetzt werden können.



## 6.11 Klinische Relevanz und Betulinsäure

In Hinblick auf klinische Studien ist allerdings zu bedenken, ob Konzentrationen, die *in vitro* getestet werden, letztendlich auch *in vivo* realisiert werden können. Interessanterweise konnten Mäuse, die intraperitoneal mit vergleichbaren Konzentrationen BA, wie auch in Zellkultur unserer Studie angewandt (5-20 µg/ml), ohne toxische Nebeneffekte behandelt werden (UDEANI *et al.* 1999). Außerdem sollte bei klinischen Ansätzen vielleicht auch bedacht werden, dass BA nicht nur als Einzelapplikation eingesetzt werden könnte, sondern auch in Kombination mit anderen anti-tumorigenen Substanzen, um deren Wirkung zu verstärken (FULDA and DEBATIN 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CyC und BA effektiv in Hepatoblastomen Apoptose auslösen und den Hedgehog-Signalweg beeinflussen. Außerdem induziert BA in Rhabdomyosarkomen Apoptose *in vitro* über den intrinsischen Apoptoseweg und inhibiert ebenfalls den Hedgehog-Signalweg. Zudem hemmt BA das Tumorwachstum in RMS-13 Xenografts durch Induktion von Apoptose ohne Beeinflussung der Angiogenese. In Zukunft könnte die gezielte Induktion von Apoptose oder Inhibition des Hh-Signalwegs, sei es durch CyC oder BA oder effektivere Derivate von BA, ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von kindlichen Tumorerkrankungen sein.

## 7 Zusammenfassung

Im Kindesalter auftretende Tumore sind durch eine große morphologische Ähnlichkeit der malignen Zellen mit ihren embryonalen Vorläuferzellen gekennzeichnet. Diese embryonalen Tumore entstehen meist schon während der Organentwicklung und zeigen deshalb auch ein den Ursprungszellen entsprechendes Muster der Aktivität verschiedener Gene. Die frühe Manifestation kindlicher Tumoren und die Tatsache, dass es häufig aus ungeklärten Gründen zur spontanen Regression dieser Tumore kommt, lässt darauf schließen, dass relativ wenige genetische Veränderungen für die Ausbildung des malignen Phänotyps nötig sind. Eigene Vorarbeiten haben zudem gezeigt, dass eine Aktivierung von anti-apoptotischen Molekülen, wie beispielsweise *Igf2*, *Akt* und *Bcl2*, ein Charakteristikum dieser embryonalen Tumoren ist. Dies führt dazu, dass die entarteten Zellen dieser Tumore nicht mehr in der Lage sind, in Apoptose zu gehen.

In der vorgelegten Arbeit sollten deshalb Substanzen identifiziert werden, die selektiv in embryonalen Tumoren Apoptose induzieren können, und deren Wirkungsweise auf molekularer Ebene untersucht werden.

Beim Screening verschiedener Substanzen auf deren anti-tumorigene Wirkung bei Zelllinien embryonaler Tumoren konnte eine starke Wirkung des Hedgehog-Inhibitors Cyclopamin auf Hepatoblastome und des Apoptose-Induktors Betulinsäure auf Hepatoblastome und Rhabdomyosarkome festgestellt werden. In anschließenden Untersuchungen konnten wir für beide Wirkstoffe diverse Merkmale der Apoptoseinduktion wie morphologische Veränderungen, DNA-Fragmentierung, Translokation des Phosphatidylserins und eine Aktivierung von Apoptose-spezifischen Proteinen (Caspase 3 und PARP) nachweisen. Des Weiteren konnte der durch Betulinsäure ausgelöste Effekt durch Zugabe des Breitband-Caspase-Inhibitors zVAD.fmk stark reduziert werden. Darüber hinaus konnten wir durch den Verlust des Mitochondrienmembranpotentials und der Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien nach Betulinsäure-Behandlung zeigen, dass die Apoptoseinduktion über den intrinsischen, mitochondrial vermittelten Weg der Apoptose ausgelöst wird. In einigen getesteten Zelllinien fanden wir allerdings auch Hinweise darauf, dass die Unfähigkeit einiger Zelllinien nach Betulinsäure-Behandlung in Apoptose zu gehen mit einer Überexpression von anti-apoptotischen oder einer Herunterregulierung pro-apoptotischer Gene in Zusammenhang stehen könnte. Interessanterweise zeigte Betulinsäure nicht nur eine Induktion von Apoptose in den embryonalen Tumoren, sondern vielmehr auch eine deutliche Inhibition des für die Entstehung embryonaler Tumore wichtigen Hedgehog-Signalwegs, den auch Cyclopamin nachweislich beeinflusst. Nach diesen beeindruckenden *in vitro* Ergebnissen konnten wir in einer präklinischen Wirksamkeitsstudie an einem Maus-Xenograftmodell weiterhin demonstrieren, dass Betulinsäure im Tiermodell ebenfalls eine

signifikante Reduktion des Tumorwachstums hervorruft. Hierbei zeigte sich eine selektive Wirkung von Betulinsäure auf das Apoptosevermögen der Tumorzellen, während die Proliferation, die Angiogenese und Differenzierung unbeeinflusst blieb, genauso wie die Genexpression von Apoptose- oder Hedgehog-assoziierten Genen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Betulinsäure als auch Cyclopamin in der Lage ist, selektiv in embryonalen Tumoren Apoptose zu induzieren. Beide Wirkstoffe scheinen zudem den für die embryonale Entwicklung wichtigen Hedgehog-Signalweg zu inhibieren. Vielversprechende *in vivo* Experimente haben außerdem gezeigt, dass Betulinsäure eindrucksvoll das Wachstum von Xenografttumoren inhibiert. Daher könnte unser Therapieansatz von großem Interesse für den gezielten Einsatz bei der Therapie von embryonalen Tumoren sein.

## 8 Abstract

Malign cells of childhood tumors commonly arise during organogenesis, have a high similarity to embryonal precursor cells and a comparable pattern of gene expression to these cells. Childhood tumors have a very early clinical manifestation and sometimes regress spontaneously. This suggests that only a few genetic alterations suffice for causing the malign phenotype. Our previous work in the *Patched1* knock-out mouse model has shown that embryonal tumors characteristically display an activation of survival promoting and anti-apoptotic proteins such as *Igf2*, *Akt* and *Bcl2*. This might be associated with the inability of the tumor cells to undergo apoptosis.

Therefore, we have set out to identify new compounds, which selectively induce apoptosis in embryonal tumors and analyze the mechanism how they confer this effect to the tumor cells.

First, we screened several compounds towards their anti-tumorigenic effect on different embryonal tumor cell lines and found a strong inhibition of the viability in hepatoblastoma and rhabdomyosarcoma cell lines by using cyclopamine and betulinic acid. Upon treatment, we could demonstrate typical apoptotic features such as morphological changes, DNA-fragmentation, translocation of phosphatidylserine and a significant activation of caspases by the proteolytic cleavage of caspase 3 and PARP, which could be inhibited by the broad-range caspase inhibitor zVAD.fmk. Moreover, as betulinic acid treatment results in loss of mitochondrial membran potential and the release of cytochrom C from the mitochondria we showed that betulinic acid induces apoptosis through the intrinsic apoptosis pathway. Our finding that some cell lines were not responsive to betulinic acid treatment could be explained by an increased expression of survival genes and a decreased expression of pro-apoptotic genes. Interestingly, we also found a significant decrease of known hedgehog target genes in hedgehog activated cell lines by cyclopamine or betulinic acid treatment. Beyond that we could demonstrate that the growth of rhabdomyosarcoma xenograft tumors were markedly inhibited in betulinic acid treated mice due to an increased induction of apoptosis, whereas proliferation, angiogenesis and differentiation was unaffected, as well as the gene expression of apoptosis- or hedgehog-associated genes.

In conclusion, our results clearly demonstrate that cyclopamine and betulinic acid are capable of inducing apoptosis and affecting hedgehog signalling in embryonal tumor cell lines. In addition, betulinic acid is also effective in an *in vivo* tumor model. Therefore, these compounds might be of uttermost interest for the therapeutical treatment of embryonal tumors, especially those with an activated hedgehog signaling pathway.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	alpha
Apaf1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	<b>Adenomatous polyposis coli</b>
ARMS	alveoläres Rhabdomyosarkom
ATCC	engl.: <b>American Type Culture Collection</b>
$\beta$	beta
BA	Betulinsäure
BAD	<i>BCL2-associated agonist of cell death</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIRC	<i>baculoviral IAP repeat-containing</i>
BSA	engl.: <b>Bovine Serum Albumine</b>
BWS	<b>Beckwith-Wiedemann-Syndrom</b>
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaare
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
CAT	<b>Chloramphenicol-Acetyltransferase</b>
CBP	<b>CREB-binding protein</b>
CCND1/2	CyclinD1/D2
CD95L	<i>Cluster of differentiation 95 ligand</i>
CDK	engl.: <b>Cyclin-dependent kinase</b>
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i>
CHX	Cycloheximid
$\text{CHCl}_3$	Chloroform
CK1	Casein Kinase I
$\text{cm}^3$	Quadratzenimeter
$\text{CO}_2$	Kohlendioxid
COX4	<i>cytochrome c oxidase subunit IV</i>
ct	engl.: <i>cycle threshold</i>
C	Cyclopamin
d	engl.: <i>day, Tag</i>
dd	<i>Double distilled</i>
DAPI	4',6- <b>Diamidino-2-phenylindole</b>
DHH	<i>Desert Hedgehog</i>
$\text{DiOC}_6(3)$	Dihexaoxacarbocyaninjodid
DKK	<i>Dickkopf</i>
DNA	engl.: <b>desoxyribonucleic acid</b>
DMEM	engl.: <b>Dulbecco's Modified Eagle Medium</b>
DMF	Dimethylformamid
DSMZ	<b>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</b>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Eosin
E. coli	lat.: <b>Escherichia coli</b>
ECL	Electrochemiluminescence
EDTA	<b>Ethylendiamintetracyanat</b>
EGCG	Epigallocatechingallat
ELISA	engl.: <b>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</b>
ERMS	embryonales Rhabdomyosarkom
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid

EtOH	Ethanol
EWS-FLI1	<i>Ewing Sarcoma-Friend leukemia virus integration 1</i>
Ex	Exon
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAD	Familiären Adenomatösen Polyposis
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FBS	engl.: <b>Fetale Bovine Serum</b>
FGF	engl.: <b>Fibroblast growth factor</b>
FITC	<b>Fluoresceinisocyanat</b>
Fu	<i>Fused</i>
fw.	engl.: <i>forward</i>
γ	gamma
g	Gramm
GAS1	<i>growth arrest-specific 1</i>
GFP	engl.: <b>Green Fluorescence Protein</b>
GLI	<i>Glioma-associated oncogene homolog</i>
GSK3β	<b>Glykogen Synthase Kinase 3β</b>
h	engl.: <i>hour</i> , Stunde
H	Hämalaun
HB	<b>Hepatoblastom</b>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HDL	<i>High-Density-Lipoprotein</i>
HE	Hämalaun-Eosin
Hh	<i>Hedgehog</i>
HHIP	engl.: <b>Human Hedgehog Interacting Protein</b>
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HR	engl.: <i>High Risk</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	(engl.: <i>horseradish peroxidase</i> ) Meerrettichperoxidase
IC <sub>50</sub>	inhibitorische Konzentration 50
IHH	<i>Indian Hedgehog</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IRS2	<i>Insulin receptor substrate 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
κ	kappa
K <sup>+</sup>	Kalium
kb	Kilo-Basenpaar
kDa	Kilo Dalton
λ	lambda
l	Liter
LB	engl.: <b>Lysogeny Broth</b>
LFS	Li-Fraumeni-Syndrom
Lkl.	Lokalisation
M	Mol
mA	Milliamper
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MeOH	Methanol
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Mitochondriales Membranpotential
mTOR	engl.: <i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm

μM	Mikromolar
n	Nano
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NBCCS	<i>Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome</i>
NF <sub>κ</sub> B	<i>nuclear factor “κ-light-chain-enhancer” of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
dNTPs (ATP, CTP, GTP, UTP)	desoxy- <b>N</b> ukleotid- <b>T</b> ri <b>P</b> hospat ( <b>A</b> denin-, <b>C</b> ytosin-, <b>G</b> uanin-, <b>U</b> racil-)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p	Pico
PARP	poly(adenosin diphosphate-ribose)polymerase
PBS	engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1
PTCH	<i>Patched</i>
PH	lat.: <i>pondus Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PI3KCA	<i>phosphatidyl inositol 3-kinase catalytic subunit</i>
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKA	Protein-Kinase A
PKB	Protein-Kinase B
PLAG1	<i>Pleomorphic adenoma gene 1</i>
PPAR <sub>γ</sub>	<i>Peroxisom Proliferator-activated receptor γ</i>
Prod.	Produkt
PS	Penicilin/Streptomycin
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Q-PCR	Quantitative PCR
rev	engl.: <i>reverse</i>
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i>
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
RPMI	engl.: <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SAP18	<i>Sin3A-associated protein</i>
SDS	<b>S</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfat
sec	Sekunde
SFV	<b>S</b> emliki- <b>F</b> orest- <b>V</b> irus
SHH	<i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	<i>Smoothend</i>
STE	<i>Sodium Chloride–Tris–EDTA</i>
SUFU	<i>Suppressor of Fused</i>
SR	engl.: <i>Standard Risk</i>
TBE	Tris/Borate/EDTA
TBP	engl.: <i>TATA-Box-Binding Protein</i>
TE	<b>T</b> RIS- <b>E</b> DTA Puffer
Temp.	Temperatur
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TNF <sub>α</sub>	Tumornekrosefaktor-α
TP53	Tumorsuppressor Protein 53
TRAIL	engl.: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate</i>
U	engl.: <i>unit</i> , Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
var.	variabel
VEGF	engl.: <b>V</b> ascular <b>E</b> ndothelial <b>G</b> rowth <b>F</b> actor
Vol.	Volumen
v/v	engl.: <i>volumet per volume</i>
w/v	engl.: <i>weight per volume</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
zVAD.fmk	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon
z.B.	zum Beispiel



## 10 Danksagung

Seitens des Lehrstuhls für Proteomik und Bioanalytik an der Technischen Universität München möchte ich mich herzlich bedanken bei Prof. Dr. Bernhard Küster, der meine Dissertation betreute und PD Dr. Karl Kramer für seine Bemühungen.

Mein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Roland Kappler für die Betreuung meiner Dissertation am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig Maximilians Universität.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, der es mir ermöglichte, meine Dissertation am Dr. von Haunerschen Kinderspital durchzuführen.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Irmela Jeremias (Helmholz Zentrum, München), PD Dr. Reinhard Paschke (BioSolutions, Halle) und PD Dr. Bernhard Hemmerlein (Institut für Pathologie, Krefeld) für die Kooperationen bedanken.

Finanzielle Unterstützung dieser Arbeit wurde von der Horst Muggenburg Stiftung und der OMNIBUS Stiftung gewährt. Weiter wurde diese Arbeit auch unterstützt von dem Förderprogramm „Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre“ der Technischen Universität München. Dafür vielen Dank.

Ein sehr großes Dankeschön auch an meine Kollegen: Ivonne Gruner, ohne deren Aufmunterungen mancher Arbeitstag frustrierender gewesen wäre; Sebastian Schröpf, der uns oft mit leckeren Kuchen den Laboralltag versüßte; Dr. Jochen Hubertus, für seine Freundschaft und stets gut Laune; Clemens Lück, für sein Engagement hinsichtlich meiner forensischen Interessen; Dr. Markus Hammel für seine moralische Unterstützung; sowie Sarah Lena Meier, Dr. Federico Seifart, Dr. Ferdinand Wagner und Dr. Danielle Wendling; außerdem den Technischen Assistentinnen Shiva Promoli und Karin Schmeizl, sowie Herrn Rudolf Lehner, der sich liebevoll als Tierpfleger um die Mäuse kümmerte.

Besonderer Dank an Susan Joksch, die durch Ihre positive Einstellung mir stets beistand, Dr. Horst Apfel, der es immer schaffte schwierige Situationen weniger schwierig aussehen zu lassen und den oft frustrierenden grauen Alltag erträglich sein zu lassen, sowie an Stefan Weber, der es verstand, mich immer aufzubauen und moralisch zu unterstützen.

Ganz spezieller Dank gilt Dr. Hauke Walter, der mir in schwierigen Momenten immer in Rat und Tat zu Seite stand und der es schaffte mich immer zu motivieren.

Meinen Eltern danke ich von ganzen Herzen dafür, dass Sie immer für mich da waren, mich stets unterstützt und an mich geglaubt haben.

## 11 Referenzliste

- ALAKURTTI, S., T. MAKELA, S. KOSKIMIES and J. YLI-KAUHALUOMA, 2006 Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur J Pharm Sci* **29**: 1-13.
- ANDERSON, J., A. GORDON, K. PRITCHARD-JONES and J. SHIPLEY, 1999 Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* **26**: 275-285.
- ARAI, M. A., C. TATENO, T. HOSOYA, T. KOYANO, T. KOWITHAYAKORN *et al.*, 2008 Hedgehog/GLI-mediated transcriptional inhibitors from *Zizyphus cambodiana*. *Bioorg Med Chem* **16**: 9420-9424.
- ARMISTEAD, P. M., J. SALGANICK, J. S. ROH, D. M. STEINERT, S. PATEL *et al.*, 2007 Expression of receptor tyrosine kinases and apoptotic molecules in rhabdomyosarcoma: correlation with overall survival in 105 patients. *Cancer* **110**: 2293-2303.
- ATHAR, M., C. LI, X. TANG, S. CHI, X. ZHANG *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.
- BANDRES, E., R. MALUMBRES, A. ESCALADA, E. CUBEDO, I. GONZALEZ *et al.*, 2005 Gene expression profile of ewing sarcoma cell lines differing in their EWS-FLI1 fusion type. *J Pediatr Hematol Oncol* **27**: 537-542.
- BARLOW, J. W., J. C. WILEY, M. MOUS, A. NARENDRAN, M. F. GEE *et al.*, 2006 Differentiation of rhabdomyosarcoma cell lines using retinoic acid. *Pediatr Blood Cancer* **47**: 773-784.
- BERMAN, D. M., S. S. KARHADKAR, A. R. HALLAHAN, J. I. PRITCHARD, C. G. EBERHART *et al.*, 2002 Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* **297**: 1559-1561.
- BERMAN, D. M., S. S. KARHADKAR, A. MAITRA, R. MONTES DE OCA, M. R. GERSTENBLITH *et al.*, 2003 Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**: 846-851.
- BOEHM, K., F. BORRELLI, E. ERNST, G. HABACHER, S. K. HUNG *et al.*, 2009 Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Cochrane Database Syst Rev*: CD005004.
- BORGSTROM, P., M. A. BOURDON, K. J. HILLAN, P. SRIRAMARAO and N. FERRARA, 1998 Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* **35**: 1-10.
- BOUTIS, A., K. PAPAISIS, K. PISTEVOU-GOMPAKI, A. LAMBROPOULOS, I. SOFRONIADIS *et al.*, 2006 Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor olomoucine enhances gamma-irradiation-induced apoptosis and cell cycle arrest in Raji cells. *Anticancer Res* **26**: 3493-3498.
- BRINGMANN, G., W. SAEB, L. A. ASSI, G. FRANCOIS, A. S. SANKARA NARAYANAN *et al.*, 1997 Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester. *Planta Med* **63**: 255-257.
- BUENDIA, M. A., 2002 Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: common and distinctive aspects. *Med Pediatr Oncol* **39**: 530-535.
- BUTT, M. S., and M. T. SULTAN, 2009 Green tea: nature's defense against malignancies. *Crit Rev Food Sci Nutr* **49**: 463-473.
- CALZADA-WACK, J., U. SCHNITZBAUER, A. WALCH, K. H. WURSTER, R. KAPPLER *et al.*, 2002 Analysis of the PTCH coding region in human rhabdomyosarcoma. *Hum Mutat* **20**: 233-234.
- CANTLEY, L. C., 2002 The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**: 1655-1657.
- CARPENTER, D., D. M. STONE, J. BRUSH, A. RYAN, M. ARMANINI *et al.*, 1998 Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13630-13634.

- CARPTEN, J. D., A. L. FABER, C. HORN, G. P. DONOHO, S. L. BRIGGS *et al.*, 2007 A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**: 439-444.
- CERTO, M., V. DEL GAIZO MOORE, M. NISHINO, G. WEI, S. KORSMEYER *et al.*, 2006 Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**: 351-365.
- CHEN, C. Y., and J. B. BLUMBERG, 2008 Phytochemical composition of nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* **17 Suppl 1**: 329-332.
- CHEN, M., A. CASSIDY, J. GU, G. L. DELCLOS, F. ZHEN *et al.*, 2009 Genetic variations in PI3K-AKT-mTOR pathway and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* **30**: 2047-2052.
- CHEN, M., and J. WANG, 2002 Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* **7**: 313-319.
- CHEN, Q., B. GONG and A. ALMASAN, 2000 Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ* **7**: 227-233.
- CHEN, X. L., Q. WANG, L. Q. CAO, X. H. HUANG, X. H. FU *et al.*, 2008 [Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **88**: 2524-2528.
- CHINNI, S. R., Y. LI, S. UPADHYAY, P. K. KOPPOLU and F. H. SARKAR, 2001 Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Oncogene* **20**: 2927-2936.
- CHINTHARLAPALLI, S., S. PAPINENI, S. LIU, I. JUTOORU, G. CHADALAPAKA *et al.*, 2007a 2-cyanolup-1-en-3-oxo-20-oic acid, a cyano derivative of betulinic acid, activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colon and pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* **28**: 2337-2346.
- CHINTHARLAPALLI, S., S. PAPINENI, S. K. RAMAIAH and S. SAFE, 2007b Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Res* **67**: 2816-2823.
- CHOWDHURY, A. R., S. MANDAL, B. MITTRA, S. SHARMA, S. MUKHOPADHYAY *et al.*, 2002 Betulinic acid, a potent inhibitor of eukaryotic topoisomerase I: identification of the inhibitory step, the major functional group responsible and development of more potent derivatives. *Med Sci Monit* **8**: BR254-265.
- CHUANG, P. T., and A. P. MCMAHON, 1999 Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**: 617-621.
- CICHEWICZ, R. H., and S. A. KOUZI, 2004 Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med Res Rev* **24**: 90-114.
- COHEN, M. M., JR., 2003 The hedgehog signaling network. *Am J Med Genet A* **123A**: 5-28.
- CORY, S., D. C. HUANG and J. M. ADAMS, 2003 The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**: 8590-8607.
- DANG, Z., W. LAI, K. QIAN, P. HO, K. H. LEE *et al.*, 2009 Betulinic Acid Derivatives as Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Inhibitors ( parallel). *J Med Chem* **52**: 7887-7891.
- DASHWOOD, W. M., G. A. ORNER and R. H. DASHWOOD, 2002 Inhibition of beta-catenin/Tcf activity by white tea, green tea, and epigallocatechin-3-gallate (EGCG): minor contribution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at physiologically relevant EGCG concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* **296**: 584-588.
- DI MARCOTULLIO, L., E. FERRETTI, E. DE SMAELE, B. ARGENTI, C. MINCIONE *et al.*, 2004 REN(KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10833-10838.
- DOHI, T., E. BELTRAMI, N. R. WALL, J. PLESCIA and D. C. ALTIERI, 2004 Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* **114**: 1117-1127.
- EDAMATSU, H., C. L. GAU, T. NEMOTO, L. GUO and F. TAMANOI, 2000 Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene* **19**: 3059-3068.
- EHRHARDT, H., S. FULDA, M. FUHRER, K. M. DEBATIN and I. JEREMIAS, 2004 Betulinic acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Leukemia* **18**: 1406-1412.

- EICHENMULLER, M., I. GRUNER, B. HAGL, B. HABERLE, J. MULLER-HOCKER *et al.*, 2009a Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology* **49**: 482-490.
- EICHENMULLER, M., D. VON SCHWEINITZ and R. KAPPLER, 2009b Betulinic acid treatment promotes apoptosis in hepatoblastoma cells. *Int J Oncol* **35**: 873-879.
- ENGELMAN, J. A., T. MUKOHARA, K. ZEJNULLAHU, E. LIFSHITS, A. M. BORRAS *et al.*, 2006 Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest* **116**: 2695-2706.
- EPSTEIN, E. H., 2008 Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer* **8**: 743-754.
- EVANGELISTA, M., H. TIAN and F. J. DE SAUVAGE, 2006 The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 5924-5928.
- EVERETT, H., and G. MCFADDEN, 1999 Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol* **7**: 160-165.
- FENG, Y., E. VAN CRAEYVELD, F. JACOBS, J. LIEVENS, J. SNOEYS *et al.*, 2009 Wild-type apo A-I and apo A-I(Milano) gene transfer reduce native and transplant arteriosclerosis to a similar extent. *J Mol Med* **87**: 287-297.
- FESTA, M., A. PETRELLA, S. ALFANO and L. PARENTE, 2009 R-roscovitine sensitizes anaplastic thyroid carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via regulation of IKK/NF-kappaB pathway. *Int J Cancer* **124**: 2728-2736.
- FOLKMAN, J., 2002 Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* **29**: 15-18.
- FOULSTONE, E., S. PRINCE, O. ZACCHEO, J. L. BURNS, J. HARPER *et al.*, 2005 Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol* **205**: 145-153.
- FRANK, M. B., Q. YANG, J. OSBAN, J. T. AZZARELLO, M. R. SABAN *et al.*, 2009 Frankincense oil derived from *Boswellia carteri* induces tumor cell specific cytotoxicity. *BMC Complement Altern Med* **9**: 6.
- FRESNO VARA, J. A., E. CASADO, J. DE CASTRO, P. CEJAS, C. BELDA-INIESTA *et al.*, 2004 PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **30**: 193-204.
- FULDA, S., and K. M. DEBATIN, 2000 Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. *Med Pediatr Oncol* **35**: 616-618.
- FULDA, S., and K. M. DEBATIN, 2005 Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic Acid. *Neoplasia* **7**: 162-170.
- FULDA, S., C. FRIESEN, M. LOS, C. SCAFFIDI, W. MIER *et al.*, 1997 Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res* **57**: 4956-4964.
- FULDA, S., I. JEREMIAS, T. PIETSCH and K. M. DEBATIN, 1999a Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. *Klin Padiatr* **211**: 319-322.
- FULDA, S., I. JEREMIAS, H. H. STEINER, T. PIETSCH and K. M. DEBATIN, 1999b Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer* **82**: 435-441.
- FULDA, S., C. SCAFFIDI, S. A. SUSIN, P. H. KRAMMER, G. KROEMER *et al.*, 1998 Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem* **273**: 33942-33948.
- GALILI, N., R. J. DAVIS, W. J. FREDERICKS, S. MUKHOPADHYAY, F. J. RAUSCHER, 3RD *et al.*, 1993 Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* **5**: 230-235.
- GANGULY, A., B. DAS, A. ROY, N. SEN, S. B. DASGUPTA *et al.*, 2007 Betulinic acid, a catalytic inhibitor of topoisomerase I, inhibits reactive oxygen species-mediated apoptotic topoisomerase I-DNA cleavable complex formation in prostate cancer cells but does not affect the process of cell death. *Cancer Res* **67**: 11848-11858.
- GERHART, J., 1999 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology* **60**: 226-239.
- GOODYEAR, S., and M. C. SHARMA, 2007 Roscovitine regulates invasive breast cancer cell (MDA-MB231) proliferation and survival through cell cycle regulatory protein cdk5. *Exp Mol Pathol* **82**: 25-32.

- GOSWAMI, S. K., and D. K. DAS, 2009 Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Lett* **284**: 1-6.
- GRAY, S. G., T. ERIKSSON, C. EKSTROM, S. HOLM, D. VON SCHWEINITZ *et al.*, 2000 Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. *Br J Cancer* **82**: 1561-1567.
- GREEN, D. R., and J. C. REED, 1998 Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.
- HAHN, H., C. WICKING, P. G. ZAPHIROPOULOUS, M. R. GAILANI, S. SHANLEY *et al.*, 1996 Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* **85**: 841-851.
- HAHN, H., L. WOJNOWSKI, K. SPECHT, R. KAPPLER, J. CALZADA-WACK *et al.*, 2000 Patched target *Igf2* is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem* **275**: 28341-28344.
- HAHN, H., L. WOJNOWSKI, A. M. ZIMMER, J. HALL, G. MILLER *et al.*, 1998 Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med* **4**: 619-622.
- HAIL, N., JR., B. Z. CARTER, M. KONOPLEVA and M. ANDREEFF, 2006 Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* **11**: 889-904.
- HANAHAN, D., and R. A. WEINBERG, 2000 The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- HARTMANN, W., B. DIGON-SONTGERATH, A. KOCH, A. WAHA, E. ENDL *et al.*, 2006 Phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN. *Clin Cancer Res* **12**: 3019-3027.
- HARTMANN, W., J. KUCHLER, A. KOCH, N. FRIEDRICH, A. WAHA *et al.*, 2009 Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival. *Clin Cancer Res* **15**: 4538-4545.
- HARTMANN, W., A. WAHA, A. KOCH, C. G. GOODYER, S. ALBRECHT *et al.*, 2000 p57(KIP2) is not mutated in hepatoblastoma but shows increased transcriptional activity in a comparative analysis of the three imprinted genes p57(KIP2), IGF2, and H19. *Am J Pathol* **157**: 1393-1403.
- HIROSE, Y., T. ITOH and A. MIYAJIMA, 2009 Hedgehog signal activation coordinates proliferation and differentiation of fetal liver progenitor cells. *Exp Cell Res* **315**: 2648-2657.
- HO, R., J. E. MINTURN, T. HISHIKI, H. ZHAO, Q. WANG *et al.*, 2005 Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* **65**: 9868-9875.
- HOSOYA, T., M. A. ARAI, T. KOYANO, T. KOWITHAYAKORN and M. ISHIBASHI, 2008 Naturally occurring small-molecule inhibitors of hedgehog/GLI-mediated transcription. *Chembiochem* **9**: 1082-1092.
- HOTCHKISS, R. S., A. STRASSER, J. E. MCDUNN and P. E. SWANSON, 2009 Cell death. *N Engl J Med* **361**: 1570-1583.
- HUANG, L., P. HO and C. H. CHEN, 2007 Activation and inhibition of the proteasome by betulinic acid and its derivatives. *FEBS Lett* **581**: 4955-4959.
- HUANG, S., J. HE, X. ZHANG, Y. BIAN, L. YANG *et al.*, 2006 Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* **27**: 1334-1340.
- HYMAN, J. M., A. J. FIRESTONE, V. M. HEINE, Y. ZHAO, C. A. OCASIO *et al.*, 2009 Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14132-14137.
- INCARDONA, J. P., W. GAFFIELD, R. P. KAPUR and H. ROELINK, 1998 The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* **125**: 3553-3562.
- ISEKI, H., T. C. KO, X. Y. XUE, A. SEAPAN, M. R. HELLMICH *et al.*, 1997 Cyclin-dependent kinase inhibitors block proliferation of human gastric cancer cells. *Surgery* **122**: 187-194; discussion 194-185.
- JAGANATHAN, S. K., and M. MANDAL, 2009 Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *J Biomed Biotechnol* **2009**: 830616.
- JEONG, H. J., H. B. CHAI, S. Y. PARK and D. S. KIM, 1999 Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* **9**: 1201-1204.

- JOHNSTONE, R. W., A. A. RUEFLI and S. W. LOWE, 2002 Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**: 153-164.
- KAESLER, S., B. LUSCHER and U. RUTHER, 2000 Transcriptional activity of GLI1 is negatively regulated by protein kinase A. *Biol Chem* **381**: 545-551.
- KAPPLER, R., R. BAUER, J. CALZADA-WACK, M. ROSEMAN, B. HEMMERLEIN *et al.*, 2004 Profiling the molecular difference between Patched- and p53-dependent rhabdomyosarcoma. *Oncogene* **23**: 8785-8795.
- KAPPLER, R., J. CALZADA-WACK, U. SCHNITZBAUER, M. KOLEVA, A. HERWIG *et al.*, 2003 Molecular characterization of Patched-associated rhabdomyosarcoma. *J Pathol* **200**: 348-356.
- KARHADKAR, S. S., G. S. BOVA, N. ABDALLAH, S. DHARA, D. GARDNER *et al.*, 2004 Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* **431**: 707-712.
- KASPERCZYK, H., K. LA FERLA-BRUHL, M. A. WESTHOFF, L. BEHREND, R. M. ZWACKA *et al.*, 2005 Betulinic acid as new activator of NF-kappaB: molecular mechanisms and implications for cancer therapy. *Oncogene* **24**: 6945-6956.
- KAUR, M., C. AGARWAL and R. AGARWAL, 2009 Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *J Nutr* **139**: 1806S-1812S.
- KERR, J. F., A. H. WYLLIE and A. R. CURRIE, 1972 Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.
- KHATIB, Z. A., H. MATSUSHIME, M. VALENTINE, D. N. SHAPIRO, C. J. SHERR *et al.*, 1993 Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res* **53**: 5535-5541.
- KIM, D. S., J. M. PEZZUTO and E. PISHA, 1998 Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 1707-1712.
- KIM, J., X. ZHANG, K. M. RIEGER-CHRIST, I. C. SUMMERHAYES, D. E. WAZER *et al.*, 2006 Suppression of Wnt signaling by the green tea compound (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG) in invasive breast cancer cells. Requirement of the transcriptional repressor HBP1. *J Biol Chem* **281**: 10865-10875.
- KIM, S. H., S. H. KIM, Y. B. KIM, Y. T. JEON, S. C. LEE *et al.*, 2009 Genistein inhibits cell growth by modulating various mitogen-activated protein kinases and AKT in cervical cancer cells. *Ann N Y Acad Sci* **1171**: 495-500.
- KIM, Y., J. W. YOON, X. XIAO, N. M. DEAN, B. P. MONIA *et al.*, 2007 Selective down-regulation of glioma-associated oncogene 2 inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* **67**: 3583-3593.
- KINZLER, K. W., S. H. BIGNER, D. D. BIGNER, J. M. TRENT, M. L. LAW *et al.*, 1987 Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* **236**: 70-73.
- KNUDSON, A. G., 1992 Stem cell regulation, tissue ontogeny, and oncogenic events. *Semin Cancer Biol* **3**: 99-106.
- KOGERMAN, P., T. GRIMM, L. KOGERMAN, D. KRAUSE, A. B. UNDEN *et al.*, 1999 Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol* **1**: 312-319.
- KONOPLEVA, M., S. ZHAO, Z. XIE, H. SEGALL, A. YOUNES *et al.*, 1999 Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **457**: 217-236.
- KRYSTOF, V., I. W. MCNAE, M. D. WALKINSHAW, P. M. FISCHER, P. MULLER *et al.*, 2005 Antiproliferative activity of olomoucine II, a novel 2,6,9-trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Mol Life Sci* **62**: 1763-1771.
- KULTZ, D., 2005 Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu Rev Physiol* **67**: 225-257.
- KURMASHEVA, R. T., and P. J. HOUGHTON, 2007 Pediatric oncology. *Curr Opin Chem Biol* **11**: 424-432.
- KWON, H. J., J. S. SHIM, J. H. KIM, H. Y. CHO, Y. N. YUM *et al.*, 2002 Betulinic acid inhibits growth factor-induced in vitro angiogenesis via the modulation of mitochondrial function in endothelial cells. *Jpn J Cancer Res* **93**: 417-425.
- LARSSON, S. C., L. BERGKVIST and A. WOLK, 2009 Coffee and black tea consumption and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor status in a Swedish cohort. *Cancer Causes Control* **20**: 2039-2044.

- LAUTH, M., A. BERGSTROM, T. SHIMOKAWA and R. TOFTGARD, 2007 Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8455-8460.
- LAWSON-SMITH, M. J., and J. K. MCGEACHIE, 1998 The identification of myogenic cells in skeletal muscle, with emphasis on the use of tritiated thymidine autoradiography and desmin antibodies. *J Anat* **192 ( Pt 2)**: 161-171.
- LEE, W. S., K. R. IM, Y. D. PARK, N. D. SUNG and T. S. JEONG, 2006 Human ACAT-1 and ACAT-2 inhibitory activities of pentacyclic triterpenes from the leaves of *Lycopus lucidus* TURCZ. *Biol Pharm Bull* **29**: 382-384.
- LI, D., X. CHEN and W. ZHANG, 2003 The inhibition of apoptosis of hepatoma cells induced by HBx is mediated by up-regulation of survivin expression. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **23**: 383-386.
- LI, F., G. AMBROSINI, E. Y. CHU, J. PLESCIA, S. TOGNIN *et al.*, 1998 Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**: 580-584.
- LIU, W. F., S. S. YU, G. J. CHEN and Y. Z. LI, 2006 DNA damage checkpoint, damage repair, and genome stability. *Yi Chuan Xue Bao* **33**: 381-390.
- LOPEZ-KNOWLES, E., S. A. O'TOOLE, C. M. MCNEIL, E. K. MILLAR, M. R. QIU *et al.*, 2009 PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer* **26**: 1121-1131.
- LOPEZ-LAZARO, M., 2008 Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res* **52 Suppl 1**: S103-127.
- LUM, L., and P. A. BEACHY, 2004 The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science* **304**: 1755-1759.
- MACFARLANE, M., and A. C. WILLIAMS, 2004 Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* **5**: 674-678.
- MANN, J. R., N. KASTHURI, F. RAAFAT, J. R. PINCOTT, S. E. PARKES *et al.*, 1990 Malignant hepatic tumours in children: incidence, clinical features and aetiology. *Paediatr Perinat Epidemiol* **4**: 276-289.
- MANNING, B. D., and L. C. CANTLEY, 2007 AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-1274.
- MARTIN, S. T., N. SATO, S. DHARA, R. CHANG, S. R. HUSTINX *et al.*, 2005 Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms. *Cancer Biol Ther* **4**: 728-733.
- MCCARTHY, J. V., and T. G. COTTER, 1997 Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. *Cell Death Differ* **4**: 756-770.
- MECKLENBURG, L., B. TYCHSEN and R. PAUS, 2005 Learning from nudity: lessons from the nude phenotype. *Exp Dermatol* **14**: 797-810.
- MERLINO, G., and L. J. HELMAN, 1999 Rhabdomyosarcoma--working out the pathways. *Oncogene* **18**: 5340-5348.
- MEYERS, R. L., 2007 Tumors of the liver in children. *Surg Oncol* **16**: 195-203.
- MONACO, E. A., 3RD, C. M. BEAMAN-HALL, A. MATHUR and M. L. VALLANO, 2004 Roscovitine, olomoucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons. *Biochem Pharmacol* **67**: 1947-1964.
- MORISON, I. M., and A. E. REEVE, 1998 Insulin-like growth factor 2 and overgrowth: molecular biology and clinical implications. *Mol Med Today* **4**: 110-115.
- MUCENIECE, R., K. SALENIECE, U. RIEKSTINA, L. KRIGERE, G. TIRZITIS *et al.*, 2007 Betulin binds to melanocortin receptors and antagonizes alpha-melanocyte stimulating hormone induced cAMP generation in mouse melanoma cells. *Cell Biochem Funct* **25**: 591-596.
- MUCENIECE, R., K. SALENIECE, J. RUMAKS, L. KRIGERE, Z. DZIRKALE *et al.*, 2008 Betulin binds to gamma-aminobutyric acid receptors and exerts anticonvulsant action in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **90**: 712-716.
- MUKHERJEE, R., M. JAGGI, P. RAJENDRAN, M. J. SIDDIQUI, S. K. SRIVASTAVA *et al.*, 2004 Betulinic acid and its derivatives as anti-angiogenic agents. *Bioorg Med Chem Lett* **14**: 2181-2184.

- MULLER, C. R., E. B. PAULSEN, P. NOORDHUIS, F. PEDEUTOUR, G. SAETER *et al.*, 2007 Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A. *Int J Cancer* **121**: 199-205.
- NEILL, G. W., L. R. GHALI, J. L. GREEN, M. S. IKRAM, M. P. PHILPOTT *et al.*, 2003 Loss of protein kinase Calpha expression may enhance the tumorigenic potential of Gli1 in basal cell carcinoma. *Cancer Res* **63**: 4692-4697.
- NESSLING, M., K. RICHTER, C. SCHWAENEN, P. ROERIG, G. WROBEL *et al.*, 2005 Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. *Cancer Res* **65**: 439-447.
- NICOLETTI, I., G. MIGLIORATI, M. C. PAGLIACCI, F. GRIGNANI and C. RICCARDI, 1991 A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**: 271-279.
- NIEDZIELSKA, G., and J. KOCKI, 2000 Evaluation of bcl-2 gene expression in papilloma of larynx in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **53**: 25-29.
- NUSSLEIN-VOLHARD, C., and E. WIESCHAUS, 1980 Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795-801.
- OBERLIN, O., A. REY, E. LYDEN, G. BISOGNO, M. C. STEVENS *et al.*, 2008 Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups. *J Clin Oncol* **26**: 2384-2389.
- OMENETTI, A., and A. M. DIEHL, 2008 The adventures of sonic hedgehog in development and repair. II. Sonic hedgehog and liver development, inflammation, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**: G595-598.
- OMENETTI, A., L. YANG, Y. X. LI, S. J. MCCALL, Y. JUNG *et al.*, 2007 Hedgehog-mediated mesenchymal-epithelial interactions modulate hepatic response to bile duct ligation. *Lab Invest* **87**: 499-514.
- PACHER, M., M. J. SEEWALD, M. MIKULA, S. OEHLER, M. MOGG *et al.*, 2007 Impact of constitutive IGF1/IGF2 stimulation on the transcriptional program of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* **28**: 49-59.
- PAPENFUSS, K., S. M. CORDIER and H. WALCZAK, 2008 Death receptors as targets for anti-cancer therapy. *J Cell Mol Med* **12**: 2566-2585.
- PAPPO, A. S., 1995 Rhabdomyosarcoma and other soft tissue sarcomas of childhood. *Curr Opin Oncol* **7**: 361-366.
- PATEL, R., A. INGLE and G. B. MARU, 2008 Polymeric black tea polyphenols inhibit 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis by inhibiting cell proliferation via Wnt/beta-catenin pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **227**: 136-146.
- PATIL, B. S., G. K. JAYAPRAKASHA, K. N. CHIDAMBARA MURTHY and A. VIKRAM, 2009 Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *J Agric Food Chem* **57**: 8142-8160.
- PATIL, M. A., J. ZHANG, C. HO, S. T. CHEUNG, S. T. FAN *et al.*, 2006 Hedgehog signaling in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* **5**: 111-117.
- PAULA-LIMA, A. C., M. A. TRICERRI, J. BRITO-MOREIRA, T. R. BOMFIM, F. F. OLIVEIRA *et al.*, 2009 Human apolipoprotein A-I binds amyloid-beta and prevents Abeta-induced neurotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 1361-1370.
- PAVLAKOVIC, H., W. HAVERS and L. SCHWEIGERER, 2001 Multiple angiogenesis stimulators in a single malignancy: implications for anti-angiogenic tumour therapy. *Angiogenesis* **4**: 259-262.
- PERILONGO, G., E. SHAFFORD, R. MAIBACH, D. ARONSON, L. BRUGIERES *et al.*, 2004 Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology--SIOPEL 2. *Eur J Cancer* **40**: 411-421.
- PFAFFL, M. W., 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- PIETSCH, T., C. FONATSCH, S. ALBRECHT, H. MASCHKE, H. K. WOLF *et al.*, 1996 Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest* **74**: 809-818.
- PIETSCH, T., E. GOTtert, E. MEESE, N. BLIN, H. J. FEICKERT *et al.*, 1988 Characterization of a continuous cell line (MHH-NB-11) derived from advanced neuroblastoma. *Anticancer Res* **8**: 1329-1333.



- PISHA, E., H. CHAI, I. S. LEE, T. E. CHAGWEDERA, N. R. FARNSWORTH *et al.*, 1995 Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* **1**: 1046-1051.
- POHJALA, L., S. ALAKURTTI, T. AHOLA, J. YLI-KAUHALUOMA and P. TAMMELA, 2009 Betulin-Derived Compounds as Inhibitors of Alphavirus Replication. *J Nat Prod* **72**: 1917-1926.
- POLLAK, M. N., 2004 Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Found Symp* **262**: 84-98; discussion 98-107, 265-108.
- PORTA, C., and R. A. FIGLIN, 2009 Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Signaling Pathway and Kidney Cancer, and the Therapeutic Potential of Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt Inhibitors. *J Urol* **182**: 2569-2577.
- PRICE, M. A., and D. KALDERON, 2002 Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* **108**: 823-835.
- PUTCHA, G. V., C. A. HARRIS, K. L. MOULDER, R. M. EASTON, C. B. THOMPSON *et al.*, 2002 Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: lessons from the analysis of mutant mice. *J Cell Biol* **157**: 441-453.
- PUTHALAKATH, H., L. A. O'REILLY, P. GUNN, L. LEE, P. N. KELLY *et al.*, 2007 ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**: 1337-1349.
- QIAN, C. N., K. A. FURGE, J. KNOL, D. HUANG, J. CHEN *et al.*, 2009 Activation of the PI3K/AKT pathway induces urothelial carcinoma of the renal pelvis: identification in human tumors and confirmation in animal models. *Cancer Res* **69**: 8256-8264.
- QIU, L., Q. WANG, W. DI, Q. JIANG, E. SCHEFELLER *et al.*, 2005 Transient activation of EGFR/AKT cell survival pathway and expression of survivin contribute to reduced sensitivity of human melanoma cells to betulinic acid. *Int J Oncol* **27**: 823-830.
- QUALTROUGH, D., A. BUDA, W. GAFFIELD, A. C. WILLIAMS and C. PARASKEVA, 2004 Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment. *Int J Cancer* **110**: 831-837.
- RABI, T., S. SHUKLA and S. GUPTA, 2008 Betulinic acid suppresses constitutive and TNFalpha-induced NF-kappaB activation and induces apoptosis in human prostate carcinoma PC-3 cells. *Mol Carcinog* **47**: 964-973.
- RAFFEL, C., R. B. JENKINS, L. FREDERICK, D. HEBRINK, B. ALDERETE *et al.*, 1997 Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res* **57**: 842-845.
- RAINIER, S., C. J. DOBRY and A. P. FEINBERG, 1995 Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res* **55**: 1836-1838.
- RAJENDRAN, P., M. JAGGI, M. K. SINGH, R. MUKHERJEE and A. C. BURMAN, 2008 Pharmacological evaluation of C-3 modified Betulinic acid derivatives with potent anticancer activity. *Invest New Drugs* **26**: 25-34.
- RASSOUL, F., J. SALVETTER, D. REISSIG, W. SCHNEIDER, J. THIERY *et al.*, 2006 The influence of garlic (*Allium sativum*) extract on interleukin 1alpha-induced expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Phytomedicine* **13**: 230-235.
- REGL, G., M. KASPER, H. SCHNIDAR, T. EICHBERGER, G. W. NEILL *et al.*, 2004 Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res* **64**: 7724-7731.
- RENAN, M. J., 1993 How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog* **7**: 139-146.
- RIEDLINGER, W. F., H. P. KOZAKEWICH and S. O. VARGAS, 2005 Myogenic markers in the evaluation of embryonal botryoid rhabdomyosarcoma of the female genital tract. *Pediatr Dev Pathol* **8**: 427-434.
- ROBERTS, W. M., E. C. DOUGLASS, S. C. PEIPER, P. J. HOUGHTON and A. T. LOOK, 1989 Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res* **49**: 5407-5413.
- ROCHA, L., A. MARSTON, M. A. KAPLAN, H. STOECKLI-EVANS, U. THULL *et al.*, 1994 An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* **36**: 1381-1385.
- ROMER, J. T., H. KIMURA, S. MAGDALENO, K. SASAI, C. FULLER *et al.*, 2004 Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer Cell* **6**: 229-240.

- RUBIN, L. L., and F. J. DE SAUVAGE, 2006 Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 1026-1033.
- RUDIN, C. M., C. L. HANN, J. LATERRA, R. L. YAUCH, C. A. CALLAHAN *et al.*, 2009 Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* **361**: 1173-1178.
- RUIZ I ALTABA, A., 2008 Therapeutic inhibition of Hedgehog-Gli signaling in cancer: epithelial, stromal, or stem cell targets? *Cancer Cell* **14**: 281-283.
- RUIZ I ALTABA, A., V. PALMA and N. DAHMANE, 2002a Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* **3**: 24-33.
- RUIZ I ALTABA, A., P. SANCHEZ and N. DAHMANE, 2002b Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* **2**: 361-372.
- RZESKI, W., A. STEPULAK, M. SZYMANSKI, M. SIFRINGER, J. KACZOR *et al.*, 2006 Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **374**: 11-20.
- SALMENA, L., A. CARRACEDO and P. P. PANDOLFI, 2008 Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* **133**: 403-414.
- SAMUELS, Y., and K. ERICSON, 2006 Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* **18**: 77-82.
- SANCHEZ, P., A. M. HERNANDEZ, B. STECCA, A. J. KAHLER, A. M. DEGUEME *et al.*, 2004 Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12561-12566.
- SANDRI, M., and U. CARRARO, 1999 Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1373-1390.
- SANTOS, R. C., J. A. SALVADOR, S. MARIN and M. CASCANTE, 2009 Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem* **17**: 6241-6250.
- SAREK, J., J. KLINOT, P. DZUBAK, E. KLINOTOVA, V. NOSKOVA *et al.*, 2003 New lupane derived compounds with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem* **46**: 5402-5415.
- SASAI, K., J. T. ROMER, Y. LEE, D. FINKELSTEIN, C. FULLER *et al.*, 2006 Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer Res* **66**: 4215-4222.
- SAWADA, N., K. KATAOKA, K. KONDO, H. ARIMOCHI, H. FUJINO *et al.*, 2004 Betulinic acid augments the inhibitory effects of vincristine on growth and lung metastasis of B16F10 melanoma cells in mice. *Br J Cancer* **90**: 1672-1678.
- SAXENA, B. B., L. ZHU, M. HAO, E. KISILIS, M. KATDARE *et al.*, 2006 Boc-lysinated-betulinic acid: a potent, anti-prostate cancer agent. *Bioorg Med Chem* **14**: 6349-6358.
- SCHMIDT, M. L., K. L. KUZMANOFF, L. LING-INDECK and J. M. PEZZUTO, 1997 Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur J Cancer* **33**: 2007-2010.
- SCHUHLY, W., J. HEILMANN, I. CALIS and O. STICHER, 1999 New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta Med* **65**: 740-743.
- SCHWEIGERER, L., G. NEUFELD, A. MERGIA, J. A. ABRAHAM, J. C. FIDDES *et al.*, 1987 Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: implications for the proliferation and neovascularization of myoblast-derived tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 842-846.
- SCOTTING, P. J., D. A. WALKER and G. PERILONGO, 2005 Childhood solid tumours: a developmental disorder. *Nat Rev Cancer* **5**: 481-488.
- SHAI, L. J., L. J. MCGAW, M. A. ADEROGBA, L. K. MDEE and J. N. ELOFF, 2008 Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves. *J Ethnopharmacol* **119**: 238-244.
- SHAMPO, M. A., and R. A. KYLE, 2002 Kary B. Mullis--Nobel Laureate for procedure to replicate DNA. *Mayo Clin Proc* **77**: 606.
- SHIRAIISHI, H., H. OKAMOTO, A. YOSHIMURA and H. YOSHIDA, 2006 ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci* **119**: 3958-3966.
- SICKLICK, J. K., Y. X. LI, A. JAYARAMAN, R. KANNANGAI, Y. QI *et al.*, 2006 Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **27**: 748-757.

- SMITH, M. A., C. L. MORTON, D. PHELPS, K. GIRTMAN, G. NEALE *et al.*, 2008 SK-NEP-1 and Rh1 are Ewing family tumor lines. *Pediatr Blood Cancer* **50**: 703-706.
- SMITH, P. F., A. OGUDELE, A. FORREST, J. WILTON, K. SALZWEDEL *et al.*, 2007 Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-o-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 3574-3581.
- SOLDANI, C., and A. I. SCOVASSI, 2002 Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **7**: 321-328.
- STECCA, B., C. MAS, V. CLEMENT, M. ZBINDEN, R. CORREA *et al.*, 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.
- STECCA, B., and A. RUIZ I ALTABA, 2005 Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors. *J Neurobiol* **64**: 476-490.
- SU, M., X. WU, H. Y. CHUNG, Y. LI and W. YE, 2009 Antiproliferative activities of five Chinese medicinal herbs and active compounds in *Elephantopus scaber*. *Nat Prod Commun* **4**: 1025-1030.
- SUBRAMANYAM, R., A. GOLLAPUDI, P. BONIGALA, M. CHINNABOINA and D. G. AMOORU, 2009 Betulinic acid binding to human serum albumin: a study of protein conformation and binding affinity. *J Photochem Photobiol B* **94**: 8-12.
- SUGAWARA, W., M. HARUTA, F. SASAKI, N. WATANABE, Y. TSUNEMATSU *et al.*, 2007 Promoter hypermethylation of the RASSF1A gene predicts the poor outcome of patients with hepatoblastoma. *Pediatr Blood Cancer* **49**: 240-249.
- SUZUKI, M., M. KATO, C. YUYAN, J. TAKITA, M. SANADA *et al.*, 2008 Whole-genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single-nucleotide polymorphism genotyping microarrays. *Cancer Sci* **99**: 564-570.
- TADA, M., F. KANAI, Y. TANAKA, K. TATEISHI, M. OHTA *et al.*, 2008 Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **14**: 3768-3776.
- TAIPALE, J., J. K. CHEN, M. K. COOPER, B. WANG, R. K. MANN *et al.*, 2000 Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**: 1005-1009.
- TAKADA, Y., and B. B. AGGARWAL, 2003 Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF-kappa B activation through inhibition of I kappa B alpha kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. *J Immunol* **171**: 3278-3286.
- TAKAGI, H., S. SASAKI, H. SUZUKI, M. TOYOTA, R. MARUYAMA *et al.*, 2008 Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* **43**: 378-389.
- TAN, Y., R. YU and J. M. PEZZUTO, 2003 Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin Cancer Res* **9**: 2866-2875.
- TANIGUCHI, H., H. YAMAMOTO, N. AKUTSU, K. NOSHO, Y. ADACHI *et al.*, 2007 Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatic structure in human gastrointestinal cancer. *J Pathol* **213**: 131-139.
- TANIGUCHI, K., L. R. ROBERTS, I. N. ADERCA, X. DONG, C. QIAN *et al.*, 2002 Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* **21**: 4863-4871.
- THURNHER, D., D. TURHANI, M. PELZMANN, B. WANNEMACHER, B. KNERER *et al.*, 2003 Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. *Head Neck* **25**: 732-740.
- TOFTGARD, R., 2000 Hedgehog signalling in cancer. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1720-1731.
- TOSTAR, U., C. J. MALM, J. M. MEIS-KINDBLOM, L. G. KINDBLUM, R. TOFTGARD *et al.*, 2006 Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* **208**: 17-25.
- TREMBLAY, M. R., M. NESLER, R. WEATHERHEAD and A. C. CASTRO, 2009 Recent patents for Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancy. *Expert Opin Ther Pat* **19**: 1039-1056.

- TURASHVILI, G., J. BOUCHAL, G. BURKADZE and Z. KOLAR, 2006 Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis. *Pathobiology* **73**: 213-223.
- UDEANI, G. O., G. M. ZHAO, Y. GEUN SHIN, B. P. COOKE, J. GRAHAM *et al.*, 1999 Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm Drug Dispos* **20**: 379-383.
- VARJOSALO, M., and J. TAIPALE, 2008 Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev* **22**: 2454-2472.
- VON HOFF, D. D., P. M. LORUSSO, C. M. RUDIN, J. C. REDDY, R. L. YAUCH *et al.*, 2009 Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **361**: 1164-1172.
- VON SCHWEINITZ, D., 2006 Management of liver tumors in childhood. *Semin Pediatr Surg* **15**: 17-24.
- VON SCHWEINITZ, D., H. HECKER, D. HARMS, U. BODE, P. WEINEL *et al.*, 1995 Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89. *J Pediatr Surg* **30**: 845-852.
- VON SCHWEINITZ, D., H. HECKER, G. SCHMIDT-VON-ARNDT and D. HARMS, 1997 Prognostic factors and staging systems in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer* **74**: 593-599.
- VOUSDEN, K. H., and X. LU, 2002 Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**: 594-604.
- WANG, H., D. PENG and J. XIE, 2009 Ginseng leaf-stem: bioactive constituents and pharmacological functions. *Chin Med* **4**: 20.
- WARMANN, S. W., H. FRANK, H. HEITMANN, P. RUCK, T. HERBERTS *et al.*, 2008 Bcl-2 gene silencing in pediatric epithelial liver tumors. *J Surg Res* **144**: 43-48.
- WARZECHA, J., L. BONKE, U. KOEHL, D. MUNKELT, S. GOTTIG *et al.*, 2008 The hedgehog inhibitor cyclopamine induces apoptosis in leukemic cells in vitro. *Leuk Lymphoma* **49**: 2383-2386.
- WARZECHA, J., S. GOTTIG, K. U. CHOW, C. BRUNING, D. PERCIC *et al.*, 2007 Inhibition of osteosarcoma cell proliferation by the Hedgehog-inhibitor cyclopamine. *J Chemother* **19**: 554-561.
- WEBER, R. G., T. PIETSCH, D. VON SCHWEINITZ and P. LICHTER, 2000 Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome. *Am J Pathol* **157**: 571-578.
- WEINBERG, A. G., and M. J. FINEGOLD, 1983 Primary hepatic tumors of childhood. *Hum Pathol* **14**: 512-537.
- WHITE, J. D., C. RACHEL, R. VERMEULEN, M. DAVIES and M. D. GROUNDS, 2002 The role of p53 in vivo during skeletal muscle post-natal development and regeneration: studies in p53 knockout mice. *Int J Dev Biol* **46**: 577-582.
- WICKING, C., I. SMYTH and A. BALE, 1999 The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* **18**: 7844-7851.
- WILLMANN, M., V. WACHECK, J. BUCKLEY, K. NAGY, J. THALHAMMER *et al.*, 2009 Characterization of NVX-207, a novel betulinic acid-derived anti-cancer compound. *Eur J Clin Invest* **39**: 384-394.
- WIRTHS, O., A. WAHA, S. WEGGEN, P. SCHIRMACHER, T. KUHNE *et al.*, 2003 Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* **83**: 429-434.
- WU, P. P., S. C. KUO, W. W. HUANG, J. S. YANG, K. C. LAI *et al.*, 2009 (-)-Epigallocatechin gallate induced apoptosis in human adrenal cancer NCI-H295 cells through caspase-dependent and caspase-independent pathway. *Anticancer Res* **29**: 1435-1442.
- XIA, S. J., J. G. PRESSEY and F. G. BARR, 2002 Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* **1**: 97-104.
- XU, K., F. GUO, S. ZHANG, C. LIU, F. WANG *et al.*, 2009 Blocking Ihh signaling pathway inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of PSCs. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **29**: 39-44.
- YANG, J., and R. H. LIU, 2009 Synergistic effect of apple extracts and quercetin 3-beta-d-glucoside combination on antiproliferative activity in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* **57**: 8581-8586.

- YUAN, T. L., and L. C. CANTLEY, 2008 PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**: 5497-5510.
- ZATKOVA, A., J. M. ROUILLARD, W. HARTMANN, B. J. LAMB, R. KUICK *et al.*, 2004 Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **39**: 126-137.
- ZHANG, L., D. YU, D. J. HICKLIN, J. A. HANNAY, L. M. ELLIS *et al.*, 2002 Combined anti-fetal liver kinase 1 monoclonal antibody and continuous low-dose doxorubicin inhibits angiogenesis and growth of human soft tissue sarcoma xenografts by induction of endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* **62**: 2034-2042.
- ZHANG, W., X. CHEN and F. QIU, 2003 An antisense plasmid targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes hepatocarcinoma cells to chemotherapy. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **23**: 387-391.
- ZHANG, X., N. HARRINGTON, R. C. MORAES, M. F. WU, S. G. HILSENBECK *et al.*, 2009 Cyclopamine inhibition of human breast cancer cell growth independent of Smoothed (Smo). *Breast Cancer Res Treat* **115**: 505-521.
- ZHOU, Y., C. GARCIA-PRIETO, D. A. CARNEY, R. H. XU, H. PELICANO *et al.*, 2005 OSW-1: a natural compound with potent anticancer activity and a novel mechanism of action. *J Natl Cancer Inst* **97**: 1781-1785.
- ZUCO, V., R. SUPINO, S. C. RIGHETTI, L. CLERIS, E. MARCHESI *et al.*, 2002 Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett* **175**: 17-25.