

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
des Kopf- und Neurozentrums  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. R. Schmelzle

# **Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor bei Neurofibromatose Typ 1- assoziierten Tumoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Hong Ha Rosa Nguyen  
aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 28.10.10

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. V.-F. Mautner

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. C. Hagel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. R. E. Friedrich



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Das Krankheitsbild der <i>Neurofibromatose Typ 1</i> (NF1)	1
1.1.1	Diagnostische Charakteristika der <i>NF1</i>	1
1.1.2	Neurofibrome und plexiforme Neurofibrome	6
1.1.3	Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST)	7
1.2	Physiologische Funktion von Vitamin D <sub>3</sub>	8
1.2.1	Physiologische Effekte/Wirkungen von 1,25-Dihydroxycholecalciferol und Vitamin D <sub>3</sub> -Mangel	8
1.2.2	Biochemie und Physiologie des Vitamin D <sub>3</sub> und seiner Metabolite	10
1.2.3	Vitamin D <sub>3</sub> -Rezeptor	12
1.3	Anti-neoplastische Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub>	16
1.3.1	Allgemeine anti-neoplastische Wirkung von 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	16
1.3.2	Anti-neoplastische Wirkung von 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> in Prostatakrebszellen	17
1.4	Vitamin D <sub>3</sub> und NF1	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	22
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1	Materialien und Geräte	23
2.2	Patienten und Tumoren	27
2.3	Zellkultur	27
2.4	Gewebekulturen	30
2.5	Immunfluoreszenz-Färbung an kultivierten Zellen	31
2.6	Immunhistochemische Färbung an Gewebeschnitten	33
2.7	Auswertung	36

### **3 ERGEBNISSE** **37**

---

3.1	Kultivierung der Schwanzzellen aus Tumoren	37
3.2	Bestimmung der optimalen Antikörper-Verdünnung	39
3.3	VDR im Prostata-Karzinomgewebe	42
3.4	VDR-Färbung in MPNST	43
3.5	VDR in Neurofibromen von Patienten mit vermindertem Vitamin D <sub>3</sub> -Spiegel	47
3.6	Quantifizierung und Korrelation mit dem Vitamin D <sub>3</sub> -Spiegel der Patienten	49

### **4 DISKUSSION** **52**

---

4.1	VDR-Expression in MPNST	52
4.2	VDR-Expression in Neurofibromen und plexiformen Neurofibromen	55

### **5 ZUSAMMENFASSUNG** **58**

---

### **6 LITERATURVERZEICHNIS** **59**

---

### **7 ANNEX** **68**

---

7.1	Abkürzungsverzeichnis	68
7.2	Abbildungsverzeichnis	70
7.3	Danksagung	73
7.4	Erklärung	74

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1 (NF1)

*Neurofibromatose Typ 1 (NF1)*, auch unter dem Namen *Morbus Recklinghausen* beschrieben, zählt zu den Erkrankungen aus dem Formenkreis der Phakomatosen und tritt mit einer Inzidenz von 1:3.000 und einer Prävalenz von 1:4.500 in populationsbasierten Studien auf (Lammert M *et al.*, 2005; Friedmann JM, Riccardi VM, 1999). *NF1* ist die häufigste hereditäre, autosomal-dominante Tumordisposition, die jeweils zu ca. 50% vererbt wird oder durch Neumutationen entsteht.

*NF1* hat eine 100%ige Penetranz im Alter von 5 Jahren. Die Ausprägung der Symptome ist altersabhängig. Morbidität ist durch verschiedene krankheitsassoziierte Komplikationen (Tumoren des Nervensystems, knöcherne Manifestation und kognitive Störungen) determiniert. Mortalität der *NF1*-Patienten ist im Wesentlichen auf das Auftreten von malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNST) zurückzuführen. Ein Drittel der Patienten entwickeln mindestens eine Komplikation zu Lebzeiten (Zoller M *et al.*, 1995).

#### 1.1.1 Diagnostische Charakteristika der NF1

Die diagnostischen Kriterien für *NF1* wurden in einem numerischen Klassifikationssystem, dem *Statement Neurofibromatosis* aus dem Jahr 1988 auf der *National Institutes of Health (NIH) Consensus Development Conference* festgelegt und sind im Folgenden in Tab. 1 dargestellt (Stumpf DA *et al.*, 1988, Gutmann DH *et al.*, 1997). Für die Diagnose *NF1* müssen bei Patienten mindestens zwei der tabellierten Kriterien vorhanden sein.

1. Café au lait (CAL)-Flecken	6 oder mehr, mit einem Durchmesser: präpubertär, $\varnothing \geq 0,5$ cm, postpubertär, $\varnothing \geq 1,5$ cm
2. Neurofibrome (NF)	2 oder mehr NF jeden Typs oder ein plexiformes NF (PNF)
3. <i>Freckling</i>	(in den Hautfalten) axillär oder inguinal
4. Optikusgliom	
5. Lischknötchen (Iris-Hamartom)	2 oder mehr
6. Charakteristische Knochenläsionen	lange Röhrenknochen, distinkte Knochenläsionen (kongenitale Pseudarthrose der Tibia, Keilbeinflügeldysplasie)
7. positive Familienanamnese	betroffener Verwandter ersten Grades (Eltern, Geschwister oder Kinder)

Tab. 1: Klinische Diagnosekriterien für *NFI* (NIH, 1988). Für die Diagnose *NFI* müssen Patienten mindestens zwei der tabellierten Kriterien aufweisen.

Die Kardinalsymptome der *NFI* äußern sich in Form von Pigmentveränderungen (CAL-Flecke, > 90%, Hautfalten-*Freckling*, 90%, Lischknötchen, 95%) und Neurofibromen (dermale NF, nahezu 100%, spinale NF, 40%). CAL-Flecke treten in der Regel im Laufe der ersten zwei Lebensjahre auf und sind die erste klinische Manifestation der Erkrankung (Friedman JM, Riccardi VM, 1999). Charakteristische Merkmale im Kindesalter sind eine allgemeine Entwicklungsverzögerung und motorische Defizite. Dabei steht die psychomotorische Entwicklungsverzögerung im Vordergrund. 50% der Kinder erreichen die sogenannten Meilensteine der Entwicklung nicht zeitgerecht. Lernschwierigkeiten können die Persönlichkeitsentwicklung der Kinder beeinträchtigen. Aufmerksamkeitsstörungen, Teilleistungsstörungen und ein verminderter Intelligenzquotient im Bereich von 75-80 erschweren die Individuation von Kindern und Jugendlichen. Diese Faktoren beeinflussen die Persönlichkeit der Erwachsenen im Sinne einer Selbstwertstörung, depressiven Verstimmungen und folgendem sozialen Abstieg. Im Kindesalter können sich für Betroffene weitere Belastungsfaktoren durch Minderwuchs, *Pubertas praecox* und knöcherne Komplikationen (Skoliose und Pseudarthrose) ergeben. Pilozytische Astrozytome treten im Kindes- und Jugendalter primär als Optikusgliome (OPT) und Hirnstammgliome auf. Zudem werden Rhabdomyosarkome, juvenile myelomonozytäre Leukämien (JMML) und MPNST gehäuft beobachtet (Friedrich R *et al.*, 2007).

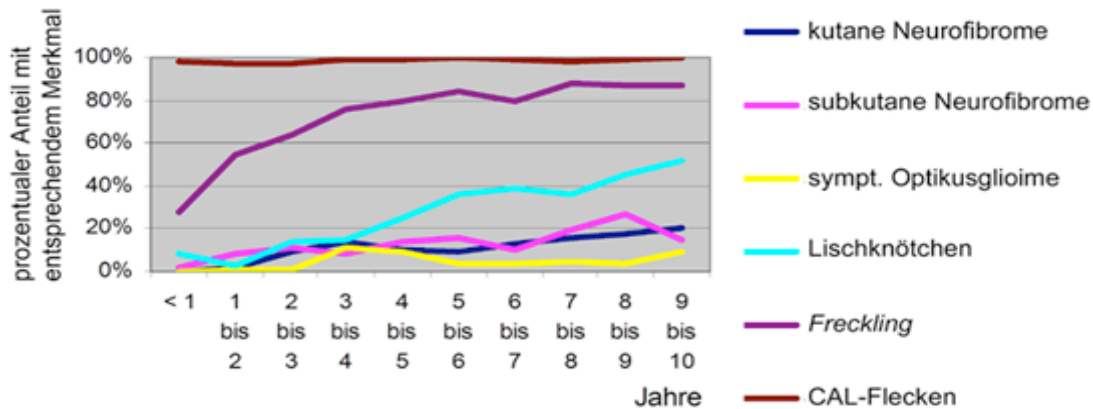


Abb. 1: Diagnostische Kriterien einer NF1 im Kindesalter. Schematische Darstellung des zeitlichen Auftretens der Merkmale; in Anlehnung an JM Friedmann.

Plexiforme Neurofibrome können als konnatale Tumoren im Kindesalter bereits nachweisbar sein und zeigen insbesondere in den Jugendjahren Progression (Tucker T *et al.*, 2009). Kutane Neurofibrome sind in aller Regel mit Beginn der Pubertät diskret nachweisbar und nehmen im Verlauf des Lebens zu. Die maßgebende Beeinträchtigung im Erwachsenenalter ist die Entstellung durch die kutanen und plexiformen Neurofibrome, die zu einer verminderten Lebensqualität führt und vielfältige psychosoziale Auswirkungen hat. Darüber hinaus kommt es aufgrund folgender Krankheitsmanifestationen zu weiteren Beeinträchtigungen: MPNST, gastrointestinale Stromatumoren und Hypertonus (Phäochromozytom) (Gutmann DH *et al.*, 1997).

Das PNF wird bei 30% der Patienten im Rahmen von Populationsstudien beobachtet. Neuere Studien, die die interne Tumormanifestation mit Hilfe der Magnetresonanztomographie berücksichtigen, weisen auf ein deutlich höheres Auftreten hin (Mautner VF *et al.*, 2008). Bei 8-13% der Patienten kommt es im Verlauf des Lebens zu einer Transformation der PNF zu MPNST. Ein solcher Entartungsprozess ist häufig mit Zunahme der Tumorgroße, Blutungen, neu aufgetretenen neurologischen Defiziten und akuten Schmerzen assoziiert (Evans DG *et al.*, 2002). Eine vollständige Resektion des PNF ohne Schädigung des normalen Gewebes ist im Vergleich zu kutanen NF (KNF), aufgrund des diffusen und infiltrativen Tumorwachstums, oftmals nicht möglich. Dagegen wird in aller Regel bei kutanen Neurofibromen keine Malignisierung beobachtet.



### **Genetik der *NF1***

Die genetische Ursache der Erkrankung ist eine heterozygote Mutation im *NF1*-Tumorsuppressorgen auf dem Chromosomenabschnitt 17q11.2 (Viskochil D *et al.*, 1990). Die Inaktivierung des zweiten (intakten) Allels, d.h. ein Verlust der Heterozygotie (LOH), wurde in ca. 13% der dermalen Neurofibrome, 40% der PNF und 60% der MPNST nachgewiesen (Rasmussen SA *et al.*, 2000).

Das *NF1*-Gen umfasst 350 kB genomische DNA mit 60 Exons und kodiert mittels alternativem *Splicing* für zwei RNA-Transkripte der Länge 11 und 13 kB. Das Genprodukt Neurofibromin, welches in verschiedenen Geweben eine variable Genexpression aufweist, besteht aus 2818 Aminosäuren (Viskochil D *et al.*, 1990, Viskochil D, 2002). Neurofibromin gehört zu den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) und besitzt Eigenschaften eines Tumorsuppressors (Xu G *et al.*, 1990). Es inaktiviert das Ras-Protein und hemmt somit einen elementaren Bestandteil des Signaltransduktionsweges, der bei Zellwachstum und Zelldifferenzierung, Energie- und Sauerstoffhaushalt der Zelle sowie der Tumorgenese eine Rolle spielt (Bourne HR *et al.*, 1990, 1991, Johannessen CM *et al.*, 2005, s. Abb. 2). Das Protein Ras wird u.a. durch G-Proteingekoppelte Rezeptoren und Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert. Es kann GTP-abhängig seinen Aktivierungszustand ändern. GTP-gebunden ist es als GTP-Ras aktiviert und durch GTP-Hydrolyse als GDP-Ras deaktiviert. Im aktivierten Zustand induziert GTP-Ras Signalkaskaden, die in oben genannten Zelleffekten münden. Nukleotidaustausch und GTP-Hydrolyse werden durch so genannte *Guanine Exchange Factors* (GEF) wie SOS1, SOS2 oder CDC25 bzw. GTPase-aktivierende Proteine (GAP) reguliert. GEF verändern die Dissoziation der Nukleotide und führen zu einer erhöhten GTP-Konzentration in der Zelle, wodurch ein Austausch von GDP durch GTP gefördert wird. Säuger besitzen zwei GAP: p120GAP und Neurofibromin (Trahey M und McCormick F, 1987, Xu G *et al.*, 1990). Die Co-Expression und Aktivität beider Enzyme ist stets vorhanden. Neurofibromin besitzt eine 32-fach höhere Affinität zu H-Ras, aber eine 7,4-fach geringere Aktivität als p120GAP. In Untersuchungen von unterschiedlichen Geweben reichte die Aktivität des Neurofibromin von <1% bis 80% (Ahmadian MR *et al.*, 1996, Bollag G und McCormick F, 1991). In zwei anderen Studien wurde der Anteil von Ras-gebundenem GTP am Gesamt-GTP in MPNST mit keinem und äußerst geringem Nachweis von Neurofibromin untersucht. Ras-GTP war in den Geweben von durchschnittlich 8,7% auf 37,8% (Basu TN *et al.*, 1992) bzw. von 5% auf 46% erhöht (DeClue *et al.*, 1992). Bei Abwesenheit oder geringerer Expression von Neurofibromin steigt demnach der Ras-GTP-Gehalt und somit auch das durch die Ras-Signaltransduktion induzierte Zellwachstum und die Zelldifferenzierung.

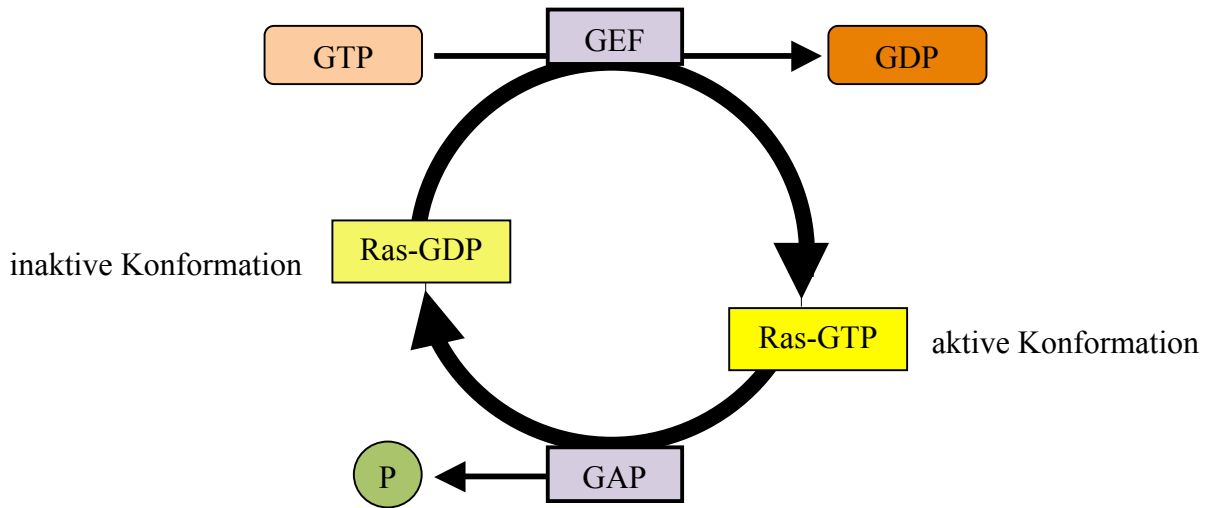


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung und Deaktivierung des Ras-Proteins mit den beteiligten Co-Faktoren: Guanodin-5'-Triphosphat (GTP), *Guanine Exchange Factors* (GEF), Guanodin-5'-Diphosphat (GDP), GTPase-aktivierende Proteine (GAP), aktiviertes Ras-Protein (Ras-GTP), deaktiviertes Ras-Protein (GDP-Ras).

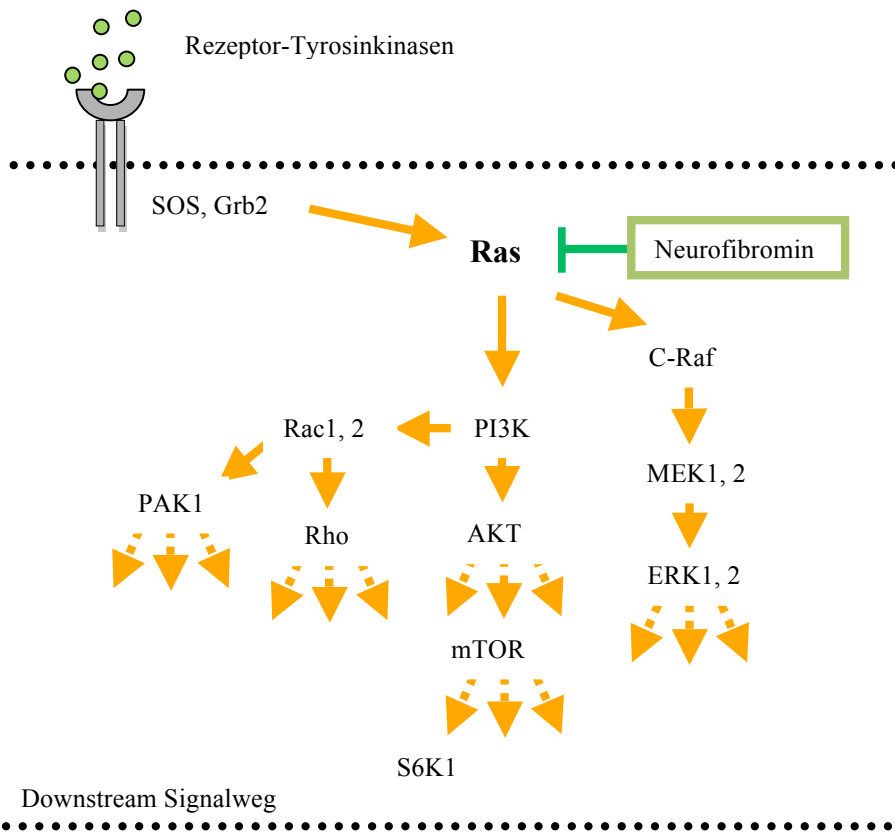


Abb. 3: Angriffspunkt von Neurofibromin innerhalb der Ras-Signaltransduktionskaskade.

### 1.1.2 Neurofibrome und plexiforme Neurofibrome

Neurofibrome (NF) sind gutartige Nervenscheidentumoren des peripheren Nervensystems. Sie lassen sich aufgrund ihres Wachstumsverhaltens in kutane (KNF) und plexiforme NF (PNF) einteilen und sind hyperzellulär und äußerst heterogen in ihrer Zellzusammensetzung. Sie setzen sich aus Schwannzellen (Hauptanteil mit 60-80%), Fibroblasten, Neuronen, Mastzellen, Endothelzellen und mitunter Pigmentzellen zusammen (Peltonen J *et al.*, 1988, Menon AG *et al.*, 1990). Es wurde bewiesen, dass Schwannzellen die Tumovorläuferzellen der Neurofibrome sind (Kluwe *et al.*, 1999). Die selektive Kultivierung dieses Zelltyps aus NF ist erst seit einigen Jahren möglich. Man verwendet hierfür Heregulin, das das selektive Schwannzell-Wachstum fördert und 3-Iso-Butyl-L-Methylxanthine (IBMX), welches das Wachstum von Fibroblasten unterdrückt und gleichzeitig einen synergistischen Einfluss auf die Wirkung des Heregulin besitzt (Rosenbaum T *et al.*, 1998). Schwannzellen exprimieren das für sie spezifische Protein S100 (Weiss SW *et al.*, 1983). Die Schwannzell-spezifische Morphologie ist durch die sogenannte Spindelform mit bipolaren Fortsätzen gekennzeichnet.

Die in ihrer Erscheinung sehr variablen KNF geben der Erkrankung ihren Namen und finden sich bei nahezu allen erwachsenen *NFI*-Patienten. Ihr Wachstum ist lokal beschränkt und innerhalb der Dermis und Epidermis lokalisiert. KNF manifestieren sich im Jugendalter und zeigen eine lebenslange Progression. Nur in seltenen Fällen verursachen sie Schmerzen (Friedman JM, Riccardi VM, 1999). Das Einsetzen der Pubertät, Schwangerschaft und Traumen können das Wachstum dieser Tumore auslösen und beschleunigen.

PNF sind bei knapp einem Drittel der *NFI*-Patienten vorhanden und von den anderen Neurofibromtypen abzugrenzen. Sie lassen sich in (1) oberflächlich, (2) tief verdrängend und (3) tief invasiv wachsende PNF einteilen und unterscheiden sich außerdem durch ihr noduläres bzw. diffuses Auftreten. (Mautner VF *et al.*, 2008). Ihnen ist gemein, dass sie ein netzartiges Wachstum entlang der Nervenwurzeln haben, sich von Hauptnervenwurzeln auf kleinere distale Äste verteilen und hierbei, gemäß der obigen Einteilung, oberflächliche, invasive und raumfordernde Eigenschaften besitzen können. PNF sind im Bereich großer Nervenplexus, dorsaler Nervenwurzeln oder autonomer und kranialer Nerven zu finden. Sie können in jüngeren Jahren zu einer entsprechenden segmentalen Hypertrophie führen. Klinisch können sie durch eine Hyperpigmentierung, Hypertrophie und Hypertrichiose auffällig sein.

### 1.1.3 Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST)

Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNST) gehören zu der Gruppe der Weichteilsarkome und nehmen in dieser Gruppe einen Gesamtanteil von 5-10% ein. Ca. die Hälfte aller MPNST sind mit *NF1* vergesellschaftet (Ferner RE, Gutmann DH, 2002, Korf BR, 2000). Ein Sarkom wird als MPNST definiert, wenn es sich entweder aus einem peripheren Nerven entwickelt hat, als Vorläufer einen benignen Nervenscheidentumor aufweist oder wenn in einer histologischen Untersuchung Schwannzellen im Tumor nachweisbar sind. MPNST-Zellen erscheinen histopathologisch als dichte zelluläre Faszikel, die in Kombination mit myxoiden Arealen vorliegen. Die Zellen können rund, fusiform oder spindelförmig mit irregulären Konturen sein und besitzen die typischen Zellmalignitätskriterien, wie erhöhter Mitoseindex, nukleärer Pleomorphismus, Zellatypie, Nekrosen, Angiogenese und Infiltration von benachbartem Gewebe (Ducatman BS *et al.*, 1986, Hirose T *et al.*, 1998). Nur 50-70% der MPNST weisen das Schwannzell-spezifische Protein S100 auf (Weiss *et al.*, 1983).

*NF1*-Patienten haben ein lebenslanges Risiko von etwa 8-13% aus internen, tief infiltrierenden PNF ein MPNST zu entwickeln (Tucker T *et al.*, 2005). Zudem wird eine Assoziation mit subkutanen NF diskutiert (Khosrotehrani K *et al.*, 2005, Mautner VF *et al.*, 2008). Die maligne Transformation ereignet sich vornehmlich im Alter zwischen 20-35 Jahren und ist häufig an den proximalen Extremitäten oder am Stamm lokalisiert. MPNST haben ein aggressiv infiltrierendes Tumorwachstum. Die 5 Jahres-Überlebensrate beträgt 21% (Evans DG *et al.*, 2002) und ist stark abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung und Beginn der Therapie. Typisches klinisches Merkmal der malignen Entartung stellen auch hier Größenzunahme, Schmerzen und neurologische Defizite dar. MPNST metastasieren primär in die Lungen, in den Knochen und in die Pleura.

## 1.2 Physiologische Funktion des Vitamin D<sub>3</sub>

Vitamin D<sub>3</sub> bzw. Calciferol bezeichnet eine Gruppe lipophiler Moleküle, die strukturell zu den Steroiden gezählt werden. Vitamin D<sub>3</sub> ist ein Prohormon. Als biologisch aktiver Metabolit fungiert 1,25-Dihydroxycholecalciferol, auch 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] genannt. Das Molekül spielt eine essentielle Rolle im Knochen-, Calcium- und Phosphathaushalt, ist aber auch entscheidend in andere Prozesse involviert, wie zum Beispiel in die Hemmung des Zellwachstums, die Induktion der Zelldifferenzierung, die Immunmodulation sowie in die Interaktion mit anderen Hormonsystemen. Aufgrund ihrer physiologischen Funktionen werden die aktiven Metabolite des Vitamin D<sub>3</sub> als Hormone angesehen.

### 1.2.1 Physiologische Effekte/Wirkungen von 1,25-Dihydroxycholecalciferol und Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel

Vitamin D<sub>3</sub> und seine Metabolite haben eine essentielle Wirkung im Mineralisations- und Calciumhaushalt. Sie sind an den Interaktionen zwischen Darm, Knochen, Nieren und Nebenschilddrüse beteiligt. Als Zielwert der Blutkonzentration von Vitamin D<sub>3</sub> werden > 80 nmol/L (≈ 30 µg/L) angegeben (Holick MF *et al.*, 2004).

#### Darm

Im Dünndarm kann Vitamin D<sub>3</sub> die Calcium-Resorption steigern und die Phosphataufnahme hemmen. Es existieren zwei voneinander unabhängige Mechanismen der intestinalen Calciumaufnahme. Bei dem transzellulären Prozess werden die epithelialen Calciumkanäle TRPV6 (ECaC2 oder CaT1) und zu einem geringeren Anteil TRPV5 (ECaC1) benötigt, die durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und den Vitamin D-Rezeptor (VDR) reguliert werden. Nach luminaler Aufnahme durch die genannten Kanäle wird Calcium mittels des Transportmoleküls Calbindin D auf die basolaterale Seite der Zelle transportiert, um dort über die membranständige Ca<sup>2+</sup>-ATPase PMCA1b und den Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher NCX1 in den venösen Blutstrom zu gelangen. Die Aufnahme von Calcium in die Enterozyten ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und streng reguliert durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und VDR. Der transzelluläre Mechanismus ist bei 10 nM im Duodenum bzw. > 32 ng/ml im Blut gesättigt. Die schnellen Reaktionen bilden einen alternativen parazellulären Aufnahmeweg. Ihre mengenmäßige Relevanz in Bezug auf die Gesamtresorptionsrate wird derzeit noch diskutiert (Bouillon R *et. Al.*, 2003).

Neben der Regulation des Calciumhaushaltes beeinflusst Vitamin D<sub>3</sub> die Phosphat(P<sub>i</sub>)-Homöostase. Die Phosphatrückresorption kann direkt über die Expression der Na-P<sub>i</sub>-Co-Transporter in den Enterozyten und indirekt über einen negativen Feedback-Mechanismus des *Fibroblast Growth Factor-23* (FGF23) modifiziert werden (Masuyama R *et al.*, 2006, Kurnik BR und Hruska KA, 1985). FGF23, auch als Phosphatonin bezeichnet, stammt weitestgehend aus den Osteoblasten des Knochengewebes und induziert eine negative Phosphatbilanz, indem es über eine Hemmung des tubulären Natrium-P<sub>i</sub>-Co-Transporters Typ IIa (NPTIIa) phosphaturisch wirkt. Zudem wirkt FGF23 durch eine Induktion der renalen CYP27B1 (Mirams M *et al.*, 2004, Saito H *et al.*, 2003).

### **Skelett**

Die Osteoklasten-Reifung kann *in vivo* direkt über das sogenannte RANK/RANKL-System eingeleitet werden. Nach Bindung des membranständigen *Receptor activator of NF-κB ligand* (RANKL) auf Osteoblasten bzw. Stromazellen an den Rezeptor RANK auf Progenitorzellen der Osteoklasten, wird die Differenzierung der letzteren zu reifen Osteoklasten getriggert (Kitazawa S *et al.*, 2003). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und VDR verstärken die Expression von RANKL (Masuyama *et al.*, 2006) und hemmen zugleich die Wirkung von Osteoprotegerin (OPG), das an RANKL binden kann und eine Liganden-Rezeptor-Interaktion verhindert. Bei radikalen vegetarischen Essgewohnheiten ohne bilanzierte Vitamin D<sub>3</sub>-Zufuhr und bei Verweigerung einer Prophylaxe mit Vitamin D<sub>3</sub> im 1. Lebensjahr sowie sekundärer Niereninsuffizienz und Malabsorptionsstörungen bzw. Maldigestion von Fetten kann sich die sogenannte *Rachitis* im Kindes- und *Osteomalazie* im Erwachsenenalter entwickeln. Die Syndrome beruhen auf Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel. Bei fehlendem 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> resultiert eine Hypocalcämie, Hypophosphatämie und ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Die verminderte Calciumresorption im Darm und Rückresorption in der Niere führen zu einer kompensatorisch gesteigerten Parathormon (PTH)-Sekretion. Der niedrige Calciumspiegel im Körper führt zu einer verminderten Mineralisierungsrate der Knochenmatrix und aufgrund der PTH-Ausschüttung zu einem Knochenabbau. Der Knochen weist in Folge eine geringere Dichte auf und wird frakturgefährdeter. Klinisch äußern sich die Veränderungen in Wachstumsretardierung, Knochendeformation, Knocheninstabilität und Schmerzen (Tucker T *et al.*, 2008).

*Rachitis* wird autosomal rezessiv vererbt. Man teilt die Erkrankung in *Vitamin D Dependent Rickets* (VDDR) Typ I und II ein. Bei VDDR Typ I liegt ein Defekt der renalen 1α-Hydroxylase vor (Fu GK *et al.*, 1997). Eine lebenslange Substitution mit physiologischen Dosen von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (0,25-1 µg/d) ermöglicht eine komplette Symptombefreiheit. Es handelt sich dadurch quasi um eine „pseudo-anhängige“ *Rachitis*. VDDR Typ II ist mit einer Mutation im VDR-Gen vergesellschaftet.

Je nach Mutationslokalisierung sind Affinität/Resistenz für  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Symptomatik unterschiedlich stark ausgeprägt. Die orale Substitution mit hohen Calcium-Dosen erzielt gute Erfolge und kann die klinische Symptomatik mildern (Balsan S *et al.*, 1985). In 50% der Patienten mit VDDR Typ II wird zusätzlich eine therapieresistente Alopezie beobachtet.

### **Nebenschilddrüse**

In der Nebenschilddrüse wird das Parathormon (PTH) gebildet und bei niedrigen Calciumkonzentrationen ausgeschüttet. Die Nebenschilddrüse registriert die Calciumspiegel im Blut über den sogenannten *Calcium Sensing Receptor* (CaSR). PTH bewirkt eine Erhöhung des Calciumspiegels und hemmt zusätzlich die Phosphatrückresorption in der Niere, damit das Produkt aus Calciumphosphat nicht im Blut ausfallen kann. Niedrige  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen führen zu einer Hyperplasie der Nebenschilddrüse und zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus, der wie im Fall einer Niereninsuffizienz durch eine Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution behandelt wird (Dusso AS *et al.*, 2004).

### **1.2.2 Biochemie und Physiologie des Vitamin D<sub>3</sub> und seiner Metabolite**

Vitamin D<sub>3</sub> zählt genau genommen nicht zu den klassischen Vitaminen, weil es in der menschlichen Haut durch photolytische Konversion und anschließende thermale Isomerisierung von 7-Dehydrocholesterol gebildet werden kann (Holick MF *et al.*, 1977). 7-Dehydrocholesterol stammt aus den Hepatozyten, in denen es durch das Enzym Cholesteroldehydrogenase aus Cholesterol entsteht und anschließend über Transportproteine im Blut zu den Keratinozyten der Epidermis gelangt. Das isomerisierte Provitamin D<sub>3</sub> wird in die Leber transportiert und in dem ersten von zwei Aktivierungsschritten durch eine Cytochrom-P-450-abhängige mitochondriale Hydroxylase, CYP2R1, an seinem C<sub>25</sub> hydroxyliert (Cheng JB *et al.*, 2004). Die 25-Hydroxylierung unterliegt einer schwachen Regulation. Die Plasmakonzentration von 25-Hydroxycholecalciferol steigt proportional zur Vitamin D<sub>3</sub>-Zufuhr an. Daher dient dieser Parameter als laborchemischer Indikator des Vitamin D<sub>3</sub>-Status (Holick MF *et al.*, 1981). Der zweite Konvertierungsschritt der Bioaktivierung von Vitamin D<sub>3</sub> findet vor allem in der Niere statt. Es existieren aber auch andere Gewebe, die hierzu in der Lage sind, beispielsweise Prostata-, Brust- und Colonzellen, sowie Beta-Zellen des Pankreas und Monozyten (Hewison M *et al.*, 2004). C<sub>1</sub> wird mittels der Cytochrom-450-abhängigen mitochondrialen Monooxygenase  $1\alpha$ -Hydroxylase, CYP27B1, hydroxyliert (s. Abb. 4). Anders als CYP2R1 unterliegt CYP27B1 einer sehr strengen Regulation. Calcium kann die Enzymaktivität direkt (Serumcalciumkonzentration) oder indirekt (Parathormon) steuern (Omdahl

JL *et al.*, 1972). Andere Regulationsfaktoren des Enzyms sind beispielsweise niedrige Phosphat-Konzentrationen, die eine Zunahme der Enzymaktivität und mRNA bewirken und ein Feedback-Mechanismus durch  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , der einen inhibitorischen Einfluss auf das Hormon und den  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumspiegels hat. Die Inaktivierung von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  wird durch die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -induzierbare 24-Hydroxylase katalysiert (Jones G *et al.*, 1987). Dieses Enzym ist in der Lage, sowohl  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  zu  $1,24,25$ -Trihydroxycholecalciferol als auch seinen Vorgänger 25-Hydroxycholecalciferol zu  $24,25$ -Dihydroxycholecalciferol umzuwandeln. Ersteres Molekül hat nach der Hydroxylierung eine ca. fünffach geringere biologische Aktivität als vorher. Bei  $24,25$ -Dihydroxycholecalciferol handelt es sich sogar um eine 10.000fach geringere Affinität zum Rezeptor.  $1\alpha$ -Hydroxylase und 24-Hydroxylase verhalten sich in ihrer Aktivität reziprok zueinander und werden dementsprechend auch reguliert. PTH supprimiert die 24-Hydroxylase, wohingegen hohe Phosphat-Konzentrationen die Enzymexpression induzieren (Wu S *et al.*, 1996). Die Calcitronensäure ist das Endprodukt des Vitamin  $\text{D}_3$ -Stoffwechsels und wird hepato-biliär ausgeschieden (Jones G *et al.*, 1999).

Da es sich bei Vitamin  $\text{D}_3$  um einen lipophilen Stoff handelt, benötigt er Plasmaproteine als Carrier-Proteine im Blut. Diese Aufgabe wird vor allem durch das *Vitamin D binding protein* (DBP) übernommen, das in einer 20fach höheren Konzentration als Vitamin  $\text{D}_3$  vorliegt und in geringeren Anteilen durch Albumin und Lipoproteine. Dadurch nimmt das DBP eine Art Pufferfunktion ein und kann sehr effektiv Vitamin  $\text{D}_3$ -Intoxikationen vorbeugen (Bouillon R *et al.*, 1981). Mehr als 99% des Vitamin  $\text{D}_3$  liegen in Protein-gebundener Form vor und sind hierdurch quasi dem Metabolismus in Zielzelle und Leberzellen entzogen. DBP unterliegt keiner Regulation durch Vitamin  $\text{D}_3$  und umgekehrt hat DBP keinen Einfluss auf die  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentration. Neben dem Transport im Blut, ist DBP bei der luminalen Aufnahme von  $25(\text{OH})\text{D}_3$  in die proximalen Tubuluszellen und die Rückresorption von DBP aus dem Primärharn beteiligt (Pierre JV and Christensen EI, 2002). Die Asparagyl-Endopeptidase Legumain löst intrazellulär 25-Hydroxyvitamin  $\text{D}_3$  aus seiner DBP-Bindungsstelle, so dass es über intrazelluläre DBP (IDBP) in die Mitochondrien transloziert und den Enzymen 24-Hydroxylase und  $1\alpha$ -Hydroxylase exponiert wird (Yamane T *et al.*, 2002).



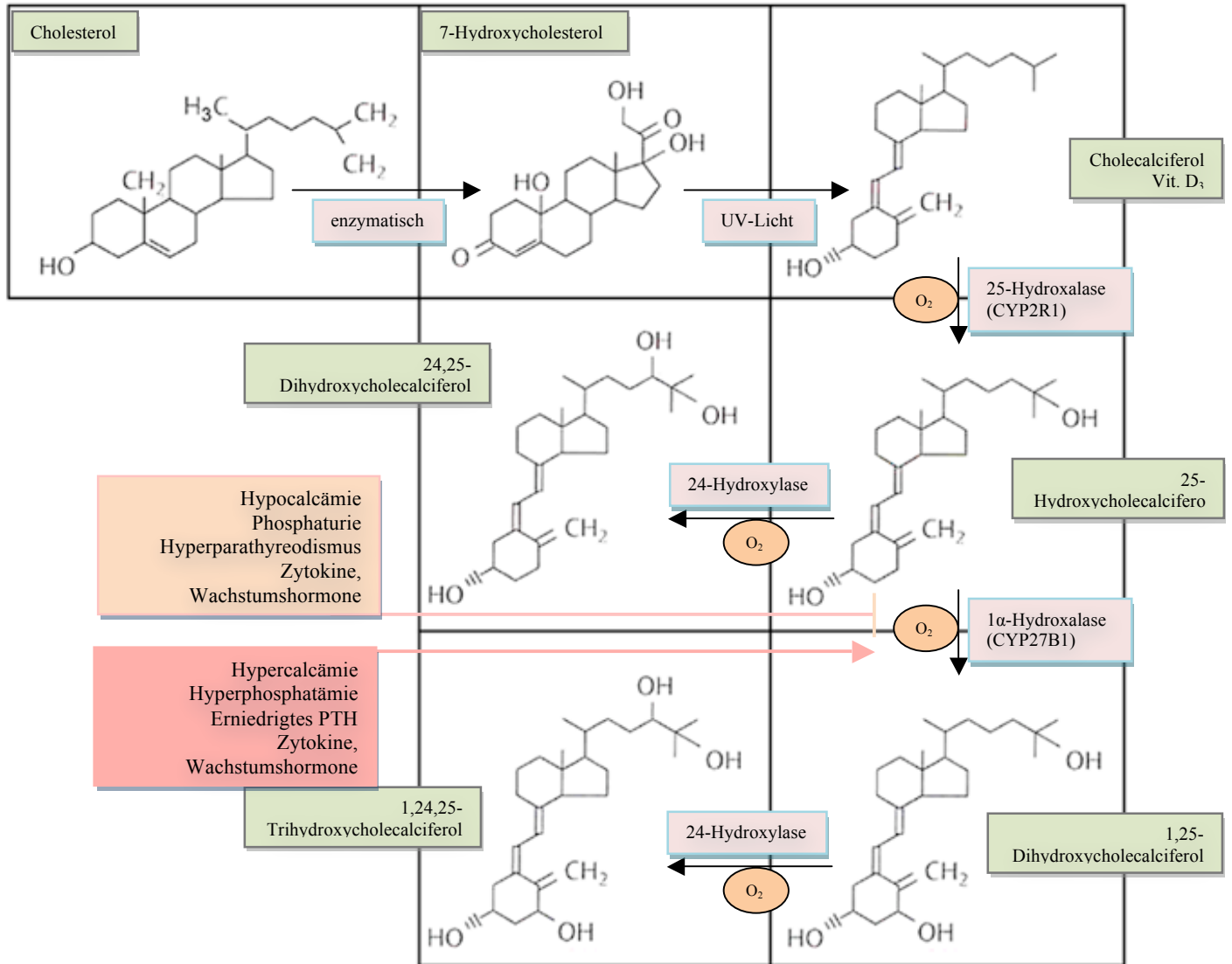


Abb. 4: Schematische Darstellung des Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus.

### 1.2.3 Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor

1,25-Dihydroxycholecalciferol kann eine langsame und eine schnelle Reaktion innerhalb der Zielzelle induzieren. Bei beiden Vorgängen ist in den meisten Fällen der sogenannte Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor (VDR) beteiligt, der zu der Gruppe der klassischen Steroid-/Thyroidhormonrezeptoren zählt und sowohl im Zytosol als auch im Nukleus vorzufinden ist. Der Rezeptor liegt inaktiviert als Monomer vor und dimerisiert durch Ligandenbindung. In dimerisierter Form ist der Rezeptor aktiviert und kann dann vor allem als Transkriptionsfaktor die Transkriptionsrate von Genen des Calcium-Haushaltes beeinflussen. Die funktionellen Bereiche des VDR (s. Abb. 5) setzen sich aus

Liganden- und DNA-bindender Domäne (ligand binding domain = LBD bzw. DNA-binding domain = DBD), nukleären Translokations- und Dimerisationsdomänen mit RXR sowie Transaktivierungs- (AF-2, E1) und Phosphorylierungsdomänen zusammen. N-terminal bindet der Rezeptorkomplex an die DNA. Am C-terminalen Ende befindet sich die Hormonbindungsdomäne (Strugnell SA and Deluca HF, 1997). Durch ihre vielfältigen Aufgaben und Wirkungen sowie einer negativen Korrelation mit dem Auftreten von chronischen Erkrankungen rückten Vitamin D<sub>3</sub> und VDR zunehmend in den Fokus der Krebs- und Autoimmunkrankheitsforschung.

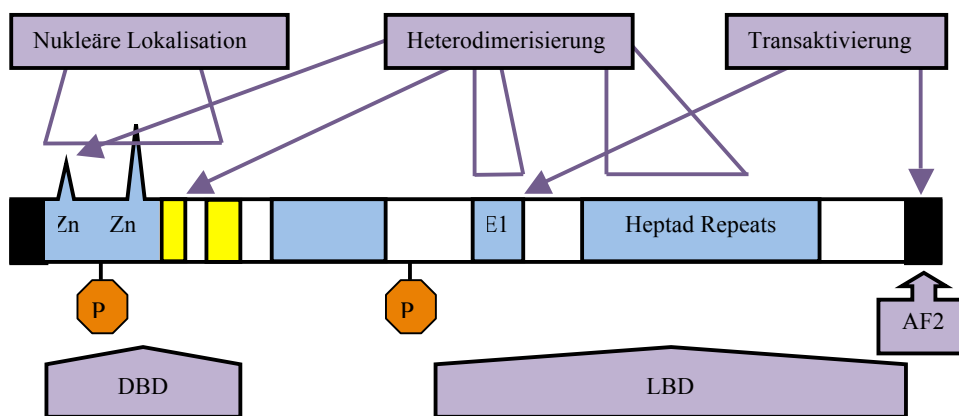


Abb. 5: Schematische Darstellung der funktionellen Struktur des Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptors.

### Genregulatorische Effekte von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und VDR

Durch Bindung von Calcitriol im Zytoplasma setzt die langsame Aktivierungskaskade des Rezeptors ein, die in einer Induktion oder Suppression der regulierten Gene mündet. VDR kann durch Ligandenbindung in den Zellkern translozieren.

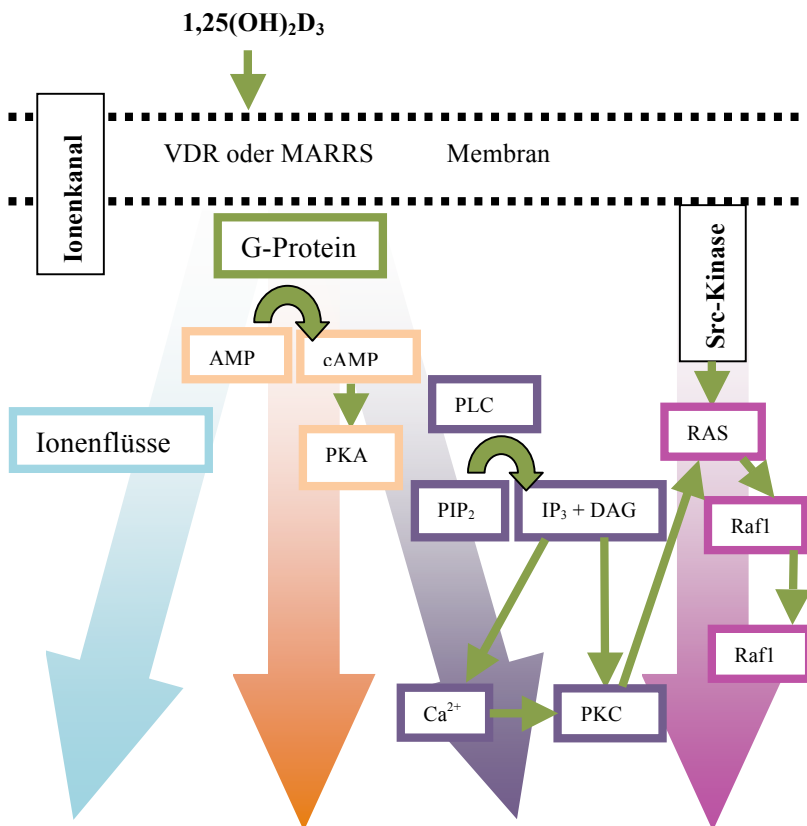
Nach Bindung des Liganden im Zytosol erfolgt zunächst eine Heterodimerisierung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), wofür VDR drei Domänen besitzt. Die Dimerisierung stellt einen entscheidenden Schritt für die anschließende Konformationsänderung dar, die im Bereich der ligandenabhängigen *Activation Function 2* (AF-2) vollzogen wird. Diese dreidimensionale Strukturänderung bildet die Basis, damit zytosolische und vor allem nukleäre Co-Aktivatoren mit den zwei Transaktivierungsdomänen des Rezeptors interagieren können. E1, innerhalb der Dimerisationsdomäne, bindet Transkriptionsfaktoren und ist eine hoch konservative Struktur. AF-2 ist die zweite Transaktivierungsdomäne, zu deren interagierenden Proteinen u.a. Motorproteine für

eine Translokation in den Zellkern entlang der Mikrotubuli (Racz A and Barsony J, 1999) oder Bestandteile des transkriptionalen Initiationskomplexes, z.B. RNA-Polymerase II und weitere Transkriptionsfaktoren (v.a. TF IIB) zählen. Die Bindung von nukleären transkriptionalen Co-Regulatoren führt zur Bildung des Präinitiations-Komplexes. Die DNA besitzt sogenannte *Vitamin D Response Elements* (VDRE) in den Promotoren der 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-assoziierten Gene, an die der VDR-Komplex mittels seiner DBD binden kann. Die DNA-Bindungsstellen des Rezeptors sind hoch konservativ. Sie beinhalten zwei klassische Zinkfinger-Domänen, in deren Inneren jeweils zwei Cystein- und Histidinreste um ein zentrales Zink-Ion angeordnet sind. Diese Zinkfingerstrukturen sind hoch affin für die oben genannten VDREs in den Promotoren. VDR kann sowohl eine Geninduktion als auch eine Gensuppression bewirken. Entscheidend hierbei ist die Interaktion mit den jeweiligen Co-Regulatoren, die Zell- und Promotor-spezifisch sind (Rachez C und Freedmann LP, 2000). Hauptsächlich kodieren die Gene für Proteine, die die Calcium-Homöostase regulieren, d.h. z.B. *Transient Receptor Potential Vanilloid-Type Family Member 6* (TRPV6, zur Calcium-Resorption im Darm), Osteocalcin (Bestandteil der extrazellulären nicht-kollagenen Knochenmatrix und Knochenaufbau-Marker), 24-Hydroxylase (CYP24) etc. Die Aktivität des Rezeptor-Liganden-Komplexes hängt von der zellspezifischen Expression der IDBP ab, die die Exposition des Liganden regulieren und die Halbwertszeit des Rezeptors indirekt dadurch beeinflussen, da eine Ligandenbindung den Ligand-Rezeptor-Komplex vor Ubiquitinierung und Abbau im Proteasom schützt (Masuyama H and MacDonald PN, 1998).

### **Schnelle Effekte von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und VDR**

Neben der klassischen Funktion als Transkriptionsfaktor, wird VDR auch in schnellen Reaktionen (*Rapid Responses*) vorausgesetzt. Es existiert eine zweite Aktivierungskaskade, die als *Rapid Response* (RR) bezeichnet und über Zelloberflächen-ständige Rezeptoren aktiviert wird. Die sich anschließende Signaltransduktion verläuft weitestgehend über G-Proteine oder non-Rezeptor Tyrosin-Kinasen (z.B. Src-Kinase). Sie umfasst eine Stimulierung der Phospholipase C und D und des Phosphoinositol-3-(PI-3)-Kinase-Weges, Veränderung der intrazellulären Calcium-, cAMP- und cGMP-Spiegel und entsprechende Beeinflussung der Proteinkinase A und C (PK A und C) sowie MAP-Kinasen und Öffnungszustände von Ionenkanälen (Sitrin MD *et al.*, 1999, s. Abb. 6). Trotz der gut untersuchten biochemischen Mechanismen sind die physiologischen Effekte der RRs weiterhin noch nicht eindeutig geklärt. Es ist beispielsweise bekannt, dass VDR im Rahmen der schnellen Reaktionskaskade in Chondrozyten eine Steigerung der Prostaglandin-Produktion und Protease-Aktivität durch zunehmende Rekrutierung von Membranlipiden bewirkt, so dass die

Zellen anschließend in den Knochen- und Mineralisations-Haushalt eingreifen können (Boyan BD *et al.*, 1994). RRs spielen auch als Feedback-Mechanismen eine Rolle. Die schnellen Effekte steuern einen Teil des  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Katabolismus, indem sie über den Transduktionsweg der MAP-Kinasen die mRNA von Enzymen des 24-Hydroxylase-Komplexes stabilisieren (Nguyen TM *et al.*, 2004). Weitere Beispiele für RRs sind die schnelle intestinale Calciumabsorption (Transcaltachia), Insulinsekretion aus  $\beta$ -Pankreaszellen und die Öffnung von spannungsabhängigen Calcium- und Chloridkanälen in Osteoblasten (Norman AW, 2006, Norman AW *et al.*, 2004). Eine Interaktion der RR in Form von Optimierung des klassischen Signalweges von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und VDR wird diskutiert. Die Generierung einer langsamen oder schnellen Antwort über VDR hängt sowohl von der Konformationsstellung des Liganden als auch von der des Rezeptors ab. So aktiviert die 6-*s-trans*-Konformation von  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  langsame Aktivität und umgekehrt eine 6-*s-cis*-Konformation RRs. VDR besitzt neben der klassischen langsamen LBD eine alternative Tasche für Hormone und andere Liganden, die eine RR bewirken (Norman AW *et al.*, 1997).



Chondrozyten, Enzyme des 24-Hydroxylase-Komplexes, Transcaltachia, Insulinsekretion etc.

Abb. 6: Übersicht der *Rapid Responses* im Rahmen der Vitamin D<sub>3</sub>-Wirkung.

## 1.3 Anti-neoplastische Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub>

### 1.3.1 Allgemeine anti-neoplastische Wirkung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

1981 wurde erstmals eine anti-neoplastische Wirkung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auf myeloisch-leukämische Zellen der Maus entdeckt und führte in diesen Zellen zu einer terminalen Differenzierung (Abe E *et al.*, 1981). Seither wurden anti-proliferative und pro-apoptotische Effekte in einer Reihe transformierter Zellen nachgewiesen, wie z.B. in Brust-, Colon-, Nieren-, Lungen- und Prostata-Karzinomen sowie Sarkomen, Neuroblastomen, Gliomen und Melanomen. Das Prinzip der Anti-Tumor-Wirkung beruht vor allem auf der Inhibition der Proliferation und der Induktion von Differenzierung, Förderung der Apoptose, Hemmung des invasiven Wachstums (Serin- und Metalloproteinasen) und der Angiogenese. Bei einer Konzentration von 1nM oder mehr wurde *in vitro* eine Anti-Tumor-Wirkung nachgewiesen. Da diese Dosis physiologisch bis heute allerdings mit der täglichen Zufuhr nicht erreichbar ist, fand das Konzept der intermittierend parenteralen Applikation in Dosis-Eskalationsstudien Anwendung. Ab einer Dosis von ungefähr 8 µg trat die Hypercalcämie als Dosis-limitierende Toxizität auf (Smith DC *et al.*, 1999). Die therapeutische Langzeitanwendung von Vitamin D<sub>3</sub> in der Onkologie ist daher wegen des Auftretens von Nebenwirkungen (Entwicklung einer Hypercalcämie und Hypercalcurie) limitiert. Es wurden daraufhin Vitamin D<sub>3</sub>-Analoga entwickelt, die eine Tumorsuppression bei minimalem Anstieg des Calcium-Spiegels erreichen. Solche Präparate sind z.B. EB1089 (Seocalcitol) und CB1093. EB1089 wird in einer Dosis von 0.5-2.5 µg/kg p.o. verabreicht und in der Regel mit Chemotherapie und Bestrahlung kombiniert, um eine additiv synergistische Wirkung zu erzielen (Kissmeyer AM *et al.*, 1997). In Versuchen mit Vitamin D<sub>3</sub> oder Analoga zeigten VDR-negative Tumorzellen und normale VDR-positive Gewebs- und Epithelzellen keine Reaktionen. Das bedeutet, dass eine Reaktion lediglich in Zellen mit VDR-Expression und Malignisierung hervorgerufen wurde. In Untersuchungen, in denen Mamma-Karzinomzellen unterschiedlicher VDR-Expression mit EB1089 behandelt wurden, zeigte sich eine Korrelation zwischen der Zellproliferation mit der Höhe der Expression (Valrance ME *et al.*, 2007). In einer weiteren Studie wurden die MCF7-Brustkrebszellen 6 Tage lang mit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oder EB1089 (1x10<sup>-8</sup> M) inkubiert, was in den Zellen eine Herunterregulation des anti-apoptotische Proteins bcl-2 und eine Hochregulation der pro-apoptotischen Proteine Bak, p53, p21 (James SY *et al.*, 1996) zur Folge hatte. Statistische Untersuchungen zeigten eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit des Brustkrebsrisikos mit der körpereigenen 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration (Chen WY *et al.*, 2005). Molekularbiologisch wurde im Zusammenhang mit anti-neoplastischer Wirkung der G<sub>1</sub>-Phase-Arrest bislang am besten untersucht.

In der intestinalen Zelllinie Caco-2 induzierte VDR eine Aktivierung der Phosphatasen PP1c und PP2Ac, die wiederum die p70S6-Kinase inaktivieren können (Bettoun DJ *et al.*, 2002). p70S6, auch bekannt als *Ribosomal Protein S6 Kinase* (S6K1), ist Bestandteil des mTOR-Signalwegs und wird durch den katalytischen Komplex mTORC1 aktiviert. Die Kinase-Aktivität dieses Proteins spielt eine essentielle Rolle im Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus und ist für eine Hochregulierung der Proteinbiosynthese und Zellproliferation verantwortlich (Hay N and Sonenberg N, 2004). In der Dermatologie wird 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bei Psoriasis vulgaris als Antiproliferativum gegen Epidermiszellen eingesetzt. Es richtet sich gegen die hyperproliferativen Keratinozyten (Reichrath J und Holick MF (ed.), 1999).

### **1.3.2 Anti-neoplastische Wirkung von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in Prostatakarzinomzellen**

Neben Brust-Tumoren wurden Prostatazellen in der Vergangenheit bezüglich Calcitriol und VDR eingehend untersucht (Beer TM und Myrthue A, 2004). Die Wirkungen von 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reichen von der Regulation bestimmter Wachstumsfaktoren über Modifizierung ganzer Signaltransduktionswege. Eine Zunahme der Zell-Differenzierung, Abnahme der Proliferation, Invasion und Metastasierung wurde auch hier beobachtet (Schwartz GG *et al.*, 1994, Lokeshwar BL *et al.*, 1999), was sich klinisch in einer zeitweiligen Verbesserung oder einem Stillstand des Tumorwachstums äußerte (Guzey M *et al.*, 2002). In Experimenten wurden LNCaP-Zellen mit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> über 6 Tage behandelt, was zu einer > 60%igen Verminderung des Zellwachstums führte und im Folgenden auch nach Entfernung von Calcitriol niedrig blieb (Blutt SE *et al.*, 1997). Allerdings muss gesagt werden, dass sensitive (LNCaP) bis resistente Zelllinien (DU145) existierten. Die Wirkung von Vitamin D<sub>3</sub> hängt sowohl von der Expression und Funktionalität von VDR als auch von den anschließenden biochemischen Zell-Mechanismen oder Co-Faktoren (z.B. Androgen-Rezeptor) ab (Zhao XY *et al.*, 1997). Heutzutage ist der therapeutische Einsatz von Calcitriol oder Analoga bei Hormon-refraktären Prostata-Karzinomen indiziert. Hypercalcämie und Hypercalcurie bilden nach wie vor die Dosis-limitierenden Toxizitäten (Liu G *et al.*, 2002, Beer TM *et al.*, 2003).

## 1.4 Vitamin D<sub>3</sub> und NF1

### Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel in *NF1*-Patienten

Die Forschungsgruppe von Prof. Mautner (Lammert *et al.* 2006) führte eine Bestimmung des Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel bei 55 *NF1*-Patienten und 58 gesunden Kontrollpersonen durch. Die Bestimmung fand im Herbst und Winter statt, da die 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Konzentration im Frühjahr und Sommer aufgrund der vermehrten Sonnenexposition bekanntermaßen erhöht ist (Calvo M *et al.*, 2003). In den Seren wurde ein Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel ( $\leq 30$  ng/ml) bei 72% der untersuchten *NF1*-Patienten festgestellt. Im Vergleich wurden bei lediglich 21% der gesunden Kontrollpersonen zu niedrige Werte gemessen (s. Abb. 7 A).

### Korrelation mit der Anzahl der Neurofibrome

Zusätzlich ergab sich eine umgekehrt proportionale Korrelation des Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegels im Patienten-Serum mit der Anzahl der dermalen Neurofibrome. Dieses Ergebnisse zeigte, dass Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel ein häufiges Phänomen bei *NF1* ist und mit der Entstehung/dem Wachstum der assoziierten Tumoren zusammenhängen könnte (Lammert *et al.*, 2006, s. Abb. 7B).

### Wachstumsverhalten von MPNST- und Schwannzellen unter 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

In vorangegangenen Versuchen unseres Labors wurden 4 MPNST-Zelllinien und 5 primäre Schwannzellpopulationen aus jeweils 2 dermalen und 3 plexiformen Neurofibromen mit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> behandelt und untersucht. Die MPNST-Zellen und primären Schwannzellen wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  bis  $4 \times 10^4$ / ml gesät und nach 24-48 Stunden mit aktivem 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Leo Pharmaceutical Products, DK und Sigma, D) und Analoga (Seocalcitol/EB1089, Leo Pharmaceutical Products, DK und BXL-628, BioXell, I) für 6 Tage inkubiert. Die 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration reichte von  $10^{-11}$  bis  $10^{-6}$  M. Nach Ablauf der 6 Tage wurde die Proliferation anhand eines BrdU-Proliferations-Assays bestimmt. Der Versuch wurde 2 Mal durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurden LNCaP-Zellen verwendet, in denen, wie in vorangegangenen Studien ebenfalls bereits gezeigt, eine starke Inhibition des Zellwachstums durch 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auftrat (Skowronski RJ *et al.*, 1993, s. Abb. 9).

Die Zellproliferation wurde in 2 der 4 MPNST-Zelllinien beeinflusst (s. Abb. 8 C und D). Die maximale Proliferationshemmung fand in den MPNST-Zelllinien S805 und S1268,1 bei einer Calcitriol-Konzentration von  $10^{-6}$  M und signifikant bei  $10^{-7}$  M statt. Bis zu einer Konzentration von  $10^{-6}$  M wurden die anderen zwei MPNST Zelllinien S462 und S520 in ihrem Wachstum nicht von

Calcitriol gehemmt. Die Schwannzell-Kultur 1453,2 zeigte bei der Zugabe von  $10^{-6}$  M Calcitriol eine Abnahme der Zellzahl auf 60% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die anderen 4 untersuchten Schwannzellkulturen wurden nicht in ihrer Zellproliferation beeinflusst.

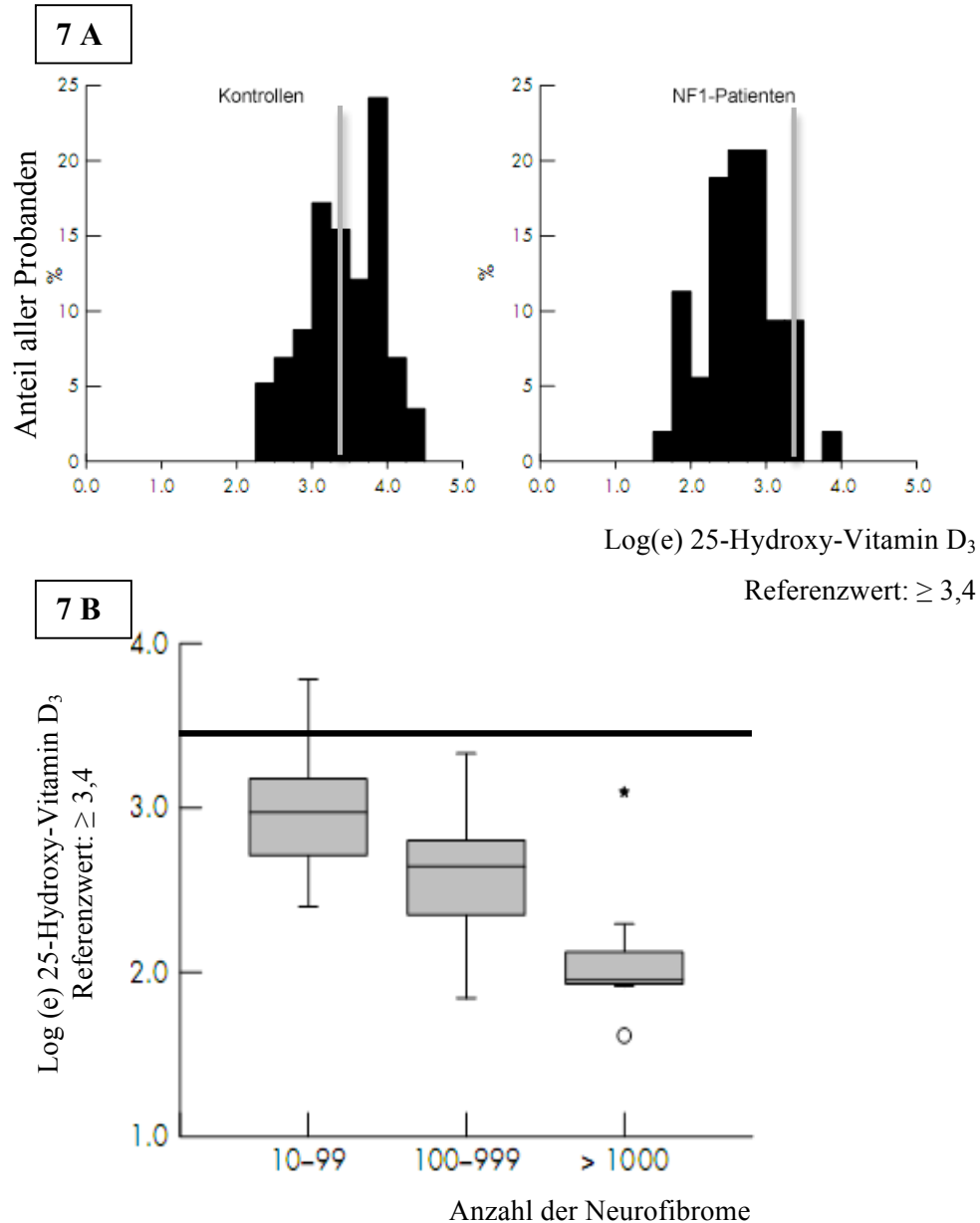
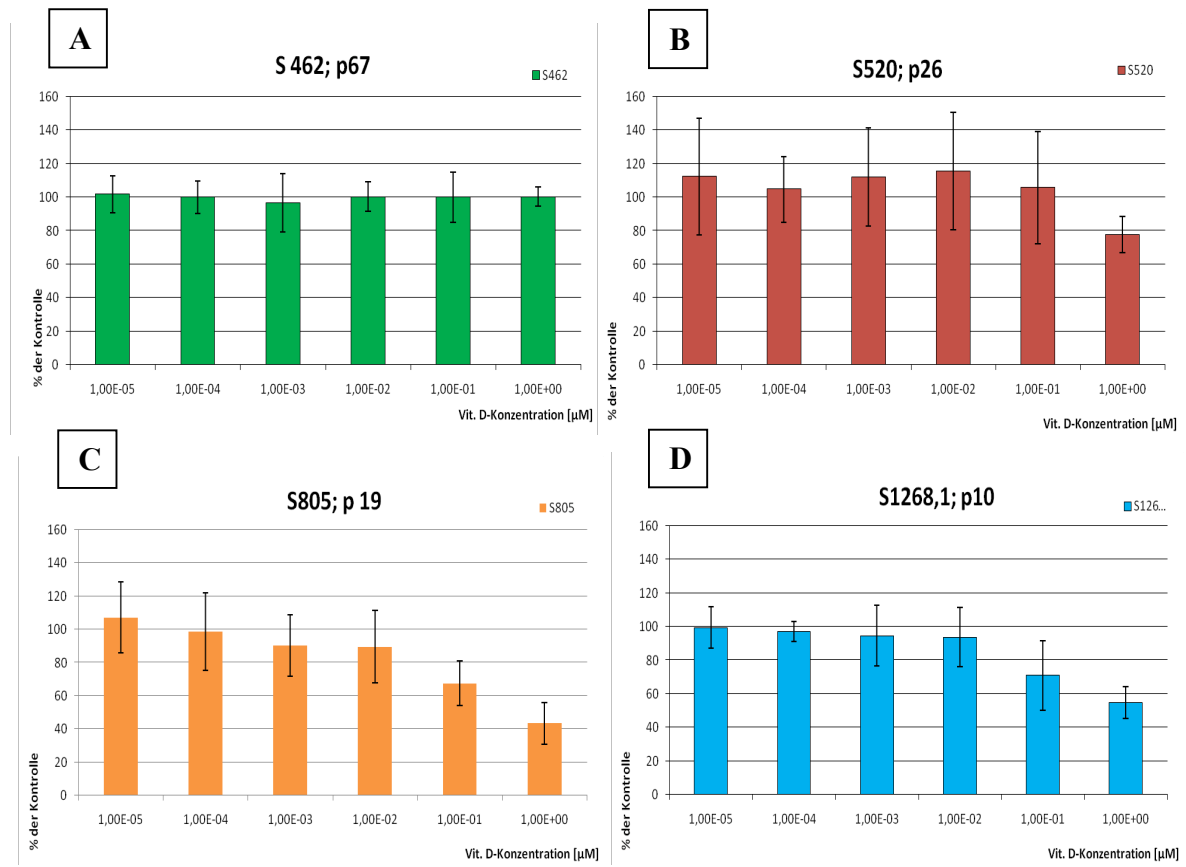


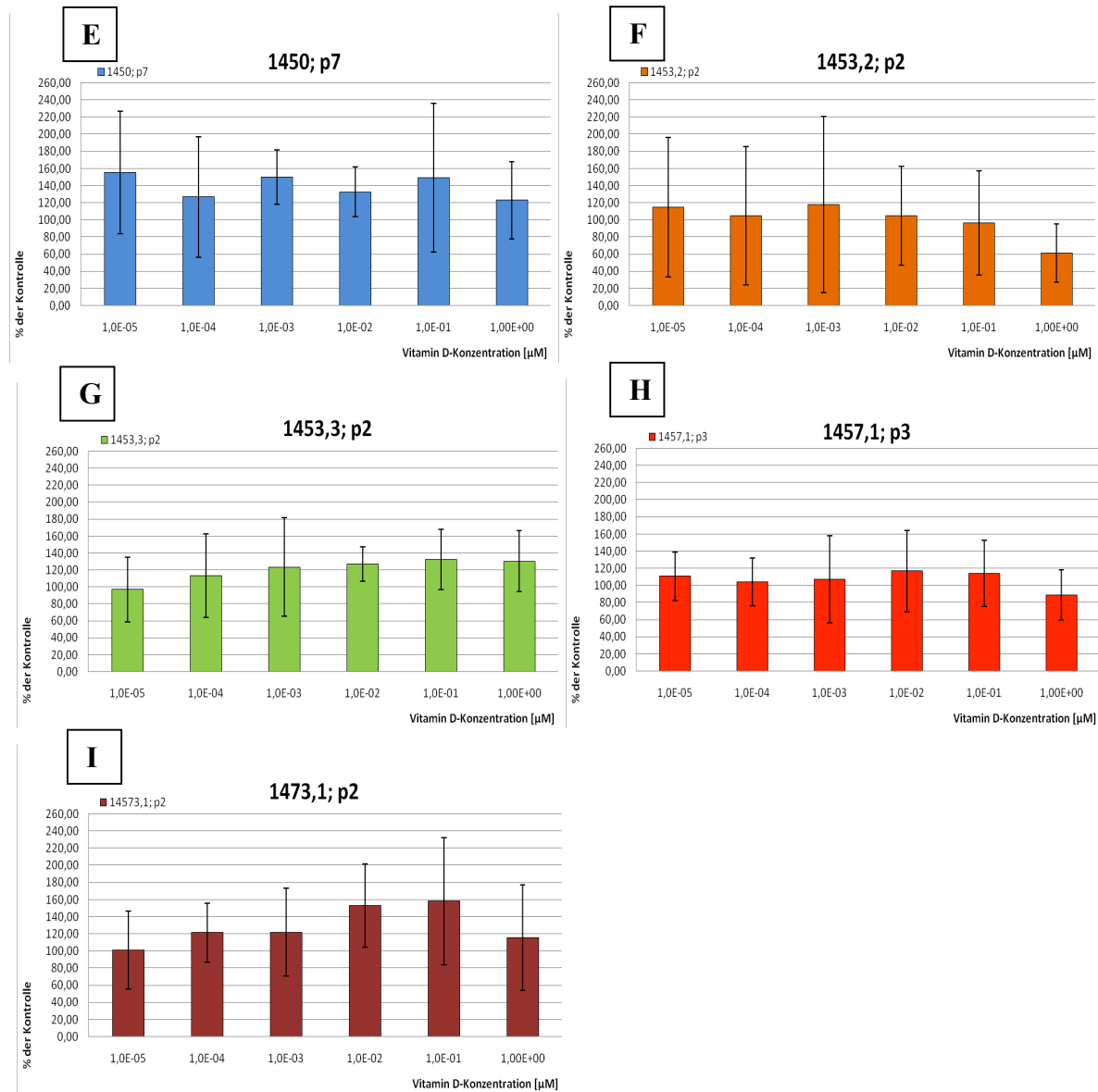
Abb. 7: Zu A: Logarithmische Darstellung des 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegels in Seren der 55 *NF1*-Patienten und 58 gesunden Kontrollpersonen (Lammert M et al., 2006). Zu B: Boxplot des logarithmisch aufgetragenen 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegels über der Anzahl kutaner Neurofibrome der untersuchten *NF1*-Patienten (Lammert M et al., 2006).



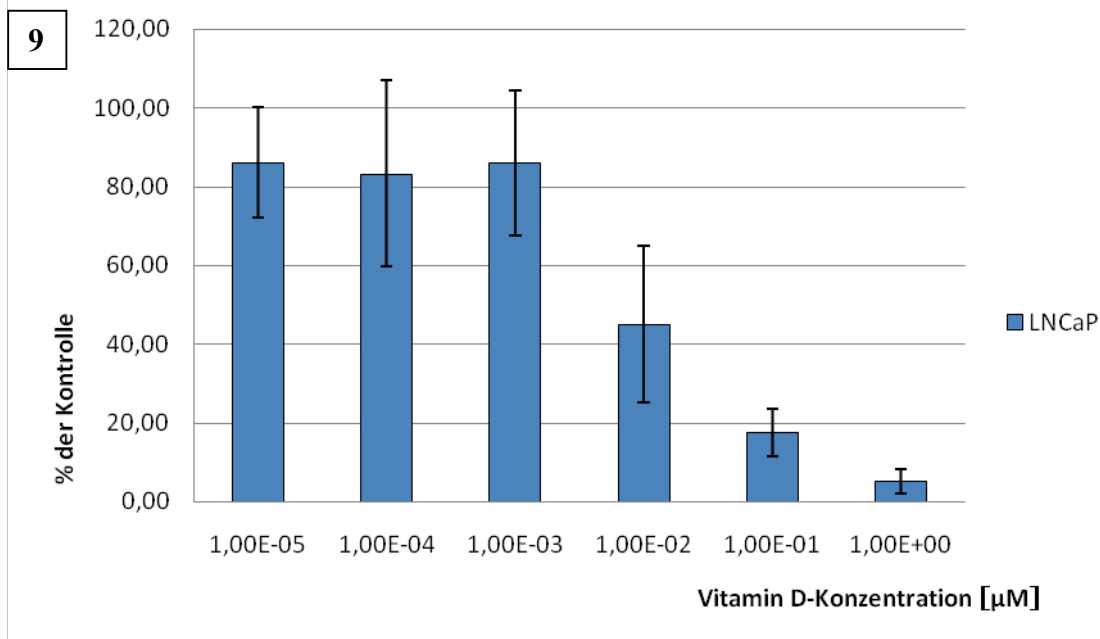
Behandelte MPNST-Zellen



**Behandelte Schwann-Zellen**



**Abb. 8 A-I:** BrdU-Assays von MPNST- und Schwannzelllinien nach 6 Tagen Behandlung mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Es wurden  $1 \times 10^4$  bis  $4 \times 10^4$  Zellen/ml ausgesät und nach 24-48 Stunden mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  und Analoga für 6 Tage inkubiert (Konzentration  $10^{-11}$  bis  $10^{-6}$  M). Nach dieser Zeit wurde die Proliferation anhand eines BrdU-Proliferations-Assays bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte prozentualen Zellzahl ( $n=24$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=4$ ) über der Vitamin D-Konzentration aufgetragen. Die doppelte Standardabweichung  $2 \sigma$  ist für jede Reihe und Konzentration angegeben.



**Abb. 9:** BrdU-Assays von LNCaP-Zellen, die als Positivkontrolle für den Hemmproliferationsversuch mittels  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  verwendet wurden. Bestimmung der Zellproliferation nach 6tägiger Behandlung mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Es wurden  $1 \times 10^4$  bis  $4 \times 10^4$  Zellen/ml gesät und nach 24-48 Stunden mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  6tägig inkubiert (Konzentration  $10^{-11}$  bis  $10^{-6}$  M). In der Abbildung wurde die mittlere prozentuale Zellzahl ( $n=12$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n=4$ ) (ohne Vitamin  $\text{D}_3$ -Zusätze, entspricht 1,0) über der Vitamin  $\text{D}$ -Konzentration aufgetragen. Die doppelte Standardabweichung  $2 \sigma$  wurde für jede Versuchsreihe angegeben.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse zeigen, dass Vitamin  $\text{D}_3$ -Mangel ein häufiges Phänomen bei *NF1*-Betroffenen ist. *In vitro* Studien deuten darauf hin, dass Vitamin  $\text{D}_3$  das Wachstum von *NF1*-assoziierten Tumoren hemmen könnte. Ein Erklärungsmodell für diese Beobachtung ist eine Überexpression des Vitamin  $\text{D}_3$ -Rezeptors in den *NF1*-assoziierten Tumoren. Deshalb ist das Ziel dieser Doktorarbeit dieser wesentlichen Fragestellung nachzugehen und die Expression und Lokalisation des Vitamin  $\text{D}_3$ -Rezeptors in verschiedenen *NF1*-assoziierten Tumoren zu untersuchen. Dafür sollen Immunfärbungen mit einem Antikörper gegen den Vitamin  $\text{D}_3$ -Rezeptor an Gewebeschnitten sowie an den kultivierten Zellen aus Tumoren durchgeführt werden. Es soll geklärt werden, ob VDR in den Tumorzellen generell exprimiert wird und ob die Expression variiert. Ferner soll eine mögliche Assoziation mit dem Tumortyp und dem Serumvitamin  $\text{D}_3$ -Spiegel der Patienten überprüft werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### Chemikalien

Nachfolgend sind die verwendeten Chemikalien, geordnet nach Name und Hersteller, aufgelistet.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Merck, Darmstadt
Chlorwasserstoff	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsuloxid)	Sigma, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma, Steinheim
HRG- $\beta$ 1 (Recombinant Human Heregulin- $\beta$ 1 EGF Domain)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IBMX (3-iso-Butyl-L-Methylxanthine)	Sigma, Steinheim
Insulin	Sigma, Steinheim
L-Glutamin	Gibco BRL, Karlsruhe
Lysin	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma, Steinheim
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Steinheim
Tri-Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma, Steinheim
Tris HCl	Sigma, Steinheim
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Xylol

Sigma, Steinheim

### Sonstige Materialien und Geräte

Nachfolgend sind sonstige verwendete Materialien und Geräte, geordnet nach Name und Hersteller, aufgelistet.

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
2x4 Lab Tech™ Chamber Slide™ System	Nunc, Langenselbold
6 cm Kulturschalen	Nunc, Langenselbold
10 cm Kulturschalen	Nunc, Langenselbold
15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße	Falcon, Heidelberg
50 ml Kulturflasche	Falcon, Heidelberg
250 ml Kulturflasche	Falcon, Heidelberg
Autoklav	Getinge L20419
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Dako-Pen	DakoCytomation, Hamburg
Digitalkamera	Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot II, Zeiss, Göttingen mit CCD-Kamera Hamamatsu C4742-95, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Software: Openlab 2.0.4 (Fa. Improvion, Coventry, UK)
Kryoröhrchen	Nunc, Langenselbold
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	Ikamag, RCG, Staufen
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle	AEG, Stockholm, Schweden
Multikanalpipette	Rainin, Giessen
Neubauer-Zählkammer	Hecht Assistent, Sondheim
Objektträger	Hecht Assistent, Sondheim
Petrischalen	Nunc, Langenselbold
Schüttler	PeqLab, Erlangen
Serologische Pipetten 2, 5, 10, 25 ml	Falcon, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter 0, 22µm	Millipore, Billerica, MA

Spritzen	BD Discardit II, Nümbrecht
Suspensions-Kulturschalen	Corning, Fort Lauderdale, FL
Vorsatzfilter	Sarstedt, Nümbrecht
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkulturbank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

### **Lösungen, Puffer und Medien**

Nachfolgend sind verwendete Fertig- und zubereitete Lösungen, Puffer und Medien, geordnet nach Name und Hersteller, aufgelistet.

<b>Lösung / Puffer / Medium (fertig)</b>	<b>Hersteller</b>
Antibody Diluent Reagent Solution	DakoCytomation, Hamburg
DakoCytomation Proteinblock X0909	DakoCytomation, Hamburg
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 4.5 g/l Glucose	Gibco BRL, Karlsruhe
FBS (Fetal Bovine Serum)	Gibco BRL, Karlsruhe
Natural Mouse Laminin	Invitrogen, Karlsruhe
PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)	Gibco BRL, Karlsruhe
VectaMount <sup>®</sup>	Vector Laboratories, Wiesbaden
Ziegenserum	DakoCytomation, Hamburg

### **Antikörper**

Im Folgenden sind die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sowie die Kernfärbung, geordnet nach Name, Code-Nummer, Verdünnung, Hersteller und Versuchsgebiet, aufgelistet.

#### **Primärantikörper**

##### **VDR (D-6): sc-13133, mouse monoclonal IgG**

Verdünnung: 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Immunzytochemie und Immunhistochemie.

##### **Polyclonal Rabbit Anti-S100 (Z0311)**

Verdünnung: 1:200, DakoCytomation, Hamburg, Immunzytochemie.

#### **Sekundärantikörper**

**Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 rabbit anti-mouse IgG (A-11062)**

Verdünnung: 1:500, Invitrogen, Karlsruhe, Immunzytochemie.

**Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins/FITC (F0261)**

Verdünnung: 1:500, DakoCytomation, Hamburg, Immunzytochemie.

**Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunglobulins/FITC (F0205)**

Verdünnung: 1:500, DakoCytomation, Hamburg, Immunzytochemie.

**Sekundärantikörper**

**EnVision<sup>®</sup> + Dual Link System Peroxidase (K4063)**

2-3 Tropfen pro Objektträger, DakoCytomation, Hamburg, Immunzytochemie.

**Kernfärbung**

**ProLong<sup>®</sup> gold antifade reagent with DAPI (P-36931)**

Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe, Immunzytochemie.

**Propidium Iodide, 1.0 mg/ ml solution in water (P3564)**

Invitrogen Molecular Probes, Karlsruhe, Immunzytochemie.

**Kit**

Folgendes Kit wurde verwendet.

**Vector<sup>®</sup> NovaRED<sup>™</sup> Substrate Kit for Peroxidase (SK4800)**

Vector Laboratories, Wiesbaden, Immunzytochemie und Immunhistologie.

**Enzyme und Antibiotika**

Nachfolgend sind verwendete Enzyme und Antibiotika, geordnet nach Name und Hersteller, aufgelistet.

<b>Enzym / Antibiotikum</b>	<b>Hersteller</b>
Collagenase/Dispase	Roche, Mannheim
Streptomycin/ Penicillin	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe

## 2.2 Patienten und Tumoren

Alle untersuchten Patienten wurden nach den klinischen Diagnosekriterien für *NF1* der NIH diagnostiziert (Stumof DA *et. al.*, 1988). Die relativ kleine Fallzahl ist durch die limitierten klinischen Daten bedingt, da zu gegebener Zeit lediglich bei den vorliegenden Patienten sowohl Tumormaterial, als auch Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel zu Verfügung standen. Es wurden Tumorproben verwendet, die aus Operationen im Herbst und Winter stammen. Der Zeitpunkt Herbst/Winter wurde gewählt, weil die 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Konzentration im Frühjahr und Sommer aufgrund der individuellen Sonnenexposition stark schwanken kann und sich daher keine Vergleiche bezüglich des Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptors machen lassen (Calvo *et al.*, 2003). Die Tumorproben wurden unmittelbar nach der chirurgischen Entnahme in sterilen Röhrchen in das Labor transportiert. Ein Teil des Tumormaterials wurde in der Neuropathologie des UKE histologisch verifiziert. Der Rest wurde zu Teilen bei -80°C eingefroren und in der Zellkultur aufbereitet. Zellen aus 5 KNF, 7 PNF und 4 MPNST wurden immunzytochemisch untersucht. Die immunhistologische Untersuchung an Paraffingewebeschnitten wurde bei 2 KNF, 7 PNF und 4 MPNST durchgeführt. Bei den 3 nicht untersuchten KNF war kein ursprüngliches Gewebe mehr vorhanden. Die Tumoren 1500,1 (KNF) und 1500,2 (PNF) stammen von demselben Patienten. Als Positivkontrolle diente Material aus Prostata-Tumoren sowohl bei der immunzytochemischen als auch bei der immunhistochemischen Färbung, da von diesen Tumoren bekannt ist, dass sie VDR exprimieren. Das LNCaP-Material stammt ursprünglich aus einer biopsierten Lymphknotenmetastase. Diese Untersuchungen fanden im Rahmen einer von der Ethikkommission geprüft und bewilligten Studie statt (OB-011/07).

## 2.3 Zellkultur

### Standard-Medium

### Zusammensetzung

10% FBS

1 mM Natrium-Pyruvat

2 mM L-Glutamin

100 U/ ml Penicillin/Streptomycin

in DMEM

bei 4°C bis zu 3 Wochen lagerbar.



**Medium für Tumorgewebsauflösung**      0,5 mg/ ml Collagenase/Dispase (= 0,05 U/ ml Collagenase und 0,4 U/ ml Dispase) in Standard-Medium, steril filtriert.

Unmittelbar nach der Resektion wurde der Tumor mit Hilfe von Skalpell und Pinzette weitestgehend von Haut und Fettgewebe befreit. Anschließend wurde ein Teil des Tumorgewebes in Alufolie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, der Rest wurde in kleinere Stücke zerschnitten und in einer 6 cm oder 10 cm großen Suspensions-Kulturschale vollständig mit Standard-Medium bedeckt. Alle diese Prozeduren wurden steril unter der Werkbank durchgeführt. Die Gewebstücke wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Luftgehalt im Brutschrank über Nacht belassen. Am zweiten Tag wurden die Tumorstücke mit einer Schere weiter zerkleinert ( $\leq 1 \text{ mm}^3$ ) und für 16-24 Stunden in einer Lösung aus Collagenase/Dispase bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$ -Luftgehalt im Brutschrank inkubiert. Mittels Collagenase/Dispase wurde das umliegende Gewebe enzymatisch angedaut und die Tumorzellen freigelegt. Am dritten Tag wurde der Inhalt der Suspensions-Kulturschale mit einer serologischen Pipette auf- und abgesaugt. Die Suspension mit dem nun nahezu vollständig aufgelösten Gewebe wurde dann in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt und 5 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die proteolytischen Enzymen beinhaltetete, wurde abgesaugt und die Zellen im Pellet in 4 ml Schwannzell-Medium in einer laminierten 50 ml Kulturflasche resuspendiert und bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 10%  $\text{CO}_2$ -Luftgehalt inkubiert. Am vierten Tag wurde das Medium gewechselt und somit überschüssiges Material, das obenauf schwamm, entfernt.

### **Passagieren**

Sobald die Zellen den Zustand der Konfluenz erreichten, wurden sie passagiert. Hierfür wurde die Suspensions-Kulturflasche mit PBS gewaschen und anschließend trypsiniert. Die Zellen wurden mit 1,5 ml (50 ml Kulturflasche) oder 2,5 ml (250 ml Kulturflasche) Trypsin für 2 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um sie von der Kulturoberfläche zu lösen. Ein zusätzliches Klopfen der Kulturflasche gegen den Tisch half, die verbliebenen adhärenen Zellen abzulösen. Anschließend wurde die Zellsuspension in 5 ml Serum-haltigem Medium aufgenommen und 5 Min. bei 1000rpm zentrifugiert. Das Serum (10%) stoppte die Enzymaktivität des Trypsin. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen im Pellet in frischem Medium resuspendiert und in neuen Kulturflaschen ausgesät.

### **Einfrieren und Auftauen der Zellen**

#### **Einfrier-Medium**

#### **Zubereitung**

10% DMSO in Standard-Medium

bei 4°C bis zu einer Woche lagerbar, unmittelbar vor Gebrauch auf Eis gekühlt.

Die einzufrierenden Zellen wurden nach der Trypsinierung (siehe „Passagieren“), in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Medium überführt und 5 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugierung abgesaugt, die Zellen im Pellet in 1,6 ml Einfrier-Medium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen pipettiert. Das Einfrier-Medium beinhaltet DMSO, das als Gefrierschutzmittel für Zellen in der Kryokonservierung eingesetzt wird. Für einen langsamen Temperaturabfall wurde das Kryoröhrchen in einer Styropor-Schachtel bei -80°C eingefroren, wo es sich einige Monate hält. Im Fall einer Langzeit-Lagerung wurden die Zellen anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen fand bei Raumtemperatur statt. Unmittelbar nach dem Vorgang wurde die Zellsuspension in 6 ml Standard-Medium überführt und 5 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Sodann wurde das zytotoxische DMSO im Überstand abpipettiert und die Zellen im Pellet in 4 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Flasche überführt und am Folgetag durch einen Mediumwechsel von restlichem DMSO und Zelltrümmern befreit.

#### **Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer mit einem Deckgläschen abgedeckt, das bei richtigem Aufsitzen sogenannte Newtonsche Ringe bildete. Eine 10 µl Zellsuspension wurde seitlich aufpipettiert und durch Kapillarkraft in den Raum zwischen Zählfläche und Deckgläschen gesaugt. Eine Neubauer-Zählkammer hat 4 Quadrate. Die Höhe des Raumes zwischen Kammern und Deckgläschen beträgt 0,1 mm. Die Fläche eines Quadrates beträgt somit 1 mm<sup>2</sup>, so dass ein Volumen von 1 mm x 1 mm x 0,1 mm = 0,1 mm<sup>3</sup> (= 0,1 µl) resultiert. Die Zellen innerhalb der 4 Quadrate wurden gezählt, wobei zwei Grenzlinien pro Quadrat berücksichtigt wurden, um Doppelzählungen zu vermeiden. Die Zellzahl pro Volumeneinheit wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen}/4 \times 10^4 = \text{Zellzahl}/\text{ml}$$

Der Faktor  $10^4$  entspricht dem Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe. Möchte man beispielsweise 10 ml einer Suspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen/ ml ansetzen, errechnet sich das aus folgender Formel:

$$\frac{1 \times 10^5 \text{ Zellen / ml} \times 10 \text{ ml}}{\text{Anzahl der Zellen / Quadrat} \times 10^4} = \text{Volumen mit } 1 \times 10^5 \text{ Zellen [ ml]}$$

Entsprechend wurde das errechnete Volumen aus der Zellsuspension entnommen und in diesem Beispiel auf 10 ml mit Medium aufgefüllt.

## 2.4 Gewebekulturen

### Kultur von MPNST-Zellen

MPNST-Zellen wurden unter Standard-Bedingungen bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Luftgehalt kultiviert (s. 2.3 Zellkultur). Es wurde mit bereits etablierten Zelllinien gearbeitet (Frahm S, 2004). Die Zellkulturen waren rein. Das Passagieren erfolgte nach der gängigen Methode (s. „Passagieren“).

### Kultivierung von Schwanzzellen

#### Schwanzzell-Medium

#### Zubereitung

0,5 mM IBMX (gelöst in 50% Ethanol)

2 nM  $\beta$ 1-Heregulin (gelöst in PBS mit 0,1% BSA)

2,5  $\mu$ M Insulin (gelöst in PBS)

in Standard-Medium, steril filtriert

bei 4°C bis zu 2 Wochen lagerbar.

### Beschichtung der Kulturflaschen mit Laminin

0.01% Lysin

4  $\mu$ g Laminin/ ml PBS (bei 4°C gelagert)

In die 50 ml Kulturflaschen wurden jeweils 2 ml Lysinlösung pipettiert und bei gleichmäßigem Schwenken 5 Min. in den Flaschen belassen. Anschließend wurden die Kulturflaschen mit sterilem destillierten Wasser gewaschen und nach dem Trocknen entweder über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei 37°C mit 4  $\mu$ g Laminin/ ml PBS inkubiert. Lysin hat die Eigenschaft, dass es die

Ladungen an der Kammeroberfläche neutralisiert, wodurch Laminin besser binden kann. Laminin ist ein Glykoprotein und Bestandteil der extrazellulären Matrix. Man findet es in allen *Basallaminae* und es weist entsprechende Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren auf, die für die Zelladhärenz benötigt werden. Vor dem Aussähen der Zellen wurde die Lösung abgesaugt und die Kulturflasche einmal mit PBS gewaschen.

Die Zellzusammensetzung der untersuchten Neurofibrome und plexiformen Neurofibrome ist sehr heterogen. Der Hauptbestandteil der Primärkultur setzt sich aus Fibroblasten und Schwannzellen zusammen. Bei Konfluenz der Zellen, in der Regel der Fibroblasten, wurde die Suspensionskulturflasche mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Zellen wurden nach dem herkömmlichen Verfahren passagiert und die Zellen im Pellet in 4 ml Schwannzell-Medium resuspendiert und in einer Kulturflasche ohne Laminin-Beschichtung erneut ausgesät. Die folgende Inkubationszeit betrug 15 Min. bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>-Luftgehalt. Während der Inkubationszeit waren die Fibroblasten in der Lage, sich an der Kulturflaschenoberfläche abzusetzen. Den Schwannzellen fehlte für ihre Adhärenz die Laminin-Beschichtung, sie schwammen daher im Medium obenauf. Die Schwannzell-Suspension konnte nach der Inkubationszeit, je nach Schwannzell-Menge, in 2-4 Kulturflaschen mit Laminin-Beschichtung überführt werden. Dieses Verfahren erlaubte ein Passagieren und zugleich eine Selektion der Schwannzellen.

## 2.5 Immunfluoreszenz-Färbung an kultivierten Zellen

### Beschichtung der Lab Tech<sup>™</sup> Chamber Slides<sup>™</sup>

Für Immunfluoreszenz-Färbungen an Schwannzellen wurden 2 x 4 Lab Tech<sup>™</sup> Chamber Slides<sup>™</sup> verwendet. Auch hier benötigten die Zellen eine Laminin-Beschichtung, um sich setzen zu können. Die Kammern wurden dafür eingangs mit 0,01% Lysin beschichtet und die Slides 5 Min. bei gleichmäßigem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Kammern mit sterilem destillierten Wasser gewaschen und nach dem Trocknen entweder über Nacht bei 4°C oder eine Stunde bei 37°C mit 4 µg Laminin/ ml PBS inkubiert. Vor dem Aussähen der Zellen wurde die Lösung abgesaugt und die Kammern einmal mit PBS gewaschen. Die Chamber Slides<sup>™</sup> waren in PBS bei 4°C einige Tage lagerbar. MPNST-Zellen benötigten keine Laminin-Beschichtung. Im Rahmen der Immunfluoreszenz-Färbung wurden 10.000 Zellen pro Kammer des Chamber Slide ausgesät und im entsprechenden Medium kultiviert.

Nachfolgend sind die verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tab. 2: Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen.

Antikörper	Verdünnung	Klonalität	Herkunft / Konjugation	Hersteller
Primärantikörper				
<b>Anti-human VDR (D-6)</b>	1:200	monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
<b>Anti-human S100</b>	1:200	polyklonal	Kaninchen	DakoCytomation, Hamburg
Sekundärantikörper				
<b>Goat-anti-mouse</b>	1:500	polyklonal	sulfoniertes Rhodamin	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Goat-anti-mouse</b>	1:500	polyklonal	FITC	DakoCytomation, Hamburg
<b>Goat-anti-rabbit</b>	1:500	polyklonal	FITC	DakoCytomation, Hamburg

### **FITC** (Fluoresceinisothiocyanat)

Derivat des Fluorescein mit einer Absorptionswellenlänge von 496 nm (blauer Filter) und einer Emissionswellenlänge von 525 nm (grün).

### **Alexa Fluor<sup>®</sup> 594**

Derivat des sulfonierten Rhodamin mit einer Absorptionswellenlänge von 594 nm (grüner Filter) und einer Emissionswellenlänge von 620 nm (rot).

### **VDR- und S100-Färbung an kultivierten Schwanzzellen**

Die Schwanzzellen wurden nach dem Aussähen 16-24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Luftgehalt in den Kammern der Chamber Slides inkubiert, um sich auf der laminierten Oberfläche setzen zu können. Am Folgetag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen jeweils zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd bei RT für 20 Min. fixiert. Nach Ablauf der Zeit wurde Paraformaldehyd abgeschüttelt und die Kammern mit Standard-

Medium drei Mal gewaschen. Da es sich bei VDR und S100 um intrazelluläre Proteine handelt, ist eine Permeabilisierung der Zellmembran notwendig, um die Epitope den Antikörpern zugänglich zu machen. Die Permeabilisierung der Zellmembran wurde mit Hilfe von reinem Methanol mit einer Inkubationszeit von 5 Min. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Das Methanol wurde anschließend ebenfalls abgeschüttelt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Die Arbeiten mit Paraformaldehyd und Methanol wurden, aufgrund der Toxizität der Substanzen, unter dem Abzug absolviert. Zur Blockierung unspezifischer Epitope wurden die Schwanzzellen mit dem DakoCytomation Protein Block X0909 für 30 Min. bei RT inkubiert, ehe der Primärantikörper gegen VDR bzw. S100 mit einer Verdünnung von 1:200 in Standard-Medium in die Kammern pipettiert wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 60 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank wurde mit Standard-Medium 5 Min. lang gewaschen. Der Sekundärantikörper, assoziiert mit einem sulfonierten Rhodamin-Konjugat (VDR) bzw. FITC-Konjugat (S100), wurde 1:500 in Standard-Medium verdünnt und 45 Min. in den Kammern belassen. Hiernach wurden die Zellen ebenfalls 5 Min. in Standard-Medium gewaschen. Die DAPI-Kernfärbung und das Eindeckeln mit Eindeckelmedium und Deckgläschen erfolgte durch die Verwendung von ProLong<sup>®</sup> gold *antifade reagent with DAPI* in einem einzigen Schritt. Hierfür wurden nach Entfernung des Kammeraufsatzes jeweils 5  $\mu\text{l}$  der Lösung auf jedes Kammerfeld pipettiert, die Zellen mit einem Deckgläschen eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Nachdem der Nagellack getrocknet war, wurden die Schwanzzellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop mit dem entsprechenden Filter betrachtet und fotografiert.

### **VDR-Färbung an kultivierten MPNST-Zellen**

Die MPNST-Zellen wurden analog dem Verfahren der immunzytologischen Färbung an kultivierten Schwanzzellen gefärbt. Es wurde eine VDR-Färbung und Kern-Färbung mittels DAPI durchgeführt.

## **2.6 Immunhistochemische Färbung an Gewebeschnitten**

### **Herstellung der Gewebeschnitte**

Aus den resezierten Tumoren wurde jeweils ein erbsengroßes Stück heraus geschnitten und darauf geachtet, dass es sich um weitestgehend reines Tumormaterial handelte, das makroskopisch wenig bis keine Hautanteile und Fettgewebe enthielt. Anschließend wurde das Material in 3% Formalin für 24h bei  $-4^{\circ}\text{C}$  fixiert. Formalin vernetzt und denaturiert die Proteine. Dadurch erhält das Gewebe eine gummiähnliche Konsistenz. Lipide und Kohlenhydrate, die nicht mit Proteinen assoziiert sind,

bleiben unversehrt. Die Einbettung des Gewebes in Paraffin und die Übertragung der Gewebsschnitte auf Objektträger wurden freundlicherweise vom Institut für Neuropathologie des UKE durchgeführt.

### **Nachfixierungs-Lösung**

### **Zusammensetzung**

8g Paraformaldehyd in 100 ml Wasser bei  $\leq 65^{\circ}\text{C}$

Natriumhydroxid-Titration

200 ml mit PBS auffüllen

bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zu 8 Wochen lagerbar.

### **Blockierungslösung**

1/20 Ziegen Serum

9/20 Tris-Triton-Puffer

10/20 Antibody Diluent Reagent Solution

Gebrauchslösung immer neu zubereiten.

### **Natriumcitrat-Puffer (pH = 6,0)**

9 ml der Stammlösung A (10,5 g Citronensäure-Monohydrat in 500 ml ddH<sub>2</sub>O)

41 ml der Stammlösung B (14,7 g Tri-Natriumcitrat in 500 ml ddH<sub>2</sub>O)

450 ml ddH<sub>2</sub>O

bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zu 2 Wochen lagerbar.

### **TEC-Puffer (pH = 7,8)**

5 g Tris

10 g EDTA solid, 0,5 M

6,4 g Tri-Natriumcitrat

950 ml ddH<sub>2</sub>O

pH mittels Natronlauge und Salzsäure einstellen

Gebrauchslösung 1:20 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt

bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zu 2 Wochen lagerbar.

### **Nova Red-Gebrauchslösung**

5 ml destilliertes Wasser

3 Tropfen Lösung 1, gut mischen

2 Tropfen Lösung 2, gut mischen

2 Tropfen Lösung 3, gut mischen

2 Tropfen Hydrogen Peroxid Sol, gut mischen

Gebrauchslösung immer neu zubereiten.

Die immunhistochemische Färbung wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Paraffinschnitte aus dem Kühlfach (-20°C) entnommen und über Nacht bei 37°C gelagert. Am ersten Tag wurde das Gewebe eingangs entparaffiniert. Hierfür wurden die Schnitte zweimal 20 Min. in dem Intermedium Xylol belassen und anschließend einmal 5 Min. in reinem Ethanol gewaschen. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurde das Gewebe mit Peroxid und reinem Ethanol in einer Verdünnung von 1:50, für 7 Min. behandelt und derweil die Mikrowellenpuffer zubereitet. Die sich anschließende, absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, Aqua destilliert, jeweils 2 Min.) diente der Rehydrierung der Schnitte. Durch die Fixierung in Formalin können Epitope maskiert sein. Die Hitze-induzierte Demaskierung der Antigene wurde durch eine Mikrowellenvorbehandlung à viermal 5 Min. bei 600 W, unter Verwendung des Natriumcitrat- (2 x 5') und TEC-Puffers (2 x 5'), durchgeführt. Nach einer anschließenden Abkühlzeit von ca. 20 Min. wurden die Schnitte 5 Min. in destilliertem Wasser gewaschen und mit der Blockierungslösung für 30 Min. inkubiert, ehe sie im Folgenden für 15 Min. in 0,1% Tris-Triton-Puffer überführt wurden. Zum Ende des ersten Tages wurden die Schnitte mit dem DAKO-Pen umrandet und der Primärantikörper mit der entsprechenden Verdünnung auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation der Gewebsschnitte mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer. Am zweiten Tag der Färbung wurden die Schnitte jeweils einmal 1 Min. und einmal 5 Min. in 0,1% Tris-Triton-Puffer gewaschen. Das Detektieren des Primärantikörpers erfolgte durch das Dual Link EnvisionSystem. Nach einer 40-minütigen Inkubationszeit wurden die Schnitte abermals 5 Min. in Tris-Triton-Puffer gewaschen und anschließend das Substrat mit Hilfe des Peroxidase Kit Nova Red umgewandelt (Inkubationszeit: 7 Min, im Anschluss 10 Min. unter Leitungswasser gewaschen). Als letzte Schritte wurden die Gewebe mit Hämalaun gegengefärbt und in Leitungswasser für 10 Min. gebläut. Vor der Eindeckelung der Schnitte mit Vectamount wurde den Geweben der Wassergehalt mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entzogen. Die eingedeckelten Schnitte wurden 16-24h Luftgetrocknet, ehe sie unter dem Mikroskop betrachtet wurden. Das Protokoll wurde sowohl für die Färbung kutaner und plexiformer NF als auch für MPNST befolgt.



### 2.7 Auswertung

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden das Mikroskop Axiophot II, Zeiss, Göttingen und die Software Openlab 2.0.4, Improvision, Coventry verwendet. In den durchgeführten Färbungen wurde ein mäßig starkes Fluoreszenzsignal bei mindestens 10% der Tumorzellen als Kriterium für ein positives Ergebnis gewertet. Fraglich positive Immunreaktion in wenigen Zellen, beispielsweise aufgrund des nicht klar zu trennenden gefärbten Hintergrundes, wurde somit nicht positiv gewertet.

#### **Auswertung der Immunfluoreszenz**

Zur Quantifizierung der VDR-Expression wurden von jeder Zelllinie 10 Zellen willkürlich gewählt und in ihrer Signalintensität bewertet. Es wurden nukleäre und zytoplasmatische Reaktionen gewertet. Die Intensität der Fluoreszenzfärbung wurde in vier Stärken eingeteilt: Die Zellen wurden hierfür im Vergleich zur Positivkontrolle (LNCaP) betrachtet und für jede Zelllinie ein Färbequotient vergeben. Der Färbequotient stellt einen Score von 0-3 dar (s. unten), der die nukleäre und zytoplasmatische Menge der Farbsignale quantifiziert. Hierbei wurden die Zellen mit den gefärbten LNCaP-Zellen aus dem Prostata-Karzinom verglichen, denen ein Quotient von 3 zugeordnet wurde, da bekannt ist, dass diese Zellen eine außerordentlich hohe VDR-Expression haben. Die Färbung der Gewebeschnitte wurde nach demselben Verfahren ausgewertet.

Quotient	Bedeutung
0	keine Immunreaktion
1	schwache Immunreaktion
2	mittlere Immunreaktion
3	starke Immunreaktion

Tab. 3: Bewertungsschema zur Quantifizierung der gefärbten Schwanzzellen und Tumorgewebe.

Bei den kultivierten Schwanzzellen wurde mittels einer S100-Einfachfärbung und S100- und VDR-Doppelfärbung der etwaige Anteil der kultivierten Schwanzzellen in den Kammern der Chamber Slides beurteilt und die VDR-Färbung in den übrigen VDR-Einfachfärbungen zusätzlich bestätigt. In den verbliebenen Kammern wurden die Schwanzzellen anhand ihrer charakteristischen Morphologie im Phasenkontrast von den Fibroblasten abgegrenzt und zur Beurteilung ausgewählt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kultivierung der Schwannzellen aus Tumoren

#### Schwannzellen

Insgesamt wurden 5 kutane Neurofibrome (KNF) und 8 plexiforme Neurofibrome (PNF) dissoziiert und Schwannzellen (Tumorzellen) daraus kultiviert. Aus allen 13 Tumoren konnten Zellen in Kultur gehalten werden. In den ersten Passagen wurde bei einigen Kulturen die Ausbildung von kugelförmigen Zell-Aggregaten beobachtet (s. Abb. 10 A, B). In den folgenden Passagen lösten sich diese Aggregate allerdings und die Zellen verteilten sich gleichmäßig auf dem Flaschenboden. Es wurde die typische Morphologie der Schwannzellen in Kultur beobachtet. Auf den Fibroblasten wachsend, entfalteten sie im Laufe einer Passage ihre langen Fortsätze und erreichten dadurch ihr bipolares, spindelförmiges Aussehen. Die Schwannzellen wuchsen in den Zellkulturen einheitlich sehr gut, wobei sehr rasches Wachstum in der Phase des mittelkonfluenten Zustandes beobachtet wurde. Es bildete sich zum Ende einer jeweiligen Passage ein konfluenter Zellrasen. Die Abb. 10 C und D zeigen den Zustand zweier Zellkulturen in der Kulturflasche zum Ende der dritten Passage, d.h. zum Zeitpunkt der ersten Färbung. In den Schwannzellkulturen fanden sich bekanntermaßen auch Fibroblasten. Die Schwannzellen ließen sich durch ihre zelltypisch bipolare und spindelförmige Morphologie mit langen Fortsätzen gut von den Fibroblasten abgrenzen, die wiederum viele irreguläre kurze zytoplasmatische Fortsätze hatten. Um Schwannzellen und Fibroblasten dennoch zu differenzieren und den Schwannzellgehalt der Kulturen zu überprüfen, wurden die Zellen nach dem Schwannzell-spezifischen S100-Marker gefärbt. In der S100-Einfachfärbung reagierten die Schwannzellen sehr stark. Das grüne Signal erschien äußerst hell und kräftig. Das Zytoplasma war vollständig angefärbt und der Bereich des Zellkerns ausgespart (s. Abb. 10 E, F). In der Kultur mit hohem Fibroblastenanteil zeigten lediglich vereinzelte Zellen eine S100-Expression. Die Fibroblasten dienten gleichzeitig als Negativkontrolle, welche die Spezifität der S100-Färbung belegte. Bei allen 13 Zellkulturen waren mehr als 80% der Zellen positiv für S100, was der Verteilung der Schwannzellen entsprach. Eine Korrelation der spindelförmigen Morphologie und der S100-Expression war deutlich zu erkennen. Dies ermöglichte es in den folgenden Versuchen, die Schwannzellen anhand ihrer Morphologie zu identifizieren, ohne bei jedem Versuch eine S100-Färbung durchführen zu müssen.

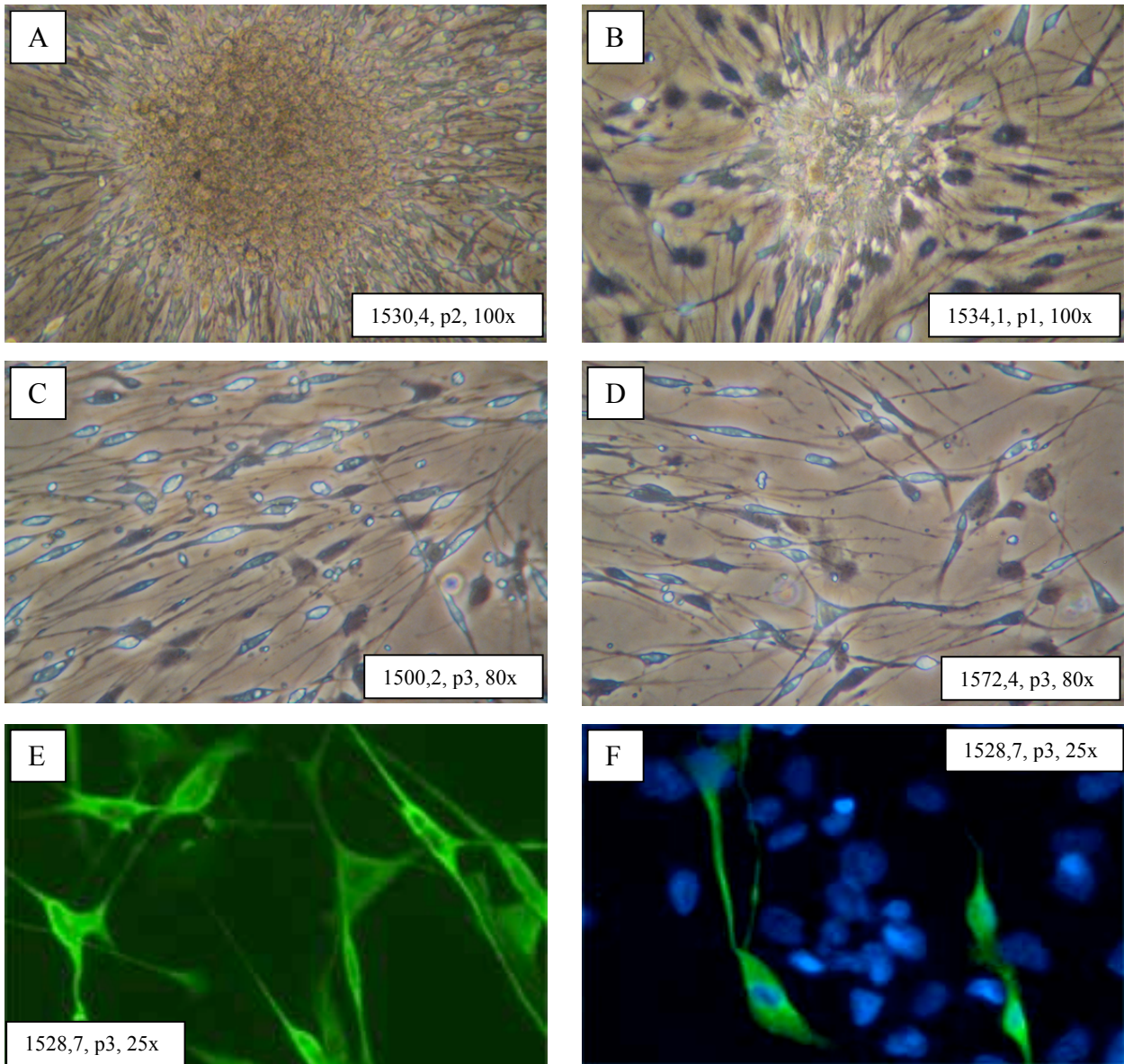


Abb. 10: **A, B:** Bildung sogenannter runder Zellaggregate in den ersten zwei Passagen von Schwannzellkulturen. **C, D:** Ausschnitte eines konfluenten Zellrasens zum Ende der dritten Passage. **E, F:** S100-Einfachfärbung (grün, Primärantikörper 1:200) in normaler Schwannzellkultur (E) und in Kultur mit sehr hohem Fibroblastenanteil (F), Kernfärbung mittels DAPI.

### MPNST-Zelllinien

Bei den MPNST wurden 4 etablierte Zelllinien verwendet, die sich in sehr hohen Passagen befanden. Die Zellen hatten eine irreguläre Kontur mit kleinen Zellfortsätzen. In ihrer Zellmorphologie äußerst pleomorph, erfüllten sie zusätzlich zelluläre Malignitätskriterien. Ihre

Kern-Plasma-Relation war zugunsten des Kerns verschoben, sie erreichten deutlich schneller als die Schwanzzellen den Zustand der Konfluenz und waren in ihrem Wachstumsverhalten unempfindlicher gegen exogene Einflussfaktoren. In allen vier Zelllinien wurde das Protein S100 nicht exprimiert.

### **3.2 Bestimmung der optimalen Antikörper-Verdünnung**

#### **Verdünnungsreihe der Antikörper**

Die Schwanzzellkulturen 1459,1, 1519,3, 1532,2 und 1572,4 wurden in Passage 3 im Rahmen einer Verdünnungsreihe mit einer Primärantikörperverdünnung von 1:1000, 1:800, 1:400, 1:200 und 1:100 gefärbt, um die adäquate Verdünnung des Primärantikörpers gegen VDR zu bestimmen. Pro Konzentration und Zellkultur wurden jeweils zwei Färbungen durchgeführt. Zudem wurde der Versuch zu der späteren Passage 6 wiederholt.

Die Zellen zeigten ein differenziertes Färbeverhalten. Die Färbung war bei den höher konzentrierten Antikörpern kräftig und hell. Je geringer die Konzentration des ersten Antikörpers wurde, desto weniger Färbung war zu sehen. Die Verdünnungen 1:1000, 1:800 und 1:400 ergaben keine deutlichen Signale im Zytoplasma (s. Abb. 11 A, B, C). Erst bei der Konzentration 1:200 war ein Signal sichtbar, welches bei 1:100 noch deutlicher wurde (s. Abb. 11 D, E). Die Verdünnung 1:200 rief in den Versuchen die größten Färbungsunterschiede zwischen und innerhalb der Zelllinien hervor. Die Unterschiede zeigten sich im Verteilungsmuster, der Menge der Farbsignale im Zellkern und dem Vorhandensein oder Fehlen einer zytoplasmatischen Färbung. Zur Veranschaulichung der Differenzen wurden die vier gefärbten Zellkulturen in Abb. 12 A-D dargestellt. Ähnliche Ergebnisse konnten bei einem wiederholten Versuch bestätigt werden. In den Zelllinien wurde eine Kernfärbung mittels Propidium Iodid durchgeführt. Negativkontrollen ohne Primärantikörper waren negativ. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Versuchen eine Verdünnung von 1:200 festgelegt.

#### **Immunfluoreszenz vs. Peroxidase**

Mit den Schwanzzellkulturen 1459,1 und 1534 wurde in Passage 3 ein Versuch durchgeführt, um die Spezifität der Bindung des Sekundärantikörpers der Immunfluoreszenzfärbung zu bestätigen. Im Rahmen der Versuche wurde eine Immunfärbung der kultivierten Schwanzzellen durchgeführt und anstelle des üblichen Sekundärantikörpers Nova Red verwendet. Die Schwanzzellen zeigten eine sichtbare Reaktion im Zellkern (s. Abb. 13 A, B). Im Zytoplasma waren keine deutlichen Signale

vorhanden. Die Mehrheit der Zellen wurde angefärbt. Die Negativkontrolle ohne Primärantikörper war negativ.

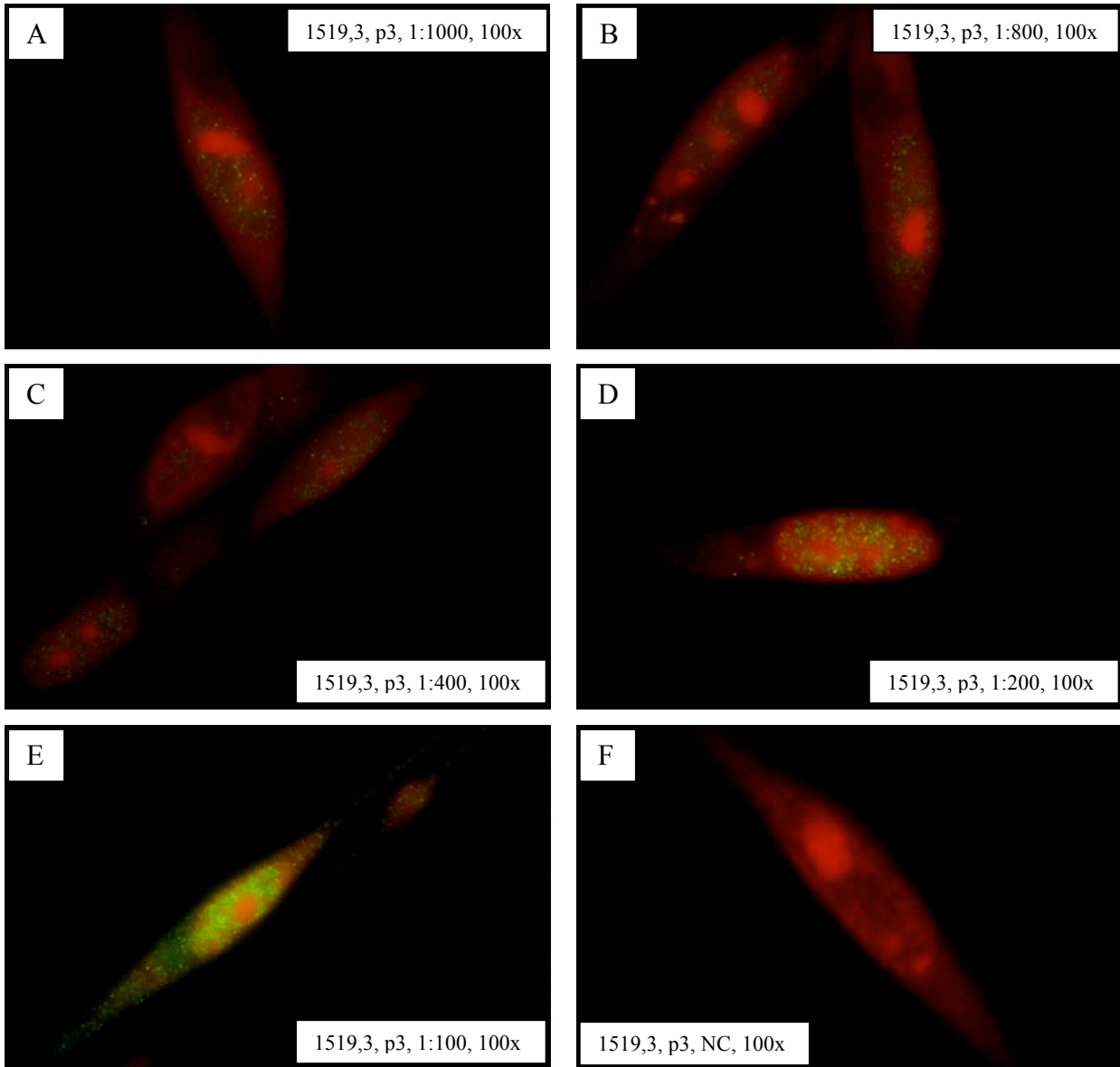


Abb. 11: **A-F**: Absteigende Verdünnungsreihe des anti-humanen VDR-Primärantikörpers (grün) in der Zelllinie 1519,3, p3. Verdünnungsschritte sind 1:1000 (A), 1:800 (B), 1:400 (C), 1:200 (D) und 1:100 (E). Für die Zellen (und Negativkontrolle, F) wurde eine Kernfärbung mittels Propidium Iodid (rot) durchgeführt.

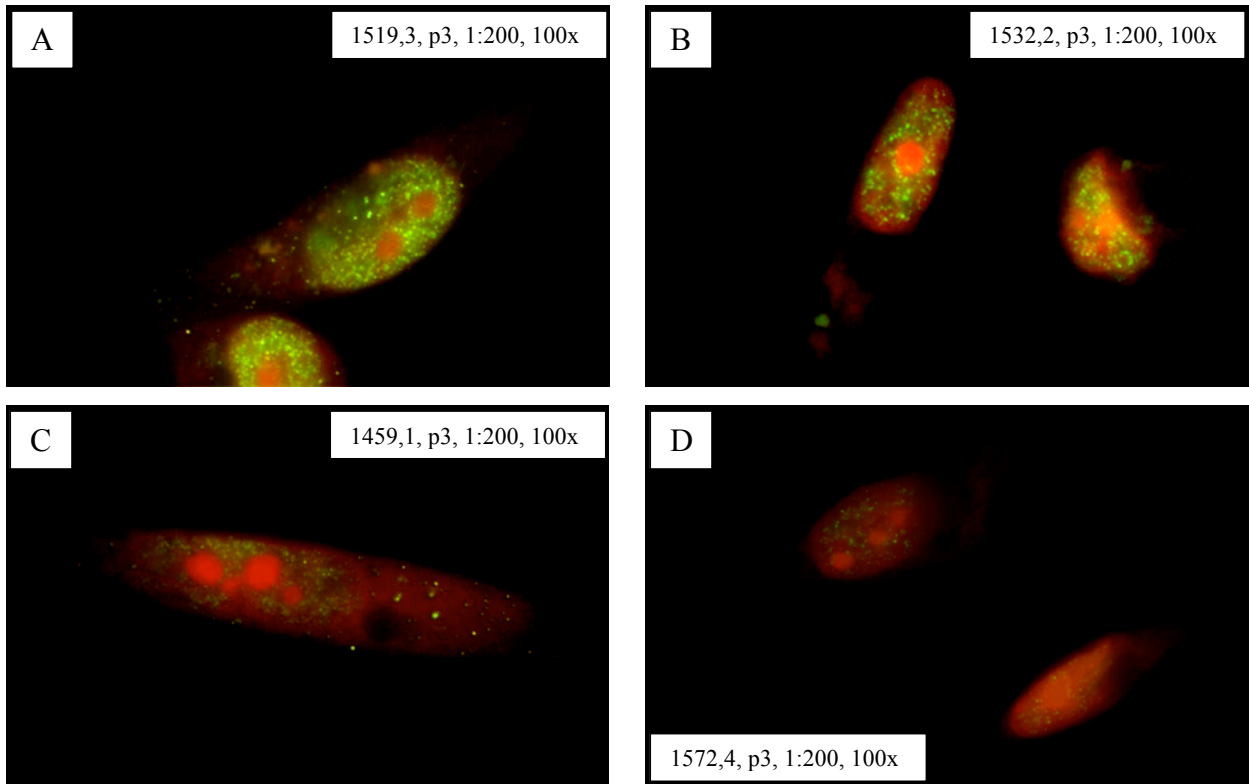


Abb. 12: **A-D**: Immunzytologische VDR-Färbung (grün) mit dem Primärantikörper in der Verdünnung 1:200. Auf dieser Verdünnungsstufe weisen die getesteten Zelllinien die größten Unterschiede bezüglich des Verteilungsmusters und der Menge der Signale auf. Kernfärbung mittels Propidium Iodid (rot).

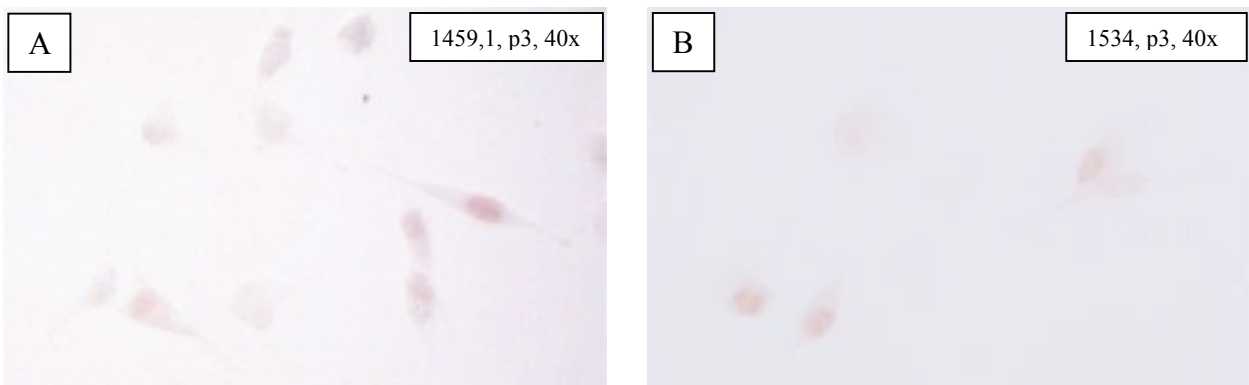


Abb. 13: **A, B**: Immunhistochemische VDR-Färbung der Zelllinie 1459,1 und 1432 (Primärantikörper 1:200). Nova Red wurde als Sekundärantikörper eingesetzt. Die VDR-Färbung manifestierte sich fast ausschließlich im Zellkern.

### 3.3 VDR im Prostata-Karzinomgewebe

Zur Positivkontrolle wurde Tumormaterial aus Prostata-Karzinomen untersucht, von denen bekannt war, dass sie VDR exprimieren. In der immunzytologischen VDR-Färbung an kultivierten Prostatakarzinom-Zellen zeigte sich eine sehr kräftige Färbung. Die Signale waren diffus im Zellkern und Zytoplasma verteilt (s. Abb. 14 A). Die Negativkontrolle ohne Primärantikörper war negativ. Auch in der immunhistologischen Färbung an Gewebeschnitten fand sich eine deutlich positive Reaktion. Die gefärbten Zellen lagen zwischen ungefärbten Gewebeanteilen zu Inseln konzentriert nebeneinander. In stärkerer Vergrößerung war auch hier sichtbar, dass eine kräftige Färbung im Kern und diffus im Plasma vorhanden war (s. Abb. 14 B-D).

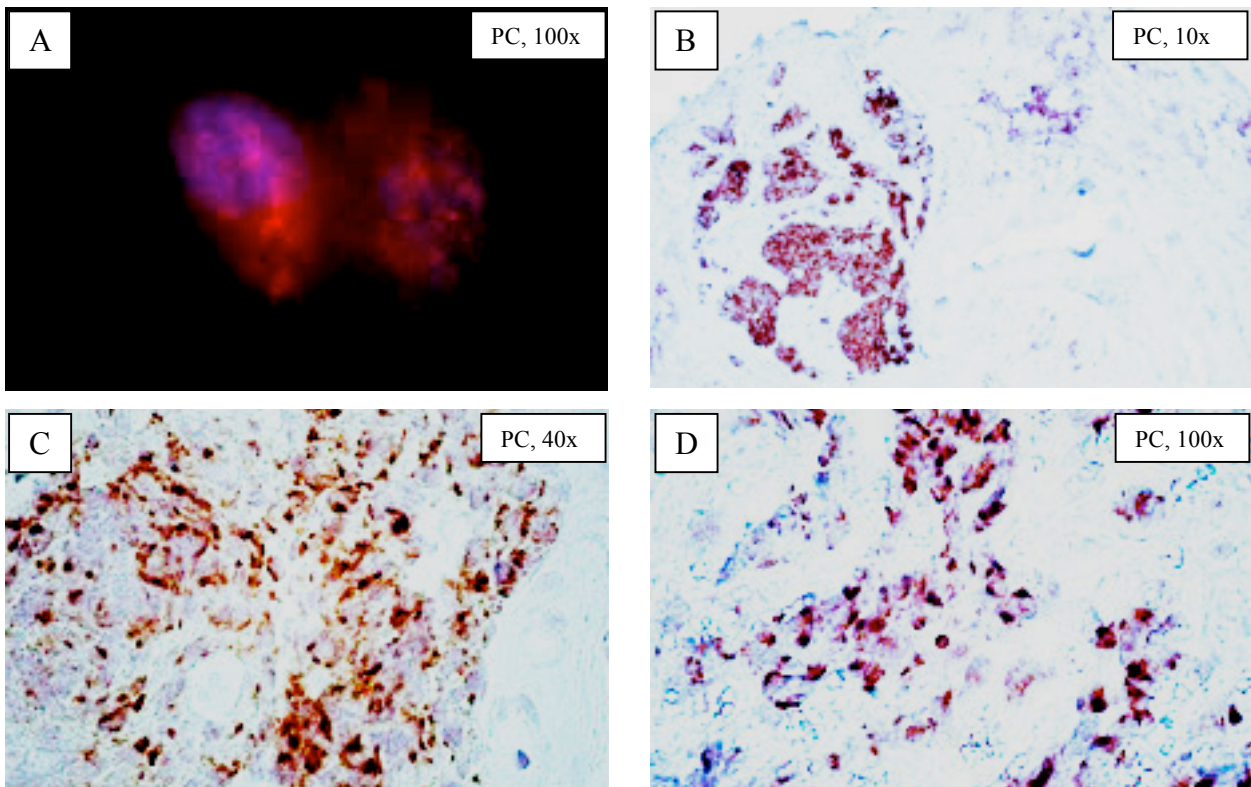


Abb. 14: **A-D**: Immunzytologische (A, rot) und immunhistochemische (B-D) VDR-Färbung an Material aus Prostata-Karzinometastasen (Primärantikörper 1:200). Die Zellen reagierten deutlich. Die Färbung war kräftig diffus im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert. Im Gewebe lagen die positiven Zellen zwischen negativen Gewebeanteilen in Inseln zusammen.

### **3.4 VDR-Färbung an MPNST**

#### **VDR-Expression in kultivierten MPNST-Zellen**

In den VDR-Färbungen an kultivierten MPNST-Zellen reagierten die Zelllinien S805 und S1268,1 mittelstark bis stark. Das Immunofluoreszenz-Signal manifestierte sich sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Auffallend war die relativ kräftige Färbung des Zytoplasmas (vgl. Abb.15 A-D). Der Zellkern erschien diffus gesprenkelt und wies im Verteilungsmuster eine geringere Ausprägung und Dichte als das Zytoplasma auf. Die verbliebenen Zelllinien S462 und S520 zeigten keine bis sehr geringe Reaktion. Dezentente Farbsignale beschränkten sich hauptsächlich auf den Zellkern und das perinukleäre Areal (s. Abb. 15 E, F). In allen Zelllinien wurde eine Kernfärbung mittels DAPI durchgeführt. Die Negativkontrollen ohne Primärantikörper waren durchweg negativ.

#### **VDR-Expression an Gewebeschnitten**

Entsprechend den oben geschilderten Ergebnissen zeigten die immunohistochemischen VDR-Färbungen eine sehr hohe Expression in den ursprünglichen Tumoren S805 und S1268,1. Die positiven Zellen waren inselartig zwischen ungefärbten Gewebeanteilen angeordnet (s. Abb. 16 A, D). Bei Vergrößerung und Inspektion der Zellen aus dem Tumor S805 fiel auf, dass vornehmlich die Zellkerne eine Reaktion zeigten (s. Abb. 16 B, C). Im Tumorgewebe S1268,1 manifestierte sich die Färbung vor allem im Zytoplasma (s. Abb. 16 E). Die angefärbten Zellen wiesen die typische Morphologie von MPNST-Zellen auf. Es handelte sich um dichte zelluläre Faszikel, die in Kombination mit myxoiden Arealen vorlagen. Die Zellen waren rund, teilweise fusiform mit irregulären Konturen und wiesen mitunter die typischen Malignitätskriterien, wie erhöhter Mitoseindex, nukleärer Pleomorphismus, Zellatypie und Kern-Plasma-Relation zu Gunsten des Kerns auf. Die Tumore S462 und S520, woraus die Zelllinien S426 und S520 entsprangen, zeigten im Gewebe hingegen keine VDR-Expression (s. Abb. 17 A, B). Alle Negativkontrollen ohne Primärantikörper waren negativ.



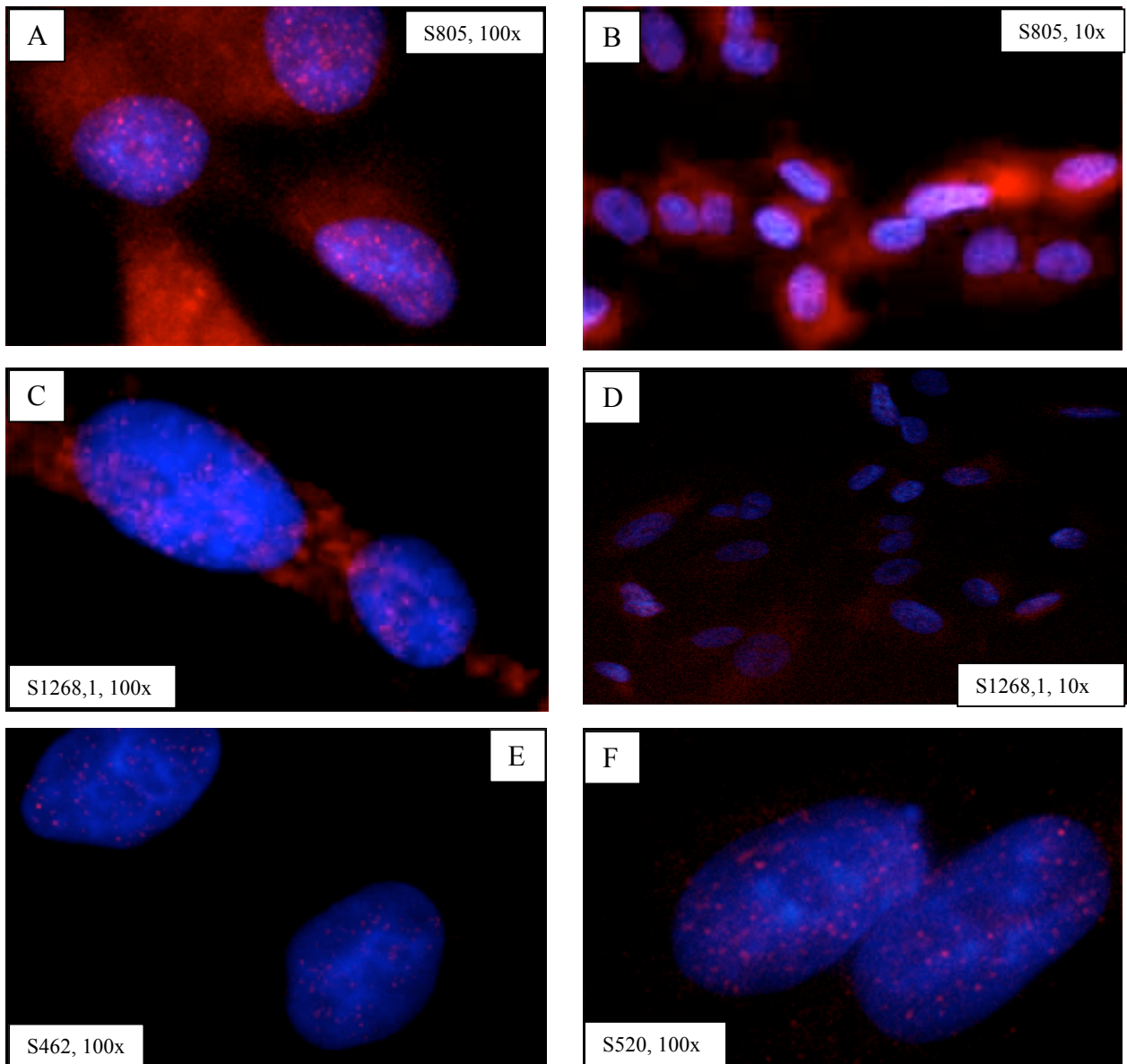


Abb. 15: A-F: VDR-immunzytologische VDR-Färbung (rot) an vier MPNST-Zelllinien (Primärantikörper 1:200).

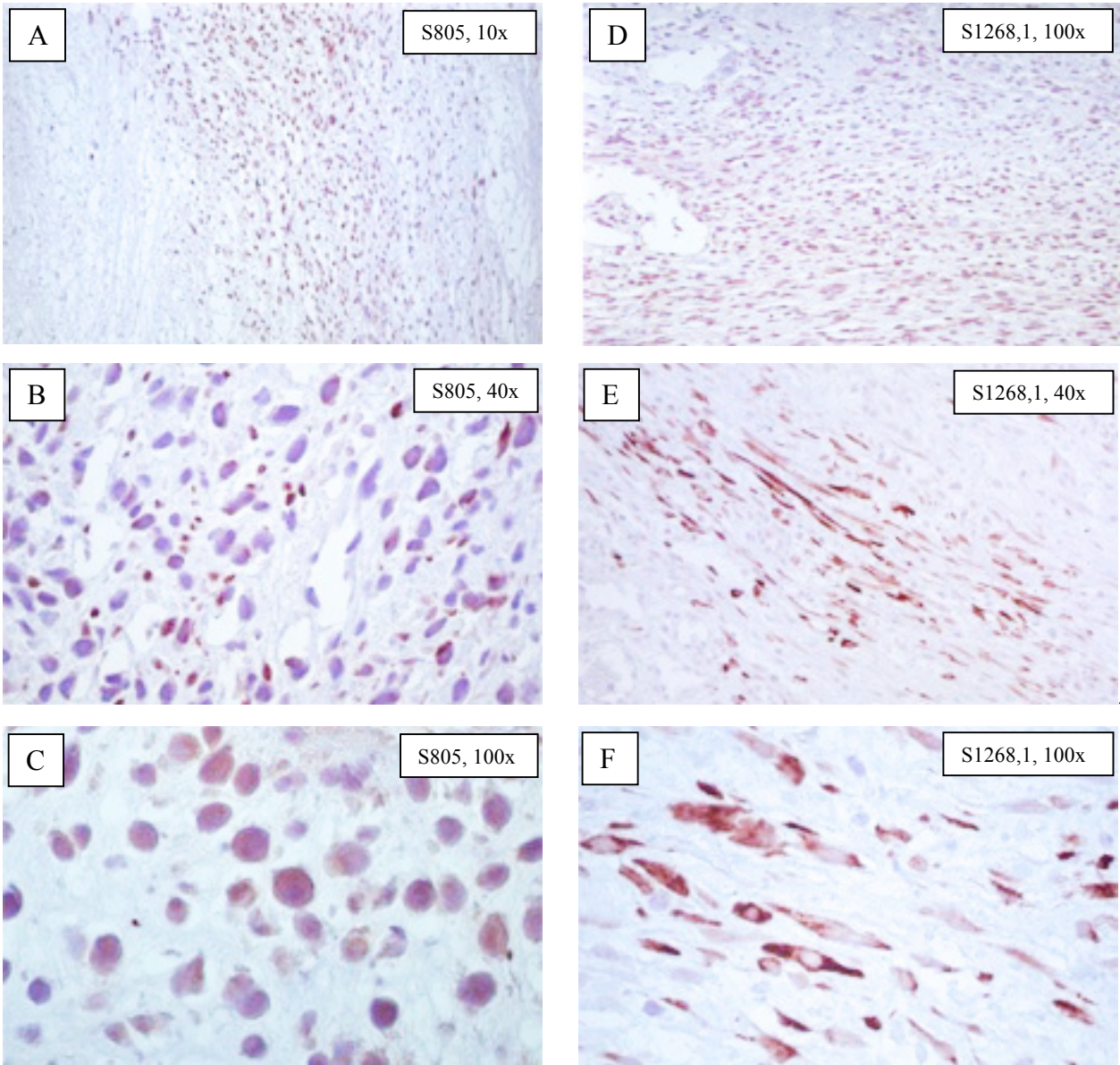


Abb. 16: **A-E**: Immunhistochemische VDR-Färbung an Gewebeschnitten aus den MPNST S805 und S1268,1 (Primärantikörper 1:200). Die gefärbten Zellen gruppieren sich flächig und inselförmig zwischen ungefärbten Gewebsteilen. Bei Inspektion der Zellen manifestierte sich die Färbung vornehmlich nukleär (S805) oder im Zytoplasma (S1268,1). Es wurde mit Hämalaun gegengefärbt.

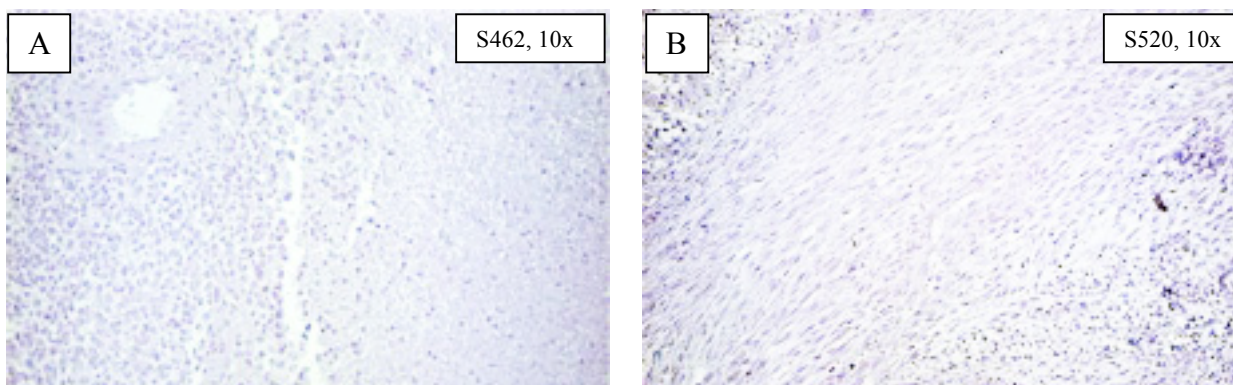


Abb. 17: **A, B:** Immunhistochemische VDR-Färbung an Gewebeschnitten aus den MPNST der Zelllinie S462 und S1520 (Primärantikörper 1:200). Die Gewebe zeigten keine Farbreaktion. Es wurde mit Hämalaun gegengefärbt.

### Auswertung

Die Immunfärbungen wurden wie in Abschnitt 2.6 beschrieben ausgewertet und die Ergebnisse in Tab. 4 dargestellt.

Zelllinie	IF, MPNST * <sup>1</sup>	IHC, MPNST * <sup>2</sup>	Wirkung von Vitamin D <sub>3</sub> / Analoga, 10 <sup>-6</sup> M, nach 6 Tagen auf das Zellwachstum, % der Kontrolle
S462	0,5	0	1,00
S520	1	0	0,78
S805	2	3	0,44
S1268,1	3	2,5	0,54

\*<sup>1</sup> Immunfluoreszenz, \*<sup>2</sup> Immunhistochemie

Tab. 4: Auflistung der untersuchten MPNST-Zellen mit den vergebenen Färbequotienten. In den Versuchen wurde jeder Zelllinie Vitamin D<sub>3</sub> zugesetzt und das Wachstum dieser Zellen zu solchen ohne Vitamin D<sub>3</sub>-Zusatz verglichen. Die behandelten Zellen wurden ausgezählt und in Spalte 4 die prozentuale Abweichung zu den unbehandelten (entsprechen 1.0) aufgelistet.

Der Grad der Expression in den kultivierten Zellen korrelierte mit der im ursprünglichen Gewebe. Die Färbungsergebnisse in der Zellkultur und im Gewebe passen zueinander. Sie korrelieren zudem mit den Ergebnissen der Hemmungsversuche durch Vitamin D<sub>3</sub>/ Analoga.

### **3.5 VDR in Neurofibromen von Patienten mit vermindertem Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel**

#### **VDR-Expression in kultivierten Schwannzellen**

Die Immunfluoreszenz-Färbung mit dem VDR-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:200 zeigte in der Mehrzahl der kultivierten Schwannzellen eine VDR-Expression. Die Färbung war unter dem Fluoreszenzmikroskop primär nukleär lokalisiert und dort sowohl zum Teil diffus, punktförmig gesprenkelt als auch flächig gruppenartig angeordnet. Es fiel auf, dass sich in einigen Fällen auch im Zytoplasma eine Färbung zeigte. In diesen Fällen war das Signal des Zytoplasmas im Vergleich zum Zellkern stärker (s. Abb. 18 A, B). Die Kulturen zeigten eine unterschiedliche Ausprägung der Färbung. Der Anteil der Schwannzellen, die nicht angefärbt wurden, machte durchschnittlich weniger als 10% aus. Zur Überprüfung, ob es sich bei den angefärbten Zellen tatsächlich um Schwannzellen handelte, wurde pro Zelllinie und Versuch eine Doppelfärbung (VDR und S100) durchgeführt. Die meisten S100-positiven Zellen exprimierten VDR (s. Abb. 18 C). Für die spätere Auswertung wurden allerdings Schwannzellen aus VDR-Einzelfärbungen herangezogen und anhand ihrer klassischen Morphologie als solche identifiziert (S. Abb. 18 D). Es wurden auch Zellen gesichtet, die S100 negativ, aber VDR positiv waren. Bei diesen Zellen wurde aufgrund ihrer Zellmorphologie angenommen, dass es sich um Fibroblasten handelte. Alle Negativkontrollen ohne Primärantikörper waren durchweg negativ.

#### **VDR-Expression an Gewebeschnitten**

In der immunhistochemischen Färbung an Gewebeschnitten aus Neurofibromen, waren 8 von 9 Geweben negativ. Eine Patientenprobe zeigte eine äußerst schwache Reaktion. In der stichprobenartigen Auszählung beinhaltete die Probe weniger als 10% positive Zellen (s. Abb. 18 E).

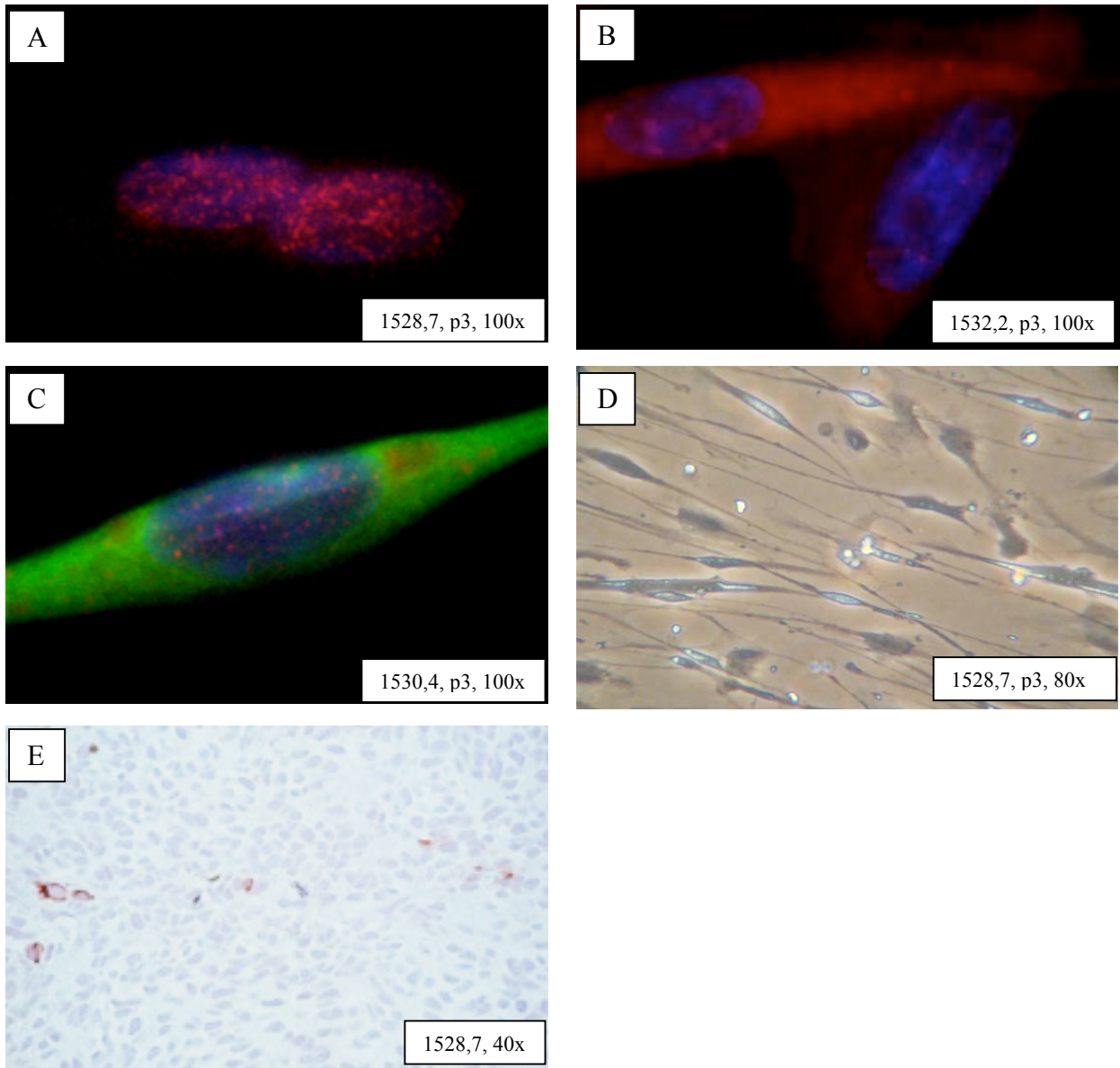


Abb. 18: **A, B:** Immunzytologische VDR-Färbung (rot, Primärantikörper 1:200) der Zelllinien 1528,7 und 1532,2. Die Zellen weisen ein nukleäres (A) und zum Teil zusätzlich zytoplasmatisches (B) Signal auf. Kernfärbung mittels DAPI. **C:** Immunzytologische VDR- (rot) / S100- (grün) Doppelfärbung der Zelllinie 1530,4 (Primärantikörper 1:200). Kernfärbung mittels DAPI. **D:** Zellen aus C im Phasenkontrast. **E:** Immunhistochemische VDR-Färbung des Gewebes aus dem Tumor 1528,7, das als einziges von neun Geweben sehr schwach positiv reagiert hat. Gegenfärbung mit Hämalaun.

**Auswertung**

Zelllinie	Art des Tumors	IF, SC* <sup>1</sup>	IHC, SC* <sup>2</sup>
1465	KNF	2	n.a.
1459,1	KNF	2	n.a.
1500,1	KNF	2,5	n.a.
1532,2	KNF	2,5	0
1572,4	KNF	0,5	0
1495,2	PNF	2,5	0
1500,2	PNF	3	0
1517,1	PNF	2,5	n.a.
1519,3	PNF	3	0
1526,1	PNF	1	0
1528,7	PNF	3	0
1530,4	PNF	3	0
1534,1	PNF	1,5	0,5

\*<sup>1</sup> Immunfluoreszenz an kultivierten Schwanzzellen, \*<sup>2</sup> Immunhistochemie an Gewebeschnitten, n.a. = nicht vorhanden. Mit diesen Tumorzellen wurde kein Wachstumshemmversuch mit Vitamin D<sub>3</sub>/Analoga durchgeführt.

Tab. 5: Auswertung der Färbung an kultivierten Schwanzzellen aus Neurofibromen und plexiformen Neurofibromen und im Gewebe.

### **3.6 Quantifizierung und Korrelation der Färbeergebnisse mit dem Vitamin D<sub>3</sub>-Serum-Spiegel der Patienten**

Die Bestimmung des Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentration im Patientenserum wurde freundlicherweise vom Zentrallabor des UKE mittels eines *Radioimmunoassay* (RIA) im Rahmen der stationären Diagnostik durchgeführt.

Die Quantifizierung der VDR-Expression wurde, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, durchgeführt. Die Untersuchung der Vitamin D<sub>3</sub>-Serumkonzentration der Patienten und der Färbung wurde für Neurofibrome und plexiforme Neurofibrome durchgeführt. Die Tab. 6 wurde zur Übersicht erstellt

und listet neben Tumor und Art des Tumors weitere klinische Daten und Informationen (Alter, Geschlecht), Vitamin D<sub>3</sub>- und PTH-Spiegel der Patienten und die entsprechenden Färbequotienten auf.

Zelllinie	Art des Tumors	Alter bei OP	w/m	Vit. D <sub>3</sub> [µg/l] * <sup>1</sup>	PTH [ng/l] * <sup>2</sup>	IF, SC	IHC, SC
1532,2	KNF	34	m	6,7	55,1	2,5	0
1465	KNF	61	m	14,1	20,4	2	n.a.
1500,1	KNF	44	m	13,3	59,4	2,5	n.a.
1459,1	KNF	47	m	11,9	+99,4	2	n.a.
1572,4	KNF	28	w	52,4	57,8	0,5	0
1534,1	PNF	25	w	5,3	64,7	1,5	0,5
1528,7	PNF	25	w	6,4	+80,9	3	0
1530,4	PNF	36	w	8,3	+97,3	3	0
1495,2	PNF	39	m	5,8	46,0	2,5	0
1500,2	PNF	44	m	13,3	59,4	3	0
1526,1	PNF	45	m	26,6	48,5	1	0
1517,1	PNF	57	w	6,74	60,7	2,5	n.a.
1519,3	PNF	29	w	4,97	-58,8	3	0

\*<sup>1</sup> > 30µg/l, Mangel bei < 20 µg/l, \*<sup>2</sup> 10-65 ng/l

Tab. 6: Auflistung der untersuchten KNF und PNF mit weiteren klinischen Daten (Alter, Geschlecht), Vitamin D<sub>3</sub>- und PTH-Spiegel der Patienten und den vergebenen Färbequotienten.

Ein Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel ist definiert als Serumkonzentration < 30 µg/l. 11 der 12 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel, wobei die Serumkonzentration eines Patienten > 20 und < 30 µg/l, von 3 Patienten > 10 und < 20 µg/l und von sieben Patienten < 10 µg/l betrug. Eine Patientin hatte einen Vitamin D<sub>3</sub>-Wert, der größer als 30 µg/l war. Bei drei Patienten war ein sekundärer Hyperparathyreoidismus vorhanden. Von den sieben Patienten mit Werten < 10 µg/l waren drei, deren Tumoren in den Versuchen der VDR-Färbung an kultivierten Schwanzzellen einen Färbequotient von 3 (sehr stark) erhielten. Weiteren drei Patienten dieser

Gruppe wurde der Färbequotient 2,5 (stark) und der verbliebenen Patientin 1,5 (schwach bis mittelschwach) zugeordnet. In der Patientengruppe mit Vitamin D<sub>3</sub>-Werten zwischen > 10 bis < 20 µg/l hatte ein Patient einen Score von 3 und 2,5 erhalten. Diesem Patienten entstammten zwei untersuchte Tumoren. Den zwei anderen Patienten wurde jeweils ein Score von 2 (mittel) zugeteilt. Die zwei Patientinnen mit Vitamin D<sub>3</sub>-Werten zwischen > 20 bis < 30 µg/l bzw. > 30 µg/l erhielten jeweils einen Score von 1 (schwach) bzw. 0,5 (sehr schwach). Zur Übersicht dieser Ergebnisse wurde eine graphische Darstellung angefertigt. Im Graphen wurden die Färbequotienten der Tumoren über den Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentrationen der dazugehörigen Patienten aufgetragen (s. Abb. 19).

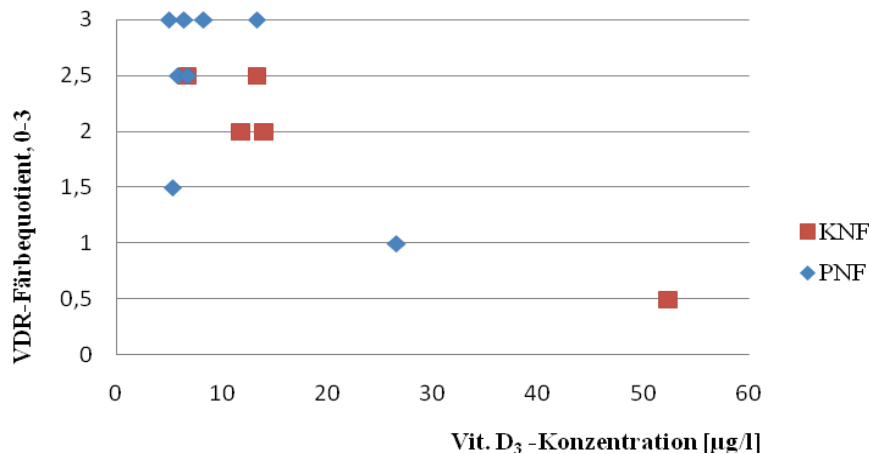


Abb. 19: Darstellung des VDR-Färbequotienten (0-3) kultivierter Schwanzzellen über Vit. D<sub>3</sub>-Konzentration [µg/l] der zugehörigen Patienten. PNF und KNF sind einzeln dargestellt.



## 4 Diskussion

### 4.1 VDR-Expression in MPNST

Die VDR-Expression war in zwei MPNST-Zelllinien sowie ursprünglichen Tumorgeweben deutlich festzustellen. Dementsprechend wurde das Wachstum dieser zwei MPNST-Zelllinien durch die Zugabe von Vitamin D<sub>3</sub> mit rückläufiger Zellzahl unterdrückt. In den anderen zwei untersuchten MPNST-Zelllinien war die VDR-Expression kaum zu detektieren. Entsprechend wurde das Wachstum dieser zwei Zelllinien von der Vitamin D<sub>3</sub>-Zugabe nicht beeinflusst. Vitamin D<sub>3</sub> und seine Metabolite fungieren bekanntlich u.a. als Induktoren anti-neoplastischer Wirkungen in vielen bekannten Tumoren (vgl. Abschnitt 1.4). Der Mechanismus beruht auf der Inhibition von Proliferation und Induktion von Differenzierung, Förderung der Apoptose und Hemmung des invasiven Wachstums sowie der Angiogenese.

Die MPNST-Zellen wurden in dem Proliferationshemmungs-Versuch mit Calcitriol-/Analog-Konzentrationen von 10<sup>-12</sup> bis 10<sup>-7</sup> M inkubiert. Erst ab einer Konzentration von 10<sup>-7</sup> M (= 100 nM) zeigte sich eine signifikante Proliferationshemmung, die bei 10<sup>-6</sup> M (= 1000 nM = 1 µM) sehr deutlich ausgeprägt war.

Um diese Beobachtungen für therapeutische Überlegungen nutzbar zu machen, ist es notwendig die verwendeten Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentrationen vor dem physiologischen Hintergrund zu betrachten. Das therapeutische Fenster von Vitamin D<sub>3</sub> in diesem Zusammenhang ist dennoch relativ schmal und schwierig zu erreichen. Man geht davon aus, dass der Schwellwert für die dosislimitierende Hypercalcämie bei Serumwerten > 600 nM liegt. Die in dem Hemmungsversuch benötigten Vitamin D<sub>3</sub>-Dosen dürften also nur zwischen 1-5 \* 10<sup>-7</sup> M liegen. In Patienten orientierte sich die Dosis bei Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution bislang an den Richtlinien des *Food and Nutrition Board*. Wichtige Referenzwerte sind der *Lowest observed adverse effect level* (LOAEL), *No observed adverse effect level* (NOAEL) und der abgeleitete *Upper intake level* (UL). Der LOAEL gibt die niedrigste Menge einer Substanz an, bei der substanzspezifische Nebenwirkungen auftreten. Im Fall von Vitamin D<sub>3</sub> beobachtet man Hypercalcämien. Die maximale Einnahmedosis, bei der keine Nebenwirkungen beobachtet werden, der sogenannte NOAEL, läge entsprechend immer unterhalb des LOAEL. Der UL ist ein abgeleiteter Wert, der die maximale Dosis bei täglicher Einnahme über einen längeren Zeitraum angibt, die definitionsgemäß bei einem gesunden Erwachsenen „wahrscheinlich kein Risiko von Nebenwirkungen“ verursacht (*Food and Nutrition Board*, 1997). Ein Überschreiten des Grenzwertes bedeutet nicht, dass sich der Patient einem

sofortigen Risiko der Nebenwirkungen aussetzt. Der UL liefert vielmehr einen Sicherheitsabstand zu jenen Dosen, die Nebenwirkungen hervorrufen könnten. Er berechnet sich aus der Division von NOAEL/*Uncertainty Factor* (UF). Der UF wird von einer spezifischen Datenbank bezogen und beträgt für Vitamin D<sub>3</sub> 1.2 (*Food and Nutrition Board*, 1997). Für Vitamin D<sub>3</sub> wurden der LOAEL mit 95 µg/d, NOAEL mit 60 µg/d und UL mit 50 µg/d festgelegt. Der NOAEL basiert auf einer Studie von Narang NK *et al.*, 1984, in der die Hypercalcämie als Nebenwirkung bei Einnahme von 95 µg Vitamin D<sub>3</sub>/d über 3 Monate auftraten. In der Arbeit von Vieth R *et al.* von 2001 wurden allerdings keine Nebenwirkungen bei Probanden beobachtet, die mit 100 µg/d behandelt wurden. Das Vorhandensein und Fehlen von Nebenwirkungen bei diesen Dosen bestätigt, dass die Dosen innerhalb des Sicherheitsbereiches liegen, in dem Hypercalcämien auftreten können, aber nicht müssen. In der Publikation von Barger-Lux MJ *et al.*, 1998 wurden männliche Probanden mit 25µg (1.000 IU), 250µg (10.000 IU) und 1250 µg (50.000 IU) Vitamin D<sub>3</sub> während der Wintermonate über einen Zeitraum von 8 Wochen behandelt. Bei allen Dosen traten keine Hypercalcämie und andere Nebenwirkungen auf und die Probanden erreichten mittlere Vitamin D<sub>3</sub>-Werte im Blut von 213 nmol/l (*n* = 10) und 220 nmol/l (*n* = 16). Heaney RP *et al.*, 2003 behandelten 15 Patienten mit 125 µg Vitamin D<sub>3</sub>/d und beobachteten ebenfalls einen Anstieg des Serum-Vitamin D<sub>3</sub> auf 160 nmol/l ohne Hypercalcämie. Hathcock *et al.*, 2007 sprachen sich auf dieser Grundlage für die Erhöhung der NOAEL von 95 (3.800 IU) auf 250 µg/d (10.000 IU) aus. Die benötigten Vitamin D<sub>3</sub>-Dosen aus dem Hemmungsversuch wären nach den nun überdachten Empfehlungen also theoretisch applizierbar und physiologisch im Blut zu erreichen. In der Realität wird der empfohlene Wert von 250 µg/d durch Aufnahme von angereicherten und nicht-angereicherten Lebensmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln sowie autogene Bildung von Vitamin D<sub>3</sub> allerdings nicht ansatzweise erreicht. Es kommen zudem weitere Einflussfaktoren wie Geschlecht und Sonnenexposition dazu, die die Aufnahme und den Stoffwechsel im Körper erschweren können. Eine gezielte hochdosierte medikamentöse Substitution von Vitamin D<sub>3</sub> und regelmäßige Blut- und Urinkontrollen wären erforderlich. Die Erhöhung des Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegels folgt einer exponentiellen Verteilung, wie in Abb. 20 ersichtlich (Hathcock *et al.*, 2007) und stellt sehr anschaulich alle vor 2007 durchgeführten und publizierten Studienergebnisse zu Vitamin D<sub>3</sub>-Gabe und Auswirkung auf die Serumkonzentration des 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> dar. Erhöhte Calciumblutspiegel treten vereinzelt bereits unterhalb des Grenzwertes für Hypercalcämien (gestrichelten Linie) von 600 nmol/l 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> auf. Zusätzlich muss man berücksichtigen, dass die zuvor genannten Versuche an gesunden männlichen Probanden durchgeführt wurden, von denen bekannt ist, dass sie generell

einen höheren Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel haben und daher die Substitutionen im Vergleich zu Frauen in kürzerer Zeit in höheren Serumwerten resultieren.

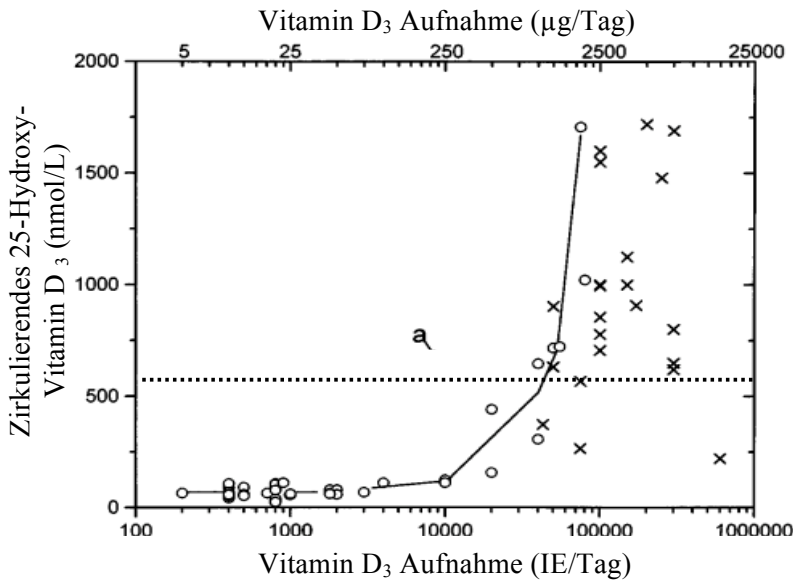


Abb. 20: Darstellung des Serum-25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [nmol/l] über der Vitamin D<sub>3</sub>-Aufnahmedosis [IU/d] (Hathcock *et al.*, 2007). Runde Markierungen stellen die Ergebnisse aus Studien zu diesem Thema bis 2007 dar. Markierungen mit einem “x” repräsentieren Probanden mit Vitamin D<sub>3</sub>-Intoxikationen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert 600 nmol/l 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, ab welchem mit Hypercalcämien zu rechnen ist.

In der Literatur wurde bei Prostata-Karzinomzellen bereits von einer signifikanten Anti-Tumor-Wirkung des Vitamin D<sub>3</sub> *in vitro* unter Konzentration von 10<sup>-9</sup> M berichtet (Chen TC *et al.*, 2000). Als praktische Beispiele seien hier das epidemiologische Nord-Süd-Gefälle der Inzidenz des Prostata-Karzinoms aufgeführt, das man auf die erhöhte Sonnenexposition im Süden zurückführt, und die klinische Betreuung von Prostata-Karzinom-Patienten, bei denen aufgrund des synergistischen Effektes Vitamin D<sub>3</sub> beispielsweise in Kombination mit Taxanen verabreicht wird. Die in dieser Arbeit untersuchten MPNST-Zellen reagierten erst bei Dosen von 10<sup>-7</sup> M. Da ein relativ enges therapeutisches Fenster vorliegt, stellt sich die Frage, wie häufig therapielimitierende Hypercalcämien bei Patienten unter einer Substitution auftreten werden und wie gut Patienten eingestellt werden können. Zudem stellt sich die Frage, inwieweit und wie schnell ein hoher Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel Einfluss auf das Tumorstadium hat und inwieweit ein Behandlungsversuch

unter ethischen Gesichtspunkten bei mittel- bis niedriggraden MPNST vertretbar ist, da nach wie vor die einzig kurative Therapie die rechtzeitige chirurgische Intervention ist (Hagel C *et al.*, 2007).

MG	384,6 g/mol
1 µg der Verbindung	1 µg des Vitamins
Umrechnungsfaktor auf aktives Vitamin	1
1IU	0,025 µg Vitamin D <sub>3</sub>
40 IU	1µg Vitamin D <sub>3</sub>

Stoffmenge (n)	Molares Gewicht (M)	Masse (m)	Dosis	Internationale Einheiten
<b>mol</b>	<b>g/mol</b>	<b>g</b>	<b>µg/d</b>	<b>IU</b>
1,00E-12	384,6	3,846E-10	4,00E-04	0,016
1,00E-09	384,6	3,846E-07	0,4	16
3,75E-08	384,6	1,442E-05	14,4	576
5,00E-08	384,6	1,923E-05	19,2	768
7,50E-08	384,6	2,885E-05	28,9	1.156
8,00E-08	384,6	3,077E-05	30,8	1.232
1,00E-07	384,6	3,846E-05	38,5	1.540
1,25E-07	384,6	4,808E-05	48,1	1.924
1,00E-06	384,6	0,0003846	384,6	15.384
3,25E-03	384,6	1,250	1250,0	50.000
6,50E-03	384,6	2,500	2500,0	100.000

Tab 7.: Umrechnungstabelle für Vitamin D<sub>3</sub>, Cholecalciferol

## 4.2 VDR-Expression in Neurofibromen und plexiformen Neurofibromen

Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass in allen kultivierten Tumorzellen aus Neurofibromen und plexiformen Neurofibromen eine differenzierte VDR-Expression gefunden wurde. In Zellkulturen von PNF und KNF wachsen für gewöhnlich sowohl Schwannzellen als auch Fibroblasten. Auch nach Durchführung von Anreicherungsverfahren setzten sich die Kulturen nicht 100%ig aus Schwannzellen zusammen, sondern lediglich aus 70-80% Schwannzellen. Daher wurden S100-/VDR-Doppelfärbungen durchgeführt. Die S100-positiven Zellen wiesen die Schwannzell-typische

Morphologie auf. Die S100-positiven Zellen exprimierten VDR zu 90%. Die Expression manifestierte sich primär diffus im Zellkern. Bei einigen Tumoren wurde zudem eine Expression im Zytoplasma beobachtet, die vergleichsweise stärker als im Zellkern war. VDR ist im Zytoplasma lokalisiert und passiert erst bei Ligandenbindung die Zellkernmembran. Mit dem aktuellen theoretischen Wissen über die Lokalisation des Rezeptors stimmen diese Ergebnisse überein. Des Weiteren passen die Lokalisation und Verteilung der Färbung innerhalb einer Zelle zu Ergebnissen in früheren publizierten Studien zur Untersuchungen von VDR in gesunden und malignen Zellen (Friedrich M *et al.*, 1998, Boos A *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen zeigten sowohl schwache als auch kräftige VDR-Kernfärbungen in Darm- und Brustkrebszellen und verschiedenen starke zytoplasmatische Färbungen, die den unterschiedlichen VDR-Gehalt der Zellen widerspiegeln. Im Ursprungsgewebe fand man zwischen unmittelbar benachbarten Zellen und zwischen den verschiedenen Biopsiesegmenten eine sich differenzierende Verteilung der Färbung. Die Stärke der Expression von VDR in den kultivierten Schwanzzellen verhielt sich umgekehrt proportional zum Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel der zugehörigen Patienten. Lammert *et al.* (2006) fanden in ihrer Arbeit eine umgekehrte Proportionalität zwischen Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel und KNF bei den untersuchten Patienten.

VDR generiert sowohl anabole als auch katabole Vorgänge im menschlichen Körper. Diese Prozesse sind bei vielen Tumoren pathologisch verändert. Wenn man sich vergegenwärtigt, dass Vitamin D<sub>3</sub> und seine Metabolite in komplexe Vorgänge der Signaltransduktion und Regulation von Wachstumsfaktoren involviert sind und u.a. Zellwachstum und Zelldifferenzierung steuern, kam nach diesen Ergebnissen hypothetisch eine erhöhte Resorption und Metabolisierung des Vitamin D<sub>3</sub> durch die Tumorzellen in Frage. Dagegen spricht, dass sich im ursprünglichen Gewebe der untersuchten Tumoren keine Färbung zeigte. Es ist davon auszugehen, dass eine nachträgliche Hochregulierung der VDR-Expression in der Zellkultur stattfand. Stärkste Einflussfaktoren auf die VDR-Expression sind die Hormone und Komponenten des Knochenstoffwechsels. Während der Zellkultivierung wurde DPBS verwendet, ein typischer Phosphatpuffer, der mit Salzen (Natrium, Kalium), Glucose, Aminosäuren und Vitaminen angereichert ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Verwendung des Puffers eine Hochregulierung des Rezeptors hervorgerufen haben könnte. Wie zuvor beschrieben ist die Kultivierung der Schwanzzellen ein sehr sensibles Verfahren. Die Kultivierung der Schwanzzellen unter Verwendung eines Mediums ohne oben genannte Zusätze wäre nicht durchführbar gewesen. Da keine VDR-Expression in der Mehrzahl der untersuchten Gewebe vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass die erniedrigten Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel der Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit nicht durch einen zuvor angenommenen erhöhten

Stoffwechsel durch Tumorzellen *in vivo* verursacht werden oder damit in unmittelbarem Zusammenhang stehen. Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen aus dem durchgeführten Proliferationshemmungs-Versuch durch Vitamin D<sub>3</sub> oder dessen Analoga. Obwohl in den Experimenten nicht die gleichen Zelllinien benutzt wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, korrelieren die Ergebnisse dennoch miteinander. 5 aus 6 Schwanzzellkulturen wurden in ihrer Zellproliferation nicht durch Vitamin D<sub>3</sub> oder Analoga beeinflusst.

### **Ausblick**

In dieser Arbeit konnte der Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptor als Grund für die erniedrigten Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel bei NF1 ausgeschlossen werden. Die Gründe für die niedrigen Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel bei *NF1*-Patienten wurden durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt. Anzuregen wäre beispielsweise die Metabolite von Vitamin D<sub>3</sub> in der Epidermis und das Verhalten der Patienten hinsichtlich UV-Exposition und Ernährung in Folgearbeiten eingehender zu untersuchen. Zudem wäre es interessant zu beobachten, welche objektiven (klinisch/physiologisch z.B. volumetrischen Änderungen der Tumoren, Serum-Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegel, Zunahme der Knochendichte) und subjektiven (z.B. Besserung der psychischen Verfassung) Auswirkungen sich aus einer Vitamin D<sub>3</sub>-Substitution ergäben.

## 5 Zusammenfassung

Neurofibromatose Typ 1 gehört zu der Gruppe der genetischen Tumorsuppressor-Syndrome und ist durch Tumorbildung im peripheren Nervensystem, Pigmentierungsstörungen und Knochenmineralisationsdefekte charakterisiert (Friedman JM, Riccardi VM, 1999, Lammert *et al.*, 2005). In der von Lammert M *et al.* (2006) veröffentlichten Studie wurden in der Mehrzahl der Probanden mit NF1 ein Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel und eine inverse Korrelation zwischen der Serum-Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentration und der Anzahl an kutanen Neurofibromen festgestellt. Diese Ergebnisse wurden auch in einer zweiten Studie bestätigt (Tucker T *et al.*, 2008).

In der Literatur wird berichtet, dass Vitamin D<sub>3</sub> eine anti-neoplastische Wirkung auf diverse Tumoren hat. Auf dieser Grundlage wurden im Labor Wachstumssuppressions-Versuche mit Vitamin D<sub>3</sub> und dessen Analoga durchgeführt und ein nahezu 50%iger Rückgang der Zellzahl in 2 von 4 etablierten MPNST-Zelllinien erreicht. 5 aus 6 getesteten Schwanzzellpopulationen wurden in ihrer Zellproliferation nicht beeinflusst. Ein Erklärungsmodell für diese Beobachtung ist eine Überexpression des Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptors in den NF1-assoziierten Tumoren.

In dieser Arbeit wurde die Expression des Vitamin D-Rezeptors (VDR) in 5 kutanen Neurofibromen, 7 plexiformen Neurofibromen und 4 MPNST sowie in den aus diesen Tumoren kultivierten Schwanzzellen und MPNST-Zellen untersucht. Die Ergebnisse wurden mit der Serum-Vitamin D<sub>3</sub>-Konzentration der Patienten und der Proliferationshemmung in den Zellen verglichen. Die VDR-Expression war in zwei MPNST-Zelllinien sowie ursprünglichen Tumorgewebe deutlich nukleär und zytoplasmatisch festzustellen. Dementsprechend ist anzunehmen, dass das Wachstum dieser zwei MPNST-Zelllinien durch die Zugabe von Vitamin D<sub>3</sub> mit rückläufiger Zellzahl supprimiert wurde. In den anderen zwei untersuchten MPNST-Zelllinien war die VDR-Expression kaum nachweisbar. Entsprechend wurde das Wachstum dieser zwei Zelllinien von der Vitamin D<sub>3</sub>-Zugabe nicht beeinflusst. In den kultivierten Schwanzzellen wurde eine VDR-Expression differenziert gefunden. Die Expression manifestierte sich primär diffus im Zellkern mit teilweiser Expression im Zytoplasma. Der Rezeptor wurde allerdings nicht im ursprünglichen Tumorgewebe gefunden.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen, dass die Mehrheit der untersuchten *NF1*-assoziierten Tumore (plexiforme Neurofibrome, kutane Neurofibrome und MPNST) im Gewebe keine VDR-Expression aufweisen, diese aber unter Kulturbedingungen entwickeln können. Die Wachstumshemmung durch Vitamin D<sub>3</sub> und Analoga in MPNST korreliert mit einer starken VDR-Expression sowohl in den kultivierten Zellen als auch im Tumorgewebe.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abe E, Miyura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, Suda T:** Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78:4990-4994; 1981.

**Ahmadian MR, Wiesmüller L, Lautwein A, Bischoff FR and Wittinghofer A:** Structural differences in the minimal catalytic domains of the GTPase-activating proteins p120<sup>GAP</sup> and Neurofibromin. *J Biol Chem*; 271; 16409–16415; 1996.

**Balsan S, Garabédian M, Larchet M, Gorski AM, Cournot G, Tau C, Bourdeau A, Silve C, Ricour C:** Long-term nocturnal calcium infusions can cure rickets and promote normal mineralization in hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest*; 77:1661-1667; 1986.

**Barger-Lux MJ, Heaney RP, Dowell S, Chen TC, HolickMF:** Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men. *Osteoporos Int*; 8:222–30; 1998.

**Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J:** Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature*; 356:713–715, 1992.

**Beer TM, Lemmon D, Lowe BA, Henner WD:** High-dose weekly oral calcitriol in patients with a rising PSA after prostatectomy or radiation for prostate carcinoma. *Cancer*; 97:1217-1224; 2003.

**Beer TM und Myrthue A:** Calcitriol in cancer treatment: from the lab to the clinic. *Mol Cancer Ther*; 3:373-81; 2004.

**Bettoun DJ, Buck DW 2nd, Lu J, Khalifa B, Chin WW, Nagpal S:** A vitamin D receptor-Ser/Thr phosphatase-p70 S6 kinase complex and modulation of its enzymatic activities by the ligand. *J Biol Chem*; 277:24847-24850, 2002.

**Blutt SE, Allegretto EA, Pike JW, Weigel NL:** 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 9-*cis*-retinoic acid act synergistically to inhibit the growth of LNCaP prostate cells and cause accumulation of cells in G<sub>1</sub>. *Endocrinol*; 138:1491-1497; 1997.

**Bollag G und F McCormick:** Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature*; 351:576-579; 1991.

**Boos A, Riner K, Hässig M, Liesegang A:** Immunohistochemical Demonstration of Vitamin D Receptor Distribution in Goat Intestines. *Cells Tissues Organs*; DOI: 10.1159/000102540; 2007.



- Bouillon R, Van Assche FA, Van Baelen H, Heyns W, De Moor P:** Influence of vitamin d-binding protein on serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentration. *J Clin Invest*; 67:589-596; 1981.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F:** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*; 349:117-127; 1991.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F:** The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*; 348:125-132; 1992.
- Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G:** Intestinal Calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem*; 88:332-339; 2003.
- Boyan BD, Dean DD, Sylvia VL, Schwartz Z:** Nongenomic regulation of extracellular matrix events by vitamin D metabolites. *J Cell Biochem*; 56:331-339; 1994.
- Calvo MS und Whiting SJ:** Prevalence of vitamin D insufficiency in Canada and the United States: importance to health status and efficacy of current food fortification and dietary supplement use. *Nutr Rev*; 61(3):107-113; 2003.
- Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ:** Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int*; 7:439-443; 1997.
- Chen TC, Schwartz GG, Burnstein KL, Lokeshwar BL, Holick MF:** The *in vitro* Evaluation of 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 19-nor-1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub> as therapeutic agents for prostate cancer. *Clinical Cancer Research*; Vol. 6: 901-908; 2000.
- Chen WY, Bertone-Johnson ER, Hunter DJ, Willett WC, Hankinson SE:** Associations Between Polymorphisms in the Vitamin D Receptor and Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14(10):2335-2339; 2005.
- Cheng JB, Levine MA, Bell NH, Mangelsdorf DJ, Russell DW:** Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:7711-7715; 2004.
- Cornet A, Baudet C, Neveu I, Baron-Van Evercooren A, Brachet P, Naveilhan P:** 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulates the expression of VDR and NGF gene in Schwann cells in vitro. *J Neurosci Res*; 53:742-746; 1998.
- DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR:** Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell*; 69:265-273; 1992.
- Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM:** Malignant peripheral nerve sheath tumors a clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer*; 57:2006-2011; 1986.

- Dusso AS, Thadhani R, Slatopolsky E:** Vitamin D receptor and analogs. *Semin Nephrol*; 24:10-16; 2004.
- Evans DG, Baser ME, McGaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A:** Malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*; 39:311-314; 2002.
- Ferner RE und Gutmann DH:** International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *Cancer Res*; 62:1573-1577, 2002.
- Fleet JC:** Rapid, membrane-initiated action of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean. *J Nutri*; 134(12):3215-3218; 2004.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine:** Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. *Nat Academy Press*; 51-69; 1997.
- Frahm S:** Zellbiologische und genetische Untersuchungen an Schwannzellen aus peripheren Nervenscheidentumoren von *NF1*-Patienten. Dissertation, Hamburg; 2004.
- Friedrich M, Rafi L, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J:** Expression of 1,25-Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> Receptor in Breast Carcinoma. *J Histochem Cytochem*; 46:1335-1337; 1998.
- Friedman JM, Arbiser J, Epstein JA, Gutmann DH, Huot SJ, Lin AE, McManus B, Korf BR:** Cardiovascular disease in neurofibromatosis 1: a report of the *NF1* Cardiovascular Task Force. *J Genet Med*; 4:105-111; 2002.
- Friedman JM und Riccardi VM:** Clinical and epidemiological features. In: Friedman JM, Gutmann DH, Mac Collin M, Riccardi VM (Hrg.): Neurofibromatosis: phenotype, natural history, and pathogenesis. 3rd edition; 29-86. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1999.
- Friedrich RE, Hartmann M, Mautner VF:** Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST) in *NF1*-affected children. *Anticancer Res*; 27(4A):1957-60; 2007.
- Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, Portale AA:** Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type I. *Mol Endocrinol*; 11:1961-1970; 1997.
- González Pardo V, Boland R, de Boland AR:** Vitamin D receptor levels and binding are reduced in aged rat intestinal subcellular fractions. *Biogerontol*; 1389-5729; 2007.
- Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D:** The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *J Am Med Assoc*; 278:51-57; 1997.
- Guzey M, Kitada S, Reed JC:** Apoptosis induction by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*; 1:667-677; 2002.

**Hagel C, Zils U, Peiper M, Kluwe L, Gotthard S, Friedrich RE, Zurakowski D, von Deimling A, Mautner VF:** Histopathology and clinical outcome of NF1-associated vs. sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Neurooncol*; 82(2):187-92; 2007.

**Hay N und Sonenberg N:** Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*; 18 (16):1926-1945; 2004.

**Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A:** Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Am Coll Nutr*; 22:142-146; 2003.

**Heaney RP, Davies KM, Chen TC, Holick MF, Barger-Lux MJ:** Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol. *Am J Clin Nutr*; 77:204–10; 2003.

**Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, Adams JS:** Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 $\alpha$ -Hydoxylase. *Mol Cell Endocrinol*; 215:31-38; 2004.

**Hirose T, Scheithauer BW, Sano T:** Perineurial malignant Peripheral nerve sheath tumor (MPNST). A Clinicopathological and ultrastructural study of seven cases. *Am J Surg Pathol*; 1368-1378; 1998.

**Holick MF, Frommer JE, McNeill SC, Richtand NM, Henley JW, Potts JT Jr.:** Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D<sub>3</sub> in skin. *Biochem Biophys Res Commun*; 76:107-114; 1977.

**Holick MF:** The cutaneous photosynthesis of previtamin D<sub>3</sub>: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol*; 77:51-57; 1981.

**Holick MF:** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune disease, cancer, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*; 80:1678-1688; 2004.

**Holick MF:** The role of vitamin D for bone health and fracture prevention. *Curr Osteoporos Rep*; 4(3):96-102; 2006.

**James SY, Mackay AG, Colston KW:** Effects of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and ist analogues on induction of apoptosis in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 58(4):395-401; 1996.

**Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K:** The *NF1* tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102(24):8573-8578; 2005.

**Jones G, Vriezen D, Lohnes D, Palda V, Edwards NS:** Side chain hydroxylation of vitamin D<sub>3</sub> and its physiological implications. *Steroids*; 49:29-55; 1987.

**Jones G:** Metabolism and Catabolism of Vitamin D, Its Metabolites, and Clinically Relevant Analogs. IN: *Vit D Physiol, Mol Biol, and Clin Applic.* Holick MF (ed.); Humana Press Totowa; NJ; 57-84; 1999.

**Kacz A und Barsony J:** Homrone-dependent translocation of vitamin d receptors is linked to transactivation. *J Biol Chem*; 274:19352-19360; 1999.

**Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Riccardi VM, Birch P, Friedman JM, Wolkenstein P:** Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: a cohort study of 703 patients. *Am J Med Genet A*; 132:49-53; 2005.

**Kissmeyer AM, Binderup E, Binderup L, Mørk Hansen C, Andersen NR, Makin HL, Schroeder NJ, Shankar VN, Jones G:** Metabolism of the vitamin D analog EB 1089: identification of in vivo and in vitro liver metabolites and their biological activities. *Biochem Pharmacol*; 53:1087-1097; 1997.

**Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, Kitazawa R:** Vitamin D<sub>3</sub> supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promotor. *J Cell Biochem*; 89:771-779, 2003.

**Kluwe L, Friedrich RE, Mautner VF:** Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosomes Cancer*; 24(3):283-5, 1999.

**Korf BR:** Malignancy in neurofibromatosis type 1. *Oncologist*; 5:477-485; 2000.

**Khosrotehrani K, Bastuji-Garin S, Riccardi VM, Birch P, Friedman JM, Wolkenstein P:** Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: a cohort study of 703 patients. *Am J Med Genet A*; 132A(1):49-53; 2005.

**Kurnik BR und Hruska KA:** Mechanism of stimulation of renal phosphate transport by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Biochem Biophys Acta*; 817:42-50; 1985.

**Lammert M, Kappler M, Mautner VF, Lammert K, Storkel S, Friedman JM, Atkins D:** Decreased bone mineral density in patients with neurofibromatosis. *Osteoporos Int.*; 16(9):1161-1166, 2005.

**Lammert M, Friedman JM, Roth HJ, Friedrich RE, Kluwe L, Atkins D, Schooler T, Mautner VF:** Vitamin D deficiency associated with number of neurofibromas in neurofibromatosis 1. *J Med Genet*; 43:810-813; 2006.

**Lammert M, Friedman JM, Kluwe L, Mautner VF:** Prevalence of neurofibromatosis 1 in German children at elementary school enrollment. *Arch Dermatol*; 141(1):78-9; 2005.

**Liu G, Oettel K, Ripple G, Staab MJ, Horvath D, Alberti D, Arzoomanian R, Marnocha R, Bruskevitz R, Mazess R, Bishop C, Bhattacharya A, Bailey H, Wilding G:** Phase I trial 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin d(2) in patients with hormone refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*; 8:2820-2827; 2002.

**Liu M, Lee MH, Cohen M, Bommakanti M, Freedman LP:** Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D<sub>3</sub> leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev*; 10:142-153; 1996.

**Lokeshwar BL, Schwartz GG, Selzer MG, Burnstein KL, Zhuang SH, Block NL, Binderup L:** Inhibition of prostate cancer metastasis *in vivo*: a comparison of 1,25-dihydroxyvitamin D (Calcitriol) and EB 1089. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*; 8:241-248; 1999.

**Masuyama H and MacDonald PN:** Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J Cell Biochem*; 71:429-440; 1998.

**Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, Van Looveren R, Maes C, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G:** Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest*; 116(12):3150-3158; 2006.

**Mautner VF:** Longitudinal study of plexiform fibroma growth in people with Neurofibromatosis. Poster at NNF Consortium for the Molecular Biology of *NF1*, *NF2*, and Schwannomatosis; Aspen, Colorado; 2005.

**Mautner VF, Asuagbor FA, Dombi E, Fünsterer C, Kluwe L, Wenzel R, Widemann BC, Friedman JM:** Assessment of benign tumor burden by whole-body MRI in patients with neurofibromatosis 1. *Neuro oncol*; 10(4):593-598; 2008.

**Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Yandell DW, Farmer GE, Freiman RN, Lee JK, Li FP, et al:** Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87:5435-5439; 1990.

**Mirams M, Robinson BG, Mason RS, Nelson AE:** Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate? *Bone*; 35:1192-1199; 2004.

**Nguyen TM, Lieberherr M, Fritsch J, Guillozo H, Alvarez ml, Fitouri Z, Jehan F, Garabédian M:** The rapid effects of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> require the VDR and influence 24-hydroxylase activity: studies in human skin fibroblasts bearing vitamin D receptor mutations. *J Biol Chem*; 279(9):7591-7597, 2004.

**Norman AW, Okamura WH, Hammond MW, Bishop JE, Dormanen MC, Bouillon R, van Baelen H, Ridall AL, Daane E, Khoury R, Farach-Carson MC:** Comparison of 6-s-*cis*- and 6-s-*trans*-Locked Analogs of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Indicates That the 6-s-*cis* Conformation Is Preferred for Rapid Nongenomic Biological Responses and That Neither 6-s-*cis*- nor 6-s-*trans*-locked Analogs Are Preferred for Genomic Biological Responses. *Mol Endocrinol*; 11(10):1518-1531; 1997.

**Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP:** Steroid hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Natl Rev Drug Discov*; 3:27-41; 2004.

**Norman AW:** Minireview: Vitamin D Receptor: New Assignments for an Already Busy Receptor. *Endocrinol*; 147(12):5542-5548; 2006.

**Omdahl JL, Gray RW, Boyle IT, Knutson J, DeLuca HF:** Regulation of metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by kidney tissue in vitro by dietary calcium. *Nat New Biol*; 237:63-64; 1972.

**Pálmer HG, Anjos-Afonso F, Carmeliet G, Takeda H, Watt FM:** The Vitamin D Receptor Is a Wnt Effector that Controls Hair Follicle Differentiation and Specifies Tumor Type in Adult Epidermis. *PLoS ONE*; 3(1):e1483; 2008.

**Peltonen J, Jaakkola S, Lebwohl M, Renvall S, Risteli L, Virtanen I, Uitto J:** Cellular differentiation and expression of matrix genes in type 1 neurofibromatosis. *Lab Invest*; 59:760-771; 1988.

**Pierre JV and Christensen EI:** Megalin and cubilin – the story of two multipurpose receptors unfolds. *Nephrol Dial Transplant*; 17:1867-1871; 2002.

**Rachez C und Freedmann LP:** Mechanism of gene regulation by vitamin D<sub>3</sub> receptor: a network of co-activator interactions. *Gene*; 246:9-21; 2000.

**Rasmussen SA, Overman J, Thomson SA, Colman SD, Abernathy CR, Trimpert RE, Moose R, Virdi G, Roux K, Bauer M, Rojiani AM, Maria BL, Muir D, Wallace MR:** Chromosome 17 loss-of-heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer*; 28(4):425-431; 2000.

**Reichrath J und Holick MF (ed.):** Clinical Utility of 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Its Analogs for the Treatment of Psoriasis and Other Skin Diseases. In: *Vitamin D Physiol, Mol Biol Clinical Applic.* Humana Press Totowa; NJ; 357-373; 1999.

**Rosenbaum C, Kluwe L, Mautner VF, Friedrich RE, Müller HW, Hanemann CO:** Isolation and characterization of Schwann cells from neurofibromatosis type 2 patients. *Neurobiol Dis*; 5:55–64; 1998.

- Saito H, Kusano K, Kinoshita M, Ito H, Hirata M, Segawa H, Miyamoto K, Fukushima N:** Human fibroblast growth factor-23 suppress  $\text{Na}^+$ -dependent phosphate co-transporter activity and  $1\alpha,25\text{-Dihydroxyvitamin D}_3$  production. *J Biol Chem*; 278:2206-2211; 2003.
- Schwartz GG, Oeler TA, Uskoković MR, Bahnson RR:** Human prostate cancer cell lines: inhibition of proliferation by vitamin D analogs. *Anticancer Res*; 14:1077-1081; 1994.
- Sitrin MD, Bissonnette M, Bolt MJ, Wali R, Khare S, Scaglione-Sewell B, Skarosi S, Brasitus TA:** Rapid effects of  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin  $\text{D}_3$  on signal transduction systems in colonic cells. *Steroids*; 64:137-142; 1999.
- Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D:** Vitamin D and prostate cancer:  $1,25$  dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  receptors and actions in human prostate cancer cell lines. *Endocrinol*; 132:1952-1960; 1993.
- Smith DC, Johnson CS, Freeman CC, Muindi J, Wilson JW, Trump DL:** A Phase I trial of calcitriol ( $1,25$ -dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res*; 5:1339-1345; 1999.
- Strugnell SA and Deluca HF:** The vitamin D receptor-structure and transcriptional activation. *Proceedings of the Society for Experimental Biol and Med*. 215:223 -228; 1997.
- Stumpf DA et al.:** Neurofibromatosis: Conference Statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol*; 45:575-578; 1988.
- Trahey M, McCormick F:** A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*; 238:542-545; 1987.
- Tucker T, Wolkenstein P, Revuz J, Zeller J, Friedman JM:** Association between benign and malignant peripheral nerve sheath tumors in *NF1*. *Neurol*; 65:205-211; 2005.
- Tucker T, Schnabel C, Hartmann M, Friedrich R, Frieling I, Kruse HP, Mautner VF, Friedman JM:** Bone Health and Fracture Rate in Individuals with *NF1*. *J Med Genet*; Epub; 2008.
- Tucker T, Friedman JM, Friedrich RE, Wenzel R, Fünsterer C, Mautner VF:** Longitudinal study of neurofibromatosis 1 associated plexiform neurofibromas. *J Med Genet*; 46(2):81-5; 2009.
- Valrance ME, Brunet AH, Welsh J:** VDR Dependent Inhibition of Mammary Tumor Growth by EB1089 and UV Radiation in vivo. *Endocrinol*; 148(10):4887-4894; 2007.
- Vieth R, Chan P-CR, MacFarlane GD:** Efficacy and safety of vitamin  $\text{D}_3$  intake exceeding the lowest observed adverse effect level. *Am J Clin Nutr*; 73:288-94, 2001.
- Viskochil D:** Genetics of neurofibromatosis 1 and the *NF1* gene. *J Child Neurol*; 17:562-572; 2002.
- Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA et al.:** Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*; 62:187-192, 1990.

**Weiss SW, Langloss JM, Enzinger FM:** Value of S-100 protein in the diagnosis of soft tissue tumors with particular reference to benign and malignant Schwann cell tumors. *Lab Invest* 49:299-308; 1983.

**Wu S, Finch J, Zhong M, Slatopolsky E, Grieff M, Brown AJ:** Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol*; 271:F203-F208; 1996.

**Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R et al.:** The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell*; 62:599-608, 1990.

**Xu G, Lin B, Tanaka K, Dunn D, Wood D, Gesteland R, White R, Weiss R, Tamanoi F:** The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell*; 63:835-841; 1992.

**Yamane T, Takeuchi K, Yamamoto Y, Li YH, Fujiwara M, Nishi K, Takahashi S, Ohkubo I:** Legumain from bovine kidney: its purification, molecular cloning, immunohistochemical localization and degradation of annexin II and vitamin D-binding protein. *Biochem Biophys Acta*; 1:108-120; 2002.

**Zhao XY, Ly LH, Peehl DM, Feldman D:** 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> actions in LNCaP human prostate cancer cells are androgen-dependent. *Endocrinol*; 138:3290-3298; 1997.



## 7 Annex

### 7.1 Ankürzungsverzeichnis

1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> /Calcitriol
AF-2	Activation Function 2
CAL	Café au lait-Flecke
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CRE	cAMP Responsive Elements
CaSR	Calcium Sensing Receptors
DBD	DNA Binding Domain
DBP	Vitamin D binding protein
DMSO	Dimethylsuloxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERp57	Endoplasmic Reticulum Protein 57 kDa
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF23	Fibroblast Growth Factor-23
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAP	GTPase aktivierenden Proteine
GIST	gastrointestinaler Stroma-Tumor
GRP58	Glucose Responsive Protein 58 kDa
HRG-β1	Recombinant Human Heregulin-β1 EGF Domain
IBMX	3-iso-Butyl-L-Methylxanthine
IDBP	intrazelluläre DBP
If	Immunfluoreszenz
JMML	Juvenile myelomonozytäre Leukämie
KNF	kutane Neurofibrome
LBD	Ligand Binding Domain
LNCaP	Lymph Node, Prostate Carcinoma
LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect level</i>
LRP2	Low Density Lipoprotein Related Protein 2

MARRS-Protein	1,25D <sub>3</sub> -Membrane-Associated Rapid Response Steroid-Binding Protein
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidentumor
mRNA	messenger RNA
NIH	National Institutes of Health
NF	Neurofibrom
<i>NF1</i>	Neurofibromatose Typ 1
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>
NPTIIa	Natrium-P <sub>i</sub> -Co-Transporter Typ IIa
OPG	Osteoprotegerin
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
Ph	Phasenkontrast
P <sub>i</sub>	Phosphat
PI-3	Phosphoinositol-3
PK	Proteinkinase
PTH	Parathormon
PNF	plexiforme(s) Neurofibrom(e)
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
RAP	Receptor-Associated Protein
RAS	Rat Sarcoma
RR	Rapid Response
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPV	Vanilloid-Type Family Member
UL	<i>Upper intake level</i>
VDDR	Vitamin D Dependent Rickets
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D Responsive Elements

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Diagnostische Kriterien einer NF1 im Kindesalter. Schematische Darstellung des zeitlichen Auftretens der Merkmale; in Anlehnung an JM Friedmann.
- Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung und Deaktivierung des Ras-Proteins mit den beteiligten Co-Faktoren: Guanosin-5'-Triphosphat (GTP), *Guanine Exchange Factors* (GEF), Guanosin-5'-Diphosphat (GDP), GTPase-aktivierende Proteine (GAP), aktiviertes Ras-Protein (Ras-GTP), deaktiviertes Ras-Protein (GDP-Ras). Bourne HR *et al.*, 1990, 1991, Johannessen CM *et al.*, 2005.
- Abb. 3: Angriffspunkt von Neurofibromin innerhalb der Ras-Signaltransduktionskaskade. Identifying Candidate NF Therapeutics. The Challenge and Opportunity. KHT/CTF, 2006.
- Abb. 4: Schematische Darstellung des Vitamin D<sub>3</sub>-Metabolismus. <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/otherendo/vitamind.html>, 13.01.2008.
- Abb. 5: Schematische Darstellung der funktionellen Struktur des Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptors. Strugnell SA and Deluca HF, 1997.
- Abb. 6: Übersicht der *Rapid Responses* im Rahmen der Vitamin D<sub>3</sub>-Wirkung. Norman AW, 2006.
- Abb. 7: Zu **A**: Logarithmische Darstellung des 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegels in Seren der 55 *NF1*-Patienten und 58 gesunden Kontrollpersonen (Lammert M *et al.*, 2006). Zu **B**: Boxplot des logarithmisch aufgetragenen 25-Hydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>-Spiegels über der Anzahl kutaner Neurofibrome der untersuchten *NF1*-Patienten (Lammert M *et al.*, 2006).
- Abb. 8 A-I: A-I: BrdU-Assays von MPNST- und Schwannzelllinien nach 6 Tagen Behandlung mit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Es wurden 1x10<sup>4</sup> bis 4x10<sup>4</sup> Zellen/ ml ausgesät und nach 24-48 Stunden mit 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und Analoga für 6 Tage inkubiert (Konzentration 10<sup>-11</sup> bis 10<sup>-6</sup> M). Nach dieser Zeit wurde die Proliferation anhand eines BrdU-Proliferations-Assays bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte prozentualen Zellzahl (n=24) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=4) über der Vitamin D-Konzentration aufgetragen. Die doppelte Standardabweichung 2 σ ist für jede Reihe und Konzentration angegeben. Ulbricht U *et al.*, 2005.

- Abb. 9: BrdU-Assays von LNCaP-Zellen, die als Positivkontrolle für den Hemmproliferationsversuch mittels  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  verwendet wurden. Bestimmung der Zellproliferation nach 6tägiger Behandlung mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Es wurden  $1 \times 10^4$  bis  $4 \times 10^4$  Zellen/ml gesät und nach 24-48 Stunden mit  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  6tägig inkubiert (Konzentration  $10^{-11}$  bis  $10^{-6}$  M). In der Abbildung wurde die mittlere prozentuale Zellzahl (n=12) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=4) (ohne Vitamin  $\text{D}_3$ -Zusätze, entspricht 1,0) über der Vitamin  $\text{D}$ -Konzentration aufgetragen. Die doppelte Standardabweichung  $2 \sigma$  wurde für jede Versuchsreihe angegeben.  
Ulbricht U *et al.*, 2005.
- Abb. 10 A-F: A, B: Bildung sogenannter runder Zellaggregate in den ersten zwei Passagen von Schwanzzellkulturen. C, D: Ausschnitte eines konfluenten Zellrasens zum Ende der dritten Passage. E, F: S100-Einfachfärbung (grün, Primärantikörper 1:200) in normaler Schwanzzellkultur (E) und in Kultur mit sehr hohem Fibroblastenanteil (F), Kernfärbung mittels DAPI.
- Abb. 11 A-F: A-F: Absteigende Verdünnungsreihe des anti-humanen VDR-Primärantikörpers (grün) in der Zelllinie 1519,3, p3. Verdünnungsschritte sind 1:1000 (A), 1:800 (B), 1:400 (C), 1:200 (D) und 1:100 (E). Für die Zellen (und Negativkontrolle, F) wurde eine Kernfärbung mittels Propidium Iodid (rot) durchgeführt.
- Abb. 12: A-D: Immunzytologische VDR-Färbung (grün) mit dem Primärantikörper in der Verdünnung 1:200. Auf dieser Verdünnungsstufe weisen die getesteten Zelllinien die größten Unterschiede bezüglich des Verteilungsmusters und der Menge der Signale auf. Kernfärbung mittels Propidium Iodid (rot).
- Abb. 13: A, B: Immunhistochemische VDR-Färbung der Zelllinie 1459,1 und 1432 (Primärantikörper 1:200). Nova Red wurde als Sekundärantikörper eingesetzt. Die VDR-Färbung manifestierte sich fast ausschließlich im Zellkern.
- Abb. 14: A-D: Immunzytologische (A, rot) und immunhistochemische (B-D) VDR-Färbung an Material aus Prostata-Karzinometastasen (Primärantikörper 1:200). Die Zellen reagierten deutlich. Die Färbung war kräftig diffus im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert. Im Gewebe lagen die positiven Zellen zwischen negativen Gewebeanteilen in Inseln zusammen.
- Abb. 15: A-F: VDR-immunzytologische VDR-Färbung (rot) an vier MPNST-Zelllinien (Primärantikörper 1:200).

- Abb. 16: A-E: Immunhistochemische VDR-Färbung an Gewebeschnitten aus den MPNST S805 und S1268,1 (Primärantikörper 1:200). Die gefärbten Zellen gruppieren sich flächig und inselförmig zwischen ungefärbten Gewebsanteilen. Bei Inspektion der Zellen manifestierte sich die Färbung vornehmlich nukleär (S805) oder im Zytoplasma (S1268,1). Es wurde mit Hämalaun gegengefärbt.
- Abb. 17: A, B: Immunhistochemische VDR-Färbung an Gewebeschnitten aus den MPNST der Zelllinie S462 und S1520 (Primärantikörper 1:200). Die Gewebe zeigten keine Farbreaktion. Es wurde mit Hämalaun gegengefärbt.
- Abb. 18: A, B: Immunzytologische VDR-Färbung (rot, Primärantikörper 1:200) der Zelllinien 1528,7 und 1532,2. Die Zellen weisen ein nukleäres (A) und zum Teil zusätzlich zytoplasmatisches (B) Signal auf. Kernfärbung mittels DAPI. C: Immunzytologische VDR- (rot) / S100- (grün) Doppelfärbung der Zelllinie 1530,4 (Primärantikörper 1:200). Kernfärbung mittels DAPI. D: Zellen aus C im Phasenkontrast. E: Immunhistochemische VDR-Färbung des Gewebes aus dem Tumor 1528,7, das als einziges von neun Geweben sehr schwach positiv reagiert hat. Gegenfärbung mit Hämalaun.
- Abb. 19: Darstellung des VDR-Färbequotienten (0-3) kultivierter Schwanzzellen über Vit. D<sub>3</sub>-Konzentration [ $\mu\text{g/l}$ ] der zugehörigen Patienten. PNF und KNF sind einzeln dargestellt.
- Abb. 20: Darstellung des Serum-25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [nmol/l] über der Vitamin D<sub>3</sub>-Aufnahmedosis [IU/d] (Hathcock *et al.*, 2007). Runde Markierungen stellen die Ergebnisse aus Studien zu diesem Thema bis 2007 dar. Markierungen mit einem "x" repräsentieren Probanden mit Vitamin D<sub>3</sub>-Intoxikationen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert 600 nmol/l 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, ab welchem mit Hypercalcämien zu rechnen ist.

### **7.3 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. V.-F. Mautner und Frau Dr. habil. L. Kluwe für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit im Labor der ZMKG-Klinik diese Arbeit durchzuführen. Ich möchte mich für die freundliche Unterstützung bedanken, die mir im Rahmen der Doktorarbeit zuteil wurde.

Herrn Prof. Dr. C. Hagel aus der Neuropathologie des UKE für die Überlassung der Paraffinschnitte der Tumoren und Beantwortung meiner Fragen sowie Bereitstellung des Lichtmikroskops und zugehöriger Kamera.

Frau Dr. M. Demestre für Diskussionen und Ratschläge.

Frau Dr. U. Ulbricht für die Einarbeitung und Betreuung.

Frau J. Knoblauch für Hilfe und Erklärungen.

Frau Orth für Hilfe und Erklärungen.

Frau Dr. J. Brandner und Frau E. Wladykowski aus der Dermatologie des UKE für die Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops. Frau E. Wladykowski für die Einführung in den Gebrauch des Fluoreszenzmikroskops und in die Methoden der Immunhistochemie.

Mama, Papa und Anh Cuong für ihre Unterstützung.

## **7.4 Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.