Prehľad vplyvu polymorfizmov receptora vitamínu D na vznik a progresiu malígneho melanómu

Effect of Vitamin D Receptor Polymorphisms on the Development and Progression of Malignant Melanoma

Špaková I.¹, Bilecová-Rabajdová M.¹, Zabavníková M.², Urban P.¹, Mareková M.¹

¹ Ústav lekárskej a klinickej biochémie LF UPJŠ a LABMED, a. s., Košice

² Klinika plastickej, rekonštrukčnej a estetickej chirurgie LF UPJŠ a UN LP Košice

Súhrn

Východiská: Malígný melanóm patrí k najzhubnejším nádorovým ochoreniam zo všetkých nádorov kože mužov aj žien. Pravdepodobnosť vzniku malígneho melanómu závisí od vplyvu vonkajších faktorov a vzájomnej deregulácii interakcií genotypu a fenotypu. V súčasnosti sa čoraz väčšia pozornosť venuje štúdiu interakcií aktívnej formy vitamínu D₃ s receptorom, ako aj inhibičnému účinku polymorfizmov receptora vitamínu D₃ na viaceré signálne dráhy zapojené do proliferčných a metastatických procesov. **Ciele:** Táto prehľadová práca sa zameriava na popísanie vzťahu medzi faktormi, ktoré pôsobia na vznik malígneho melanómu ovplyvnením Hedgehog signálnej dráhy (HH). Sumarizuje súčasné poznatky zaoberajúce sa malígnym melanómom v spojení s úlohou aktívnej formy vitamínu D₃ pri väzbe na receptor vitamínu D₃ (VDR) a vplyvu polymorfizmov VDR na inhibíciu HH. Pochopenie daných mechanizmov a kritické zhodnotenie poznatkov sú dôležité pre aplikáciu primárnej, ako aj sekundárnej prevencie, respektíve pri použití chemopreventívnych látok vhodných pre predchádzanie vzniku malígneho melanómu.

Kľúčové slová

vitamín D₃ – Hedgehog signalizácia – melanóm – calcitriol – rakovina kože

Summary

Background: Malignant melanoma is one of the most aggressive cutaneous tumors in men and women. The risk of developing a malignant melanoma depends on several external factors along with deregulation of mutual interaction of genotype and phenotype. Nowadays, growing attention is focused on the study of the interactions of the active form of vitamin D₃ with its receptor and inhibitory effect of vitamin D₃ receptor polymorphisms on multiple signaling pathways involved in proliferative and metastatic processes. **Objectives:** This review article addresses the relationship between factors involved in the development of malignant melanoma through Hedgehog signaling pathway (HH). It summarizes current knowledge of malignant melanoma in regard to the role of the active form of vitamin D₃ binding to vitamin D₃ receptor (VDR), as well as it describes the influence of polymorphisms of VDR on the inhibition of HH. Understanding of these mechanisms and critical assessment of available data is beneficial to both primary and secondary prevention of malignant melanoma particularly by means of chemo-preventive substances.

Key words

vitamin D₃ – Hedgehog signalisation – melanoma – calcitriol – skin cancer

Táto práca bola podporená grantom DIAG-ONKO ITMS: 26220220153.

This work was supported by the grant DIAG-ONKO ITMS: 26220220153.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

Mgr. Peter Urban, Ph.D.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie
LF UPJŠ a LABMED, a. s.

Trieda SNP 1

040 01 Košice

e-mail: peter.urban@upjs.sk

Obdrženo/Submitted: 21. 12. 2013

Přijato/Accepted: 25. 2. 2014

Úvod

Malígne tumory sú v súčasnosti jednou z hlavných príčin úmrtnosti vo svete, pričom onkologické ochorenia kože patria k najbežnejším typom rakoviny v ľudskej populácii [1]. Karcinómy kože môžeme rozdeliť na niekoľko typov podľa pôvodu nádoru, a to na bazocelulárny karcinóm (basal cell carcinoma – BCC), malígny melanóm (malignant melanoma – MM) a spinalióm. Malígny melanóm patrí k najzhubnejším nádorovým ochoreniam zo všetkých nádorov kože mužov aj žien a je zastúpený v 2 % zo všetkých kožných nádorov s potvrdenou 75–90% mortalitou [2,3]. Malígny melanóm sa najčastejšie vyskytuje na koži (až 95 % zo všetkých prípadov), ale môže byť klinicky manifestovaný v oku pacienta a v minoritných prípadoch môže byť lokalizovaný na vnútorných slizniciach (napr. sliznica rekta, ústna, vaginálna sliznica) [4–6].

Pravdepodobnosť vzniku MM závisí na vplyve vonkajších faktorov a vzájomnej deregulácii interakcií genotypu a fenotypu. Hlavným environmentálnym faktorom vzniku MM je expozícia ultrafialovému žiareniu (UV). Rozoznávame niekoľko typov UV v závislosti od vlnovej dĺžky. Žiarenie UVA, s vlnovou dĺžkou 315–400 nm, preniká do hlbokých vrstiev kože, poškodzuje DNA a urýchľuje jej starnutie. Najviac interaguje s melanocytmí, indukuje tvorbu melanínu, stimuluje fotosenzibilné a fototoxické reakcie. Množstvo žiarenia UVA je v priebehu dňa konštantné. Žiarenie UVB s vlnovou dĺžkou 280–315 nm, tvorí cca 10 % z celkového slnečného UV žiarenia. Je absorbované pokožkou a pô-

sobí priamo na DNA, no vo väčšej miere škodí nepriamo, oxidačným stresom cez kyslíkové radikály [5]. Celkový účinok absorbovaného UVA a UVB je kumulatívny [5]. Kombinácia genetickej predispozície, kožného fenotypu a následnej expozície kože tak prirodzenému, ako aj umelému UV žiareniu, je hlavnou príčinou vzniku melanómu [6].

Slnečné žiarenie UVB nielen stimuluje karcinogenézu cez mutagenézu a imunosupresiu, ale tiež zvyšuje hladinu kožného vitamínu D_3 , ktorý následne blokuje Hedgehog signálnu dráhu (HH) a pravdepodobne inhibuje proliferáciu rakovinových buniek melanocytov. Tento mechanizmus by mohol viesť aspoň k čiastočnému objasneniu priameho vzťahu medzi vystavením sa slnečnému žiareniu a rizikom vzniku MM.

Genetické faktory podmieniajú pozitívnu rodinnú anamnézu, fototyp, hustotu a atypickosť kože, a patria k veľmi významným rizikovým faktorom vývoja melanómu. Konkrétnym genetickým abnormalitám (mutácie DNA opravných génov, polymorfizmy receptora vitamínu D) sa v súčasnosti venuje veľká pozornosť pri skúmaní príčinných súvislostí vzniku MM.

Dôležitú úlohu, pri odhaľovaní malígneho melanómu, dynamiky ochorenia, kontroly účinnosti liečby, respektíve perzistencie či recidívy, zohráva v klinickej praxi predovšetkým včasná diagnostika. Skvalitnenie diagnostiky je nevyhnutné pri pochopení súvislostí medzi faktormi, ktoré pôsobia na vznik MM ovplyvnením Hedgehog signálnej dráhy, a preto sa za-

meriavame na prehľad súčasných poznatkov zaoberajúcich sa MM v spojení s úlohou aktívnej formy vitamínu D_3 pri väzbe na receptor vitamínu D_3 (VDR) a vplyvu polymorfizmov VDR na inhibíciu HH. Pochopenie a kritické zhodnotenie poznatkov sú dôležité pre aplikáciu tak primárnej, ako aj sekundárnej prevencie, respektíve pri použití chemopreventčných látok (napr. vitamín D, C, E, betakaroténu) vhodných pre predchádzanie vzniku MM.

Vitamín D_3 a väzba na VDR

Vitamín D, tzv. slnečný vitamín, je dobre známy svojou rozpustnosťou v tukoch. Má pleiotropický efekt na metabolizmus vápnika, fosforu, reguluje bunkový cyklus a apoptózu, stimuluje diferenciáciu rakovinových buniek v tumorových tkanivách, stimuluje angiogenézu, imunomoduláciu, má chemopreventívny účinok a podieľa sa na antibakteriálnej aktivite [7]. V posledných rokoch sa zdôrazňuje jeho vplyv na imunitný systém. Je preukázané, že zvyšuje aktivitu natural killer (NK) buniek, fagocytárnu schopnosť makrofágov a znižuje riziko vzniku viróz. Tieto vlastnosti vitamínu D sú ovplyvňované fotosenzibilitou kože, hladinou $1\alpha,25(OH)_2D_3$ v sére, ako aj funkciou signifikantných polymorfizmov na VDR géne [8].

Aktívna forma vitamínu D ($1\alpha,25(OH)_2D_3$, kalcitriol) sa viaže na VDR, ktorý je lokalizovaný v jadre buniek (obr. 1).

Okrem kostí bol tento receptor potvrdený vo väčšine orgánov (napr. koža, mozog, srdce, obličky, prištítna telieska, tenké a hrubé črevo, NK bunky), čo pou-

Obr. 1. Porovnanie štruktúry neaktívnej (cholecalciferol) a aktívnej formy vitamínu D_3 (kalcitriol).

kazuje na široké spektrum využitia s cieľom na ovplyvnenia veľkého množstva analytov tak za fyziologických, ako aj patologických stavov organizmu.

Naviazanie vitamínu D_3 na VDR vyúsťuje do transkripcie génov, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v inhibícii mitogénom aktivovanej proteín kinázy (MAPK) signalizácie. Aktivácia MAPK signalizácie indukuje disociáciu extracelulárnym signálom indukovaných kináz 1 a 2 (extracellular-signal-regulated kinases – ERK1/2) z kinázového komplexu, ktorý následne reguluje expresiu viacerých génov zapojených do bunkovej proliferácie, diferenciácie a prežívania, a to buď priamo, fosforyláciou nukleárných transkripcčných faktorov napr. ELK-1, MYC [9], alebo nepriamo ovplyvnením intracelulárných signálnych molekúl napr. p90-RSK [10]. MAPK tiež ovplyvňuje posttranslačnú fosforyláciu apoptotických regulačných molekúl, napr. BAD, BIM, MCL-1 a BCL-2 [11].

Bolo identifikované množstvo VDR polymorfných úsekov v DNA, ktoré sa priamo alebo nepriamo podieľajú na imunodeficientných ochoreniach úzko súvisiacich s hladinou vitamínu D. Vzájomný vzťah VDR polymorfizmov s rakovinou kože je popísaný v súvislosti nielen s iniciáciou karcinogenézy, ale aj ovplyvnením invazivity melanómovej malignity, a tým celej prognózy ochorenia.

Gén pre VDR pozostáva z vyše 1 000 polymérnych častí lokalizovaných na chromozóme 12q12-14 [12]. VDR gén zahŕňa dva regióny promótorov, osem proteín kódujúcich exónov (2–9) a šesť nepreložených exónov (1a–1f) [12]. Takto rozsiahly promótorový región má schopnosť generovať mnohopočetné tkanivovo-špecifické transkripty, pričom niektoré z nich majú vplyv aj na vznik melanómov. Najviac preštudované fragmenty polymorfizmov o rozdielnych dĺžkach sú rs10735810 (T > A nukleotidová zmena v *FokI* reštrikčnom mieste), rs1544410 (G > A v *BsmI*) a rs731236 (T > C v *TaqI*). Napríklad výskyt alely rs10735810 A (*FokI* alela) a rs1544410 A alely (*BsmI* alela) zvyšuje riziko vzniku malígneho melanómu, zatiaľ čo alela rs731236 C (*TaqI* alela) bola identifikovaná ako predispozícia zníženého

Obr. 2. Vplyv VDR receptora na orgánové systémy.

výskytu MM. Alela A rs4516035 (A > G výmena v *EcoRV* reštrikčnom mieste) je prezentovaná ako alela zvýšeného melanómového rizika. Na druhej strane, nebolo pozorované žiadne prepojenie medzi dĺžkou reštrikčného fragmentu polymorfizmu rs7975232 (G > T záměna v *Apal* reštrikčnom mieste), podobne ako rs11568820 (G > A výmena v *Cdx2* väzbovom mieste) a rizikom vzniku MM [7].

Prepojená nerovnováha medzi niektorými z VDR polymorfizmov a zvýšeným rizikom vzniku melanómov bola popísaná pre polymorfizmy vitamínu D – *TaqI*, *FokI* a *BsmI*. Reštrikčná oblasť *TaqI* je silne prepojená s nerovnováhou poly(A) polymorfizmu [7]. Halsall et al [13] identifikovali kombinovaný efekt melanómového rizika A alely v *EcoRV* (A-1012G) polymorfizme s alelou vo *FokI* polymorfizme. Podobne progresia melanómu by mohla byť klasifikovaná detekciou v signalizácii vitamínu D, založenej na znížení expresie VDR [14]. Analýza expresie VDR a polymorfizmov, môže poskytnúť veľmi

potrebné informácie ešte pred terapeutickou intervenciou melanómov vitamínom D a jeho analógmi, čím by prispela aj k predikcii a následnému zlepšeniu prognózy ochorenia.

Vzájomná asociácia polymorfizmov receptora aktívnej formy vitamínu D_3 (VDR) so vznikom, respektíve stimuláciou vzniku melanómov, nie je v dnešnej dobe popísaná. Veľmi málo opublikovaných vedeckých prác popisuje, že samotný receptor vitamínu D_3 bez $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ligandu môže mať rovnaký stimulačný účinok na karcinogénezu. VDR bez $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ligandu pôsobí cez WNT signalizáciu (wingless-type signaling pathway), ktorá má dôležitú funkciu v HH signalizačnej dráhe melanocytov [15]. Opačnú úlohu zastáva ligandom $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aktivovaný vysokoexprimovaný VDR, na ktorý sa v rakovinových bunkách viaže kalcitriol (aktívny vitamín D_3) a tým aktivuje anti-tumorovú signalizačnú dráhu s dokázanými anti-proliferatívnymi účinkami na rakovinové bunky [16,17].

Molekulový mechanizmus aktivácie VDR

Hormonálne aktívna forma vitamínu D₃ je pomocou vitamínu D viažuceho proteínu (DBP) transportovaná do cieľových tkanív s príslušným receptorom. VDR je hlavná štrukturálna doména nukleárneho receptora s vysoko zachovaným DNA väzbovým regiónom a ligand-väzbovou doménou. Vzniknutá väzba indukuje heterodimerizáciu VDR a retinoidného X receptora (RXR), čím vplyva na spustenie kaskády, ktorá vedie k zmenám v expresii génov pozostávajúcich z vitamínu D citlivých elementov v ich promótoch (VDREs).

VDR patrí do superrodiny transaktivačných transkripčných regulačných faktorov, ktoré zahŕňajú steroidné a tyroidné hormonálne receptory. Aktívna forma vitamínu D po väzbe na VDR aktivuje cieľovú génovú expresiu počas transkripcie [18,19]. VDR po aktivácii vytvára viaceré formy homodimérov alebo heterodimérov s jedným z troch retinoidných X receptorov (RXR) – RXRα, RXRβ, RXRγ. Súčasne vzniká VDR homodimérna alebo VDR-RXR heterodimérna väzba (obr. 2) na špecifické zosilňovače expresie, nazývané vitamín-D-citlivé elementy (vitamin D response elements – VDREs).

Ligandom indukovaná transaktivácia pomocou VDR je nevyhnutná pre formovanie iniciačného transkripčného komplexu s RNAPolymerázou II [20]. Kalcitriol tak priamo alebo nepriamo reguluje vyše 200 génov bunkovo- a tkanivovo-špecifickým spôsobom. V súčasnosti sa čoraz väčšia pozornosť venuje štúdiu interakcii aktívnej formy vitamínu D₃ s VDR a ich inhibičný vplyv na Hedgehog signálnu dráhu.

Vplyv kalcitriolu na Hedgehog signálnu dráhu

Táto signálna dráha sa podieľa na vzniku a manifestácii niekoľkých typov ľudských tumorov, vrátane karcinómu bazálnych buniek a MM. Z počiatku bola identifikovaná ako základná iniciačná dráha vo vývoji buniek, ale v poslednej dobe je viac vnímaná ako potenciálne zaujímavý stimulátor karcinogenézy. K narušeniu HH signalizácie dochádza v dôsledku mutácií génov kódujúcich

komponenty signalizačnej dráhy, alebo zvýšenou produkciou ligandov v tumoroch, ale aj v bunkách väzivového tkaniva [21–23].

Bijlsma et al [24] popisujú novú biologickú funkciu kalcitriolu v potláčaní HH signalizácie v *in vitro* modelovom systéme. Kalcitriol blokuje proliferáciu a HH signalizáciu cez inkorporáciu do mRNA expresiou génu *GLI1*. Efekt vitamínu D₃ na *GLI1* expresiu a na bunkovú proliferáciu je porovnateľný s efektom cyklopamínu, ktorý je známym inhibítorom HH dráhy. Tento účinok je špecifický pre aktívnu formu vitamínu D₃, pretože jeho prekursor, cholekalciferol a jeho produkt 25-hydroxycholecalciferol sú podstatne menej efektívne v inhibícii produkcie mRNA pre *GLI1* a tým znižovaní bunkovej proliferácie. V súčasnosti sú terapeutické aplikácie vitamínu D na MM závislé na expresii *GLI1* a *Ki67*.

Najviac študovaným mechanizmom efektov vitamínu D₃ je 1α,25(OH)₂D₃ (kalcitriolom)-indukovaná transkripčná aktivácia VDR, následkom ktorej dochádza k zmenám v bunkovom správaní, ktoré je založené na stimulácii diferenciácie a redukcii proliferácie kožných keratocytov [25,26]. Bijlsma et al [24] dokázali špecifický spôsob viazania sa kalcitriolu do oblasti SMO (smoothened homolog) v dôsledku čoho nastáva inhibícia expresie *GLI1* [27]. Bijlsma et al [24] taktiež identifikovali anti-HH efekt kalcitriolu, ktorý je nezávislý na VDR a navrhli nehydroxylovaný vitamín D₃ ako možné terapeutikum na inhibíciu karcinogenézy.

Záver

Farmakologické využitie kalcitriolu môže nájsť využitie ako blokátor proliferácie rakovinových buniek *in vitro* a proliferácie tumorov *in vivo*. U kalcitriolu a jeho analógov bol popísaný prevenčný a inhibičný účinok na onkologické ochorenia. Aktívna forma vitamínu D₃ je jedným z najužitočnejších nástrojov, ktoré máme k dispozícii pre zlepšenie celkového zdravotného stavu, keďže ovplyvňuje vitalitu organizmu v mnohých smeroch. Je nutné mať na zreteli, že príliš vysoká hladina kalcitriolu môže mať aj negatívne účinky so sprievodnou patológiou vzhľadom na vzniknutú hy-

perkalciémiu a hyperkalciúriu, ktoré tak ohroviujú farmakologické využitie kalcitriolu ako terapeutického prostriedku v limitnej forme.

Literatúra

1. Grimaldi AM, Cassidy PB, Leachmann S et al. Novel approaches in melanoma prevention and therapy. *Cancer Treat Res* 2014; 159: 443–455. doi: 10.1007/978-3-642-38007-5_25.
2. Kappelmann M, Bosserhoff A, Kuphal S. AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol* 2014; 93(1–2): 76–81. doi: 10.1016/j.jecb.2013.10.003.
3. Bosserhoff A (ed.). *Melanoma development molecular biology, genetics and clinical application*. Springer 2011: 376.
4. Havránková M. Záhyt dermatologických malignít v ambulancií praktického lekára. *Via pract* 2007; 4(5): 244–246.
5. Krajsová I. Melanom. In: Krajsová I (ed.). *Melanom*. Maxdorf 2006.
6. Polsky D, Cordon-Cardo C, Houghton A. 19. Molecular biology of melanoma in the molecular basis of cancer. 2nd ed. Mendelson J et al. Elsevier Inc 2001.
7. Szyska P, Zmijewski MA, Slominski AT. New vitamin D analogs as potential therapeutics in melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2012; 12(12): 585–599. doi: 10.1586/era.12.40.
8. Gandini S, Raimondi S, Gnagnarella P et al. Vitamin D and skin cancer: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009; 45(4): 634–641. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.003.
9. Madhunapantula SV, Robertson GP. Is B-Raf a good therapeutic target for melanoma and other malignancies? *Cancer Res* 2008; 68(1): 5–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2038.
10. Gollob JA, Wilhelm S, Carter C et al. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol* 2006; 33(4): 392–406.
11. Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y et al. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (review). *Int J Oncol* 2009; 34(6): 1481–1489.
12. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M et al. Cloning the expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(10): 3294–3298.
13. Halsall JA, Osborne JE, Potter L et al. A novel polymorphism in the 1A promoter region of the vitamin D receptor is associated with altered susceptibility and prognosis in malignant melanoma. *Br J Cancer* 2004; 91(4): 765–770.
14. Essa S, Denzer N, Mählknecht U et al. VDR microRNA expression and epigenetic silencing of vitamin D signaling in melanoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121(1–2): 110–113. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.003.
15. Palmer HG, Anjos-Afonso F, Carmeliet G et al. The vitamin D receptor is a wnt effector that controls hair follicle differentiation and specifies tumor type in adult epidermis. *PLoS One* 2008; 3(1): 1483. doi: 10.1371/journal.pone.0001483.
16. Ishibashi M, Arai M, Tanaka S et al. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of lipophilic vitamins on human melanoma A375 cells *in vitro*. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(1): 10–17.
17. Essa S, Reichrath S, Mählknecht U et al. Signature of VDR miRNAs and epigenetic modulation of vitamin D signaling in melanoma cell lines. *Anticancer Res* 2012; 32(1): 383–389.
18. Haussler MR, Whitfield GK, Haussle CA et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13(3): 325–349.

19. Darwish H, DeLuca HF. Vitamin D-regulated gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1993; 3(2): 89–116.
20. Freedman LP. Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signalin. *Cell* 1999; 97(1): 5–8.
21. Nolan-Stevaux O, Lau J, Morgan L et al. GLI1 is regulated through Smoothened independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev* 2009; 23(1): 24–36. doi: 10.1101/gad.1753809.
22. Wang Y, McMahon AP, Allen BL. Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19(2): 159–165.
23. So PL, Fujimoto MA, Epstein EH Jr. Pharmacologic retinoid signaling and physiologic retinoic acid receptor signaling inhibit basal cell carcinoma tumorigenesis. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(5): 1275–1284. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2043.
24. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D et al. Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *Plos Biol* 2006; 4(8): e232.
25. Bikle DD. Vitamin D receptor, UVR, and skin cancer: a potential protective mechanism. *J Invest Dermatol* 2008; 128(10): 2357–2361. doi: 10.1038/jid.2008.249.
26. Holick MF. Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2006; 354(21): 2287–2288.
27. Tang JY, Xiao TZ, Oda Y et al. Vitamin D3 inhibits hedgehog signaling and proliferation in basal cell carcinomas. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4(5): 744–751. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0285.