

Die Rolle des
Presenilin 1 Gens
in embryonalen Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von Judith Martha Renate Lehmann-Koch geb. Lehmann
aus Köln

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Pietsch
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Bode

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.11.2008

Aus dem Institut für Neuropathologie
Medizinische Einrichtungen der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. T. Pietsch

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Glossar	8
2	Einleitung	13
2.1	<i>Presenilin 1</i>	13
2.1.1	<i>Presenilin 1</i> -Transkriptionsprodukt	13
2.1.2	<i>Presenilin 1</i> -Protein	13
2.1.3	Notch-Signalweg	17
2.1.4	WNT-Signalweg	19
2.1.5	<i>Presenilin 1</i> als Inhibitor des WNT-Signalweges	21
2.1.6	β -Catenin und Tumorigenese	22
2.1.7	Zielgene und Inhibitoren des WNT-Signalweges	23
2.2	Das Hepatoblastom	24
2.2.1	Definition	24
2.2.2	Epidemiologie	24
2.2.3	Lokalisation	24
2.2.4	Klinische Merkmale	24
2.2.5	Makroskopie	25
2.2.6	Tumorwachstum	25
2.2.7	Histologie	26
2.2.8	Genetische Prädispositionen	27
2.2.9	Molekulargenetische Aspekte	27
2.2.10	Prognose und prädiktive Faktoren	27
2.3	Das Medulloblastom	28
2.3.1	Definition	28
2.3.2	Epidemiologie	28
2.3.3	Lokalisation	28
2.3.4	Klinische Merkmale	28
2.3.5	Makroskopie	28
2.3.6	Mikroskopie	29
2.3.7	Genetische Prädispositionen	29
2.3.8	Zytogenetische Aspekte	30
2.3.9	Molekulargenetische Aspekte	31
2.4	Ziele dieser Arbeit	32
3	Material und Methoden	33
3.1	Untersuchungskollektiv	33

3.1.1	Medulloblastomkollektiv	33
3.1.2	Hepatoblastomkollektiv	37
3.2	Isolierung von DNA	39
3.2.1	Isolierung von genomischer DNA aus Leukozyten	39
3.2.2	Isolierung von genomischer DNA aus Tumor- und Normalgewebe	40
3.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	40
3.4	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.5	Mutationssuche mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP)	42
3.5.1	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	46
3.5.2	Isolierung der aberrant laufenden Banden aus dem SSCP-Gel und Reamplifizierung durch PCR	47
3.5.3	Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung	47
3.6	DNA-Sequenzierung	48
3.7	Deletionssuche mit Hilfe des PCR- und RT-PCR-Verfahrens	50
3.7.1	DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Aufreinigung mit dem QIAquick Gel-Extraktions-Kit	51
3.8	Isolierung von RNA	52
3.8.1	Isolierung von total zellulärer RNA mit Trizol	52
3.8.2	Behandlung der RNA mit DNase I	53
3.9	Synthese von cDNA	53
3.10	Kompetitive RT-PCR (cRT-PCR) zur Quantifizierung von Gentranskripten	54
3.10.1	Herstellung der exogenen Kompetitor-RNA-Moleküle	54
3.10.2	Semiquantitative RT-PCR	57
3.10.3	Auswertung der Rohdaten	58
3.11	Western-Blot-Analyse	58
3.12	Zellkultur	62
3.13	Herstellung von Zelllysaten	63
3.14	Transformation chemisch-kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	65
3.15	Co-Transfektion von Zelllinien mit Plasmid-DNA und dem Dual-Luciferase Reportersystem	66
3.16	RNA-Extraktion nach Stimulation des WNT-Signalweges	67
3.17	Proliferationsanalyse unter Verwendung von <i>Nicastrin</i> -spezifischer RNAi	68
3.18	³ H-Thymidin-Inkorporations-Assay	69
3.19	Proliferationsanalyse unter Verwendung eines γ -Sekretase-Inhibitors	69
4	Ergebnisse	71
4.1	Ergebnisse der Mutationsanalyse	71
4.2	Ergebnisse der Deletionssuche	73
4.3	Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse	74
4.3.1	<i>Presenilin 1</i> -Expression in Medulloblastomen	74

4.3.2	Überexpression von <i>Presenilin 1</i> in Hepatoblastomen	77
4.4	Inhibition des WNT-Signalweges in Medulloblastomzellen nach Cotransfektion eines <i>PS1</i> -Expressionsplasmides und eines Dual-Luciferase-Reporter-Systems	80
4.5	Bestimmung der <i>Presenilin 1</i> -Expression in Medulloblastomzelllinien nach Stimulation des WNT-Signalweges mit Wnt 3a	81
4.6	Proliferationsanalyse unter Verwendung von <i>Nicastrin</i> -RNAi	81
4.7	Proliferationsanalyse unter Verwendung eines γ -Sekretase-Inhibitors	84
5	Diskussion	89
5.1	Presenilin 1 und der WNT-Signalweg	89
5.1.1	Mutationsanalyse des <i>Presenilin 1</i> -Genes	89
5.1.2	Expressionsanalyse des <i>Presenilin 1</i>	90
5.1.3	<i>Presenilin 1</i> als Zielgen und Inhibitor des WNT-Signalweges	91
5.1.4	Zelluntergang von Medullo- und Hepatoblastomzelllinien nach Transfektion mit <i>Nicastrin</i> RNAi	93
5.2	<i>Presenilin 1</i> und der Notch-Signalweg	94
5.2.1	Proliferationsanalyse unter Verwendung des γ -Secretase-Inhibitor L685.458	95
6	Zusammenfassung	97
7	Literaturverzeichnis	98
A	Danksagung	116

1 Glossar

A

A	adenosin
Abb.	Abbildung
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
AFP	Alpha-Fetoprotein
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
Aph-1	P4-tetraphosphate asymmetrical hydrolase
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure

B

bp	Basenpaare
----	------------

C

C	cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CK1	casein kinase 1
cm	Centimeter
c-myc	cellular myc
CoR	corepressor
cRT	competitive reverse transcriptase
CSL	cerebellar soluble lectin
CT	Computertomografie
CTF	COOH-terminales Fragment

D

dATP	deoxyadenosintriphosphate
dCTP	deoxycytidintriphosphate
DEPC	diethylpyrocarbonat

dGTP	deoxyguanidintriphosphate
Dkk-1	dickkopf-1
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotidetriphosphate
Dsh	dishevelled
DTT	dithiothreitol
dTTP	deoxythymidintriphosphate
DTX	deltex

E

ECL	enzymatic chemiluminescence
ECN	notch extracellular domain
EDTA	ethylendiamintetraacid

F

f	femto (10^{-15})
FAP	familiar adenomatosis polyposis
FNG	fringe

G

G	guanin
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskonstante
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
GSK-3 β	glykogen synthetase kinase-3 β

H

h	Stunde
HBL	Hepatoblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HRP	horseradish peroxidase

I

I-Clip	intramembrane cleaving protease
ICN	notch intracellular domain

Itf-2 inducible transcription factor 2

J

Jnk c-Jun N-terminal kinase

K

kb Kilobase

kDa Kilodalton

L

l Liter

LDS lithium dodecyl sulfate

Lef lymphoid enhancer factor

LOH loss of heterozygosity

M

m Milli 10^{-3}

M Molar

m männlich

MBL Medulloblastom

min Minuten

μ micro, 10^{-6}

mM milli Molar

m-RNA messenger ribonucleic acid

MRT Magnetresonanztomografie

MW Mittelwert

MYCN myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived

N

n Nano 10^{-9}

n.a. nicht angegeben

NBCSS nervoid basal cell carcinoma syndrome

Nkd naked

NTF NH_2 -terminales Fragment

P

p	pico 10^{-12}
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Pen2	presenilin enhancer 2
PKA	protein kinase
PLB	passive lysis buffer
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
%	Prozent
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
PT	Primärtumor

R

RNAi	interfering ribonucleic acid
RT	Rezidivtumor

S

SD	Standardfehler
SDS	sodiumdodecylsulfate
sek.	Sekunde
SSCP	single strand conformational polymorphism

T

T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquatus</i>
TBE	trisborate EDTA
TBS	tris-buffered saline
Tcf	T-cell factor
β -TrCP	β -transducing repeat-containing protein
TEMED	tetramethylethyldiamine
TMD	transmembrane domain

U

U	unit
Ub	Ubiquitinierung
uPar	urokinase-type plasminogen activator receptor
UV-Licht	Ultraviolett-Licht

V

V	Volt
Vol	Volumen

W

w	weiblich
WHO	World Health Organisation

Z

ZL	Zelllinie
----	-----------

2 Einleitung

2.1 *Presenilin 1*

Während der Charakterisierung neuer Gene, die an der Pathogenese des Morbus Alzheimers beteiligt sein könnten, gelang es erstmals, das *Presenilin 1* Gen als Komponente des AD3-Locus zu identifizieren (Sherrington et al., 1995). Dieses Gen befindet sich auf Chromosom 14q24.3 und besitzt eine Größe von 75kb (Alzheimers Disease Collaborative Group, 1995). Betrachtet man nur den kodierenden Bereich, so findet man eine hohe Homologie zu einem zweiten Gen auf Chromosom 1q31-q42, das als *Presenilin 2* bezeichnet wird. Beide Preseniline bestehen aus zehn Exonen, die einen Bereich von 24 kb umfassen (Prihar et al., 1996). *Presenilin 1* weist zusätzlich drei weitere Exone auf, die sich in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) befinden, wobei die Exone 1-2 alternativ gespleisst werden (Sherrington et al., 1995). Während bei *Presenilin 1* und *Presenilin 2* die Intron - Exon Grenzen sehr ähnlich und konservierte Regionen hier sogar identisch sind, differieren die intronischen Sequenzen, die die Exone unmittelbar flankieren, stark. Dies gibt Anlass zu vermuten, dass diese Gene nicht das Ergebnis einer in der Evolution kürzlich stattgefundenen Genverdopplung sind (Levy-Lahad et al., 1996). Dennoch kodieren beide Gene für sehr ähnliche Proteine, die funktionell betrachtet wahrscheinlich sehr ähnliche Aufgaben wahrnehmen.

2.1.1 *Presenilin 1*-Transkriptionsprodukt

Das Transkriptionsprodukt des *Presenilin 1* Gens wird als S182 bezeichnet, ist in ungespleisster Form 2,7kb groß (Rogaev et al., 1995) und kodiert für ein integrales Membranprotein (Sherrington et al., 1995). Es sind verschiedene Spleiss-Varianten dieses Transkriptes publiziert worden, wovon zwei an dieser Stelle exemplarisch Erwähnung finden sollten. Die erste Variante betrifft Exon 3 und geht mit dem Verlust von vier Aminosäuren VRSQ und damit zweier potentieller Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C oder die Caseinkinase II einher. Diese kürzere Variante ist im Gehirn, in Fibroblasten und Lymphozyten ca. 1,5 mal häufiger zu finden als die normale (Cruts et al., 1995). Die zweite Spleissvariante geht mit einem Verlust von Exon 8 einher, dass bei beiden Presenilin-Proteinen gleichermaßen für die transmembranäre Domäne VI und den Beginn der großen cytosolischen Schleife kodiert. Auch diese zweite Form ist im Gehirn präsent, dominiert aber besonders in Leukozyten (Rogaev et al., 1995).

2.1.2 *Presenilin 1*-Protein

Proteinaufbau

Das hydrophobe *Presenilin 1*-Protein besteht aus 467 Aminosäuren (Sherrington et al., 1995) und stellt sich als 42-50 kDa schweres Eiweißmolekül dar (reviewed by De Strooper, 2003, Sahara et

al., 1996). Als integrales Membranprotein setzt es sich aus neun transmembranären Domänen zusammen (Spasic et al., 2006) (Vgl. Abb.1.1). Die Domänen VI und VII verdienen an dieser Stelle besondere Aufmerksamkeit, denn im Unterschied zu den übrigen sind beide durch eine große zytosolische Schleife miteinander verbunden (Sherrington et al., 1995). Darüber hinaus verfügen sie über jeweils ein Aspartatmolekül, das in gleicher Distanz von der Membran lokalisiert ist (Wolfe et al., 2002). Im gesamten transmembranären Bereich kann eine hohe Homologie zum Presenilin 2-Protein, die insgesamt ca. 67% beträgt, beobachtet werden (Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Van Broeckhoven et al., 1995). Im Gegensatz hierzu ähneln sich der N-Terminus, der intrazellulär lokalisiert ist (Alzheimers Disease Collaborative Group, 1995), und die zentrale Region der cytosolischen Schleife der Domäne VI wenig.

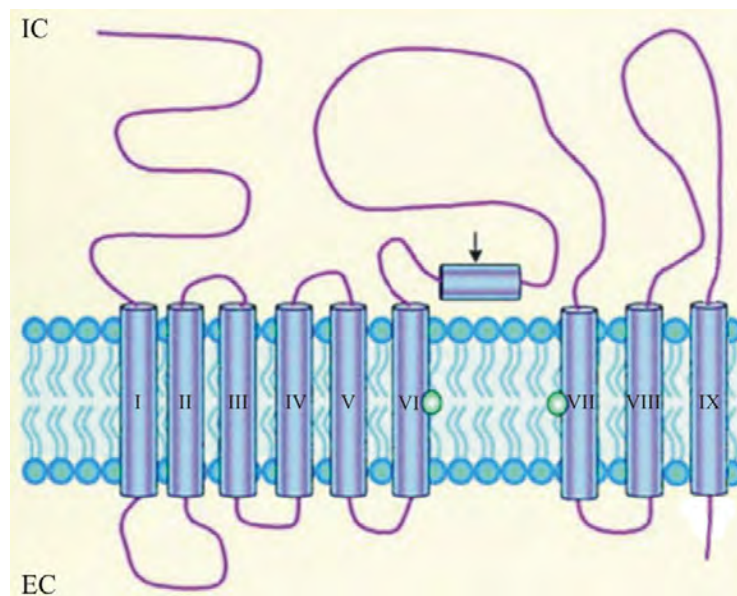


Abbildung 1: Esler und Wolfe, 2001 Science, ergänzt gemäß Spasic et al., 2006. Darstellung des Presenilin 1-Proteins, das aus 9 transmembranären Einheiten besteht, wobei nur die Domänen VI und VII durch eine zytosolische Schleife miteinander verbunden sind. EC = extrazellulär; IC = intracellulär

Proteinlokalisierung

Presenilin 1 (PS1) wird in den meisten Geweben exprimiert, so beispielsweise in Herz, Leber, Pankreas, Milz, Niere, Hoden und Gehirn (Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995; Suzuki et al., 1996). Im menschlichen Gehirn ist es im Rahmen der Alzheimer-Forschung am besten untersucht. Es findet sich insbesondere in der neuronalen Zellpopulation des Hippocampus, im cerebralen Kortex, im Kleinhirn und auch im Plexus choroideus (Mercken et al., 1996; Suzuki et al., 1996). Betrachtet man sich die Verteilung des Presenilin 1 auf Zellebene, so ist das Protein hauptsächlich in der perinukleären Zone neuronaler Zellen, im endoplasmatischen Reticulum, im Golgi-Apparat sowie in intrazellulären Vesikeln lokalisiert (Mercken et al., 1996).

Proteinaktivierung

Um funktionell wirksam werden zu können, muss Presenilin 1 proteolytisch gespalten werden. Diese Bioaktivierung findet im Rahmen einer raschen Verstoffwechslung im endoplasmatischen Reticulum statt (Hartmann et al., 1997). Die Halbwertszeit des Holoproteins ist hier nur kurz (30-60 min), währenddessen es sich einer charakteristischen Phosphorylierung, aber keiner Sulfatierung oder Glykosylierung unterzieht (Xia, 2000). Zum Prozess der Endoproteolyse gibt es zwei Hypothesen. Die erste postuliert, dass das Protein durch eine sogenannte Presenilinase im hydrophoben Bereich der cytosolischen Schleife der Domäne VI und VII nahe oder unmittelbar an der AS 292 bzw. zwischen der AS 298 und 299 geschnitten wird (Podlisny et al., 1997). Die zweite Hypothese hingegen favorisiert eine von den Aspartatmolekülen ausgehende Autokatalyse (Wolfe, 2002). In beiden Fällen geht man von der Entstehung eines 27 kDa schweren, NH₂-terminalen (NTF) und eines 17 kDa schweren, COOH-terminalen (CTF) Fragmentes aus (Lehmann et al., 1997). Beide werden überwiegend in den Golgi-Apparat transportiert und nur in geringen Mengen in die Plasmamembran eingelagert (Annaert et al., 1999; Cupers et al., 2001; Kaether et al., 2002). Die Akkumulation der Fragmente im Verhältnis 1:1 und die Assoziation mit anderen Eiweißmolekülen zu großen Proteinkomplexen bewirkt schließlich die Aktivierung des Proteins (Thinakaran et al., 2001).

Proteinfunktion

Die Preseniline als katalytische Komponente der γ -Sekretase

Seit Langem vermutet man, dass die Preseniline Bestandteil eines Multienzymkomplexes sind, den man als γ -Sekretase bezeichnet. Im Laufe der Jahre wurden drei weitere Gene identifiziert, die an diesem Proteinkomplex beteiligt sind. Durch funktionale und immunhistologische Untersuchungen wirkte ein Zusammenhang der vier Proteine Nicastrin (Edbauer et al., 2002; Esler et al., 2002; Yu et al., 2000), Aph-1 (Francis et al., 2002; Goutte et al., 2002; Gu et al., 2002; Lee et al., 2002), Pen-2 (Francis et al., 2002; Steiner et al., 2002) und Presenilin 1 bzw. 2 (reviewed by Haass et al., 2002) sehr wahrscheinlich. Im März 2003 schließlich gelang es Edbauer et al., die lang geforderte Rekonstruktion der γ -Sekretase Aktivität mittels dieser Komponenten durchzuführen und so die Hypothese zu bestätigen. Während zum jetzigen Zeitpunkt die Involvierung weiterer Proteine noch nicht vollständig auszuschließen ist, konnte doch gezeigt werden, dass die γ -Secretase-Aktivität strikt von dem Zusammenspiel dieser vier funktional aktiven Proteine abhängig ist. So zeigten Expressionsuntersuchungen, dass die Regulation von nur drei Komponenten in beliebiger Kombination keine, die Überexpression aller vier Gene aber sehr wohl eine Steigerung der γ -Sekretase-Aktivität zur Folge hat (Edbauer et al., 2003; reviewed by Kimberly et al., 2003; Takasugi et al., 2003). Für die vorliegende Arbeit ist neben Presenilin 1 auch Nicastrin von Bedeutung. Deswegen sollen diese beiden Proteine hinsichtlich ihrer Aufgabe im Rahmen des Multienzymkomplexes näher vorgestellt werden.

Die Komponenten des γ -Sekretase-Komplexes:

Nicastrin: Dieses Protein ist ein ca. 130 kDa großes, transmembranes Glykoprotein vom Typ I, das sowohl das NTF, als auch das CTF der Preseniline binden kann. (Yu et al., 2000) Es wird als ein 110 kDa großes Vorläuferprotein synthetisiert und benötigt Presenilin 1 oder 2, um das endoplasmatische Reticulum zu verlassen und an die Zelloberfläche zu gelangen (Leem et al., 2002). Untersuchungen, bei denen man die Nicastrinexpression mit Hilfe von RNAsis unterdrückte, ergaben, dass dieses Protein ein Presenilin stabilisierender Faktor ist. (Edbauer et al., 2002).

Preseniline: Im Rahmen des Multienzymkomplexes werden die Preseniline als katalytische Komponente favorisiert. Durch Inhibitorstudien konnte nachgewiesen werden, dass die γ -Sekretase-Aktivität durch die Verwendung des Hemmstoffes L-685.458, für den eine direkte Presenilin-Spezifität nachgewiesen ist, unterbunden werden konnte (Li et al., 2000). Runterregulation oder Fehlen von Presenilin führt zu einer reduzierten Reifung und Glykosylierung von Nicastrin (Edbauer et al., 2002; Leem et al., 2002). Ausserdem führt ein PS1/ PS2 Knockout zu einer verminderten Pen-2 Expression (Steiner et al., 2002).

Zusammenfassend kann für alle vier Proteine des γ -Sekretase-Komplexes festgehalten werden, dass sie co-reguliert sind und eine Änderung des Expressionslevels einer individuellen Komponente Auswirkungen auf die Stabilität, die proteolytische Reifung, die Glykosylierung und den Transport der anderen Untereinheiten an die Zelloberfläche zur Folge hat (Edbauer et al., 2003; Gu et al., 2003; Kimberly et al., 2003; Lee et al., 2002; Luo et al., 2003; Steiner et al., 2002; Takasugi et al., 2003). In assoziierter Form umfasst der γ -Sekretase-Komplex eine minimale Größe von 200-250 kDa (Kimberly et al., 2003), wobei alle vier Proteine im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1:1 enthalten sind. Bedenkt man nun, dass es zwei verschiedene Preseniline und zwei Aph-1 Homologe gibt, so ergeben sich hieraus vier unterschiedliche Möglichkeiten der Komplexbildung. Bezieht man zusätzlich alternative Spliceformen in diesen Gedankengang mit ein, so ergeben sich eine Fülle von different angelegten γ -Sekretase-Komplexen. Bislang nicht sicher bewiesen ist, ob aus diesen differenten Enzymkomplexen ein Spezifitätsunterschied resultiert, der die Mannigfaltigkeit der umsetzbaren Substrate erklären könnte (De Strooper et al., 2003). Die zur Zeit vorherrschende Hypothese besagt, dass die Ursache der Substratvielfalt ein relativier Spezifitätsverlust der γ -Sekretase ist.

Typisierung der γ -Sekretase

Die γ -Sekretase gehört zur Gruppe der intramembranös schneidenden Proteasen (I-CliPs; intramembrane-cleaving-proteases) (Wolfe et al., 1999). Ausgehend von der Hypothese, das Presenilin 1 mit seinen zwei komplett konservierten Aspartat-Molekülen in TMD6 und TMD7 (Wolfe et al., 1999) als katalytische Komponente des Enzymkomplexes wirksam wird und die aktive Seite des Presenilins 1 ein GxGD Motiv (x = variabel) aufweist, in das der C-terminale Aspartatrest eingebettet ist, handelt es sich wahrscheinlich um eine polytopische Protease mit einem Aspartyl-Protease-Mechanismus (Haass und Steiner, 2002).

Zelluläre Aufgaben der γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist zum einen an der APP-Prozessierung beteiligt. In diesem Rahmen erhält besonders ihre katalytische Komponente Presenilin 1 eine pathogenetische Bedeutung für die Erkrankung des Morbus Alzheimer. Zum anderen nimmt die γ -Sekretase eine bedeutende Rolle im Notch-Signalweg ein. Da für ihn neben seiner Bedeutung in der embryonalen Entwicklung zahlreicher Organsysteme u.a. eine Beteiligung an der Entwicklung embryonaler Tumore wie z.B. den Medulloblastomen (Fan et al., 2004 und 2006) diskutiert wird, soll die klassische Signalkaskade im Folgenden kurz vorgestellt werden.

2.1.3 Notch-Signalweg

Notch-Signalweg - inaktiv -

In Säugetieren sind vier Notch-Proteine bekannt, die als unreife Vorläuferproteine aus einer extra- und einer transmembranären Untereinheit bestehen (Blaumüller et al., 1997). Die transmembranäre Untereinheit enthält die intrazelluläre Domäne, die nach Abspaltung als Signalpeptid fungieren, in den Nucleus translozieren und dort die Transkription von Zielgenen initiieren kann. In Abwesenheit von Liganden wie Delta like und Jagged (Lindsell et al., 1995; Shawber et al., 1996) ist Notch inaktiv. Bei inaktiviertem Signalweg verhindert der CSL/Corepressorkomplex die Transkription (Hsieh and Hayward, 1995; Kao et al., 1998; Oswald et al., 1998).

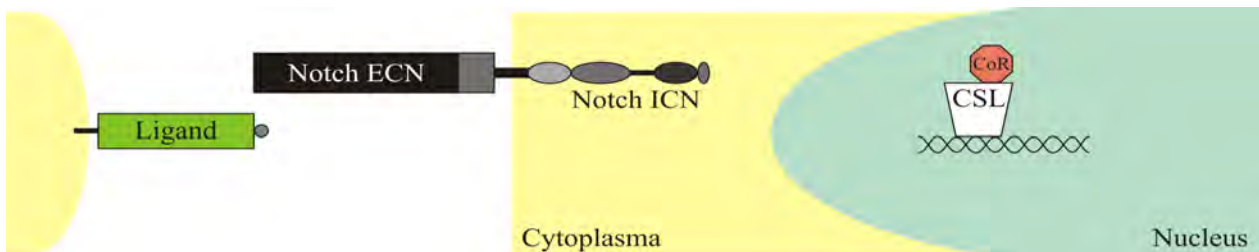


Abbildung 2: Darstellung des inaktiven NOTCH-Signalweges. An das unprozessierte Notch-Protein ist kein Ligand gebunden. Im Nucleus verhindern Moleküle der CSL-Familie nach Bindung von Co-Repressoren die Transkription von Zielgenen. ECN = extrazelluläre Domäne von Notch, ICN = intrazelluläre Domäne von Notch, CoR = Co-Repressoren.

Notch-Signalweg - aktiv -

Wird Notch durch Ligandenbindung aktiviert, so erfolgt die proteolytische Spaltung des Proteins in zwei Schritten. Der erste Schritt der Prozessierung ist hierbei durch eine Protease der Adam-Familie vermittelt (Sotillos et al., 1997; Pan et al., 1997; Wen et al., 1997). Der Zweite wird von der γ -Secretase durchgeführt (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Nach Abspaltung der intrazellulären Domäne von Notch kann diese zum Nucleus translozieren, die Bindung zwischen Corepressoren und CSL-Molekülen lösen und gleichzeitig Coaktivatoren (z.B. Mastermind) binden. Daraufhin erfolgt

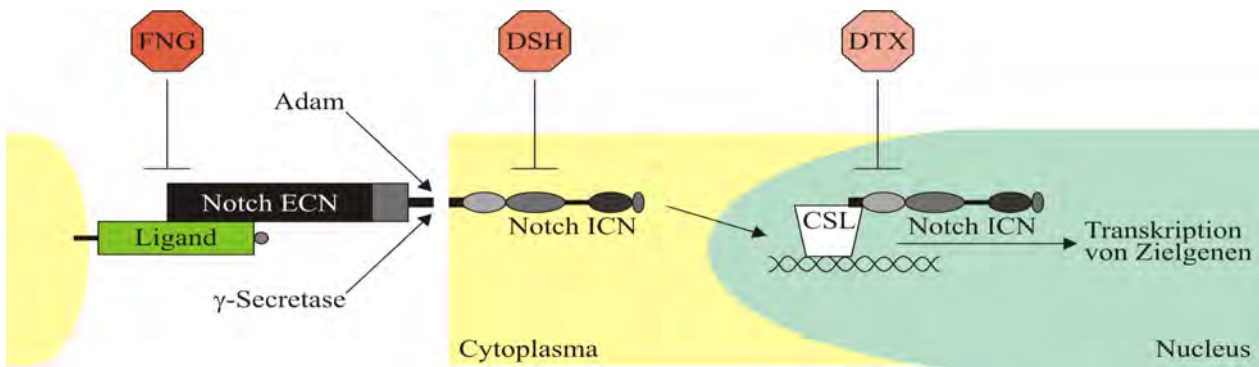


Abbildung 3: Darstellung des aktivierten Notch-Signalweges sowie der Angriffspunkte inhibitorischer Regulatoren. Durch Ligandenbindung wird Notch aktiviert und daraufhin durch Adam sowie durch die γ -Secretase prozessiert. Die intrazelluläre Domäne des Notch-Proteins wird freigesetzt und transloziert zum Nucleus, wo sie die Corepressoren verdrängt, Coaktivatoren anzieht und durch Bindung an CSL die Transkription von Target-Genen des Signalweges initiieren kann. Verhindert werden kann die Transkription extrazellulär durch Hemmung der Ligandenbindung (z.B. FNG=Frige), intrazellulär durch Bindung von ICN (z.B. DSH=Dishevelled) oder auch durch Inhibition der CSL/ICN Interaktion (z.B. DTX=Deltex).

die Transkription von Zielgenen des Notch-Signalweges (reviewed by Miele and Osborne, 1999). Die aktivierte Signalkaskade kann jedoch an verschiedenen Stellen inhibitorisch reguliert werden. Der erste Modulationspunkt ist hierbei die Bindung des Liganden an Notch, die durch Moleküle wie z.B. Fringe (Fleming et al., 1997; Panin et al., 1997) verhindert werden kann. Auch durch Abfangen der intrazellulären Domäne von Notch, z.B. durch Dishevelled (Axelrod et al., 1996; Blair, 1996) wird die Signaltransduktion unterbrochen. Zuletzt kann die CSL-abhängige Transkription durch Interaktion mit Molekülen wie z.B. Deltex (Izon et al., 2002; Sestan et al., 1999) gehemmt werden.

Presenilin 1 als negativ Regulator des WNT-Signalweges

Presenilin 1 ist jedoch nicht nur als katalytische Komponente der γ -Sekretase im humanen Organismus wirksam. 2002 entdeckte Kang et al., dass Presenilin 1 zusätzlich als negativ Regulator des WNT/ β -Catenin Signalweges aktiv ist und so über eine Axin - ähnliche Funktion eine Degradation von β -Catenin unterstützt. Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, da die intrazelluläre Stabilisierung von β -Catenin ein bedeutender Vorgang bei der Entstehung von Medullo- und Hepatoblastomen ist.

Diese Arbeit wird sich auch auf die Presenilin 1-Wirkung im Zusammenhang mit dem WNT-Signalweg fokussieren und die Bedeutung an der Tumorigenese von Medullo- und Hepatoblastomen analysieren. Aus diesem Grunde wird der Signalweg und seine Interaktion mit Presenilin 1 dargestellt.

2.1.4 WNT-Signalweg

Wnts sind sezernierte Glykoproteine, die während der embryonalen Entwicklung auf Wachstum, Motilität und Differenzierung von Vorläuferzellen Einfluss nehmen. Sie agieren hierbei parakrin, indem sie diverse Signalkaskaden innerhalb der Zielzellen aktivieren. Der WNT Signalweg hat in den vergangenen Jahren besonders in der Krebsforschung an Aufmerksamkeit gewonnen. Hier konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg beispielsweise in Hepatoblastomen, Medulloblastomen, Nephroblastomen und Colorektalen Carcinomen aktiv ist.

Der kanonische WNT-Signalweg - inaktiv -

In der Abwesenheit eines stimulierenden Wnt Moleküls bildet sich intrazellulär ein Multienzymkomplex. Er enthält die phosphorylierenden Enzyme Casein Kinase 1 (CK1) α oder ϵ und die Glycogen-Synthetase Kinase (GSK) -3β . Ausserdem sind das Adenomatosis Polyposis Coli (APC) Protein, das als Stützgerüst wirkende Axin ein entsprechendes Homolog Axin 2 und das die CK1 ϵ bindende Diversin in diesem Komplex assoziiert. Seine Funktion ist die konstante Phosphorylierung des β -Catenin Proteins, die zentrale Komponente dieses Signalweges. Dies erfolgt stets sequentiell. Initial wird dabei das β -Catenin Molekül an seinem Serin 45-Rest unter Einwirkung der CK1 phosphoryliert. Diese Reaktion initialisiert eine Kaskade weiterer Phosphorylierungen. Via GSK-3 β erfolgen diese an den benachbarten Positionen Threonin 41, Serin 37 und Serin 33 (Liu et al., 2002; Yanagawa et al., 2002). Auf diese Weise wird die Ubiquitination des β -Catenin-Moleküls via β -TrCP getriggert und die Degradation gemäß dem 26S-Proteasom-Weg ermöglicht (Aberle et al., 1997). In Abwesenheit des β -Catenin binden im Zellkern Tcf (T-cell-factor) Moleküle an Corepressoren (z.B. der Familie Groucho) und blockieren dadurch die Expression von WNT-Zielgenen (Bienz et al., 1998; Brannon et al., 1997; Riese et al., 1997). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei inaktivem WNT-Signalweg das Level des Mediators β -Catenin und somit seine transkriptionsaktivierende Wirkung durch Proteinabbau gering gehalten wird.

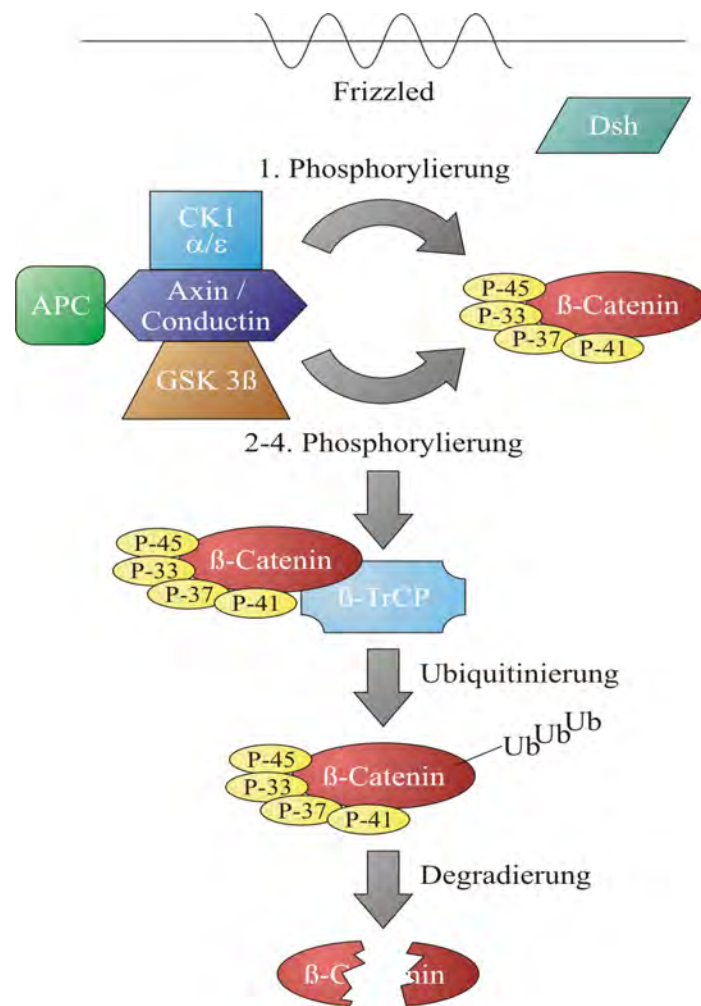


Abbildung 4: Darstellung des inaktiven WNT-Signalweges. In Abwesenheit stimulierender WNT-Moleküle kommt es zur Phosphorylierung, Ubiquitinierung und schließlich zur Degradierung des Signalproteins β -Catenin. Dsh = Dishevelled, CK1 = Casein Kinase 1, APC = Adenomatosis Polyposis Coli (APC) Protein, GSK 3 β = Glycogen-Synthetase Kinase, β TrCP = β -transducing repeat-containing Protein; Ub = Ubiquitinierung

Der kanonische WNT-Signalweg - aktiv -

Bei Bindung eines WNT-Moleküls an einen Rezeptor der Frizzled-Familie wird das zyttoplasmatische Protein Dsh phosphoryliert und dadurch aktiviert. Schon dieser erste Schritt kann positiv verstärkt (z.B. durch LRP5-6) oder antagonisiert werden (z.B. durch FrzB). Das stimulierte Dishevelled-Protein entfaltet über seine Interaktion mit dem Axin-Molekül eine inhibierende Wirkung auf den Multienzymkomplex, der zur Phosphorylierung des β -Catenins benötigt wird (Itoh et al., 1998). Als Folge kommt es zu einer Hemmung der β -Catenin-Phosphorylierung und somit zu einer cytosolischen Stabilisierung seines Spiegels. Im unphosphorylierten Zustand ist dieses Schlüssel-molekül in der Lage, zum Zellkern zu translozieren und dort eine transkriptionsaktivierende Wirkung zu entfalten. Dies erfolgt, indem es die bis dahin als Repressoren wirkenden Tcf/Lef (lymphoid enhancer factor)- Transkriptionsfaktoren bindet und diese dadurch aktiviert. Die Komplexbildung von

Tcf/Lef : β -Catenin kann durch multiple Faktoren unterstützt werden. Beispielfhaft sei hier das Molekül CBP (Histon Acetyl Transferase) erwähnt. Der Tcf/Lef : β -Catenin Komplex kann nun an spezifische DNA-Sequenzen binden und so die Transkription von Wnt-Zielgenen (z.B. *c-myc* oder *Cyclin D1*) (He et al., 1998; Tetsu et al., 1999), die nicht nur als Kontrollgene bei Regulation der Zellproliferation und der Entwicklung, sondern auch im Rahmen der Tumorigenese eine Rolle spielen (vgl.1.1.7)initiieren.

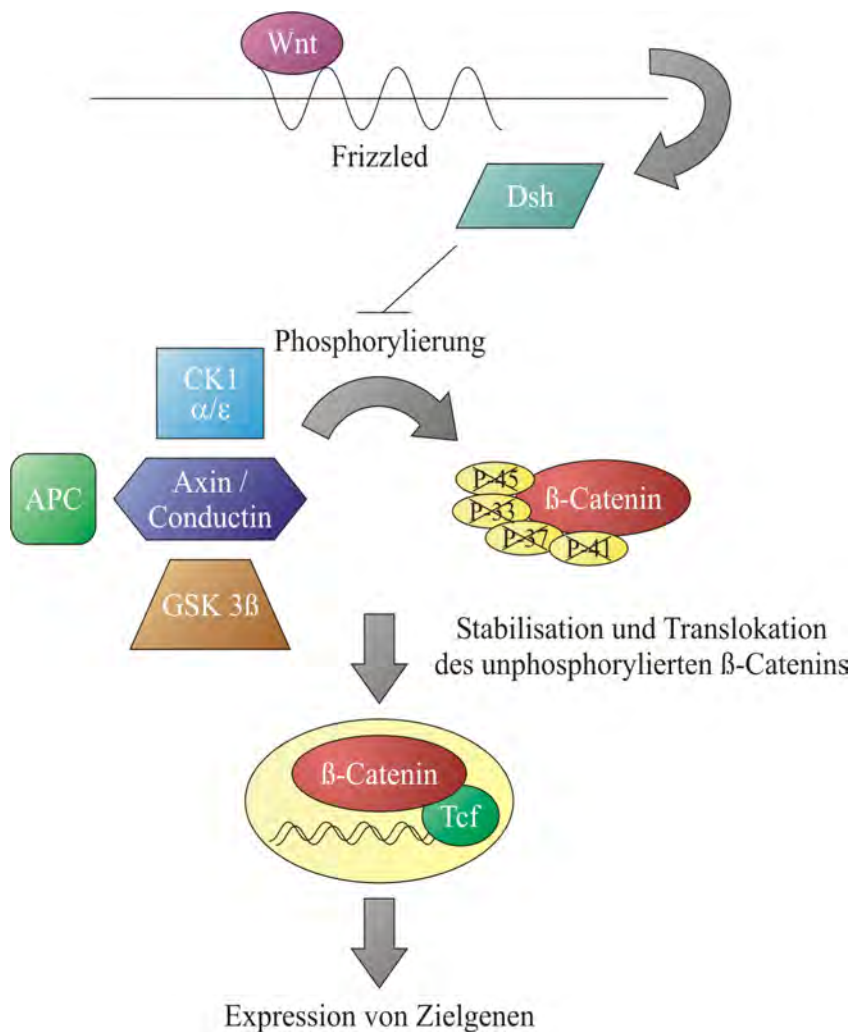


Abbildung 5: Darstellung des aktiven WNT-Signalweges. In Anwesenheit stimulierender WNT-Moleküle wird die Phosphorylierung des Signalproteins β -Catenin gehemmt. In Folge kommt es zur Stabilisierung und Translokation des β -Catenins sowie zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen Dsh = Dishevelled, CK1 = Casein Kinase 1, APC = Adenomatosis Polyposis Coli (APC) Protein, GSK 3 β = Glycogen-Synthetase Kinase, TCF = T-Cell Faktor

2.1.5 Presenilin 1 als Inhibitor des WNT-Signalweges

Kang et al. gelang es im Jahre 2002 ein weiteres Molekül zu identifizieren, das unabhängig von Axin und dem WNT-Signal in der Lage ist, die Phosphorylierung des β -Catenins zu unterstützen. Hierbei

handelte es sich um das Presenilin 1. Es konnte gezeigt werden, dass im Zusammenhang mit diesem Protein die initiale Phosphorylierung an Position Serin 45 durch die Proteinkinase A durchgeführt wird. Die folgenden Reaktionen, die zur Ubiquitination und zum Abbau des β -Catenins führen, sind mit den Axin-assoziierten identisch (Vgl. Abb. 1.5). Hierbei ist Presenilin 1 in Analogie zu Axin obligat für die Verknüpfung dieser beiden Phosphorylierungsschritte. Expressionsuntersuchungen in diesem Zusammenhang zeigten, dass eine Überexpression des Presenilin 1 eine Senkung, ein vermindertes Vorkommen hingegen eine Stabilisierung des β -Cateninspiegels zur Folge hat. Es ergab sich an dieser Stelle die Frage, ob Presenilin 1 möglicherweise sogar als ein Tumorsuppressorgen fungieren und so in Folge einer Genmutation in Tumoren wie Medullo- und Hepatoblastomen seine Wirkung verlieren könnte.

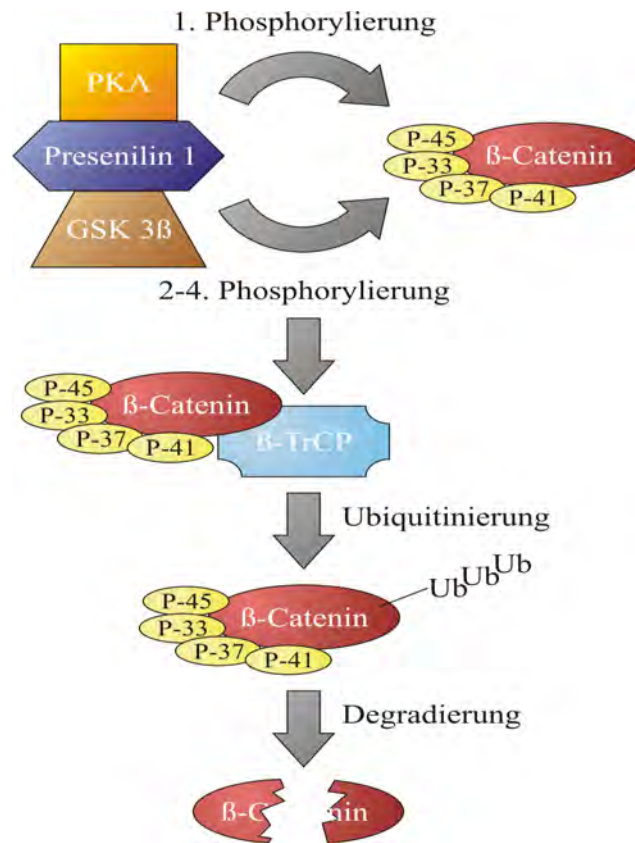


Abbildung 6: Darstellung der Presenilin 1-vermittelten Phosphorylierung des Signalproteins β -Catenin, die seine Ubiquitination und Degradation bewirkt. PKA = Protein Kinase A, GSK 3 β = Glycogen-Synthetase Kinase, β TrCP = β -transducing repeat-containing Protein; Ub = Ubiquitination

2.1.6 β -Catenin und Tumorigenese

Die Stabilisierung und Akkumulation des β -Catenin-Proteins wird heute als entscheidender onkologischer Schritt während der Entwicklung verschiedenster Tumorentitäten verstanden. Die Aktivierung des WNT-Signalweges durch Wnt-Moleküle ist allerdings nicht der einzige Mechanismus, der zur Sta-

bilisierung dieses Schlüsselproteins führt. Auch aktivierende Mutationen in β -Catenin (*CTNNB1*) selbst, die sich in der Regel an oder in der Nähe der Phosphorylierungsstellen (Codon 33,37,41,45) ereignen und somit das Exon 3 des β -Catenins betreffen, können eine Degradierung von β -Catenin verhindern. Solche Mutationen stehen im ursächlichen Zusammenhang mit der Colon-Carcinogenese (Kitaeva et al., 1997; Morin et al., 1997). Darüber hinaus wurden sie aber auch in Tumoren der Haut (Rimm et al., 1999; Robbins et al., 1996), der Leber (De La Coste et al., 1998), des Ovars (Palacios et al., 1998), der Prostata (Voeller et al., 1998) und des Endometriums (Fukuchi et al., 1998) sowie in embryonalen Tumoren wie Medullo- und Hepatoblastomen (Koch et al., 1999 und 2001) nachgewiesen. Neben diesen aktivierenden kennt man auch inaktivierende Mutationen, die in der Regel Gene betreffen, die für den β -Catenin Destruktionskomplex kodieren und zu dessen Funktionsverlust führen. Beispiele sind *APC*-Mutationen in hereditären und nicht hereditären Formen des Darmkrebses, bei denen keine β -Catenin Mutationen vorliegen (Kinzler et al., 1996; Powell et al., 1992). Ähnliches gilt für *Axin 1* in hepatozellulären Karzinomen (Satoh et al., 2000) und Hepatoblastomen (Taniguchi et al., 2002) sowie für *Conductin (Axin 2)* in Hepatoblastomen (Koch et al., 2004). Zusammengefasst sollte festgehalten werden, dass diesen genetischen Veränderungen gemeinsam ist, dass sie zur Stabilisierung und nukleären Translokation von β -Catenin führen. Folge ist die β -Catenin-vermittelte Aktivierung von Zielgenen, die eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Tumorigenese haben.

2.1.7 Zielgene und Inhibitoren des WNT-Signalweges

Durch die Aktivierung der Transkription von WNT-Zielgenen werden die WNT-spezifischen Effekte auf Tumorzellproliferation und Tumorzellüberleben vermittelt. Als WNT-Zielgene konnten nicht nur die Onkogene *c-Myc* und *Cyclin D1* (He et al., 1998; Shtutman et al., 1999), sondern auch *Conductin (Axin 2)* (Jho et al., 2002; Lustig et al., 2002), *Mmp7* (Crawford et al., 1999) *Fra-1*, *c-Jun*, *uPar* (Mann et al., 1999) und *Itf-2* (Kolligs et al., 2002) identifiziert werden. Die meisten Zielgenanalysen fanden in kolorektalen Tumoren und endometroiden Adenokarzinomen des Ovars statt. So konnte in Kolonkarzinomen eine positive Korrelation zwischen *Cyclin D1*-Überexpression und β -Catenin-Deregulation detektiert werden (Utsunomiya et al., 2001). Darüber hinaus wurde in Kolonkarzinomen über eine positive Korrelation zwischen Überexpression von *Mmp-7* sowie *uPar* und β -Catenin -Mutationsstatus berichtet (Brabletz et al., 1999; Hiendlmeyer et al., 2004). Zhai et al. untersuchten 2002 sechs potentielle WNT-Zielgene in endometroiden Adenokarzinomen des Ovars, wovon fünf Gene eine Regulation auf Expressionsebene zeigten, sofern in den Tumoren β -Catenin-Mutationen vorlagen. Auch für Hepatoblastome publizierte Takayasu et al. 2001 einen Zusammenhang zwischen *Cyclin D1*-Überexpression und β -Catenin-Mutation. Koch et al. untersuchte 2005 in Hepatoblastomen neben der Expressionsstärke von neun potentiellen Target-Genen auch ihre funktionelle Bedeutung unter Verwendung eines Luciferase-Reporter Assays. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA Spiegel der Gene *Cyclin D1*, *c-Myc*, *Mmp-7*, *Fra-1*, *uPar*, *c-Jun* und *Itf-2* in Hepatoblastomen nicht vom β -Catenin-Mutationsstatus abhängig waren. Für *Nkd-1* und β -*TrCP* jedoch konnte eine signifikante Überexpression in Tumorgeweben verglichen mit den korrespondierenden Normalgeweben detektiert werden. Im Luciferase-Reporter-Assay zeigte sich

nach Stimulation des Signalweges mit WNT3a, dass die WNT-Signalaktivität in humanen Lebertumorzelllinien ohne β -Catenin-Akkumulation bei Überexpression von *Nkd-1* reduziert, in Hepatoblastomzelllinien mit β -Catenin-Akkumulation jedoch unverändert ist. Diese Ergebnisse postulieren, dass *Nkd-1* nicht nur Zielgen, sondern auch negativ Regulator des WNT-Signalweges ist und diesen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmt. Die Überexpression von *Nkd-1* in Hepatoblastomen repräsentiert somit den Versuch, die aberrante WNT-Signalwegaktivität zu hemmen. Da hier jedoch eine β -Catenin-Degradierung durch Mutation unmöglich geworden ist, bleibt dieser Versuch der zellulären Regulation frustan. Auch andere Gruppen zeigten einen negativen Regulationsmechanismus durch Expression bestimmter Zielgene, die inhibitorische Komponenten des Signalweges kodieren, wie z.B. Lustig et al. 2002 für *Conductin* in Kolonkarzinomen und Lebertumoren und Wirths et al., 2003 für *Dkk-1* in Hepatoblastomen und Wilms-Tumoren. Solche überexprimierten Zielgene könnten Tumormarker darstellen.

2.2 Das Hepatoblastom

2.2.1 Definition

Bei dem Hepatoblastom handelt es sich um den häufigsten malignen Lebertumor des Kindesalters. Die involvierten Zellen zeigen Differenzierungsstadien, die an embryonale oder fetale Hepatozyten erinnern. Darüber hinaus sind in einem Teil der Fälle ausgereifte Gewebe zu detektieren, die durch Osteoidbildung sowie mesenchymale Anteile auffallen.

2.2.2 Epidemiologie

Ungefähr 4% der Hepatoblastome treten bereits konnatal auf. 68% der Fälle treten in den ersten beiden Lebensjahren auf. Man konnte herausfinden, dass die Inzidenz des Hepatoblastoms bei Frühgeburten mit einem Gewicht <1500g steigt (Ikeda et al., 1998; Ikeda et al., 1997; Tanimura et al., 1998). Ausserdem ist eine männliche Prädominanz zu verzeichnen, die sich auf 1,5:1 bzw. 2:1 beläuft. Rassenbedingte Prädilektionen konnten jedoch nicht festgestellt werden.

2.2.3 Lokalisation

Hepatoblastome erscheinen in der überwiegenden Zahl der Fälle als ein solitärer Tumor, der in 57% im rechten, in 15% im linken und in 27% in beiden Leberlappen auftritt (Stocker et al., 1994). 20% der Erkrankten zeigen jedoch auch multiple Tumorherde, die sowohl in einem als auch in beiden Leberlappen lokalisiert sein können.

2.2.4 Klinische Merkmale

In einer bedeutenden Anzahl der Fälle zeigen die Kinder ein massiv vergrößertes Abdomen, das von einem Gewichtsverlust und einer Anorexie begleitet wird. Manchmal werden auch Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Abdominalschmerzen angegeben. Eine Gelbsucht liegt zusätzlich bei etwa 5% der Patienten vor. Selten können Tumorzellen auch Gonadotropin produzieren, wobei

es zum verfrühten Einsetzen der Pubertät kommt. Blutbildveränderungen schlagen sich in 70% in Form einer Anämie und in 50% als Thrombozytose nieder. Darüber hinaus ist eine Erhöhung des AFP bei 90% der Hepatoblastome auffällig. AFP kann deshalb in vielen Fällen sowohl als diagnostischer Marker, als auch zur Beurteilung des Therapieverlaufs eingesetzt werden. Weitere laborchemische Abweichungen äußern sich in einem erhöhten Cholesterin-, Billirubin-, alkalische Phosphatase- und Aspartat-Aminotransferase-Spiegel. Computertomographisch entdeckt man in der Hälfte der Fälle Kalzifizierungen (Miller et al., 1985), während mit Hilfe des MRT die für das Hepatoblastom charakteristischen zystischen und vaskulären Strukturen (Powers et al., 1994) dargestellt werden können.

2.2.5 Makroskopie

Die Größe eines Hepatoblastoms kann zwischen 5 und 22 cm im Durchmesser variieren. Sein Gewicht umfasst eine Spannweite von 150 - 1400 g. Charakteristisch ist eine unregelmäßige Pseudokapsel, die den Tumor von dem normalen Lebergewebe abgrenzt. Die Tumoren erscheinen oft nodulär und weisen nekrotische sowie hämorrhagische Areale auf, die braun bis rot sind und eine weiche oder gelatineartige Konsistenz haben.

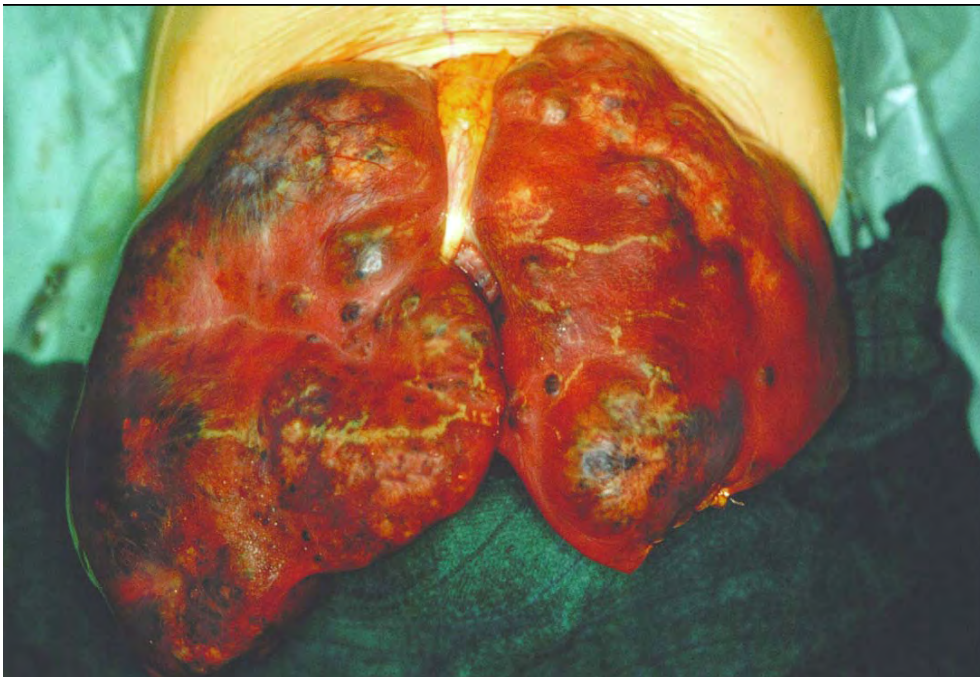


Abbildung 7: Makroskopisches Präparat eines multifokalen Hepatoblastoms.

2.2.6 Tumorwachstum

Zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation sind 40 - 60% der Hepatoblastome bereits so groß, dass sie beide Lappen involvieren. Eine Resektion ist in diesem Zustand nicht möglich (Stocker et al., 1998). Man hat allerdings herausgefunden, dass eine präoperative Chemotherapie die Tumorgröße

in 85% der Fälle so sehr reduziert, dass eine Resektion vorgenommen werden kann. Das Tumorstadium setzt sich auch in die Lebergefäße und in die Vena cava inferior fort. Von dort aus kann es zu einer Metastasierung in die Lunge kommen, die bei Diagnosestellung in 10 - 20% der Fälle bereits stattgefunden hat. Darüber hinaus sind auch Knochen-, Gehirn-, Eierstock- und Augenmetastasen beobachtet worden (Bove et al.,1996; Endo et al., 1996; Green et al.,1989; Robertson et al.,1997).

2.2.7 Histologie

Das Hepatoblastom ist ein Tumor epithelialen Ursprungs, der eine zusätzliche mesenchymale Komponente aufweisen kann. Diese besteht in der Regel aus unreifem Bindegewebe, das gelegentlich zu Knorpelgewebe oder Osteoid ausreift (Schmidt et al., 1985). Die histologische Einteilung des Hepatoblastoms richtet sich in erster Linie nach dem Reifegrad des epithelialen Tumoranteils und umfasst gemäß Stocker (1994) folgende Subtypen:

- (1) fötal epithelial
- (2) embryonal und fötal epithelial
- (3) makrotrabekulär
- (4) kleinzellig undifferenziert
- (5) gemischt epithelial und mesenchymal mit teratoiden Anteilen
- (6) gemischt epithelial und mesenchymal ohne teratoide Anteile

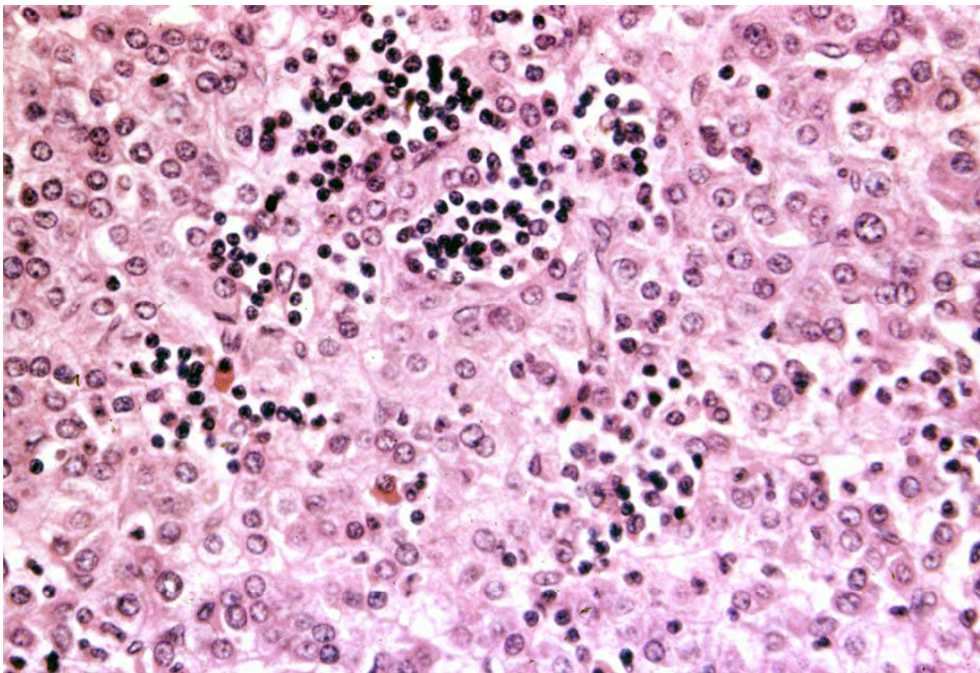


Abbildung 8: Mikroskopisches Bild eines multifokalen Hepatoblastoms.

2.2.8 Genetische Prädispositionen

Bei ungefähr 5% der erkrankten Kinder sind kongenitale Anomalien zu verzeichnen. Sie beinhalten nicht nur renale Mißbildungen, wie beispielsweise Hufeisennieren, renale Dysplasien und doppelte Ureteren, sondern auch gastrointestinale Fehlentwicklungen wie etwa Meckel-Divertikel oder inguinale und diaphragmale Hernien. Auch ein Fehlen adrenaler Drüsen und eine Heterotrophie des Lungengewebes konnte beobachtet werden. Darüber hinaus ergaben sich positive Korrelationen zwischen der Inzidenz des Hepatoblastoms und einigen Syndromen, wie etwa Beckwith-Wiedemann-Syndrom, Trisomie 18 und 21, Acardia-Syndrom, Goldenhar-Syndrom, Prader-Willi-Syndrom und Typ 1a der Glykogen-Speicher-Krankheit (Riikonen et al., 1990). Auch eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer Familiären Adenomatosis Coli (FAP) und eines Hepatoblastoms ist beschrieben. Hierbei ist das relative Risiko für die Entwicklung eines Hepatoblastoms in einer FAP-Familie um 750-7,500-fach höher als in der Normalbevölkerung (Giardiello et al., 1991, Hughes et al., 1992). Der Assoziation von Hepatoblastom und FAP liegt in der Regel eine Keimbahnmutation des *APC*-Genes zu Grunde (Cetta et al., 1997; Giardiello et al., 1996). In 8-10% vermeintlich sporadisch auftretender Hepatoblastome konnten darüberhinaus auch de novo *APC*-Mutationen nachgewiesen werden (Aretz et al., 2006).

2.2.9 Molekulargenetische Aspekte

Die zytogenetischen Abnormalien umfassen Trisomien von Teilen oder aber dem gesamten Bereich des Chromosoms 2, Trisomien des Chromosoms 20 und Loss of Heterozygosity (LOH) für telomere Bereiche von 11p (11p15,5). Bei Letzterem sei erwähnt, dass das Material, das von 11p verloren geht, immer maternalen Ursprungs ist (Albrecht et al., 1994b). Weitere Allelverluste fanden sich auf dem kurzen sowie auf dem langen Arm von Chromosom 1 (Kraus et al., 1996). Desweiteren konnte man eine Überexpression von *TP53* in einigen Hepatoblastomen nachweisen, wobei aber Mutationen dieses Genes in Exon 5 bis 9 sehr selten sind (Ohnishi et al., 1996). In einem erwachsenen Patienten beobachtete man eine erhöhte Anzahl von *c-Met* und *K-sam* Proto-Onkogen-Kopien. Gleiches galt für *Cyclin D1* (Kuniyasu et al., 1996), das auch als Target-Gen des WNT-Signalweges bekannt ist. 1999 zeigte Koch et al., dass die zentrale Komponente des WNT-Signalweges, *β -Catenin*, in 48% der untersuchten Hepatoblastomen mutiert ist. Diese aktivierenden Mutationen ereignen sich ausschließlich im Exon 3 und betreffen die Phosphorylierungsstellen des *β -Catenin*-Gens. In Folge kann *β -Catenin* nicht mehr degradiert werden und es kommt zu seiner intranukleären Akkumulation sowie zur erhöhten Transkription von WNT-Zielgenen. *In vitro* Versuche unter Verwendung von *β -Catenin* RNAs konnten schließlich belegen, dass die Tumorzellproliferation in Hepatoblastomen entscheidend von diesem WNT-Signalprotein abhängt (Sangkhathat et al., 2006).

2.2.10 Prognose und prädiktive Faktoren

Die Prognose wird direkt beeinflusst von der Tatsache, ob der Tumor chirurgisch vollständig zu entfernen ist. Unter Hinzuziehen therapeutischer Maßnahmen wie Chemotherapie und Transplantation wird eine Resektion in 90% der Fälle ermöglicht. Dies steigert den Anteil der Überlebenden

auf 65-70%. AFP ist ein wichtiger diagnostischer Marker, der zur Einschätzung der Behandlungsart ebenfalls hinzugezogen werden kann. (Van Tornout et al., 1997). AFP Spiegel zwischen 100 und 1 000 000 ng/ml bei initialer Diagnose haben eine bessere Prognose, als solche < 100 und $> 1\,000\,000$ ng/ml. Weitere prognostisch positive Merkmale sind die Lokalisation in nur einem Leberlappen, der fetal epitheliale Subtyp und multifokale Verteilung der Tumorherde (von-Schweinitz et al., 1997).

2.3 Das Medulloblastom

2.3.1 Definition

Das Medulloblastom ist ein maligner, invasiver Tumor des Kleinhirns, der sich vorzugsweise bei Kindern manifestiert. Prädominant besteht er aus unreifen, neuroektodermalen Zellen und zeigt eine Tendenz zur Ausbildung von Liquorabtropfmetastasen. Er korrespondiert histologisch zum WHO Grad IV.

2.3.2 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz des Medulloblastoms liegt bei 0.5 pro 100 000 Kindern, die jünger als 15 Jahre alt sind. (Central Brain Tumour Registry of the US, 1995; Stevens et al., 1991). Generell kann man einen Manifestationshöhepunkt um das siebte Lebensjahr verzeichnen. 70 % der Patienten sind jünger als 16 Jahre (Arseni et al., 1981; Roberts et al., 1991). Bei Erkrankung während des Adoleszenten- und Erwachsenenalters sind 80% der Betroffenen zwischen 21 und 40 Jahren alt (Giordana et al., 1999; Hubbard et al., 1989). Extrem selten tritt das Medulloblastom nach dem fünften Lebensjahrzehnt auf. Eine Prädominanz ist auf Seiten des männlichen Geschlechts zu erkennen, das ungefähr 65% des Patientenkollektivs ausmacht.

2.3.3 Lokalisation

Ungefähr 75% der kindlichen Medulloblastome sind im Kleinhirnwurm lokalisiert und projizieren in den vierten Ventrikel. Mit steigendem Erkrankungsalter sind zusehends die Kleinhirnhemisphären involviert.

2.3.4 Klinische Merkmale

Zur klinischen Symptomatik bei Manifestation zählen trunkale Ataxie, Gangstörungen, intrakranielle Hypertension, Obstruktion im Bereich des Liquordrainagesystems, Lethargie sowie Kopfschmerz und morgendliches Erbrechen. Im CT oder MRT zeigt sich der Tumor als solide, homogene, kontrastreiche Masse. Metastasen zeigen sich als noduläre oder diffuse Tumorherde in den Leptomeningen oder auf der Ventrikeloberfläche. Sie sind bei einem Drittel der Patienten zu finden.

2.3.5 Makroskopie

Medulloblastome variieren stark in ihrer Struktur. Einige von ihnen sind derb und abgrenzbar, während andere weich und weniger gut definierte Grenzen aufweisen. In einigen Fällen sind zusätzlich

massive Hämorrhagien zu erkennen.

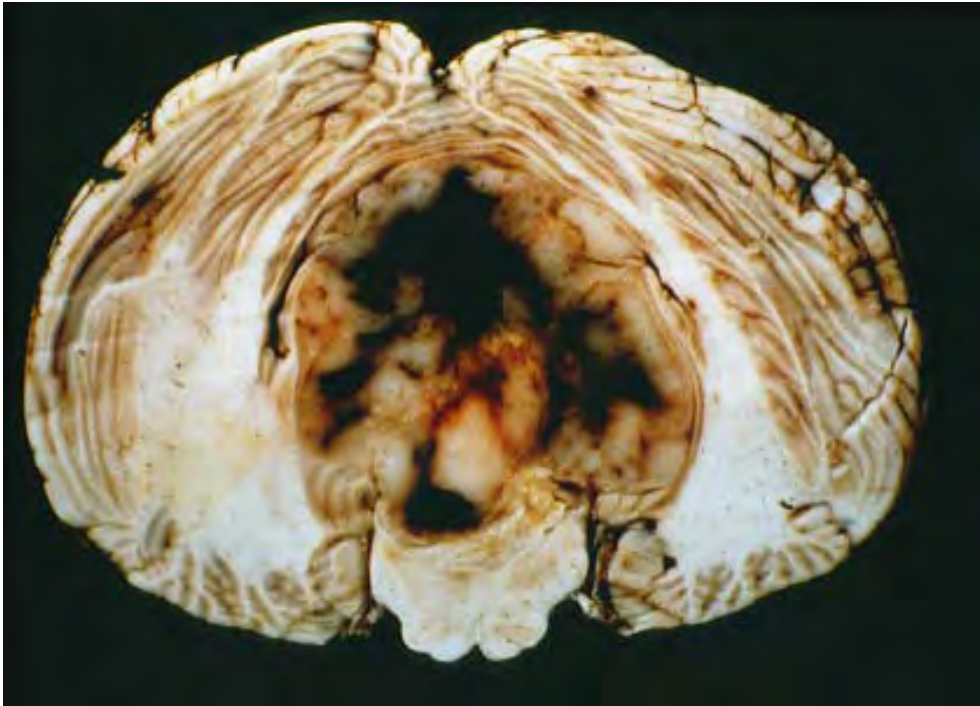


Abbildung 9: Makroskopisches Sektionspräparat eines im Kleinhirnwurm entstandenen Medulloblastoms.

2.3.6 Mikroskopie

Neben selteneren Varianten wie Medulloblastome mit extremer Nodularität, anaplastische und großzellige Subtypen lassen sich im Wesentlichen histologisch zwei Formen unterscheiden.

- (1) Die klassischen Tumoren bestehen aus dicht gepackten Zellen mit rund - ovalen, hyperchromatischen Zellkernen. Die Nuclei sind von spärlichem Zytoplasma umgeben. Zusätzlich sind neuroblastische Rosetten, sogenannte Homer Wright Rosetten, in ca. 40% der Fälle vorhanden. Die mitotische Aktivität ist deutlich erhöht.
- (2) Die desmoplastische Variante zeichnet sich durch noduläre, retikulinfreie Zonen (pale islands) aus. Diese sind von dichtgepackten stark proliferativen Zellen umgeben, die ein dichtes interzelluläres Retikulinfasernetzwerk bilden. Die Knötchen haben insgesamt ein reduziertes Zellvorkommen, eine fibrilläre Matrix und eine hohe Uniformität der Zellkerne. Zwischen den Knoten eingestreute Zellen weisen unregelmäßigere und hyperchromatische Kerne auf.

2.3.7 Genetische Prädispositionen

Aus der Zwillingsforschung sind Fälle bekannt, bei denen sich ein Medulloblastom sowohl bei mono- als auch bei dizygoten Geschwistern manifestierte (Bickerstaff et al., 1967; Hung et al., 1990; Ya-

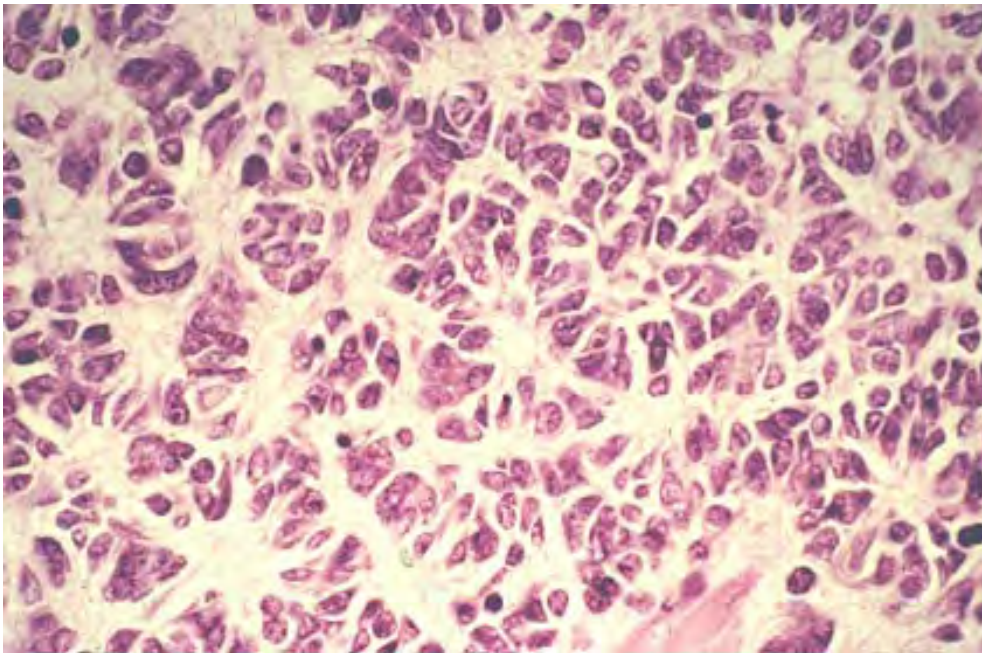


Abbildung 10: Mikroskopisches Bild eines klassischen Medulloblastoms mit neuroblastischen Rosetten

mashita et al., 1975). Es gibt auch Hinweise, dass die Verwandten von Medulloblastompatienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung anderer kindlicher Tumore haben, vor allem für Leukämie und Lymphome (Farwell et al., 1984; Kuijten et al., 1993). Darüber hinaus konnte man eine Assoziation dieser Läsion nicht nur mit anderen Tumoren des Gehirns, sondern auch mit extracerebralen Neoplasien, wie etwa dem Wilms - Tumor feststellen. Ausserdem konnte in einigen Familien assoziierte Krebs syndrome detektiert werden wie z.B. das Turcot-Syndrom (APC-Keimbahnmutation) (Hamilton et al., 1995) , Li-Fraumeni-Syndrom (p53-Keimbahnmutation) (Malkin et al., 2006, Srivastava et al., 1990, van Hest et al., 2007) oder das Gorlin-Goltz-Syndrom (NBCCS; PTCH-Mutationen) (Lindström et al., 1990). Gelegentlich werden Medulloblastome durch einige komplexe Malformationen begleitet. Diese sind beispielsweise intestinale Malrotationen, Omphalocelen und Harnblasenextrophien (Ogasawara et al., 1988) sowie das Coffin-Siris-Syndrom (mit mentaler Retardierung, postnataler Wachstumsstörung, Gelenkschwäche und einer Brachydaktylie am fünften Finger). Die meisten Medulloblastome treten allerdings sporadisch auf.

2.3.8 Zytogenetische Aspekte

Das in 50% der Fälle auftretende Isochromosom 17q (Bjornsson et al., 1985; Griffin et al., 1988) gehört zu den häufigsten Medulloblastom-spezifischen Abnormalitäten. In der Mehrzahl der Fälle befindet sich die Bruchstelle im proximalen Bereich des kurzen Arms zwischen D17S689 und D17S95 bei 17p11.2 (Shapiro et al., 1989), einer sehr instabilen Region. Die resultierende Struktur ist dizentrisch. Neben diesem Mechanismus, der mit einem Kopiegewinn für 17q verbunden ist, fand man in einigen Fällen einen partiellen oder kompletten Verlust von 17p durch Deletion, unbalan-

zierter Translokation und Monosomie 17 (Biegel et al., 1992). Auch das Chromosom 1 ist häufig bei Medulloblastomen verändert. Die Abnormalitäten hier sind allerdings variabel und erstrecken sich von Deletionen, über unbalanzierte Translokationen bis hin zu Duplikationen. Wiederherstellungsversuche von Chromosom 1 resultieren häufig in einer Trisomie 1q ohne den Verlust des p-Arms. Weitere Deletionen sind auf Chromosom 10q (41%), 11 (41%) und verbunden mit Kopiegewinn auf Chromosom 7 (44%) zu detektieren (Reardon et al., 1997). An einigen isolierten Fällen fallen auch Deletionen in den Bereichen 6q, 9q, 10q, 16q auf.

2.3.9 Molekulargenetische Aspekte

In Fällen mit *double minutes* (Scheurlen et al., 1998) konnte eine Amplifikation von *c-Myc* (Badiali et al., 1991; Batra et al., 1994; Bigner et al., 1990) und etwas seltener auch von *n-Myc* (Tomlinson et al., 1994) nachgewiesen werden. Hierbei war die Inzidenz der Myc-Amplifikation in der großzelligen Tumorvariante besonders hoch (Brown et al., 2000). Aldosari et al. beschreibt 2002 eine Assoziation zwischen N-Myc-Amplifikation und schlechter Prognose und Michiels et al. diskutiert dies 2002 auch für eine L-Myc-Amplifikation.

Allgemein betrachtet ist der LOH von 17p, der in 30-45% der Tumoren vorzufinden ist, die häufigste molekulargenetische Alteration. Deshalb vermutet man, dass der Bereich 17p13.3 (Biegel et al., 1992; Koch et al., 1996; Mc Donald et al., 1994) für ein wichtiges Tumorsuppressorgen kodiert. *Tp53* ist ebenfalls auf Chromosom 17p13 lokalisiert. Mutationen können bekanntlich in einer großen Anzahl verschiedener Tumoren vorkommen, finden sich aber nur in 5-10% der Medulloblastome (Adesina et al., 1994; Alderson et al., 1996; Ohgaki et al., 1993). 10-18% der Fälle zeigen einen Allelverlust, der auf dem langen Arm von Chromosom 9 lokalisiert ist (Albrecht et al., 1994a; Schofield et al., 1995). Dort befindet sich der Lokus von NBCCS. Patienten mit NBCCS sind prädisponiert, Basalzellcarzinome und Medulloblastome vom desmoplastischen Typ (Schofield et al., 1995) zu entwickeln. Sie tragen eine inaktivierende Keimbahnmutation im *Patched*-Gen, dessen Genprodukt im Hedgehog/Patched Signalweg als negativer Wachstumsregulator fungiert und *Patched* entspricht deshalb einem Tumorsuppressorgen. *Patched*-Mutationen sind in 8% der sporadisch auftretenden Medulloblastome zu finden (Pietsch et al., 1997; Raffel et al., 1997; Vorechovsky et al., 1997; Wolter et al., 1997; Zurawel et al., 2000). In diesem Zusammenhang ist noch zu erwähnen, dass in einigen wenigen Fällen auch weitere Komponenten dieses Signalweges genetische Alterationen aufweisen, die alternativ zu seiner Aktivierung beitragen. Auch der WNT-Signalweg ist in einer Subgruppe sporadischer Medulloblastome aktiv. So konnte gezeigt werden, dass Medulloblastome in 13% der sporadisch auftretenden Fälle *APC*- oder β -*Catenin*- Mutationen tragen (Huang et al., 2000). Eine nukleäre β -*Catenin* Akkumulation zeigte Eberhart et al. 2000 für 18% der untersuchten sporadischen Medulloblastome. Neben Veränderungen des β -*Catenin*-Genes selbst können auch Gene, die den Destruktionskomplex dieses Signalproteins kodieren, in Medulloblastomen mutiert vorliegen. Beispielsweise wies Dahmen et al., 2001 Mutationen oder Deletionen des *Axin 1*-Genes in 12% der untersuchten Fälle auf. Punktmutationen in *Axin 1* wurden auch 2003 auch von Baeza et al. detektiert. Abschließend sei erwähnt, dass diese WNT-Signalwegaktivität in Medulloblastomen als positiver prognostischer Faktor angesehen werden darf (Ellison et al., 2005).

2.4 Ziele dieser Arbeit

Der WNT-Signalweg ist in einer Subgruppe von Medulloblastomen sowie in der Mehrzahl der von uns untersuchten Hepatoblastomproben aktiv. Die aberrante WNT-Aktivierung kann sowohl durch aktivierende Mutationen des β -Catenin Genes, als auch durch inaktivierende Mutationen in Genen wie *Axin* und *Conductin (Axin 2)* induziert werden. Axin und Conductin verhindern als Bestandteile des β -Catenin -Degradierungskomplexes die intranucleäre β -Catenin-Akkumulation und wirken somit als negativ Regulatoren des WNT-Signalweges. *Conductin (Axin 2)* ist darüberhinaus auch Zielgen des WNT-Signalwegs und wirkt gleichzeitig über einen inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus als negativ Negativregulator des WNT-Signalweges. Khang et al. zeigte 2002, dass auch Presenilin 1 unabhängig vom WNT- Signal eine Axin-ähnliche Funktion einnimmt und ebenfalls die Degradierung von β -Catenin fördert. Darüberhinaus wurde in diesem Zusammenhang eine potentielle Bedeutung des *Presenilin 1*-Genes als Tumorsuppressorgen diskutiert. Deshalb sollten an Medullo- und Hepatoblastomproben folgende Studien durchgeführt werden:

- Das *PS1*-Gen soll auf molekulargenetische Veränderungen wie Punktmutationen, Deletionen und Insertionen untersucht werden.
- Durch Analyse der mRNA-Expression soll die Hypothese einer potentiellen Bedeutung des *PS1*-Genes als Tumorsuppressorgen überprüft werden.
- Funktionelle Untersuchungen sollen zeigen, ob *PS1* wie *Conductin (Axin 2)* Zielgen des WNT-Signalweges in Medullo- und Hepatoblastomen ist und ob es über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die WNT-Signalwegaktivität hemmt.
- Die Bedeutung des *PS1*-Genes für die Vitalität und Proliferation von Medullo- und Hepatoblastomzellen soll durch ein indirektes Gene-Silencing unter Verwendung von *Nicastrin*-RNAs überprüft werden.

Presenilin 1 ist nicht nur negativ Regulator des WNT-Signalweg. Es kodiert auch die katalytische Komponente der γ -Secretase, die eine bedeutende Funktion im Notch-Signalweg hat. Wie der WNT-Signalweg, so ist auch der Notch-Signalweg in embryonalen Tumoren wie z.B. Medulloblastomen aktiv.

- Durch Proliferationsstudien unter Verwendung von γ -Secretaseinhibitoren soll hier die Bedeutung des Notch-Signalweges für die Tumorzellproliferation in Medullo- und Hepatoblastomen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungskollektiv

3.1.1 Medulloblastomkollektiv

Tumor	Geschlecht	Alter bei Diagnose- stellung (Jahre)	Probentyp	Histologie
D 83 II	w	6	ZL (MHH-MED-2)	klassisch
D 82	w	7	PT	desmoplastisch
D 368	w	3	ZL (MHH-MED-3)	klassisch
D 369	m	4	ZL (MHH-MED-4)	klassisch
D 210 II	w	34	PT	klassisch
D 212 II	m	24	PT	klassisch
D 322	m	51	PT	desmoplastisch
D 324	m	18	PT	klassisch
D 85 II	m	12	PT	klassisch
D 40 II	m	7	PT	desmoplastisch
D 218 II	m	59	PT	klassisch
D 224 II	w	31	PT	klassisch
D 226 II	m	21	PT	klassisch
D 230 II	w	13	PT	klassisch
D 237 II	m	12	PT	klassisch
D 239 III	m	3	PT	desmoplastisch
D 243 II	m	9	PT	klassisch
D 245 II	m	16	PT	klassisch
D 262	w	6	PT	klassisch
D 280	m	4	PT	klassisch
D 282	w	34	RT	desmoplastisch
D 330 II	m	4	PT	klassisch
D 331 II	m	8	PT	klassisch
D 333	m	4	PT	klassisch
D 187	m	14	RT	klassisch
D 366	m	10	PT	klassisch
D 378	m	8	PT	klassisch
D 442	w	31	PT	klassisch

Tumor	Geschlecht	Alter bei Diagnose- stellung (Jahre)	Probentyp	Histologie
D 391	m	9	PT	medullomyoblastisch
D 398	w	24	PT	desmoplastisch
D 448	m	4	PT	desmoplastisch
D 522	m	2	PT	klassisch
D 445	w	5	PT	klassisch
D 446	m	9	PT	klassisch
D 471	m	5	PT	klassisch
D 472	m	2	PT	klassisch
D 480	w	3	PT	klassisch
D 481 II	m	4 Monate	PT	klassisch
D 523	m	43	PT	desmoplastisch
D 354	m	3	PT	klassisch
D 491	w	13	RT	klassisch
D 529	w	13	RT	klassisch
D 538	m	24	PT	desmoplastisch
D 546	m	11	PT	klassisch
D 289	m	5	PT	klassisch
D 292	w	1	PT	desmoplastisch
D 293 II	w	3	PT	klassisch
D 492	m	7	PT	klassisch
D 286	m	13	PT	klassisch
D 545	m	6	PT	klassisch
D 409 II	w	8	PT	klassisch
D 567	m	5	PT	klassisch
D 353 III	m	11	PT	klassisch
D 569	m	2	PT	klassisch
D 663	w	25	RT	klassisch
D 295 III	m	4	PT	klassisch
D 288 II	w	13	PT	klassisch
D 350	w	12	PT	klassisch
D 806	m	2	PT	klassisch
D 755	m	19	PT	klassisch
D 810 II	m	22	PT	desmoplastisch
D 811 II	m	28	PT	klassisch
D 848	m	4	PT	klassisch
D 819 II	m	11	PT	klassisch

Tumor	Geschlecht	Alter bei Diagnose- stellung (Jahre)	Probentyp	Histologie
D 849	m	2 Monate	PT	desmoplastisch
D 1100	w	9	PT	klassisch
D 1011	m	1,5	PT	klassisch
D 1097	m	2	RT	klassisch
D 1103	w	2	Metastase	klassisch
D 1121	m	6	PT	klassisch
D 1127 B	m	5	PT	klassisch
D 1144	m	2	PT	desmoplastisch
D 999	m	2	PT	klassisch
D 1002	m	11	PT	klassisch
D 933	w	9	PT	klassisch
D 980	m	6	PT	klassisch
D 985	m	3	PT	klassisch
D 978	w	12	PT	desmoplastisch
D 1173	m	7	PT	klassisch
D 1165	m	4	PT	klassisch
D 1185	m	3	PT	großzellig-anaplastisch
D 1177	w	5	PT	klassisch
D 1049	w	11	PT	klassisch
D 1028	m	3	PT	desmoplastisch
D 1106	m	11	PT	klassisch
D 80 II	w	2	PT	klassisch
D 228 II	m	9	PT	klassisch
D 247 II	w	1 Monat	PT	klassisch
D 285 II	m	3	PT	klassisch
D 290	w	28	PT	desmoplastisch
D 294 II	m	4	PT	klassisch
D 336	m	10	PT	klassisch
D 337	m	13	PT	medullomyoblastisch
D 338	m	13	PT	klassisch
D 340	m	9	RT	klassisch
D 341	m	7	PT	klassisch
D 349 II	m	6	PT	klassisch
D 355	m	4	PT	klassisch
D 526	m	7	PT	klassisch
D 547	m	6	PT	klassisch

Tumor	Geschlecht	Alter bei Diagnose- stellung (Jahre)	Probentyp	Histologie
D 563	w	6	PT	klassisch
D 570	m	9	PT	klassisch
D 809 II	m	17	PT	klassisch
D 1075	w	9	PT	klassisch
D 1076	w	8	PT	klassisch
D 963	w	7	PT	klassisch
D 967	m	16	PT	klassisch
D 1198	w	37	PT	klassisch
D 2010	m	13	PT	klassisch
D 1105	m	19 Tage	PT	klassisch
D 365 III	m	4	ZL (Daoy)	desmoplastisch
D 193 II	m	6	ZL (D283MED)	klassisch
D 194 III	m	3	ZL (D341MED)	klassisch
D 803	m	5	ZL (D425MED)	Medulloblastom nws
D 804	w	7	ZL (D556MED)	großzellig-anaplastisch
D 192 II	m	10	ZL (MHH-1-MED)	klassisch
D 468	w	5	ZL (WÜ-1580)	klassisch
D 499	m	1	ZL (MEB-MED-8A)	klassisch
D 540	m	1	ZL (MEB-MED-8S)	klassisch
D 464	w	29	PT	klassisch
D 965	m	10	n.a.	klassisch
D 1400	m	21	PT	desmoplastisch
D 86	m	4	PT	desmoplastisch
D 1399	w	42	PT	desmoplastisch
D 1401	w	43	PT	desmoplastisch
D 1062	m	9 Monate	PT	desmoplastisch

Tabelle 1: Darstellung des Medulloblastomkollektivs mit Angabe von Geschlecht, Alter, Spezifität und Histologischem Befund, sofern bekannt. Insgesamt umfasste dieses Kollektiv 114 Medulloblastomproben und 12 Medulloblastomzelllinien. w = weiblich, m = männlich, PT = Primärtumor, RT = Rezidivtumor, n.a. = nicht angegeben, nws = nicht weiter spezifiziert

3.1.2 Hepatoblastomkollektiv

Tumor	Geschlecht	Alter bei Diagnosestellung (Monate)	Probentyp	Histologie
DZ 12	m	6	PT	Mischtumor
D 23	m	21	RT	Mischtumor
D 24	w	48	RT	epithelial
D 263	m	12	PT	epithelial
DZ 25	w	34	PT	epithelial, multifokal
DZ 23	m	22	PT	epithelial
DZ 29 II	m	13	PT	epithelial
D315	m	12	PT	epithelial
DZ 18/D 107	m	6	PT	epithelial
D 104	w	27	PT	epithelial
D 170 m	m	11	RT	epithelial
D 162	m	19	RT	epithelial, multifokal
D 123	w	3	RT	Mischtumor
D 269	w	9	PT	Mischtumor
D 6 II	w	11	PT	epithelial
D 272	m	12	PT	Mischtumor
D 199	w	25	PT	epithelial
D 175	m	16	PT	epithelial
D 268	w	6	PT	Mischtumor
D 195	m	19	RT	epithelial
D 197	m	54	RT	epithelial
D 304	w	42	PT	epithelial
D 306 IV	m	12	PT	epithelial
D 308	m	25	PT	epithelial
D 266	w	8	PT	Mischtumor
D 264	m	57	PT	epithelial
D 314	w	7	RT	Mischtumor
D 497	w	6	RT	epithelial
D 310	m	30	PT	Mischtumor
D 312	w	15	PT	Mischtumor
D 316	m	10	PT	epithelial
D 564	w	4	PT	epithelial
D 565	w	18	RT	Mischtumor
D 566	w	18	PT	epithelial

Tumor	Geschlecht	Alter bei Diagnose- stellung (Monate)	Probentyp	Histologie
D 169 II	w	40	PT	anaplastisch
D 318	w	17	PT	epithelial
D 319	m	4	PT	epithelial
D 200	w	4 Jahre	PT	epithelial
D 399 II	m	4	PT	epithelial
D 401	w	9	PT	Mischtumor
D 402	m	1	PT	Mischtumor
D 404	m	1	PT	epithelial
D 381	w	51	RT	epithelial
D 379	w	4	RT	Mischtumor
D 377	m	20	PT	Mischtumor
D 482	m	3	RT	Mischtumor
D 573/ D 697	m	32	PT	epithelial
D 583	m	2	PT	Mischtyp
D 695	m	38	PT	epithelial
D 675	w	143	PT	fetal
D 700	w	20	PT	epithelial
D 701	m	43	PT	epithelial, teratoid
D 719	w	11	PT	Mischtyp
D 842	m	36	PT	epithelial, mit HCC-Anteilen
D 840	m	13	PT	Mischtyp
D 422	m	18	PT	epithelial
D 159	w	34	ZL (HepT1)	epithelial
D 166	m	48	RT/ ZL (HepT2)	epithelial
D 204	m	9	PT/ ZL (HepT3)	Mischtumor
D161	w	11	PT/ ZL (HepT4)	epithelial
D717	w	1	PT/ ZL(HepT5)	epithelial/ multifokal
D 1569	m	47	ZL (HepT8)	epithelial, fetal
D 399	m	12	ZL (HUH6)	Mischtumor
D 388	m	15 Jahre	ZL (HepG2)	HCC
M 12	m	13	PT	epithelial
M 14	m	20	RT	epithelial
M 16	m	36	PT	epithelial

Tumor	Geschlecht	Alter bei Diagnose- stellung (Monate)	Probentyp	Histologie
D 760 - 783	***	***	***	***

Tabelle 2: Darstellung des Hepatoblastomkollektivs mit Angabe von Geschlecht, Alter, Spezifität und histologischem Befund, sofern bekannt. Insgesamt umfasste dieses Kollektiv 87 Hepatoblastomproben, 7 Hepatoblastomzelllinien und 1 kindliche hepatozelluläre Zelllinie. w = weiblich, m = männlich, PT = Primärtumor, RT = Rezidivtumor, HCC = Hepatocelluläres Karzinom, *** = Anonymisiertes, histopathologisch überprüftes Hepatoblastomkollektiv, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Thomlinson, Dallas, USA

3.2 Isolierung von DNA

3.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Leukozyten

Material und Lösungen

Blut-Lysispuffer:

155 mM NH_4Cl
 10 mM KHCO_3
 0.1 mM EDTA
 pH 7.4 autoklavieren

Tumor-(Kern-)-Lysispuffer:

10 mM Tris-Cl (pH 8.0)
 0.1 mM EDTA (pH 8.0)
 0.5 % SDS

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCL (pH 7.4)
 1 mM EDTA (pH 8.0)
 RNase, DNase frei (Roche)
 Proteinkinase K (10 mg/ ml) (Roche)
 Phenol:Chloroform:Isoamyl- (25:24:1) (Life-Technologies)
 Alkohol
 PBS (Life-Technologies)

Durchführung

Zunächst wurden 10 ml des heparinisierten Blutes mit dem kalten Blut-Lysispuffer versetzt und nach kurzem Schütteln für 15–30 Minuten auf Eis lysiert. Im Anschluss fand eine 12 minütige Zentrifugation bei 900 *g* statt. Das dabei gewonnene Pellet wurde in 200 μ l PBS gelöst, bevor es mit 6 ml Kern-Lysispuffer behandelt wurde. Als das Pellet vollständig resuspendiert war, erfolgte eine zunächst einstündige Inkubation mit RNase (100 μ g/ml) bei 37 °C. Nach kurzer Unterbrechung zwecks Zugabe von 60 μ l Proteinkinase K (10 mg/ml), wurde diese bei 50 °C über Nacht fortgesetzt. Zur Entfernung unerwünschter Proteine erfolgte die DNA-Aufreinigung, bei der zunächst ein Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Gemisches in einem gleichen Volumen (25:24:1) zu den Proben hinzugefügt wurde. Nach 30 minütiger Durchmischung zentrifugierte man für weitere 10 Minuten bei 1800 *g*. Die dabei entstandene wässrige Phase, die die DNA enthielt, wurde nun vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Noch zweimalig erfolgte die Zugabe von 1 Vol Chloroform, die beschriebene Durchmischung, Zentrifugation und Entfernung der wässrigen Phase. Dann erst wurde die DNA durch Behandlung mit 0,2 Vol 3 M Ammoniumacetat (pH 5,3) und 2,5 Vol Ethanol präzipitiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet getrocknet war, verwendete man abschließend zur Resuspension eine entsprechende Menge TE- Puffer.

3.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Tumor- und Normalgewebe

Mit Hilfe des Kryostaten wurden jeweils 100 μ m dicke Schnitte gewonnen, nachdem man einen Gefrierschnitt nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin mikroskopisch untersucht hatte, um sicherzugehen, dass die Proben nur das gewünschte Gewebe enthielten. Danach konnte die DNA-Extraktion unter Zugabe von 6 ml Tumor-(Kern)-Lysispuffer begonnen werden. Im Weiteren glich das Protokoll dem unter 2.2.1 beschriebenen.

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der sogenannten PCR handelt es sich um ein molekularbiologisches *in vitro*-Verfahren zur exponentiellen Amplifikation ausgewählter DNA-Sequenzen (Saiki et al., 1989). Startpunkte dieser Reaktion sind kurze, einzelsträngige Oligonucleotide, die im Durchschnitt ca. 20 bp umfassen. Charakterisiert sind diese sogenannten Primer durch ihre Komplementarität zu denjenigen DNA-Bereichen, die an die Ziel-DNA-Sequenz angrenzen. Zu Beginn der Reaktion wird die DNA bei 94 °C denaturiert, so dass sich der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge auftrennt. Dies ermöglicht nun den als Annealing bezeichneten Vorgang, der in der Anlagerung der Primer an die komplementäre Sequenz besteht. Die dabei zu wählende Temperatur ist Primer-spezifisch und hängt von der jeweiligen Länge und Basenzusammensetzung ab. Nun sind die Voraussetzungen für die Extension geschaffen. Diese besteht in der Elongation des durch die Oligonucleotide begonnenen komplementären Stranges, die von deren freien 3'-Hydroxylgruppe ihren Ausgang nimmt. Dabei werden durch ein entsprechendes Enzym komplementäre Nucleosidtriphosphate, die im Reaktionsgemisch vorhanden sein müssen, miteinander verknüpft. Die hierfür von uns verwendete Taq-Polymerase wird aus dem

hitzeinstabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnen und hat ein Temperaturoptimum von 72 °C. Die auf diese Weise gewonnenen DNA-Doppelstränge enthalten nun jeweils einen Matrizenstrang und einen komplementär dazu neu synthetisierten Einzelstrang. Je nach gewünschter Menge PCR-Produktes können diese Teilreaktionen beliebig oft zyklisch wiederholt werden. Abschließend sei noch erwähnt, dass sie im Allgemeinen durch eine anfängliche Denaturierung bei 94 °C über 5 Minuten eingeleitet und durch eine letzte Extensionsphase über 10 Minuten bei 72 °C abgeschlossen werden, die die Komplettierung teilsynthetisierter Stränge ermöglichen soll.

Material und Lösungen

Ansatz für 10 PCR-Versuche:

10 μ l	200 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	(Promega)
10 μ l	10x PCR-Puffer	(Life Technologies)
2/3/4 μ l	50 mM MgCl ₂ (für 1,0/1,5/2,0 mM; je nach Primer)	(Life Technologies)
5 μ l	10 pmol Primer forward	
5 μ l	10 pmol Primer reverse	
0.5 μ l	0.025 U Taq	(Life Technologies)
ad 100 μ l aqua bidest		
eventl. DMSO 10 %		(Sigma)

Durchführung

Das PCR-Reaktionsvolumen umfasste insgesamt 10 μ l, wobei jeweils 1 μ l (entsprechend 10–50 ng) DNA eingesetzt wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten, individuell optimierten PCR-Bedingungen, die aus, Annealing-Temperatur, Zyklusdauer, Zyklusanzahl und MgCl₂-Konzentration bestehen, sind in den entsprechenden Kapiteln detailliert aufgeführt. Die konstant durchgeführte initiale Denaturierung bei 94 °C über 5 Minuten und die terminale Extension bei 72 °C über 10 Minuten finden dort keine erneute Erwähnung.

3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient als Nachweisverfahren für PCR-Produkte von 0.5 bis 25 kb Länge. Ihr liegt das Prinzip der Beweglichkeit geladener DNA-Moleküle im elektrischen Feld zu Grunde. Diese ist von der Größe der Moleküle abhängig. Durch den fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der mit der DNA interkaliert, können die Banden des Amplifikationsproduktes sichtbar gemacht und unter Hinzuziehen eines Längenstandards bzgl. ihrer Größe eingeschätzt werden.

Material und Lösungen

2 %iges Agarosegel mit 15 μ l Ethidiumbromid (1 mg/ ml) pro 100 ml Gellösung:

Agarose-Ladepuffer:

15 % Ficoll Typ 400 (Sigma)
0.25 % Bromphenolblau (Sigma)
0.25 % Xylencyanol (Merck)
zum Gebrauch 2:5 mit aqua bidest verdünnt

10x TBE:

108 g Tris/ HCL
55 g Borsäure
40 ml 0.5 M EDTA
ad 1 l aqua bidest

Agarose-Laufpuffer:

0.5x TBE

Durchführung

Nach Hinzufügen von 5 μ l Ladepuffer wurden die PCR-Produkte auf ein 2 %iges Agarosegel geladen und in einer Pufferkammer mit 0.5x TBE unter einer Spannung von 180–200 Volt für 6–15 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt.

3.5 Mutationssuche mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (SSCP)

SSCP steht für *Single Strand Conformational Polymorphism*-Analyse und ist ein Nachweisverfahren für DNA-Mutationen und Polymorphismen (Hayashi et al 1993; Orita et al., 1989). Nach initialer Denaturierung trennt sich die DNA in ihre beiden Einzelstränge auf. Das Laufverhalten der Einzelstränge ist neben Größe, Ladung und Temperatur entscheidend von deren Konformation abhängig. Diese wird durch die Primärsequenz bestimmt. So kann bereits eine einzige Mutation z.B. in Form einer Basensubstitution zu einer Konformationsänderung und damit zu einem vom Wildtyp differierenden Laufverhalten des Fragmentes im elektrophoretischen Feld führen. Unter optimalen Bedingungen (Temperatur des Gels, Ionenstärke von Gel und Laufpuffer, Vernetzungsgrad der Polymere, Zusatz von Glycerol) wird dieses dann in dem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel nach Silberacrylamidfärbung in Form eines aberranten Laufverhaltens (Shift) augenscheinlich (vgl. 2.5.1). Eine solche aberrante Bande kann nun zur näheren Charakterisierung ausgeschnitten, eluiert, reamplifiziert und schließlich sequenziert werden. Letzteres wie unter 2.5.2, 2.5.3, 2.6 erläutert. Die Sensitivität dieser Methodik beträgt 75–80 % und sinkt mit zunehmender Fragmentgröße (>300 bp) (Michaud et al., 1992; Savov et al., 1992; Sheffield et al., 1993). Die optimalen SSCP-Bedingungen sind in der vorliegenden Arbeit für jedes Fragment individuell bestimmt worden. Alle Proben wurden unter jeweils zwei Konditionen untersucht, die sich u.a. in ihrem Vernetzungsgrad unterschieden. So versuchte man, die Sensitivität dieser Methode zu steigern.

Material und Lösungen

10 %ige Gelstocklösung mit einer Acrylamid:Bisacrylamid-Vernetzung von 29:1:

48.34 ml	40 % Acrylamid	(Life Technologies)
33.34 ml	2 % Bisacrylamid	(Life Technologies)
10 ml	10x TBE	
ad 200 ml aqua bidest		
5 % Glycerol (je nach Gelbedingung)		

200 μ l 20 % Ammoniumpersulfat und 20 μ l TEMED als Starter der Polymerisation für 20 ml Gelstocklösung

SSCP-Ladepuffer:

90 %	Formamid
10 %	10x TBE
0.01 %	SDS 1 mM EDTA
0.25 %	Bromphenolblau (Merck)
0.25 %	Xylencyanol (Merck)
0.06 M	NaOH

SSCP-Laufpuffer:

0.5x TBE

Durchführung

Das PCR-Produkt wurde mit dem SSCP-Ladepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt. Bei ca. 94 °C erfolgte nun die Denaturierung der Proben für 10 Minuten. Danach wurden die PCR-Produkte auf Eis gestellt. Jeweils 5 μ l der Proben konnten nun auf die nicht-denaturierenden Polyacrylamidgele geladen werden. Nach Anlegen einer Spannung von ca. 60 Volt bei Raumtemperatur (bzw. 80 Volt bei einer Außentemperatur von 4 °C) wurden die Proben über einen Zeitraum von 14–16 h (bzw. 18–20 h) elektrophoretisch getrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden wie unter 1.5.1 erläutert gefärbt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die individuell ermittelten PCR- und SSCP-Bedingungen der auf Mutation untersuchten Fragmente des *Presenilin 1*.

Fragment	Exon	Primer- <i>forward</i>	Primer- <i>reverse</i>	Fragment- länge	PCR-Bedingung	Acrylamid: Bisacrylamid- Verhältnis
A	4	TP2131 5'-CCTCA AGAGG CTTTG TTTTC -3'	TP2132 5'- GGGAG ATGAT AAGTG AATCC -3'	195 bp	94 °C für 30 sek. 58 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 37 Zyklen MgCl ₂ 2.0	10% 29:1 14% 49:1 + 10% Glycerol 22 °C
B	5	TP2133 5'- GCTGA GAATC TGATT TACTG -3'	TP2134 5'- TATTT CAATG TCAGC TCCTC -3'	187 bp	94 °C für 30 sek. 56 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 37 Zyklen MgCl ₂ 1.5	10% 29:1 14% 49:1 + 10% Glycerol 22 °C
C	5	TP2219 5'- GAAGA AGATG AGGAG CTGAC -3'	TP2220 5'- GCCTT CAAGG TGATG ATGAC -3'	215 bp	94 °C für 30 sek. 63 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 2.0	12% 29:1 + 10% Glycerol 14% 99:1 + 10% Glycerol 22 °C
D	6	TP2137 5'- TGGTA ATGTG GCTGG TGATC -3'	TP2138 5'-AAGAT CTGTG TCTCA TGCTC -3'	228 bp	94 °C für 30 sek. 63 °C für 40 sek. 63 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 37 Zyklen MgCl ₂ 2.0	8% 29:1 + 10% Glycerol 10% 79:1 + 10% Glycerol 22 °C
E	7	TP2327 5'- TTCTA GGTCA TCCAT GCC -3'	TP2328 5'- ATGAT AGTCA CACAG CAC -3'	138 bp	94 °C für 30 sek. 60 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 1.5	14% 49:1 14% 99:1 22 °C
F	8	TP2141 5'- TAATG TTTGG GAGCC ATCAC -3'	TP2142 5'-TACTT GATAA ACACC AGGGC -3'	218 bp	94 °C für 30 sek. 60 °C für 40 sek. 60 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 37 Zyklen MgCl ₂ 1.5	12% 29:1 14% 49:1 + 10% Glycerol 22 °C

Frag- ment	Exon	Primer- <i>forward</i>	Primer- <i>reverse</i>	Frag- ment- länge	PCR-Bedingung	Acrylamid: Bisacrylamid- Verhältnis
G	8	TP2143 5'- GACTC CAGCA GGCAT ATCTC -3'	TP2144 5'- GGGGC ATTCC TGTGA CAAAC -3'	154 bp	94 °C für 30 sek. 56 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 2.0	12% 29:1 + 10% Glycerol 14% 1:49 + 10% Glycerol 22 °C
H	9	TP2145 5'-CTACC ACCCA TTTAC AAGTT TAGC -3'	TP2146 5'- CTTCA AGTTC CCGAT AAATT CTAC -3'	228 bp	94 °C für 30 sek. 56 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 1.5 + DMSO	12% 29:1 10% 79:1 + 10% Glycerol 10% 79:1 + 10% Glycerol 22 °C
I	10	TP2147 5'- TTTGT GTGTC CAGTG CTTAC -3'	TP2148 5'- AGCTT ATAAC AGTGA CCCTG -3'	186 bp	94 °C für 30 sek. 60 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 2.0	10% 29:1 14% 79:1 14% 79:1 22 °C
J	11	TP2149 5'- GAGCT GTAAC TTCCA CTTTC -3'	TP2150 5'- GCTAC CTAAA GGAAT CCATG -3'	250 bp	94 °C für 40 sek. 60 °C für 50 sek. 72 °C für 50 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 2.0	12% 29:1 + 10% Glycerol 14% 49:1 + 10% Glycerol 14% 49:1 + 10% Glycerol 4 °C
K	12	TP2151 5'- CATAc CAAAG AGTGA CCAAC -3'	TP2152 5'- GACAT TAAGA GCTCT GACAC-3'	111 bp	94 °C für 30 sek. 56 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 1.5-2.0	12% 29:1 + 10% Glycerol 14% 99:1 + 10% Glycerol 14% 99:1 + 10% Glycerol 22 °C

Frag- ment	Exon	Primer- <i>forward</i>	Primer- <i>reverse</i>	Frag- ment- länge	PCR-Bedingung	Acrylamid: Bisacrylamid- Verhältnis
L	13	TP2153 5'- GTCTT TCCCA TCTTC TCCAC -3'	TP2154 5'- ATCCA TGGGA TTCTA ACCGC-3'	205 bp	94 °C für 30 sek. 63 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 2.0	12% 29:1 + 10% Glycerol 14% 99:1 22 °C

Tabelle 3: Auflistung der untersuchten Fragmente des *Presenilin 1*-Gens unter Angabe der Exone der zur Amplifikation verwendeten Primerpaare und der Fragmentlängen. Zusätzlich Angabe der optimalen PCR- und SSCP-Bedingungen. MgCl₂ in mM.

3.5.1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung ist ein sehr sensitives Verfahren zum Nachweis von DNA-Fragmenten in Polyacrylamidgelen (Budowle et al., 1991). Sie beruht auf der Eigenschaft von Nucleinsäuren, bei niedrigem pH-Wert Silberionen zu binden und hat eine Nachweisgrenze von 5 ng/ DNA-Bande. Mit Hilfe von alkalischem Formaldehyd gelingt es, komplex-assoziierte Silberionen zu reduzieren. Hierdurch fällt das Silber aus und die DNA-Banden erscheinen braun bis schwarz.

Material und Lösungen

SSCP-Laufpuffer:

10 %	Ethanol	(Riedel de Häen)
1 %	Salpetersäure	(Merck)
0.2 %	Silbernitrat	(Serva)
10 %	Essigsäure	(Merck)

Natriumbicarbonatlösung:

150 g	Na ₂ CO ₃	(Merck)
2.5 ml	Formaldehyd 35 %	(Merck)
ad 5 l aqua bidest		

Durchführung

Zur Fixierung der Nucleinsäuren in der Gelmatrix wurden die Gele zunächst für 5 Minuten in 10 %igem Ethanol geschwenkt. Anschließend erfolgte eine 1–2 minütige Behandlung mit 10 %iger Salpetersäure und ein einmaliges kurzes Waschen in aqua dest. Daraufhin wurden die Polyacrylamidgele in 0.2 %ige Silbernitratlösung gelegt und dort unter leichtem Schwenken für mindestens 20 Minuten belassen. Der Entwicklungsvorgang konnte nun nach mehr-

maligem sorgfältigen Waschen der Gele in aqua dest durch Zugabe von Natriumbicarbonat-Formaldehyd-Lösung eingeleitet werden. Unter Reduktion der Silberionen ist ein Sichtbarwerden der DNAProdukte als Banden zu beobachten gewesen. Gestoppt wurde diese Reaktion, wenn die Banden deutlich braun gefärbt erschienen, durch Behandlung der Gele mit 10 %iger Essigsäure für ca. 1 Minute. Nach gründlichem Auswaschen der Essigsäure mit aqua dest wurden die Polyacrylamidgele auf einem Vakuumtrockner bei ca 80 °C für 2 h getrocknet.

3.5.2 Isolierung der aberrant laufenden Banden aus dem SSCP-Gel und Reamplifizierung durch PCR

Proben mit aberrantem Laufverhalten, die wiederholt auftraten, wurden vor dem Trockenvorgang aus dem SSCP-Gel ausgeschnitten und mit 50 μ l Elutionspuffer versetzt. Bei 50 °C wurden sie über Nacht geschüttelt, um die DNA aus dem Acrylamidgel zu lösen.

Material und Lösungen

DNA Elutionspuffer:

0.5 M	Ammoniumacetat
10 mM	Magnesiumacetat
1 mM	EDTA 0.1 % SDS

Durchführung

Nach erfolgter Elution wurde die DNA mit 125 μ l Ethanol absolut gefällt und über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 4 °C und 10000 *g* zentrifugiert. Im Anschluss daran ist das entstandene Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und für weitere 10 Minuten im Speed Vac getrocknet worden. Die so gewonnene DNA konnte nun nach Resuspension in 10 μ l aqua bidest erneut als Matrize in die sogenannte Reamplifizierung-PCR eingesetzt werden. Als Reaktionsvolumen wurden hierbei 40 μ l gewählt; die PCR Bedingungen für das jeweilige Primerpaar blieben identisch (siehe Tab. 2.5). Nach erfolgreicher Reamplifizierung konnten die Proben aufgereinigt und schließlich sequenziert werden.

3.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung

Ziel der Aufreinigung war es, Primer, überschüssige Nucleotide, Salze und die Taq-Polymerase zu entfernen, damit durch sie keine Signalüberlagerungen bei der Sequenzierreaktion entstehen konnten. Hierzu verwendete man Affinitätssäulen der Firma Qiagen (QIAquick-spin Purification Kit 250) und verfuhr gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Material und Lösungen

DNA Elutionspuffer:

Puffer PB	(Qiagen)
Puffer PE	(Qiagen)
Puffer EB	(10 mM, Tris Cl, pH 8.5)
Säule	Qiaquick

Durchführung

Nachdem das aufzureinigende Produkt mit dem fünffachen Volumen an Puffer PB versetzt und durchmischt worden war, konnte es auf eine QIAquick-Säule mit dazugehörigem Sammelgefäß (Collection Tube) überführt werden. Dieses wurde dann für 1 Minute bei Raumtemperatur und 10 000 *g* zentrifugiert. Der dabei im Collection Tube aufgesammelte Durchlauf konnte verworfen werden. Nun erfolgte das Waschen des Produktes durch Zugabe von zunächst 500 μ l Puffer PE und erneute Zentrifugation zu gleichen Konditionen. Der Waschvorgang wurde anschließend unter Verwendung von 200 μ l Puffer PE noch einmal wiederholt. Zur Elution der DNA wurde die Qiaquick-Säule in ein neues Tube überführt und mit etwa 30 μ l Puffer EB versetzt. Nach 2 minütiger Inkubation erfolgte durch eine abschließende Zentrifugation die Herauslösung des nun aufgereinigten PCR-Produktes aus der Membran der Affinitätssäule. Dieses konnte direkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden.

3.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzier-Methode, die von Sanger et al. 1977 entwickelt wurde, kann auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet werden. Sie bietet die Möglichkeit, einzelsträngige cDNA sowie gDNA, die nach initialer Denaturierung als Einzelstrang in der Sequenzierreaktion vorliegt, zu analysieren. Hierbei kommt den normalen Nukleotiden zugesetzten 2',3'-Didesoxynukleotiden (ddATP/ddTTP/ddCTP/ddGTP) eine besondere Bedeutung zu. Fluoreszenzmarkiert fungieren sie als Terminatoren der Amplifikation, so dass ihr Einbau den Kettenabbruch zur Folge hat. Bei ausreichender Menge eingesetzter und während der Reaktion neu synthetisierter Matrizen-DNA kann man auf diese Weise Fragmente erhalten, deren Größe im Bereich Primerlänge + 1 bis Gesamtfragmentlänge variiert. Gleich ist allen Produkten, dass die letzte zum Abbruch führende Base fluoreszenzmarkiert ist und ein für sie spezifisches Farbsignal abgibt. Dies bietet die Möglichkeit, die Basenabfolge eines Fragmentes mit Hilfe eines Sequenziergerätes zu visualisieren. Zur Durchführung der Sequenzierreaktion wurde das PRISMTMReady Reaction Dye DeoxyTMTerminator Cycle Sequencing Kit von PerkinElmer/Applied Biosystems und der automatische Sequenzierer Abi 377 verwendet.

Material und Lösungen

PRISMTMReady Reaction Dye DeoxyTMTerminator Cycle Sequencing Kit (PerkinElmer/
Applied Biosystems)

Mix für die Sequenzierreaktion:

2 μ l Terminator Premix (Applied Biosystems)
20 ng Template
1.6 pmol Primer
ad 10 μ l aqua bidest

6%iges Sequenziergel:

30 g Harnstoff
9 ml AA-Stammlösung 40 % (Life Technologies)
6 ml 10x TBE
23.5 ml aqua bidest

Filter (Porengröße 0.2 μ m)

Reagentien zur Induktion der Polymerisation: 180 μ l APS, 10 %; 24 μ l TEMED

Laufpuffer: 1x TBE Ladepuffer: Formamid (98 %): EDTA (50 mM, pH 8,0) = 4 : 1

Durchführung

Die Sequenzierreaktion, die mit Hilfe des Gene Amp 9600 Thermocycler der Firma PerkinElmer durchgeführt wurde, gliederte sich in folgende Teilreaktionen: Initiale Denaturierung bei 96 °C für 2 Minuten; 25 Zyklen der Sequenz; Denaturierung bei 96 °C für 10 sek.; Alignment bei 50 °C für 10 sek.; Extension bei 60 °C für 4 min. Anschließend erfolgte die Fällung der Proben mit 0.1 Vol 3 M NaAc (pH 5.3) und 2.5 Vol Ethanol. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14 000 *g* wurde der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet mit 250 μ l 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut für 10 min bei 4 °C und 14 000 *g* zentrifugiert und im Anschluss daran vakuumgetrocknet. In 4 μ l Ladepuffer konnten die Proben resuspendiert werden. Bei 94 °C erfolgte dann über 2 Minuten die Denaturierung. Um eine Reassoziaton der DNA-Doppelstränge zu vermeiden, wurden die Proben unmittelbar danach auf Eis aufbewahrt, bis sie auf das 6 %ige Polyacrylamidgel geladen wurden. Die Auftrennung erfolgte unter den in Tabelle 2.4 aufgelisteten Bedingungen. Mit den Programmen ABI PrismTM377 Collection version 2.5.1 und Sequencing Analysis 3.3 konnten die Proben ausgewertet werden. Alle Sequenzierungen erfolgten mit dem automatischen Sequenzierer Typ 377 der Firma ABI. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die sequenzierten DNA-Fragmente mit aberrantem Laufverhalten im SSCP-Gel.

Frag- ment	Primer- <i>forward</i>	Primer- <i>reverse</i>	Frag- ment- länge	PCR-Bedingungen
A	TP2131-PS1 5'-CCTCAAGA GGCTTTGTT TTC-3'	TP2132-PS1 5'-GGGAGATG ATAAGTGAA TCC-3'	195 bp	94 °C für 30 sek. 58 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insges. 37 Zyklen MgCl ₂ 2.0
F	TP2141-PS1 5'-TAATGTTT GGGAGCCAC AC-3'	TP 2142-PS1 5'-TACTTGAT AAACACCAG GGC-3'	218 bp	94 °C für 30 sek. 60 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 37 Zyklen MgCl ₂ 1.5
H	TP2145-PS1 5'-CTACCACC CATTTACAA GTTTAGC-3'	TP2146-PS1 5'-CTTCAAGT TCCCGATAA ATTCTAC-3'	282 bp	94 °C für 30 sek. 60 °C für 40 sek. 72 °C für 40 sek. Insg. 40 Zyklen MgCl ₂ 1.5 +DM- SO

Tabelle 4: Für die Sequenzierreaktion verwendete Primer und PCR-Bedingungen, MgCl₂ in mM.

Elektrophoretische Spannung	1680 Volt
Elektrophoretischer Strom	50 mA
Elektrophoretische Arbeit	150 Watt
Temperatur des Gels	51 °C
Laser Arbeit	40 mW
Laufzeit	7 h
Anzahl der Scans	8252

Tabelle 5: Sequenzierungsbedingungen (Abi Prism 377)

3.7 Deletionssuche mit Hilfe des PCR- und RT-PCR-Verfahrens

Der kodierende Bereich des *Presenilin 1* Gens erstreckt sich über die Exone 4–12. Diese sind mit Hilfe der PCR- und RT-PCR-Methodik auf große, exonübergreifende Basenverluste untersucht worden. Hierbei setzte man als Template sowohl cDNA als auch genomische DNA in die PCR ein. Die cDNA konnte durch das Verfahren der reversen Transkription aus Tumor- und Normalgewebe gewonnen werden, wie unter 2.9 beschrieben.

Exon	Primer- <i>forward</i>	Primer- <i>reverse</i>	Fragmentlänge cDNA/ gDNA	PCR- Bedingungen
4-12	TP2325-PS1-del 5'-TGAAAGAA AGAACCTCA AGAGGC-3'	TP2326-PS1-del 5'-AAACATCC ATGGGAGGC TAACCG-3'	1485 bp/ 3056 bp	94 °C für 50 Sek 58 °C für 60 sek. 72 °C für 60 sek. Insges. 45 Zyklen MgCl ₂ 1.0 mM

Tabelle 6: Primersequenzen und PCR-Konditionen für das PCR/RT-PCR-Verfahren

Durchführung

Gemäß den in der Tabelle angegebenen Konditionen fanden PCR und RT-PCR in einem Reaktionsvolumen von 40 μ l statt. Die dabei erzielten Amplifikationsprodukte wurden gemeinsam mit einem Längenstandard auf 2 %ige Agarosegele aufgetragen und bei 180 V über 15 min elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht-Bestrahlung konnten nun die geladenen Proben als Banden sichtbar gemacht werden.

3.7.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und Aufreinigung mit dem QIAquick Gel-Extraktions-Kit

6 μ l eines 6x Agarose-Ladepuffer wurden auf 40 μ l des PCR-Produktes pipettiert. Dann lud man das gesamte Volumen auf ein 2 %iges Agarosegel und ließ dies in einer entsprechenden Pufferkammer mit 0.5x TBE bei 180 V über 15 min laufen. Nach elektrophoretischer Auftrennung konnten die für die Produkte repräsentativen Banden unter UV-Licht detektiert, ausgeschnitten und in einem 1.5 ml Reaktionsröhrchen gesammelt werden. Mit Hilfe einer Analysenwaage erfolgte die Bestimmung des Gewichtes. Im folgenden wurde die DNA unter Verwendung des QIAquick Gel-Extraktions-Kit der Firma QIAGEN isoliert und aufgereinigt.

Material und Lösungen

Puffer OG	(Qiagen)
Puffer PE	(Qiagen)
Puffer EB	(10 mM Tris Cl, pH 8.5)
Isopropanol (100 %) Säule	QIAquick

Durchführung

Zu den gewogenen Banden wurde zunächst das dreifache Volumen an OG-Puffer pipettiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei 50 °C erfolgte die Übertragung dieser Lösung auf eine QIAquick-Säule, die sich in einem Sammelgefäß befand. Handelte es sich bei den DNA-Produkten um Fragmente, die kleiner als 300 bp waren, so konnte durch Zugabe von Isopropanol an dieser Stelle eine größere Ausbeute erzielt werden. Nun erfolgte die Zentrifugation für 1

min bei Raumtemperatur und 10 000 *g*. Zur vollständigen Entfernung von Agaroserückständen fügte man noch einmal 500 μl OG-Puffer hinzu und zentrifugierte für eine weitere Minute. Der dabei entstandene Durchlauf wurde verworfen, bevor das Waschen der DNA in 750 μl Puffer PE und zweimalig eine Zentrifugation unter oben erwähnten Bedingungen erfolgte. Nach Überführung der QIAquick-Säule in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß, wurden 30 μl Puffer EB auf die Membran der Affinitätssäule pipettiert. Zwei Minuten später vollzog man durch eine abschließende Zentrifugation bei 12 000 *g* die Elution der aufgereinigten DNA, die direkt als Template in die Sequenzierreaktion eingesetzt werden konnte.

3.8 Isolierung von RNA

3.8.1 Isolierung von total zellulärer RNA mit Trizol

Die zelluläre RNA wurde überwiegend mit Trizol extrahiert. Hierbei orientierte man sich im Wesentlichen an dem Protokoll von Life Technologies.

Material und Lösungen

Trizol Reagenz	(Life Technologies)
Chloroform	(Merck)
75 % Ethanol	
Isopropanol	
DEPC behandeltes Wasser	
(0.1 % DEPC, 2 h bei 37 inkubieren, autoklavieren)	

Durchführung

Von dem in flüssigem Stickstoff gelagerten Tumormaterial wurden mit Hilfe des Kryostaten 50–100 $10\ \mu\text{m}$ dicke Dünnschnitte angefertigt. Im Anschluss erfolgte in 750 μl Trizol deren Resuspension und Homogenisierung. Mikroskopisch wurde das Gewebe kontrolliert, wie unter 2.2 beschrieben. Nach Zugabe von 150 μl Chloroform wurden alle Proben geschüttelt und zur Phasentrennung für 15 min bei 4 °C und 12 000 *g* zentrifugiert. In der oberen wässrigen Phase befand sich nun die RNA, die untere enthielt die DNA und Proteine. Nach Überführen der oberen Phase in ein neues Tube, erfolgte bei Raumtemperatur die Fällung der RNA mit 250 μl Isopropanol für 10 min. Nach erfolgter Inkubation der RNA mit Isopropanol fand eine erneute Zentrifugation der Suspension für diesmal 10 min bei 4 °C und 12 000 *g* statt. Nun konnte der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet in 75 %igem Ethanol gewaschen werden. Anschließend ließ man das Pellet vollständig trocknen, bevor es in DEPC-behandeltem aqua bidest resuspendiert wurde. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

3.8.2 Behandlung der RNA mit DNase I

Um Kontaminationen der wie unter 2.8.1 gewonnenen RNA mit genomischer DNA zu eliminieren, erfolgt im Anschluss an die Extraktion ein DNase-Verdau.

Material und Lösungen

DNase I, RNase-frei (10 U/ μ l)	(Boehringer Mannheim)
10x DNase-Puffer	(Roche)
Rnasin (40 U/ μ l)	(Promega)

Durchführung

Nach Zugabe von 3 μ l DNase Puffer, 2 μ l RNasin und 1 μ l DNase I wurden die 24 μ l RNA für 90 min bei 37 °C inkubiert. Um die DNase nun wieder zu entfernen, wurde eine weitere Trizol-Extraktion wie unter 2.8.1 beschrieben durchgeführt. Zur Resuspension der RNA verwendete man diesmal 30–100 μ l DEPC-behandeltes aqua bidest. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte photometrisch bei 260–280 nm.

3.9 Synthese von cDNA

Material und Lösungen

SuperScriptTMPreamplification System (Life Technologies)

Durchführung

Zur reversen Transkription der RNA verwendete man das SuperScriptTMPreamplification System für die cDNA-Erststrangsynthese von Life Technologies gemäß dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Zunächst wurden zu 250–500 ng der RNA 1 μ l eines Zufallsprimers (random hexamer; 50 ng/ml) pipettiert und durch Zugabe von DEPC-behandeltem aqua dest ein Gesamtvolumen von 12 μ l erzielt. Im Anschluss daran fand eine 10 minütige Inkubation bei 70 °C statt. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt worden waren, erfolgte die reverse Transkription. Dafür gab man 10x-PCR-Puffer, MgCl₂, dNTP-Mix, DTT und 0,7 μ l reverse Transcriptase (50 U/ml) zu den Proben und inkubierte diese dann für 10 min bei Raumtemperatur. Danach folgte eine weitere Inkubation für 50 min bei 42 °C. Durch 15 minütiges Erhitzen auf 70 °C wurde die Reaktion zum Abschluss gebracht. Die so gewonnene cDNA konnte 1:5 oder 1:10 mit aqua bidest verdünnt in die PCR eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

3.10 Kompetitive RT-PCR (cRT-PCR) zur Quantifizierung von Gentranskripten

Ein auf der reversen Transkriptase-PCR beruhendes kompetitives Verfahren wurde verwendet, um die mRNA-Expression des Genes *Presenilin 1* semi-quantitativ darzustellen. Im Vergleich zu Northern-Blot und zum Ribonuclease-Protection Assay war für die kompetitive RT-PCR ca. 100 Mal weniger zelluläre Total-RNA einzusetzen. Sie stellte sich darüber hinaus als schnelle und einfache Methode zur Analyse des Expressionsverhaltens eines Genes in einem großen Probenkollektiv dar. Mit einer hohen Sensitivität erlaubte sie auch die Detektion geringerer mRNA Mengen, die mit anderen Verfahren nicht zu analysieren gewesen wären. Für die cRT-PCR wurden zunächst exogene, sequenz-spezifische Kompetitor-RNA-Moleküle synthetisiert, die über die gleichen Primersequenzen wie die Zielgene verfügten. Im Unterschied zu diesen jedoch wiesen sie eine Deletion von den 10-20 unmittelbar vor dem reversen Primer gelegenen Basenpaaren auf. Der darauf basierende Größenunterschied ermöglichte die elektrophoretische Unterscheidung von Kompetitor (internem Standard) und Zielgenprodukten. Hergestellt wurden diese kompetitiven RNA-Moleküle durch Mutagenese und Addition eines T7-Motors. Dies wurde in einem einzigen PCR Schritt erzielt. Im Anschluss erfolgte eine in-vitro Transkription. In Vorexperimenten konnte mittels Titration die optimale Kompetitor-RNA-Konzentration ermittelt werden, die der Ziel-RNA zugegeben werden musste, bevor die reverse Transkription gestartet werden konnte. Bei Raumtemperatur wurden nun Kompetitor-RNA und Ziel-RNA mit derselben Effizienz transkribiert. Da sie gleichen PCR-Primern und PCR-Bedingungen unterlagen, galt dies auch für die Amplifikation. Deswegen ließ sich so aus der Analyse der Relation von Produkten aus Ziel-RNA / Produkten aus Kompetitor-RNA eine zuverlässige Angabe über die mRNA Menge in einem Tumor machen (Waha et al., 1998). Damit verschiedene Proben, so z.B. aus Tumor und entsprechendem Normalgewebe, verglichen werden konnten, bedurfte es der Expressionanalyse eines sogenannten Haushaltgens. In dieser Arbeit wurde hierfür *β 2-Mikroglobulin* gewählt, dessen Expression das Maß für die in die RT-PCR eingesetzte Menge an RNA und deren Qualität war. Unter Berücksichtigung der Relation der Expression des Zielgens zur Expression des Haushaltgens konnten die Expressionsdaten normalisiert werden. Abschließend sei erwähnt, dass der reverse Primer bei diesen Experimenten jeweils fluoreszenzmarkiert war, so dass bei der Analyse ein halbautomatisches Sequenziergerät verwendet werden konnte.

3.10.1 Herstellung der exogenen Kompetitor-RNA-Moleküle

Material und Lösungen

dNTP's (dATP/ dGTP/ dCTP/ dTTP)	(Life Technologies)
10x PCR-Puffer	(Life Technologies)
50 mM MgCl ₂	(Life Technologies)
Taq DNA-Polymerase	(Life Technologies)

T7-RNA-Polymerase Kit	(Stratagene)
QIAquick-spin PCR Purification Kit 250	(Qiagen)
RNeasy Quickspin columns	(Qiagen)
DNase I, RNase-frei (10 U/ μ l); 10x DNase-Puffer	(Roche)
Rnasin (40 U/ μ l)	(Promega)
DEPC-behandeltes aqua bidest	

Durchführung

Zur Synthese der exogenen Kompetitoren für die Transkripte der Gene *Presenilin 1* und *β 2-Mikroglobulin* bedurfte es zunächst der Zusammenstellung eines cDNA-Pools aus Tumor- und Normalgeweben. Zur Amplifizierung der Zielfragmente bediente man sich der Methodik der PCR. Die dabei gewonnenen Produkte wurden mit einem entsprechenden Längenstandard auf ein 2 %iges Agarosegel geladen und über 15 min bei 180 V elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die Banden sichtbar gemacht und ausgeschnitten werden. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit. Anschließend konnten 10 ng des aufgereinigten Produktes als Matrize in die Mutagenese-PCR eingebracht werden. In dieser wurden sowohl die Deletion der 10–20 vor dem reversen Primer gelegenen Basenpaare, als auch die Addition des T7-Promotors vollzogen. Die PCR fand in einem Reaktionsvolumen von 30 μ l statt und oblag den gleichen PCR-Bedingungen wie zuvor die Amplifikation des Zielgens. Lediglich die Primer wurden durch einen den T7-Überhang tragenden *forward* und den entsprechenden *reversen* Mutagenese-Primer ersetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Uno Biometra Thermoblock Cykler (Biometra) unter den in Tabelle 2.7 aufgeführten Konditionen. Der Mastermix enthielt 200 mmol/l jedes dNTPs, 15 pmol jedes Primers und 0,75 U Taq-Polymerase. Bereits im ersten Zyklus der Mutagenese-PCR fanden die entscheidenden Bindungsreaktionen statt, die auf dem besonderen Design der Primer beruhten. Am Ende des Templates lagerte sich der Mutageneseprimer unmittelbar vor den später deletierten Basenpaaren an. Gleichzeitig band der *forward*-Primer mit dem T7-Überhang, wodurch das Fragment um genau diese Anzahl später verlorener Basen verlängert wurde. So wird bereits ab dem zweiten Zyklus der PCR nahezu ausschließlich ein Produkt amplifiziert, das die gewünschte Deletion am Ende und den eingefügten T7-Überhang am Anfang trägt. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden die Produkte mit dem QIAquick-spin PCR Purification Kit 250 aufgereinigt. Im Anschluss erfolgte die *in vitro*-Transkription in einem Reaktionsvolumen von 25 μ l mit je 0,5 μ g mutierter Template-cDNA und 10 U T7-RNA-Polymerase, wie vom Hersteller protokolliert. Im Folgenden fand der DNase-Verdau der Template-cDNA in einem Reaktionsvolumen von 30 μ l statt. Unter Verwendung von 100 U RNase freier DNase I und 40 U RNasin wurde hierbei analog zum Firmenprotokoll verfahren. Im Anschluss erfolgte erneut eine Aufreinigung, diesmal mit dem RNeasy Quickspin columns nach dem Protokoll der Firma Qiagen. Nachdem die RNA in 30 μ l DEPC-behandeltem Wasser gelöst worden war, wurde die Konzentration der so synthetisierten Kompetitoren mittels Spektrophotometrie bestimmt.

Gen	Primer- <i>forward</i>	Primer- <i>reverse</i>	Mutagenese- primer	PCR- Bedingungen
<i>Presenilin 1</i>	TP 1534-Pres1- Exp- <i>forward</i> 5'-CCCCATTCA CAGAAGATAC C-3'	TP 1535 bzw. 1681-Pres1-Exp- <i>reverse</i> 5'-GGCATGGA TGACCTTATA GC-3'	TP-Pres-T7 5'-GGATCCT AATACGAC TCACTATA GGGAGGCC CCATTCAC AGAAGATA CC-3' TP-Pres-mut 5'-GGCATGG ATGACCTT ATATGCAC CAGGAGGA TAGTCATG AC-3'	94 °C für 30 Sek 54 °C für 40 Sek 72 °C für 40 Sek Insges. 35 Zyklen MgCl ₂ 2.0 mM
<i>β2Mikroglobulin</i>	TP 1684-MIC- exp- <i>forward</i> 5'-TGTCTTTCA GCAAGGACTG GC-3'	TP 1685-MIC- exp- <i>reverse</i> 5'-GATGCTGC TTACATGTCT CG-3'	TP 1684-MIC- T7 5'-GGATCCT AATACGAC TCACTATA GGGAGGTG TCTTTCAG CAAGGACT GG-3'	94 °C für 30 Sek 57 °C für 40 Sek 72 °C für 40 Sek Insges. 40 Zyklen MgCl ₂ 1.5 mM

Gen	Primer- <i>forward</i>	Primer- <i>reverse</i>	Mutagenese- primer	PCR- Bedingungen
			TP 1241-MIC- mut 5'-GATGCTG CTTACATG TCTCGGCT GTGACAAA GTCACATG G-3'	

Tabelle 7: PCR-Bedingungen zur Herstellung der exogenen RNA-Kompetitor-Moleküle, PS1=*Presenilin 1*

3.10.2 Semiquantitative RT-PCR

Um den Umfang der Transkription des Genes *Presenilin 1* sowie des Haushaltsgens $\beta 2$ -Mikroglobulin zu erfassen, fertigte man zunächst eine serielle Verdünnungsreihe der Kompetitor-RNA an, ausgehend von 500 pg bis zu 10 fg; für $\beta 2$ -Mikroglobulin wurde das Zehnfache eingesetzt. Mit 0,25 μ g gesamtzellulärer RNA aus gepooltem Tumor- und Normalgewebe vollzog man dann mit jeder Verdünnungsstufe eine reverse Transkription. Um die optimale Titration bestimmen zu können, verwendete man bei der anschließenden RT-PCR einen fluoreszenzmarkierten reversen Primer. Die Produkte wurden nun auf ein 4,5 %iges Polyacrylamidgel geladen und mit Hilfe eines Sequenziergerätes analysiert. Dabei galt diejenige Titrationsstufe als optimal, bei der sich Tumor- bzw. Normalgewebepool-RNA und Kompetitor-RNA quantitativ entsprachen.

Material und Lösungen

4,5 %iges Sequenziergel (siehe 2.6)

Ladepuffer: deionisiertes Formamid (pH 7,2) (Ambion)

Laufpuffer: 1x TBE

Durchführung

Wie unter 2.7 beschrieben wurde die RT-PCR durchgeführt. Hierbei war der reverse Primer fluoreszenzmarkiert, um die Produkte auf dem Sequenziergerät (ABI 377, Applied Biosystems) quantitativ bestimmen zu können. Zur Auswertung wurde folgende Software genutzt: ABI PrismTM377; Gene Scan Analysis 3.1; Gene Scan 3.1 und Genotyper 1.1. Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit dem Ladepuffer verdünnt und nach 2 minütiger Denaturierung bei 94 °C sofort auf Eis gestellt. Dann sind sie auf ein 4,5%iges Polyacrylamidgel geladen und mit dem Sequenziergerät elektrophoretisch aufgetrennt worden. Die dabei vorherrschenden Bedingungen sind der Tab. 2.8 zu entnehmen. Nach visueller Abschätzung der optimalen Titrationsstufe wurden die entsprechenden Mengen an Kompetitoren zusammenpipettiert. Die

jeweils kalkulierte Menge dieses Kompetitorgemisches wurde dann zu je 250 ng der einzelnen Total-RNA-Extrakte der zu untersuchenden Tumore und der angrenzenden Normalgewebe, der Zelllinien und Positivkontrollen gegeben. Mit diesem Gemisch erfolgte nun die reverse Transkription. Die erhaltenen cDNA Produkte wurden nun unter Verwendung eines genspezifischen fluoreszenzmarkierten reversen Primers im Rahmen einer RT-PCR amplifiziert. (Bedingungen siehe Tab. 2.7) Zeigten sich nach der Sequenzierung große Differenzen in Signalstärke von Tumor-RNA und Kompetitor-RNA, so wurde diese Methodik auch in der darüber und darunter liegenden Titrationsstufe durchgeführt.

Elektrophoretische Spannung	2000 Volt
Elektrophoretischer Strom	50 mA
Elektrophoretische Arbeit	150 Watt
Temperatur des Gels	51 °C
Laser Arbeit	40 mW
Laufzeit	20–30 min (in Abhängigkeit von der Fragmentlänge)

Tabelle 8: Sequenzierungsbedingungen (Abi Prism 377)

3.10.3 Auswertung der Rohdaten

Zur Berechnung des individuellen Umfangs der Expression des *Presenilin 1* Genes bildete man den Quotienten aus Proben-Produkt und Kompetitor-Produkt. Fehler, die durch verschiedene Mengen oder unterschiedliche Qualität eingesetzter RNA eventuell entstanden waren, sollten bei der Auswertung als Differenzen zwischen den individuellen Werten sichtbar gemacht werden. Deshalb wurde der für das Zielgen berechnete Quotient noch einmal durch den auf gleiche Weise für den Housekeeper erhaltenen Wert dividiert. Zusammenfassend kam also zum Vergleich der individueller Proben mit den entsprechenden Gewebeproben folgende Formel zum Tragen:

Zielgen Probe /Zielgen Kompetitor

Haushaltsgen Probe/Haushaltsgen Kompetitor

3.11 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methodik des ECL-Western Blot verwendet. Dieses nicht-radioaktive Verfahren beruht im Allgemeinen auf dem Prinzip der Lichtemission und dient der direkten oder indirekten Detektion unbeweglicher spezifischer Antigene durch HRP-markierte Antikörper. Im Detail basiert es auf der HRP/Hydrogen-Peroxid-katalysierten Oxidation des zyklischen Diacylhydrazid Luminol unter alkalischen Bedingungen. Dadurch wird dieses in einen erregten Zustand versetzt. Durch eine weitere unverzüglich folgende Oxidation gelangt es wieder in seinen Grundzustand, wobei es zur

Emission von Lichtstrahlen kommt. Eine Verstärkung dieser Reaktion findet statt, wenn chemische Enhancer, wie z.B. Phenole anwesend sind. Die ECL-Reaktion erreicht ihren Höhepunkt nach 5–20 min und schwächt dann mit einer Halbwertszeit von ungefähr 60 min ab. Die maximale Lichtemission befindet sich bei einer Wellenlänge von 428 nm und kann mit autoradiographischen Filmen erfasst werden. Im Wesentlichen umfasst die Methodik folgende fünf Teilschritte:

- (1) Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
- (2) Blotten der Proteine auf ECL-Membran
- (3) Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper
- (4) Inkubation mit einem HRP markierten sekundären Antikörper
- (5) Behandlung der Membran mit ECL Reagenz und Dokumentation des Blots via Autoradiographie

(1) Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

Material und Lösungen

Protein-Lysispuffer:

20 mM	Tris-HCl pH 7,4	
50 mM	NaCl 1,0 % Nonidet P-40	(Sigma)
1 mM	PMSF	(Boehringer Mannheim)
10 µg/ml	Leupeptin	(Boehringer Mannheim)
10 µg/ml	Aprotinin	(Calbiochem)

2xLadepuffer:

90 µl	LDS Sample Buffer 4x	(NuPage)
10 µl	Sample Reducing Agent 10x	(NuPage)
100 µl	Lysispuffer	

Laufpuffer:

40 ml	MOPS SDS Laufpuffer 20x	(NuPage)
760 ml	aqua dest.	

(* 0,5 ml Antioxidant der Firma NuPage sind unmittelbar vor Anlegen der Spannung direkt in die befüllte obere Pufferkammer zu pipettieren.)

Durchführung

Nachdem auf 25 μg des Proteinlysates 25 μl 2x Ladepuffer pipettiert worden war, erfolgte die Denaturierung bei 70 °C für 10 min. Anschließend verblieben die Proben auf Eis, bis sie auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen wurden. Die Prozentigkeit des Geles richtete sich hierbei nach der Proteingröße und konnte unter Hinzuziehens des sogenannten Gel Migration chart der Firma NuPage ermittelt werden. Unter Verwendung des oben angegebenen Laufpuffers erfolgte die Auftrennung der Proteine in einer Elektrophoresekammer (Novex Mini Cell/ invitrogen) bei einer Spannung von 200 V für 40 min.

(2) Blotten der Proteine auf ECL-Membran:

Material und Lösungen

Filterpapier 7,5 x 8,5 cm

ECL-Membran 7,5 x 8,5 cm; Porengröße 0,2 μm

Transferpuffer:

40 ml 20x Transfer Buffer (NuPage)

0,8 ml Antioxidant (NuPage)

160 ml Methanol

600 ml aqua dest.

Blockierungslösung:

10 % Non-Fat-Dry-Milk in TBS (Biorad)

0,05 % Tween (10 g/100 ml) (Biorad)

(20 % polyklonaler Antikörper eines Pferdeserums (Gibco/invitrogen))

Durchführung

Zunächst wurde die ECL (Enhanced-Chemiluminescence)-Membran für ca. 1 min mit aqua dest. inkubiert und anschließend für weitere 5 min in Transferpuffer geschwenkt. Dann galt es die für den Blot notwendigen Komponenten in folgender Reihenfolge aufzuschichten:

- a) 2x Blotting Pad
- b) Filterpapier
- c) Gel
- d) Transfermembran
- e) Filterpapier
- f) 2x Blotting Pad

Dies wurde dann erneut in die Elektrophoresekammer eingebaut, mit Transferpuffer bedeckt und für ca. 1 Stunde bei 30 V geblottet. Nach dem Proteintransfer erfolgte die Behandlung der ECL-Membran mit der Blockierungslösung für ca. 1 h bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Verwendete man zum anschließenden Proteinnachweis einen polyklonalen Antikörper, so wurden der

Blockierungslösung 20 % eines Pferdeserums hinzugefügt. Dadurch konnte eine Reduzierung der für solche Immunglobuline charakteristischen starken Hintergrunddarstellung erzielt werden.

(3) Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper:

Material und Lösungen

Monoklonaler Presenilin 1 Antikörper (PSN2)	(Okochi, REBS Letters, Vol 418, Issue 1-2, 1997)
HRP-konjugierter Sekundärantikörper (anti-mouse)	(Amersham)
Polyklonaler anti-Nicastrin-Antikörper	(Sigma)
HRP-konjugierter Sekundärantikörper (anti-rabbit)	(Dako)
PBS	

Durchführung

Nach Abschluss des Blockierungsvorganges wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit den jeweiligen spezifischen Primärantikörpern inkubiert. Am nächsten Morgen galt es, durch mehrmaliges Waschen mit PBS die ungebundenen Antikörperreste zu entfernen. Dies erfolgte in zwei kurzen und drei langen Vorgängen über 10 min.

(4) Inkubation mit einem HRP-markierten sekundären Antikörper (s.o.):

Durchführung

Der mit HRP (Meerrettich Peroxidase) konjugierte sekundäre Antikörper wurde zunächst im Verhältnis 1:3000 in PBS verdünnt. Die anschließende Inkubation der ECL-Membran mit der Lösung erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Shaker. Anschließend erfolgte erneut ein Waschen mit PBS zur Entfernung von Antikörperresten (s.o.).

(5) Behandlung der Membran mit ECL-Reagent und Dokumentation des Blots via Autoradiographie:

Material und Lösungen

ECL Reagent	(Amersham)
Hyperfilm TM ECL TM	(Amersham)

Durchführung

ECL-Reagent A und ECL-Reagent B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. In der Regel benötigte man pro Membran ein Volumen von 2 ml. Vorsichtig konnte nun die ECL-Membran hiermit benetzt und nach 1 minütiger Einwirkzeit auf eine Röntgenkassette übertragen werden. Hierbei war darauf zu achten, dass keine Luftblasen und keine unnötige Befeuchtung der Röntgenkassette verursacht wurden. In der Dunkelkammer erfolgte abschließend die Plazierung des HyperfilmTMECLTM und die Entwicklung des Röntgenbildes. Die Belichtungszeiten variierten je nach Qualität des Blots zwischen 15 Sek und 5 min.

Ergänzung:

Bei dieser Methodik empfahl es sich zur Abschätzung der Proteingröße einen ECL-Marker zu verwenden. So wurden zunächst 0,5 μ l des Markers mit 9 μ l Ladepuffer versetzt, anschließend bei 100 °C für 4 min denaturiert und auf Eis gestellt, bevor diese Lösung mit den übrigen Proben auf das SDS- Polyacrylamidgel geladen wurde. Bis zum Blockierungsvorgang verfuhr man mit Proben und Marker identisch. Dann allerdings erfolgte keine Inkubation mit Antikörpern, sondern vielmehr die Aufbewahrung des den Marker tragenden Membranstückes in TBS bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag nahm man eine Streptavidin-HRP Inkubation bei Raumtemperatur über 45 min vor, wie vom Hersteller beschrieben (Mischungsverhältnis 1:1500). Die abschließende Behandlung mit ECL-Reagenz und die Autoradiographie wurde daraufhin wie oben erläutert durchgeführt.

3.12 Zellkultur**Material und Lösungen****zu 500 ml RPMI (Invitrogen):**

50 ml FCS (Invitrogen)
5 ml 200 mM L-Glutamin (100x) (Invitrogen)

zu 500 ml DMEM (Invitrogen):

50 ml FCS (Invitrogen)
10 ml 200 mM L-Glutamin (100x) (Invitrogen)
5 ml Natrium-Pyruvat (Invitrogen)

Durchführung

Es wurden insgesamt sieben Zelllinien in Kultur gehalten. Darunter befanden sich die Hepatoblastomzelllinien HUH6 und HepT1, die hepatocelluläre Carcinomzelllinie HepG2 sowie die Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D283MED, D425MED und Daoy. Die Versorgung der Zellen erfolgte in sterilen Zell-Kultur-Flaschen der Firma Corning, die eine Fläche von 25 cm umfassten. Mit Ausnahme der Linie MEB-MED-8a konnten alle Zellen mit dem RPMI 1640 Medium der Firma Gibco/Invitrogen kultiviert werden, durch Zugabe von fetalem Kälberserum und L-Glutamin angereichert wurde (s.o.). Die Linie MEB MED 8a hinge-

gen benötigte zum Überleben und Proliferieren Dulbeccos Mod Eagle Medium (DMEM) der Firma Gibco/Invitrogen, das durch fetales Kälberserum, L-Glutamin und Natrium-Pyruvat ergänzt wurde (s.o.). Der Mediumwechsel erfolgte alle 2–4 Tage, je nach Zelldichte. War eine 70–80 %ige Konfluenz dieser adhärent wachsenden Zelllinien zu verzeichnen, so erfolgte die Passagierung und Subkultivierung der Zellen, wie im Folgenden beschrieben.

Material und Lösungen

1 Kulturflasche mit konfluent gewachsenen Zellen	(Corning)
PBS (ohne Calcium und Magnesium, 37 °C)	(Gibco/ Invitrogen)
Trypsin/ EDTA-Lösung (0.5 % Trypsin/ 0.02 % EDTA / 37 °C)	(Gibco/ Invitrogen)
vorgewärmtes frisches Medium	

Durchführung

Zunächst wurde das alte Medium aus der Zellkulturflasche entfernt. Dann wusch man die Zellen vorsichtig in warmem PBS, um Mediumreste zu entfernen, die die Wirkung des Trypsin abschwächen würden. Anschließend inkubierte man den Monolayer mit 1,62 ml Trypsin-EDTA und beobachtete den Ablösungsprozeß unter dem Phasenmikroskop. Die optimale Einwirkzeit lag in der Regel zwischen 3–10 min und war dann erreicht, wenn die Mehrzahl der Zellen sich vom Boden abgelöst hatten. An dieser Stelle musste darauf geachtet werden, die Inkubation nicht zu lange vorzunehmen, da Trypsin-EDTA die Zellvitalität irreversibel schädigen kann. Lose anhaftende Zellen wurden nun mit der Pipette behutsam ab gespült, bevor man die Zellen in ein Röhrchen mit 10 ml Medium überführte. Das Medium führte zu einer Inaktiverung des Trypsins. Bei Raumtemperatur und 500 *g* erfolgte nun eine Zentrifugation für 5 min. Während die Zellen sich zu einem Pellet am Boden gesammelt hatten, enthielt der Überstand Medium- und Trypsinreste, die nun abpipetiert und so entfernt werden konnten. Nach Resuspension des Pellets in einer ausreichenden Menge frischem Medium wurden die Zellen in neue Kulturflaschen gegeben. Der Verdünnungsfaktor für die Aussaat der Zellen musste hierbei für jede Zelllinie individuell bestimmt werden.

3.13 Herstellung von Zelllysaten

Um die im Zellinneren enthaltenen Proteine für weitere Analysen z.B. mittels Western blot zu gewinnen, wurde die Zellmembran in Anwesenheit der Proteinaseinhibitoren Phenyl-methyl-sulfonylfluoride (PMSF) und Aprotinin vorsichtig lysiert.

Material und Lösungen

PBS	(Gibco/ invitrogen)
Versene	(Gibco/ Invitrogen)
RPMI/ DMEM	(Gibco/ invitrogen)
0.5 % Nonidet P-40	
Trypanblau	(Merck)
Aprotinin	(Calbiochem)
PMSF	(Sigma)

Lysispuffer:

50 mM	Tris pH 8.0
120 mM	NaCl
0.5 %	Nonidet P-40

Durchführung

Um eine größere Ausbeute an Zielprodukten zu erhalten, wurden die Zellen zunächst in Zellkulturflaschen (NUNC) mit einer Gesamtfläche von 75–80 cm² überführt. Wichtig war darauf zu achten, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Lyse noch in der Proliferationsphase befanden. Ihre Zelldichte durfte nicht so hoch sein, dass das Populationswachstum über Kontaktinhibition zum Stillstand kam. So wurde die Lyse in der Regel bei 70–80 %iger Konfluenz des Zellrasens wie folgt eingeleitet: Nach Entfernen des Nährmediums wurden die Zellen kurz in 5 ml PBS geschwenkt, bevor man sie mit 5 ml Versene behandelte. Im Brutschrank verblieben die Kulturflaschen bei 37 °C nun so lange, bis sich die Zellen vollständig vom Boden abgelöst hatten. Dann überführte man die Lösung in ein 15 ml Röhrchen, indem sich bereits 7 ml des entsprechenden Zellmediums befanden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei Raumtemperatur und 1000 *g*. Der dabei gewonnene Überstand konnte verworfen werden. Das Pellet wurde in 12 ml PBS erneut resuspendiert. Bei einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen sollten nun Versene- und Mediumreste entfernt werden. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet dieses Mal in Abhängigkeit von seiner Größe in 5–10 ml PBS resuspendiert. Von dieser Lösung überführte man nun 50 µl in ein kleines Eppendorfreaktionsgefäß, indem sich bereits eine gleiche Menge Trypanblau befand. Mit Hilfe der Neubauerzählkammer wurde die Zellzahl/ µl Zellsuspension bestimmt. Die übrigen in PBS gelösten Zellen wurden ein weiteres Mal für 5 min bei Raumtemperatur und 2500 *g* zentrifugiert. Währenddessen fertigte man aus 5 ml Lysispuffer, 5 µl Aprotinin und 50 µl PMSF den Lysepuffer an. 1 µl dieses Puffers war nun ausreichend für die Lyse von 10 000 Zellen. Nachdem das Zellpellet in der entsprechenden Menge Lysepuffer resuspendiert und gut durchmischt worden war, wurde es für eine halbe Stunde auf Eis aufbewahrt. Während dieser Zeit wurde die Lösung in regelmäßigen Abständen gevortext. Anschließend erfolgte noch einmal eine Zentrifugation über 20 min bei 4 °C und 14 000 *g*. Das dabei gewonnene Pellet enthielt nun die Zelltrümmer, der Überstand beinhaltete die Proteine. Dieser wurde aliquotiert und

bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

3.14 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Material und Lösungen

Plasmid 1: pLPCX (Leervektor)

Plasmid 2: pLPCX-PS1wt (hergestellt durch die Klonierung von *PS1* als ein 1.4 kb Fragment in die XhoI/NotI-Schnittstellen des Leervektors pLPCX)

Beide Plasmide wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Sascha Weggen.

TEN-Puffer:

20 mM Tris-HCl pH 7.5
1 mM EDTA
50 mM NaCl

LB2Y-Medium (pH 7.4):

0.5 % (w/v) NaCl
1.0 % (w/v) Hefe-Extrakt
1.0 % (w/v) Trypton auf Endvolumen mit H_2O aufgefüllt und 20 min autoklaviert

LB2Y-Nährböden (pH 7,4):

Zugabe von 1.5 % (w/v) zu LB2Y-Medium, danach Autoklavierung, bei Bedarf war Zufügen von Antibiotika möglich, Nährböden wurden in 10 cm-Kulturschalen gegossen, Lagerung erfolgte bei 4°C .

Ampicillin-Stammlösung:

100 mg/ml in ddH_2O gelöst, mit NaOH neutralisiert und steril filtriert, Aliquots bei -20°C gelagert, für Verwendung in Selektionsmedium 1:1000 verdünnt

Kanamycin-Stammlösung:

10 mg/ml in ddH_2O gelöst, steril filtriert, Aliquots bei -20°C lagern, für Verwendung in Selektionsmedium 1:100 verdünnt

IPTG:

285 μl 20 %-iges (w/v) IPTG zu 100 ml LB2Y-Nährboden gegeben

X-Gal:

1.5 ml 2 %-iges (w/v) X-Gal zu 100 ml LB2Y-Nährboden gegeben

Durchführung

10–100 ng Plasmid-DNA wurden in 25–50 μl TEN-Puffer gegeben, mit 50–100 μl transformationskompetenter Bakterien für 20 min auf Eis inkubiert und regelmäßig durchmischt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für exakt 2 min und eine Inkubation auf Eis für 10 min. Nach Zugabe von 0.5-1.0 ml LB2Y-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Aufgrund eines in jedem Plasmid vorkommenden Resistenzgens gegenüber einem speziellen Antibiotikum können transformierte Bakterien auf Nährböden plus Antibiotikum selektioniert werden. Dazu wurden zuerst 100 μl des Ansatzes ausplattiert, die restlichen Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert, in 50 μl Überstand resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die Inkubation auf Selektionsnährböden erfolgte über Nacht bei 37 °C. Sowohl Ampicillin als auch Kanamycin wurde bei Bedarf in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugegeben. Bei einer gewünschten Blau-Weiß-Selektion wurde zusätzlich IPTG und X-Gal hinzugefügt. Anschließend wurden Einzelkolonien in 50 ml LB2Y-Medium plus Antibiotikum inokuliert und nach Kultivierung zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendet. Nun erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA wie im Folgenden beschrieben.

Material und Lösungen

Plasmid Midi Kit (Qiagen)

Durchführung

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde aus einem Zellpellet einer 50 ml ÜN-Bakterienkultur isoliert. Nach Zellyse durch die sukzessive Zugabe der Puffer P1, P2 und P3 wurde die Plasmid-DNA an die Silica-Membran der Qiagen-tip-Säulchen gebunden, mit dem Puffer QC gewaschen und durch Zugabe von 5 ml QF-Puffer eluiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA gefällt und in 50 μl ddH₂O resuspendiert.

3.15 Co-Transfektion von Zelllinien mit Plasmid-DNA und dem Dual-Luciferase Reportersystem

Die Lipofektion ist eine Methode, um Plasmid-DNA oder Reporter-moleküle auf eukaryontische Zellen zu übertragen.

Material und Lösungen

FuGene 6 Reagent	(Roche)
Neurobasalmedium ohne B27	(Invitrogen)
DMEM	(Invitrogen)
Dual-Luciferase Reporter Assay System	(Promega)

Durchführung

Es wurden die Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D283MED und D425MED mit dem jeweiligen Plasmid und den Reporter-molekülen co-transfiziert. Dafür wurden 50 μl serumfreies Medium vorgelegt und mit 3 μl FuGene 6 Reagent (Roche)/0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Plasmid-DNA vermengt. Nach Zugabe von 0.5 μg der Plasmid-DNA und 0.5 μg TOP-Flash sowie 0.01 μg Renilla SV 40 erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 45 min. Anschließend wurde das Gemisch für 24 h zu den Zellen gegeben. Nun erfolgte eine Stimulation des WNT-Signalweges, wie im Folgenden beschrieben.

Material und Lösungen

Dual-Luciferase Reporter Assay System	(Promega)
Neurobasalmedium ohne B27	(Invitrogen)
12-Loch-Platten	(Costar)
Wnt 3a	(R&D Systems)

Durchführung

Nach Co-Transfektion mit der Plasmid-DNA und dem Dual-Luciferase-Reportersystem wurden die Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D283MED und D425MED unter Verwendung von Neurobasalmedium ohne B27 auf 12-Loch Platten in Kultur gehalten. Die Stimulation des WNT-Signalweges erfolgte bei 70–80 %iger Zellkonfluenz durch Zugabe von 100 ng Wnt 3a/ml Nährmedium für 24 Stunden. Dann wurde das Medium verworfen. Nach Protokoll des Herstellers konnten die Zellen nun durch Zugabe des Lysispuffers PLB aufgeschlossen werden. Nach Zentrifugation befanden sich die gelösten Proteine im Überstand. In einem semi-automatischen Luminometer fügte man zu je 10 μl Überstand 50 μl LARII-Puffer zu, um die Fluoreszenz der Firefly-Luciferase anzuregen. Nach Vermessung dieser Fluoreszenz wurde 50 μl Stop&Glo-Puffer hinzugefügt und die Fluoreszenz der Renilla-Luciferase angeregt. Dadurch konnte in einer Probe die jeweilige Menge der beiden Reporterproteine vermessen werden.

3.16 RNA-Extraktion nach Stimulation des WNT-Signalweges

Die Stimulation des WNT-Signalweges erfolgte an den Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D283MED, D425MED und Daoy durch Zugabe von 100 ng Wnt 3a/ml Nährmedium. Nach 48

stündiger Inkubation erfolgte die RNA-Extraktion mit Trizol (vgl.2.8) sowie die quantitative Analyse der *PS1*-mRNA mittels kompetitiver RT-PCR (vgl.2.10).

3.17 Proliferationsanalyse unter Verwendung von *Nicastrin*-spezifischer RNAi

Die Methode des Gene-silencing via RNA Interferenz ist ein zunehmend beliebtes Verfahren zur Analyse der funktionellen Bedeutung eines Genes (Caplen et al., 2001). Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen natürlich vorkommender mRNA und synthetisch hergestellter, spezifischer RNAi kann die Expression eines Zielgenes *in vitro* gezielt unterdrückt werden und die Auswirkungen auf ein Zellsystem beobachtet werden.

Material und Lösungen

Optimem Medium	(Invitrogen)
Oligofectamine	(Invitrogen)
Nicastrin RNAi 6er Lochplatten	(Costar)
96er Lochplatten	(NUNC)
Steriles aqua dest.	(Gibco/ Invitrogen)

Durchführung

Die Zellen Daoy und HepT1 wurden zur morphologischen Analyse zunächst auf je eine 6 Lochplatte in 2 ml Optimem ausgesäht. Gleichzeitig erfolgte die Übertragung von 62.5 μ l derselben Zellsuspension auf 96 Lochplatten. Hierbei wurden jeweils 10 Löcher für die Transfektion und 10 Löcher für die Kontrollen präpariert. Die Zelldichten konnten nach mehrfacher Auszählung mittels Neubauerzählkammer angeglichen werden, so dass schließlich überall 2812.5 Zellen/Loch vorlagen. Anschließend wurden die äußeren, noch freien Löcher der 96 Lochplatte mit aqua-dest. befüllt. Nun erfolgte die Vorbereitung der Transfektion, indem man für die Lösung I 240 μ l Optimem mit 60 μ l Oligofectamine für 10 min inkubierte. Währenddessen fertigte man Lösung II durch Mischen von 1000 μ l Optimem mit 60 μ l RNAi (in RNase-freiem Wasser gelöst) der Konzentration 2 μ M an. Daraufhin wurde Lösung I zu Lösung II gegeben und alles für weitere 20 min inkubiert. Nach Zufügen von weiteren 640 μ l Optimem wurden zu den Zellen in den 6 Lochplatten jeweils 400 μ l , zu denen in den 96 Lochplatten jeweils 12.5 μ l dieser Lösung pipettiert, so dass die Endkonzentration von RNAi 10 nM in jedem Ansatz betrug. Zur Präparation der Kontrollen verfuhr man analog. Statt RNAi fügte man hier der Lösung II Optimem in äquivalenter Menge zu. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte nun im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂ Atmosphäre von 5.0 % für 48 h. Dann wurde eine Photodokumentation der Zellen in den 6 Lochplatten vorgenommen. Anschließend wurden diese Zellen lysiert und für eine Proteindarstellung mittels Westernblot präpariert. Nach insgesamt 72 h erfolgte eine ³H -Thymidin-Markierung der Zellen der 96er

Lochplatten sowie nach mehrstündiger Inkubation die Bestimmung der Proliferationsaktivität mittels ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay.

3.18 ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay

Material und Lösungen

Methyl- ^3H -Thymidin, 3 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$	(Amersham)
Packard Filtermate 196	(Harvester system)
Topcount NXT microplate scintillation and luminescence counter	(Topcount NXT; luminescence counter software version 1.6)

Durchführung

Zur Bestimmung der Proliferationsrate nach Behandlung der Zellen mit RNAi sowie unter dem Einfluss des Inhibitors L685.458 (vgl. 2.19) wurde ein ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay durchgeführt. Nach ausreichend langer Inkorporation mit dem RNAi's/ Inhibitor erfolgte die Zugabe von 12.5 μl des mit Medium verdünntem ^3H -Thymidin und die Aufbewahrung der Zellen im Brutschrank für weitere 12 h. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Zellenzählgeräts Packard Filtermate 196 auf eine Membran übertragen und die Inkorporationsrate mittels Szintillationsmessung bestimmt.

3.19 Proliferationsanalyse unter Verwendung eines γ -Sekretase-Inhibitors

In diesem Experiment wurden die Zelllinien HUH6, HepG2, HepT1, MEB-MED-8a, D283MED und D425MED untersucht. Durch Inkubation der Tumorzellen mit dem γ -Sekretaseinhibitor L685.458 in fünf unterschiedlichen Titrationsstufen sollte versucht werden, die Aktivität der γ -Secretase im Rahmen des Notch-Signalweges zu reduzieren. Da für diesen Signalweg eine Bedeutung für die Tumorzellproliferation diskutiert wird (Fan et al., 2006), erfolgte die Dokumentation des Inhibitionseffekts mit einem ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay.

Material und Lösungen

RPMI	(Gibco/ Invitrogen)
Trypsin-EDTA (1x)	(Gibco/ Invitrogen)
96er Lochplatten	(NUNC)
Steriles aqua dest.	(Gibco/ Invitrogen)
Neubauerzählkammer Trypanblau	(Merck)
γ -Sekretase-Inhibitor L 685 458	(Merck Inhibitor, Li et al. Nature, Vol 405, Issue 6787 2000)

Durchführung

Nach Entfernen des Nährmediums aus den unterschiedlichen Zellkulturflaschen (Corning) erfolgte die Behandlung der Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA wie unter 2.12.1 beschrieben. Die so entstandene Zellsuspension überführte man nun in ein 15 ml Röhrchen, welches mit RPMI ad 12 ml aufgefüllt wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 7 min bei Raumtemperatur und 1100 *g*. Anschließend wurden die gewonnenen Pellets in Abhängigkeit von ihrer Größe in 4–12 ml RPMI Medium resuspendiert. Unter Verwendung sechs neuer Falkons verdünnte man diese Zellsuspensionen erneut mit RPMI Medium im Verhältnis 1:10. Durch Aussaat der in diesen Verdünnungen enthaltenen Zellen auf eine Testplatte konnte ihre Quantität visuell abgeschätzt werden. Eine zu große Zelldichte wurde durch Zugabe von Medium, eine zu geringe durch Ergänzung mit Zellsuspension korrigiert. Ziel war es, die Zellzahl so einzustellen, dass sie bei Zugabe des Inhibitors einen Zellrasen mit 70 %iger Konfluenz bildeten. Dann wurden jeweils 100 μl dieser ausgetesteten Verdünnungen auf 96er Lochplatten, deren äusserste Reihe mit aqua dest befüllt war, pipettiert. Dabei fertigte man pro Zelllinie vier Ansätze an. Ein jeder beinhaltete Proben für 5 verschiedene Inhibitortitrationsstufen und 1 Negativkontrolle. Nachdem die Zellen sich auf dem Boden der 96er Lochplatten abgesetzt hatten, wurde mikroskopisch die Konfluenz überprüft. Handelte es sich um die gewünschten 70 %, so konnte mit dem Experiment fortgefahren werden. Hierzu fertigte man eine Verdünnungsreihe des γ -Sekretase-Inhibitor an, die folgende Konzentrationen umfasste:

$$T1 = 0,25 \mu\text{M}, \quad T2 = 0,5 \mu\text{M}, \quad T3 = 1,0 \mu\text{M}, \quad T4 = 2,5 \mu\text{M}, \quad T5 = 5,0 \mu\text{M}.$$

Alle vier Ansätze einer jeden Zelllinie wurden nun mit 100 μl der entsprechenden Inhibitortitration beimpft. Zu den Negativkontrollen pipettierte man dieselbe Menge Medium versetzt mit 0,1% DMSO. Alle Kulturansätze wurden nun zur weiteren Inkubation wieder in den Brutschrank gestellt und dort für ca. 36 h belassen. Nachdem nun unter dem Phasenmikroskop eine Kontrolle der Zellvitalität vorgenommen worden war, erfolgte die Proliferationskontrolle der Zellen mittels ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay. Die Gesamtdauer dieser Proliferationsuntersuchung umfasste 48 h.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Mutationsanalyse

Proben zweier unterschiedlicher Tumorentitäten wurden unter Anwendung der PCR-SSCP Methode auf Mutationen untersucht. Das Medulloblastomkollektiv umfasste hierbei 106 Tumorproben sowie 12 Zelllinien, das Hepatoblastomkollektiv 84 Tumorproben. In den untersuchten Tumoren und Zelllinien konnten weder Mutationen, noch Polymorphismen der kodierenden Sequenz des *PS-1* detektiert werden. Im intronischen, nicht translatierten Bereich des Gens jedoch wurden an drei unterschiedlichen Stellen Basenaustausche augenscheinlich. Betroffen waren die Introne 5, 8 und 10.

Intron	Position	Basenaustausch	Häufigkeit in %
5	18 Basen hinter der letzten kodierenden Base von Exon 4	C zu T	* n.a.
8	44 Basen vor der ersten kodierenden Base von Exon 8	G zu A	5,4% der MBL 1,74% der HBL
10	17 Basen hinter der letzten kodierenden Base von Exon 9	T zu G	3,24% der MBL 0% der HBL

Tabelle 9: Auflistung der detektierten Basenaustausche unter Angabe der Position, der Art der Sequenzänderung und der Häufigkeit in %; * n.a.: Aufgrund der Varianz der Darstellbarkeit nicht angegeben

Der auf Intron 5 beobachtete Shift zeigte bzgl. seiner Darstellbarkeit eine große Variationsbreite. In vielen Tumorproben sowie in den korrespondierenden Normalgeweben kam er nur angedeutet und schwach zur Darstellung. In einer Wiederholung der Amplifikation zeigte auch die Referenzprobe diesen Shift in schwacher Form. Zusammenfassend ist daher nicht auszuschließen, dass der hier beobachtete Basenaustausch Folge einer Kontamination oder eines Enzymfehlers ist.

Der Shift, der den auf Intron 8 detektierten Basenaustausch repräsentierte, konnte in einer späteren PCR und SSCP-Analyse nicht wiederholt werden und ist am ehesten als Folge eines Enzymfehlers anzusehen.

Für Intron 10 konnte der in der Medulloblastomprobe beobachtete Shift wiederholt und zusätzlich im parallel untersuchten Blut des gleichen Patienten gezeigt werden, wenngleich die Signalintensität des Shifts in der Wiederholung abgeschwächt zur Darstellung kam. Im entsprechenden Chromatogramm zeigte sich neben der Base G auch noch eine geringe Signalintensität der ursprünglichen Base T. Dies ist am ehesten dadurch zu erklären, dass es beim Ausschneiden des Shifts aus dem SSCP-Gel zu einer Kontamination mit DNA des darübergelegenen Einzelstrangs gekommen ist. Bei der an dieser Stelle beobachteten Sequenzänderung gehen wir daher davon aus, dass es sich um einen intronischen Polymorphismus handelt.

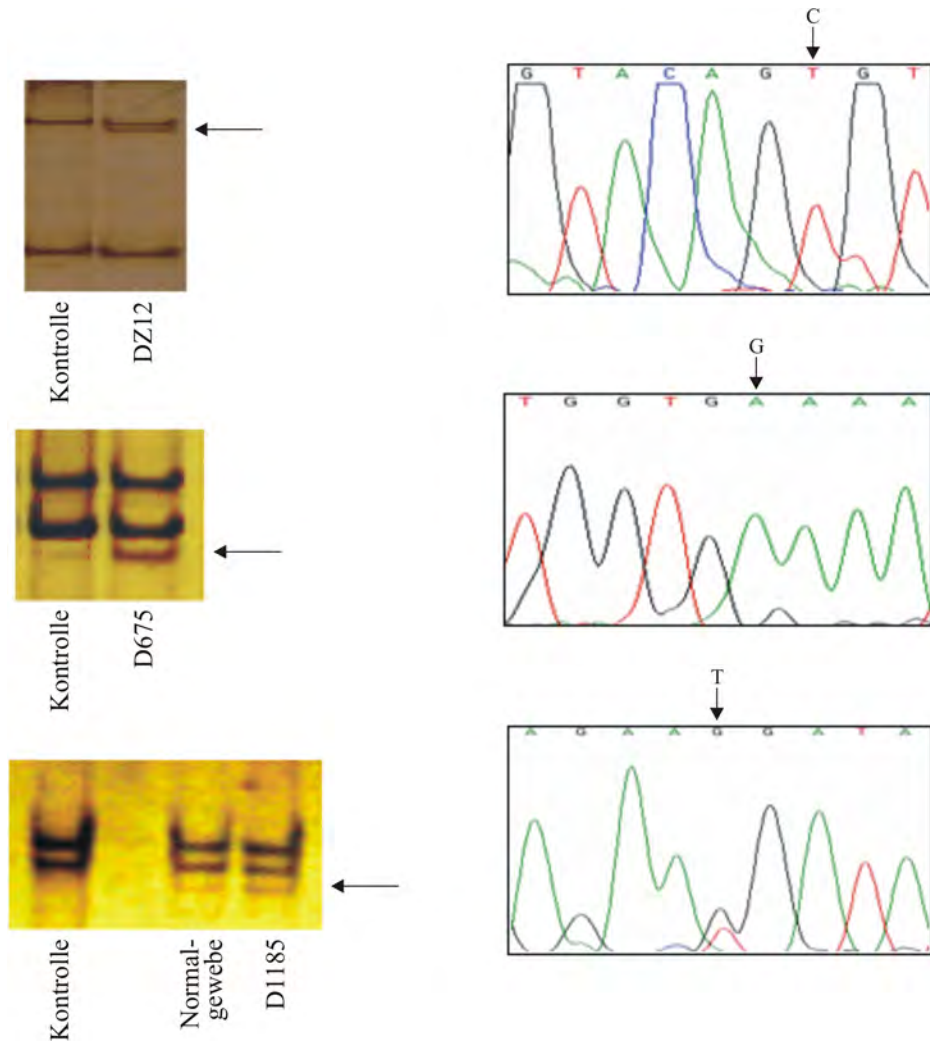


Abbildung 11: Darstellung der SSCP-Gele mit Proben mit aberrantem Laufverhalten sowie der dazugehörigen Sequenzierungschromatogramme. A) Basenaustausch auf Intron 5 am Beispiel der Hepatoblastomprobe DZ 12, B) Basenaustausch auf Intron 8 am Beispiel der Hepatoblastomprobe D 675, C) Basenaustausch auf Intron 10 am Beispiel der Medulloblastomprobe D 1185 sowie einer Blutprobe des gleichen Patienten D 1195

4.2 Ergebnisse der Deletionssuche

Das *PS-1* Gen wurde mit Hilfe des PCR/RT-PCR-Verfahrens auf große, Exon- übergreifende Deletionen untersucht. Hierbei wurden die PCR-Primer so gewählt, dass das Amplifikationsprodukt, dessen Sequenz von Exon 2 bis in den nicht mehr translatierten Bereich von Exon 13 reichte, eine Größe von 1485 bp haben sollte. Gescreent wurden cDNAs von 39 Medulloblastomen und 15 Hepatoblastomen. Bei der Analyse des Hepatoblastomkollektivs ergaben sich keine Hinweise auf Deletionen. Die Medulloblastomproben R 1556, R 1607 und R 1176 jedoch wiesen nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel neben der erwarteten Referenzbande zusätzliche Signale auf, die auf weitere kleinere PCR-Produkte hindeuteten. (Vgl. Abb 3.2)

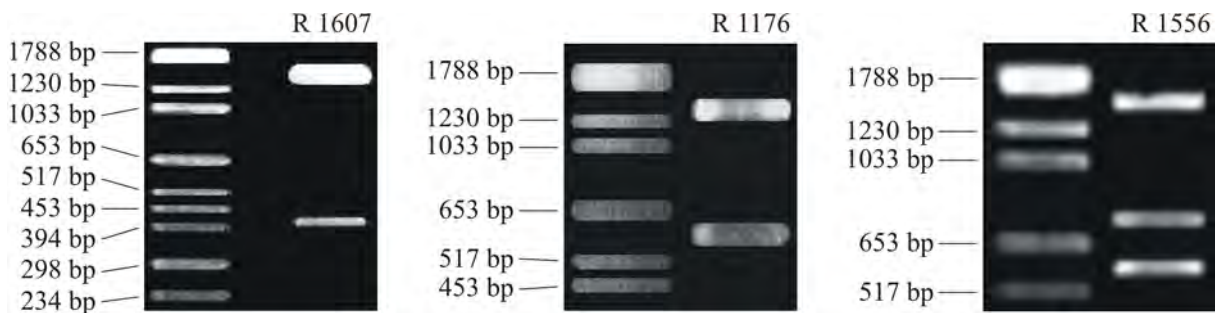


Abbildung 12: Agarosegelelektrophorese der Exone 2-13 des *PS1*-Genes in den Medulloblastomproben . Die cDNA Proben wurden mit dem Primerpaar TP2325 und TP2326 amplifiziert und auf 2%igen Agarosegelen analysiert. In den Tumoren ist die Wildtypbande bei 1485 Bp zu erkennen. Die kleineren PCR-Produkte galten als potentielle Deletionsprodukte.

Um zu belegen, dass es sich bei diesen Basenverlusten um tatsächliche Deletionen handelte, wurden exemplarisch die cDNA-Proben R 1556 und R 1607 erneut amplifiziert. In der gleichen PCR wurde auch die gDNA zu R 1607 (D 1665) als template eingesetzt. Zum Ausschluss eines Enzymfehlers wurde neben der üblichen Taq Polymerase eine Platinum Taq Polymerase verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das in Abbildung 3.3 präsentierte Laufmuster augenscheinlich.

Man sieht deutlich, dass die Amplifikation der genomischen DNA weder mit der Taq-, noch mit der Platinum-Taq-Polymerase gelungen ist. Darüber hinaus war auch die Reproduktion der analysierten kleineren cDNA Produkte nicht mehr möglich. Beide Aspekte weisen darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Veränderungen nicht um echte Deletionen handelte. Es liegt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Phänomene auf einen Enzymfehler der Taq-Polymerase zurückzuführen sind. Auf eine Wiederholung der PCR der Probe R 1176 wurde aus diesem Grunde verzichtet.

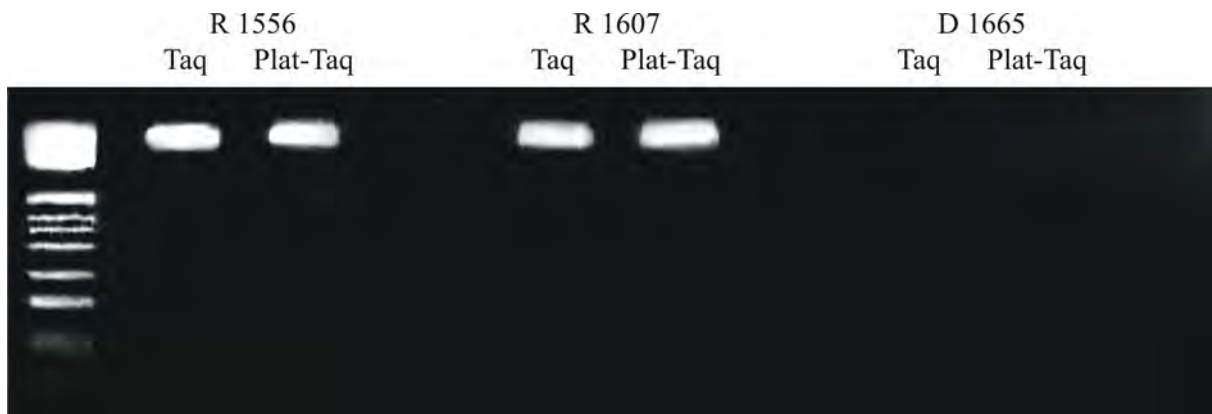


Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese der cDNA Proben R 1556 und R 1607 sowie der gDNA D 1665, die sowohl mit der Taq Polymerase, als auch mit der Platinum Taq Polymerase amplifiziert wurden. Es gelang hierbei nicht, die genomische DNA zu amplifizieren. Für R 1556 sowie für R 1607 zeigten sich unabhängig von dem verwendeten Enzym keine deletierten Produkte mehr.

4.3 Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse

Die mRNA Expression des *PS1* Genes wurde mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR in Medulloblastomen und Hepatoblastomen untersucht. Für jede Probe wurde die *PS1*-mRNA Expression wiederholt bestimmt und der entsprechende Mittelwert zur besseren Vergleichbarkeit durch die entsprechenden *β 2-Mikroglobulin*-mRNA-Expressionswerte geteilt. Dann wurde der Standardfehler der relativen Expressionswerte berechnet. Das Expressionsprofil der Tumorproben wurde wenn möglich mit dem korrespondierenden Normalgewebe verglichen. Da für die Medulloblastome kein autologes Referenzgewebe zur Verfügung stand, wurde als Vergleichswert die mittlere *PS1* Expression der fetalen Kleinhirngewebe hinzugezogen. Bei den Hepatoblastomzelllinien sowie bei den fetalen Lebergeweben erfolgte ein Vergleich zum Mittelwert der *PS1*-Expression aller korrespondierenden kindlichen Lebergewebe der Patienten.

Im Folgenden werden die Expressionsdaten nach Tumorentitäten geordnet dargestellt. Hierbei wird das Verhältnis Expression (Tumor bzw. Zelllinie (ZL) oder fetales Gewebe)/ Expression (korrespondierendes Normalgewebe bzw. Mittelwert aller Kontrollgewebe) tabellarisch dargestellt. Säulendiagramme veranschaulichen zusammenfassend das Expressionsmuster aller untersuchten Proben.

4.3.1 *Presenilin 1*-Expression in Medulloblastomen

Das Medulloblastomkollektiv umfasste 12 Tumoren der klassischen, 12 Tumoren der desmoplastischen Variante sowie 2 Medulloyblastome und 7 Zelllinien. Darüber hinaus dienten 5 Proben adulter und 5 fetaler Kleinhirne als Kontrollgewebe.

Tumore

Klassische Medulloblastome

<u>RNA</u>	<u>PS1 Expression</u>	<u>Standardfehler</u>	<u>Relative Expression</u>
D 2010	12,10	5,01	1,21
D 1165	2,32	0,19	0,23
D 965	1,69	0,63	0,17
D 1198	1,54	0,53	0,15
D 963	1,42	0,53	0,14
D 1185	1,16	0,46	0,12
D 1097	1,06	0,58	0,11
D 1106	0,98	0,61	0,10
D 1177	0,93	0,19	0,09
D 1127	0,74	0,15	0,07
D 1103	0,71	0,11	0,07
D 1049	0,46	0,13	0,05

Desmoplastische Medulloblastome

<u>RNA</u>	<u>PS1 Expression</u>	<u>Standardfehler</u>	<u>Relative Expression</u>
D 1400	11,57	2,50	1,15
D 86	8,27	2,41	0,83
D 292	5,93	0,79	0,59
D 1399	2,41	0,74	0,24
D 322	0,69	0,02	0,07
D 538	0,64	0,34	0,06
D 978	0,63	0,01	0,06
D 1144	0,52	0,24	0,05
D 849	0,37	0,07	0,04
D 1401	0,34	0,12	0,03
D 82	0,22	0,06	0,02
D 1062	0,10	0,01	0,01

Medullomyoblastom

<u>RNA</u>	<u>PS1 Expression</u>	<u>Standardfehler</u>	<u>Relative Expression</u>
D 337	5,25	1,52	0,52
D 391	0,57	0,42	0,06

Tumorzelllinien

<u>RNA</u>	<u>PS1 Expression</u>	<u>Standardfehler</u>	<u>Relative Expression</u>
MHH-MED-3	22,88	7,76	2,28
D 341MED	9,73	3,92	0,97
D 565MED	7,44	0,09	0,74
D 499	3,72	1,50	0,37
MEB-MED-8a	0,81	0,31	0,08
Daoy	0,46	0,02	0,05
WÜ-1580	0,38	0,11	0,04

Kontrollgewebe

Adulte Kleinhirne

Fetale Kleinhirne

<u>RNA</u>	<u>PS1 Expression</u>	<u>Standardfehler</u>	<u>RNA</u>	<u>PS1 Expression</u>	<u>Standardfehler</u>
R 1627	16,16	0,81	F20C	40,43	6,80
R 1140	13,38	9,03	F16C	4,78	1,17
R 1395	3,04	1,08	F21C	3,08	1,31
R 1082	1,49	0,88	F22C	0,96	0,42
R 1276	0,54	0,22	FC98-29	0,85	0,15

Tabelle 10: Ergebnisse der Expressionsanalyse des *PS1*-Genes in Medulloblastomen. Neben der mRNA-Expression und des jeweiligen Standardfehlers ist das Verhältnis von *PS1*-Expression des Tumors/Mittelwert der *PS1*-Expression der fetalen Kleinhirngewebe dargestellt. Der Mittelwert der fetalen Kleinhirngewebe war 10,02.

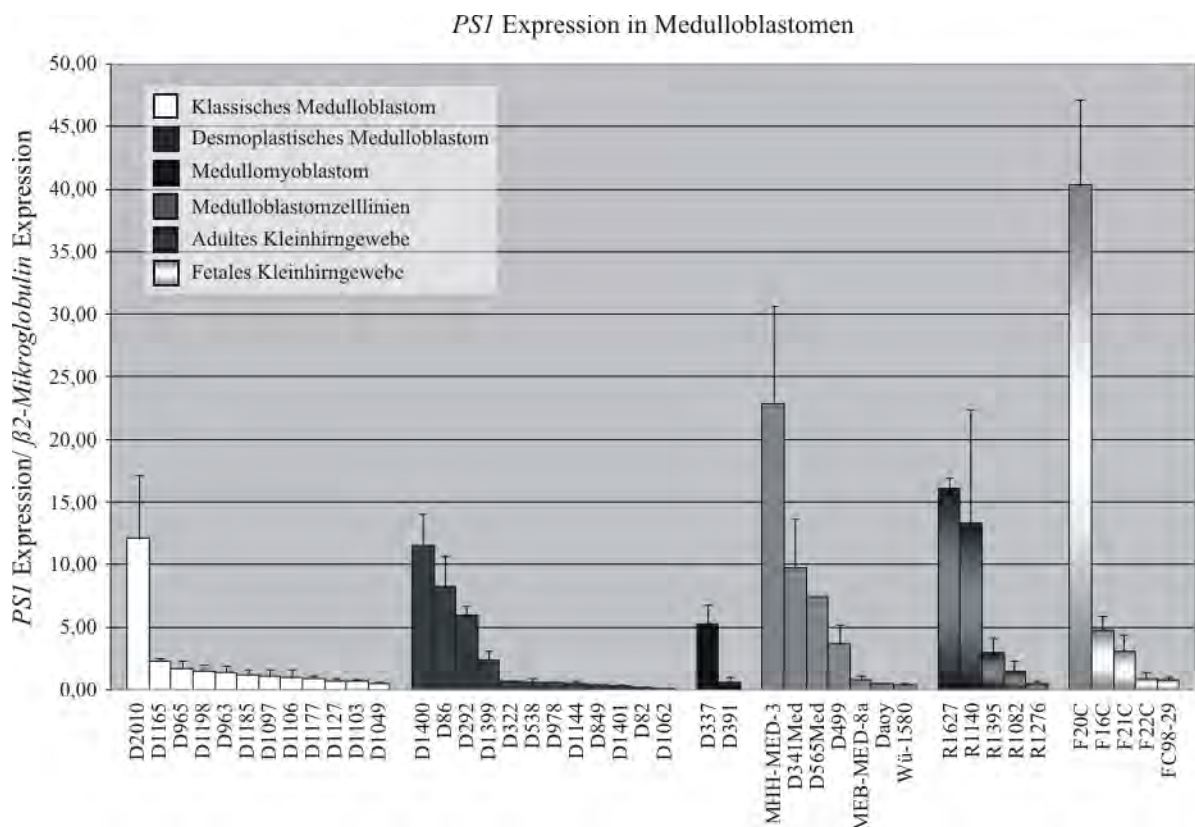


Abbildung 14: Säulendiagramm zur Darstellung der *PS1*-Expression in 12 klassischen, 12 desmoplastischen Medulloblastoma und 2 Medulloblastoma sowie 7 Medulloblastomzelllinien, 5 adulten und 5 fetalen Kleinhirngeweben. Jede Säule wurde durch den Standardfehler ergänzt.

Für die klassischen Medulloblastome variierte die Relation der mRNA *PS1* Menge zum Mittelwert der fetalen Kleinhirne von 0,05-1,21, wobei in 11 Fällen die Relation < 1 (0,05-0,23) und lediglich für die Tumorprobe D 2010 > 1 (1,21) war. D.h. fast alle klassischen Medulloblastomproben exprimierten geringe Mengen *Presenilin 1*.

Die desmoplastischen Medulloblastoma zeigten in der Relation von mRNA *PS1* Menge zum Mittelwert der fetalen Kleinhirne eine Variationsbreite von 0,01 bis 1,15. Auch hier erhielt man für 11 Tumore eine Relation < 1 (0,01-0,83) und nur für D 1400 > 1 (1,15). D.h. auch die Mehrzahl der desmoplastischen Medulloblastoma zeigten eine geringe *PS1*-Expression.

Bei den beiden untersuchten Medullomyoblastoma ergab die Relation der mRNA *PS1* Menge zum Mittelwert der fetalen Kleinhirne in beiden Fällen Werte < 1 (0,06; 0,52) als Hinweis auf eine geringe *PS1*-Expression in Medullomyoblastoma.

Für die sieben untersuchten Zelllinien variierte die Relation der *PS1*-Expression zum Mittelwert der fetalen Kleinhirne von 0,04-2,28. Lediglich die Zelllinie MHH-MED-3 zeigte eine Relation > 1 (2,28). Auch in Medulloblastomzelllinien zeigte sich überwiegend eine geringe Expression von *Presenilin 1*. Zur Überprüfung statistisch signifikanter *PS1*-Expressionsunterschiede wurde ein zweiseitiger, nicht parametrischer Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt und die *PS1*-Expression von klassischen und desmoplastischen Medulloblastomen miteinander sowie mit der *PS1*-Expression in adulten und fetalen Kleinhirngeweben verglichen. Dabei ergab sich bei Betrachtung der asymptotischen zweiseitigen Signifikanz kein statistisch signifikanter *PS1*-Expressionunterschied der untersuchten Subgruppen. Die Medulloblastomzelllinien zeigten ebenfalls keinen signifikanten *PS1*-Expressionunterschied im Vergleich zu fetalen und adulten Kleinhirngeweben. Auch der Vergleich der *PS1*-Expression in adulten und fetalen Kleinhirngeweben ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass fast alle klassischen Medulloblastome, die Mehrzahl der desmoplastischen Medulloblastome, die Medullomyoblastome sowie die Medulloblastomzelllinien *Presenilin 1* im Vergleich zu fetalem Kleinhirngewebe gering exprimierten, wobei hier kein statistisch signifikanter Expressionsunterschied festgestellt werden konnte.

4.3.2 Überexpression von *Presenilin 1* in Hepatoblastomen

Das Hepatoblastomkollektiv umfasste 15 Tumorproben mit korrespondierenden Lebergeweben sowie 7 Hepatoblastomzelllinienproben, wobei zwei mRNA Proben der HepT1 zur Verfügung standen, die aus unterschiedlichen Kultivierungen gewonnen wurden. Darüber hinaus standen 4 fetale Lebergewebe zur Verfügung.

Tumore

<u>RNA</u>	<u>PS1-Expr.-Tumor(SD)</u>	<u>PS1-Expr.-Leber(SD)</u>	<u>Relative Expr.</u>
D 697	16,19 (2,15)	1,31 (0,14)	12,34
D 717	7,38 (0,49)	0,93 (0,08)	7,97
D 197	2,29 (0,11)	0,10 (0,00)	23,53
D 399II	1,88 (0,19)	1,50 (0,28)	1,25
D 272	1,56 (0,08)	0,15 (0,02)	10,43
D 700	1,14 (0,07)	0,03 (0,01)	37,46
D 675	1,04 (0,19)	0,24 (0,02)	4,41
D 377	0,99 (0,13)	0,42 (0,05)	2,38
D 401	0,80 (0,23)	0,77 (0,17)	1,03
DZ 29II	0,78 (0,12)	0,14 (0,03)	5,43
M 12	0,77 (0,07)	0,05 (0,01)	15,70
D 840	0,41 (0,21)	0,43 (0,04)	0,94
D 107	0,34 (0,00)	1,69 (0,51)	0,20
M 16	0,29 (0,03)	1,17 (0,04)	0,25
M 14	0,23 (0,04)	1,69 (0,15)	0,13

Tumorzelllinien

<u>RNA</u>	<u>PS1-Expr.</u>	<u>Standardfehler</u>	<u>Relative Expr.</u>
Hep T5	10,84	0,70	15,32
Hep T1	7,45	0,89	10,53
Hep G2	3,62	0,53	5,12
Hep T1	1,82	0,53	2,57
Hep T8	1,56	0,08	2,21
Hep T2	0,98	0,15	1,39
Hep T4	0,95	0,05	1,34

Fetale Leber

<u>RNA</u>	<u>PS1-Expr.</u>	<u>Standardfehler</u>	<u>Relative Expr.</u>
FL99-40	3,26	0,23	4,61
99-40L	0,43	0,03	0,60
FL98-24	0,38	0,16	0,54
99-42L	0,06	0,00	0,09

Tabelle 11: Ergebnisse der Expressionsanalyse des *PS1*-Genes in Hepatoblastomen. Neben der mRNA-Expression und des jeweiligen Standardfehlers ist das Verhältnis von *PS1*-Expression des Tumors bzw. der Tumorzelllinien oder des fetalen Lebergewebes/Mittelwert der *PS1*-Expression der normalen Lebergewebe dargestellt. Der Mittelwert der normalen Lebergewebe war 0,71. SD=Standardfehler, Expr.=Expression

Die relative *PS1*-Expression in Tumor und korrespondierenden Lebergeweben variierte von 0,13 bis 37,46. In den Proben D 107, D 840, M 14 und M 16 war die Relation <1 (0,13 - 0,94), in den übrigen >1 (1,03 – 37,46). Dies bedeutet, dass Presenilin 1 in der Mehrzahl der Hepatoblastome stärker exprimiert ist als in den korrespondierenden Lebergeweben. Die Hepatoblastomzelllinien zeigten eine Varianz des Quotientenwertes *PS1*-Expression (HBL-ZL)/ *PS1*-Expression (MW aller korrespondierenden Lebergeweben) von 1,34 bis 15,32 und damit eine erhöhte relative *PS1*-Expression. In den fetalen Geweben variierte die Relation *PS1*-Expression (fetale Leber)/ *PS1*-Expression (MW aller

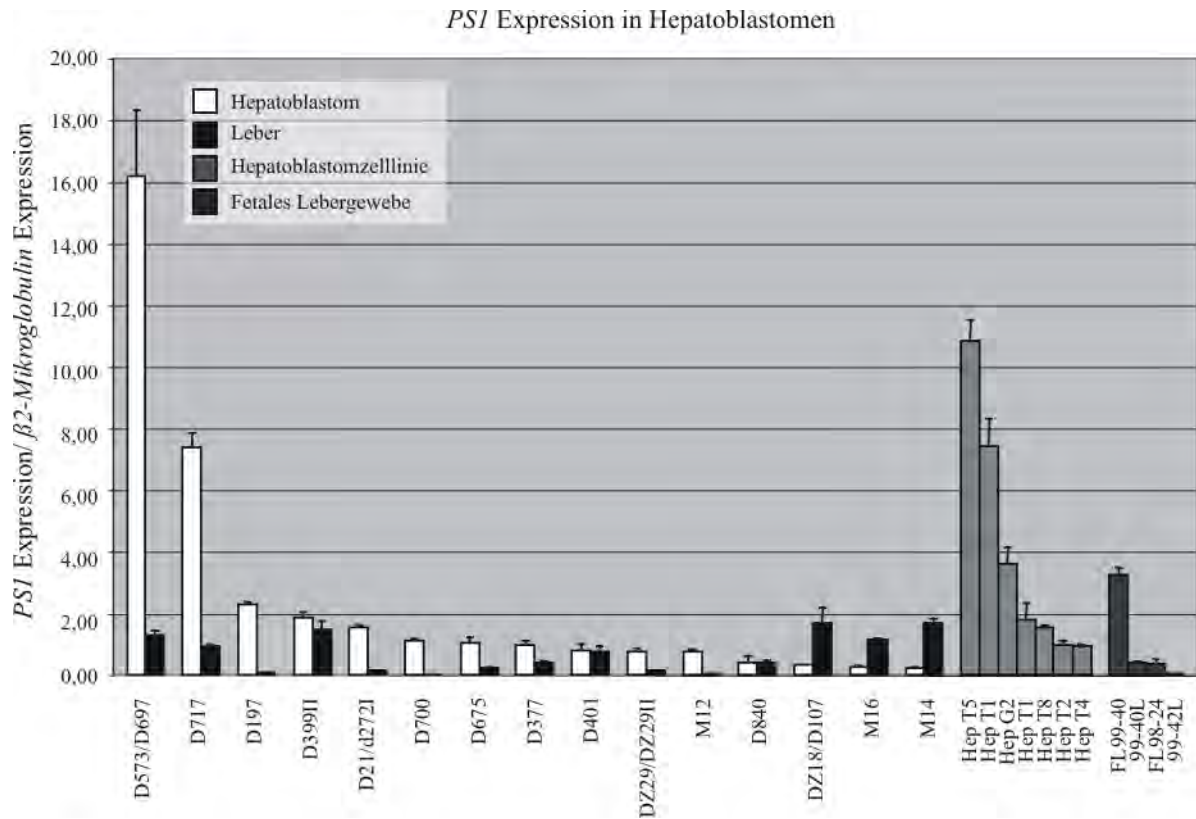


Abbildung 15: Säulendiagramm zur Darstellung der *PS1*-Expression in 15 Hepatoblastomen mit ihren korrespondierenden Lebergeweben sowie in 7 Zelllinienproben und 5 fetalen Lebergeweben. Jede Säule wurde durch den Standardfehler ergänzt.

korrespondierenden Lebern) zwischen 0,09 und 4,61, wobei nur die Probe FL99-40 eine Relation >1 zeigte. Demnach war *Presenilin 1* in fetalen Lebern gering exprimiert.

Eine statistische Analyse wurde mittels zweiseitigem, nicht parametrischem Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Hierbei ergab sich im Vergleich aller Hepatoblastome und aller korrespondierenden Lebergewebe bei Betrachtung der asymptotischen, zweiseitigen Signifikanz kein statistisch signifikanter *PS1*-Expressionsunterschied, was durch die geringere *PS1*-Expression in 3 Tumoren sowie durch den fehlenden *PS1*-Expressionsunterschied in zwei weiteren untersuchten Patienten zu erklären ist. Hepatoblastomzelllinien hingegen zeigten eine signifikant höhere *PS1*-Expression im Vergleich zu den korrespondierenden Lebergeweben ($p=0,004$). Fetale Lebern und adulte Lebern zeigten keine signifikanten *PS1*-Expressionsunterschiede.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass *PS1* in 10 Tumoren höher exprimiert war als in den korrespondierenden Normalgeweben und in drei Tumoren geringer. In zwei Tumoren konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen *PS1*-Expression im Tumor und im korrespondierenden Lebergewebe festgestellt werden. Die höhere *PS1*-Expression in Hepatoblastomzelllinien im Vergleich zu allen adulten Lebergeweben war statistisch signifikant. In fetalem Lebergewebe war *Presenilin 1* relativ gering exprimiert.

4.4 Inhibition des WNT-Signalweges in Medulloblastomzellen nach Cotransfektion eines *PS1*-Expressionsplasmides und eines Dual-Luciferase-Reporter-Systems

Um den Einfluss von *PS1* auf die WNT-Signalaktivität zu untersuchen wurde ein Zellsystem ausgewählt, in dem die Tumorzelllinien weder aktivierende Mutationen des β -Catenin-Gens, noch inaktivierende Mutationen in Genen, die Komponenten des WNT-Multiproteinkomplex kodieren, aufwiesen. So wurden die Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D283MED und D425MED mit dem Presenilin 1 Expressionsvektor pLPCX-PS1 bzw. dem Leervektor pLPCX und dem Top-Flash-Reportertermolekül cotransfiziert. 24h später erfolgte die Stimulation des WNT-Signalweges mit Wnt 3a für weitere 24h.

Zelllinie	MW Top-Flash-Luciferase-Aktivität pLPCX (SD)	MW Top-Flash-Luciferase-Aktivität pLPCX-PS1 (SD)
MEB-MED-8a	0.0795 (0.0005)	0.0495 (0.0005)
D283MED	0.535 (0.095)	0.225 (0.045)
D425MED	1.585 (0.185)	0.76 (0.16)

Tabelle 12: Darstellung der Mittelwerte der Top-Flash-Luciferase-Aktivität sowie der entsprechenden Standardfehler der cotransfizierten Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D283MED und D425MED nach Behandlung mit Wnt 3a. Die Messungen wurden zwei Mal durchgeführt. MW: Mittelwert, SD: Standardfehler, pLPCX: Leervektor, pLPCD-PS1: Presenilin 1-Plasmid.

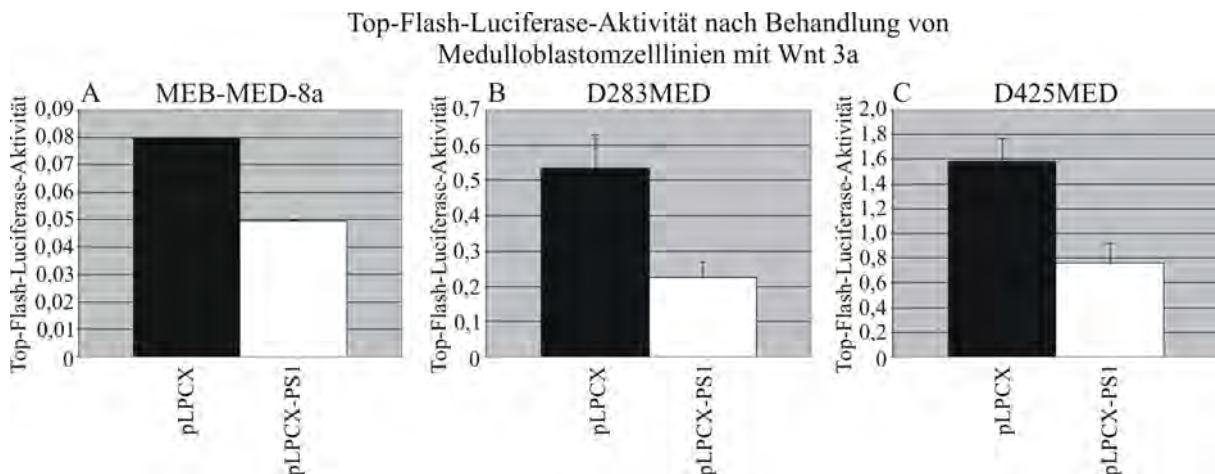


Abbildung 16: Säulendiagramm zur Darstellung der Top-Flash-Luciferase-Aktivität nach Behandlung dreier Medulloblastomzelllinien mit Wnt 3a. A-C: Schwarz ist die Luciferase-Aktivität der mit dem Leervektor pLPCX transfizierten Kontrollzellen dargestellt. Die weiße Säule repräsentiert die Luciferase-Aktivität der mit dem *Presenilin 1*-Plasmid pLPCX-PS1 transfizierten Zellen, die in allen Fällen deutlich reduziert ist.

Die Top-Flash-Luciferase-Aktivität der mit dem PS1-Plasmid transfizierten Zellen wurde mit den Kontrollzellen verglichen. MEB-MED-8a zeigte bei Transfektion mit dem *PS1*-Plasmid eine ca.

38%ige, D283MED eine ca. 58%ige und D425MED eine ca. 52%ige Reduktion der Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Kontrollen (vgl. Tab. 3.4 und Abb. 3.6).

4.5 Bestimmung der *Presenilin 1*-Expression in Medulloblastomzelllinien nach Stimulation des WNT-Signalweges mit Wnt 3a

Zur Untersuchung, in wie fern eine Aktivierung des WNT-Signalweges die Transkription des *PS1*-Genes beeinflusst, wurden die Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D425MED, Daoy und D283MED für 48 h mit 100 ng Wnt 3a stimuliert. Anschließend erfolgte die *PS1*RNA-Extraktion und die Bestimmung der RNA-Menge mit Hilfe der kompetitiven RT-PCR. Zur besseren Vergleichbarkeit der Proben untereinander wurden die *PS1*-Expressionswerte in Relation zu den Expressionswerten des Haushaltsgens $\beta 2$ -Mikroglobulin gesetzt. In allen vier Zelllinien bewirkte die Stimulation des WNT-Signalweges eine Steigerung der *PS1*-Expression. Während für Daoy und MEB-MED-8a dieser Effekt nur diskret war, zeigten D425MED und D283MED eine deutliche Zunahme der *PS1*-mRNA-Menge (vgl. Abb. 3.7).

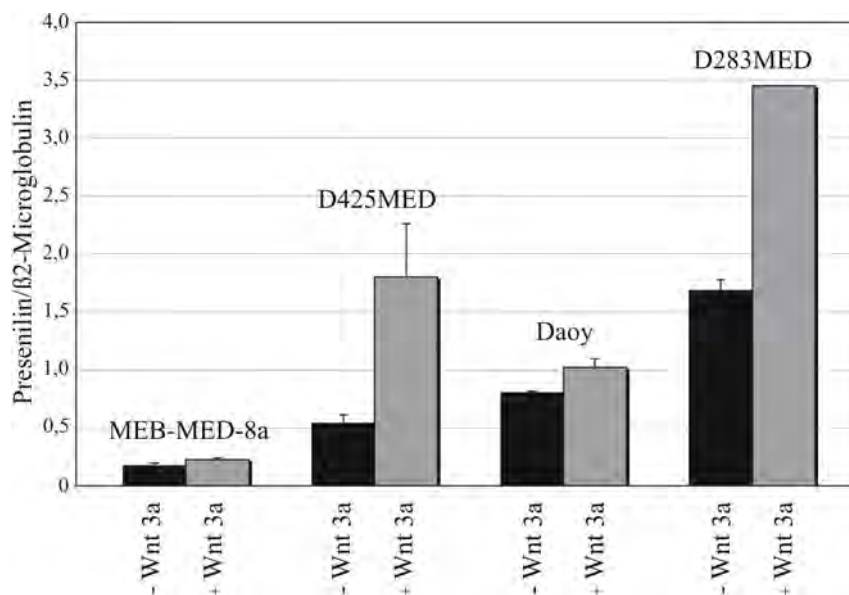


Abbildung 17: Darstellung der *PS1*-mRNA-Expression in vier Medulloblastomzelllinien ohne und nach Stimulation des WNT-Signalweges. In allen Fällen ist die *PS1*-mRNA-Expression nach Stimulation des WNT-Signalweges gesteigert. Besonders deutlich sieht man diesen Effekt am Beispiel von D425MED und D283MED.

4.6 Proliferationsanalyse unter Verwendung von *Nicastrin*-RNAi

Die Untersuchungen erfolgten an der Medulloblastomzelllinie Daoy sowie an der Hepatoblastomzelllinie HepT1. Da *PS1* und *Nicastrin* im Rahmen des γ -secretase-Komplexes co-reguliert sind,

konnte durch ein knock-down von *Nicastrin* mittels RNAi auch die Proteinmenge von *PS1* in diesen Zelllinien reduziert werden. Dieser Transfektionseffekt wurde zunächst durch einen Westernblot veranschaulicht und durch die Quantifizierung der Signalintensität behandelter versus unbehandelter Zellen belegt.

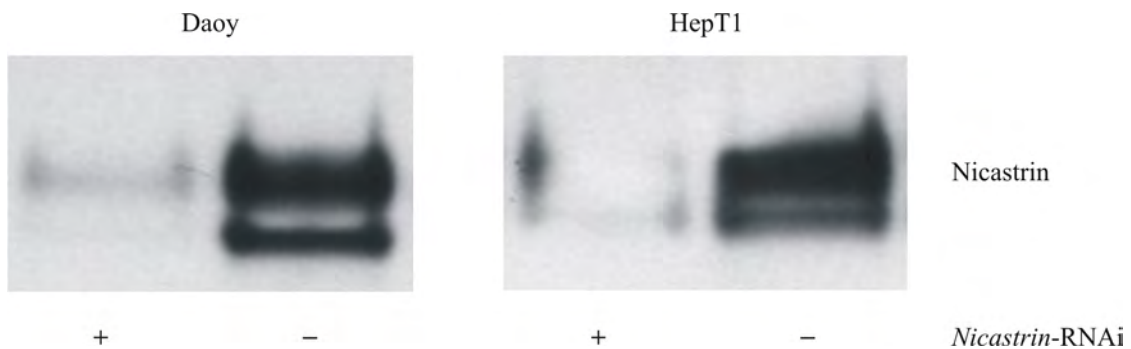


Abbildung 18: Westernblot der Zelllinien Daoy und Hep T1 nach Behandlung mit *Nicastrin*-RNAi sowie unbehandelte Zellen als Kontrollen. Geblotet wurde mit einem *Nicastrin* Antikörper. Es kamen ein 111 kDa schweres Nicastrin-Protein und eine 97 kDa schwere Variante zur Darstellung. Die behandelten Zellen zeigten deutlich weniger Nicastrin.

Dieser Westernblot (vgl. Abb. 3.8) zeigt nicht nur visuell eindrücklich den Effekt der *Nicastrin*-RNAi. Durch Vergleich der Signalintensitäten der 111 kDa Bande des Nicastrins behandelter und unbehandelter Zellen ergab sich für Daoy eine Reduktion der Proteinmenge auf 21,61% und für HepT1 19,93% nach Behandlung mit RNAi. 97 kDa großes Nicastrin konnte bei Daoy auf 10,37%, bei HepT1 auf 18,73% reduziert werden.

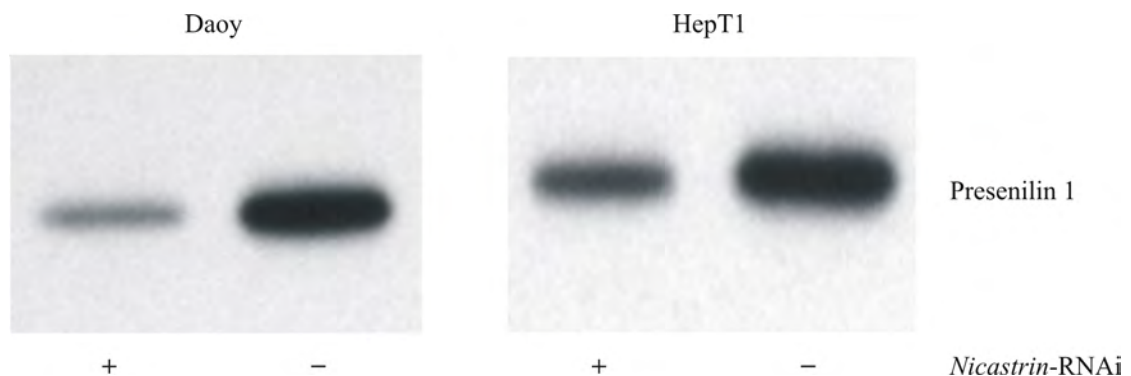


Abbildung 19: Westernblot der Zelllinien Daoy und HepT1 nach Behandlung mit *Nicastrin*-RNAi sowie unbehandelte Zellen als Kontrollen. Geblotet wurde mit einem *Presenilin*-Antikörper. Zur Darstellung kam ein ca. 27 kDa schweres Presenilin-Protein. Die behandelten Zellen zeigten deutlich weniger Presenilin.

Dieser zweite Blot (vgl. Abb. 3.9) belegt den Effekt des *Nicastrin*-silencings auf die Presenilin 1 Proteinmenge. Für Daoy konnte die Signalintensität von PS1 durch Behandlung der Zellen mit anti-*Nicastrin*-RNAi auf 33,68% und für Hep T1 auf 50,06% gesenkt werden.

Nachdem der Effekt der Transfektion auf diese Weise überprüft wurde, erfolgte ein erneuter Versuchsansatz. Dieses Mal wurden für jede Zelllinie 10 Proben transfiziert und 10 Kontrollen angelegt. Durch eine Fotodokumentation nach 48 h konnten morphologische Veränderungen der Tumorzellen festgehalten werden (vgl. Abb. 3.10 und 3.11). Ein Westernblot diente erneut der Darstellung des Transfektionserfolges. Zur Überprüfung der Konsequenz des Gen-knock-downs auf die Proliferationsaktivität der Tumorzellen wurde der ^3H -Thymidin-Einbau gemessen und als Säulendiagramm in Abb. 3.12 dargestellt.

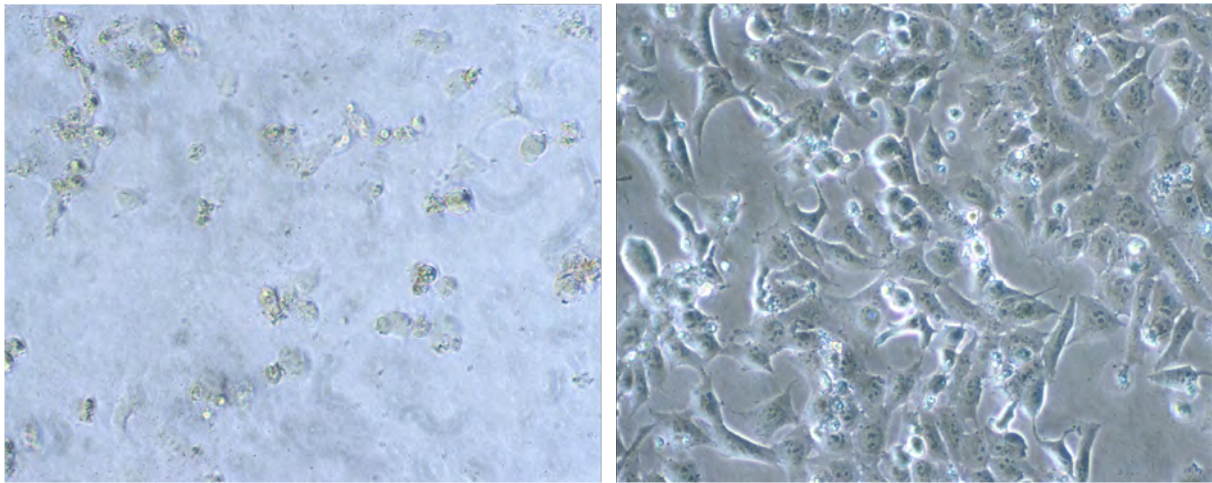


Abbildung 20: Fotografien der Medulloblastomzelllinie Daoy. Das linke Bild zeigt die transfizierten Zellen, das rechte Bild die Kontrollen. Der *Nicastrin*-knock-down führte zum Zelluntergang.

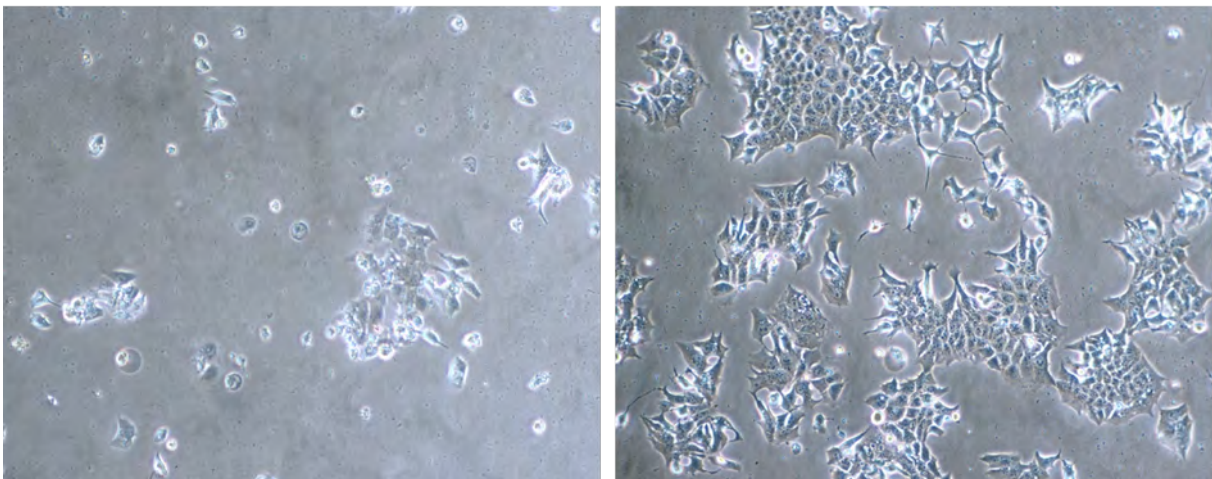


Abbildung 21: Fotografien der Hepatoblastomzelllinie HepT1. Das linke Bild zeigt die transfizierten Zellen, das rechte Bild die Kontrollen. Das *Nicastrin*-knock-down führte zum Zelluntergang.

Zur Überprüfung der Konsequenz des *Nicastrin*-knock-downs für die Zellproliferation wurde der ^3H -Thymidin-Einbau bestimmt. Dabei konnte für alle 10 transfizierten Proben eine deutliche Reduktion der Proliferationsaktivität im Vergleich zu ihren Kontrollen dargestellt werden. Für HepT1

verblieb im Mittel eine Proliferationsaktivität von 14,45%. Für Daoy verblieb im Mittel eine Proliferationsaktivität von 26,25%.

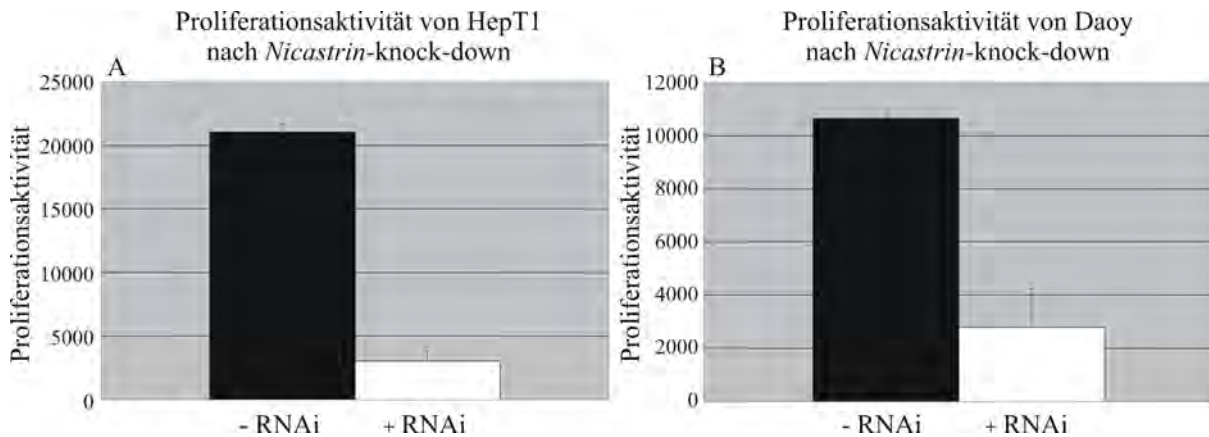


Abbildung 22: Auswirkung des *Nicastrin*-knock-downs auf die Proliferationsaktivität von Hepato- und Medulloblastomzellen. A) Säulendiagramm zur Darstellung der reduzierten Proliferationsaktivität der mit *Nicastrin*-RNAi transfizierten Hepatoblastomzelllinie HepT1 im Vergleich zu den Kontrollen. B) Säulendiagramm zur Darstellung der reduzierten Proliferationsaktivität der mit *Nicastrin*-RNAi transfizierten Medulloblastomzelllinie Daoy im Vergleich zu den Kontrollen. Die transfizierten Zellen sind jeweils weiß, die Kontrollen jeweils schwarz dargestellt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei knock-down des *Nicastrin* nicht nur die Proteinmenge von Nicastrin, sondern auch die von Presenilin deutlich reduziert wird. Das reduzierte Vorkommen dieser beiden Proteine führte sowohl zum Zelluntergang von Medulloblastom- und Hepatoblastomzellen, als auch zu einer erheblichen Reduktion der Zellproliferationsaktivität.

4.7 Proliferationsanalyse unter Verwendung eines γ -Sekretase-Inhibitors

Die Hepatoblastomzelllinien HUH6, HepG2 und HepT1 sowie die Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D283MED und D425MED wurden mit dem γ -Sekretaseinhibitor L685.458 in fünf Titrationsstufen (T1 = 0,25 μ M; T2 = 0,5 μ M; T3 = 1,0 μ M; T4 = 2,5 μ M; T5 = 5,0 μ M) für 48 h behandelt. Für jede Konzentrationsstufe wurde ein vierfacher Ansatz gewählt. Die Auswirkung der γ -Sekretaseinhibition auf die Proliferationsaktivität der Tumorzellen wurde durch einen 3 H-Thymidin-Inkorporations-Assay untersucht. Die so erhaltenen Messwerte wurden gemittelt und der Standardfehler berechnet. Zusätzlich wurde die Relation Proliferationsaktivität (behandelte Tumorzellen)/ Proliferationsaktivität (unbehandelte Tumorzellen) bestimmt (vgl. Abb. 3.13 - 3.18).

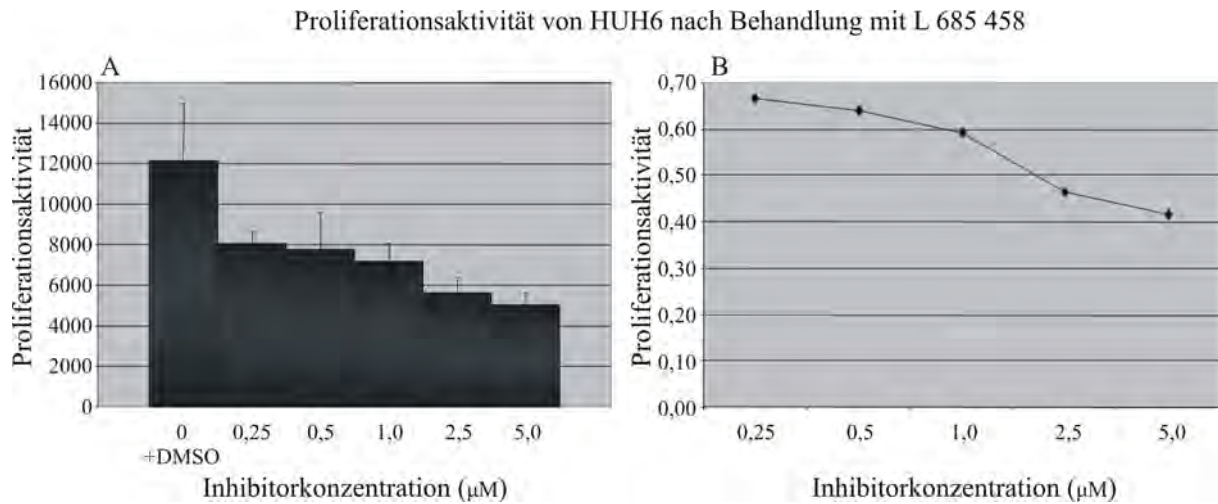


Abbildung 23: Proliferationsaktivität von HUH6 nach Behandlung mit L 685 458 A) Säulendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Die Behandlung der Zelllinie HUH6 mit L 685 458 hatte einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation. Inhibitorkonzentration und mittlere Proliferationsaktivität verhalten sich hierbei direkt proportional. Die Säulen sind durch den jeweiligen Standardfehler ergänzt. B) Kurvendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Präsentiert wird die Relation von Proliferationsaktivität (behandelte Zellen)/ Proliferationsaktivität (unbehandelte Zellen).

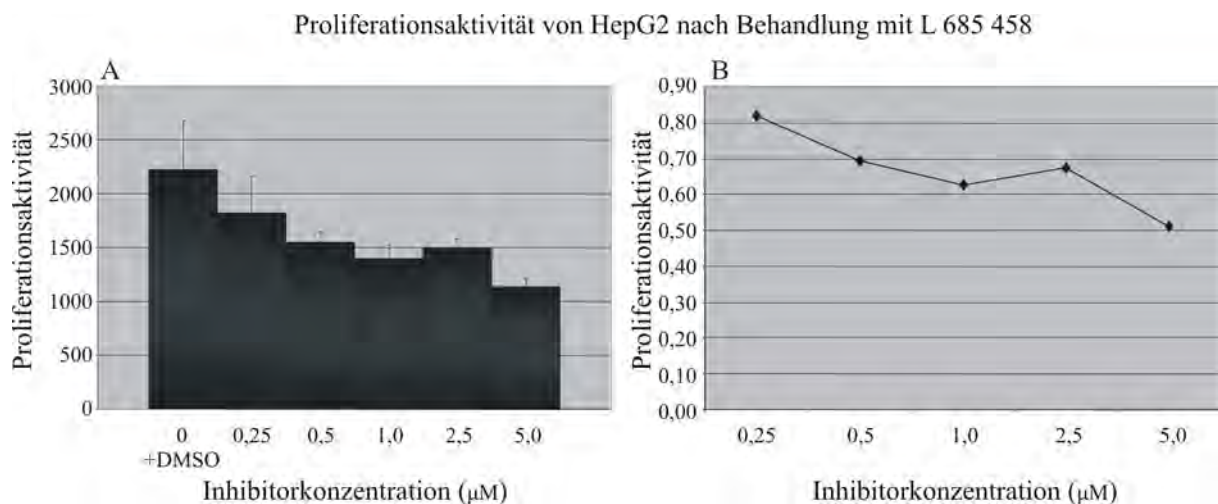


Abbildung 24: Proliferationsaktivität von HepG2 nach Behandlung mit dem Inhibitor L 685 458 A) Säulendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Die Behandlung der Zelllinie HepG2 mit L 685 458 hatte einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation. Mit Ausnahme der Inhibitorkonzentration von $2,5\mu\text{M}$ sinkt die mittlere Proliferationsaktivität mit steigender Inhibitorkonzentration ab. Die Säulen sind durch den jeweiligen Standardfehler ergänzt. B) Kurvendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Präsentiert wird die Relation von Proliferationsaktivität (behandelte Zellen)/ Proliferationsaktivität (unbehandelte Zellen).

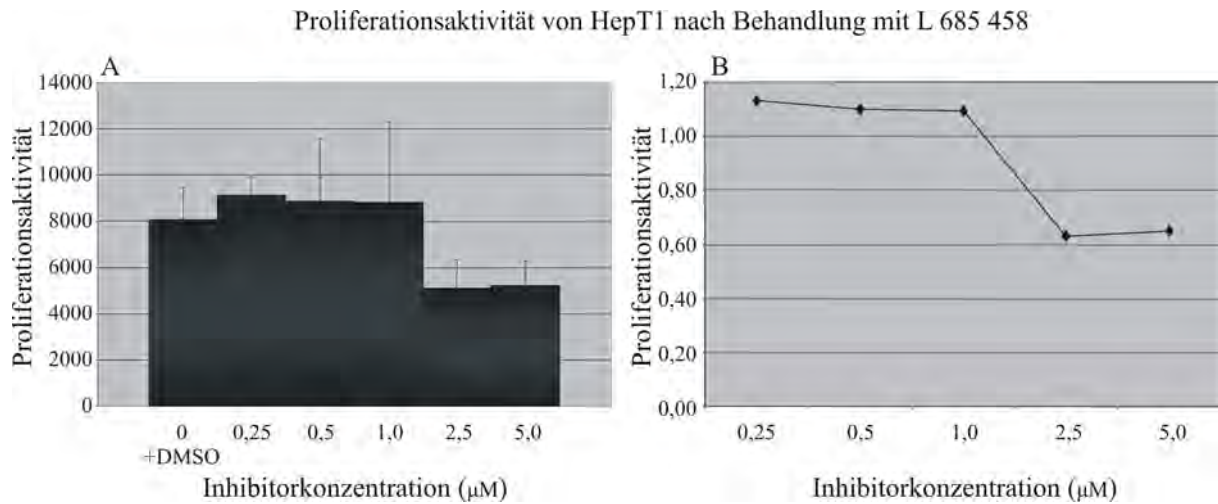


Abbildung 25: Proliferationsaktivität von HepT1 nach Behandlung mit dem Inhibitor L 685 458
 A) Säulendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Die Behandlung der Zelllinie HepT1 mit L 685 458 hatte erst ab einer Inhibitor-Konzentration von $2,5\mu\text{M}$ einen hemmenden Effekt auf die mittlere Proliferationsaktivität. Die Säulen sind durch den jeweiligen Standardfehler ergänzt. B) Kurvendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Präsentiert wird die Relation von Proliferationsaktivität (behandelte Zellen)/ Proliferationsaktivität (unbehandelte Zellen).

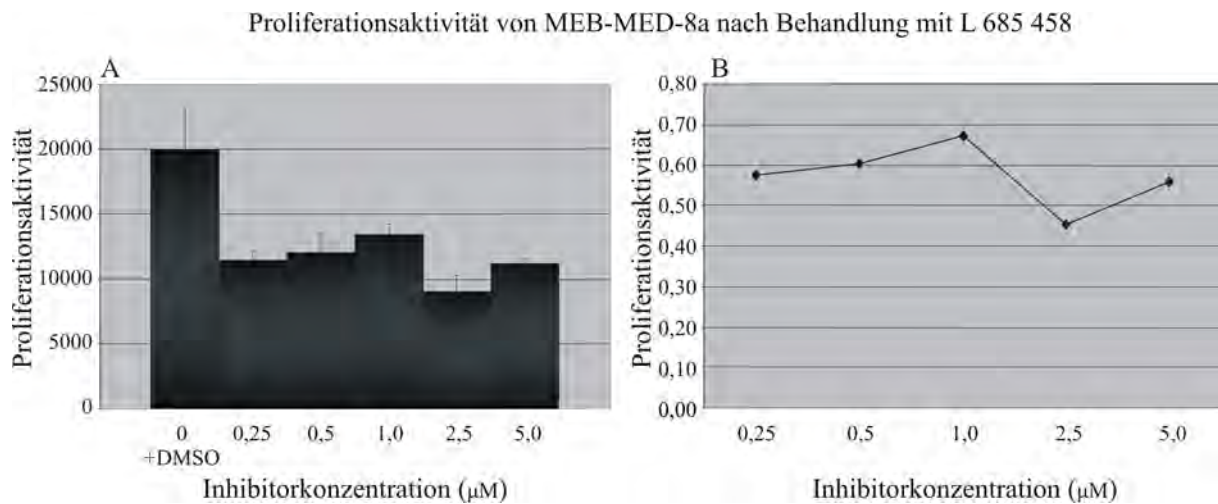


Abbildung 26: Proliferationsaktivität von MEB-MED-8a nach Behandlung mit dem Inhibitor L 685 458
 A) Säulendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Die Behandlung der Zelllinie MEB-MED-8a mit L 685 458 hatte zwar einen hemmenden Effekt auf die mittlere Proliferationsaktivität, dabei lag jedoch keine Proportionalität zwischen Inhibitor-Konzentration und Proliferationsinhibition vor. Die Säulen sind durch den jeweiligen Standardfehler ergänzt. B) Kurvendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Präsentiert wird die Relation von Proliferationsaktivität (behandelte Zellen)/ Proliferationsaktivität (unbehandelte Zellen).

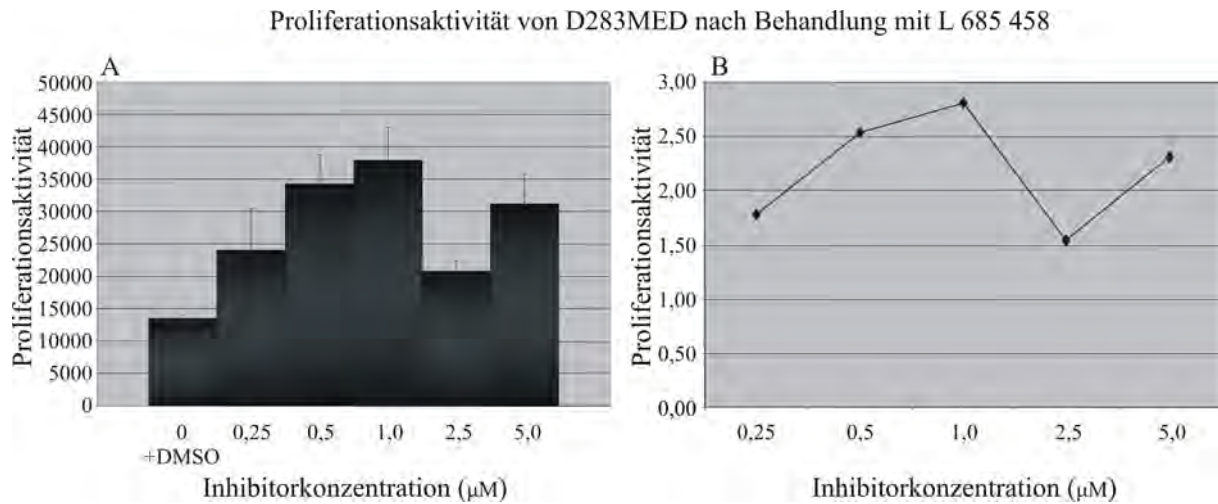


Abbildung 27: Proliferationsaktivität von D283MED nach Behandlung mit dem Inhibitor L 685 458 A) Säulendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Die Behandlung der Zelllinie D283MED mit L 685 458 hatte keinen hemmenden Effekt auf die mittlere Proliferationsaktivität. Die Säulen sind durch den jeweiligen Standardfehler ergänzt. B) Kurvendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Präsentiert wird die Relation von Proliferationsaktivität (behandelte Zellen)/ Proliferationsaktivität (unbehandelte Zellen).

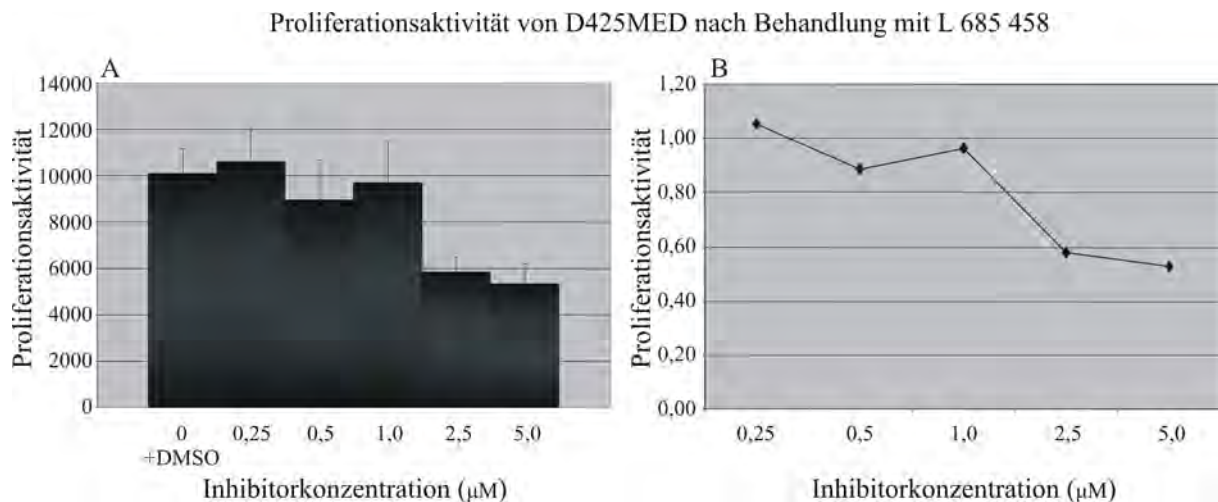


Abbildung 28: Proliferationsaktivität von D425MED nach Behandlung mit dem Inhibitor L 685 458 A) Säulendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Die Behandlung der Zelllinie D425MED mit L 685 458 hatte erst ab einer Inhibitorkonzentration von $2,5\mu\text{M}$ einen hemmenden Effekt auf die mittlere Proliferationsaktivität. Die Säulen sind durch den jeweiligen Standardfehler ergänzt. B) Kurvendiagramm zur Darstellung des ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays. Präsentiert wird die Relation von Proliferationsaktivität (behandelte Zellen)/ Proliferationsaktivität (unbehandelte Zellen).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsaktivität der Hepatoblastozelllinien HUH6, HepG2, HepT1 durch Behandlung mit L 685 458 gesenkt werden konnte. Dabei verhielt

sich der Inhibitionseffekt bei HUH6 und bei HepG2 (Ausnahme bei $2,5\mu\text{M}$) proportional zur Inhibitorkonzentration. Bei HepT1 konnte ein deutlicher Inhibitionseffekt erst ab einer Inhibitorkonzentration von $2,5\mu\text{M}$ beobachtet werden.

Bei der Medulloblastozelllinie MEB-MED-8a zeigte sich zwar ein inhibitorischer Effekt auf die Proliferationsaktivität. Dieser war jedoch ohne Proportionalität zur Inhibitorkonzentration. Für D425MED konnte ein deutlicher Inhibitionseffekt erst ab einer Inhibitorkonzentration von $2,5\mu\text{M}$ beobachtet werden. D283MED zeigte nach Behandlung mit L 685 458 keine Reduktion, sondern vielmehr eine Steigerung der Proliferationsaktivität.

5 Diskussion

5.1 Presenilin 1 und der WNT-Signalweg

5.1.1 Mutationsanalyse des *Presenilin 1*-Genes

Verschiedene Komponenten des WNT-Signalweges haben in diversen Tumoren infolge von Mutationen ihre biologische Funktion verändert. Neben aktivierenden Mutationen des β -Catenin Genes selbst (De La Coste et al., 1998; Kitaeva et al., 1997; Koch et al., 1999 und 2001; Morin et al., 1997, Rimm et al., 1999; Robbins et al., 1996), sind inaktivierende Mutationen von *Axin 1* und *Conduktin* (*Axin 2*) in kolorektalen Tumoren (Liu et al., 2000; Webster et al., 2000), hepatozellulären Tumoren (Sato et al., 2000), ovariären, endometriiden Adenokarzinomen (Wu et al., 2001) und Medulloblastomen (Dahmen et al., 2001) beschrieben. Die gemeinsame Konsequenz ist eine intranukleäre Akkumulation des Signalproteins β -Catenin, durch das die Transkription von Zielgenen initiiert wird. PS1 ist Komponente einer alternativen, vom WNT-Signal unabhängigen Kaskade, in der es als Bestandteil eines Multienzymkomplexes - ähnlich wie Axin - die Degradation von β -Catenin unterstützt (Khang et al., 2002). In diesem Zusammenhang stellten wir uns die Frage, ob *Presenilin 1* in pädiatrischen Tumoren - analog zu *Axin* - infolge von Mutation seine Funktion verloren hat und so zu einer Stabilisierung von β -Catenin beiträgt. Durch die SSCP-Methodik wurden 106 Medulloblastome und 12 Medulloblastomzelllinien sowie 84 Hepatoblastome auf genetische Alterationen untersucht. Im gesamten exonischen Bereich gab es keinen Anhalt für Mutationen. Lediglich Basenaustausche im intronischen Bereich des Gens wurden beobachtet. Der auf Intron 5 in Medullo- und Hepatoblastomen beobachtete Shift zeigte eine große Variationsbreite hinsichtlich seiner Darstellbarkeit mit einer inkonstanten Präsenz im korrespondierenden Blut bzw. Lebergewebe. Der auf Intron 8 in Medullo- und Hepatoblastomen beobachtete Basenaustausch ließ sich in einer Versuchswiederholung nicht reproduzieren. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Veränderungen von Intron 5 und 8 unspezifisch sind und beispielsweise auf einen Enzymfehler zurückzuführen sind.

Intron 10 hingegen zeigte nur im Medulloblastomkollektiv einen Shift, der sich - wenn auch in abgeschwächter Form - reproduzieren ließ und nicht nur in der Tumorprobe, sondern auch in der korrespondierenden Blutprobe zur Darstellung kam. Daher gehen wir davon aus, dass es sich bei dieser Sequenzalteration um einen intronischen Polymorphismus handelt, dem ein Basenaustausch von T zu G zu Grunde liegt und der in 3,24% der Medulloblastomproben auftrat. Sequenzänderungen im intronischen Bereich des *Presenilin 1* sind im Rahmen der Alzheimerforschung durchaus von pathogenetischer Relevanz. Auf Intron 4 des *Presenilin 1* ist z.B. die Mutation g.23024delG beschrieben. Diese führt zu einem aberanten splicing und zur Synthese dreier unterschiedlicher Transkripte (c.338–339insTAC, c.170–338del, c.88–338del), wobei der ersten Variante mit Insertion einer Aminosäure Threonin zwischen Codon 113 und 114 im Rahmen der Alzheimer-Genese eine pathogenetische Bedeutung zukommt (De Jonghe et al., 1999). Für das Intron 10 des *Presenilin 1* sind bislang keine Polymorphismen oder Mutationen beschrieben worden, die zu einem alternati-

ven Spleissvorgang führen. Da der von uns detektierte Polymorphismus jedoch 17 Basen hinter der letzten kodierenden Base von Exon 9 liegt, ist er 15 Positionen von der Spleiss-Donorstelle zwischen Exon 9 und Exon 10 entfernt. Es ist aufgrunddessen nicht davon auszugehen, dass dieser Polymorphismus zur Synthese funktionell relevanter, alternativer Transkripte führt.

In Erinnerung der Ergebnisse von Dahmen et al, die 2001 große Leseraster - Mutationen im kodierenden Bereich von *Axin* detektierten untersuchten wir ergänzend 39 Medulloblastom- und 15 Hepatoblastomproben mit Hilfe des PCR/RT-PCR Verfahrens auf große Exon- übergreifende Deletionen des *PS1*-Gens. Auch hier wurden keine Mutationen detektiert. Zusammenfassend ergab sich also im Unterschied zu *Axin* kein Anhalt für mutagene Funktionsverluste des Presenilin-Proteins in den von uns untersuchten Medullo- und Hepatoblastomproben.

5.1.2 Expressionsanalyse des *Presenilin 1*

Khang et al veröffentlichte 2002 erste Beobachtungen an Mäuseembryonen späten Gestationsalters des Phänotyps *PS1*^{-/-}. Untersucht wurde das Rückenmark. Es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von *Presenilin 1* zu überschießendem Zellwachstum und Organisationsverlust des Rückenmarkgewebes führt. Die erzielten morphologischen Veränderungen waren identisch mit denen, die aus einer *Wnt1*-Überexpression resultieren. Auch im Bereich der Haut und anderer Organe habe man die Entwicklung von Neoplasien bei Verlust des *PS2*-Gens und Hemizygotie des *PS1*-Gens beobachtet (2002, unveröffentlichte Daten). Auf dem Hintergrund dieser Daten formulierten wir die Hypothese, *Presenilin 1* könnte möglicherweise als Tumorsuppressorgen fungieren. Demnach wären in fetalen Geweben niedrige, in adulten Geweben hohe und in malignen Geweben niedrige bis fehlende Expressionswerte zu erwarten.

Geringe Expression von *PS1* in Medulloblastomen

Untersucht wurden 12 klassische und 12 desmoplastische Medulloblastome, 2 Medullomyoblastome und 7 Medulloblastomzelllinien. Als Kontrollgewebe fungierten 5 fetale und 5 adulte Kleinhirne. Hierbei war *Presenilin 1* im tumorösen Gewebe in Relation zum Mittelwert der fetalen Gewebe überwiegend niedrig exprimiert. Diese Beobachtung wäre formal mit der Hypothese eines Tumorsuppressorgenes vereinbar. Betrachtet man sich aber das sehr heterogene Expressionsmuster in Tumoren wie auch in Kontrollgeweben, so erscheint das Formulieren einer allgemeingültige Aussage schwer möglich. Gegen die Hypothese, *Presenilin 1* sei ein Tumorsuppressorgen spricht der Vergleich der adulten und fetalen Kontrollgewebe. Hier konnte kein signifikanter Unterschied der *PS1*-Expression festgestellt werden, wie man ihn für ein Tumorsuppressorgen erwarten würde. So war auch die mittlere *PS1*-Expression in beiden Kontrollgruppen etwa gleich. Bei Abwesenheit von Mutationen im kodierenden Bereich des Genes und fehlender eindeutiger Regulation des Genes auf Expressionsebene kann anhand der vorliegenden Daten die Hypothese, *PS1* fungiere als Tumorsuppressorgen in Medulloblastomen, nicht aufrechterhalten werden.

Überexpression von *PS1* in Hepatoblastomen

Das Hepatoblastomkollektiv umfasste 15 Tumorproben mit korrespondierenden Lebergeweben. 10 Tumorproben zeigten eine *PS1*-Überexpression und drei Tumore eine geringere *PS1*-Expression im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe. In 2 Tumoren konnte kein wesentlicher Expressionsunterschied zum Normalgewebe festgestellt werden. Gemäß diesen Daten fanden wir in der Mehrzahl der Fälle eine Überexpression von *PS1* in Hepatoblastomen verglichen mit den korrespondierenden normalen Lebergeweben. Auch alle sieben untersuchten Hepatoblastomzelllinienproben sowie die vier fetalen Lebergewebe zeigten eine zum Mittelwert aller adulten Kontrollgewebe gesteigerte Expression von *Presenilin 1*. Für Hepatoblastomzelllinien war diese gesteigerte *PS1*-Expression gemäß dem zweiseitigen, nicht parametrischen Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben statistisch signifikant. Diese Ergebnisse machen die Hypothese, *Presenilin 1* sei ein Tumorsuppressorgen, unwahrscheinlich. Vielmehr fällt auf, dass beim Vorliegen gesteigerter WNT-Signalweg-Aktivität auch eine erhohnte Expression von *Presenilin* zu verzeichnen ist. Das parallele Auftreten dieser beiden Phänomene könnte ein Hinweis auf das Vorliegen einer Interaktion sein. Für überexprimiertes *DKK1* (Gonzalez-Sancho et al, 2005; Niida et al, 2004; Wirths et al., 2003) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es nicht nur Zielgen des WNT-Signalweges ist, sondern diesen auch über einen negativen Rückkopplungsmechanismus inhibiert. Diese Hemmung wird über eine Interaktion mit dem LRP6/Frizzled-Komplex vermittelt (Bafico et al, 2001; Mao et al, 2001). Die vorliegenden Expressionsdaten führen zu der Frage, ob auch überexprimiertes *Presenilin 1* in Hepatoblastomen als Zielgen und negativ Regulator des WNT-Signalweges fungiert. Es bleibt weiterhin zu diskutieren, warum drei Proben eine eher verminderte Expression des *Presenilin 1*-Genes zeigen. Geht man davon aus, dass *PS1* tatsächlich Zielgen des WNT-Signalweges ist, dann liegt als Erklärung nahe, dass es viele Interaktionen gibt, die die Aktivität dieses Signalweges beeinflussen. So existieren beispielsweise Bindungspartner von β -Catenin wie Chibby und Icat, die einen modulierenden Einfluss auf die β -Catenin vermittelte Transkription ausüben können (Tago et al, 2000; Takamaru et al 2003). Neben dem heterogenen Expressionmuster fällt auch eine Variationsbreite der Uberexpressionsstarke auf. Als mögliche Erklärung mag hier die Tatsache dienen, dass es weitere Signalwege gibt, die ergänzend zum WNT-Signalweg zu einer Erhöhung der intranukleären β -Catenin-Akkumulation beitragen. In Prostata-Carzinomen beispielsweise erfolgt dies über den Phosphatidyl-Inositol-3-kinase/Akt Signalweg, der das Enzym GSK3 β als Bestandteil des β -Catenin degradierenden Multienzymkomplexes hemmt (Sharma et al, 2002).

5.1.3 *Presenilin 1* als Zielgen und Inhibitor des WNT-Signalweges

Wie *Presenilin 1* sind eine Reihe weiterer Gene in Hepatoblastomen überexprimiert. Zu diesen zählen neben *Conductin* (*Axin 2*) und *DKK1* (Lustig et al., 2002; Wirths et al., 2003) auch *NKD1* und β -*TRCP* (Koch et al., 2005). Für alle vier Gene konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur Zielgene des WNT-Signalweges sind, sondern diesen auch über einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmen. Da in Hepatoblastomen der β -Catenin-Abbau durch aktivierende Mutationen des β -*Catenin*-Gens selbst oder durch inaktivierende Mutationen in Genen, die für den Degradierungs-

komplex kodieren, inhibiert ist, verliert dieser Rückkopplungsmechanismus seine Effektivität. Die Überexpression von negativ Regulatoren ist damit Ausdruck des frustrierten Versuches, die WNT-Signalwegaktivität in Hepatoblastomen zu kontrollieren. Um zu überprüfen, ob die detektierte *Presenilin 1* Überexpression auch Ausdruck eines solchen Mechanismus sein könnte, sollte untersucht werden, ob *Presenilin 1* Zielgen des WNT-Signalweges ist und ob eine *Presenilin 1*-Überexpression eine Reduktion des WNT-Signals zur Folge hat.

Da unsere Hepatoblastomzelllinien aktivierende β -*Catenin*-Mutationen tragen, waren sie für diese Untersuchungen nicht geeignet. Aus diesem Grund führten wir *in vitro* Studien an Medulloblastomzelllinien durch, bei denen bisher keine Mutationen in Komponenten des WNT-Multiproteinkomplexes identifiziert wurden. In mehreren Medulloblastomzelllinien konnte in einem ersten Versuch gezeigt werden, dass aus der Stimulation der Zellen mit Wnt 3a eine gesteigerte mRNA-Expression von *Presenilin 1* resultierte. *Presenilin 1* darf daher als Zielgen des WNT-Signalweges in Medulloblastoma bezeichnet werden. Um zu untersuchen, ob *Presenilin 1* ein direktes WNT-Zielgen ist, führten wir zusätzlich eine Datenbankrecherche durch. Direkte Zielgene des WNT-Signalweges besitzen in ihrem Promotorbereich Lef/Tcf-Bindungsstellen. Die Consensussequenz für Lef/Tcf lautet YCTTTGWW, d.h. C/GCTTTGA/TA/T und da enhancer keine Richtung besitzen auch A/TA/TCAAAGC/G (Waterman et al., 2004). Der *Presenilin 1*-Promotor (Gen Bank Tm AF 029701) zeigte jedoch für keine dieser Sequenzen eine Übereinstimmung und wies folglich keine Lef/Tcf-Bindungsstellen auf. Gemäß dieser Analyse handelt es sich bei *Presenilin 1* also um kein direktes, sondern ein indirektes Zielgen des WNT-Signalwegs. Indirekte Zielgene werden durch Transkriptionsfaktoren reguliert, die selbst direkte WNT-Zielgene sind. So reguliert beispielsweise das direkte WNT-Zielgen *Myc* über Interaktion mit MIZ-1 die Transkription des indirekten WNT-Zielgens *p21WAF1* (Wu et al., 2003). Zukünftige Studien müssen zeigen, welche Transkriptionsfaktoren bzw. welche direkten WNT-Zielgene mit dem *Presenilin 1*-Promotor interagieren und so die *PS1*-Transkription kontrollieren.

In einem zweiten Versuch stimulierten wir den WNT-Signalweg mit Wnt 3a nach Cotransfektion der Medulloblastomzellen mit dem *Presenilin 1* Expressionsvektor pLPCX-*PS1* bzw. dem Leervektor pLPCX und dem Top-Flash-Reportermolekül. Medulloblastomzellen, die den *Presenilin 1* Expressionsvektor trugen, zeigten eine deutliche Reduktion der Top-Flash-Luciferase-Aktivität verglichen mit ihren Kontrollzellen. Diese Daten lassen vermuten, dass *Presenilin 1* den WNT-Signalweg in Medulloblastomzellen hemmt. Auch wenn diese Versuche an Medulloblastomen und nicht an Hepatoblastomen durchgeführt wurden, ist ein ähnlicher Mechanismus zur Erklärung der *PS1*-Überexpression in Hepatoblastomen wahrscheinlich. Zur Überprüfung der Hypothese sollten zukünftige Studien die Auswirkung der WNT-Inhibition auf die Expression von *Presenilin 1* untersuchen. Eine Reduktion der *PS1*-mRNA-Transkripte nach Behandlung der Hepatoblastomzellen mit WNT-Antagonisten würde die Annahme, dass *Presenilin 1* auch in Hepatoblastomen Zielgen ist, bestätigen. Als WNT-Antagonist könnte beispielsweise der neue molekulare Inhibitor ICG-001 eingesetzt werden. ICG-001 hemmt durch Interaktion mit dem Transkriptionscoaktivator Creb- (Tcf/beta-catenin/cAMP-response element-binding protein) binding protein (CBP) die β -Catenin vermittelte Transkription von Zielgenen des WNT-Signalweges (Eguchi et al., 2005). Eine zweite

Methode den Zielgencharakter von *PS1* nachzuweisen wäre ein β -*Catenin* Silencing unter Verwendung von RNAis. Die Überexpression von WNT-Zielgenen, die auch negativ Regulatoren des WNT-Signalweges sind, ist ein Phänomen im Rahmen der Tumorigenese. Deswegen könnte diesen Genen zukünftig eine Bedeutung als Tumormarker im Rahmen der Tumorfürhdiagnostik zukommen (Lustig et al., 2002; Wirths et al., 2003). Die endgültige Bestätigung der von uns aufgestellten Hypothese vorausgesetzt, könnte *Presenilin 1* möglicherweise eine Bedeutung als Tumormarker für die Diagnostik von Hepatoblastomen erhalten.

5.1.4 Zelluntergang von Medullo- und Hepatoblastomzelllinien nach Transfektion mit *Nicastrin* RNAi

Wir konnten zeigen, dass *PS1* in Medulloblastomzellen Zielgen und Inhibitor des WNT-Signalweges ist und vermuten für Hepatoblastomzellen auf der Grundlage der Expressionsdaten eine ähnliche Funktion. Zur Detektion weiterer funktionaler Effekte dieses WNT-Zielgens z.B. auf Tumorzellvitalität und -proliferation reduzierten wir auf indirekte Weise die *PS1*-Transkript-Menge. Da Zhang et al. 2005 zeigen konnten, dass alle Komponenten des γ -Secretase-Komplexes coreguliert sind, gelang es in der vorliegenden Arbeit durch knock-down von *Nicastrin* auch das Vorkommen des reifen Presenilin 1-Proteins in Medullo- und Hepatoblastomzelllinien zu reduzieren. Untersucht wurde in diesem Zusammenhang die Medulloblastomzelllinie Daoy und die Hepatoblastomzelllinie HepT1. Der Transfektionserfolg konnte mit einem Westernblot unter Verwendung eines anti-Nicastrin sowie eines anti-Presenilin Antikörpers dargestellt werden. Bereits bei mikroskopischer Begutachtung der Zellen 24h nach Transfektion fiel in beiden Tumorentitäten eine verminderte Zelladhärenz sowie ein verzögertes Zellwachstum im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Vereinzelt avitale Zellen hatten sich vom Boden der 6-Lochplatten abgelöst. Die Fotodokumentation, die nach 48h angefertigt wurde, zeigte dann sehr deutlich, dass die Transfektion und damit die Reduktion der Proteine Nicastrin und Presenilin zum Untergang der Medulloblastom- und Hepatoblastomzellen führten. Die nach 72h angefertigte Proliferationsanalyse demonstrierte abschließend die Reduktion der Zellproliferation in allen 10 Ansätzen. Diese Daten lassen vermuten, dass *PS1* nicht nur Zielgen und negativ Regulator des WNT-Signalweges ist, sondern weitere Effekte ausübt, die für das Wachstum und Überleben von Tumorzellen von Bedeutung sind. Wir können bislang nicht ausschließen, dass der beobachtete Zelltod durch unspezifische RNAi-Effekte (sogenannte off-target-Effekte) ausgelöst wurde. Um unsere Daten zu untermauern sollte der Effekt durch Verwendung alternativer *Nicastrin*- und *Presenilin 1*-RNAi-Sequenzen überprüft werden. Desweiteren könnte man versuchen, den Effekt durch gleichzeitige Überexpression von *Presenilin 1*-cDNA zu neutralisieren, um damit dessen Spezifität zu belegen.

Dem beobachteten Zelltod können zwei mögliche Mechanismen zu Grunde liegen. Nekrose oder Apoptose. Eine Nekrose ist ein exogen vermittelter Zelltod, der z.B. toxische, hypoxische oder traumatische Ursachen haben kann. Als Apoptose bezeichnet man den programmierten Zelltod, der unter physiologischen Bedingungen eine Zellektion bewirkt. In der Literatur sind vielfältige Hinweise zu finden sind, dass der Nicastrin-Presenilin-Komplex bzw. auch Presenilin allein eine antiapoptotische Wirkung entfalten kann (Deftos et al., 1998; Guo et al., 1999; Jehn et al., 1999;

Kim et al., 2001; Kovacs et al., 1999; Mattson et al., 2000; Shelly et al., 1999; Xie et al., 2004; Zhang et al., 1998). So beschrieb beispielsweise Kim et al. 2001 eine antiapoptotische Wirkung von Presenilin durch negativregulation des SAPK/JNK-Signalweges, wobei diese Presenilin-Wirkung von der Funktionstüchtigkeit der γ -Secretase abhängig zu sein scheint. Auch über Förderung der UPR-Signalwegaktivität entfaltet Presenilin 1 eine antiapoptotische Wirkung (Imaizumi et al., 2001, Takuma et al., 2005). Schließlich gibt es auch Hinweise darauf, dass unprozessiertes Presenilin 1 (Presenilin 1-Holoprotein) nicht nur in neuronalen Zellen (Guo et al., 1999; Kovacs et al., 1999; Mattson et al., 2000; Zhang et al., 1998), sondern auch in Neurogliomzellen antiapoptotisch wirkt. In letzteren ist beschrieben, dass durch ein *Presenilin 1*-knock-down die antiapoptotische Wirkung aufgehoben werden (Xie et al., 2004). Sollte es sich bei dem von uns beobachteten, knock-down assoziierten Zelltod folglich um einen spezifischen Effekt handeln, liegt die Vermutung nahe, dass auch dieser apoptotisch vermittelt sein könnte. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnte z.B. ein Caspase-3-Assay durchgeführt werden. Im folgenden soll das Ergebnis des RNAi knock-down sowie der γ -Secretase-Studien in Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg diskutiert werden, indem Presenilin als katalytische Komponente der γ -Secretase fungiert.

5.2 *Presenilin 1* und der Notch-Signalweg

Für den Notch-Signalweg sind pleiotrope Effekte beschrieben worden. Neben der Zelldifferenzierung kann er auch eine Wirkung auf die Zellproliferation (Berry et al, 1997; Johnston and Edgar, 1998) und den programmierten Zelltod (Deftos et al., 1998; Jehn et al., 1999; Shelly et al., 1999) haben. Diese unterschiedlichen Wirkungen ergeben sich zum einen aus der Vielzahl seiner möglichen Liganden, Co-Repressoren, Co-Aktivatoren und Zielgenen, zu denen bei Säugetieren die *HES*-Gene (Hairy Enhancer of split) (Jarriault et al, 1998; Stifani et al, 1992), *Cyclin D1*, das auch Zielgen des WNT-Signalweges ist (Shtutman et al., 1999; Tetsu et al., 1999), und *P21* gehören. Zum anderen wird der Effekt des Notch-Signals durch die Art der negativ Regulatoren sowie durch die Interaktion mit anderen Signalwegen bestimmt. Zu diesen zählen nicht nur der Ras-Signalweg (Ordentlich et al., 1998), sondern z.B. über eine Verbindung durch das Protein Dishevelled (Axelrod et al., 1996) oder das Pdz Protein Canoe/AF-6 (Carmena et al., 2006) auch der WNT-Signalweg. Wie für den WNT-Signalweg existieren auch für den Notch-Signalweg verschiedene Hinweise, dass Änderungen von *Notch* auf Expressions- und Signalentstehungsebene zur Tumorigenese beitragen (Miele and Osborne, 1999). So entdeckte man eine gesteigerte Expression von scheinbar intaktem *Notch 1 und 2* in zervikalen Karzinomen und anderen epithelialen Malignitäten, in präneoplastischen Läsionen (Daniel et al, 1997; Zagouras et al., 1995) sowie in Colon-Adenokarzinomen und squamösen Lungenkarzinomen (Zagouras et al, 1995). Auch bei der Analyse verschiedener transformierter Zelllinien diverser Krebsarten (T-ALL, akute promyelotische Leukämie, Erythroleukämie, Neuroblastom, Medulloblastom, pleurales Mesotheliom) detektierte man eine signifikant gesteigerte Expression von scheinbar intaktem *Notch1* (unpublished L.M., reviewed by Miele and Osborne, 1999). Es erscheint demnach so, als ob die Überexpression von *Notch*-Rezeptoren eine vom Zelltyp unabhängige gemeinsame molekulare Konsequenz der Transformation ist. Fan et al. postulierte 2004 und 2006 schließlich eine Bedeutung

des Notch-Signalweges für die Entstehung embryonaler Tumoren wie für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Medulloblastome. Die Aspekte, dass eine gesteigerte Notch-Aktivität ein bekanntes Phänomen in embryonalen Tumorzellen ist, und dass der Notch-Signalweg eine proliferative sowie eine anti-apoptotische Wirkung entfalten kann (Deftos et al., 1998; Jehn et al., 1999; Shelly et al., 1999), ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Diese Erkenntnisse erlauben folgende Hypothese: Der Notch-Signalweg ist für das Überleben von Medullo- und Hepatoblastomzellen von großer Bedeutung. Bei Fehlen von Nicastrin und Presenilin als wesentliche Komponenten des γ -Secretase-Komplexes kann dieser Multienzymkomplex nicht mehr in seiner vollständigen Form synthetisiert werden (Edbauer et al., 2003). Der daraus resultierende Enzymausfall führt zum Abbruch der Signalkaskade. Ohne die γ -Secretase kann die intrazelluläre Domäne des Notch-Moleküls nicht freigesetzt und die Transkription proliferationsstimulierender bzw. antiapoptotischer Zielgene durch die klassische Notch-Signalkaskade nicht mehr initiiert werden. Als Konsequenz ergäbe sich die Reduktion der Tumorzellproliferation und das Einsetzen des programmierten Zelltodes. Würde diese Hypothese stimmen, so müsste bei Behandlung von Medullo- und Hepatoblastomzellen mit einem γ -Secretase-Inhibitor dergleiche Effekt zu sehen sein.

5.2.1 Proliferationsanalyse unter Verwendung des γ -Secretase-Inhibitor L685.458

Zur Überprüfung unserer Hypothese führten wir eine Proliferationsanalyse mit dem *Presenilin*-spezifischen γ -Secretase-Inhibitor L 685 458 in fünf unterschiedlichen Titrationsstufen durch. Untersucht wurden die Hepatoblastomzelllinien HUH6 und Hep T1 sowie die hepatozelluläre Tumorzelllinie HepG2 und die Medulloblastomzelllinien MEB-MED-8a, D283MED und D425MED. Nach 48-stündiger Inkubation erfolgte die ^3H -Thymidin-Markierung der Zellen und die Bestimmung des ^3H -Thymidin-Einbaus. Dabei gelang es, die Proliferationsaktivität der Zelllinien HUH6, HepG2 und HepT1 zu senken. Die direkte Proportionalität von Inhibitorkonzentration und antiproliferativem Effekt konnte dabei nur für HUH6 nachgewiesen werden. Für HepT1 zeigte sich ein inhibitorischer Effekt erst ab $2,5 \mu\text{M}$. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass der Notch-Signalweg für das Überleben von Hepatoblastomzellen von Bedeutung sein könnte. Die Medulloblastomzelllinien zeigten zwar einen Inhibitionseffekt durch Reduktion der Proliferationsaktivität. Eine lineare Beziehung war hier jedoch nicht zu erkennen. D283MED zeigt keine spezifische Inhibition. Betrachtete man diese Ergebnisse insgesamt, so fiel auf, dass nur die Zelllinie HUH6 den klassischen Kurvenverlauf eines positiven Inhibitoreffektes repräsentierte. Es stellte sich also die Frage, warum der Inhibitionseffekt so unterschiedlich ausgeprägt bzw. bei D283MED gar nicht zu verzeichnen war. Wir führten zunächst Versuchswiederholungen durch unter Modifizierung der Inkubationszeiten, Medien und Inhibitorkonzentrationen. Die dabei erzielten Ergebnisse unterschieden sich jedoch nicht wesentlich von den in dieser Arbeit präsentierten. Interessanterweise führte die Arbeitsgruppe um Fan et al. 2006 ebenfalls γ -Secretase-Inhibitionsstudien in Medulloblastomen durch. Sie untersuchten wie wir die Medulloblastomzelllinien D425MED und D283MED sowie darüberhinaus Daoy und PFSK. Ihre *in vitro* Studien zeigten, dass durch Behandlung von Medulloblastomzelllinien mit dem γ -Secretase-Inhibitor GSI-18 die Expression von *Hes1*, einem Zielgen des Notch-Signalweges,

reduziert werden konnte. Medulloblastomzelllinien, die die intrazelluläre Untereinheit von Notch überexprimierten und damit unabhängig von der γ -Secretase konstitutiv aktiv waren, zeigten nach Behandlung mit GSI-18 keine Reduktion der *Hes1*-Expression. Diese Beobachtungen untermauern, dass der beschriebene Effekt aus einer Interaktion der γ -Secretase mit Notch- und nicht mit einem anderen γ -Secretase-abhängigen Signalweg resultierte. Neben einer verminderten *Hes-1*-Expression zeigten mit GSI-18 behandelte Zellen zusätzlich eine Reduktion in Zellgröße und Anzahl vitaler Tumorzellen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die *in vitro* Studien von Fan et al. 2006 eine Verlangsamung, aber kein Sistieren des Tumorzellwachstum nach Behandlung mit dem γ -Secretaseinhibitor GSI-18 zeigten. Zusätzlich durchgeführte *in vivo* Studien zeigten, dass das Potential zur Ausbildung großer Tumoren nach Notch-Inhibition stark eingeschränkt ist. Die *in vivo* Studien zeigten somit in beeindruckender Weise einen Effekt, den *in vitro* Experimente lediglich andeuteten. Die an dieser Stelle deutlich werdende Diskrepanz von *in vitro* und *in vivo* Effekten könnte möglicherweise auch erklären, warum in unseren Zellkulturexperimenten nicht in allen Fällen ein eindeutiger Inhibitionseffekt zu sehen war. Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, ob *in vitro* Studien als Experimente in einem artifiziellen System tatsächlich eine allgemeingültige Aussage über Signalwegsinhibitionseffekte zulassen.

Schließlich kann auch diskutiert werden, ob man unter Verwendung eines anderen γ -Secretase-Inhibitors eindeutiger Ergebnisse erzielt hätte als mit dem Presenilin spezifischen Inhibitor L 685 458. Fan et al. verwendete 2006 die Inhibitoren GSI-18, einen Inhibitor mit Sulfonamidkern, sowie JC2, einen Inhibitor mit Benzodiazepinkern. Darüberhinaus wäre aber auch der Einsatz eines ganz anderen Inhibitors wie z.B. DAPT denkbar. DAPT (N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-analyl]-S-phenylglycine t-Butyl Ester) bindet am C-terminalen Fragment des Presenilins, wobei es nicht an der katalytischen Einheit und auch nicht an der Substratbindungsstelle andockt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es weitere neue funktionelle Domänen des γ -Secretase-Komplexes gibt, die für dessen katalytische Aktivität von Bedeutung sind und mit denen Inhibitoren wie DAPT wirkungsvoll interagieren können (Morohashi et al., 2006).

Zur Postulierung einer Bedeutung des Notch-Signalweges nicht nur für Medulloblastome, sondern auch für Hepatoblastome müssten demnach weitere Experimente folgen, die neben der Verwendung alternativer γ -Secretaseinhibitoren auch *in vivo* Studien beinhalten sollten. Aus den in dieser Arbeit vorliegenden Daten kann eine Beteiligung des Notch-Signalweges an dem beobachteten Zelltod nicht ausgeschlossen, aber auch nicht mit letzter Sicherheit bestätigt werden. Interessant wäre ein Beweis dieser Hypothese deshalb, weil der Notch-Signalweg dadurch zu einem attraktiven therapeutischen Angriffspunkt würde. So wäre denkbar, über eine γ -Secretase-Inhibition die Signalkaskade von Notch zu unterbrechen und so seine proliferative sowie antiapoptotische Wirkung auf Tumorzellen aufzuheben. Dass Notch besonders für das Überleben von Tumorstammzellen von Bedeutung ist, die sich einer kombinierten operativen, chemo- und radiotherapeutischen Therapie in der Regel entziehen, zeigte Fan et al. 2006. Somit könnte die γ -Secretase-Inhibition ein nebenwirkungsarmes, ergänzendes Behandlungskonzept zu den bislang bekannten Therapieansätzen darstellen und hier besonders für die Redizidiv- und Metastasierungsprophylaxe von wertvollem Nutzen sein.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das *Presenilin 1*-Gen in zwei hochmalignen embryonalen Tumoren untersucht. Zu diesen gehörten Medulloblastome, die häufigsten bösartigsten kindlichen Gehirntumore, sowie Hepatoblastome, die häufigsten malignen Lebertumore des Kindesalters. Insbesondere in Hepatoblastomen, aber auch in einer Subgruppe von Medulloblastomen ist der WNT-Signalweg im Rahmen der Tumorigenese von besonderer Bedeutung. Presenilin 1 antagonisiert den WNT-Signalweg, indem es die Degradierung von β -Catenin fördert. Durch diese Eigenschaft könnte Presenilin 1 ein Tumorsuppressor sein. In diesem Zusammenhang stellten wir uns die Frage, ob *Presenilin 1* in diesen Tumoren mutiert sei und dadurch zur Aktivierung des WNT-Signalweges beitragen könnte. Wir untersuchten zunächst 106 Medullo- und 84 Hepatoblastome auf inaktivierende Punktmutationen im *Presenilin 1* Gen bzw. auf große Exon-übergreifende Deletionen. Im gesamten exonischen Bereich konnten keine Sequenzänderung detektiert werden. Lediglich auf Intron 10 konnte ein Polymorphismus beobachtet werden.

Wir untersuchten das mRNA-Expressionsverhalten des *PS1*-Gens in Medullo- und Hepatoblastomen und verglichen es mit entsprechenden Normalgeweben. Während *PS1* in Medulloblastomen nicht signifikant verändert exprimiert war, beobachteten wir in Hepatoblastomen eine gesteigerte Expression. Diese deutet darauf hin, dass *Presenilin 1* möglicherweise ein Zielgen des aktiven WNT-Signalweges ist. Wir konnten tatsächlich in Medulloblastomen ohne basale WNT-Aktivität zeigen, dass *PS1* ein Zielgen des WNT-Signalweges ist. Da der *Presenilin 1* Promotor keine Lef/Tcf-Bindungsstellen aufweist, vermuten wir, dass es sich bei *Presenilin 1* um ein indirektes WNT-Zielgen handelt. Um die Bedeutung des *PS1*-Genes für die Tumorzellvitalität und -proliferation zu untersuchen, führten wir ein indirektes Gen-knock-down durch. Wir konnten zeigen, dass durch knock-down von *Nicastrin*, einem coregulierten Komplexpartner von PS1, auch die Proteinmenge von Presenilin in Medullo- und Hepatoblastomzellen reduziert werden konnte. Der Verlust dieser beiden Proteine ging nicht nur mit einer Einschränkung der Proliferationsaktivität einher, sondern auch mit einem Verlust der Zellvitalität. Da sowohl für den Presenilin-Nicastrin-Komplex, als auch für Presenilin selbst antiapoptische Effekte beschrieben worden sind, favorisieren wir die Hypothese, dass es sich bei dem beobachteten Zelluntergang um einen programmierten Zelltod handeln könnte. *Presenilin 1* ist nicht nur Bestandteil des WNT-Signalweges, sondern auch des Notch-Signalweges, der ebenfalls in die Tumorigenese embryonaler Tumore wie Medulloblastomen involviert ist. Im Rahmen des Notch-Signalweges agieren Presenilin und Nicastrin gemeinsam im Rahmen des γ -Secretase-Komplex. Während die RNAi-Experimente deutliche Effekte auf Zellwachstum und Zellvitalität zeigten, führte die Inkubation mit einem γ -Secretase-Inhibitor nur zu relativ schwacher Wachstumsinhibition *in vitro*.

Weitere Experimente müssen die funktionelle Bedeutung von Presenilin in embryonalen Tumoren klären und aufzeigen, ob eine Hemmung des Presenilins oder des γ -Secretase-Komplexes mögliche Therapieoptionen in der Behandlung dieser Tumoren darstellt.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target of the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 1997; 16:3797-3804
- (2) Adesina AM, Nalbantoglu J, Cavenee, WK. p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma. *Cancer Res* 1994; 54:5649-5651
- (3) Albrecht S, von Deimling A, Pietsch T, Giangaspero F, Brandner S, Kleihues P, Wiestler OD. Microsatellite analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 9q, 11p and 17p in medulloblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994a; 20:74-81
- (4) Albrecht S, von Schweinitz D, Waha A, Kraus JA, von Deimling A, Pietsch T. Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma. *Cancer Res* 1994b; 54:5041-5044
- (5) Alderson L, Fetell MR, Sisti M, Hochberg F, Cohen M, Louis DN. Sentinel lesions of primary CNS lymphoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60:102-105
- (6) Aldosari N, Bigner SH, Burger PC, Kepner JL, Friedman SH, McLendon RE. MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126:540-544
- (7) Alzheimer's disease collaborative group. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nat Genet* 1995; 11:219-222
- (8) Annaert WG, Levesque L, Craessaerts K, Dierinck I, Snellings G, Westaway D, George-Hyslop PS, Cordell B, Fraser P, De Strooper B. Presenilin 1 controls gamma-secretase processing of amyloid precursor protein in pre-golgi compartments of hippocampal neurons. *J Cell Biol* 1999; 147:277-294
- (9) Aretz S, Koch A, Uhlhaas S, Friedl W, Propping P, von Schweinitz D, Pietsch T. Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for APC germline mutations? *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47:811-818
- (10) Arseni C, Ciurea AV. Statistical survey of 276 cases of medulloblastoma (1935-1978). *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 47:811-818
- (11) Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signalling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284:770-776
- (12) Axelrod JD, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Perrimon N. Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science* 1996; 271:1826-1832

- (13) Badiali M, Pession A, Basso G, Andreini L, Rigobello L, Galassi E, Giangaspero F. N-myc and c-myc oncogenes amplification in medulloblastomas. Evidence of particularly aggressive behavior of a tumor with c-myc amplification. *Tumori* 1991; 77:118-121
- (14) Baeza N, Masuoka J, Kleihues P, Ohgaki H. AXIN1 mutations but not deletions in cerebellar medulloblastomas. *Oncogene* 2003; 22:632-636
- (15) Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signaling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 2001; 3:683-686
- (16) Batra SK, Rasheed BK, Bigner SH, Bigner DD. Oncogenes and anti-oncogenes in human central nervous system tumors. *Lab Invest* 1994; 71:621-637
- (17) Berry LW, Westlund B, Schedl T. Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Development* 1997; 124:925-936
- (18) Bickerstaff ER, Connolly RC, Woolf AL. Cerebellar medulloblastoma occurring in brothers. *Acta Neuropathol (Berl)* 1967; 8:104-107
- (19) Biegel JA, Burk CD, Barr FG, Emanuel BS. Evidence for a 17p tumor related locus distinct from p53 in pediatric primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 1992; 52:3391-3395
- (20) Bienz M. TCF: transcriptional activator or repressor? *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:366-372
- (21) Bigner SH, Friedman HS, Vogelstein B, Oakes WJ, Bigner DD. Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 1990; 50:2347-2350
- (22) Bjornsson J, Scheithauer BW, Okazaki H, Leech RW. Intracranial germ cell tumors: Pathobiological and immunohistochemical aspects of 70 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985; 44:32-46
- (23) Blair SS. Notch and Wingless signals collide. *Science* 1996; 271:1822-1823
- (24) Blaumueller CM, Qui H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 1997; 90:281-291
- (25) Bove KE, Soukup S, Ballard ET, Ryckman F. Hepatoblastoma in a child with trisomy 18: cytogenetics, liver anomalies, and literature review. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16:253-262
- (26) Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999; 155:1033-1038
- (27) Brannon M, Gomperts M, Sumoy L, Moon RT, Kimelman D. A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev* 1997; 11:2359-2370

- (28) Brown HG, Kepner JL, Perlman EJ, Friedman HS, Strother DR, Duffner PK, Kun LE, Goldthwaite PT, Burger PC. Large cell/anaplastic medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group Study 2000; *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59:857-865
- (29) Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 1991; 48:137-144
- (30) Caplen NJ, Parrish S, Imani F, Fire A, Morgan RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:9742-9747
- (31) Carmena A, Speicher S, Baylies M. The PDZ Protein Canoe/AF-6 Links Ras-MAPK, Notch and Wingless/Wnt Signaling Pathways by Directly Interacting with Ras, Notch and Dishevelled. *PLoS ONE* 2006; 1:e66
- (32) Cetta F, Montalto G, Petracchi M. Hepatoblastoma and APC gene mutation in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1997; 41:417
- (33) Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 1999; 18:2883-2891
- (34) Cruts M, Backhovens H, Wang SY, Van Gassen G, Theuns J, De Jonghe CD, Wehnert A, De Voecht J, De Winter G, Cras P. Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet* 1995; 4:2363-2371
- (35) Cupers P, Bentahir M, Craessaerts K, Orlans I, Vanderstichele H, Saftig P, De Strooper B, Annaert W. The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. *J Cell Biol* 2001; 154:731-740
- (36) Dahmen RP, Koch A, Denkhau D, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD, Pietsch T. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res* 2001; 61:7039-7043
- (37) Daniel B, Rangarajan A, Mukherjee G, Vallikad E, Krishna S. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genomes and cellular changes in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1997; 78:1095-1101
- (38) De Jonghe C, Cruts M, Rogaeva EA, Tysoe C, Singleton A, Vanderstichele H, Meschino W, Dermaut B, Vanderhoeven C, Backhovens H, Vanmechelen E, Morris CM, Hardy J, Rubinsztein DC, St George-Hyslop PH, Van Broeckhoven C. Aberrant splicing in the presenilin-1 intron 4 mutation causes presenile Alzheimer's disease by increased Abeta42 secretion. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8:1529-1540
- (39) De La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:8847-8851

- (40) De Strooper B. Aph-1, Pen-2 and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 2003; 38:9-12
- (41) Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ. Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity* 1998; 9:777-786
- (42) Eberhart CG, Tihan T, Burger PC. Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59:333-337
- (43) Edbauer D, Winkler E, Haass C, Steiner H. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:8666-8671
- (44) Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 2003; 5:486-488
- (45) Eguchi M, Nguyen C, Lee SC, Kahn M. ICG-001, a novel small molecule regulator of TCF/beta-catenin transcription. *Med Chem* 2005; 1:467-472
- (46) Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, Pearson AD, Clifford SC. beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Childrens Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol* 2005; 23:7951-7957
- (47) Endo EG, Walton DS, Albert DM. Neonatal hepatoblastoma metastatic to the choroid and iris. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:757-761
- (48) Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, Ye W, Diehl TS, Selkoe DJ, Wolfe MS. Activity-dependent isolation of the presenilin-gamma-secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:2720-2725
- (49) Esler WP, Wolfe MS. A portrait of Alzheimer secretases-new features and familiar faces. *Science* 2001; 293:1449-1454
- (50) Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li Y-M, Eberhart CG. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* 2006, 66:7445-7452
- (51) Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, Ball D, Brat DJ, Perry A, Eberhart CG. Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 2004; 64:7787-7793
- (52) Farwell J, Flannery JT. Cancer in relatives of children with central-nervous-system neoplasms. *N Engl J Med* 1984; 311:749-753
- (53) Fleming RJ, Gu Y, Hukriede NA. Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the Drosophila wing imaginal disc. *Development* 1997; 124:2973-2981

- (54) Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, Himes CS, Hiebsch R, Ruble C, Nye JS, Curtis D. *aph-1* and *pen-2* are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 2002; 3:85-97
- (55) Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S. Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 1998; 58:3526-3528
- (56) Giardello FM, Offerhaus GJ, Krush AJ, Booker SV, Tersmette AC, Mulder JW, Kelley CN, Hamilton SR. Risk of hepatolastoma in familial adenomatous polyposis. *J. Pediatr.* 1991; 119:776-768
- (57) Giardello FM, Peterson GM, Brensinger JD, Luce MC, Cayouette MC, Bacon J, Booker SV, Hamilton SR. Hepatoblastoma and APC gene mutation in familial adenomatous polyposis. *Gut* 1996; 39:867-869
- (58) Giordana MT, Schiffer P, Lanotte M, Girardi P, Chio A. Epidemiology of adult medulloblastoma. *Int J Cancer* 1999; 80:689-692
- (59) Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Munoz A. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a down-stream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 2006; 24:1098-1103
- (60) Goutte C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR. APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:775-779
- (61) Green LK, Silva EG. Hepatoblastoma in an adult with metastasis to the ovaries. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:110-115
- (62) Griffin CA, Hawkins AL, Packer RJ, Rorke LB, Emanuel BS. Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res.* 1998; 48:175-180
- (63) Gu Y, Chen F, Sanjo N, Kawarai T, Hasegawa H, Duthie M, Li W, Ruan X, Luthra A, Mount HTJ, Tandon A, Fraser PE, St. George-Hyslop P. APH-1 interacts with mature and immature forms of presenilins and nicastrin and may play a role in maturation of presenilin-nicastrin complexes. *J Biol Chem* 2003; 278:7374-7380
- (64) Guo G, Sebastian L, Sopher BL, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Mattson MP. Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenilin-1 mutant knock-in mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J Neurochem* 1999; 72:1019-1029
- (65) Haass C, Steiner H. Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* 2002; 12:556-562

- (66) Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B. The molecular basis of Turcot's Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332:839-847
- (67) Hartmann H, Busciglio J, Baumann KH, Staufenbiel M, Yankner BA. Developmental regulation of presenilin-1 processing in the brain suggests a role in neuronal differentiation. *J Biol Chem* 1997; 272:14505-14508
- (68) Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993; 2:338-346
- (69) He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-Myc as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281:1509-1512
- (70) Hiendlmeyer E, Regus S, Wassermann S, Hlubek F, Haynl A, Dimmler A, Koch C, Knoll C, van Beest M, Reuning U, Brabletz T, Kirchner T, Jung A. Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors. *Cancer Res* 2004; 64:1209-1214
- (71) Hsieh JJ, Hayward SD. Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 1995; 268:560-563
- (72) Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. APC mutations in sporadic medulloblastoma. *Am J Pathol* 2000; 156:433-437
- (73) Hubbard JL, Scheithauer BW, Kispert DB, Carpenter SM, Wick MR, Jr Laws ER. Adult cerebellar medulloblastomas: the pathological, radiographic, and clinical disease spectrum. *J Neurosurg* 1989; 70:536-544
- (74) Hughes LJ, Michels VV. Risk of hepatoblastoma in familial adenomatous polyposis. *AM. J. Med. Genet.* 1992; 43:1023-1025
- (75) Hung KL, Wu CM, Huang JS, How SW. Familial medulloblastoma in siblings: report in one family and review of the literature. *Sur Neurol* 1990; 33:341-346
- (76) Ikeda H, Hachitanda Y, Tanimura M, Maruyama K, Koizumi T, Tsuchida Y. Development of unfavorable hepatoblastoma in children of very low birth weight: results of a surgical and pathologic review. *Cancer* 1998; 82:1789-1796
- (77) Ikeda H, Matsuyama S, Tanimura M. Association between hepatoblastoma and very low birth weight: a trend or a chance? *J Pediatr* 1997; 130:557-560
- (78) Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, Yoneda T, Taniguchi M, Kudo T, Tohyama M. The unfolded protein response and Alzheimers disease. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1536:85-96
- (79) Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY. Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Curr Biol* 1998; 8:591-594

- (80) Izon DJ, Aster JC, He Y, Weng A, Karnell FG, Patriub V, Xu L, Bakkour S, Rodriuez C, Allman D, Pear WS. Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. *Immunity* 2002; 16:231-243
- (81) Jarriault S, Le Bail O, Hirsinger E, Pourquie O, Logeat F, Strong CF, Brou C, Seidah NG, Isra A. Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol* 1998; 18:7423-7431
- (82) Jehn BM, Bielke W, Pear WS, Osborne BA. Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *J Immunol* 1999; 162:635-638
- (83) Jho E, Zhang T, Domon C, Joo C-K, Freund J-N, Constantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1172-1183
- (84) Johnston LA, Edgar BA. Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* 1998; 394:82-84
- (85) Kaether C, Lammich S, Edbauer D, Ertl M, Rietdorf J, Capell A, Steiner H, Haass C. Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. *J Cell Biol* 2002; 158:551-561
- (86) Kang DE, Soriano S, Xia X, Eberhart CG, De Strooper B, Zheng H, Koo EH. Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell* 2002; 110:751-762
- (87) Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM, Kadesch T. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 1998; 12:2268-2277
- (88) Kim JW, Chang TS, Lee JE, Huh SH, Yeon SW, Yang WS, Joe CO, Mook-Jung I, Tanzi RE, Kim TW, Choi EJ. Negative regulation of the SAPK/JNK signaling pathway by presenilin 1. *J Cell Biol* 2001; 153:457-463
- (89) Kimberly WT, Wolfe MS. Identity and function of gamma-secretase. *J Neurosci Res* 2003; 74:353-360
- (90) Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159-170
- (91) Kitaeva MN, Grogan L, Williams JP, Dimond E, Nakahara K, Hausner P, DeNobile JW, Soballe PW, Kirsch IR. Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res* 1997; 57:4478-4481
- (92) Koch A, Denkhaus D, Albrecht S, Leuschner I, von Schweinitz D, Pietsch T. Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res* 1999; 59:269-273

- (93) Koch A, Tonn J, Kraus JA, Sorensen N, Albrecht NS, Wiestler OD, Pietsch T. Molecular analysis of the lissencephaly gene (LIS-1) in medulloblastomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22:233-242
- (94) Koch A, Waha A, Hartmann W, Hrychyk A, Schuller U, Waha A, Jr Wharton KA, Fuchs SY, von Schweinitz D, Pietsch T. Elevated expression of Wnt antagonists is a common event in hepatoblastoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11:4295-4304
- (95) Koch A, Waha A, Tonn JC, Sorenson N, Berthold F, Wolter M, Reifenberger J, Hartmann W, Friedl W, Reifenberger G, Wiestler OD, Pietsch T. Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer* 2001; 93:445-449
- (96) Koch A, Weber N, Waha A, Hartmann W, Denkhau D, Behrens J, Birchmeier W, von Schweinitz D, Pietsch T. Mutations and elevated transcriptional activity of conductin (AXIN2) in hepatoblastomas. *J Pathol* 2004; 204:546-554
- (97) Kolligs FT, Nieman MT, Winer I, Hu G, Van Mater D, Feng Y, Smith IM, Wu R, Zhai Y, Cho KR, Fearon ER. ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in a human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell* 2002; 1:145-155
- (98) Kovacs DM, Mancini R, Henderson J, Na SJ, Schmidt SD, Kim TW, Tanzi RE. Staurosporine-induced activation of caspase-3 is potentiated by presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutations in human neuroglioma cells. *J Neurochem* 1999; 73:2278-2285
- (99) Kraus JA, Albrecht S, Wiestler OD, von Schweinitz D, Pietsch T. Loss of heterozygosity on chromosome 1 in human hepatoblastoma. *Int J Cancer* 1996; 67:467-471
- (100) Kuijten RR, Strom SS, Rorke LB, Boesel CP, Buckley JD, Meadows AT, Bunin GR. Family history of cancer and seizures in young children with brain tumors: a report from the Childrens Cancer Group (United States and Canada). *Cancer Causes Control* 1993; 4:455-464
- (101) Kuniyasu H, Yasui W, Shimamoto F, Fujii K, Nakahara M, Asahara T, Dohi K, Tahara E. Hepatoblastoma in an adult associated with c-met proto-oncogene imbalance. *Pathol Int* 1996; 46:1005-1010
- (102) Lee S-F, Shah S, Li H, Yu C, Han W, Yu G. Mammalian APH-1 interacts with presenilin and nicastrin and is required for intramembrane proteolysis of amyloid-beta precursor protein and Notch. *J Biol Chem* 2002; 277:45013-45019
- (103) Leem JY, Vijayan S, Han P, Cai D, Machura M, Lopes KO, Veselits ML, Xu H, Thinakaran G. Presenilin 1 is required for maturation and cell surface accumulation of nicastrin. *J Biol Chem* 2002; 277:19236-19240
- (104) Lehmann S, Chiesa R, Harris DA. Evidence for a six-transmembrane domain structure of presenilin 1. *J Biol Chem* 1997; 272:12047-12051

- (105) Levy-Lahad E, Poorkaj P, Wang K, Fu YH, Oshima J, Mulligan J, Schellenberg GD. Genomic structure and expression of STM2, the chromosome 1 familial Alzheimer disease gene. *Genomics* 1996; 34:198-204
- (106) Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269:973-977
- (107) Li L, Mao J, Sun L, Liu W, Wu D. Second cysteine-rich domain of Dickkopf-2 activates canonical Wnt signaling pathway via LRP-6 independently of dishevelled. *J Biol Chem* 2002; 277:5977-5981
- (108) Li YM, Lai MT, Xu M, Huang Q, DiMuzio-Mower J, Sardana MK, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ. Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97:6138-6143
- (109) Li YM, Xu M, Lai MT, Huang Q, Castro JL, DiMuzio-Mower J, Harrison T, Lellis C, Nadin A, Neduveilil JG, Register RB, Sardana MK, Shearman MS, Smith AL, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ. Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* 2000; 405:689-694
- (110) Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G. Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 1995; 89:909-917
- (111) Linström E, Shimokawa T, Toftgrd R, Zaphiropoulos. PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum. Mutat.* 2006; 27:215-219
- (112) Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; 108:837-847
- (113) Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Quian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000; 26:146-147
- (114) Luo W, Wang H, Li H, Kim BS, Shah S, Lee H-J, Thinakaran G, Kim T-W, Yu G, Xu H. PEN-2 and APH-1 coordinately regulate proteolytic processing of presenilin 1. *J Biol Chem* 2003; 278:7850-7854
- (115) Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol* 2002; 22:1184-1193
- (116) Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250:1233-1238

- (117) Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:1603-1608
- (118) Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor of Dickkopf proteins. *Nature* 2001; 411:321-325
- (119) Mattson MP, Zhu H, Yu J, Kindy MS. Presenilin-1 mutation increases neuronal vulnerability to focal ischemia in vivo and to hypoxia and glucose deprivation in cell culture: involvement of perturbed calcium homeostasis. *J Neurosci* 2000; 20:1358-1364
- (120) McDonald JD, Daneshvar L, Willert JR, Matsumura K, Waldman F, Cogen PH. Physical mapping of chromosome 17p13.3 in the region of a putative tumor suppressor gene important in medulloblastoma. *Genomics* 1994; 23:229-232
- (121) Mercken M, Takahashi H, Honda T, Sato K, Murayama M, Nakazato Y, Noguchi K, Imahori K, Takashima A. Characterization of human presenilin 1 using N-terminal specific monoclonal antibodies: Evidence that Alzheimer mutations affect proteolytic processing. *FEBS Lett* 1996; 389:297-303
- (122) Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G. Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine delta-aminotransferase gene. *Genomics* 1992; 13:389-394
- (123) Michiels EM, Weiss MM, Hoovers JM, Baak JP, Vote PA, Baas F, Hermsen MA. Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2002; 24:205-210
- (124) Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J Cell Physiol* 1999; 181:393-409
- (125) Miller JH, Greenspan BS. Integrated imaging of hepatic tumors in childhood. Part I: Malignant lesions (primary and metastatic). *Radiology* 1985; 154:83-90
- (126) Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997; 275:1787-1790
- (127) Morohashi Y, Kan T, Tominari Y, Fuwa H, Okamura Y, Watanabe N, Sato C, Natsugari H, Fukuyama T, Iwatsubo T, Tomita T. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT(N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-analyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). *J Biol Chem* 2006; 281:14670-14676
- (128) Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 2004; 23:8520-8526

- (129) Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T. Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Res* 1996; 56:3320-3323
- (130) Ogasawara H, Inagawa T, Yamamoto M, Kamiya K, Yano T, Utsunomiya H. Medulloblastoma in infancy associated with omphalocele, malrotation of the intestine and extrophy of the bladder. *Childs Nerv Syst* 1988; 4:108-111
- (131) Ohgaki H, Eibl RH, Schwab M, Reichel MB, Mariani L, Gehring M, Petersen I, Holl T, Wiestler OD, Kleihues P. Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog* 1993; 8:74-80
- (132) Ohnishi H, Kawamura M, Hanada R, Kaneko Y, Tsunoda Y, Hongo T, Bessho F, Yakamori K, Hayashi Y. Infrequent mutations of the TP53 gene and no amplification of the MDM2 gene in hepatoblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 15:187-190
- (133) Okochi M, Ishii K, Usami M, Sahara N, Kametani F, Tanaka K, Fraser PE, Ikeda M, Saunders AM, Hendriks L, Shoji SI, Nee LE, Martin JJ, Van Broeckhoven C, St George-Hyslop PH, Roses AD, Mori H. Proteolytic processing of presenilin-1(PS-1) is not associated with Alzheimer's disease with or without PS-1 mutations. *FEBS Lett* 1997; 418:162-166
- (134) Ordentlich P, Lin A, Shen CP, Blaumueller C, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Kadesch T. Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Mol Cell Biol* 1998; 18:2230-2239
- (135) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:2766-2770
- (136) Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol* 1998; 18:2077-2088
- (137) Palacios J, Gamallo C. Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58:1344-1347
- (138) Pan D, Rubin GM. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 1997; 90:271-280
- (139) Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD. Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 1997; 387:908-912
- (140) Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sorenson N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res* 1997; 57:2085-2088

- (141) Podlisny MB, Citron M, Amarante P, Sherrington R, Xia W, Zhang J, Diehl T, Levesque G, Fraser P, Haass C, Koo EH, Seubert P, St George-Hyslop P, Teplow DB, Selkoe DJ. Presenilin preteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala 299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol Dis* 1997; 3:325-337
- (142) Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359:235-237
- (143) Powers C, Ros PR, Stoupis C, Johnson WK, Segel KH. Primary liver neoplasms: MR imaging with pathologic correlation. *Radiographics* 1994; 14:459-482
- (144) Prihar G, Fuldner RA, Perez-Tur J, Lincoln S, Duff K, Crook R, Hardy J, Philips CA, Venter C, Talbot C, Clark RF, Goate A, Li J, Potter H, Karran E, Roberts GW, Hutton M, Adams MD. Structure and alternative splicing of the presenilin-2 gene. *Neuroreport* 1996; 7:1680-1684
- (145) Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res* 1997; 57:842-845
- (146) Reardon DA, Michalkiewicz E, Boyett JM, Sublett JE, Entrekin RE, Ragsdale ST, Valentine MB, Behm FG, Li H, Heideman RL, Kun LE, Shapiro DN, Look AT. Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1997; 57:4042-4047
- (147) Riese J, Yu X, Munnerlyn A, Eresh S, Hsu SC, Grosschedl R, Bienz M. LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell* 1998; 88:777-787
- (148) Riikonen P, Tuominen L, Seppa A, Perkkio M. Simultaneous hepatoblastoma in identical male twins. *Cancer* 1990; 66:2429-2431
- (149) Rimm DL, Caca K, Hu G, Harrison FB, Fearon ER. Frequent nuclear/cytoplasmic localization of beta-catenin without exon 3 mutations in malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999; 154:325-329
- (150) Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Apella E, Rosenberg SA. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 183:1185-1192
- (151) Roberts RO, Lynch CF, Jones MP, Hart MN. Medulloblastoma: a population-based study of 532 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991; 50:134-144
- (152) Robertson PL, Muraszko KM, Axtell RA. Hepatoblastoma metastatic to brain: prolonged survival after multiple surgical resections of a solitary brain lesion. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1997; 19:168-171

- (153) Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995; 376:775-778
- (154) Sahara N, Yahagi Y, Takagi H, Kondo T, Okochi M, Usami M, Shirasawa T, Mori H. Identification and characterization of presenilin I-467, I-463 and I-374. *FEBS Lett* 1996; 381:7-11
- (155) Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:6230-6234
- (156) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors 1977. *Biotechnology* 1992; 24:104-108
- (157) Sangkhathat S, Kusafuka T, Miao J, Yoneda A, Nara K, Yamamoto S, Kaneda Y, Fukazawa M. In vitro RNA interference against beta-catenin inhibits the proliferation of pediatric hepatic tumors. *Int J Oncol* 2006; 28:715-722
- (158) Sasai K, Romer JT, Lee Y, Finkelstein D, Fuller C, McKinnon PJ, Curran T. Shh pathway activity is down-regulated in cultured medulloblastoma cells: implications for preclinical studies. *Cancer Res* 2006; 66:4215-4222
- (159) Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000; 24:245-250
- (160) Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:6741-6742
- (161) Scheurlen WG, Schwabe GC, Joos S, Mollenhauer J, Sorensen N, Kuhl J. Molecular analysis of childhood primitive neuroectodermal tumors defines markers associated with poor outcome. *J Clin Oncol* 1998; 16:2478-2485
- (162) Schmidt D, Harms D, Lang W. Primary malignant hepatic tumours in childhood. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 407:387-405
- (163) Schofield D, West DC, Anthony DC, Marshal R, Sklar. Correlation of loss of heterozygosity at chromosome 9q with histological subtype in medulloblastomas. *Am J Pathol* 1995; 146:472-480
- (164) Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P. Contact-dependant inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* 1999; 286:741-746
- (165) Shapiro S, Mealey Jr J, Sartorius C. Radiation-induced intracranial malignant gliomas. *J Neurosurg* 1989; 71:77-82
- (166) Sharma M, Chuang WW, Sun Z. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3beta inhibition and nuclear beta-catenin accumulation. *J Biol Chem* 2002; 277:30935-30941

- (167) Shawber C, Boulter J, Lindsell CE, Weinmaster G. Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol* 1996; 180:370-376
- (168) Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 1993; 16:325-332
- (169) Shelly LL, Fuchs C, Miele L. Notch-1 inhibits apoptosis in murine erythroleukemia cells and is necessary for differentiation induced by hybrid polar compounds. *J Cell Biochem* 1999; 73:164-175
- (170) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375:754-760
- (171) Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:5522-5527
- (172) Sotillos S, Roch F, Campuzano S. The metalloprotease-disintegrin Kuzbanian participates in Notch activation during growth and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Development* 1997; 124:4769-4779
- (173) Spasic D, Tolia A, Dillen K, Baert V, De Strooper B, Vrijens S, Annaert W. Presenilin-1 maintains a nine-transmembrane topology throughout the secretory pathway. *J Biol Chem* 2006; 281:26569-26577
- (174) Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 1990; 348:747-749
- (175) Steiner H, Winkler E, Edbauer D, Prokop S, Basset G, Yamasaki A, Kostka M, Haass C. PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* 2002; 277:39062-39065
- (176) Stevens MC, Cameron AH, Muir KR, Parkes SE, Reid H, Whitwell H. Descriptive epidemiology of primary central nervous system tumours in children: a population-based study. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1991; 3:323-329
- (177) Stifani S, Blaumueller CM, Redhead NJ, Hill RE, Artavanis-Tsakonas S. Human homologs of a *Drosophila* Enhancer split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet* 1992; 2:343
- (178) Stocker JT. Hepatoblastoma. *Semin Diagn Pathol* 1994; 136-143
- (179) Stocker JT. An approach to handling pediatric liver tumors. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:67-72

- (180) Suzuki T, Nishiyama K, Murayama S, Yamamoto A, Sato S, Kanazawa I, Sakaki Y. Regional and cellular presenilin 1 gene expression in human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219:708-713
- (181) Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, Akiyama T. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* 2000; 14:1741-1749
- (182) Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T. The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 2003; 422:438-441
- (183) Takayasu H, Horie H, Hiyama E, Matsunaga T, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ozaki T, Furuuchi K, Tada M, Ohnuma N, Nakagawara A. Frequent deletions and mutations of the beta-catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:901-908
- (184) Takemaru K-I, Yamaguchi S, Lee YS, Zhang Y, Carthew RW, Moon RT. Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* 2003; 422:905-909
- (185) Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci* 2005; 97:312-316
- (186) Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Quian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, Ross JA, Liu W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 2002; 21:4863-4871
- (187) Tanimura M, Matsui I, Abe J, Ikeda H, Kobayashi N, Ohira M, Yokoyama M, Kaneko M. Increased risk of hepatoblastoma among immature children with a lower birth weight. *Cancer Res* 1998; 58:3032-3035
- (188) Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398:422-426
- (189) Thinakaran G. Metabolism of presenilins. *J Mol Neurosci* 2001; 17:183-192
- (190) Tomlinson FH, Jenkins RB, Scheitauer BW, Keelan PA, Ritland S, Parisi JE, Cuningham J, Olsen KD. Aggressive medulloblastoma with high-level N-myc amplification. *Mayo Clin Proc* 1994; 69:359-365
- (191) Utsunomiya T, Doki Y, Takemoto H, Shiozaki H, Yano M, Sekimoto M, Tamura S, Yasuda T, Fujiwara Y, Monden M. Correlation of beta-catenin and cyclin D1 expression in colon cancers. *Oncology* 2001; 61:226-233
- (192) Van Broeckhoven C. Presenilins and Alzheimer disease. *Nat Genet* 1995; 11:230-232

- (193) van Hest LP, Ruijs MW, Wagner A, van der Meer CA, Verhoef S, van't Veer LJ, Meijers-Heijboer H. Two TP53 germline mutations in a classical Li-Fraumeni syndrome family. *Fam Cancer* 2007; 6:311-316
- (194) Van Tornout JM, Buckley JD, Quinn JJ, Feusner JH, Krailo MD, King DR, Hammond GD, Ortega JA. Timing and magnitude of decline in alpha-fetoprotein levels in treated children with unresectable or metastatic hepatoblastoma are predictors of outcome: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 1997; 15:1190-1197
- (195) Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res* 1998; 58:2520-2523
- (196) von Schweinitz D, Hecker H, Schmidt-von Arndt G, Harms D. Prognostic factors and staging systems in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer* 1997; 74:593-599
- (197) Vorechovsky I, Tingby O, Hartman M, Stromberg B, Nister M, Collins VP, Toftgard R. Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours. *Oncogene* 1997; 15:361-366
- (198) Waha A, Watzka M, Koch A, Pietsch T, Przkora R, Peters N, Wiestler OD, von Deimling A. A rapid and sensitive protocol for competitive reverse transcriptase (cRT) PCR analysis of cellular genes. *Brain Pathol* 1998; 8:13-18
- (199) Waterman ML. Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23:41-52
- (200) Webster MT, Rozycka M, Sara E, Davis E, Smalley M, Young N, Dale TC, Wooster R. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28:443-453
- (201) Wen C, Metzstein MM, Greenwald I. SUP-17, a *Caenorhabditis elegans* ADAM protein related to *Drosophila* KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. *Development* 1997; 124:4759-4767
- (202) Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kuhne T, Goodyer CG, Albrecht S, von Schweinitz D, Pietsch T. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* 2003; 83:429-434
- (203) Wolfe MS. APP, Notch, and presenilin: molecular pieces in the puzzle of Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol* 2002; 2:1919-1929
- (204) Wolfe MS, Xia W, Moore CL, Leatherwood DD, Ostaszewski B, Rahmati T, Donkor IO, Selkoe DJ. Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry* 1999; 38:4720-4727

- (205) Wolter M, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T, Reifenberger G. Mutations in the human homologue of the *Drosophila* segment polarity gene *patched* (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 1997; 57:2581-2585
- (206) Wu R, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR. Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 2001; 61:8247-8255
- (207) Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG. Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz1-dependant interaction with the p21 core promotor. *Oncogene* 2003; 22:351-360
- (208) Xia W. Role of presenilin in gamma-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *Exp Gerontol* 2000; 35:453-460
- (209) Xie Z, Romano DM, Kovacs DM, Tanzi RE. Effects of RNA interference-mediated silencing of gamma-secretase complex components on cell sensitivity to caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2004; 279:34130-34137
- (210) Yamashita Y, Handa H, Toyama M. Medulloblastoma in two brothers. *Surg Neurol* 1975; 4:225-227
- (211) Yanagawa S, Matsuda Y, Lee J-S, Matsubayashi H, Sese S, Kadowaki T, Ishimoto A. Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *EMBO J* 2002; 21:1733-1742
- (212) Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang DS, Holmes E, Milman P, Liang Y, Zhang DM, Xu DH, Sato C, Rogaev E, Smith M, Janus C, Zhang Y, Aebersold R, Farrer LS, Sorbi S, Bruni A, Fraser P, St George-Hyslop P. Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 2000; 407:48-54
- (213) Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, Carcangiu ML, Artavanis-Tsakonas S. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:6414-6418
- (214) Zhai Y, Wu R, Schwartz DR, Darrah D, Reed H, Kolligs FT, Nieman MT, Fearon ER, Cho KR. Role of beta-catenin/T-cell factor-regulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Am J Pathol* 2002; 160:1229-1238
- (215) Zhang L, Lee J, Song L, Sun X, Shen J, Terracina G, Parker EM. Characterization of the reconstituted gamma-secretase complex from Sf9 cells co-expressing presenilin 1, nicastrin [correction of nacastrin], aph-1a, and pen-2. *Biochemistry* 2005; 44:4450-4457
- (216) Zhang Z, Hartmann H, Do VM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Sommer B, van de Wetering M, Clevers H, Saftig P, De Strooper B, He X, Yankner BA. Destabilization

of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature* 1998; 395:698-702

- (217) Zurawel RH, Allen C, Chiappa S, Cato W, Biegel J, Cogen P, de Sauvage F, Raffel C. Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27:44-51

A Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. T. Pietsch, Herrn Prof. Dr. O. D. Wiestler und Herrn Prof. Dr. P. Propping für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Neuropathologie im Rahmen eines Graduiertenkollegstipendiums durchführen zu dürfen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. T. Pietsch für die menschliche und herzliche Art, mit der er diese Arbeit begleitet und umfangreich wissenschaftlich betreut hat.

Ein ganz herzlicher Dank gilt auch PD Dr. Arend Koch für seine Präsenz, seine konstruktiven Vorschläge und sein großes Engagement bei der Mitbetreuung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Sascha Weggen, Institut für Neuropathologie der Universität Düsseldorf, möchte ich mich für konstruktive Diskussionen und bereitgestellte Reagenzien bedanken.

Ganz besonders danke ich Prof Dr. D. von Schweinitz, Klinik für Kinderchirurgie, LMU, Leiter der Hepatoblastomstudie sowie allen Kindern und Eltern für Ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Untersuchung der in der vorliegenden Arbeit analysierten Tumore.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie, besonders bei N. Schmitt, W. Hartmann, H. Brune, K. Borsos, U. Schüller, A. Waha, U. Milde, N. Schulz, I. Dani und D. Denkhaus für die mir entgegen gebrachte Hilfsbereitschaft sowie für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Barbara Haupt und Martin Klein danke ich für LateX, für ihre Geduld und Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit sowie für einzigartige 48 Stunden.

Ein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinem Mann Peter, Renate, Uwe, Dennis, Nadja und Jan-Patrick Lehmann sowie Margareta, Gerd und Stefan Koch für ihre unerschütterliche Geduld, ihr Verständnis und ihre emotionale Unterstützung.