

**Identifizierung und Charakterisierung neuer Zielgene
des Sonic Hedgehog/Patched-Signaltransduktionswegs
in cerebellären Körnerzellprogenitoren der Maus
und in humanen Medulloblastomen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Hendrik Brune

aus

Leverkusen

Bonn 2004

Referent: Prof. Dr. Michael Hoch

Koreferent: Prof. Dr. Torsten Pietsch

Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampere
abs.	absolut
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
Chx	Cycloheximid
Ci	Curie
CMB	klassisches Medulloblastom
CO ₂	Kohlendioxid
CP	Cyclopamin
cRNA	komplementäre RNA
cRT-PCR	kompetitive RT-PCR
CTP	Cytidintriphosphat
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
ddH ₂ O	zweifach-deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMB	desmoplastisches Medulloblastom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	äussere Körnerzellschicht
EST	expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
f	femto (10 ⁻¹⁵)
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
G	Guanin
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitation
GCP	Körnerzellprogenitor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HB	Hepatoblastom
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämalaun-Eosin
Hh	Hedgehog
³ H	Tritium
IGF	Insulin-like growth factor
IGL	interne Körnerzellschicht
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
k	kilo (10 ³)
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen

m	milli (10^{-3})
M	molar
MB	Medulloblastom
min	Minute
mRNA	messenger-RNA
μ	micro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NMB	extrem noduläres Medulloblastom
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
p	pico (10^{-12})
PACAP	pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCL	Purkinjellschicht
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PKA	Proteinkinase A
Ptc	Patched
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SE	Standardfehler
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SSC	Saline-Sodium Citrate
SSH	subtraktive Suppressions-Hybridisierung
T	Thymin
T3	Bakteriophage
T4	Bakteriophage
T7	Bakteriophage
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T_M	Schmelztemperatur
TTP	Thymintriphosphat
U	Enzymeinheit
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultra-violett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-Galactosid
%	Prozent

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	5
1.1	Der Hedgehog/Patched-Signalweg.....	5
1.2	Das Medulloblastom.....	8
1.3	Das Gorlin-Syndrom / das Rhabdomyosarkom	10
1.4	Die Genese von Körnerzellvorläufern des Kleinhirns	10
1.5	Zielsetzung der Arbeit	12
2	<i>Material und Methoden</i>	14
2.1	<i>Material</i>	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Stammlösungen.....	14
2.1.3	Zellkulturmedien	15
2.1.4	kommerzielle Reagenzien-Sätze (Kits).....	15
2.1.5	Nukleinsäuren.....	16
2.1.5.1	Vektoren.....	16
2.1.5.2	Primer.....	16
2.1.5.2.1	Primer für kompetitive RT-PCR.....	16
2.1.5.2.2	Primer für Gli1-Bindungsstellenanalyse.....	19
2.1.5.3	Größenstandards	19
2.1.6	Bakterienstämme.....	20
2.1.7	Zelllinien.....	20
2.1.8	Untersuchungskollektive	20
2.1.8.1	Untersuchungskollektiv humaner Medulloblastom-Biopsien.....	20
2.1.8.2	Untersuchungskollektiv humaner Rhabdomyosarkom-Biopsien und Muskel-Kontrollgewebe.....	22
2.1.8.3	Untersuchungskollektiv muriner Rhabdomyosarkom-Biopsien und Muskel-Kontrollgewebe.....	22
2.1.9	Geräte	24
2.2	<i>Methoden</i>	26
2.2.1	Isolierung von RNA.....	26
2.2.1.1	Isolierung von RNA mittels Trizol.....	26
2.2.1.2	Isolierung von RNA mittels RNeasy	26
2.2.1.3	Aufreinigung von mRNA aus gesamtzellulärer RNA	27
2.2.2	Behandlung von RNA mit DNase I.....	27
2.2.3	Synthese von cDNA / reverse Transkription	27

2.2.4	Fällung von Nukleinsäuren	28
2.2.4.1	Fällung von RNA	28
2.2.4.2	Fällung von DNA	28
2.2.5	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	28
2.2.5.1	Aufreinigung von RNA	28
2.2.5.2	Aufreinigung von DNA	28
2.2.6	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA.....	29
2.2.8	Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren	30
2.2.8.1	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	30
2.2.8.2	Dephosphorylierung freier 5'-DNA-Enden	30
2.2.8.3	Ligation von DNA-Fragmenten	30
2.2.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	31
2.2.10	Größenfraktionierung von Nukleinsäuren	32
2.2.10.1	Agarose-Gelelektrophorese doppelsträngiger DNA	32
2.2.10.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA.....	33
2.2.11	DNA-Sequenzierung.....	33
2.2.12	Kompetitive RT-PCR (cRT-PCR) zur Quantifizierung von Transkripten.....	34
2.2.12.1	Herstellung exogener Kompetitor-RNA-Moleküle	35
2.2.12.2	cRT-PCR.....	36
2.2.13	Methoden der Bakterienkultur	38
2.2.13.1	Herstellung chemisch-transformationskompetenter Bakterien.....	38
2.2.13.2	Transformation chemisch-kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	38
2.2.13.3	Transformation elektro-kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	40
2.2.14	Zellkulturtechniken.....	40
2.2.14.1	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien	40
2.2.14.2	Passagieren von adhärent wachsenden Zelllinien	41
2.2.14.3	Transfektion von Zelllinien	41
2.2.14.4	Präparation cerebellärer Körnerzellvorläufer der Maus.....	41
2.2.14.5	Stimulation von Primärkulturen cerebellärer Körnerzellvorläufer der Maus	42
2.2.14.6	³H-Thymidin-Inkorporations-Assay.....	42
2.2.14.7	Dual-Luciferase-Assay	42
2.2.15	DNA Microarray-Hybridisierung.....	43
2.2.16	Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH)	44
2.2.17	Überprüfung differentiell exprimierter Klone mittels Dot Blot	45

2.2.18	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung.....	45
2.2.19	Isolation von Proteinen	47
2.2.20	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	48
2.2.21	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	48
2.2.22	Western Blot	49
2.2.23	Immunfärbung des Western Blot	49
2.2.24	Immunhistochemie	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Etablierung eines Zellkultursystems cerebellärer Körnerzellvorläufer	52
3.2	Identifizierung neuer Zielgene der Sonic Hedgehog/Patched-Kaskade mittels DNA Microarray-Hybridisierung.....	60
3.3	Identifizierung neuer Zielgene der Sonic Hedgehog/Patched-Kaskade mittels Subtraktiver Suppressions-Hybridisierung.....	63
3.4	Verifizierung Shh-regulierter Gene mittels kompetitiver RT-PCR.....	64
3.5	Suche nach potentiellen Gli1-Bindungsstellen im 5'-Bereich verifizierter Zielgene	65
3.6	Funktionelle Überprüfung potentieller Gli1-Bindungsstellen	67
3.7	Expressionsanalyse verifizierter Zielgene in der normalen Kleinhirnentwicklung der Maus.....	69
3.8	Expressionsanalyse verifizierter Zielgene in humanen Medulloblastomen.....	71
3.9	Expressionsanalyse von <i>SOX18</i> in humanen und murinen Rhabdomyosarkomen	73
3.10	Lokalisation der <i>sox18</i> -Expression während der normalen Kleinhirnentwicklung in der Maus	75
3.11	Shh-Responsivität von GCPs <i>sox18</i> -defizienter Mäuse	76
3.12	Histologische Untersuchung des Kleinhirns <i>sox18</i> -defizienter Mäuse.....	76
3.13	Shh-induzierte Proteinexpression von Deltex in GCPs	82
3.14	Expressionsanalyse von Komponenten des Notch-Signalwegs in humanen Medulloblastomen	83
4	Diskussion	84
4.1	Die Shh-vermittelte Proliferation von Körnerzellprogenitoren ist abhängig von Zytokinen und Matrixproteinen	84
4.2	Shh reguliert in Körnerzellvorläufern eine Vielzahl von Transkripten	89
4.3	Neu identifizierte Zielgene können mit unabhängigen Methoden bestätigt werden	91
4.4	Verifizierte Zielgene tragen potentielle Gli1-Bindungsstellen im proximalen Bereich ihres Translationsstartcodons	93

4.5	<i>SOX18</i> ist ein Zielgen des Shh/Ptc-Signalwegs in Körnerzellprogenitoren der Maus, und seine Expression ist in humanen desmoplastischen Medulloblastomen signifikant erhöht	95
4.6	Komponenten des Notch-Signalwegs werden in Körnerzellvorläufern der Maus und in humanen Medulloblastomen differentiell exprimiert.....	98
4.7	Die Expression von <i>IGFBP5</i> ist in Körnerzellprogenitoren der Maus und in humanen desmoplastischen Medulloblastomen gegensätzlich reguliert.....	101
5	<i>Zusammenfassung</i>	103
6	<i>Literatur</i>.....	105
7	<i>Anhang</i>	116

1 Einleitung

Vor mehr als einem Jahrhundert beobachtete der deutsche Pathologe Julius Cohnheim Ähnlichkeiten zwischen Tumoren und embryonalen Zellen. Seinen Beobachtungen nach waren beide Zelltypen meist morphologisch simpel aufgebaut, konnten differenzieren und hatten die Kapazität zu expansivem Wachstum. Von diesen Observationen ausgehend stellte er die These auf, dass Tumorzellen aus embryonalen Zellen hervorgehen können. Danach könnten während der Entwicklung mehr Zellen produziert werden als zur Gewebsausbildung nötig seien. Dieser Überschuss "embryonaler Reste" könnte im späteren Leben durch abnormale Aktivierung des Wachstums dieser Zellen zur Tumorigenese führen (Rather et al., 1978). Heute ist eine Vielzahl von Tumoren bekannt, die ihren Ursprung in meist undifferenzierten embryonalen Vorläuferzellen haben.

Die Aktivierung des Zellwachstums wird - wie viele andere zelluläre Prozesse - durch spezifische Signaltransduktionswege gesteuert. Jede lebende Zelle bedient sich solcher Wege, um mit ihrer Umwelt zu kommunizieren. Dabei binden Signalmoleküle an entsprechende Rezeptoren auf der Zelloberfläche und initiieren eine Informationsübertragung ins Zellinnere. Durch Fehlregulation einer solchen Signaltransduktionskaskade kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum kommen.

1.1 Der Hedgehog/Patched-Signalweg

Eine Signaltransduktionskaskade, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse steuert, ist der Hedgehog/Patched-Signalweg. Das Morphogen Sonic Hedgehog (Shh) gehört neben Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh) zur Hedgehog-Familie von Signalmolekülen in Vertebratenzellen, deren Mitglieder alle eine Homologie zum Hedgehog-Protein der Fruchtfliege aufweisen (Echelard et al., 1993). Nach Bioproteinsynthese wird ein 45 kDa großes Vorläuferprotein autokatalytisch in zwei Proteine gespalten (Porter et al., 1995; Porter et al., 1996). Der N-terminale, 19 kDa große Teil (N-Shh) ist für die Signalgebung verantwortlich, während der 25 kDa große C-terminale Teil (C-Shh) die Proteaseaktivität innehat. Als posttranslationale Modifikationen von N-Shh werden durch eine noch unbekannte Komponente N-terminal ein Palmitoyl-Schwanz (Pepinsky et al., 1998) sowie durch C-Shh C-terminal eine Cholesterolgegruppe (Porter et al., 1996) angehängt. Diese Modifikationen spielen in der Steigerung der Signalinduktion bzw. der kontrollierten Sezernierung und radialer Wirkung des Proteins eine wesentliche Rolle. Auf der Oberfläche

einer Shh-responsiven Zelle bindet Shh mit hoher Affinität an seinen Rezeptor Patched (Ptc), einem 12-transmembranalen Protein. Durch diese Bindung verliert Ptc seine inhibierende Wirkung auf Smoothed (Smo), einen 7-transmembranalen, G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Durch eine noch nicht vollständig verstandene, intrazelluläre Signalweiterleitung kommt es zur Translokation von Mitgliedern der Familie der Gli-Transkriptionsfaktoren in den Kern, wo spezifische Zielgene reguliert werden. Dabei fungiert Gli1 als Aktivator und Gli3 als Repressor. Zu den bereits bekannten Zielgenen des Signalwegs zählen *gli1* sowie *ptc* selbst (Ingham and McMahon, 2001). Neben *ptc* existiert im Vertebraten-System das verwandte *ptc2*, dessen Genprodukt alle Säuger-Hedgehog-Proteine bindet, dessen genaue Funktion dennoch unklar ist (Carpenter et al., 1998; Motoyama et al., 1998; Lewis et al., 1999). Ein weiteres Shh-bindendes Protein ist Hip (Hedgehog interacting protein) (Chuang and McMahon, 1999); auch hier ist die funktionelle Aufgabe noch nicht geklärt. Auf Grund einer hohen Konservierung des Signalwegs während der Evolution findet man große Homologien zwischen dem Vertebraten- und dem Drosophila-System, wobei im Letzteren die durch Hedgehog (Hh) initiierte Organisation zyttoplasmatischer Proteine besser verstanden ist. In Abwesenheit von Hh inhibiert Ptc Smo, wodurch das Homolog der Gli-Proteine - cubitus interruptus (Ci) - über die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert wird. Die bis dahin im Proteinkomplex mit Fused (Fu) und Costal 2 (Cos2) an Mikrotubuli assoziierte 155 kDa Ci-Isoform wird proteolytisch gespalten, worauf die 75 kDa-Form im Kern akkumuliert und dort - wie Gli3 in Säugerzellen - als Repressor fungiert. Durch Bindung an Ptc bewirkt Hh eine Inhibition der Ci-Spaltung und eine Dissoziation von den Mikrotubuli, so dass es als 155 kDa-Isoform vorliegt und - wie Gli1 - transkriptionsaktivierend wirkt. Dieser Regulierungsprozess, sowie der nukleäre Import von Ci werden durch einen Protein-Komplex koordiniert - bestehend aus der Serin/Threonin Kinase Fu, Suppressor of Fused (Su(fu)), Cos2 - einem Kinesin-ähnlichen Protein - und Ci selbst. Außer Cos2 sind im Vertebraten-System zwar alle anderen Komponenten bekannt, der dort ablaufende Prozess aber noch nicht vollständig verstanden (Ingham and McMahon, 2001). Es existieren mehrere Modelle zur Signalrezeption von Hedgehog-Proteinen. Ein konventioneller Ansatz geht von einer direkten Interaktion zwischen Ptc und Smo aus, wonach die Bindung von Hh zu einer Konformationsänderung von Ptc führt und so die Inhibition von Smo aufhebt (Stone et al., 1996; Murone et al., 1999). Ein anderes - stark hypothetisches Modell - geht davon aus, dass Ptc bereits intrazellulär das Sorting von Smo im Golgi-Apparat so beeinflusst, dass das Protein gar nicht erst die Plasmamembran erreicht. Durch Bindung von Hh wird Ptc internalisiert und dem lysosomalen Weg zugeführt, wodurch der Transport von Smo zur Zelloberfläche nicht mehr blockiert wird (Ingham and McMahon, 2001). Die strukturelle

Ähnlichkeit des Ptc-Proteins mit bakteriellen, die Zellwand durchspannenden Transportern sowie dem Niemann-Pick C1 Disease-Protein (NP-C1), welches ebenfalls als transmembranaler Transporter fungiert, führte wiederum zur Hypothese, dass Ptc als Hedgehog-regulierte Pumpe die Translokation kleiner Moleküle bewerkstelligt, die Einfluss auf die Aktivität von Smo nehmen (Taipale et al., 2002). Im Gegensatz zum exakten Ablauf der Signaltransduktion ist dessen Bedeutung in vielen Fällen zellulärer Prozesse bereits bekannt. So spielt Hh im Drosophila-System eine wichtige Rolle in der Entwicklung der embryonalen Anterior/Posterior-Achse, sowie von Extremitäten, Flügel, Auge, Darm, Tracheen und Gonaden. In Vertebraten ist Shh involviert in Prozesse wie der Angiogenese, der Genese von Zellen des Blutkreislaufs, der Entwicklung des Herzens, der Knochen, des Auges, des Darms, der Haare bzw. Federn, der Extremitäten, der Lunge, der Muskel und der Genese von Zellen des Nervensystems; sprich Gliazellen und Neuronen, wie beispielsweise in der Entwicklung von Körnerzellvorläufern des Kleinhirns (Ingham and McMahon, 2001). Auf Grund der Beteiligung an so vielen unterschiedlichen Prozessen ist bei einer Dysregulation eine große Anzahl von Syndromen und Tumoren mit dem Signalweg assoziiert (Abb. 1-1). So kann es im Fall der Überaktivierung des Shh/Ptc-Signalwegs zur Ausbildung des Medulloblastoms kommen.

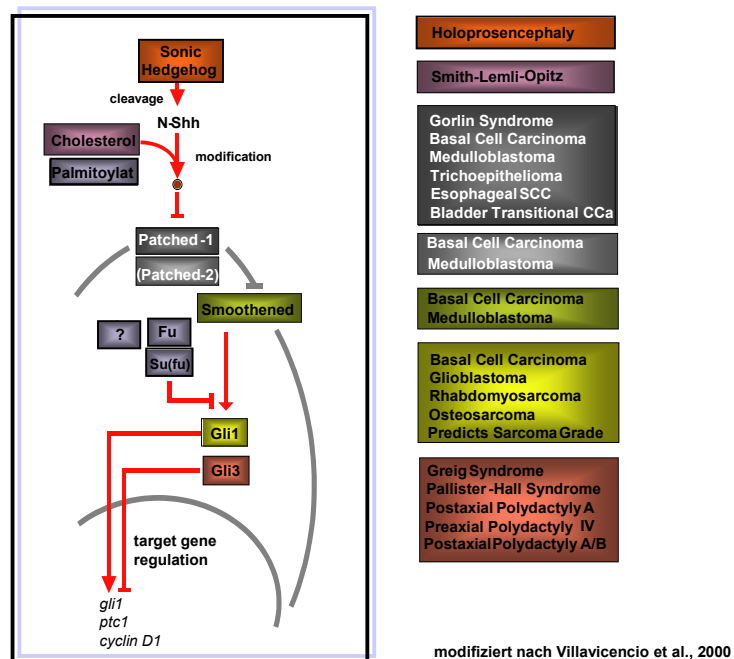


Abb.1-1

Darstellung des Shh/Ptc-Signalwegs im Säugetier-System (linke Seite) mit einer Auflistung assoziierter Syndrome und Krankheiten (rechte Seite). Die identische Farbrunterlegung in beiden Darstellungshälften symbolisiert den Zusammenhang zwischen Mutationen in Genen für Signalwegskomponenten und den daraus resultierenden Krankheitsbildern.

1.2 Das Medulloblastom

Erstmals beschrieben wurde das Medulloblastom im Jahr 1925 von Bailey und Cushing (Rorke, 1994). Es ist der häufigste, maligne Hirntumor des Kindesalters und kommt mit einer Inzidenz von 5 Neuerkrankungen pro 1 Millionen Kinder vor (Farwell and Flannery, 1984). Es tritt auch im Erwachsenenalter auf; dennoch handelt es sich in 50% aller Fälle um Patienten unter 10 Jahren (Ellison and Love, 1998). Klinische Merkmale sind Ataxie, Lethargie, Kopfschmerzen sowie morgendliches Erbrechen. Das Medulloblastom gehört zu den primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET), und ihm wird nach Klassifizierung der World Health Organization (WHO) der Grad IV zugeordnet (Kleihues and Sobin, 2000). In den meisten Fällen schließen sich Bestrahlung und/oder Chemotherapie einer operativen Entfernung malignen Gewebes an. Trotz dieser Maßnahmen sind Rezidive und Metastasen häufig. Allerdings überleben 50 - 70% aller Patienten 5 Jahre nach Zeitpunkt der Diagnose (Packer et al., 1994). Da Medulloblastome aus undifferenzierten neuralen Vorläuferzellen bestehen, werden sie den so genannten embryonalen Tumoren zugeordnet.

Die mit ca. 50% aller Fälle häufigste auftretende, cytogenetische Veränderung in Medulloblastomzellen ist das Isochromosom 17q [i(17q)] (Bigner et al., 1988; Griffin et al., 1988). Weiterhin kommt es auch zu Translokationen, Deletionen und Duplikationen auf Chromosom 1 (Bigner et al., 1988; Griffin et al., 1988), sowie chromosomalen Verlusten auf Chromosom 7, 10q und 11 (Reardon et al., 1997). LOH-Studien (Loss of heterozygosity) wiesen Allelverluste in 17p in bis zu 45% aller untersuchten Fälle nach (Cogen and McDonald, 1996). Das in 17p13 lokalisierte Tumorsuppressorgen *TP53* scheint allerdings in der Genese von Medulloblastomen keine signifikante Rolle zu spielen (Ohgaki et al., 1993; Adesina et al., 1994; Alderson et al., 1996).

Es können verschiedene Subtypen des Medulloblastoms unterschieden werden. Neben einigen, sehr selten vorkommenden Varianten mit melanocytärer oder myogener Differenzierung ist das klassische Medulloblastom (CMB), welches zumeist im Kleinhirnwurm entsteht, mit bis zu 80% aller Fälle die häufigste Variante (Abb. 1-2). Der Tumor besteht aus dicht gepackten, runden bis ovalen Zellen, die sich zu neuroblastischen Rosetten (Homer-Wright-Rosetten) formieren können. Weiterhin weisen sie meist hyperchromatische Kerne auf (Kleihues and Sobin, 2000). Das desmoplastische Medulloblastom (DMB) dagegen ist meistens in den Kleinhirn-Hemisphären lokalisiert. Seine knotenförmige Morphologie geht mit dem Auftreten Retikulin-reicher Tumorregionen stark proliferierender Zellen einher, die Retikulin-freie Inseln aus differenzierten Zellen (so genannte *pale islands*) umschließen (Katsetos et al., 1989; Giangaspero et al., 1991).

Expressionsanalysen in Medulloblastomen zeigten die Korrelation des Neurotrophin-Rezeptors p75^{NTR} mit dem Auftreten der desmoplastischen Variante (Bühren et al., 2000). Da p75^{NTR} ein Marker von Körnerzellvorläufern der äußeren Körnerzellschicht des sich entwickelnden Kleinhirns ist, weist dieser Befund auf eine Abstammung der DMBs von diesen Progenitoren hin (Yan and Johnson, 1988; Rocamora et al., 1993; Yachnis et al., 1993; Chen et al., 1996). Diese Zellpopulation reagiert auf Anwesenheit von Shh mit massiver Proliferation. Weiterhin konnten Mutationen in Komponenten des Shh/Ptc-Signalwegs in der desmoplastischen Variante des Medulloblastoms nachgewiesen werden (Pietsch et al., 1997; Raffel et al., 1997; Wolter et al., 1997; Reifenberger et al., 1998). Daher werden vom jetzigen Wissensstand aus die cerebellären Körnerzellvorläufer als Ursprungszellen des DMB betrachtet. Das extrem noduläre Medulloblastom - auch "cerebelläres Neuroblastom" genannt - weist neben einer ausgeprägten neuronalen Differenzierung histologisch wenig oder gar keine internoduläre Komponente auf. Diese Variante tritt vornehmlich in Patienten unter drei Jahren auf und ist mit einer günstigen Prognose assoziiert (Pearl and Takei, 1981; Giangaspero et al., 1999). Das anaplastische Medulloblastom, bestehend aus Zellen mit großen, irregulären Kernen und prominenten Nukleolen, sowie zahlreichen Mitosefiguren und apoptotischen Zellen hat eine ungünstige Prognose. Dabei besteht eine starke Assoziation mit der Amplifikation des *C-MYC*- oder des *N-MYC*-Protoonkogens (Eberhart and Burger, 2003). Medulloblastome können gemeinsam mit anderen Tumoren auftreten, wie beispielsweise mit multiplen Dickdarmadenomen im autosomal-dominanten Turcot-Syndrom (Ellison and Love, 1998). Weiterhin besteht bei Patienten mit Gorlin-Syndrom eine erhöhte Inzidenz von ca. 3% für die Entwicklung von Medulloblastomen (Evans et al., 1991).

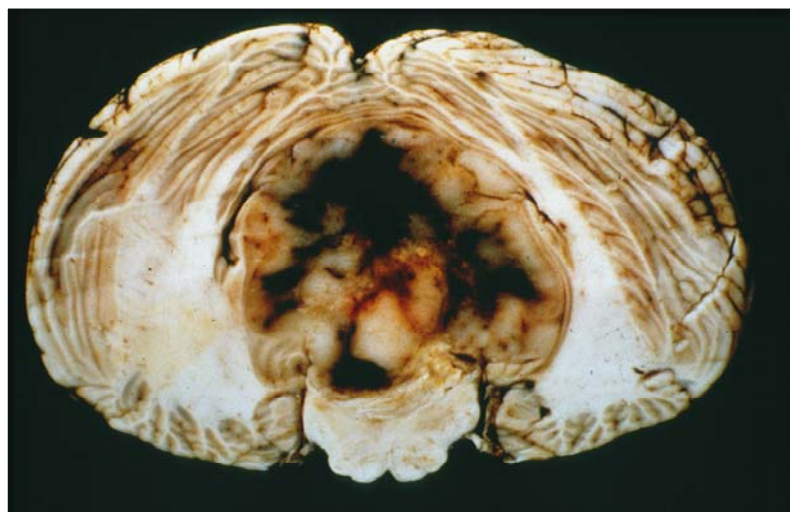


Abb. 1-2

Makroskopisches Sektionspräparat eines im Kleinhirnwurm entstandenen Medulloblastoms

1.3 Das Gorlin-Syndrom / das Rhabdomyosarkom

Das Gorlin-Syndrom, auch nävoïdes Basalzellkarzinom-Syndrom (NBCCS) genannt, ist eine autosomal-dominante Erkrankung. NBCCS-Patienten leiden unter vielfältigen Tumoren, wie Basalzellkarzinomen (BCC) oder Medulloblastomen; seltener auch Rhabdomyosarkomen (Toftgard, 2000). In vielen Fällen korreliert das Auftreten von NBCCS mit *PTCH*-Mutationen (humanes *ptc*) (Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996). Weiterhin entwickeln *ptc*^{+/-} Knock-out Mäuse ebenfalls die genannten Tumoren (Goodrich et al., 1997; Hahn et al., 1998). BCCs entstehen aus Keratinozyten des Plattenepithels und stellen lokal invasierende Tumoren dar, die selten metastasieren.

Embryonale Rhabdomyosarkome gehören zu primitiven, malignen Weichgewebssarkomen und weisen Eigenschaften des embryonalen Skelettmuskels auf (Fletcher, Unni and Mertens, 2002). Obwohl beim Menschen noch keine *PTCH*- oder *SMOH*-Mutationen nachgewiesen werden konnten, geht man von einer Assoziation mit dem Shh/Ptc-Signalweg aus, da *ptc*-defiziente Mäuse ebenfalls Rhabdomyosarkome entwickeln (Hahn et al., 1998).

1.4 Die Genese von Körnerzellvorläufern des Kleinhirns

Nach heutigem Wissensstand werden die Körnerzellprogenitoren (granule cell precursors; GCPs) des Kleinhirns als Ursprungszellen der desmoplastischen Variante des Medulloblastoms angesehen. Um die Genese von Tumoren besser zu begreifen, ist das Verständnis von normalen Entwicklungsprozessen unabdingbar.

Es kommen mindestens 5 Typen von Neuronen im Kleinhirn vor, wobei neben Korb-, Stern-, Golgi- und Purkinjezellen die Körnerzellen mengenmäßig am häufigsten auftreten (Altman and Bayer, 1997). Im Kleinhirn der Maus finden sich ca. 1×10^8 Körnerzellen, womit diese Population mehr Neuronen umfasst, als die Gesamtheit aller anderen im Cerebellum vorkommender Nervenzellen. Durch ihre Glutamat-Sezernierung kontrollieren Körnerzellen die Aktivität der Purkinjezellen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Neuronen, die im Bereich des IV. Ventrikels entstehen, gehen Körnerzellen aus der externen Körnerzellschicht (external germinal layer / external granule cell layer; EGL) hervor. Dabei migrieren die Körnerzellvorläufer, ausgehend vom Bereich der Rautenlippe, prenatal auf der Oberfläche des Cerebellums und bilden das EGL. Postnatal entsteht durch massive Proliferation des EGL eine große Anzahl von GCPs (Wechsler-Reya, 2003). Das von den Purkinjezellen sezernierte

Shh ist für diese Zellteilungsinduktion verantwortlich (Dahmane and Ruiz-i-Altaba, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Durch einen bisher nicht vollständig verstandenen Mechanismus migrieren GCPs anschließend von der Kleinhirnoberfläche einwärts, verlassen den Zellzyklus und differenzieren aus (Fishell and Hatten, 1991; Komuro and Rakic, 1998). Dabei werden Axone ausgebildet, die die Purkinjezellen kontaktieren. Danach wandern die Zellen durch die Purkinjezellschicht hindurch und bilden die so genannte interne Körnerzellschicht (internal granule cell layer; IGL) aus (Abb. 1-3).

Interessanterweise beginnt die Expression von Shh während der Embryogenese und dauert bis zum Erwachsenenalter hin an (Traiffort et al., 1999), so dass eine Abnahme der Morphogenkonzentration nicht der Grund für den Proliferationsstopp der GCPs sein kann. Es wird davon ausgegangen, dass antagonistische Signale diesen Prozess steuern. So werden Vitronectin, PACAP und bFGF solch Shh-inhibierende Wirkungen zugesprochen (Wechsler-Reya, 2003). Das extrazelluläre Matrixprotein Vitronectin kommt vornehmlich im IGL vor (Pons et al., 2001; Wechsler-Reya, 2001), während PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) von Purkinjezellen sezerniert wird (Nielsen et al., 1998; Skoglosa et al., 1999) und sein Rezeptor auf der Oberfläche von GCPs im EGL exprimiert wird (Basille et al., 1993). Obwohl in der Literatur PACAP gegensätzliche Wirkungen auf GCPs zugewiesen werden (Wechsler-Reya and Scott, 1999; Suh et al., 2001; Tabuchi et al., 2001; Lelievre et al., 2002; Vaudry et al., 2002), ist bewiesen, dass es die Proteinkinase A aktiviert, welche Shh-induzierte Antworten in den meisten Geweben blockieren kann (Li et al., 1995; Hammerschmidt et al., 1996; Ungar and Moon, 1996). bFGF wird von cerebellären Astrozyten und Purkinjezellen sezerniert (Hatten et al., 1988; Matsuda et al., 1994) und hat - wie PACAP - in unterschiedlichen Studien pro- als auch antiproliferative Wirkungen gezeigt (Tao et al., 1996; Wechsler-Reya and Scott, 1999).

Das Ergebnis des hier beschriebenen Entwicklungsprozesses des Kleinhirns ist eine Population ausdifferenzierter Körnerzellen im Erwachsenenalter, so dass kein EGL mehr vorliegt. Verbleiben dennoch vereinzelt GCPs in der Kleinhirnhemisphäre, könnten diese Zellen durch Wiedereintritt in den Zellzyklus Ursprung für die Entstehung eines desmoplastischen Medulloblastoms sein.

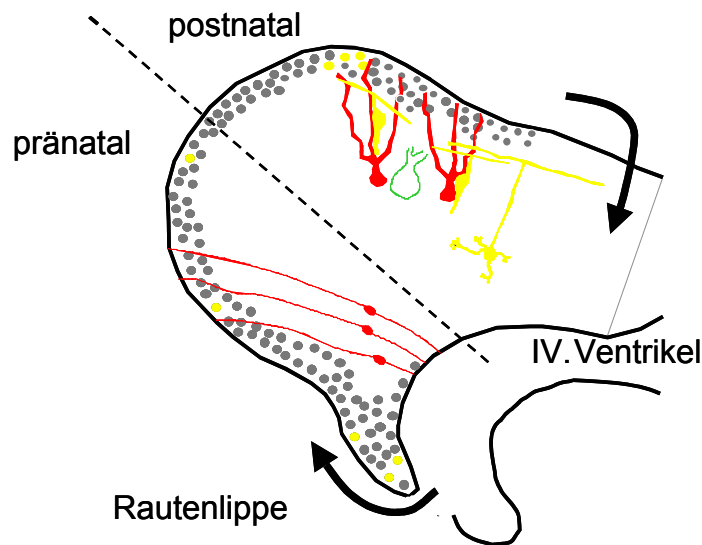


Abb. 1-3

Schematische Darstellung der Körnerzellentwicklung im Kleinhirn

Symbolik: gelbe Kreise: Körnerzellvorläufer; gelbe polymorphe Figuren: ausgereifte Körnerzellen mit Axonen; grüne Figur: Shh-sezernierende Purkinjezelle; rote polymorphe Figuren: Golgi-Zellen

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung gewebsspezifischer, neuer Zielgene des Shh/Ptc-Signalwegs in Körnerzellvorläufern des Kleinhirns der Maus und in humanen Medulloblastomen.

Dazu sollte zunächst ein Zellkultursystem etabliert werden, mit dessen Hilfe sich frisch präparierte Körnerzellprogenitoren aus dem Kleinhirn der Maus mit rekombinantem Shh stimulieren lassen. Anschließend sollten nach mRNA-Isolierung stimulierter und nicht stimulierter Körnerzellvorläufer durch Shh differentiell exprimierte Transkripte identifiziert werden. Dafür sollten die beiden komplementären Techniken Subtraktive Suppressions-Hybridisierung und DNA Microarray-Hybridisierung angewendet werden. Die Verifizierung potentieller Kandidaten sollte mittels kompetitiver RT-PCR erfolgen. Auf diese Ergebnisse aufbauend sollten funktionelle Analysen folgen, wie die Untersuchung potentieller Bindungsstellen des Signalwegs-assoziierten Transkriptionsfaktors Gli1 in regulatorischen Bereichen bestätigter Zielgene.

Darüber hinaus sollte die Relevanz neu gefundener Zielgene in humanen Medulloblastomen geklärt werden. Dazu sollten mittels kompetitiver RT-PCR Expressionsanalysen in Proben klassischer und desmoplastischer Medulloblastome durchgeführt werden (Abb. 1-4).

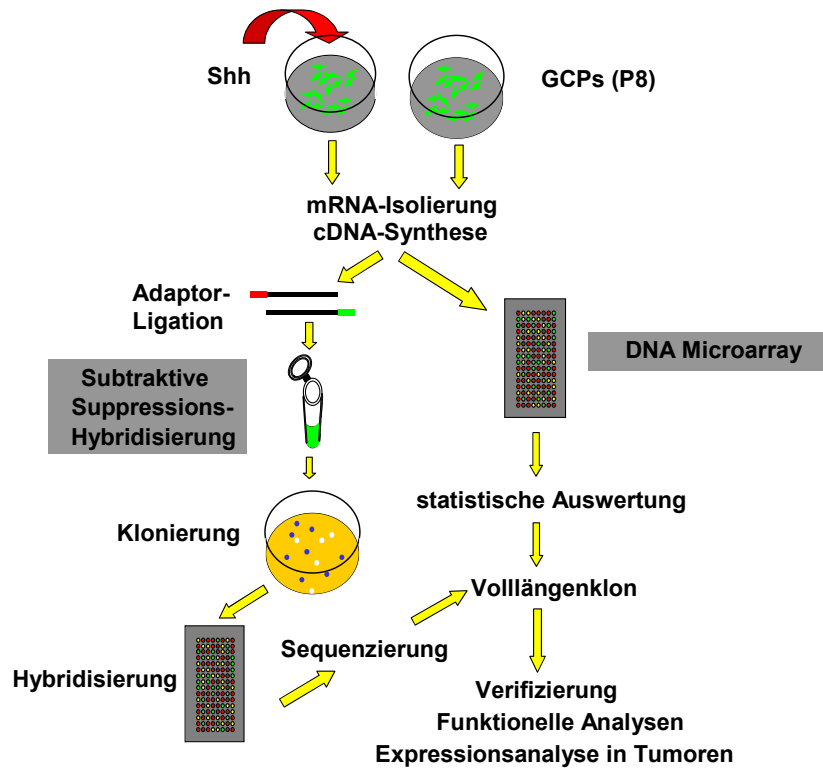


Abb. 1-4

Flussdiagramm des experimentellen Vorgehens in dieser Arbeit

Abkürzung: GCPs (P8): Körnerzellvorläufer des nachgeburtlichen Tags 8

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden – soweit nicht anders vermerkt – von den Firmen Biorad, Difco, Fluka, ICN, Invitrogen, Merck, Roche, Roth, Serva und Sigma in Analysequalität (p.a.) bezogen. Enzyme sowie Nukleotide stammten von Amersham, Clontech, Invitrogen, MBI Fermentas, MWG, NEB, Promega, Roche und Stratagene.

2.1.2 Stammlösungen

PBS:

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄

in ddH₂O lösen, einstellen auf pH 7,4

TBS:

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
2,8 mM	Tris-Base

in ddH₂O lösen, einstellen auf pH 7,4

10xTBE (1 Liter):

108 g	Tris-Base
55 g	Borat
40 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)

2.1.3 Zellkulturmedien

DMEM:

zu 500 ml DMEM-Medium (Invitrogen)

50 ml FCS (Invitrogen)

10 ml 200 mM L-Glutamin (100x; Invitrogen)

5 ml Na-Pyruvat

Neurobasal/B27:

zu 500 ml Neurobasal-Medium (Invitrogen)

50 ml B27-supplement (Invitrogen)

1,25 ml 200 mM L-Glutamin (100x; Invitrogen)

2.1.4 kommerzielle Reagenzien-Sätze (Kits)

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)

ECL Kit (Amersham)

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)

NuPage Kit (Invitrogen)

Oligotex mRNA Spin-Column Kit (Qiagen)

PCR-Select cDNA Sustraction Kit (Clontech)

PCR-Select Differential Screening Kit (Clontech)

Plasmid Midi Kit (Qiagen)

PRISM Big Dye Terminator RR Mix (Applied Biosystems)

Ready-to-go DNA Labelling Beads Kit (Amersham)

RNeasy-Mini Kit (Qiagen)

Superscript Choice system for cDNA synthesis (Invitrogen)

SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen)

TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)

T7 Transcription Kit (Fermentas)

2.1.5 Nukleinsäuren

2.1.5.1 Vektoren

Bezeichnung	Quelle
p8xmutGli1-BS-Luc	(H. Sasaki; Japan)
p8xGli1-BS-Luc	(H. Sasaki; Japan)
pcDNA3-His-humanGli1	(H. Sasaki; Japan)
pcDNA3-His-humanGli3	(H. Sasaki; Japan)
pCRII-TOPO	(Invitrogen)
pGL3-Basic	(Promega)

Tab. 2-1:

Aufstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

2.1.5.2 Primer

2.1.5.2.1 Primer für kompetitive RT-PCR

Gen	Primer-Name/Sequenz	PCR-Beding
h-Beta2-Microglobulin 147 bp Δ20 bp	TP514-hB2Mf tgtctttcagcaaggactgg TP515-hB2Mr gatgctgcttacatgtctcg TP524-T7hB2M ggatcctaatacgaactcactatagggagggtgtcctttcagcaaggactgg TP525-muthB2Mf gatgctgcttacatgtctcggtgtgacaaagtcacatgg	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
m-beta2-Microglobulin 142 bp Δ15 bp	TP1581-mB2microf tgtccttcagcaaggactgg TP1582-mB2micror tgatcacatgtctcgatccc TP1624-T7mB2micro ggatcctaatacgaactcactatagggagggtgtcctttcagcaaggactgg TP1625-mutmB2micro tgatcacatgtctcgatcccgtcggccatactgtcatgc	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
m-pbdg 153 bp Δ8 bp	TP2217-mpbdgf agctgcaggaattcagtgcc TP2218-mpbdgr cgtgcaacacactcactagg TP2232-T7mpbdg ggatcctaatacgaactcactatagggaggagctgcaggaattcagtgcc TP2233-mutmpbdg cgtgcaacacactcactaggctccttggctcggacttcc	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
m-gli1 145 bp Δ19 bp	TP1585-m/hgli1f gcgagaagccacacaagtgc TP1586-mgli1r ggcattgctaaaggccttgc TP1628-T7m/hgli1 ggatcctaatacgaactcactatagggaggggcgagaagccacacaagtgc TP1629-mutmgli1 ggcattgctaaaggccttgcattgtaaggcttctcaccgg	1,0 mM MgCl ₂ +DMSO
h-GLI1 145 bp Δ19 bp	TP1585-m/hgli1f siehe oben TP1597-GLI1r ggcattgctgaaggctttac TP1628-T7m/hgli1 siehe oben TP1640-mutGLI1 ggcattgctgaaggctttaccatgtatggcttctcaccgg	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
m-cyclinD1 195 bp Δ17 bp	TP1587-mCyclD1f cgtgcagaaggagattgtgc TP1588-mCyclD1r cttagaggccacgaacatgc TP1630-T7mCyclD1 ggatcctaatacgaactcactatagggaggcgtgcagaaggagattgtgc TP1631-mutmCyclD1 cttagaggccacgaacatgctgcaggcggctcttctcag	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
h-CYCLIN D1 198 bp Δ20 bp	TP1108hCyclD1f atgtgtgcagaaggaggtcc TP-1109hCyclD1r cttagaggccacgaacatgc TP1133-T7hCycD1 ggatcctaatacgaactcactatagggaggatgtgtgcagaaggaggtcc TP1134-muthCyclD1 cttagaggccacgaacatgcaggcggctctttttcaggg	1,0 mM MgCl ₂ +DMSO

Gen	Primer-Name/Sequenz	PCR-Beding
h-HES1 171 bp Δ15 bp	TP1591-hHRYf ccgataaaccacaaagacagc TP1592-hHRYr ccagaatgtccgccttctcc TP1634-T7hHRY ggatcctaatacagactcactatagggaggccggataaaccacaaagacagc TP1635-muthHRY ccagaatgtccgccttctccgagctatctttcttcagagc	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
m-deltex1 160 bp Δ22 bp	TP1593-mDtxf cctacccaacaatgagaagg TP1594-mDt xr tgagggttggaccaaactcc TP1636-T7mDt x ggatcctaatacagactcactatagggaggcctaccaacaatgagaagg TP1637-mutmDt x tgagggttggaccaaactccacaccacgggtgtccgactcg	1,5 mM MgCl ₂ +DMSO
h-DTX 160 bp Δ22 bp	TP1595-hDTXf tctacccaacaacgagaaaag TP1596-hDTXr tgagggttggatccaaactcg TP1638-T7hDTX ggatcctaatacagactcactatagggaggctacccaacaacgagaaaag TP1639-muthDTX tgagggttggatccaaactcgacaccacgggtgtccgactcg	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-spindlin 153 bp Δ17 bp	TP1691-m/hSpinf accctgtctgtacatgtac TP1692-m/hSpinr tcttctttggcatattccac TP1758-T7m/hSpin ggatcctaatacagactcactatagggaggaccctgtctgtacatgtac TP1759-mutm/hSpin tcttctttggcatattccacctgtccacaacttctcctgg	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-parg 125 bp Δ26 bp	TP1693-m/hPargf gccagctcttttagctaactgc TP1694-m/hPARGr ggtttccttgatgaacgtcc TP1760-T7m/hParg ggatcctaatacagactcactatagggaggccagctcttttagctaactgc TP1761-mutm/hParg ggtttccttgatgaacgtccctgggtaactagaatactcc	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-sik similar 133 bp Δ13 bp	TP1701-m/hSikf acagcagaagcattagcagc TP1702-m/hSikr acccctcctagtttagcatc TP1766-T7m/hSik ggatcctaatacagactcactatagggaggacagcagaagcattagcagc TP1767-mutm/hSik acccctcctagtttagcatcggttcatgggcttcttttac	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
m-N-myc 110 bp Δ13 bp	TP1703-mnmycf ctcagatgatgaggatgacg TP1704-mnmycr tcgtgaaagtggttacagcc TP1768-T7mnm yc ggatcctaatacagactcactatagggaggctcagatgatgaggatgacg TP1769-mutmnm yc tcgtgaaagtggttacagccaggaacgtctcttctctacg	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
h-N-MYC 129 bp Δ13 bp	TP1705-hnmycf acaaggccctcagtacctcc TP1706-hnmycr tgggtgttgaggaggaacgc TP1916-T7hn-mycf ggatcctaatacagactcactatagggaggacaaggccctcagtacctcc TP1917-muthn-mycr tgggtgttgaggaggaacgtgaccacgtcgatttcttcc	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
m-nucleolin 211 bp Δ26 bp	TP1732-mnucleolinf cttttgctcagacgctagc TP1733-mnucleolinr aggaggagccattttcttgg TP1772-T7mnucl. ggatcctaatacagactcactatagggaggcttttgctcagacgctagc TP1773-mutm nucleolin aggaggagccattttcttgggagcttcaccatgggtggc	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
m-hippocalcin 163 bp Δ16 bp	TP1730-mhippof agttcatcattgctctgagc TP1731-mhippor ttttcatcacggacgaaacc TP1774-T7mhippo ggatcctaatacagactcactatagggaggagttcatcattgctctgagc TP1775-mutmhippo ttttcatcacggacgaaaccgcacaatttctagcatctcc	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
h-HIPPOCALCIN 162 bp Δ16 bp	TP1939-hhippof agttcatcattgctctgagc TP1940-hhippor ttttcatcacggacgaaacc TP1913-T7hhippof ggatcctaatacagactcactatagggaggagttcatcattgctctgagc TP1914-muthhippor ttttcatcacggacgaaaccgcacgatctocagcatctcc	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
m-sox18 188 bp Δ16 bp	TP1728-mSox18f tcagggcgctatggccttgg TP1729-mSox18r cgtgttcagctccttccacg TP1776-T7mSox8 ggatcctaatacagactcactatagggaggctcagggcgctatggccttgg TP1777-mutmSox18 cgtgttcagctccttccacggctcagtagctgctgtgca	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
h-SOX18 118 bp Δ15 bp	TP1955-hSox18f agcaagatgctgggcaaagc TP1956-hSox18r ggtacttgtagttgggggtgg TP1995-T7hSox18f ggatcctaatacagactcactatagggaggagcaagatgctgggcaaagc TP1996-muthSox18r ggtacttgtagttgggggtggacgcgcagccggttcggcttc	1,5 mM MgCl ₂ +DMSO
m-arp1 204 bp Δ16 bp	TP1736-mArp1f aaaatcaccactaccgtggg TP1737-mArp1r aaaccaccttctcaaatgcc TP1781-T7mArp1 ggatcctaatacagactcactatagggaggaaaatcaccactaccgtggg TP1782-mutmArp1 aaaccaccttctcaaatgccgcttcttctcatcagtgga	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-cct4 157 bp Δ14 bp	TP1738-m/hCct4f ctgggttctgctgagttagc TP1739-m/hCct4r tcatgaatggagcgctcagc TP1783-T7m/hCct4 ggatcctaatacagactcactatagggaggctgggttctgctgagttagc TP1784-mutmCct4 tcatgaatggagcgctcagcgtttgttagaaccacgtacg	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-ptbp2 190 bp Δ28 bp	TP1742-m/hPtbp2f gtttatggagatgtgcagcg TP1743-m/hPtbp2r tcatcaagtcctctcgagg TP1787-T7m/hPtbp2 ggatcctaatacagactcactatagggagggtttatggagatgtgcagcg TP1788-mutm/hPtbp2 tcatcaagtcctctcgagggtacacgaataatttttcc	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO

Gen	Primer-Name/Sequenz	PCR-Beding
h/m-ns1bp 157 bp Δ19 bp	TP1744-m/hNS1BPf aaaggtaatcaactgggtgc TP1745-m/hNS1BPr catcatcactgccaacacc TP1789-T7m/hNS1BP ggatcctaatacagactcactatagggaggaaaggtaatcaactgggtgc TP1790-mutm/hNS1BP catcatcactgccaacaccgggttcccatcaagcagcttc	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-mtd 108 bp Δ11 bp	TP1746-m/hMtdf ctcagcaggtatcacatggg TP1747-m/hMtdr aaccagggcatgaacctagg TP1791-T7m/hMtd ggatcctaatacagactcactatagggaggctcagcaggtatcacatggg TP1792-mutm/hMtd aaccagggcatgaacctagggtgccggacacagctccaccgc	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
m-cdc46 185 bp Δ19 bp	TP1748-mCDC46f tcatctccaagagcatttcc TP1749-m/hCDC46r tctccacaaacttcagaagc TP1793-T7mCDC46 ggatcctaatacagactcactatagggaggctcatctccaagagcatttcc TP1794-mutmCDC46 tctccacaaacttcagaagcgggtctcccaacatcagcaag	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
m-cdc6- related 167 bp Δ20 bp	TP1750-mcdc6rf gaaagctggcagctctctacc TP1751-mcdc6rr atctcctgagcaatagctgg TP1795-T7mcdc6r ggatcctaatacagactcactatagggaggaaagctggcagctctctacc TP1796-mutmcdc6r atctcctgagcaatagctggctcagggacatgcaattcagc	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
m-myb 256 bp Δ16 bp	TP1752-mmybf ttctccgggagaaacttgccc TP1753-m/hmybr ttccccaagtgcagctttcc TP1797-T7mmyb ggatcctaatacagactcactatagggagggttctccgggagaaacttgccc TP1798-mutmmyb ttccccaagtgcagctttcccatcgtagctcatgggtcaca	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
m-igfbp5 179 bp Δ16 bp	TP1754-mIGFBP5f caacgaaaagagctacggcg TP1755-mIGFBP5r tcagcttctttctgcggtcc TP1799-T7mIGFBP5 ggatcctaatacagactcactatagggaggcaacgaaaagagctacggcg TP1800-mutmIGFBP5 tcagcttctttctgcggtccccttcagctcggaaatgcga	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
h-IGFBP5 146 bp Δ16 bp	TP1938-hIGFBP5f caagatcgagagagactccc TP-hIGFBPsr s.o. TP1912-T7hIGFBP5f ggatcctaatacagactcactatagggaggcaagatcgagagagactccc TP-muthIGFBP5r s.o.	1,5 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-tumor protein D53 140 bp Δ19 bp	TP1947-h/mtpd53f cgccattccataagtatgcc TP1948-h/mtpd53r aggacctcctcaaaaactgcc TP1922-T7h/mtpd53f ggatcctaatacagactcactatagggaggcgccattccataagtatgcc TP1923-muth/mtpd53r aggacctcctcaaaaactgccctactttcgtcttgaggct	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-mmp11 115 bp Δ15 bp	TP1951-h/mMmp11f gacatcatgatcgacttccg TP1952-h/mMmp11r aagtggacatccccttctcg TP1924-T7h/mMmp11f ggatcctaatacagactcactatagggaggacatcatgatcgacttccg TP1925-muth/mMmp11r aagtggacatccccttctcggaaggcatgggcccaggatgc	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
h-EXONUCLEASE 164 bp Δ14 bp	TP2064-hexonuclf atatcacacatgccatggcc TP2065-hexonuclr agccaaaagctaggagatcc TP2092-T7hexonucl ggatcctaatacagactcactatagggaggatcacacatgccatggcc TP2093-muthexonucl agccaaaagctaggagatcctatggcttgacacaattcccg	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
h/mHES5 120 bp Δ12 bp	TP2082-m/hHes5f gaaaaaccgactgcggaagc TP2083-m/hHes5r cttctccagcttgaggtgg TP2094-T7m/hHes5 ggatcctaatacagactcactatagggagggaaaaaccgactgcggaagc TP2095-mutm/hHes5 cttctccagcttgaggtggcgaactcctgctccagcagc	1,0 mM MgCl ₂ +DMSO
h/m-NOTCH 168 bp Δ20 bp	TP2084-m/hNotchf atgaccctggaagaactgc TP2085-m/hNotchr agtggctccttgagctactgg TP2096-T7m/hNotch ggatcctaatacagactcactatagggaggatgaccctggaagaactgc TP2097-muthNotch agtggctccttgagctactgggctggcagctcaaagccgctcg	1,0 mM MgCl ₂ -DMSO
h/m-RBPJ 207 bp Δ20 bp	TP2090-m/hRBPJf tctgaacaagagtctcaacc TP2091-m/hRBPJr ttatccgcttgctgaggaac TP2124-T7m/hRBPJ ggatcctaatacagactcactatagggaggctctgaacaagagtctcaacc TP2125-mutm/hRBPJ ttatccgcttgctgaggaacgccatagaacatctttacag	1,5 mM MgCl ₂ +DMSO

Tab. 2-2:

Auflistung verwendeter Primer für kompetitive RT-PCR

h: human; m: murin; bp: PCR-Produktgröße in Basenpaaren; Δ bp: Deletionsgröße des Kompetitors; f: *forward*-Primer; r: *reverse*-Primer; T7: *forward*-Primer mit zusätzlicher T7-Promotor-Sequenz; mut: *reverse*-Mutagenese-Primer. Alle PCRs wurden bei einer Annealing-Temperatur von 58°C durchgeführt. In der Expressionsanalyse waren alle *reverse*-Primer Fluoreszenz-markiert.

2.1.5.2.2 Primer für Gli1-Bindungsstellenanalyse

Gen	Primer-Name/Sequenz	PCR-Bedingungen
cct4 228 bp	Xho-cct4f <u>ACACTCGAGACA</u> AATGTCAGCAACAGAGGGGC Hind-cct4r <u>ACAAAGCTTACACCA</u> ATCTCTGCTGTCTGTCTGTCG	1,5 mM MgCl ₂ , + DMSO
deltex1 259 bp	Xho-dtxf <u>ACACTCGAGACAT</u> GAAATGAGTGGATGTGTGGC Hind-dtxr <u>ACAAAGCTTACAA</u> AGATCCAGGTAACCACAGG	1,5 mM MgCl ₂ , + DMSO
hippocalcin 363 bp	Xho-hippof <u>ACACTCGAGACA</u> ATGACTGCCTGTCTACTTCC Hind-hippor <u>ACAAAGCTTACA</u> CACACGCACTGACACATGGC	1,5 mM MgCl ₂ , + DMSO
igfbp5 419 bp	Xho-igfbp5f <u>ACACTCGAGACATA</u> AAACAAGGTCTCCTGCAGC Hind-igfbp5r <u>ACAAAGCTTACA</u> TTCATTATTGTTCTGGTGGGG	1,5 mM MgCl ₂ , + DMSO
mtd 251 bp	Xho-mtdf <u>ACACTCGAGACA</u> TATAGCTGGTTGGATGGGCC Hind-mtdr <u>ACAAAGCTTACA</u> AGCCTGCAAGCAGACAAGCC	1,5 mM MgCl ₂ , + DMSO
sik similar 302 bp	Xho-sikf <u>ACACTCGAGACA</u> ATTCCCAGTACTCACATGGC Hind-sikr <u>ACAAAGCTTACA</u> TTCCTTTCTTTGGGCTGGGG	1,5 mM MgCl ₂ , + DMSO
sox18 536 bp	Xho-sox18f <u>ACACTCGAGACA</u> ACTGGCTATGTCCTGTGTCC Hind-sox18r <u>ACAAAGCTTACA</u> CTCCCTTTTTCTTCCCGGC	1,5 mM MgCl ₂ , + DMSO
tpd53 274 bp	Xho-tpd53f <u>ACACTCGAGACAT</u> CCAGTAGCCACTTTGTACC Hind-tpd53r <u>ACAAAGCTTACA</u> GTCGTATTTTTACCACACCC	1,5 mM MgCl ₂ , + DMSO

Tab. 2-3:

Auflistung der verwendeten Primer zur Amplifikation potentieller Gli1-Bindungsmotive

Xho: Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym XhoI; Hind: Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym HindIII; unterstrichene Sequenz: Restriktionsenzymserkennungssequenz, beidseitig umrahmt von Spacersequenz (ACA); f: *forward*-Primer; r: *reverse*-Primer; alle PCRs wurden bei einer Annealing-Temperatur von 56°C durchgeführt.

2.1.5.3 Größenstandards

Standard	Fragmentgrößen in Basen
1 kb DNA ladder (NEB)	10.002; 8.001; 6.001; 5.001; 4.001; 3.001; 2.000; 1.500; 1.000; 517; 500
pUC19 (MBI Fermentas)	501/489; 404; 331; 242; 190; 147; 111/110; 67;
Genescan-500 Rox (Fluoreszenzmarkiert) (Applied Biosystems)	500; 490; 450; 400; 350; 340; 300; 250; 200; 160; 150; 139; 100; 75; 50; 35

Tab. 2-4:

Auflistung der verwendeten DNA-Größenstandards

2.1.6 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
XL I-blue MRF' (Invitrogen)	recA1 endA1 gryA96 thi-1 d(mcr)A183 d(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 supE44 relA1, lac[F' pro AB lacI ^q ZdM15Tn10(tet ^r 12,5 µg/ ml)]
TOP10 (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Δ80lacZΔM15 ΦlacX74 recA1 deoR araD139Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG

Tab. 2-5:

Auflistung der verwendeten Bakterienstämme

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Geschlecht/Alter; Tumor, Referenz	Kulturbedingungen
DAOY	M/4; DMB, Jacobsen et al., 1985	DMEM
MHH MED3	W/3; CMB, Pietsch et al., 1994	DMEM
MEB MED 8a	M/2; CMB, Pietsch, unpubliziert	DMEM
HepT1	W/34; HB, Pietsch et al., 1996	DMEM
HepG2	M/15; HCC, Aden et al., 1979	DMEM

Tab. 2-6:

Auflistung der verwendeten Zelllinien

Abkürzungen: DMB: desmoplastisches Medulloblastom; CMB: klassisches Medulloblastom; HB: Hepatoblastom; HCC: hepatozelluläres Karzinom

2.1.8 Untersuchungskollektive

2.1.8.1 Untersuchungskollektiv humaner Medulloblastom-Biopsien

RNA-Nr.	DNA-Nr.	Beschreibung
370	86	DMB
385	82	DMB
1057	292	DMB
1162	322II	DMB

RNA-Nr.	DNA-Nr.	Beschreibung
1181	538	DMB
1418	849	DMB
1419	1062	DMB
1420	978	DMB
1562	1144	DMB
1606	810II	DMB
1607	1665	DMB
1608	1401	DMB
1556	1011	CMB
1561	1173	CMB
1566	1088	CMB
1567	1106	CMB
1570	1198	CMB
1572	1177	CMB
1576	965	CMB
1577	967	CMB
1578	1127	CMB
1582	1185	CMB
1590	963	CMB
1593	1049	CMB
1601	1165	CMB
1682	1684	NMB
1684	1688	NMB
1685	1690	NMB
1686	1691	NMB
1687	1683	NMB
1688	1692	NMB
1626	1584	fK
1628	1583	fK

Tab. 2-7:

Auflistung des Untersuchungskollektivs humaner Medulloblastom-Biopsien

Abkürzungen: CMB: klassisches Medulloblastom; DMB: desmoplastisches Medulloblastom; NMB: extrem noduläres Medulloblastom; fK: fetales Kleinhirn

2.1.8.2 Untersuchungskollektiv humaner Rhabdomyosarkom-Biopsien und Muskel-Kontrollgewebe

RNA-Nr.	DNA-Nr.	Beschreibung
1226	676	RMS
1227	677	RMS
1228	678	RMS
1634	903	RMS
1635	904	RMS
1637	908	RMS
1638	916	RMS
1639	918	RMS
1640	920	RMS
1641	925	RMS
1643	927	RMS
1644	928	RMS
1646	930	RMS
1647	931	RMS
1631	-	Muskel
1632	-	Muskel
1633	-	Muskel

Tab. 2-8:

Auflistung des Untersuchungskollektivs humaner Rhabdomyosarkom-Biopsien und Muskelkontrollgewebes

Abkürzung: RMS: Rhabdomyosarkom

2.1.8.3 Untersuchungskollektiv muriner Rhabdomyosarkom-Biopsien und Muskel-Kontrollgewebe

RNA-Nr.	DNA-Nr.	Beschreibung
1365	869	RMS
1649	866	RMS
1651	873	RMS
1654	876	RMS

RNA-Nr.	DNA-Nr.	Beschreibung
1656	878	RMS
1658	880	RMS
1659	881	RMS
1660	882	RMS
1661	883	RMS
1662	884	RMS
1663	887	RMS
1666	890	RMS
1669	893	RMS
1670	894	RMS
1671	895	RMS
1672	896	RMS
1673	898	RMS
1675	900	RMS
1676	901	RMS
1677	902	RMS
1364	868	Muskel zu RMS RNA-Nr.: 1365
1650	872	Muskel
1652	874	Muskel zu RMS RNA-Nr.: 1651
1653	875	Muskel zu RMS RNA-Nr.: 1654
1655	877	Muskel zu RMS RNA-Nr.: 1656
1657	879	Muskel zu RMS RNA-Nr.: 1658
1667	891	Muskel zu RMS RNA-Nr.: 1666

Tab. 2-9:

Auflistung des Untersuchungskollektivs muriner Rhabdomyosarkom-Biopsien und Muskelkontrollgewebes

Abkürzung: RMS: Rhabdomyosarkom

2.1.9 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Deionisierungsanlage	Milli Q UF Plus	Millipore
Gelelektrophorese-Kammer	Wide Mini Sub Cell	Biorad
Inkubator	OV 5	Biometra
Kryostat	HM 560	Microm
Luminometer	Lumat LB 9507	Berthold
Luminometer	Microplate Reader 550	Biorad
Mikroskop	TMS	Nikon
Netzgerät	Sesatronic 500/500	Desaga
PAGE-Kammer	X Cell Sure Lock	Invitrogen
PCR-Maschine	Uno Thermoblock	Biometra
PCR-Maschine	Gene Amp 9600 Thermocycler	PerkinElmer
Phosphoimager	Fla-2.000	Fuji
Photometer	GeneQuant II	Pharmacia
Pipetten	P10, P20, P100. P1.000	Gilson
Schüttelinkubator	3033	GFL
Schüttelmischer	Vortex Genie 2	Bender
Schüttler	3011	GFL
Sequenzierer	ABI 377	Applied Biosystems
Stickstofftank	Apollo Biosafe	Messer-Greisheim
Szintillationsmesser	Topcount NXT microplate counter	Packard
Thermoblock	dri-Block DN 3A	Techne
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
UV-Fixationsgerät	Stratalinker 1.800	Stratagene
UV-Transluminator	Gel Doc 1.000	Biorad
Waage	BA 200	Sartorius
Waage	Analytic AC 120S	Sartorius
Wasserbad	MGW RC6	Lauda
Wasserbad	1083	GFL
Zellerntegerät	Filtermate 96 Harvester System	Packard
Zellinkubator	IG 150	Jouan
Zellkulturbank	antair BSK	Bioflow

Gerät	Modell	Hersteller
Zellkultur-Pipette	pipettus-akku	Hirschmann
Zentrifuge	1K15	Sigma
Zentrifuge	MiniFuge GL	Heraeus
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus

Tab. 2-10:

Auflistung verwendeter Geräte

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von RNA

2.2.1.1 Isolierung von RNA mittels Trizol

Zur Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebe wurde sich im Wesentlichen an die Anleitung des Herstellers des Trizol-Reagenz gehalten (Invitrogen).

Nach Kultivierung in 6-Loch-Schalen wurden adärent wachsende Zellen nach Entfernen des Mediums vom Boden der Kulturschale gelöst und in 750 µl Trizol resuspendiert. In flüssigem Stickstoff gelagertes Tumor- und Kontrollgewebematerial wurde mittels Kryostaten in 50 - 100 Schnitte á 10 µm geraspelt und ebenfalls in 750 µl Trizol-Reagenz resuspendiert. Nach Zugabe von 180 µl Chloroform wurden die Proben mehrmals invertiert und nach einer Inkubation von 3 min bei RT für 15 min bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Die RNA-haltige obere, wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 450 µl Isopropanol erneut zentrifugiert. Nach Abnahme des Isopropanols und Zugabe von 900 µl EtOH (70%) erfolgte eine dritte Zentrifugation. Nach Verwerfen des Überstands wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet, in 25 µl DEPC-H₂O resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Isolierung von RNA mittels RNeasy

Neben Trizol-Behandlung wurde zur RNA-Isolierung von in Zellkultur gehaltenen Zellen das RNeasy-Mini Kit (Qiagen) verwendet. Auch hier wurde sich an das vorgegebene Protokoll des Herstellers gehalten. Dabei wurden adärent wachsende Zellen nach Entfernen des Mediums vom Boden der Kulturschale gelöst, in 600 µl RLT-Puffer resuspendiert und homogenisiert. Nach Zugabe von 70% EtOH wurde die RNA auf RNeasy-Säulchen gegeben, mittels der Puffer RW1 und RPE gewaschen und anschließend in einem Volumen von 30 µl DEPC-H₂O eluiert. Die RNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.2.1.3 Aufreinigung von mRNA aus gesamtzellulärer RNA

Um PolyA⁺ mRNA aus gesamtzellulärer RNA zu isolieren, wurde das Oligotex mRNA Spin-Column Kit (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Bis zu 250 µg gesamtzellulärer RNA wurden mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 250 µl gebracht und mit 250 µl OBB-Puffer und 15 µl Oligotex-Suspension vermennt. Nach Inkubation und Zentrifugation wurde die an die Oligotexmoleküle gebundene mRNA durch Zentrifugation über Spin-Columns in 100 µl DEPC-H₂O eluiert.

2.2.2 Behandlung von RNA mit DNase I

RNA, die für die Synthese von cDNA und anschließender RT-PCR eingesetzt werden sollte, wurde einer DNase I-Behandlung unterzogen, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Dazu wurden 25 µl Trizol- bzw. RNeasy-isolierter RNA mit 3 µl 10x-DNase-Puffer, 1 µl DNase I (10 U/µl; Roche) und 1 µl RNasin (40 U/µl; Promega) für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung von Enzymen wurde anschließend eine weitere Trizol- bzw. RNeasy-Extraktion durchgeführt. Die RNA wurde in 30 µl DEPC-H₂O resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Synthese von cDNA / reverse Transkription

Durch Verwendung des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase kann RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

250-500 ng DNA-freie, gesamtzelluläre RNA wurden mit 1 µl Zufallsoligonukleotid (random hexamers; 50 ng/ml) durch Zugabe entsprechender Menge DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl gebracht, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach dem Protokoll des SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen) wurden 10x-PCR-Puffer, MgCl₂, dNTP-Mix, DTT und 0,5 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT schloss sich die 50-minütige cDNA-Synthese bei 42°C an. Eine Enzymaktivierung geschah durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C. Die cDNA wurde 1:5 bis 1:10 verdünnt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.4 Fällung von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Fällung von RNA

RNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen DEPC-behandeltem Ammoniumacetat (2 M, pH 4,0) und 2,5 Volumen EtOH abs. gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und wieder zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstands wurde das Sediment luftgetrocknet, in DEPC-H₂O resuspendiert und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Fällung von DNA

DNA wurde stets durch Zugabe von 1/10 Volumen Ammoniumacetat (2 M, pH 4,0) bzw. Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen EtOH abs. gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 12.000 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen und wieder zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstands wurde das Sediment luftgetrocknet, in ddH₂O resuspendiert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.5 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.5.1 Aufreinigung von RNA

Zur Aufreinigung von RNA wurde das RNeasy-Mini Kit (Qiagen) verwendet. Dabei wurde nicht mehr zu extrahierende RNA in einem Volumen von 600 µl DEPC-H₂O mit 600 µl 70% EtOH vermengt und wie oben beschrieben aufgereinigt (s. 2.2.1.2).

2.2.5.2 Aufreinigung von DNA

DNA wurde mittels High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei wurde die DNA in einem Volumen von 100 µl mit 500 µl Bindungspuffer vermengt und auf High Pure-Säulchen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer und Zentrifugation wurde die gereinigte DNA in 50 µl ddH₂O eluiert.

2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren haben aufgrund der aromatischen Ringsysteme ihrer Basen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm; Proteine aufgrund von aromatischen Aminosäureresten bei 280 nm. Der Quotient $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung proportional zum dekadischen Logarithmus der Extinktion (0-1) und entspricht bei 260 nm und einem Strahlengang von 1 cm einer Optische Dichte von 1 (OD1) von:

- 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (doppelsträngige DNA)
- 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (einzelssträngige DNA/RNA)
- 33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Oligonukleotide)

DNA- bzw. RNA-Proben wurden zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung 1:70 oder 1:35 in ddH₂O bzw. DEPC-H₂O verdünnt und anschließend photometrisch vermessen.

2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA

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 über-Nacht-Bakterienkultur isoliert (s. 2.2.13.2). 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 (s. 2.2.4.2) und in 50 μl ddH₂O resuspendiert.

2.2.8 Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren

2.2.8.1 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen doppelsträngige, palindromische DNA-Sequenzen und schneiden diese meistens innerhalb der für eine bestimmte Restriktase spezifischen Erkennungssequenz. Soweit nicht anders vermerkt wurden pro μg DNA jeweils zwei Enzymeinheiten Restriktionsendonuklease verwendet. Je nach Endvolumen zwischen 10 - 20 μl wurden 1 – 2 μl spezifischer 10x-Puffer eingesetzt und der Ansatz beim Temperaturoptimum (30°C - 37°C) für 2 h inkubiert. Nach Enzyminaktivierung durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C wurde der Ansatz aufgereinigt (s. 2.2.5.2) und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.8.2 Dephosphorylierung freier 5'-DNA-Enden

Um bei einer Subklonierung die Wahrscheinlichkeit einer Religation des linearisierten Vektorrückgrats zu minimieren, wurden die freien 5'-Phosphatgruppen unter Verwendung der alkalischen Phosphatase aus Krabben (SAP, 10 U/ μl ; NEB) entfernt. Zu einem hitzeinaktivierten Restriktionsansatz wurde 1/10 des Endvolumens Phosphatasepuffer (10x) und 1 μl SAP hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit ddH₂O aufgefüllt, für 30 min bei 37°C inkubiert, ein weiterer μl SAP hinzugegeben und weitere 30 min inkubiert. Nach darauf folgender Enzyminaktivierung für 15 min bei 70°C wurde der Ansatz aufgereinigt (s. 2.2.5.2) und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden freie DNA-Enden zusammengefügt. Diese kann in der Regel nur erfolgen, wenn die DNA-Enden kohäsiv - also kompatibel in Bezug auf die Überhänge - sind oder keine Überhänge existieren. Bei einer Fragmentklonierung in einen Vektor wurde die Ligation in einem Molekülverhältnis von 3:1 durchgeführt. Soweit nicht anders erwähnt wurde in einem 10 - 20 μl Ligationsansatz 1/10 des Endvolumens 10x-Ligationspuffer und

1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl; MBI Fermentas) verwendet. Inkubiert wurde bei 16°C über Nacht.

2.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Mullis and Faloona, 1987) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung ausgewählter DNA-Sequenzen. Dabei verwendet man kurze, einzelsträngige Oligonukleotide (Primer), deren Sequenzen komplementär zu den flankierenden Bereichen des zu amplifizierenden Abschnitts sind. Nach Denaturierung der DNA bei 94°C können bei einer für jede PCR spezifischen Temperatur die zueinander entgegengesetzt orientierten Primer (*forward* primer; *reverse* primer) an die einzelsträngige DNA binden (Annealing). Dazu kann nach einer Faustregel die Schmelztemperatur T_M des Primer/Matrizen-Hybrids bestimmt werden: $T_M = [4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl C+G})] + [2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl A+T})]$. Die Annealing-Temperatur liegt allgemein 5°C unterhalb der Schmelztemperatur T_M . In dem darauf folgenden Syntheseschritt bei 72°C (Extension) werden die 3'-Enden der Primer durch die hitzestabile DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verlängert. Die so entstandenen DNA-Doppelstränge bestehen nun aus einem Strang der Ausgangs-DNA und einem neu synthetisierten Strang. Das Resultat der häufigen Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Extension ist die selektive Vervielfältigung eines durch die Primer begrenzten DNA-Abschnittes und wird umrahmt von einer initialen Denaturierung von 5 min bei 94°C und einer abschließenden Extension von 10 min bei 72°C.

Komponenten für einen 1-fachen PCR-Reaktionsansatz:

1,0 µl	200 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	(Invitrogen)
1,0 µl	10x PCR-Puffer	(Invitrogen)
0,2-0,4 µl	50 mM MgCl ₂ (für 1,0-2,0 mM)	(Invitrogen)
0,5 µl	<i>forward</i> primer (10 pmol/µl)	(MWG)
0,5 µl	<i>reverse</i> primer (10 pmol/µl)	(MWG)
0,05 µl	0,025 u Taq-Polymerase	(Invitrogen)
1,0 µl	DNA (10-50 ng)	
evtl.	DMSO 10% (v/v)	(Sigma)
ad 10µl mit ddH ₂ O		

typisches PCR-Basis-Programm:

1	Denaturierung	initial	5 min	
2	Denaturierung	zyklisch	30 s	
3	Annealing	zyklisch	40 s	
4	Extension	zyklisch	40 s	Schritt 2 - 4: 40 Zyklen
5	Extension	final	10 min	

Die für jedes Primerpaar individuell optimierten Bedingungen wie MgCl₂-Konzentration, Annealing-Temperatur, Zykluszeiten und Zyklusanzahl, sowie die evtl. Zugabe von DMSO sind - falls vom Basis-Programm abweichend - in den entsprechenden Abschnitten vermerkt.

2.2.10 Größenfraktionierung von Nukleinsäuren

Da Nukleinsäuren aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld wandern, kann man gelelektrophoretische Verfahren zur Größenauftrennung von DNA und RNA nutzen.

2.2.10.1 Agarose-Gelelektrophorese doppelsträngiger DNA

Um PCR-Produkte oder mit Restriktionsenzymen verdaute DNA gelelektrophoretisch aufzutrennen, wurden 1- bis 2-%ige Agarose-Gele hergestellt. Dazu wurde Agarose abgewogen, in 1x TBE gelöst und aufgekocht. Vor Aushärtung des Gels wurden 1,5 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) pro 100 ml zugesetzt. Die aufzutrennende DNA wurde 1:5 mit Agarosegel-Ladepuffer verdünnt und gemeinsam mit einem Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese bei maximal 200 V für mindestens 10 min wurden die aufgetrennten Fragmente aufgrund der Interkalation des Ethidiumbromids mit der DNA mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

Agarosegel-Ladepuffer (4x):

15% (w/v)	Ficoll Typ 400	(Sigma)
0,25% (w/v)	Bromphenolblau	(Sigma)
0,25% (w/v)	Xylencyanol	(Merck)

Ethidiumbromid-Stammlösung:

1 mg/ml gelöst in ddH₂O

2.2.10.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA

Im Gegensatz zur Agarose-Gelelektrophorese liefert die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) eine feinere Auftrennung von DNA-Sequenzen. Daher wird sie für DNA-Sequenzierungen oder für die Analyse Fluoreszenz-markierter PCR-Produkte herangezogen.

6%-iger Gelgemisch (100 ml):

36 g Harnstoff
20 ml 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid (29:1; Invitrogen)
12 ml 10x TBE
39 ml ddH₂O

Pro 10 ml Gelansatz wird zur Polymerisation 90 µl 20%-iges APS und 10 µl TEMED hinzugegeben.

Probe-Ladepuffer (50 ml):

10 ml 25mM EDTA
40 ml 98%-iges Formamid
1 Spatelspitze Dextran-Blau

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) beruht auf der Tatsache, dass einzelsträngige DNA mit Hilfe eines sequenzspezifischen Primers in komplementäre DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge umgeschrieben werden kann. Dabei dienen den normalen Nukleotiden zugesetzte 2',3'-Dideoxynukleotide (ddATP, ddCTP,

ddGTP, ddTTP) als Terminatoren, die mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind. Durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe der Ribose der ddNTPs kommt es bei deren Einbau zum Abbruch der Kettenverlängerung. Auf Grund des Überschusses an dNTPs entstehen Fragmente jedweder Länge, die am Ende ein Fluoreszenz-markiertes Terminator-ddNTP tragen.

Neben einem sequenzspezifischen Primer wurden 10 - 100 ng DNA und 2 µl PRISM Big Dye Terminator RR Mix (Applied Biosystems) pro Ansatz eingesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte auf dem Gene Amp 9600 Thermocycler. Anschließend wurde der Ansatz aufgereinigt (s. 2.2.5.2) und in 4 µl Probe-Ladepuffer aufgenommen. Nach kurzer Denaturierung bei 90°C wurde die Probe auf ein 6%-iges PAGE-Gel auf den semi-automatischen Sequenzierer 377 geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 2.500 V, 40 mA und 30 W für 8-10 h. Die Sequenz wurde mit Hilfe der Programme „Data Collection“ (Version 1.2.0) und „Data Analysis“ (Version D1.7.1) analysiert und mit dem „Sequence Editor 1.0.3“ ausgewertet (Applied Biosystems).

Reaktionsansatz:

1-4 µl DNA (10-100 ng)
 2 µl Primer (1 pmol/µl)
 2 µl Big Dye Terminator RR Mix
 ad 10 µl mit ddH₂O

Sequenzierreaktion:

1	5 min	96°C	initial	
2	10 sec	96°C	zyklisch	
3	5 sec	50°C	zyklisch	
4	3,5 min	60°C	zyklisch	Schritt 2 - 4: 25 Zyklen

2.2.12 Kompetitive RT-PCR (cRT-PCR) zur Quantifizierung von Transkripten

Die cRT-PCR ist ein sensitives Verfahren zur Analyse des Expressionsstatus eines Zielgens in einem großen Probenkollektiv. Bei der cRT-PCR werden exogene, Sequenz-spezifische Kompetitor-RNA-Moleküle verwendet. Der Kompetitor besitzt dieselbe Sequenz wie das entsprechende Zielgen, weist aber eine interne Deletion von ca. 10% auf, so dass dieser durch

den Größenunterschied bei gelelektrophoretischer Auftrennung vom Zieltranskript unterschieden werden kann. Als Ausgangspunkt zur Herstellung eines Kompetitors dient ein PCR-Produkt des zu untersuchenden Gens. In einer einzigen PCR werden die Deletion mittels Mutagenese-Primer und die Addition einer T7-Promotorsequenz mittels Primer mit entsprechendem Überhang generiert. Durch anschließende *in vitro*-Transkription entsteht das Kompetitor-RNA-Molekül, welches in verschiedenen, in Vorexperimenten genau titrierten Konzentrationen zur Zielgen-RNA zugegeben wird. In der darauf folgenden reversen Transkription wird der Kompetitor mit derselben Effizienz wie die Zielgen-RNA transkribiert und in der anschließenden PCR unter gleichen Bedingungen und mit denselben, Fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert. Durch die Analyse der Relation *Produkte aus Zielgen-RNA / Produkte aus Kompetitor-RNA* kann eine zuverlässige Aussage über die mRNA-Menge des Zielgens gemacht werden (Waha et al., 1998).

2.2.12.1 Herstellung exogener Kompetitor-RNA-Moleküle

Zur Generierung exogener Kompetitoren wurde ein Pool verschiedener cDNAs verwendet. Für Expressionsversuche in Tumoren wurde dafür ein cDNA-Gemisch von Tumoren und/oder Normalgewebe verwendet; für weitere Experimente im Maus-Modell wurde ein Gemisch verschiedener cerebellärer Entwicklungsstufen bzw. unterschiedlich behandelte Körnerzellvorläufer herangezogen. Zielfragmente wurden mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte aus Agarosegelen ausgeschnitten. Ca. 10 ng wurden als Matrize in die entsprechende Mutagenese-PCR eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurde unter Verwendung eines reversen Mutagenese-Primers und eines *forward*-T7-Promotor-Primers ein PCR-Produkt mit einer internen Deletion von ca. 10-20 bp und einer zusätzlichen T7-Promotorsequenz amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Überprüfung von 5 µl des Produkts wurde das Restvolumen aufgereinigt (s. 2.2.5.2) und in 30 µl DEPC-H₂O eluiert. Die Bedingungen der Ausgangs-PCR und der Mutagenese-PCR waren stets die gleichen und sind in Tabelle 2-2 vermerkt. Das Prinzip der Mutagenese und T7-Promotor-Addition ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

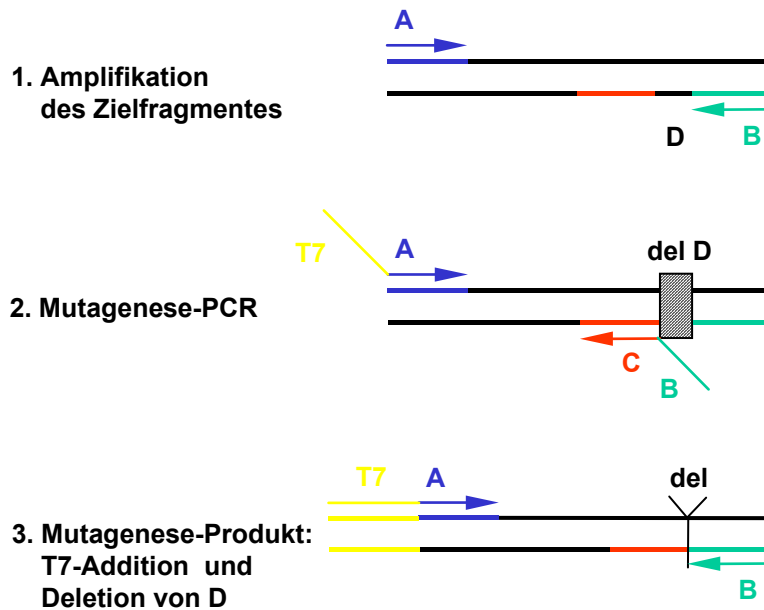


Abb. 2-1:

Prinzip der Mutagenese und T7-Promotor-Addition zur Synthese externer RNA-Kompetitor-Moleküle

A: Sequenz des *forward*-Primers; B: Sequenz des *reverse*-Primers; D: Sequenz des zu deletierenden Bereichs; T7 A: Sequenz des *forward*-Primers plus Sequenz des T7-Promotors; C B: Sequenz des *reverse*-Primers plus Sequenz eines internen, vor D gelegenen Bereichs; del: deletierter Bereich

Zur Generierung von RNA-Kompetitor-Molekülen wurde eine *in vitro*-Transkription in einem Volumen von 20 μl mit ca. 0,5 μg mutierter Template-cDNA und 1 μl T7-RNA-Polymerase (20 U/ μl ; Invitrogen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers (T7 Transcription Kit; MBI Fermentas) durchgeführt. Im Anschluss wurde die RNA einer DNase I-Behandlung unterzogen (s. 2.2.2) und aufgereinigt (s. 2.2.5.1). Die RNA wurde in 30 μl DEPC- H_2O gelöst, und die Konzentration der synthetisierten Kompetitoren wurde mittels Spektrophotometrie (s. 2.2.6) bestimmt.

2.2.12.2 cRT-PCR

Zur Bestimmung der Quantität von Zielgenen wurde zunächst eine serielle Verdünnungsreihe der jeweiligen RNA-Kompetitoren von 500 $\text{pg}/\mu\text{l}$ bis 2 $\text{fg}/\mu\text{l}$ durchgeführt. Ein Pool einer jeden Verdünnung wurde dann mit 250 ng gesamtzellulärer RNA revers transkribiert. In der anschließenden PCR mit Fluoreszenz-markierten Primern wurde der Punkt der optimalen Titration festgestellt. Die Bedingungen der PCR sind gleich denen der Ausgangs-PCR und der

Mutagenese-PCR (Tab. 2-2). Diejenige Verdünnung des Kompetitors wurde als optimal bewertet, bei der sich nach RT und kompetitiver PCR die Produkte des Kompetitors und des Zielgens quantitativ entsprachen (Abb. 2-2). Nach diesem Vorversuch wurde für alle zu analysierenden Gene die jeweiligen RNA-Kompetitoren in der optimalen Konzentration bzw. in den Titrationspunkt umrahmende Konzentrationen in eine neue serielle Verdünnungsreihe eingesetzt. RT und anschließende kompetitive PCR erfolgte wie oben beschrieben. 1 µl aus der PCR wurde 1:10 mit Ladepuffer verdünnt, bei 94°C für 5 min denaturiert, sofort auf Eis gestellt und auf ein 6%-iges PAGE-Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte erfolgte auf dem semi-automatischen Sequenzierer ABI377 bei 1.500 V, 40 mA und 40 W. Mittels entsprechender Software („Genescan collection“ und „Genescan analysis“, Version 1.2.1, Applied Biosystems) wurden die PCR-Produkte quantitativ bestimmt.

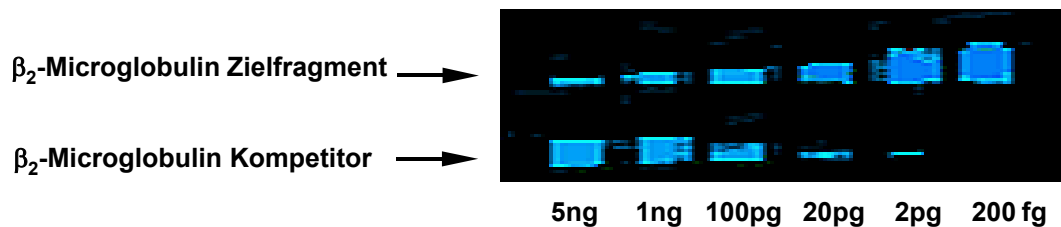


Abb. 2-2:

Titration von exogenem RNA-Kompetitor mit gepoolter zellulärer RNA.

Hier ist beispielhaft die Titration des *beta2-Microglobulin*-Gens gezeigt. Es wurde diejenige Verdünnung als optimal bewertet, bei der der Wert des Quotienten Zielfragment-Produkt / Kompetitor-Produkt etwa gleich eins war.

Um auszuschließen, dass Fluktuationen der eingesetzten zellulären RNA zu fehlerhafter Messung von Transkripten führen, wurde der jeweilige Quotient durch den entsprechenden Quotienten eines Haushaltsgens dividiert. Dies geschieht unter der Prämisse, dass ein Haushaltsgen eine nahezu konstante Expression in unterschiedlichen Proben aufweist. Die Expressionswerte wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\left(\frac{\text{Zielgen}_{\text{Probe}}}{\text{Zielgen}_{\text{Kompetitor}}} \right) / \left(\frac{\text{Haushaltsgen}_{\text{Probe}}}{\text{Haushaltsgen}_{\text{Kompetitor}}} \right)$$

2.2.13 Methoden der Bakterienkultur

2.2.13.1 Herstellung chemisch-transformationskompetenter Bakterien

Das Aufnehmen von Fremd-DNA durch Bakterien wird als Transformation bezeichnet, wobei der genaue Mechanismus dieses Vorganges noch ungeklärt ist. Durch besondere Behandlung nach Hanahan (Hanahan, 1983) kann die Transformationseffizienz von *E.coli*-Bakterien um ein Vielfaches gesteigert werden, so dass man mittels Transformation in der Lage ist, Plasmid-DNA beliebig zu vermehren. Die behandelten Bakterien werden als transformationskompetent bezeichnet.

Eine einzelne *E.coli*-Bakterienkolonie wurde in 2,5 ml LB2Y-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator kultiviert. 5 µl dieser über Nacht-Kultur wurden in 5 ml LB2Y-Medium inokuliert und durch 1,5 - 3,5 h Inkubation bei 37°C in die exponentielle Phase des Wachstums gebracht ($OD_{600nm} = 0,8$). Diese Vorkultur wurde zu 50 ml vorgewärmtem LB2Y-Medium pipettiert und bis zu einer OD_{600nm} von 0,3 bis 0,4 im Schüttelinkubator bei 37°C herangewachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gestellt und nach 5 min zentrifugiert (10 min, 5.000 g, 4°C). Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühllabor, mit vorgekühlten Lösungen und auf Eis bei 4°C durchgeführt. Nach Abnehmen des Überstands wurde das Bakterien-Pellet in 25 ml 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (5 min, 5.000 g, 4 °C). Die sedimentierten Bakterien wurden in 2 ml 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert, in 100 - 200 µl Aliquots in vorgekühlte 1,5 ml Schraubdeckelgefäße gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.13.2 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

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 µg/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 über Nacht-Kultivierung zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendet (s. 2.2.7).

TEN-Puffer:

20 mM	Tris-HCl pH7,5
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 ddH₂O auffüllen
20 min autoklavieren

LB2Y-Nährböden (pH 7,4):

zu LB2Y-Medium 1,5 % (w/v) Agar, autoklavieren, bei Bedarf Zugabe von Antibiotika, Nährböden in 10 cm-Kulturschalen gießen, Lagerung bei 4°C

Ampicillin-Stammlösung:

100mg/ml in ddH₂O lösen, mit NaOH neutralisieren und sterilfiltrieren, Aliquots bei -20°C lagern, für Verwendung in Selektionsmedium 1:1000 verdünnen

Kanamycin-Stammlösung:

10 mg/ml in ddH₂O lösen, sterilfiltrieren, Aliquots bei -20°C lagern, für Verwendung in Selektionsmedium 1:100 verdünnen

IPTG:

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

X-Gal:

1,5 ml 2%-iges (w/v) X-Gal zu 100 ml LB2Y-Nährboden geben

2.2.13.3 Transformation elektro-kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Neben der Transformation chemisch-kompetenter Bakterien wurden elektro-kompetente Bakterien mittels Elektroporation transformiert. Bei dieser Methode werden Zellen in ein elektrisches Feld gebracht und Pulsen hoher Feldstärke (12.500 Vcm^{-1}) ausgesetzt. Durch kurzzeitiges Entstehen von Poren in der Plasmamembran kann DNA in die Zelle eindringen. Zur Durchführung wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) verwendet. Hier wurden nach Angaben des Herstellers PCR-Produkte direkt in linearisierte Vektoren subkloniert und in elektro-kompetente Bakterien elektroporiert. Bei dieser Methode ist eine Klonierung über erzeugte Schnittstellen unnötig. Mittels Taq-Polymerase erzeugte PCR-Produkte haben einen einzelnen A-Überhang am 3'-Ende, der ausreicht, um die Subklonierung in einen linearisierten Vektor mit einzelner T-Überhang (pCRII-TOPO) am 3'-Ende zu erleichtern. 2 µl einer TOPO-Klonierungsreaktion wurden in elektro-kompetente Bakterien (TOP10 Electrocomp *E. coli*) pipettiert und elektroporiert.

2.2.14 Zellkulturtechniken

Es wurden sowohl Primärkulturen als auch Zelllinien verwendet (Tab. 2-6). Alle Zellen wurden in entsprechenden Medien in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

2.2.14.1 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Zum Auftauen wurden die in flüssigem Stickstoff in Einfrierröhrchen gelagerten Zellen im 37°C-Wasserbad erwärmt und anschließend in 10 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert. Durch dreimaliges Zentrifugieren bei 1.000 g für 5 min und Resuspendieren in entsprechendem Medium wurden die Zellen gewaschen und danach in Zellkulturschalen

ausgesät. Zum Einfrieren wurden die Zellen vereinzelt (s. 2.2.14.2), sedimentiert (10 min, 1.000 g), in 0,5 ml Medium resuspendiert und in Einfrierröhrchen mit vorgelegten 0,5 ml 20%-igem (v/v) DMSO vermennt. Die Zellen wurden für 1 h bei -20°C in einem Kühlaggregat für Einfrierröhrchen (Cryo 1°C Freezing Container; Nalgene) gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.14.2 Passagieren von adhärennt wachsenden Zelllinien

Nach vollständiger Abnahme des Mediums wurde zur Entfernung aller Medienreste und toter Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 2-3 ml Trypsinlösung (Trypsin EDTA 1X in HBSS; Invitrogen) wurden adhärennt wachsende Zellen vom Zellkulturboden abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe entsprechender Menge Medium abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt, durch Zentrifugation sedimentiert (10 min, 1.000 g) und durch Resuspendieren in einem adäquaten Volumen frischen Mediums neu ausgesät.

2.2.14.3 Transfektion von Zelllinien

Die Lipofektion ist eine Methode, um eukaryontische Zellen mit DNA zu transfizieren. Dafür wurden 100 μl serum-freies Medium vorgelegt und mit 3-6 μl FuGene 6 Reagenz (Roche) vermennt. Anschließend wurden 1-2 μg DNA hinzugegeben und bei RT für 15 min inkubiert. Danach wurde das Gemisch auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert.

2.2.14.4 Präparation cerebellärer Körnerzellvorläufer der Maus

Zur Herstellung von Primärkulturen dissoziierter Körnerzellvorläufer aus dem Kleinhirn der Maus wurden Tiere der F1-Generation aus Verpaarungen von C57BL/6BOM Weibchen mit CH3 Männchen bzw. *sox18* $^{-/-}$ -Tiere von Herrn Prof. Dr. Koopman, University of Queensland, Brisbane, Australien verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurden die Kleinhirne von Tieren eines Alters in Hank's Medium präpariert und von den Meningen befreit. Anschließend wurde das Gewebe in Trypsin für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Abstoppen durch einen Trypsin-Inhibitor wurden die Zellen der Gewebsfragmente durch

mehrmaliges Pipettieren durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 250 μm vereinzelt. Die so dissoziierten Zellen wurden durch Zentrifugation (7 min, 1.000 g) sedimentiert und anschließend in Neurobasal-Medium/B27 plus 1x Glutamat (10 μl 100x; 2 mg/ml; auf 1 ml Medium) aufgenommen. Soweit nicht anders vermerkt wurden die Zellen nach Zellzahlbestimmung in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml Medium auf mit Poly-D-Lysin (Sigma) beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Je nach Versuchsansatz geschah dies in 6-, 24-, oder 96-Loch-Schalen.

2.2.14.5 Stimulation von Primärkulturen cerebellärer Körnerzellvorläufer der Maus

Falls nicht anders vermerkt, wurden die cerebellären Körnerzellvorläufer direkt im Anschluss der Präparation für 7 h in An- bzw. Abwesenheit von rekombinantem Sonic Hedgehog-Protein (1,25 $\mu\text{g/ml}$; R+D Systems) in 6-Loch-Schalen bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt kultiviert.

2.2.14.6 ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von GCPs unter Beeinflussung verschiedener Stoffe wurde ein ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay durchgeführt. Dabei wurden GCPs in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Loch in 96-Loch-Platten ausgesät. Nach 12 h Kultivierung wurden 12,5 μl Medium-verdünntes ^3H -Thymidin (Methyl- ^3H -Thymidin, 3 $\mu\text{Ci/ml}$; Amersham) hinzugegeben. Nach insgesamt 48 h Kultivierung wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellerntegeräts (Filtermate 196 Harvester System; Packard) auf eine Membran übertragen und die Inkorporationsrate mittels Szintillationsmessung bestimmt (Topcount NXT microplate scintillation and luminescence counter; Topcount NXT software version 1.6).

2.2.14.7 Dual-Luciferase-Assay

Zur Untersuchung der Funktionalität von subklonierten, potentiellen Promotorbereichen wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) verwendet. Dabei wird die Menge der beiden fluoreszierenden Proteine Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase

luminometrisch bestimmt. Zelllinien wurden in 24-Loch-Schalen kultiviert und mittels Lipofektion (s. 2.2.14.3) mit Expressions- und Reporterplasmiden transfiziert. Nach Protokoll des Herstellers wurden die Zellen bei Kulturrende nach Entfernung des Mediums durch Zugabe des Lysispuffers PLB aufgeschlossen. Nach Zentrifugation befanden sich die gelösten Proteine im Überstand. In einem semi-automatischen Luminometer wurden zu je 10 µl Überstand 50 µl LARII-Puffer zur Fluoreszenzanregung der Firefly-Luciferase gegeben. Nach Vermessung der Fluoreszenz wurde diese durch Zugabe von 50 µl Stop&Glo-Puffer gequencht und die Fluoreszenz der Renilla-Luciferase angeregt. Dadurch konnte in einer Probe die jeweilige Menge der beiden Reporterproteine vermessen werden.

2.2.15 DNA Microarray-Hybridisierung

DNA Microarray-Hybridisierung ist eine Methode, um die Expression zahlreicher Gene simultan zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsexperimente geschahen in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Jörn Krätzschar und Frau Dr. Annette Sommer (Corporate Research, Schering AG, Berlin). Durch Verwendung eines modifizierten oligo-dT Primers mit einer T7-RNA-Polymerase-Promotorsequenz wurden jeweils 10 µg gesamtzellulärer RNA in cDNA umgeschrieben (Superscript Choice system for cDNA synthesis; Invitrogen). Die anschließende *in vitro*-Transkription erfolgte in Anwesenheit eines dNTP-Mixes, bestehend aus dATP, dCTP, dGTP, Biotin-11-dCTP und Biotin-16-dUTP (ENZO Diagnostics). Nach Aufreinigung (s. 2.2.5.1) wurden 20 µg cRNA durch Zugabe von Fragmentierungs-Puffer (40 mM TrisAc, pH 8,1; 100 mM KAc, 30 mM MgAc) bei 94°C für 30 min fragmentiert. Darauf folgend wurden der aus Set A und B bestehende DNA Chip Mu74Av2 (Affymetrix) nach dem Protokoll des Herstellers mit der markierten RNA hybridisiert, gewaschen und gefärbt. Jede Chip-Hybridisierung wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten Proben wurden mittels konfokalen Scanners (Affymetrix) bestimmt. Jedes Transkript ist durch bis zu 16 verschiedene Sequenzen auf einem Chip repräsentiert, wobei die verwendeten Oligonukleotidsequenzen in so genannte *perfect matches* (PM) und *mismatches* (MM) unterschieden werden. MM beinhalten einen Basenaustausch und differieren somit in der Wahrscheinlichkeit, eine cRNA-Probe zu binden. Die An- bzw. Abwesenheit individueller mRNA wurde über einen Wilcoxon Rank-Test definiert, der die Verteilung zwischen PM und MM berücksichtigt.

2.2.16 Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH)

Durch die Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH) können differentiell exprimierte Transkripte unterschiedlicher RNA-Populationen auch auf niedrigem Expressionsniveau identifiziert werden (Diatchenko et al., 1996).

Dazu wurde zunächst die gesamtzelluläre RNA von Shh-behandelten sowie unbehandelten GCPs nach 7 h Kultivierung mittels Trizol-Behandlung (s. 2.2.1.1) extrahiert. Je 2 µg mRNA, die durch Aufreinigung der gesamtzellulären RNA (s. 2.2.1.3) gewonnen wurden, dienten als Ausgangsmaterial für die SSH. Die einzelnen Schritte der SSH sind als Flussdiagramm in Abb. 2-3 dargestellt. Unter Verwendung des PCR-Select cDNA Sustraction Kit (Clontech) wurden nach Angaben des Herstellers die mRNA-Populationen in cDNA umgeschrieben. In einer sogenannten *forward subtraction*, in der durch Shh induzierte Zielgene identifiziert werden sollten, wurde die cDNA-Population von Shh-behandelten Zellen als *Tester* cDNA bezeichnet, während die cDNA-Population aus unbehandelten Zellen als *Driver* cDNA bezeichnet wurde. Bei einer *reverse subtraction* ist die Nomenklatur umgekehrt. *Tester* und *Driver* cDNA wurden mit dem Restriktionsenzym RsaI geschnitten, welches glatte Enden generiert. Anschließend wurde die *Tester* cDNA-Population in zwei gleiche Subportionen unterteilt. Die erste wurde am 5'-Ende mit dem Adaptor 1 ligiert; die zweite mit dem Adaptor 2R. Nach initialer Denaturierung bei 98°C wurde anschließend jede Portion separat mit *Driver* cDNA für 8 h bei 68°C hybridisiert, wobei sich komplementäre Sequenzen aneinander lagerten (Moleküle des Typs b, c und d). In der sich direkt anschließenden zweiten Hybridisierung wurden beide Inkubationsansätze ohne weitere Denaturierung vermischt, in der sich differentiell exprimierte Transkripte aneinanderlagerten (Moleküle des Typs e). Diese Hybride weisen unterschiedliche Adaptorsequenzen an ihren Enden auf und wurden in der darauf folgenden PCR im Gegensatz zu den anderen Hybriden exponentiell amplifiziert. Die so angereicherten, differentiell exprimierten Transkripte wurden anschließend mittels TOPO TA Cloning Kit in linearisierte Vektoren subkloniert und in elektro-kompetente Bakterien per Elektroporation transformiert (s. 2.2.13.3). Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin und X-Gal kultiviert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnten Klone mit inseriertem cDNA-Fragment durch eine Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden.

2.2.17 Überprüfung differentiell exprimierter Klone mittels Dot Blot

Unter Verwendung des PCR-Select Differential Screening Kit (Clontech) wurden 382 zufällig ausgewählte weiße Bakterienklone in je 100 µl LB-Medium für 5 h bei 37°C angezogen und die Bakteriensuspension in eine PCR mit Adaptor-komplementären Primern - nach Angaben des Herstellers - eingesetzt (*nested* primer1: 5'-tcgagcggccgcccgggcaggt-3'; *nested* primer 2R: 5'-agcgtggtcgcggccgaggt-3'). Jeweils 5 µl PCR-Produkt wurde durch Zugabe von 5 µl 0,6 N NaOH denaturiert, auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺; Amersham) übertragen und nach Neutralisierung mit Tris-HCl pH 7,5 durch UV-Bestrahlung fixiert. Die so generierte cDNA-Bibliothek wurde anschließend mit radioaktiv-markierten Sonden hybridisiert. Dabei wurde die durch Hybridisierung angereicherte *Tester* cDNA der *forward subtraction* als *forward subtracted* bezeichnet, die Ausgangs-cDNA von Shh-behandelten Zellen als *forward unsubtractet*, die durch Hybridisierung angereicherte *Tester* cDNA der *reverse subtraction* als *reverse subtracted* und die Ausgangs-cDNA Shh-unbehandelter Zellen als *reverse unsubtractet*. Die Radioisotopen-Markierung geschah unter Verwendung des Ready-to-go DNA Labelling Beads Kit (Amersham) und [α -³²P]-dCTP (50 µCi; 3.000 Ci/mmol; 18,5 MBq; Amersham) nach Angaben des Herstellers. Uninkorporiertes [α -³²P]-dCTP wurde durch Zentrifugation mittels G-50-Sephadex-Säulen (Roche) entfernt. Nach Denaturierung der Sonden bei 50°C für 2 min erfolgte die Hybridisierung unter Verwendung des Express-Hyb-Puffers (Clontech) nach Protokoll des Herstellers für 1 h bei 68°C. Nach zwei 30-minütigen Waschschritten mit niederstringenter Waschlösung (2x SSC, 1% SDS) bei RT und zwei 30-minütigen Waschschritten mit hochstringenter Waschlösung (0,1x SSC, 0,5% SDS) bei 50°C wurden die Membranen mit einem Phosphoscreen (Fuji) in einer Kassette über Nacht exprimiert und das Autoradiogramm in einem Phosphoimager (Fla-2000; Fuji) visualisiert.

2.2.18 RNA *in situ* Hybridisierung

RNA *in situ* Hybridisierung ist ein Verfahren, um die Expression von Transkripten in Geweben darzustellen.

Dazu wurde zunächst eine 475 bp lange Sequenz des *sox18*-Gens der Maus mittels PCR amplifiziert. Zur Generierung einer so genannten *sense*-Probe wurde ein *forward*-Primer mit zusätzlicher Promotersequenz für die T3-RNA-Polymerase (unterstrichen) (5'-AATTAACCCTCATCACTAAAGGGACTCGCAGGTCTCTACT-ATG-3') verwendet. Zur Generierung einer *antisense*-Probe diente ein *reverse*-Primer mit zusätzlicher

Promotersequenz für die T7-RNA-Polymerase (unterstrichen) (5'-GGATCCTAATACGACTCACGAGGTGTGTAATGAGGAGG-3'). Die PCR erfolgte bei einer Annealing-Temperatur von 52°C in Anwesenheit von 10% DMSO und 1,5 mM MgCl₂. Nach Aufreinigung (s. 2.2.5.2) wurde das PCR-Produkt sequenziert (s. 2.2.11), um während der Amplifikation aufgetretene Mutationen auszuschließen. Anschließend wurden zur Generierung von cRNA je 200 ng PCR-Produkt in einen DIG-RNA labeling Mix (Roche) nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Nach Aufreinigung (s. 2.2.5.1) wurde die DIG-markierte cRNA in 25 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Kryoschnitte muriner Kleinhirne von Tieren der postnatalen Tage P3, P5 und P8 wurden auf Miniatur-Glasobjektträger gebracht und nach 5-minütiger Fixierung in 4%-igem Paraformaldehyd in PBT zweimal in PBT gewaschen. Anschließend wurden sie in 0,2%-igem Paraformaldehyd in PBT für 10 min fixiert und erneut gewaschen. Nach einer Inkubation in einem 1:1 Mix aus PBT und Hybridisierungspuffer und darauf folgender Inkubation in Hybridisierungspuffer allein für jeweils 5 min schloss sich eine Prähybridisierung für 1 h in 900 µl Hybridisierungspuffer bei 70°C an. 0,5 µg einer denaturierten DIG-markierten cRNA Sonde wurde mit 100 µl Hybridisierungspuffer vermischt und zusammen mit den vorbehandelten Schnitten bei 70°C inkubiert. Ungebundene cRNA wurde durch erneutes Waschen mit vorgewärmtem Hybridisierungspuffer und anschließend mit einem 1:1 Mix aus Hybridisierungspuffer und MABT entfernt. Zweimaligem Waschen mit MABT für 30 min folgte eine Inkubation in MABT plus 2% Boehringer Blocking Reagenz (BBR; Roche) und eine Inkubation in MABT/BBR plus 20% hitzeinaktiviertem Ziegen Serum für 1 h. Nach einer über Nacht-Inkubation bei 4°C mit anti-DIG-Alkalische-Phosphatase-Antikörper (Roche; Verdünnung: 1:2.000 in MABT/BBR plus 20% hitzeinaktiviertem Ziegen Serum) wurde ungebundener Antikörper durch 7-maliges Waschen in MABT für je 1 h entfernt. Nach 4-maligem Waschen in NTMT wurden die Schnitte im Dunkeln mit BM-purpel Lösung (Roche) bis zu 3 Tagen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PBS abgestoppt, die gefärbten Schnitte in Kaiser's Glycerolgelatine (Merck) eingedeckelt, mikroskopiert und photodokumentiert.

MABT:

100 mM	Maleat
150 mM	NaCl
0,1% (v/v)	Tween 20

PBT:

PBS plus 0,1% (v/v) Tween 20

Hybridisierungspuffer:

25 ml	Formamid
3,5 ml	20x SSC
50 µl	0,5 M EDTA
250 µl	tRNA (10 mg/ml)
100 µl	Tween 20
2,5 ml	Chaps (10%)
50 µl	Heparin (50 mg/ml)
18,6 ml	DEPC-H ₂ O

NTMT:

100 mM	Tris-Base pH 9,5
100 mM	NaCl
50 mM	MgCl ₂
2 mM	Levamisol
0,1% (v/v)	Tween 20

2.2.19 Isolation von Proteinen

Zur Proteinextraktion aus Primärkulturen wurden die in 6-Loch-Schalen adhärent wachsenden Zellen vom Boden der Kulturschale gelöst und im Medium zentrifugiert (5.000 g, 10 min). Das Pellet wurde zweimal in PBS gewaschen und nach weiterer Zentrifugation in 900 µl eiskaltem Lysis-Puffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert (10.000 g, 15 min, 4°C). Der proteinhaltige Überstand wurde á 20 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Lysis-Puffer:

50 mM	TrisBase pH 8,0
120 mM	NaCl
0,5% (v/v)	NP-40 Detergenz
1mM	PMSF
1µg/ml	Aprotinin

2.2.20 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford beruht auf der Änderung der Absorption der sauren Coomassie Brilliant Blue G-250-Lösung (Biorad) bei Bindung an Proteine.

Zur Bestimmung wurden jeweils 50 µl eines 1:5 und 1:10 verdünnten Proteinlysats mit 25 µl Teilreagenz A und 200 µl Teilreagenz B der Farblösung für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion photometrisch bestimmt. Durch Erstellen einer Eichgerade (Extinktion gegen Konzentration) einer definierten Proteinmenge eines Standards (Bovine Gamma Plasma Globuline Standard, Biorad) konnte nach Messung der Proben die jeweilige Proteinkonzentration errechnet werden.

2.2.21 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Wie bei der Elektrophorese von Nukleinsäuren werden Proteine durch Bewegung im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch Anwesenheit des Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) wird die Eigenladung der Proteine vernachlässigbar, und es erfolgt eine Auftrennung nach dem jeweiligen Molekulargewicht. Unter Verwendung des NuPage Kit (Invitrogen) wurden Proteinlysate mit NuPage LDS-Ladepuffer vermenget, bei 70°C für 10 min denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und auf Gradienten-SDS-Polyacrylamidgele (4-12%) geladen. Die Elektrophorese geschah bei 200 V für 40 min.

2.2.22 Western Blot

Der Western Blot ermöglicht den immunologischen Nachweis von Proteinen.

Dafür wurden nach SDS-PAGE die nach Größe aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer bei 30 V für 1 h auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺; Amersham) übertragen. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierungslösung für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert.

Blockierungslösung:

10% (w/v) Milchpulver in TBS

0,05% (v/v) Tween-20

2.2.23 Immunfärbung des Western Blot

Bei der Immunfärbung wird nach Zugabe eines Protein-spezifischen Primärantikörpers ein gegen die F_c-Region des ersten Antikörpers gerichteter Sekundärantikörper hinzugefügt. Dieser ist Biotin-gekoppelt und bindet darüber in einem weiteren Schritt eine Streptavidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP), deren Aktivität durch Zugabe eines Substrats autoradiografisch dargestellt wird.

Nach Waschen in TBS/Tween wurde die Membran mit dem in Verdünnungspuffer 1:25 verdünnten Primärantikörper bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Nach Abnehmen des Primärantikörpers und mehrmaligem Waschen in TBS/Tween wurde die Membran mit 1:3.000 in TBS verdünntem Sekundärantikörper für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das aus Reagenz A+B (ECL Kit; Amersham) bestehende Substrat der Peroxidase hinzugegeben und die Reaktion auf einem Autoradiogramm dargestellt.

Verdünnungspuffer:

0,1% (w/v) BSA

0,02% (v/v) NaN₃

in PBS

2.2.24 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen dienen der Darstellung von Proteinen in histologischen Schnitten.

Paraffin-eingebettete Kleinhirnschnitte verschiedener embryonaler und postnataler Stadien aus *sox18*-defizienten Mäusen sowie Wildtyp-Tieren wurden mit Antikörpern gegen das Proliferations-assoziierte Antigen ki-67 bzw. gegen den Differenzierungs-spezifischen Marker NeuN behandelt. Dazu wurden die Präparate zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert (3x in Xylol, jeweils 1x in 98%, 90%, 80%, 70% und 50% Propanol á 5 min) und anschließend in PBS gewaschen. Um die Penetration der Antikörper durch die Zellmembran zu erleichtern, wurden die Schnitte für 10 min mit 0,1%-iger Triton-X 100-Lösung behandelt. Zur Blockierung der endogen ubiquitär vorkommenden Peroxidase wurden die Präparate in einer Lösung bestehend aus 0,1 % H₂O₂ und 10% Methanol in PBS inkubiert, da die später stattfindende Darstellung der Proteine von einer exogen zugegebenen Peroxidase katalysiert wird. Durch Zugabe von 2%-igem Ziegen Serum in PBS für 30 min wurden freie Bindungsstellen blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tec-3 Ratte-anti-Maus-Antikörper gegen ki-67, Verdünnung 1:50, Dianova; Ratte-anti-Mensch gegen NeuN, Verdünnung 1:200, Chemicon) für 12 h bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dem dreimaligen Waschen in PBS folgte die Inkubation des gegen die F_c-Region des Primärantikörpers gerichteten, biotinylierten Sekundärantikörpers für 1 h (Ziege-anti-Ratte-Antikörper, Verdünnung 1:200, Dako). Nach dreimaligem Waschen in TBS wurde die in 1%-igem TBS gelöste, Avidin-gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (Dako) für 1 h mit den Präparaten inkubiert. Die enzymatische Färbung geschah anschließend durch Zugabe 0,05%-igen Diaminobenzidins (Peroxidase Substrat Kit, Vector). Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen in TBS geblockt. Eine Gegenfärbung zur Darstellung aller Zellen wurde durch Zugabe von Mayer-Hämalaun für 1 min und anschließendes "Bläuen" mit warmem Leitungswasser erreicht. Zur mikroskopischen Auswertung wurden die Schnitte mit Kaiser's Glycerinergelatine eingedeckelt.

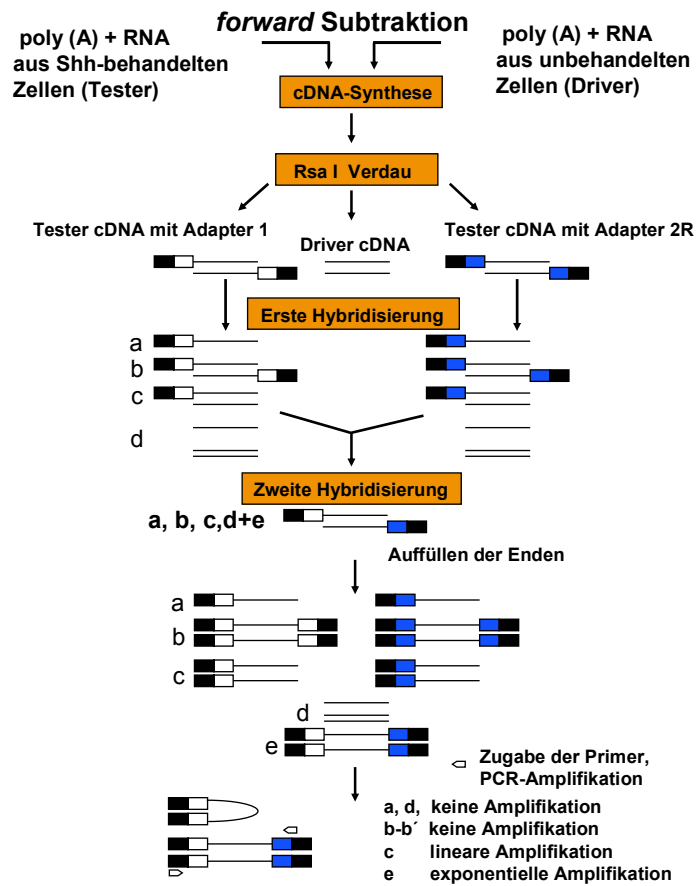


Abb. 2-3:

Schematische Darstellung der subtraktiven Suppressions-Hybridisierung (Details siehe Text)

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Zellkultursystems cerebellärer Körnerzellvorläufer

In enger Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Karl Schilling (Institut für Anatomie und Zellbiologie) wurde ein System etabliert, um frisch präparierte Körnerzellvorläufer aus dem Kleinhirn der Maus in Zellkultur zu bringen und zu manipulieren. Dabei wurde sich an das Protokoll einer von Wechsler-Reya und Scott veröffentlichten Arbeit orientiert (Wechsler-Reya and Scott, 1999). *In vivo* antworten Körnerzellvorläufer (granule cell precursors; GCPs) im sich entwickelnden Kleinhirn mit Proliferation auf die Sezernierung von Shh durch Purkinje-Zellen. Um die optimalen Bedingungen einer solchen Antwort *in vitro* zu generieren, wurden GCPs zunächst in verschiedener Zelldichte in An- bzw. Abwesenheit von rekombinantem Shh in einer Konzentration von 3 µg/ml für 48 h kultiviert und die Zellteilungsrate durch einen ³H-Thymidin-Inkorporations-Assay bestimmt. Dafür wurden jeweils 1 x 10⁶, 5 x 10⁵ und 1 x 10⁵ Zellen pro cm² in einem Volumen von je 100 µl auf Poly-D-Lysin-beschichtete 96-Loch-Schalen ausgesät. Alle drei Versuchsansätze resultierten in einer vergleichbar starken Proliferationsinduktion auf die Anwesenheit von Shh. In allen darauf folgenden Experimenten wurde eine Zelldichte von 1 x 10⁶/cm² gewählt (Abb. 3-1).

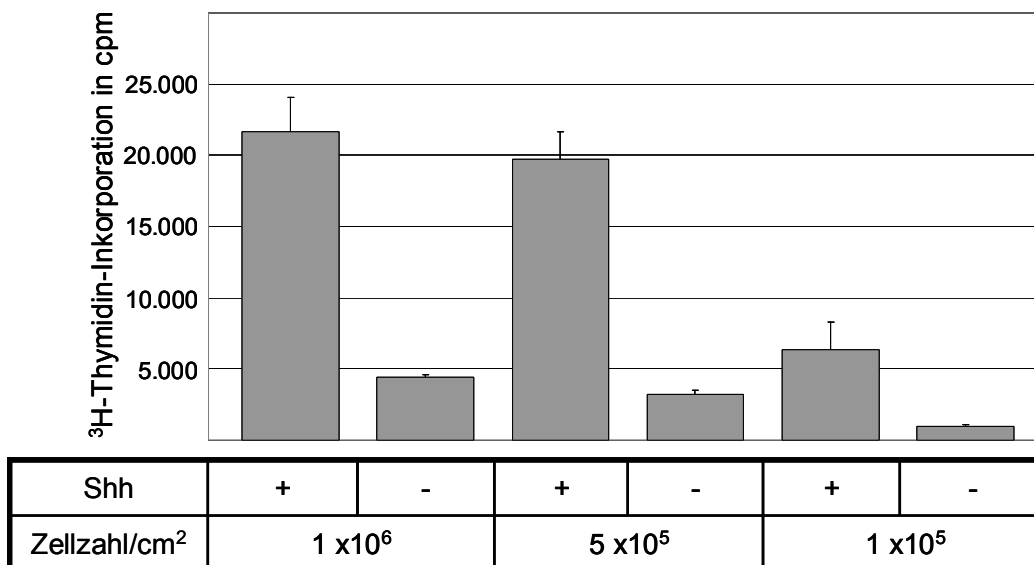


Abb. 3-1

Bestimmung der optimalen Zelldichte von GCPs der Maus für Stimulationsversuche mit Shh (3,00 µg/ml Medium). Die Inkorporation von ³H-Thymidin (in cpm = counts per minute) ist proportional zur Proliferationsrate. Die Shh-induzierten Zellteilungsrate waren vergleichbar stark und unabhängig von der initialen Zellzahl.

Um die Menge von Shh zu bestimmen, die ausreicht, um in GCPs eine eindeutige Proliferation zu induzieren, wurden verschiedene Konzentrationen des Morphogens ausgetestet. In der Literatur wurde eine Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ verwendet (Wechsler-Reya and Scott, 1999). Als immer noch sättigende Konzentration reichten 1,25 $\mu\text{g/ml}$ aus, um vergleichbare Zellteilungsrate zu induzieren, weshalb in allen sich anschließenden Versuchen diese Konzentration verwendet wurde (Abb. 3-2).

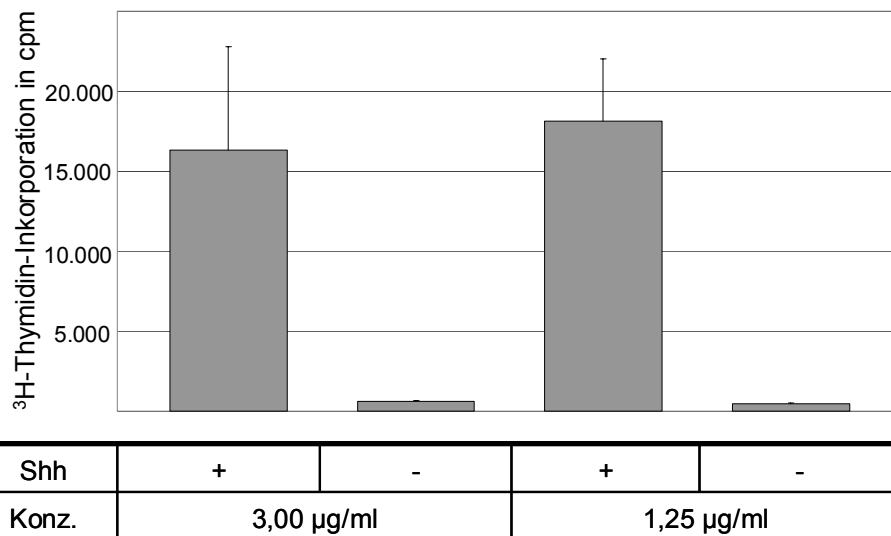


Abb. 3-2

Bestimmung einer für die Proliferationsinduktion sättigenden Konzentration von Shh

Neben der in der Literatur beschriebenen Konzentration von 3,00 μg rekombinantes Shh pro ml Medium reichten 1,25 $\mu\text{g/ml}$ aus, um eine vergleichbare Zellteilungsrate in GCPs zu induzieren.

Um auszuschließen, dass die Beschichtung der Zellkulturschalen eine eigene proliferationsbeeinflussende Wirkung hat, wurden verschiedene Proteine ausgetestet. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu Poly-D-Lysin, Vitronectin (BD Biosciences) oder Collagen S (Roche) die Anwesenheit von Laminin (R+D Systems) sowie Matrigel (BD Biosciences) eine erhöhte Basalproliferation hervorrief (Abb. 3-3).

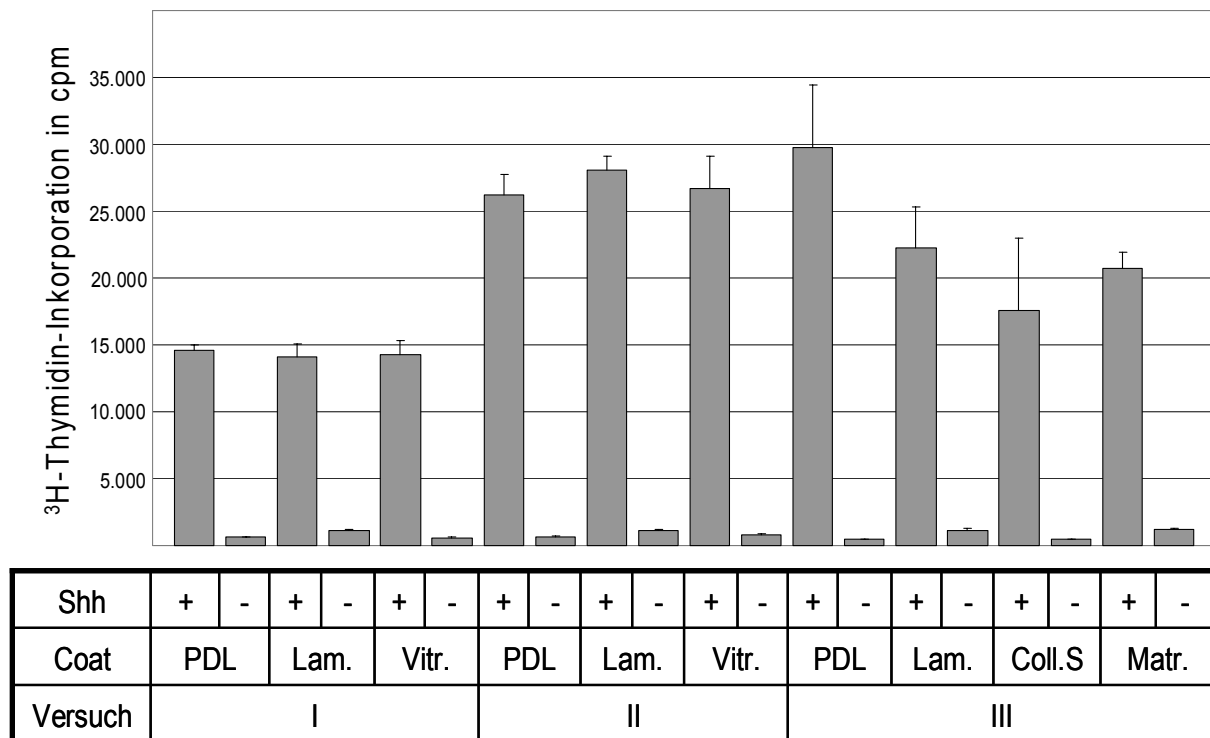


Abb. 3-3

Überprüfung des Einflusses verschiedener Beschichtungen der Zellkulturschalenböden auf die Proliferation von GCPs

In verschiedenen Versuchsansätzen bewirkten im Gegensatz zu Poly-D-Lysin (PDL), Vitronectin (Vitr.) und Collagen S (Coll. S) die Beschichtung mit Laminin (Lam.) und Matrigel (Matr.) eine ungefähr doppelt so hohe Basalproliferation in GCPs.

Die Anwesenheit der Vitronectin-Antagonisten EMD 121974 (100 µg/ml, Bachem) und eines anti-alpha-V-Integrin-Antikörpers (Verdünnung 1:20, R+D Systems) hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Shh-induzierte Proliferation (Abb. 3-4). In allen Folgeexperimenten wurden Poly-D-Lysin-beschichtete Zellkulturschalen verwendet.

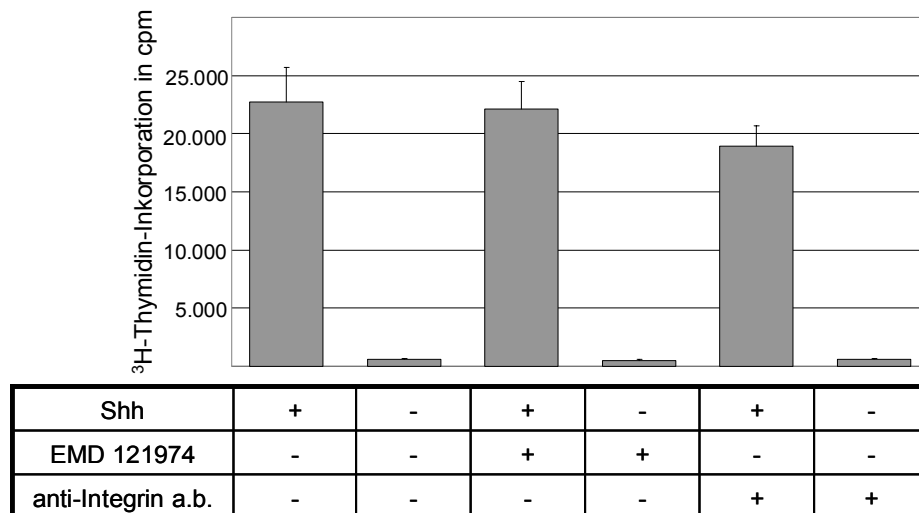


Abb. 3-4

Proliferationsinduktion von GCPs durch Shh in Anwesenheit von Vitronectin-Antagonisten

Weder EMD 121974 noch ein anti-alpha-V-Integrin-Antikörper (a.b.) beeinflussten signifikant die Shh-induzierte Proliferation von GCPs.

Für Zellkulturversuche in Anwesenheit von Cycloheximid (Sigma) war es von Nöten, den anti-proliferativen Effekt des Translationsinhibitors nachzuweisen. Dafür wurden GCPs unter den bisher ausgetesteten Bedingungen in Ab- bzw. Anwesenheit von Shh und Cycloheximid kultiviert und die Proliferationsraten bestimmt. Während in Abwesenheit des Inhibitors die Zellen responsiv auf Zugabe von Shh reagierten, wurde dieser Effekt in Anwesenheit von Cycloheximid in einer Konzentration von 10 µg/ml verhindert (Abb. 3-5).

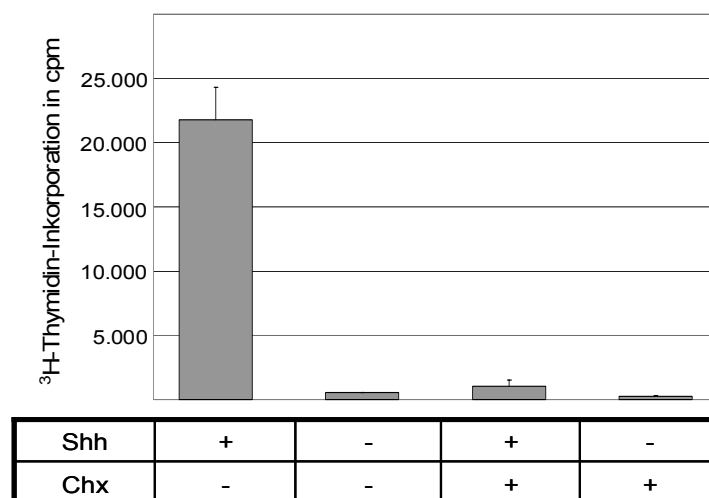


Abb. 3-5

Proliferationsinduktion von GCPs durch Shh in Anwesenheit von Cycloheximid

Die Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid (Chx; 10 mg/ml) verhinderte die Shh-induzierte Proliferation von GCPs.

Als spezifischer Inhibitor der Shh/Ptc-Kaskade wurde Cyclopamin (Toronto Research Company, Kanada) getestet - ein Stoff, der die Wirkung von Shh blockiert. GCPs wurden in Anwesenheit von Shh und unterschiedlichen Konzentrationen von Cyclopamin (0 μM bis 10 μM) kultiviert. Die Anwesenheit des Signalweghemmers verhinderte eine Shh-induzierte Proliferation ab einer Konzentration von 2,5 μM vollständig (Abb. 3-6).

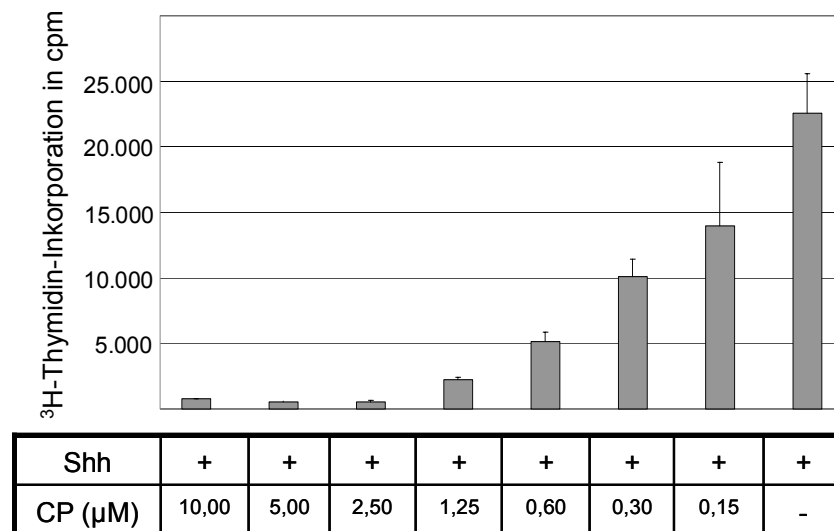


Abb. 3-6

Proliferationsinduktion von GCPs durch Shh in Anwesenheit von Cyclopamin

Mit zunehmender Menge des Signalweghemmers Cyclopamin (CP in μM) in nicht zell-toxischer Konzentration verringerte sich die Shh-induzierte Proliferation von GCPs.

In Folgeexperimenten wurde Cyclopamin stets in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt. Dabei wurde neben der Überprüfung der Proliferationshemmung mittels ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays sichergestellt, dass Cyclopamin den Shh/Ptc-Signalweg hemmt. Dazu wurde der RNA-Pool der jeweiligen Zellpopulationen in cDNA umgeschrieben. 50 ng cDNA wurde anschließend in eine Duplex-PCR eingesetzt. Die PCR wurde bei einer Annealing-Temperatur von 48°C in Anwesenheit von α -tubulin-Primern (*forward*: 5'-aaaccaagaagccctggagac-3'; *reverse*: 5'-cagatgccaagtgacaagac-3') und *gli1*-Primern (*forward*: 5'-ggctttcatcaactctcgcgtg-3'; *reverse*: 5'-gctcactgttgatgtggtgc-3') sowie 1.0 mM MgCl_2 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Haushaltsgen α -tubulin in allen Ansätzen gleichbleibend exprimiert wurde, während die Expression des bekannten Zielgens *gli1* in der mit Shh stimulierten Zellpopulation stark heraufreguliert erschien. Die Anwesenheit von Cyclopamin verhinderte den durch Shh induzierten Effekt (Abb. 3-7). Jeder durchgeführte

Versuchsansatz wurde durch diese Duplex-PCRs sowie ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays überprüft.

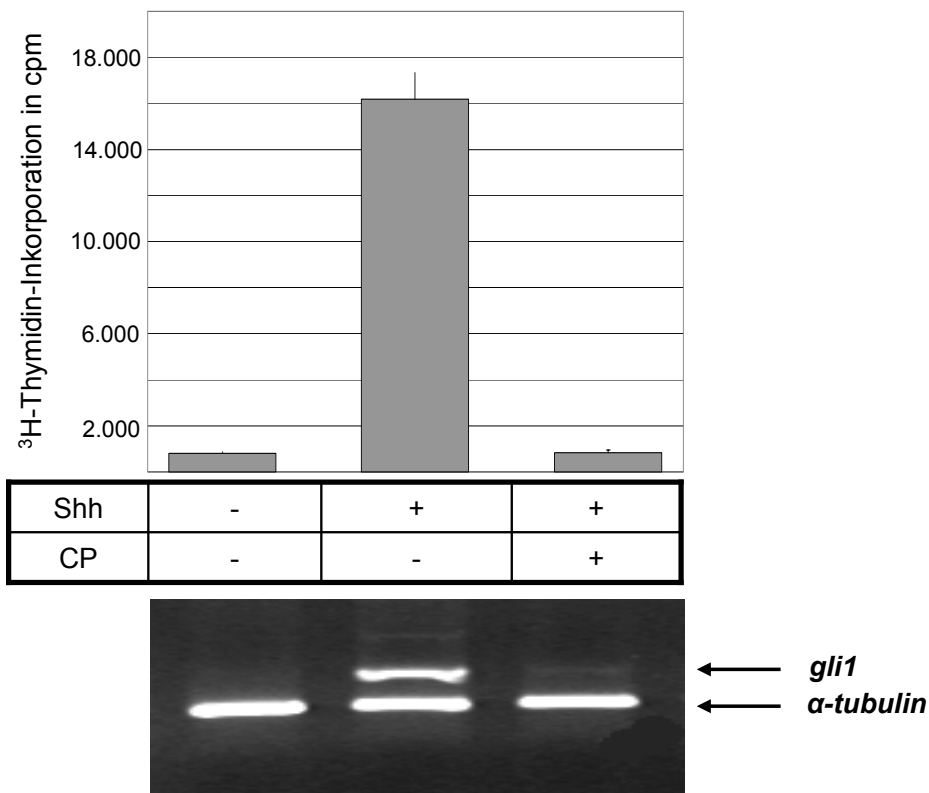


Abb. 3-7

^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay und Duplex-PCR zur Überprüfung der Wirkung von Shh und Cyclopamin auf GCPs

Die Gabe von Shh (1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bewirkte eine massive Zellproliferation in GCPs und aktivierte die Transkription des bekannten Zielgens *gli1*. Die Abwesenheit von Shh oder die Anwesenheit von Cyclopamin (CP; 10 μM) revertierte diese Ergebnisse.

Ein physiologischer Inhibitor Shh-induzierter Proliferation in GCPs ist das von Purkinjezellen sezernierte PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), dessen Rezeptoren (PACAP-R) von GCPs des äußeren EGL exprimiert werden. Um die Wirkung verschiedener Konzentrationen von PACAP auf die Proliferation von P8 GCPS zu testen, wurde eine Titrationsreihe durchgeführt. Mittels ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen von 8 nM bis 1 μM ausreichten, um die Shh-induzierte Proliferation signifikant zu inhibieren (Abb. 3-8).

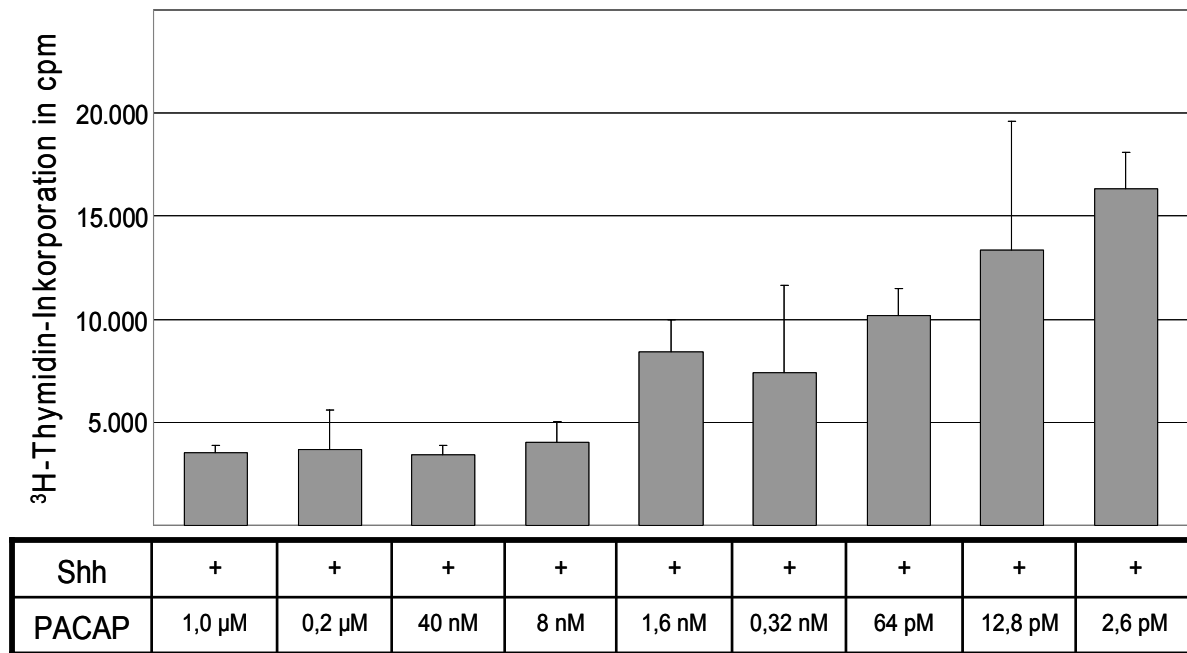


Abb. 3-8

Proliferationsinduktion von GCPs durch Shh in Anwesenheit von PACAP

Mit zunehmender Menge von PACAP verringerte sich die Shh-induzierte Proliferation von GCPs.

In einem weiteren Assay wurden die Proliferationsraten von P8 GCPs in An- bzw. Abwesenheit von Shh und PACAP (100 nM) bestimmt. Dabei konnte PACAP die Shh-abhängige Zellteilung um ca. 90% inhibieren. Eine wie oben beschriebene Duplex-PCR zeigte, dass PACAP die mRNA-Induktion von *gli1* nicht beeinflusst (Abb. 3-9).

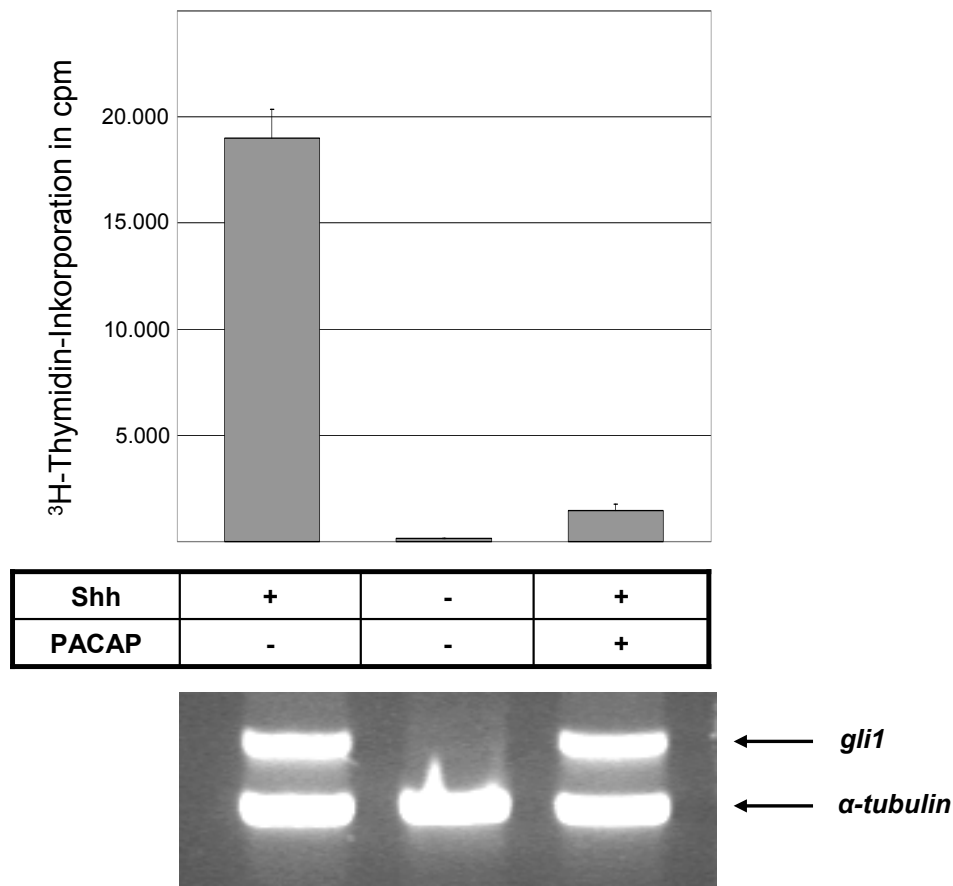


Abb. 3-9

³H-Thymidin-Inkorporations-Assay und Duplex-PCR zur Überprüfung der Wirkung von Shh und PACAP

Die Gabe von Shh induzierte - wie bereits gezeigt - eine massive Zellproliferation in GCPs. Die Abwesenheit von Shh oder die Anwesenheit PACAP (100 nM) verhinderte die Induktion. Die Anwesenheit von Shh aktivierte die Transkription des bekannten Zielgens *gli1*; die zusätzliche Anwesenheit von PACAP beeinflusste diesen Effekt nicht.

Es wird angenommen, dass verschiedene Spleiß-Varianten des PACAP-Rezeptors mit unterschiedlichen G-Proteinen interagieren und so die intrazelluläre Antwort variieren kann. Daher wurde mittels RT-PCR überprüft, ob Shh Einfluss auf die Expression unterschiedlicher PACAP-R-Spleiß-Formen hat. Dazu wurde cDNA von Shh-stimulierten und unstimulierten Zellen mit den sequenzspezifischen Primern P1 (5'-catccttgatgcagaagctgc-3'), P2 (5'-tccaccattactctacggct-3') bzw. P3 (5'-ggtgcttgaagtccatagtg-3') in eine PCR (Annealing-Temperatur: 57°C, 1.0 mM MgCl₂) eingesetzt. Das Verhältnis der amplifizierten Produkte wies nicht auf einen Einfluss von Shh auf das Spleißen von PACAP-R in P8 GCPs der Maus hin (Abb. 3-10).

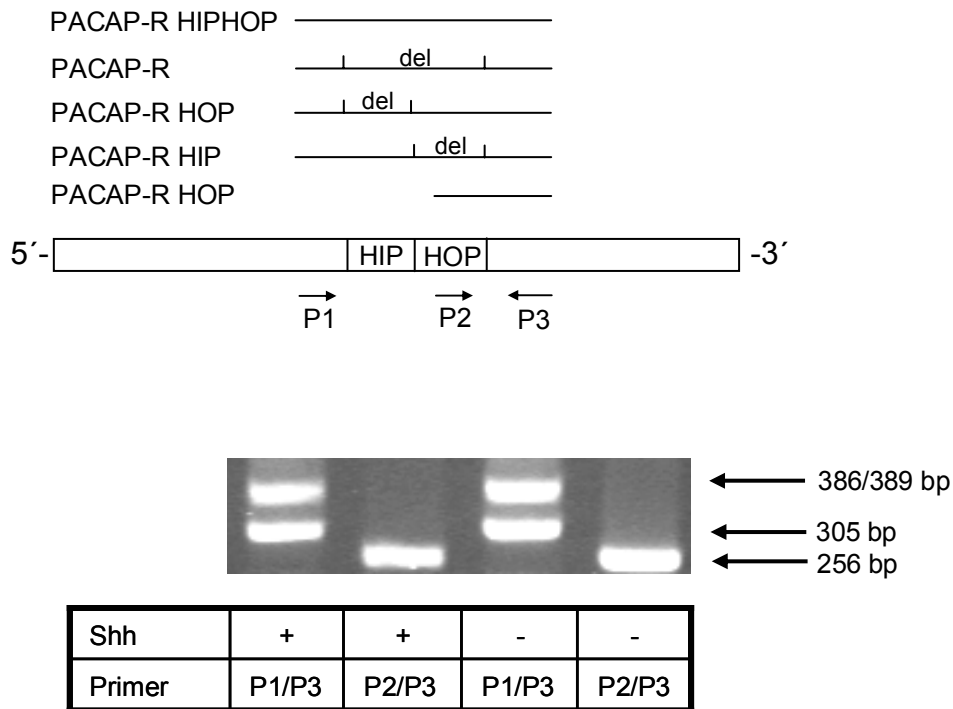


Abb. 3-10

Überprüfung des Einflusses von Shh auf die Expression verschiedener PACAP-Rezeptor-Spleiß-Varianten in GCPs

oben: Schematische Darstellung des PACAP-R-Transkripts mit den Kassetten *HIP* und *HOP*. Abkürzungen: del: deletierte Sequenz; P1, 2, 3: sequenzspezifische Primer

unten: PCR-Produkt-Größen in An- bzw. Abwesenheit von Shh unter Verwendung der Primer P1 und P3, bzw. P2 und P3.

3.2 Identifizierung neuer Zielgene der Sonic Hedgehog/Patched-Kaskade mittels DNA Microarray-Hybridisierung

Um neue Zielgene des Hedgehog/Patched-Signalwegs zu identifizieren, wurden Körnerzellvorläufer aus dem Kleinhirn der Maus präpariert und in An- bzw. Abwesenheit von Shh für 3, 7, sowie 18 h kultiviert. Zur Identifizierung primärer Transkripte - also solchen, deren Induktion keine Bioproteinsynthese voraussetzt - wurde zusätzlich der Translationshemmer Cycloheximid hinzugegeben. Um Zielgene zu isolieren, die spezifisch durch die Shh/Ptc-Kaskade reguliert werden, wurden die Zellen in Anwesenheit des Signalweginhibitors Cyclopamin kultiviert. Für die beiden letztgenannten Versuchsansätze betrug die Kultivierungsdauer ebenfalls 7 h. Nach Kultivierungsende wurde von allen beschriebenen Versuchsansätzen RNA isoliert und zur Expressionsanalyse mittels DNA Microarray-Hybridisierung aufbereitet. DNA Chip-Hybridisierung ist eine Technik, um die

Expression zahlreicher Gene simultan zu analysieren. Das verwendete cDNA Microarray-Set der Firma Affymetrix (Mu74Av2) besteht aus zwei Chips und umfasst eine Bibliothek von 6.000 bekannten Genen der Maus und 6.000 bisher noch nicht zugeordneten Transkripten, sogenannten ESTs (expressed sequence tags). Als Schwellenwert für einen signifikanten Expressionsunterschied wurde der Faktor 1,4 festgelegt.

Von den 12.000 auf den Chips repräsentierten Transkripten war die Expression von 25 Transkripten (0,2%; 16 Gene/9 ESTs) nach 3 h Kultivierung signifikant durch Shh erhöht und von 57 Transkripten (0,5%; 55 Gene/2 ESTs) erniedrigt. Nach 7 h Kultivierung waren 202 Transkripte (1,7%; 135 Gene/67 ESTs) heraufreguliert und 103 Transkripte (0,9%; 69 Gene/34 ESTs) herunterreguliert. 247 Transkripte (2,1%; 202 Gene/45 ESTs) zeigten 18 h nach Aussäen der Zellen eine Induktion durch Shh, wohingegen die Expression von 85 Transkripten (0,7%; 69 Gene/16 ESTs) erniedrigt war. Trotz Anwesenheit von Cycloheximid waren 25 Transkripte (0,2%; 15 Gene/10 ESTs) heraufreguliert, wohingegen nur ein Gen und ein EST herunterreguliert erschienen. Die Zugabe von Cyclopamin bewirkte, dass die Expression von 13 Genen (0,1%) zunahm und die von 47 Transkripten (0,4%; 36 Gene/11 ESTs) abnahm. Viele der differentiell exprimierten Gene kodieren für Proteine, denen Funktionen in der Proliferation bzw. dem Zellzyklus, in der DNA-Bindung bzw. der Transkription, der Differenzierung oder der Apoptose zugewiesen werden. Die nachfolgende Tabelle enthält in diese vier Kategorien zuordnungsbar Gene - geordnet nach der Stärke ihrer Regulation im 7 h-Versuchsansatz (Tab. 3-1). Als primäre Transkripte wurden Kandidaten angesehen, deren Expressionsquotient in Anwesenheit des Translationshemmers Cycloheximid $\geq 1,4$ war. Spezifische Transkripte wurden danach beurteilt, ob die durch Shh induzierte Expressionsregulation in Anwesenheit von Cyclopamin inhibiert wurde. Sie wurden durch einen negativen Expressionsquotienten dargestellt. Die vollständige Auflistung aller regulierten Transkripte - nach dem Expressionsquotienten des 7 h-Versuchs geordnet - findet sich im Anhang (Tab. 5-1).

Zellzyklus/Proliferation

GeneID	Ratio +Shh vs øShh 3h	Ratio +Shh vs øShh 7h	Ratio +Shh vs øShh 18h	Ratio +Shh +Chx vs øShh +Chx 7h	Ratio +Shh +CP vs +Shh 7h	gi	Transkript
160606_r_at	undef.	2.9	>2.7	1.4	-1.5	gi=1813339	disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs
94232_at	1.6	2.5	1.3	1.2	-2.1	gi=5493834	cyclin D1
101446_at	1.2	>2.3	>1.3	>1.7	undef.	gi=2895080	tumor protein D52-like 1
94838_r_at	undef.	2.3	>2.7	>1.9	-1.1	gi=200400	proliferin
161369_r_at	>-1.5	2	>4.7	undef.	<-1.1	gi=6192118	signal transducing adaptor molecule (Stam)
97725_at	>-1.1	>1.8	>1.5	undef.	>-1.2	gi=437870	alk-6
101343_at	>-1	>1.7	>2.1	<1.7	<1	gi=2429353	EWS/FLI1 activated transcript 2 (EAT-2)
97182_at	1.2	1.7	1.8	1.2	-1.1	gi=3769611	cyclin E2
94411_at	undef.	>1.6	>1.7	>1.2	>-1	gi=2832436	cyclin dependent kinase (CDK2L)
103821_at	1	1.6	-1	1.1	-1.5	gi=4007644	cdc6-related
92909_at	undef.	>1.5	>1.3	>-1.1	>-1.1	gi=1063401	placental growth factor
99032_at	undef.	>1.5	1.2	undef.	undef.	gi=2253712	ras-related protein (DEXRAS1)
102083_at	>1.1	1.5	>1.6	>-1.1	>-1.1	gi=4234919	GTP-binding protein ROC2 (Roc2)
103064_at	-1	1.5	-1.1	-1.1	-1.4	gi=2367670	checkpoint kinase (Chk1)
98943_at	1	>1.5	>1.2	>-1.1	-1.5	gi=220583	rpa2
103606_r_at	-1	1.5	1.6	1.3	-1.2	gi=6096771	regulator of G-protein signaling 19 (RGS 19)
160496_s_at	1	1.5	1.4	-1.1	-1.4	gi=3078639	mini chromosome maintenance deficient 3
100062_at	1.1	1.5	1.2	-1	-1.3	gi=53550	mini chromosome maintenance deficient 3
102264_at	undef.	1.4	>2.1	undef.	undef.	gi=3983147	schlafen1 (slfn1)
104031_at	1	1.4	1.4	1.2	-1.3	gi=1181884	patched homolog
100156_at	1.1	1.4	1.1	-1.1	-1.5	gi=940403	mcde46
92458_at	>1.1	1.4	1.1	1.2	-1.2	gi=4034784	orc1-related
93112_at	1	1.4	-1.1	-1	-1.3	gi=2381484	mMCM2
93041_at	1	1.4	-1.1	-1	-1.4	gi=940405	mcde21
103501_at	-1.1	1.4	-1.2	1	1.1	gi=404649	pur-alpha
92569_f_at	1	1.4	-1.8	-1.2	-1.7	gi=2996193	sik similar

DNA-Bindung/Transkription

GeneID	Ratio +Shh vs øShh 3h	Ratio +Shh vs øShh 7h	Ratio +Shh vs øShh 18h	Ratio +Shh +Chx vs øShh +Chx 7h	Ratio +Shh +CP vs +Shh 7h	gi	Transkript
104408_s_at	undef.	>3.5	undef.	>1.8	-3	gi=1663531	sry-box containing gene 18 (sox 18)
161417_r_at	undef.	2.8	>1.7	undef.	undef.	gi=6289873	neuroblastoma myc-related oncogene 1
94097_at	undef.	>2.5	undef.	>3.5	undef.	gi=6009643	gli1
98285_at	>1.6	>1.9	>1.4	undef.	>1.1	gi=4469276	zinc finger gene OZF
96775_at	1.5	1.8	1.5	-1.1	>1.3	gi=53162	chromobox homolog (Drosophila HPI beta)
100395_at	1.4	1.7	>1.9	1.1	-1.3	gi=1707589	gli2
98511_at	1.8	1.7	1	-1	1.3	gi=348995	HnRNP-associated with lethal yellow
102796_at	1.2	1.6	1.1	1.1	<-1.7	gi=1785994	nucleoplamin 3
162409_r_at	undef.	>1.5	>2.7	<-1.3	<-1.1	gi=6280642	nuclear protein 220 (Np220)
102411_at	1.1	>1.5	1.1	undef.	1	gi=199766	kruppel zinc finger protein 2
103086_at	-1	1.5	>1.6	-1.1	1.1	gi=51371	homeo box A5
96554_r_at	-1.1	1.5	1.1	-1.2	1.3	gi=6078262	TAF15
93856_at	1.4	1.5	2.3	1.2	-1.9	gi=202413	wilms tumor homolog
100701_r_at	undef.	>1.4	>1.5	undef.	undef.	gi=1805352	elp3
102660_at	<-1.1	>1.4	>1.3	<-1.1	-1.2	gi=396183	hox-3.5
160662_r_at	undef.	1.4	>1.5	>1.2	-1.1	gi=2625801	gata 6
93655_at	1	1.4	1.2	1.1	1.3	gi=1765921	usf1 (exons 2 to 10)
92644_s_at	-1.1	1.4	-1	-1	-1.3	gi=199934	myb proto-oncogene
102963_at	1.2	1.4	undef.	>-1.1	-1.3	gi=1091479	e2f transcription factor 1

Differenzierung

GeneID	Ratio +Shh vs øShh 3h	Ratio +Shh vs øShh 7h	Ratio +Shh vs øShh 18h	Ratio +Shh +Chx vs øShh +Chx 7h	Ratio +Shh +CP vs +Shh 7h	gi	Transkript
93372_at	1	2	-2.2	-1.1	-1.3	gi=1763274	acidic nuclear phosphoprotein 32
101873_at	undef.	>1.6	>1.9	undef.	undef.	gi=1771291	insl3
102924_at	1.3	1.4	1.4	1.3	-1.5	gi=1389693	fx-induced thymoma transcript (FXI-T1)/deltex1
97334_at	-1	-1.5	>-1	-1.1	1.5	gi=5909341	hes6

Apoptose

GeneID	Ratio +Shh vs øShh 3h	Ratio +Shh vs øShh 7h	Ratio +Shh vs øShh 18h	Ratio +Shh +Chx vs øShh +Chx 7h	Ratio +Shh +CP vs +Shh 7h	gi	Transkript
162021_r_at	undef.	>2.4	undef.	undef.	undef.	gi=6410431	bcl2 homolog
99944_at	-1.1	1.7	1.4	1.4	-1.8	gi=53162	hippocalcin
98031_at	1.2	1.5	1.3	1.3	-1.3	gi=2689659	apoptosis activator Mtd
100391_at	undef.	>1.4	undef.	undef.	undef.	gi=6141550	jnk1
100566_at	-1.3	-2.8	1.1	-1.2	2.1	gi=425405	insulin-like growth factor binding protein 5

Tab. 3-1

Durch DNA Microarray-Hybridisierung detektierte, Shh-responsive Transkripte.

Die Transkripte wurden nach ihrer Expressionsstärke des 7 h-Versuchs geordnet und in funktionale Gruppen eingeteilt. Als Schwellenwert wurde der Faktor 1,4 festgelegt. Abkürzung: undef: nicht auswertbar; gi: Genidentifizierung; CP: Cyclopamin; vs: versus; +: mit; ø: ohne; Ratio: Expressionsfaktor

3.3 Identifizierung neuer Zielgene der Sonic Hedgehog/Patched-Kaskade mittels SubtraktiverSuppressions-Hybridisierung

Im Gegensatz zur DNA Microarray-Technik, in der eine Vielzahl von Genexpressionen gleichzeitig studiert werden kann, ist die Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH) dazu geeignet, differentiell exprimierte Transkripte auch auf niedrigem Expressionsniveau zu identifizieren. Diese komplementäre Methode wurde zur erweiterten Zielgenidentifizierung aus RNA von Shh-stimulierten und unstimulierten Zellen nach 7 h Kultivierung angewandt. Nach Hybridisierung und anschließender Anreicherung potentiell regulierter Transkripte wurden aus 382 zufällig ausgewählten Klonen im Dot Blot 6 Gene als differentiell exprimiert identifiziert (Tab. 3-2).

Gen	gi	Funktion
adp-ribolysation factor-related protein (arp1)	14715091	GTPase
polypyrimidine tract binding protein 2 (ptbp2)	9507002	RNA-Spleißen im EGL
poly-ADP-ribose glycohydrolase (parg)	3388158	Degradierung von Glukose-Polymeren nukleärer Proteine
chaperonin subunit 4 (cct4)	6753321	cytosolisches Chaperon
similar to NS1-BP	13278614	Splicosom-assoziiertes Protein
spindlin	6755619	mit dem Spindelapparat assoziiertes Protein

Tab. 3-2

Mittels SSH identifizierte, Shh-responsive Transkripte

3.4 Verifizierung Shh-regulierter Gene mittels kompetitiver RT-PCR

Sowohl DNA Microarray-Analyse als auch Subtraktive Suppressions-Hybridisierung stellen Methoden dar, bei denen nicht auszuschließen ist, dass falsch positive Kandidaten generiert werden. Daher wurden alle 6 durch SSH identifizierte Gene und ausgewählte Transkripte aus dem DNA Chip-Ansatz mittels kompetitiver RT-PCR (cRT-PCR) auf ihre Richtigkeit hin untersucht. Als Schwellenwert wurde der Faktor 1,5 festgelegt. Orientiert am 7 h-Versuchsansatz konnten 11 von 15 durch DNA Microarray identifizierte Transkripte bestätigt werden. Darüber hinaus ergänzten die durch cRT-PCR gewonnenen Ergebnisse nicht auswertbare Signale des Chips (in Tab. 3-1 als *ratio undefined* bezeichnet). So konnte gezeigt werden, dass *N-myc* ein primäres, aber kein spezifisches Zielgen darstellt, wohingegen *gli1* und *tpd53* als Signalweg-spezifische Transkripte identifiziert wurden. In wenigen Fällen widersprachen die Ergebnisse der Verifizierung den Chip-Daten. Im Gegensatz zum Microarray erschienen *cyclin D1*, *cdc6-related* und *deltex1* in der cRT-PCR als primäre Zielgene. Darüber hinaus konnten *sik similar* und *hippocalcin* nicht als spezifische Zielgene verifiziert werden, wohingegen die Expression von *mtd* durch Cyclopamin geblockt werden konnte. Die differentielle Expression von Genen, die durch SSH identifiziert wurden, konnte sich in der cRT-PCR nur in den Fällen von *cct4* und *ptbp2* bestätigen. Dabei wurde *cct4* als primäres sowie spezifisches Transkript identifiziert (Tab. 3-3).

Ratio +Shh vs øShh 3h	Ratio +Shh vs øShh 7h	Ratio +Shh vs øShh 18h	Ratio +Shh +Chx vs øShh +Chx 7h	Ratio +Shh +CP vs +Shh 7h	Gen	primär	spezifisch
11,4 (+/- 1,7)	31,0 (+/-8,7)	1,6	3,0 (+/-0,3)	-16,6 (+/-0,4)	<i>sox18</i>	X	X
1,4 (+/-0,5)	22,0 (+/-6,8)	1,5 (+/-0,4)	8,1 (+/-1,2)	-9,0 (+/-0,5)	<i>gli1</i>	X	X
5,2 (+/-0,2)	4,5 (+/-1,3)	-1,1 (+/-0,1)	2,9 (+/-0,5)	-5,4 (+/-0,9)	<i>tumor protein d53</i>	X	X
1,6 (+/-0,2)	2,7 (+/-0,5)	-1,6 (+/-0,0)	2,1 (+/-0,8)	-2,5 (+/-0,1)	<i>cyclin D1</i>	X	X
1,3 (+/-0,0)	2,6 (+/-0,0)	1,0 (+/-0,0)	1,4 (+/-0,2)	-1,4 (+/-0,2)	<i>ptbp2</i>		
-1,3 (+/-0,0)	2,6 (+/-0,0)	1,4 (+/-0,1)	2,6 (+/-0,1)	-2,6 (+/-0,1)	<i>cct4</i>	X	X
-2,9 (+/-0,0)	3,4 (+/-0,1)	1,0 (+/-0,4)	-1,2 (+/-0,1)	-3,8 (+/-0,7)	<i>mtl</i>		X
1,4 (+/-0,4)	2,1 (+/-0,4)	2,1 (+/-0,4)	3,4 (+/-0,3)	-2,7 (+/-0,5)	<i>deltex1</i>	X	X
-1,3 (+/-0,1)	1,9 (+/-0,2)	2,0 (+/-0,1)	1,5 (+/-0,0)	-2,2 (+/-0,2)	<i>cdc6-related</i>	X	X
3,5 (+/-1,4)	1,8 (+/-0,8)	-1,1 (+/-0,1)	1,6 (+/-0,4)	-1,2 (+/-0,1)	<i>N-myc</i>	X	
1,1 (+/-0,2)	1,6 (+/-0,1)	-1,1 (+/-0,1)	1,9 (+/-0,1)	-1,1 (+/-0,0)	<i>hippocalcin</i>	X	
1,0 (+/-0,1)	1,6 (+/-0,1)	-1,4 (+/-0,2)	1,0 (+/-0,1)	-1,3 (+/-0,1)	<i>sik similar</i>		
-1,8 (+/-0,2)	-2,3 (+/-0,3)	-1,8 (+/-0,2)	-1,0 (+/-0,1)	2,2 (+/-0,4)	<i>igfbp5</i>		X

Tab. 3-3.

Verifizierung von Zielgenen mittels cRT-PCR

Die Expression von Shh-responsiven Zielgenen, die durch DNA Microarray-Hybridisierung oder SSH identifiziert wurden, wurde mittels cRT-PCR überprüft. Abkürzung: CP: Cyclopamin; vs: versus; +: mit; ø: ohne; Ratio: Expressionsfaktor, Standardfehler (+/-).

3.5 Suche nach potentiellen Gli1-Bindungsstellen im 5'-Bereich verifizierter Zielgene

Um herauszufinden, ob die Expression verifizierter, primärer Zielgene der Sonic Hedgehog/Patched-Kaskade direkt vom Signalweg-spezifischen Transkriptionsfaktor Gli1 reguliert wird, wurde mittels Datenbankrecherche (http://www.ensembl.org/Mus_musculus/blastview) nach potentiellen Gli1-Bindungsmotiven gesucht. Dabei wurde die proximal umgebende Region des Translationsstartcodons nach den bereits bekannten Bindungssequenzen 5'-gaccacca-3' und 5'-gaacacca-3' (Kinzler and Vogelstein, 1990; Sasaki et al., 1997) abgesehen. In den Fällen von *cct4*, *hippocalcin*, *sox18* und *tpd53* wurden

teils minimal zur Konsensus-Sequenz alternierende Motive gefunden. Des Weiteren wurden ebenfalls potentielle Gli1-Bindungsstellen im 5'-Bereich der vier nicht als primär bestätigten Transkripte *deltex1*, *igfbp5*, *mtd* und *sik similar* detektiert (Abb. 3-11).

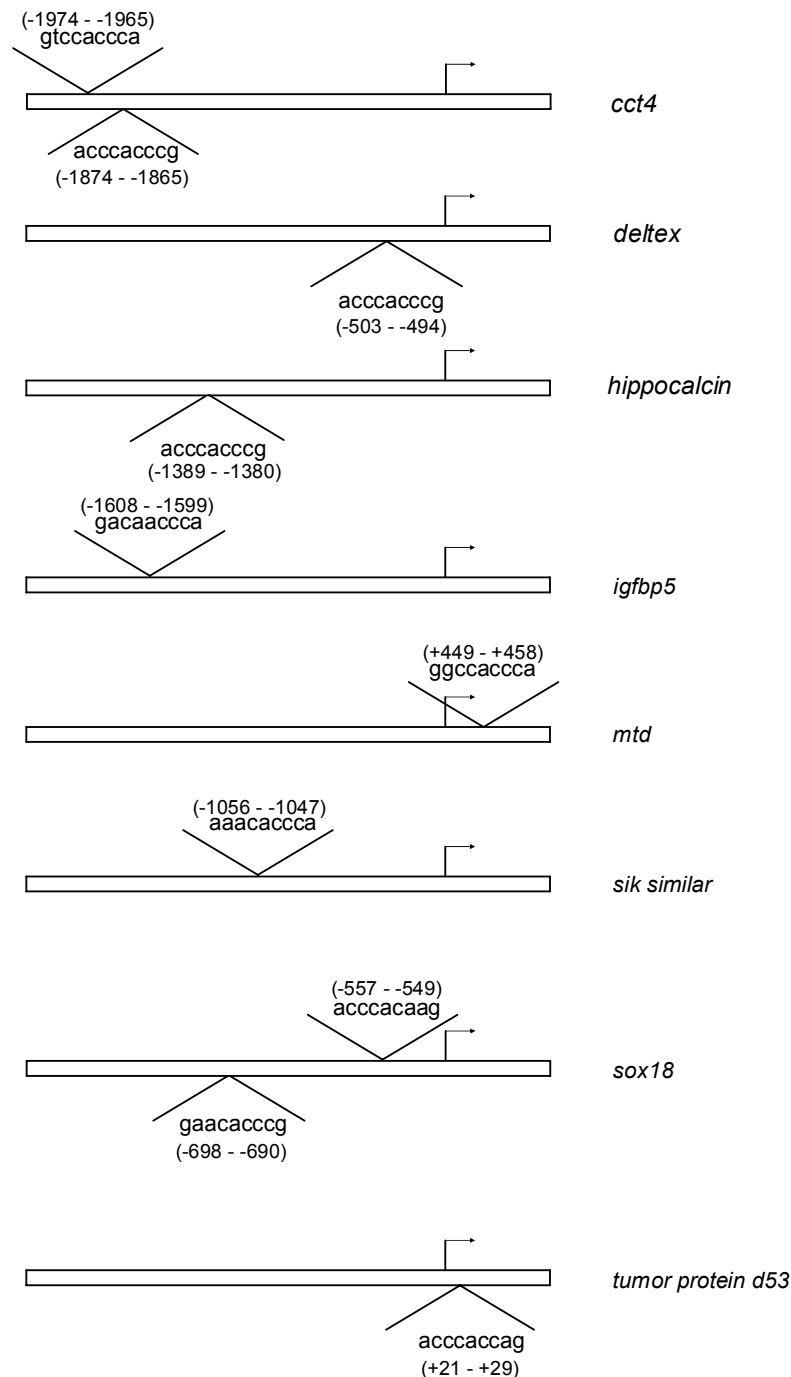


Abb. 3-11

Darstellung potentieller Gli1-Bindungsstellen verifizierter Zielgene

Im proximalen Bereich des Translationsstartcodons (Pfeil) vier primärer und vier nicht primärer Zielgene wurden potentielle Gli1-Bindungsmotive identifiziert. Die Zahlen bezeichnen die relative Position zum Startcodon ATG.

3.6 Funktionelle Überprüfung potentieller Gli1-Bindungsstellen

Die Funktionalität der identifizierten Gli1-Bindungsmotive wurde durch einen Dual-Luciferase-Assay überprüft. Dafür wurden die jeweiligen DNA-Sequenzen durch PCR amplifiziert und gerichtet vor das Luciferase-Gen in ein Reporterplasmid kloniert (Abb. 3-12).

Dieses wurde anschließend mit einem Gli1-Expressionsvektor (Sasaki et al., 1997) in Zellen kotransfiziert. Erkennt der Transkriptionsfaktor Gli1 die subklonierte Bindungsstelle, wird dadurch ein Transkriptionskomplex initiiert, der das nachfolgende Firefly-Luciferase-Gen abliest. Die Menge des translatierten Proteins kann anschließend durch luminometrische Bestimmung quantifiziert werden und gibt damit Auskunft über die Funktionalität des Gli1-Bindungsmotivs. Um ein passendes Zellmodell zu finden, wurde die Transfektionseffizienz der Zelllinien HepG2, HepT1 und DAOY ausgetestet. Dazu wurden die Zellen in unterschiedlicher Dichte (initiale Konfluenz: 25%, 50% bzw. 75%) auf unbeschichtete 24-well-Schalen ausgesät und mittels Lipofektion mit dem Vektor pRL transfiziert. Dieses Expressionsplasmid enthält unter Kontrolle eines SV40-Promotors das Gen für die Renilla-Luciferase, dessen Genprodukt luminometrisch von dem des Firefly-Luciferase-Gens unterscheidbar ist. Es zeigte sich, dass sich DAOY-Zellen bei einer initialen Konfluenz von 50% am effizientesten transfizieren ließen. Durch eine Kontrolltransfektion mit dem Vektor p8xGliBS, einem Plasmid, welches acht direkte Gli1-Bindungssequenzen vor dem Firefly-Luciferase-Gen trägt, konnte gezeigt werden, dass diese Zelllinie keine interne Gli1-Aktivität besitzt. Neben den zu testenden Konstrukten wurden Transfektionen in DAOY-Zellen von Positiv- als auch Negativkontrollen durchgeführt. In der Positivkontrolle betrug nach Kotransfektion des Gli1-Expressionsvektors mit dem p8xGliBS-Plasmid die relative Firefly-Luciferase-Induktion Faktor 438 (SE+/-94). In der Negativkontrolle wurden mutierte Gli1-Bindungsstellen bzw. ein Gli3-Expressionsvektor verwendet. Beim Test der potentiellen Gli1-Bindungsstellen betrug im Fall von *cct4* der Faktor der relativen Firefly-Luciferase-Induktion 33 (SE+/-4) (Abb. 3-13). Die Motive aller anderen Gene zeigten im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikante Firefly-Luciferase-Lumineszenz.

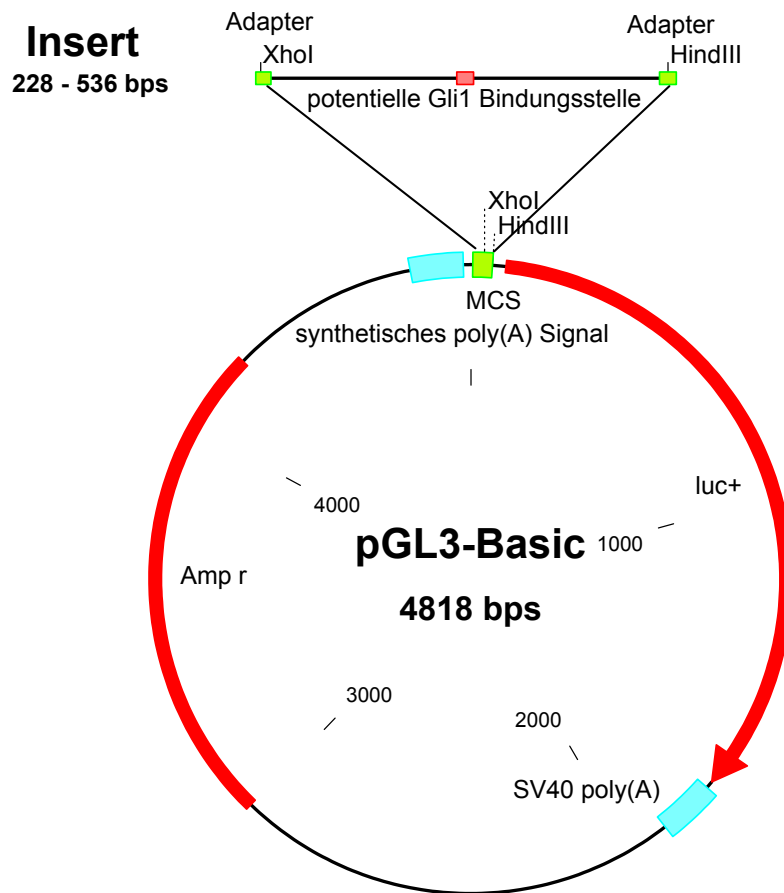


Abb. 3-12

Schematische Darstellung der Subklonierung eines potentiellen Gli1-Bindungsmotivs

Die jeweilige Sequenz wurde über die per PCR-Primer generierten Schnittstellen für HindIII und XhoI gerichtet vor das Luciferase-Gen in das Reporterplasmid pGL3-Basic kloniert. Abkürzungen: MCS: multiple cloning site; Amp^r: Resistenzgen gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin; SV40 poly(A): Polyadenylierungssignal des Virus SV40

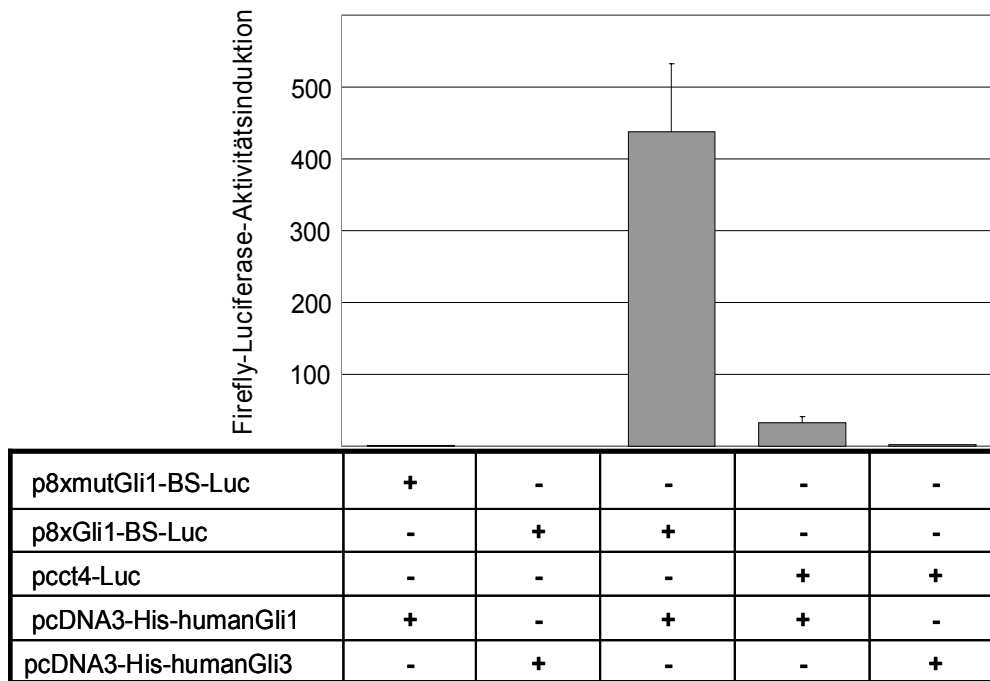


Abb. 3-13

Dual-Luciferase-Promotor-Assay

Neben der Positivkontrolle zeigte die Kotransfektion des Gli1-Expressionsvektors und des Testvektors pcct4-Luc in DAOY-Zellen eine Luciferase-Induktion. Abkürzungen: p8xmutGli1-BS-Luc: Luciferase-Reporterplasmid mit vorklonierter, achtfacher, nicht-funktioneller Gli1-Bindungsstelle, p8xGli1-BS-Luc: Luciferase-Reporterplasmid mit vorklonierter, achtfacher, funktioneller Gli1-Bindungsstelle, pcct4-Luc: Luciferase-Reporterplasmid mit vorklonierter, potentieller Gli1-Bindungsstelle des *cct4*-Gens, pcDNA3-His-humanGli1: Expressionsvektor für das humane Gli1-Protein, pcDNA3-His-humanGli3: Expressionsvektor für das humane Gli3-Protein.

3.7 Expressionsanalyse verifizierter Zielgene in der normalen Kleinhirnentwicklung der Maus

Nach Identifizierung und Verifizierung von Zielgenen, die in Zellkultur durch Zugabe von Shh reguliert werden und nach Untersuchung potentieller Gli1-Bindungsstellen von Zielgenen *in vitro*, wurde die Expression ausgewählter Zielgene in der normalen Kleinhirnentwicklung der Maus untersucht. Dazu wurde RNA der Kleinhirnentwicklungsstadien der embryonalen Tage E14, E17 sowie der postnatalen Tage P0, P3, P5, P8, P15 und P30 für die nachfolgende cRT-PCR verwendet. Während die Expression der Gene *sox18* und *cct4* bereits an Tag E14 am stärksten war und danach sukzessiv abnahm, war das Expressionsmaximum für *deltex1* an

Tag E17 und für *gli1* an Tag P0 zu verzeichnen, wo hingegen die Expression von *hippocalcin* an Tag P3 am höchsten war (Abb. 3-14).

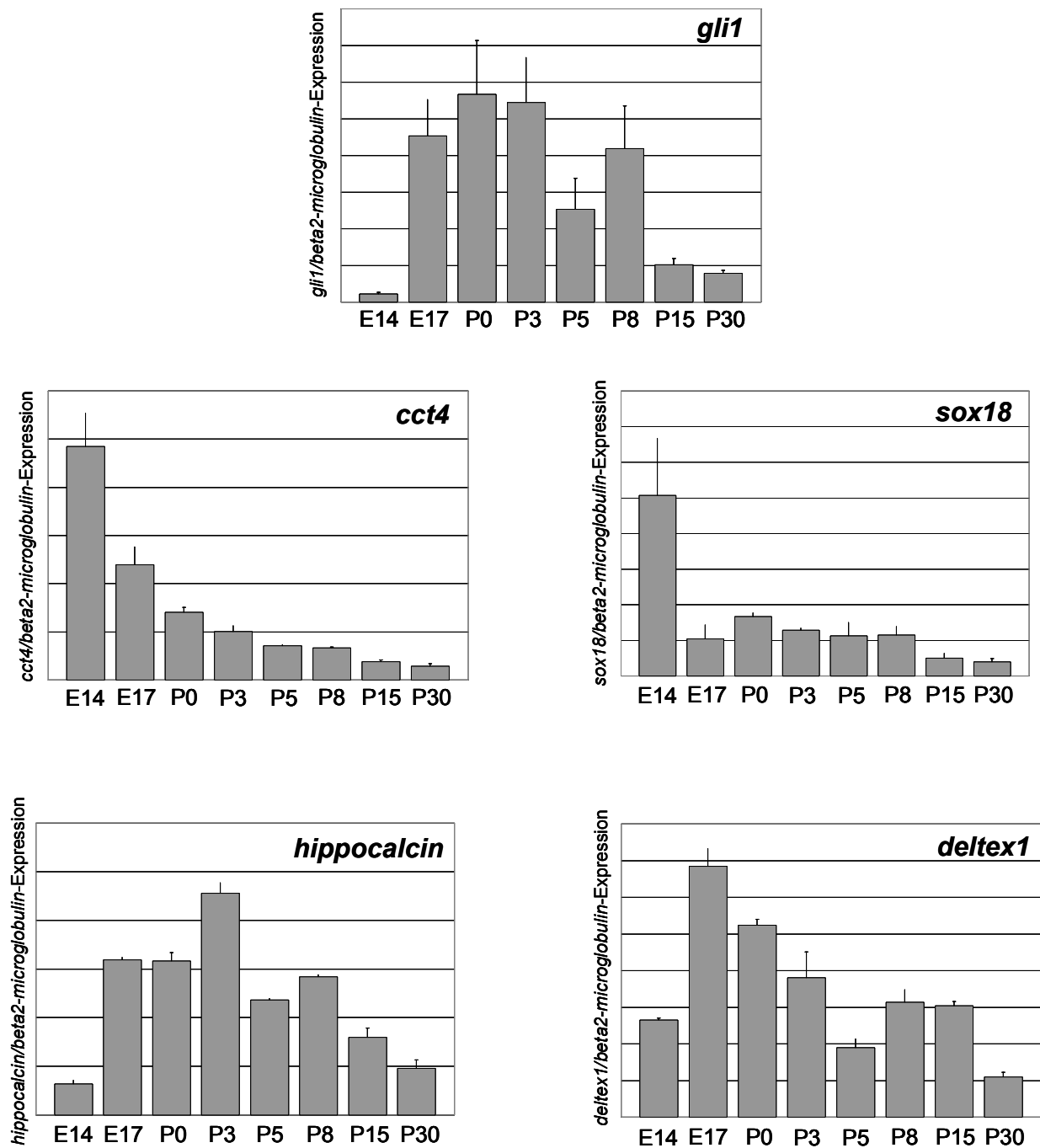


Abb. 3-14

Zielgen-Expressionsanalyse während der normalen murinen Kleinhirnentwicklung

Expression der Gene *gli1*, *cct4*, *hippocalcin*, *sox18* und *deltex1* - verrechnet mit der Expression des Haushaltgens *beta2-microglobulin* - zu verschiedenen Stadien der cerebellären Entwicklung. E: embryonaler Tag; P: postnataler Tag.

3.8 Expressionsanalyse verifizierter Zielgene in humanen Medulloblastomen

Das Medulloblastom ist der am häufigsten vorkommende, maligne Hirntumor im Kindesalter und kann in die klassische (CMB) und die desmoplastische (DMB) Variante unterteilt werden. Nach heutigem Kenntnisstand stellen die Körnerzellvorläufer des Kleinhirns den zellulären Ursprung des desmoplastischen Medulloblastoms dar, und Dysregulationen des Sonic Hedgehog/Patched-Signalwegs sind mit dem DMB assoziiert. Daher wurde mittels cRT-PCR untersucht, ob im Mausmodell verifizierte Zielgene der Kaskade ebenfalls in humanen MBs differentiell exprimiert werden. Expressionsanalysen der Gene *GLII*, *SOX18*, *CCT4*, *TPD53*, *DTX1* (humanes *deltex1*), *HIPPOCALCIN* sowie *IGFBP5* in 12 CMB- und 12 DMB-Proben ergaben, dass Transkripte von *SOX18* und *IGFBP5* in DMB signifikant erhöht waren. Durch die Verwendung eines beidseitigen Student's t-tests (p_{st}) bzw. eines beidseitigen Mann-Whitney-U-Tests (MW) zeigte sich für *SOX18* eine Signifikanz von $p_{st}= 0,0099$ bzw. $p_{MW}= 0,012$ und von $p_{st}= 0,0478$ bzw. $p_{MW}= 0,021$ für *IGFBP5*. Als Positivkontrolle konnte auch für *GLII* eine signifikant erhöhte Expression in DMBs ($p_{st}= 0,0393$ bzw. $p_{MW}= 0,022$) festgestellt werden. Dabei wiesen die Proben die höchsten Expressionen für *SOX18* und *GLII* auf, in denen eine *PTCH*-Mutation nachgewiesen worden ist (Pietsch et al., 1997). Darüber hinaus konnte in den untersuchten Proben mittels Pearson-Test eine Korrelation zwischen der *SOX18*- und *GLII*-Expression festgestellt werden ($R= 0,653$ auf einem Signifikanz-Niveau von 0,01). Weiterhin wurden im Fall von *SOX18* und *GLII* auch 6 Proben von MBs der extrem nodulären Variante (NMB) untersucht. Im Vergleich zu CMB war die Expression beider Transkripte in NMBs signifikant erhöht (beidseitiger Mann-Whitney-U-Test: *SOX18*: $p_{MW}= 0,005$; *GLII*: $p_{MW}= 0,0149$), wohingegen kein eindeutiger Expressionsunterschied zwischen NMBs und DMBs zu erkennen war (*SOX18*: $p_{MW}= 0,851$; *GLII*: $p_{MW}= 0,1898$) (Abb. 3-15).

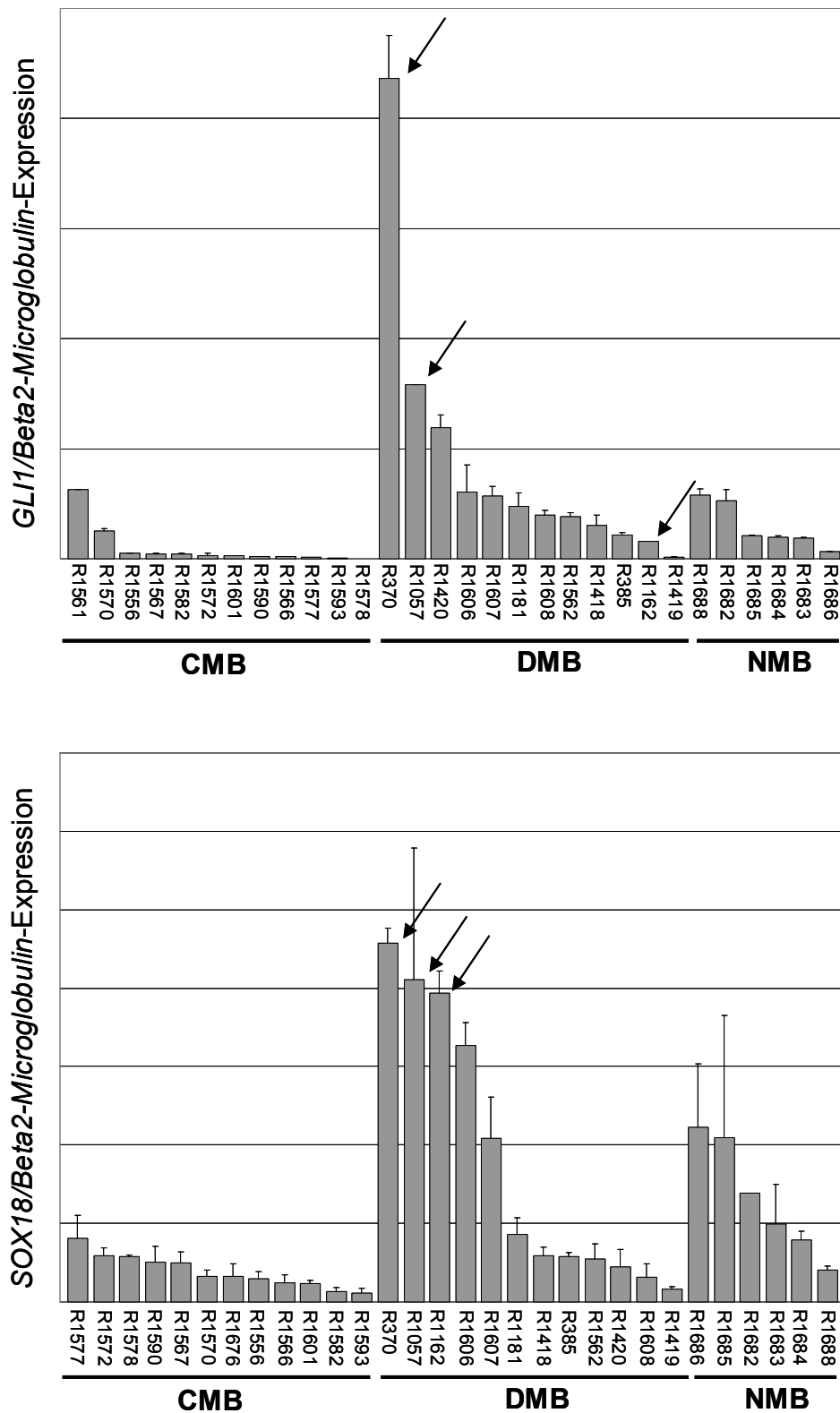


Abb. 3-15

Expression von *GLI1* und *SOX18* - verrechnet mit der Expression des Haushaltgens *Beta2-Microglobulin* - in humanen Medulloblastomen. Pfeile bezeichnen Proben mit nachgewiesener *PTCH*-Mutation. CMB: klassisches Medulloblastom; DMB: desmoplastisches Medulloblastom; NMB: extrem noduläres Medulloblastom; R-Nr. der jeweiligen Probe (s. Tab. 2-7).

3.9 Expressionsanalyse von *SOX18* in humanen und murinen Rhabdomyosarkomen

Um die Frage zu klären, ob *SOX18* ein Zelltyp-spezifisches Zielgen der Shh/Ptc-Kaskade ist, wurde dessen Expression in einer weiteren Tumorentität untersucht. Das embryonale Rhabdomyosarkom ist ein myogener Tumor, dessen Entstehung ebenfalls mit einer Dysregulation des Shh/Ptc-Signalwegs assoziiert sein kann. Ptc^{+/-} Knockout-Mäuse entwickeln neben Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen auch Rhabdomyosarkome (Hahn et al., 1998). Daher wurde die Expression von *gli1* und *sox18* in Rhabdomyosarkomen und Muskelproben der Maus untersucht. Wie bei *ptc*-defizienten Mäusen zu erwarten, war die *gli1*-Expression in der Gesamtheit der 19 Tumorproben gegenüber den 4 Muskelproben signifikant erhöht (beidseitiger Mann-Whitney-U-Test: $p_{MW} = 0,007$) (Abb. 3-16).

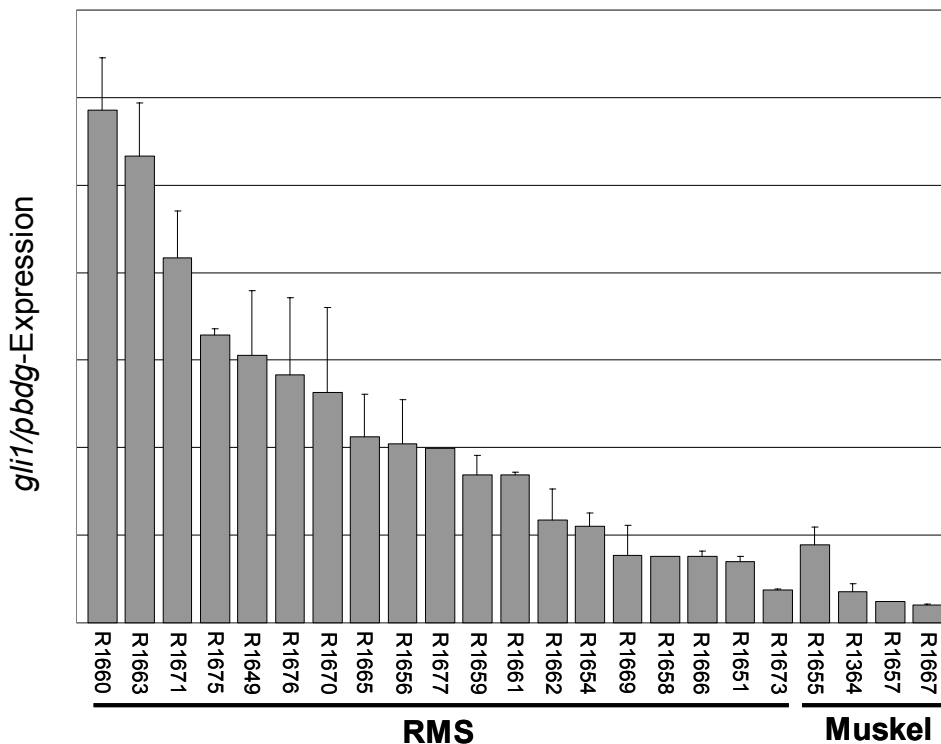


Abb. 3-16

Expression von *gli1* - verrechnet mit der Expression des Haushaltgens Porphobilinogen-Desaminase (*pbgd*) - in murinen Rhabdomyosarkom- und Muskelproben. R-Nr. der jeweiligen Probe (s. Tab. 2-9).

Dies wurde durch Gegenüberstellung der Daten von Muskel und Tumor aus demselben Tier bestätigt. Für *sox18* konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von 20 Tumorproben und 6 Muskelproben festgestellt werden (beidseitiger Mann-Whitney-U-Test: $p_{MW} = 0,33$).

Des Weiteren wurde die Expression beider Gene auch in 15 humanen Rhabdomyosarkomen und 3 Muskelkontrollen durchgeführt. *GLI1* wurde stärker im Tumor exprimiert (beidseitiger Mann-Whitney-U-Test: $p_{MW} = 0,028$), während *SOX18* stärker im normalen Muskel exprimiert wurde als im Tumor ($p_{MW} = 0,011$) (Abb. 3-17).

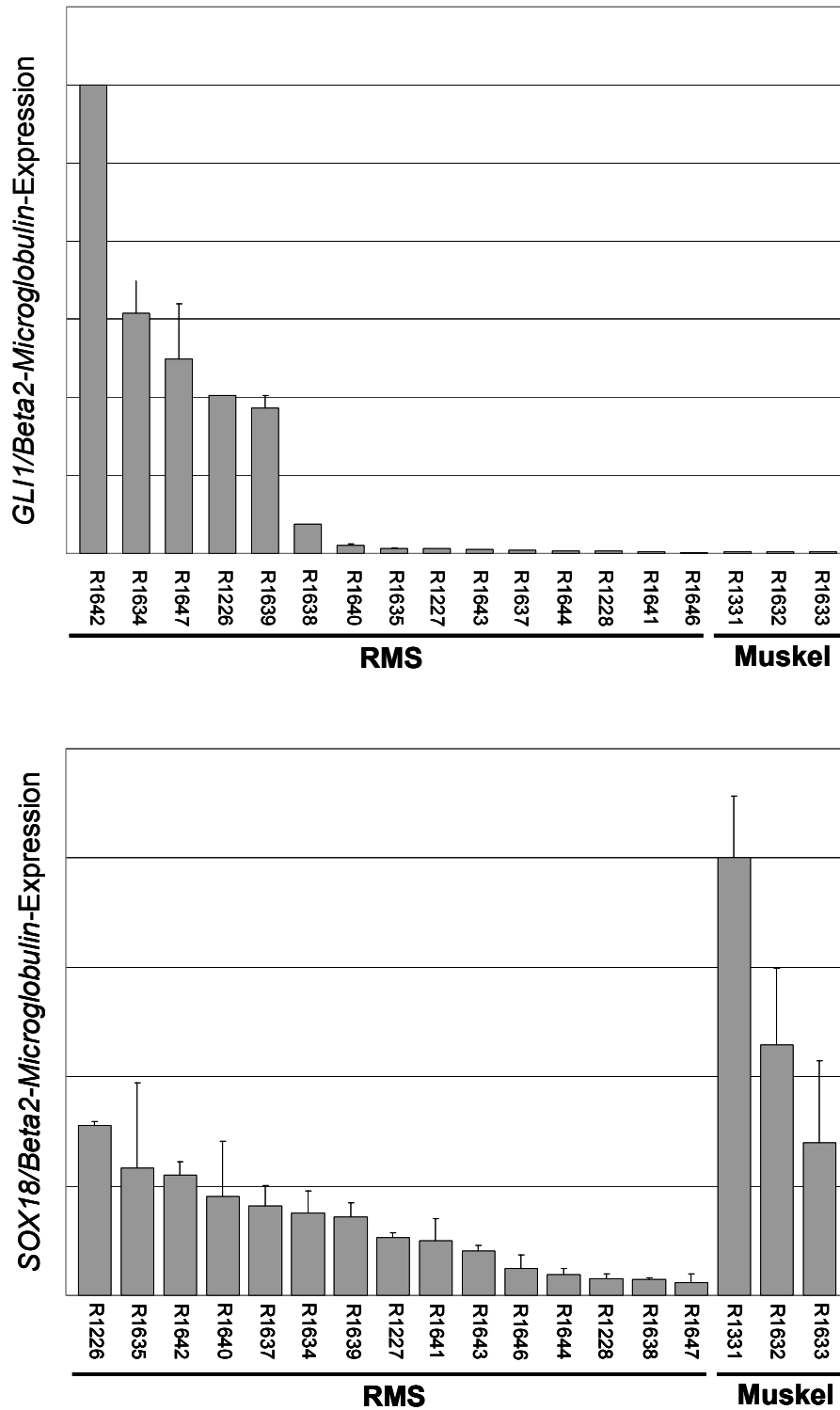
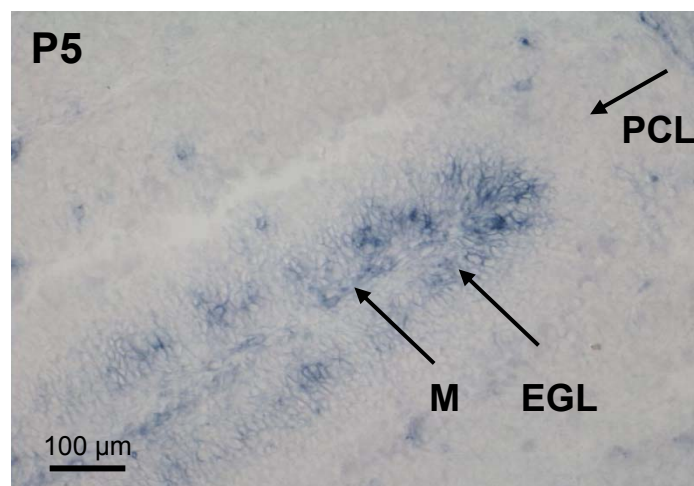
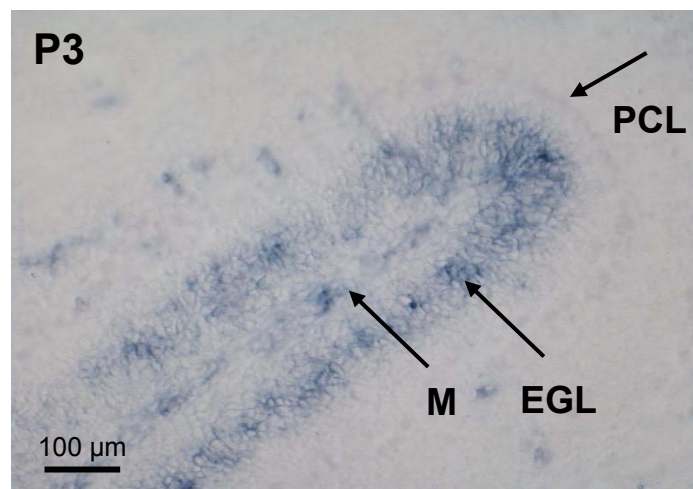


Abb. 3-17

Expression von *GLI1* und *SOX18* - verrechnet mit der Expression des Haushaltgens *Beta2-Microglobulin* - in humanen Rhabdomyosarkom- und Muskelproben. R-Nr. der jeweiligen Probe (s. Tab. 2-8).

3.10 Lokalisation der *sox18*-Expression während der normalen Kleinhirnentwicklung in der Maus

Nach der Identifizierung und Verifizierung von *sox18* als primäres und spezifisches Zielgen der Shh/Ptc-Kaskade in cerebellären Körnerzellvorläufern, nach Untersuchung zwei potentieller GLI1-Bindungsstellen, Expressionsanalysen während der normalen Kleinhirnentwicklung sowie in Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen, stellte sich die Frage nach der nativen *sox18*-Lokalisation im Kleinhirn. Dazu wurden mittels RNA *in situ* Hybridisierung murine Kleinhirnschnitte der postnatalen Tage P3, P5 und P8 mit einer *antisense sox18*-Probe hybridisiert. Das prominenteste Signal wurde an P3 beobachtet, während es an P5 und P8 in der Intensität deutlich abnahm. Die *sox18*-Expression war klar auf den inneren Bereich des EGL, sowie die Meningen beschränkt. In anderen Regionen des Kleinhirns wurde kein Signal detektiert. Gleiches galt für Hybridisierungen mit einer *sense sox18*-Probe als Negativkontrolle (Abb. 3-18).



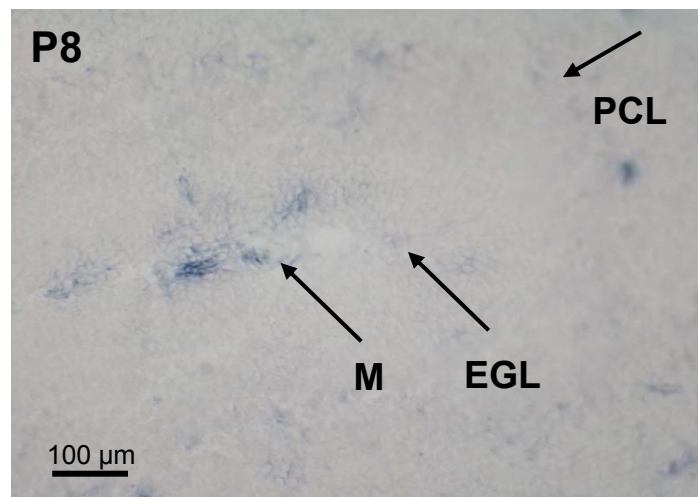


Abb. 3-18

RNA *in situ* Hybridisierung des murinen Kleinhirns mit einer *antisense sox18*-Sonde

Sagittal-geschnittene Sektionen des Cerebellums der Maus wurden mit einer *antisense sox18*-Sonde hybridisiert. Die Expression beschränkte auf den inneren Bereich des EGLs und die Meningen und nahm während der postnatalen Entwicklung ab. Abkürzungen: P3: postnataler Tag 3; P5: postnataler Tag 5; P8: postnataler Tag 8; PCL: Purkinjezellschicht; EGL: äußere Körnerzellschicht; M: Meningen.

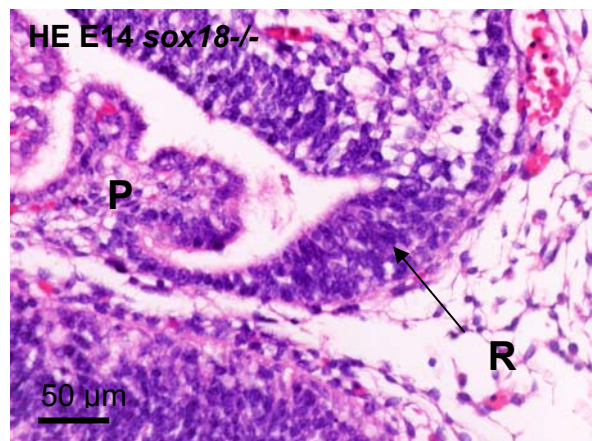
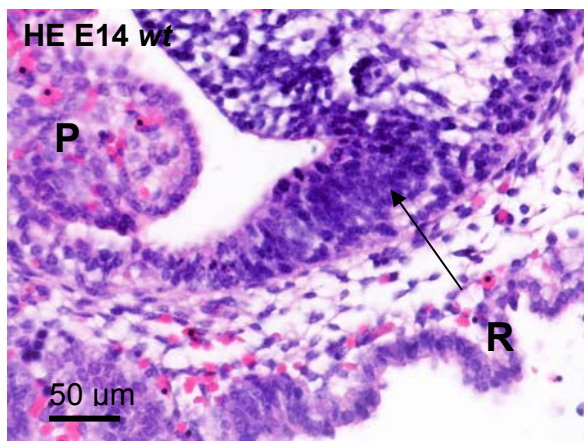
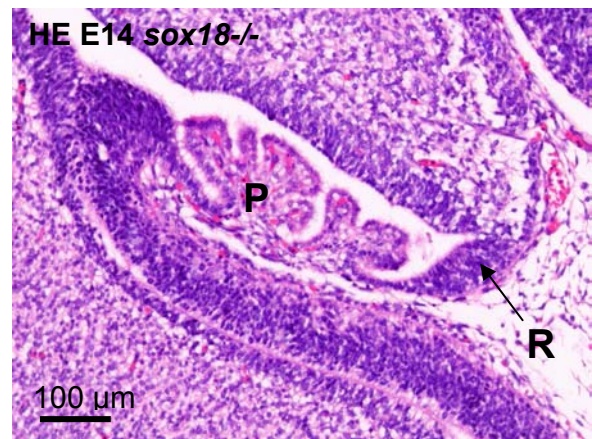
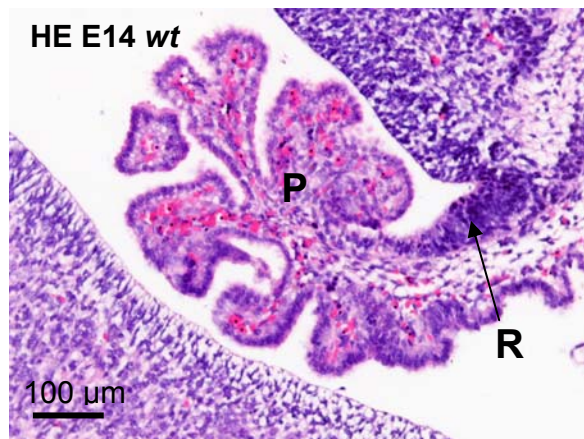
3.11 Shh-Responsivität von GCPs *sox18*-defizienter Mäuse

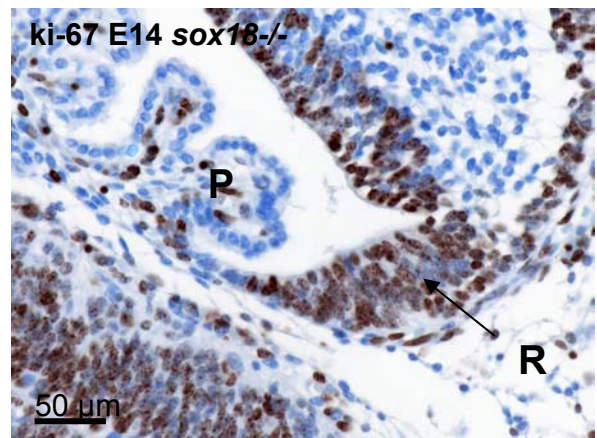
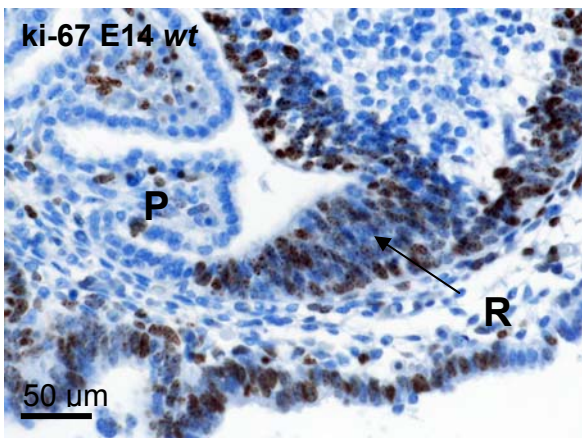
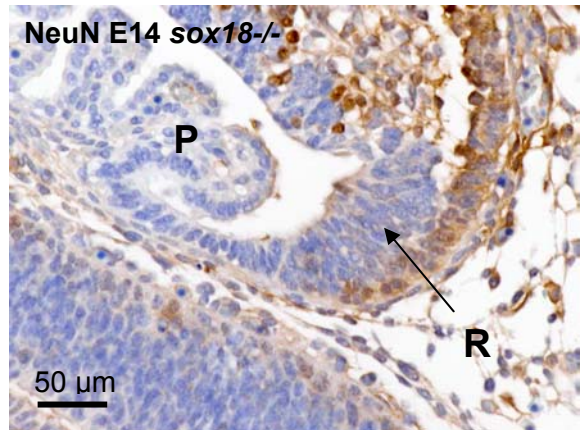
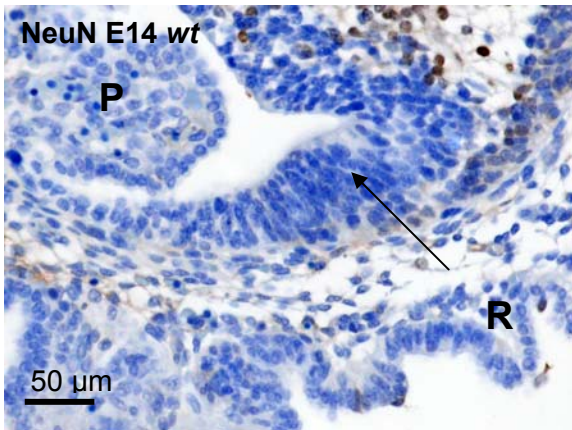
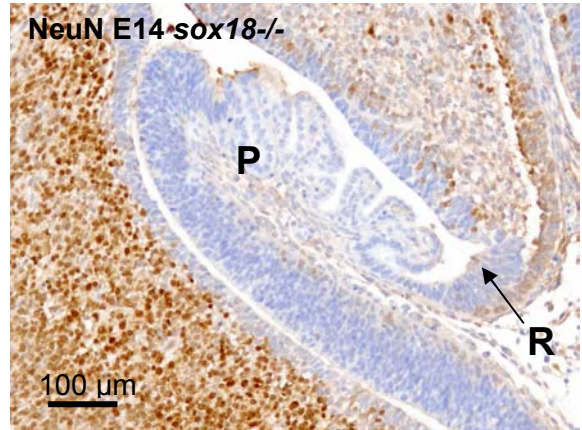
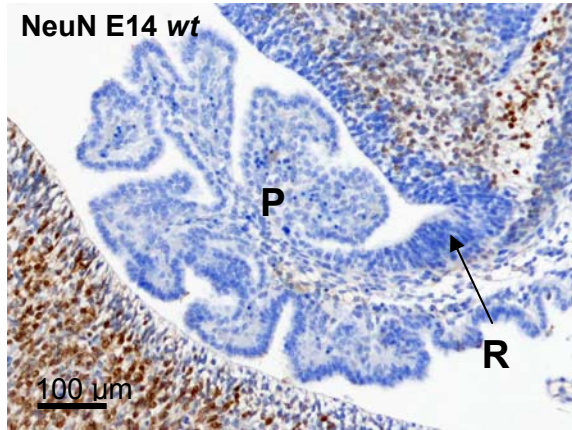
Um herauszufinden, ob *sox18* essentiell für eine Shh-induzierte Proliferation von Körnerzellvorläufern ist, wurde ein ³H-Thymidin-Inkorporations-Assay mit frisch präparierten P8 GCPs von *sox18*^{-/-} Knockout-Tieren durchgeführt. Das Experiment ergab, dass Shh-exponierte Zellen gegenüber nicht behandelten Zellen eine Proliferationsinduktion vom Faktor 16 (SE +/-1) zeigten und somit keinen signifikanten Unterschied zu den Versuchen mit Wildtypzellen aufwiesen.

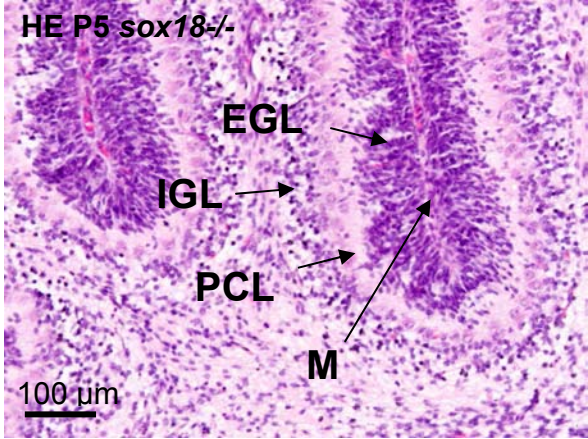
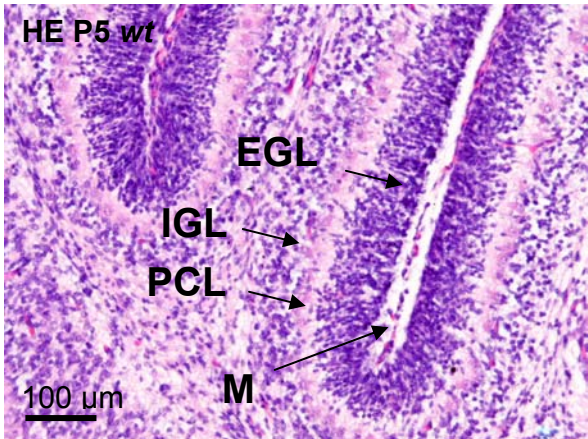
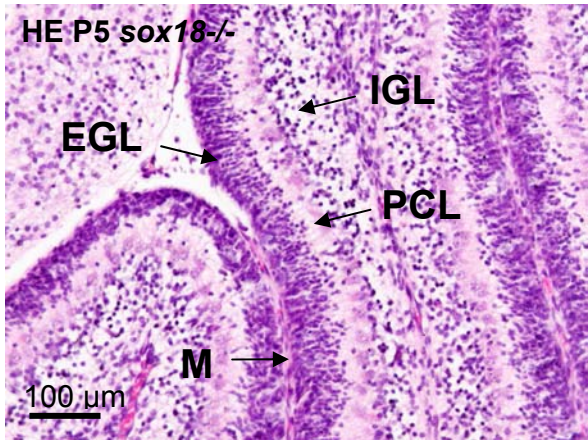
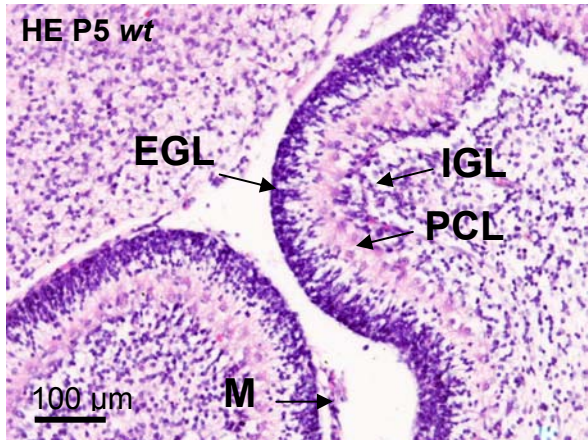
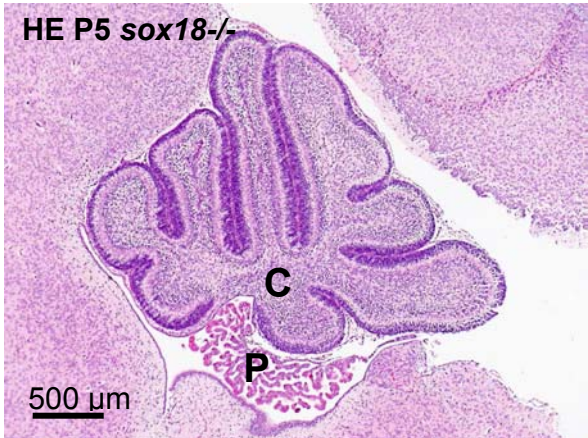
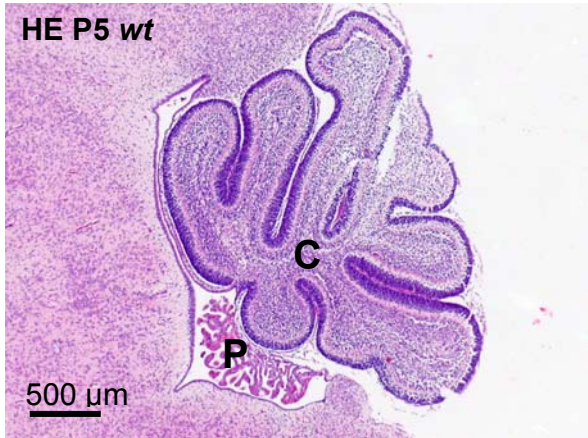
3.12 Histologische Untersuchung des Kleinhirns *sox18*-defizienter Mäuse

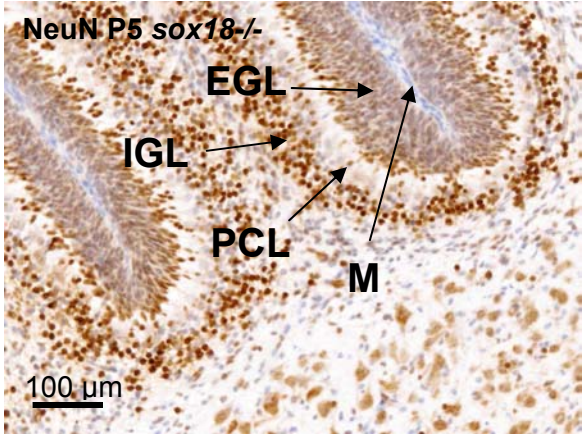
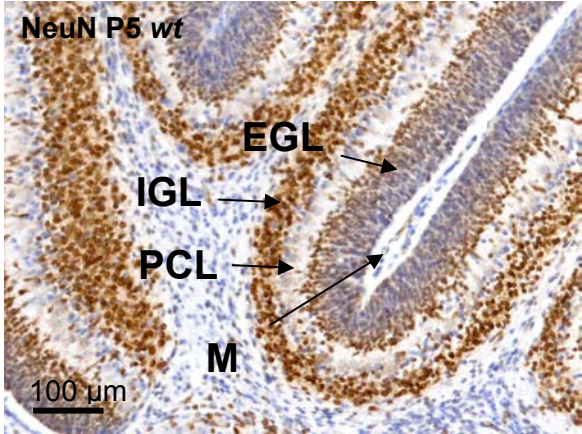
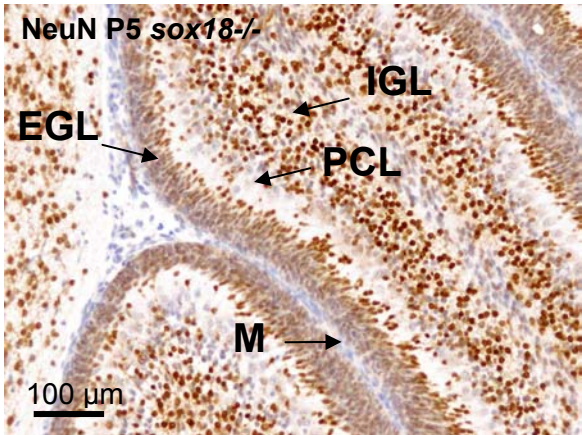
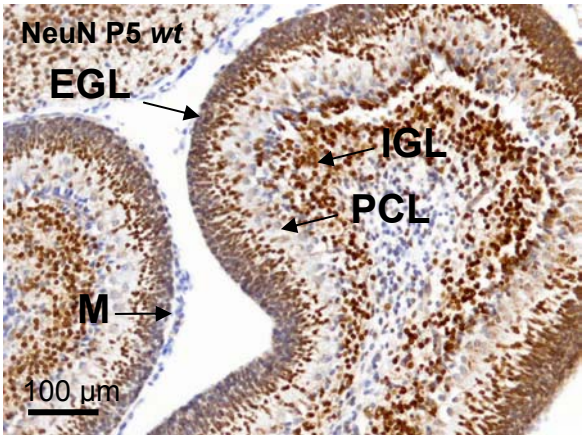
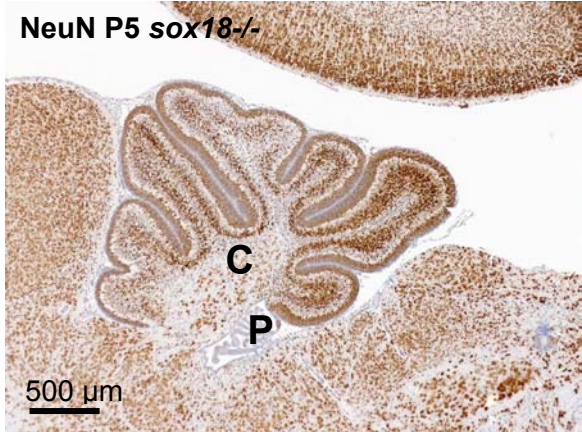
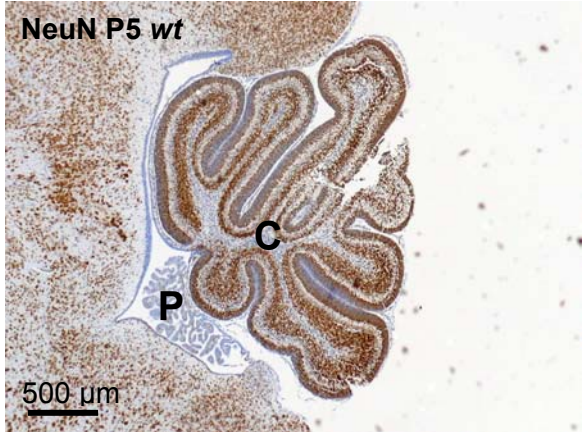
Obwohl *sox18* Knockout-Mäuse vital und fertil sind, sowie einen nur milden Fellphänotyp aufweisen und GCPs kein anormales Proliferationsverhalten zeigten, war es wichtig, die Kleinhirnentwicklung dieser Tiere näher zu charakterisieren. Dazu wurden Kleinhirnschnitte

der Entwicklungsstufen E14, P0, P5, P8, P15 sowie P30 angefertigt. Neben HE-Färbungen wurde die Expression des Proliferations-assoziierten Antigens ki-67 sowie des Differenzierungs-spezifischen Markers NeuN für alle Entwicklungszeitpunkte mittels Immunhistochemie dargestellt. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen konnten keine Anomalien in der Kleinhirnentwicklung *sox18*-defizienter Tiere festgestellt werden (Abb. 3-19).









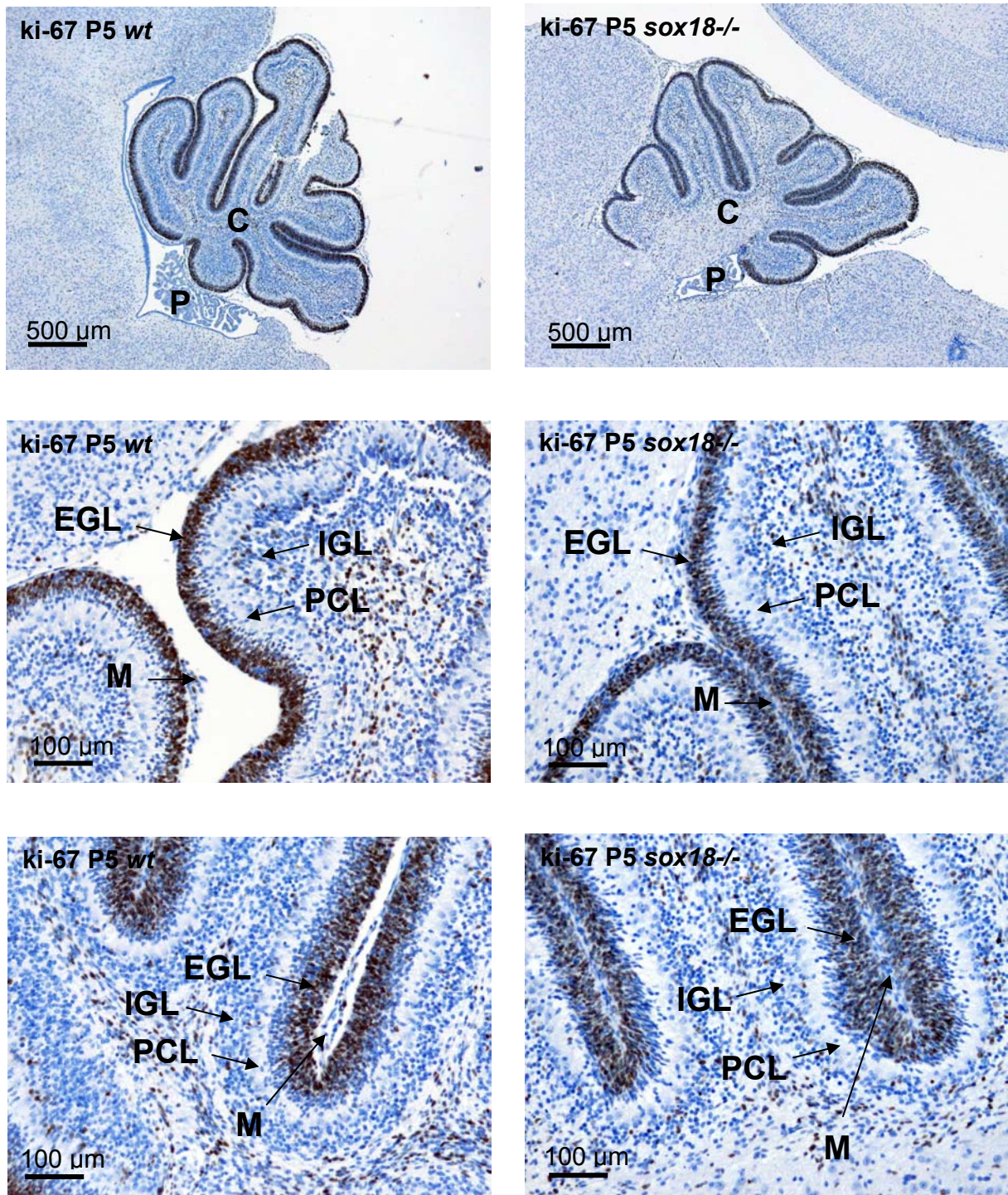


Abb. 3-19

Histologische Untersuchung des Cerebellums von *sox18*-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren

Sagittal-geschnittene Kleinhirne der Maus wurden immunhistochemisch gefärbt. Während am embryonalen Tag 14 Zellen der Rautenlippe - aus der das Cerebellum hervorgeht - stark proliferierten, beschränkte sich am postnatalen Tag 5 die Zellteilung auf das EGL, während die Zellen des IGL neuronale Differenzierung aufwiesen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kleinhirnen von Wildtyp-Tieren und *sox18* Knockout-Mäusen festgestellt. Abkürzungen: E14: embryonaler Tag 14; P5: postnataler Tag 5; HE: Hämalaun-Eosin; NeuN: neuraler Differenzierungsmarker; ki-67: Proliferationsmarker; P: Plexus choroideus, C: Cerebellum; M: Meningen; EGL: äußere Körnerzellschicht; IGL: innere Körnerzellschicht; PCL: Purkinjezellschicht

3.13 Shh-induzierte Proteinexpression von Deltex in GCPs

Ein weiteres, näher charakterisiertes Zielgen von Shh in GCPs der Maus ist *deltex1*. Als verifiziertes primäres, sowie spezifisches Transkript der Shh/Ptc-Signalkaskade wies es in der normalen Kleinhirnentwicklung seine stärkste Expression an Tag E17 auf. Durch den Dual-Luciferase-Assay konnte keine direkte Regulation durch den Transkriptionsfaktor Gli1 nachgewiesen werden. Durch Verwendung des anti-Drosophila-Deltex Antikörpers A 17 (K. Matsuno, Tokyo University of Science, Chiba, Japan) konnte die Shh-induzierte Proteinexpression in GCPs der Maus nachgewiesen werden. Im Vergleich zu nicht behandelten Zellen war die Menge von Deltex-Protein in Shh-stimulierten Zellen nach 24 h Kultivierung um den Faktor 1,7 erhöht. Dieser Effekt wurde durch Anwesenheit von Cyclopamin verhindert (Abb. 3-20).

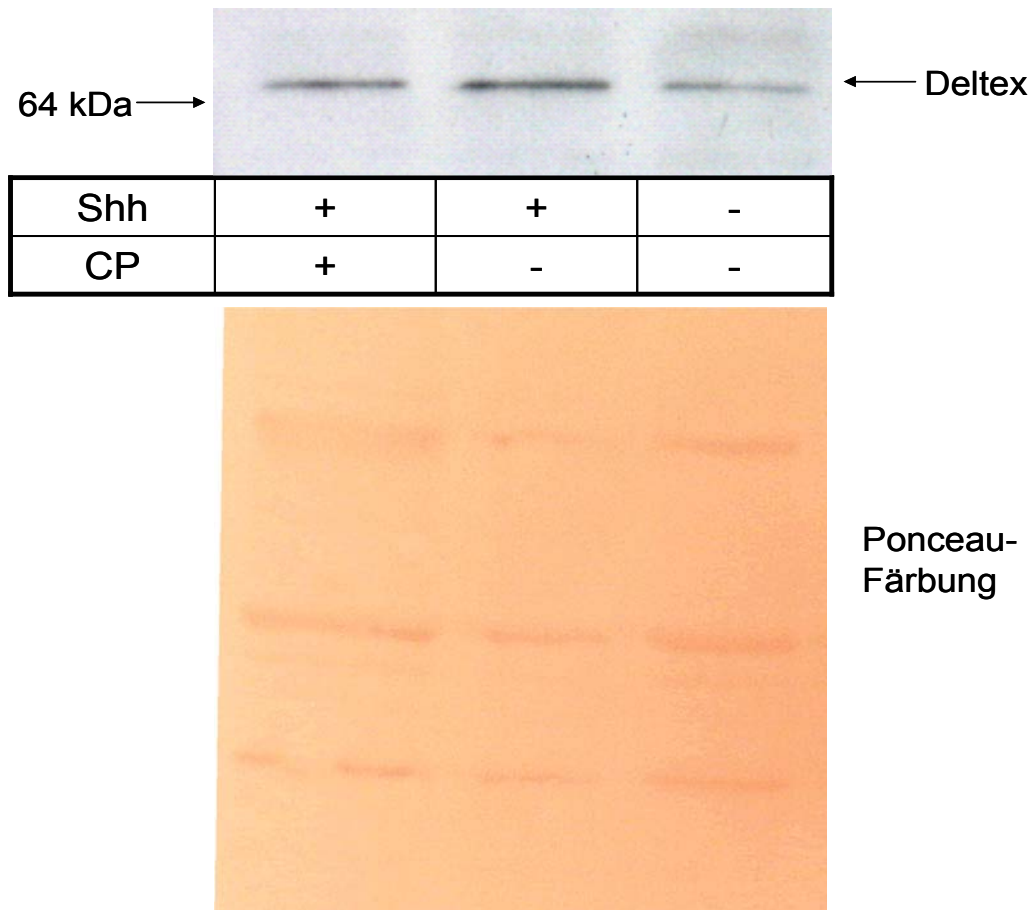


Abb. 3-20

Western Blot mit einem anti-Deltex-Antikörper

oben: Proteinnachweis von Deltex in Shh-stimulierten und unbehandelten GCPs nach 24 h Kultivierung. Die Shh-induzierte Translation von Deltex wurde in Anwesenheit von Cyclopamin (CP; 10 μ M) verhindert. Unten: Ponceau-Kontrollfärbung des Western Blot

3.14 Expressionsanalyse von Komponenten des Notch-Signalwegs in humanen Medulloblastomen

Deltex1 ist eine Komponente des Notch-Signalwegs. Nach Bindung eines membranständigen Liganden wird ein intrazellulärer Anteil des Rezeptors Notch abgespalten, der in Assoziation mit Deltex1 oder RBPJ in den Kern transloziert. Deltex1 verhindert durch Heterodimerisierung mit Kofaktoren proneuraler Transkriptionsfaktoren die Aktivierung von Zielgenen, während RBPJ die mRNA-Expression von *HES1* und *HES5* induziert. Die Genprodukte wiederum blockieren als Transkriptionsfaktoren die Expression pro-differentieller Gene, so dass sich die Notch-Kaskade mehrerer Mechanismen bedient, um in neuronalen Vorläuferzellen die Differenzierung zu inhibieren. Durch Expressionsanalysen der Gene *DTX1*, *NOTCH1*, *RBPJ*, *HES1* sowie *HES5* in humanen Medulloblastomen mittels cRT-PCR konnte eine signifikant erhöhte Expression von *HES5* in DMBs gegenüber CMBs nachgewiesen werden (beidseitiger Student's t-test: $p=0,0368$) (Abb. 3-21).

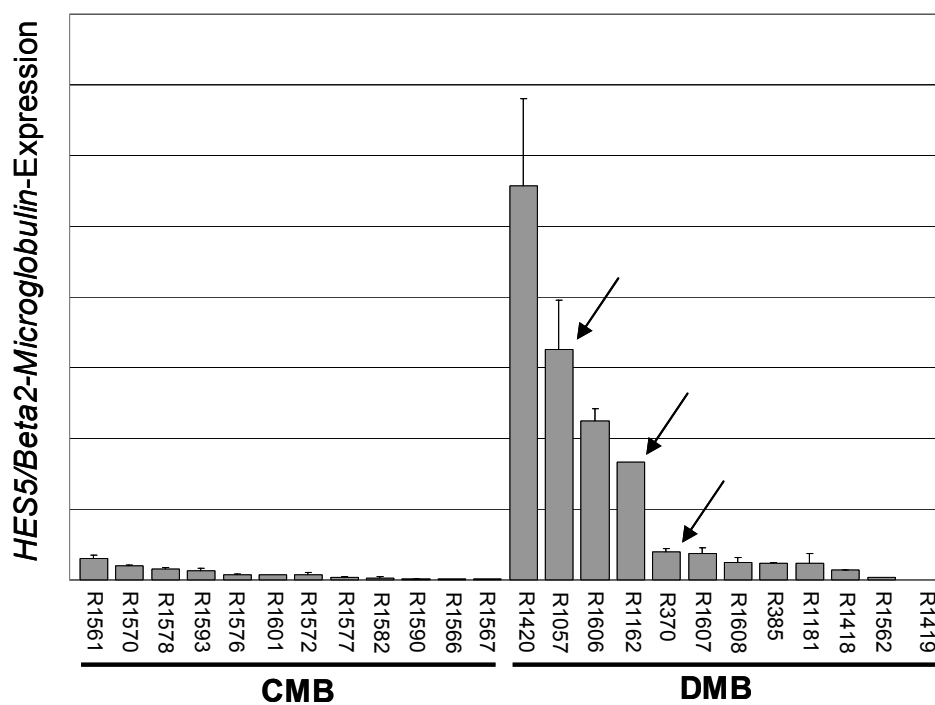


Abb. 3-21

Expression von *HES5* - verrechnet mit der Expression des Haushaltgens *Beta2-Microglobulin* - in humanen Medulloblastomen. Pfeile bezeichnen Proben mit nachgewiesener *PTCH*-Mutation. CMB: klassisches Medulloblastom; DMB: desmoplastisches Medulloblastom. R-Nr. der jeweiligen Probe (s. Tab. 2-7).

4 Diskussion

Die Natur ist sparsam; so bedient sie sich einer begrenzten Anzahl von Mechanismen, um eine Vielzahl von Prozessen zu steuern. Viele Signaltransduktionskaskaden sind evolutiv hoch konserviert, so dass Spezies-übergreifend ähnliche Abläufe vollzogen werden. Aber auch innerhalb eines Organismus kann ein einzelner Signalweg unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen.

Je nach Zelltyp koordiniert der Shh/Ptc-Signalweg so unterschiedliche Prozesse wie Zellschicksalsdeterminierung oder Proliferation (Ming et al., 1998; Wechsler-Reya and Scott, 1999; Toftgard, 2000). Wenn also Shh als Initiationssignal so gegensätzliche Prozesse steuert, stellt sich die Frage nach der molekularen Realisierung oder der Aktivierung spezifischer Zielgene in den jeweiligen Geweben. Im frühen postnatalen Stadium des sich entwickelnden Kleinhirns initiiert Shh in Körnerzellvorläufern Proliferation. Um bisher unbekannte Zielgene dieses Signalwegs in dieser Zellpopulation zu identifizieren, wurde ein Zellkultursystem primärer Körnerzellvorläufer der Maus herangezogen.

4.1 Die Shh-vermittelte Proliferation von Körnerzellprogenitoren ist abhängig von Zytokinen und Matrixproteinen

Wechsler-Reya und Scott entwickelten eine Kultivierungsmethode muriner Körnerzellvorläufer, um Proliferationseffekte durch Shh zu studieren (Wechsler-Reya and Scott, 1999). In enger Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Karl Schilling aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie gelang es, dieses System für die Fragestellungen dieser Arbeit zu etablieren. Dazu wurden P8 GCPs - wie im Methodenteil beschrieben - präpariert. Das verwendete Kulturmedium Neurobasal/B27 wurde bereits in Studien über neuronale Entwicklung und über Genexpression in Antwort auf Zytokine und andere bioaktive Substanzen verwendet. Es fördert das Wachstum neuronaler Zellen und reduziert das von Gliazellen (Brewer et al., 1993; Brewer, 1995). Um die Zuverlässigkeit des angewandten Zellkultursystems zu überprüfen, wurden zu jedem Stimulationsversuch mit Shh durch ³H-Thymidin-Inkorporations-Assay die Proliferationsinduktion und durch Duplex-PCR die Regulation des bekannten Zielgens *gli1* nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass das verwendete, in Bakterien rekombinant hergestellte Shh ohne posttranslationale Modifikationen bei einer Konzentration von 1,25 µg/ml ausreichte, um die gewünschten

Effekte zu erzielen. Die Stimulationsversuche wurden mit P8 GCPs durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die Proliferationsrate und die Responsivität auf Shh am höchsten sind.

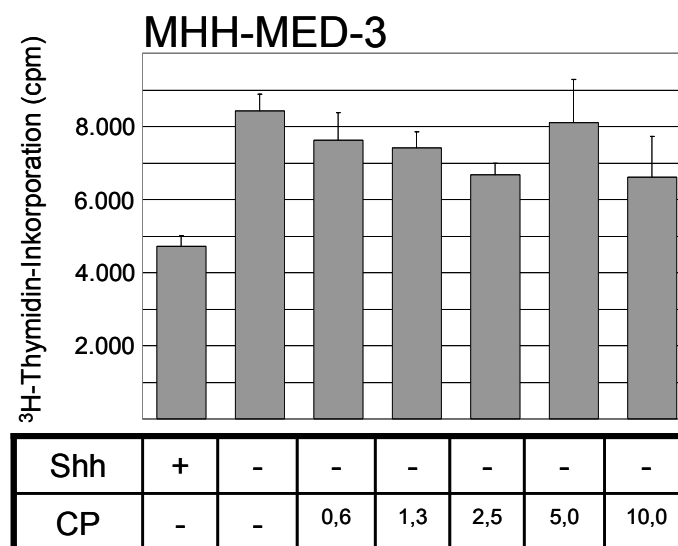
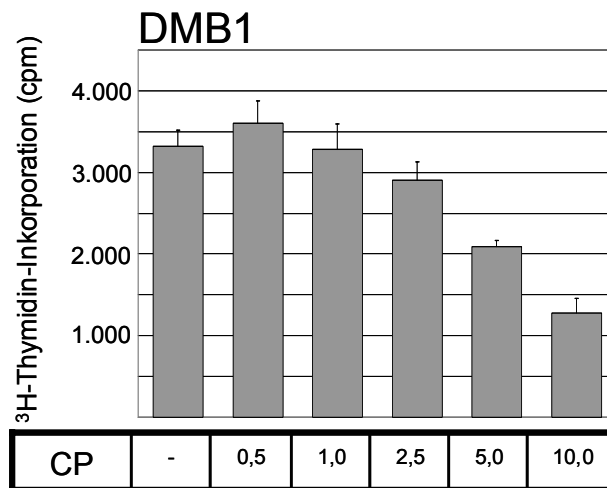
Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Faktoren untersucht, die im EGL vorkommen und die die Shh-induzierte Proliferation beeinflussen können. Um auszuschließen, dass extrazelluläre Matrixproteine, die als Zellkulturschalenbeschichtung in Frage kommen, einen eigenen Effekt auf die Zellteilungsrate haben, wurden verschiedene Beschichtungen ausgetestet. Im Gegensatz zu Poly-D-Lysin, Vitronectin oder Collagen S bewirkte die Anwesenheit von Laminin sowie Matrigel eine erhöhte Basalproliferation in Körnerzellvorläufern. Die Wirkung von Laminin auf GCPs wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. In Versuchen von Wechsler-Reya und Scott, sowie von Pons et al. zeigte sich, dass auf Laminin kultivierte GCPs eine 1,5- bis 2,0-fach höhere durch Shh induzierte Proliferation aufwiesen als stimulierte Zellen, die auf anderen Substraten ausgesät worden waren (Wechsler-Reya and Scott, 1999; Pons et al., 2001). Vitronectin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, welches vornehmlich im inneren Anteil des EGL auftritt (Pons et al., 2001). GCPs in dieser Region exprimieren alpha-V-Integrine, die als Vitronectin-Rezeptoren fungieren (Pons et al., 2001; Wechsler-Reya, 2001). Beobachtungen, dass Vitronectin eine Shh-induzierte Proliferation von GCPs bis zu 20% revertiert (Pons et al., 2001; Wechsler-Reya, 2001), konnten in unseren Versuchen nicht bestätigt werden. In ³H-Thymidin-Inkorporations-Versuchen zeigte die Zellkultur-bodenbeschichtung mit Vitronectin keine Änderung der Shh-induzierten Zellteilungsrate. Ebenso wurde die Wirkung zweier alpha-V-Integrin-Antagonisten getestet. Die Bindung von alpha-V-Integrinen an Vitronectin erfolgt über spezifische Aminosäure-sequenzwiederholungen des Triplets Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD). EMD 121974 ist ein zyklisches RGD-Penta-Peptid, welches als alpha-V-Integrin-Antagonist in DAOY-Zellen Apoptose initiiert (Taga et al., 2002). Weder die Zugabe von EMD 121974, noch die Verwendung eines anti-alpha-V-Integrin-Antikörpers beeinflusste signifikant die Shh-induzierte Proliferation in GCPs, so dass die Ergebnisse darauf hinweisen, dass die in diesem Versuchsansatz verwendeten P8 GCPs nicht Vitronectin-responsiv sind und dass das extrazelluläre Matrixprotein in dem für diese Arbeit gewählten Zellkultursystem keinen signifikanten Einfluss hat. Da im Vergleich zu anderen Beschichtungen Poly-D-Lysin keinen eigenen Einfluss auf die Proliferationsrate der kultivierten GCPs zu haben scheint, wurde in den sich anschließenden Versuchen mit dieser Substanz gearbeitet.

Zu den Stoffen, denen ein synergistischer Effekt mit Shh zugesprochen wird, zählt SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1 alpha). Das Chemokin wird von Zellen der Pia mater

produziert, die das EGL umgibt, wohingegen sein Rezeptor CXCR4 von GCPs des EGL exprimiert werden. Nach heutigem Wissensstand ist SDF-1 α der einzige Ligand von CXCR4 und CXCR4 der einzige Rezeptor für SDF-1 α . Sowohl CXCR4-defiziente Tiere als auch SDF-1 α Knockout-Mäuse zeigen im Kleinhirn eine irreguläre Organisation des EGL ohne erkennbare Einfaltungen und mit ektopisch lokalisierten Purkinjezellen (Ma et al., 1998), so dass dem System eine wesentliche Rolle in der Kleinhirnentwicklung zugesprochen werden kann. In ^3H -Thymidin-Inkorporations-Versuchen konnte die Shh-induzierte Proliferation von GCPs durch Anwesenheit von SDF-1 α gesteigert werden; die Zugabe von Pertussis-Toxin revertierte diesen Effekt wieder (Klein et al., 2001). Klein et al. gehen davon aus, dass SDF-1 α über eine $G\alpha_i$ -Einheit die Proteinkinase A inhibiert und so die Shh-induzierte Proliferation verstärkt. Um herauszufinden, ob diese Synergie auch in Zellen existiert, die den Zellzyklus bereits verlassen haben, wurden GCPs zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Shh und/oder SDF-1 α stimuliert. SDF-1 α konnte weder alleine noch in Anwesenheit von Shh bereits aus dem Zellzyklus ausgetretene GCPs in die Proliferation zurückbringen, was darauf schließen lässt, dass der synergistische Effekt von SDF-1 α und Shh auf proliferierende Zellen beschränkt ist.

Im Gegensatz zu synergistisch zu Shh wirkenden Stoffen ist Cyclopamin ein steroides Alkaloid, welches den Hh/Ptc-Signalweg blockieren kann. Seine teratogene Wirkung wurde erstmals durch embryonale Fehlbildungen in einer Schafspopulation in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts offensichtlich. Schwangere Schafe, die eine besondere Lilienart (*Veratrum californicum*) verzehrt hatten, bekamen oft Nachkommen mit schwersten Missbildungen wie Holoprosencephalie oder Cyclopienbildung; ein Phänotyp, der auch bei Shh-defizienten Mäusen zu beobachten ist (Binns et al., 1962; Chiang et al., 1996). Cyclopamin inhibiert den Hh/Ptc-Signalweg durch direkte Bindung an den transmembranalen Anteil von Smoothed und hebt somit die Wirkung von Shh auf (Chen et al., 2002). Taipale et al. zeigten in Fibroblasten *ptc*-defizienter Mäuse, in denen das *Beta-Galactosidase*-Gen unter der Kontrolle des *ptc*-Promotors steht, dass die Gabe von von 1 - 10 μM Cyclopamin ausreicht, um die konstitutive Reporterogenaktivität zu supprimieren (Taipale et al., 2000). Die in dieser Arbeit durchgeführte Cyclopamin-Titrationsreihe in GCPs zeigte, dass Konzentrationen von 2,5 - 10 μM ausreichten, die Shh-initiierte Proliferation zu inhibieren, ohne dabei zelltoxisch zu sein. Somit stellt Cyclopamin ein wertvolles Argenz für den in dieser Arbeit gewählten Zellkulturansatz zur Identifizierung Shh-spezifischer Zielgene dar. Darüber hinaus konnte die Wirkung von Cyclopamin auf die Proliferation eines frisch explantierten desmoplastischen Medulloblastoms gezeigt werden. Im Gegensatz zu Zelllinien

klassischer Medulloblastome bewirkte die steigende Zugabe des Teratogens eine Abnahme der Zellteilung dieses DMB, was nochmals darauf hindeutet, dass die Shh/Ptc-Kaskade nur in der desmoplastischen Variante des Medulloblastoms eine Rolle zu spielen scheint (Abb. 4-1). Somit ist auch für therapeutische Ansätze ein genaueres Verständnis für den Signalweg, seine gewebspezifischen Zielgene und potentielle Inhibitoren von großem Interesse.



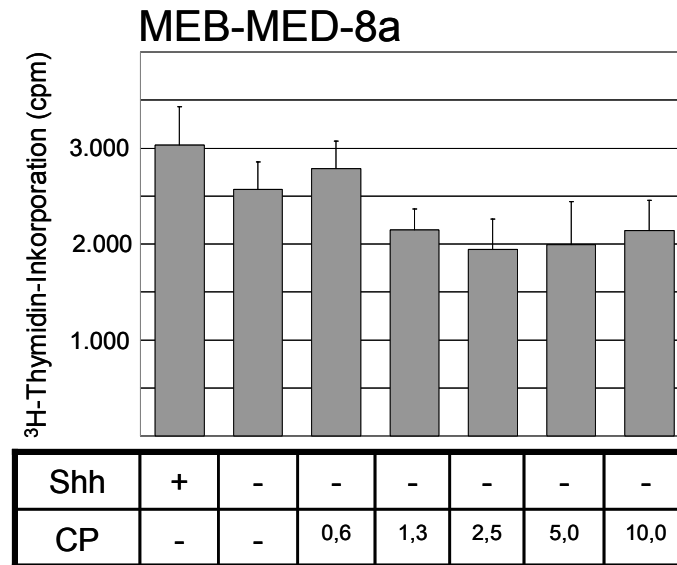


Abb. 4-1

Überprüfung der Wirkung von Cyclopamin auf die Proliferation eines humanen DMB

Die zunehmende Konzentration (in μM) von Cyclopamin (CP) inhibiert die Zellteilung des Primärtumors DMB1. In den zwei aus klassischen Medulloblastomen hervorgegangenen Zelllinien MHH-MED-3 und MEB-MED-8a zeigte sich keine Proliferationsänderung durch die Anwesenheit von CP oder Shh.

Ein natürlich vorkommender Inhibitor Shh-induzierter Proliferation ist PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide). Es wird von Purkinjezellen sezerniert (Nielsen et al., 1998; Skoglosa et al., 1999), und sein Rezeptor PACAP-R wird von GCPs des äußeren EGL exprimiert. Intrazellulär bewirkt die Liganden/Rezeptor-Bindung die Aktivierung der Adenylatcyclase und der Phospholipase C (Basille et al., 1993). In Neuronen des embryonalen Cortex oder des Hinterhirns kann PACAP die Proliferation inhibieren (Suh et al., 2001; Lelievre et al., 2002), während andere Studien eine PACAP-abhängige Proliferationszunahme von GCPs des Kleinhirns beschreiben (Vaudry et al., 1999; Tabuchi et al., 2001; Vaudry et al., 2002). In dieser Arbeit durchgeführte ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assays zeigten eindeutig den inhibitorischen Effekt von PACAP auf eine Shh-induzierte Proliferation in P8 GCPs der Maus. Duplex-PCRs zeigten allerdings, dass PACAP nicht die Shh-abhängige mRNA-Induktion von *gli1* beeinflusst. Durch DNA Microarray-Hybridisierung gewonnene Daten von Shh-stimulierten und in An- bzw. Abwesenheit von PACAP kultivierten Körnerzellvorläufern gaben hingegen keine auswertbare Auskunft über die *gli1* mRNA-Expression. Insgesamt kann man schließen, dass PACAP die Shh/Ptc-Kaskade hemmen kann, ohne dabei die *gli1*-Transkription zu beeinflussen. Um herauszufinden, ob andererseits Shh die Transkription von PACAP-Rezeptoren beeinflusst, wurde die Expression unterschiedlicher Spleiß-Varianten untersucht. Dabei wurde sich an einer Arbeit von D'Agata

et al. orientiert, in der zu postnatalen Entwicklungszeitpunkten des Rattenhirns die Transkription verschiedener PACAP-R-Isoformen untersucht wurden (D'Agata et al., 1996). Die Anwesenheit der Kassetten *Hip* und *Hop* in der PACAP-R-Sequenz scheint die Interaktion mit verschiedenen G-Proteinen zu beeinflussen (Spengler et al., 1993). Dass mittels RT-PCR keine Expressionsunterschiede von PACAP-R-Isoformen zwischen Shh-stimulierten und unstimulierten GCPs aufgezeigt werden konnten, weist nicht darauf hin, dass Shh über eine Modulation der Spleiß-Varianten des Rezeptors dem anti-proliferativen Effekt von PACAP entgegensteuert.

4.2 Shh reguliert in Körnerzellvorläufern eine Vielzahl von Transkripten

Die DNA Microarray-Technik ermöglicht es, die Expression zahlreicher Transkripte in einem einzigen Versuchsansatz simultan zu messen. In dem verwendeten Chip-System Mu74Av2 (Affymetrix) ist jedes Transkript als so genanntes *perfect match* (PM) und *mismatch* (MM) durch bis zu 16 verschiedene Sequenzen repräsentiert. Da die MMs eine Oligonukleotidsequenz mit einem singulären Basenaustausch darstellen, kann durch die Bindung eines Fluoreszenz-markierten Transkripts an die PM- bzw MM-Sequenz die Spezifität der Hybridisierung bestimmt werden. In der herkömmlichen Datenauswertungs-Software von Affymetrix werden alle PM- bzw. MM-Datenpunkte einer Hybridisierung gemittelt. In dieser Arbeit wurde eine von Herrn Dr. Henrik Seidel (Corporate Research, Schering AG, Berlin) entwickelte Software zur Auswertung der Rohdaten verwendet. Dabei wurden die Datenpunkte einer Hybridisierung nicht direkt gemittelt, sondern es wurden die Hybridisierungen aus zwei unabhängigen Versuchen für jede PM- bzw. MM-Sequenz unter der Verwendung der Formel: $\text{expression ratio} = (\text{PM}_I - \text{MM}_I) / (\text{PM}_{II} - \text{MM}_{II})$ verglichen. Nur Probenpaare, bei denen in beiden Experimenten die Hybridisierungen mit dem PM deutlich stärker waren als mit dem MM, wurden zur Auswertung herangezogen, so dass eine strenge Bewertung der Rohdaten der Auswertung zu Grunde lag. Als Schwellenwert für eine signifikante Regulation eines Transkripts wurde ein Faktor (ratio) von 1,4 festgelegt.

mRNA Shh-stimulierter und nicht stimulierter GCPs wurde nach unterschiedlich langer Kultivierung hybridisiert. Durch den Vergleich der Expression eines Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnten Hinweise auf die Art der Regulation gewonnen werden. Nach 3 h Kultivierung erschienen 0,7% aller 12.000 auf dem Array repräsentierten Transkripte reguliert (0,2% heraufreguliert; 0,5% herunterreguliert). Allerdings muss man berücksichtigen, dass zu diesem Zeitpunkt das Transkriptom der Zellen nicht nur von der An-

bzw. Abwesenheit von Shh, sondern auch durch die Stressantwort auf die Präparation und Inkulturnahme beeinflusst wird. Nach 7 h Kultivierung waren 2,6% (1,7% heraufreguliert; 0,9% herunterreguliert) aller Transkripte moduliert. Da davon ausgegangen werden kann, dass zu diesem Zeitpunkt der mRNA-Pool viele früh regulierte Transkripte umfasst und der adaptive Stress der Zellen stark abgenommen hat, wurde auf die Ergebnisse des 7 h-Ansatzes fokussiert. 2,8% der repräsentierten Transkripte waren nach 18 h reguliert (2,1% heraufreguliert; 0,7% herunterreguliert), wobei hier auch sekundäre Regulationseffekte eine Rolle spielen werden. Die Zugabe des Translationshemmers Cycloheximid zum 7 h-Ansatz hatte zum Zweck, primäre Zielgene des Shh/Ptc-Signalwegs zu identifizieren; also solche, deren Regulation nicht von einer vorherigen Bioproteinsynthese abhängig ist. Für 0,9% aller Transkripte traf dies zu (0,7% heraufreguliert; 0,2% herunterreguliert), so dass fast 1/3 aller modulierten Transkripte primär reguliert erschien. Mit Hilfe des Signalweg-spezifischen Inhibitors Cyclopamin sollten spezifische Zieltranskripte der Shh/Ptc-Kaskade identifiziert werden. 0,5% aller Transkripte erschienen nach Zugabe des Teratogens zu Shh-stimulierten Zellen reguliert. Dabei wurden 0,1% heraufreguliert, während 0,4% herunterreguliert wurden. Damit konnte die Expression von ca. 1/4 aller Shh-induzierten Transkripte durch Cyclopamin unterbunden werden.

Zwei aktuelle Veröffentlichungen befassen sich ebenfalls mit der durch Shh induzierten Zielgenaktivierung in GCPs der Maus mittels Microarray-Technik. Zhao et al. kultivierten eine Mischpopulation von P4-5 GCPs für 3 und 24 h, sowie zu einem postmitotischen Zeitpunkt in An- bzw. Abwesenheit von Shh. Unter den 76 Transkripten, die sowohl nach 3 h als auch nach 24 h reguliert erschienen, befanden sich *cyclin D1*, *N-myc*, *e2f1*, sowie *mini chromosome maintenance deficient*, die auch in der vorliegenden Arbeit per Microarray detektiert wurden (Zhao et al., 2002). Diese relativ geringe Überschneidung weist darauf hin, dass neben dem gewählten Entwicklungszeitpunkt auch die Dauer der Kultivierung einen entscheidenden Einfluss auf die beobachtete Genexpression hat. Die Versuchsansätze in dieser Arbeit und von Oliver et al. ähneln sich dagegen in vielen Punkten. Dort wurden zur Identifizierung Shh-responsiver Transkripte P7 GCPs 6 h kultiviert. So wurden auch dort Gene wie *atamts*, *N-myc*, *cyclin D1*, *hippocalcin*, *deltex1* und *igfbp5* als moduliert identifiziert (Oliver et al., 2003). Allerdings wurde weder durch Zhao noch durch Oliver *sox18* als Zielgen identifiziert, welches in dieser Arbeit das am stärksten von Shh regulierte Gen repräsentiert. Dies ist interessant, da *sox18* auf dem von beiden Gruppen verwendeten Chip Mu11K repräsentiert ist. Allerdings beinhaltet dieser Vorläuferchip des von uns verwendeten

Mu74Av2-Chips (Affymetrix) nicht das *gli1*-Transkript, was das Ausbleiben der Regulation dieses bekannten Zielgens erklärt.

Im Gegensatz zur DNA Microarray-Hybridisierung ist die Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH) eine Methode, um in verschiedenen Zellpopulationen differentiell exprimierte Transkripte auch auf niedrigem Expressionsniveau (einige Moleküle pro Zelle) zu identifizieren (Diatchenko et al., 1996). Daher wurde sie als komplementäre Methode herangezogen, um Zielgene aufzufinden, die mittels Chip-Technik nur schwer zu detektieren sind. Gegenüber ähnlichen Ansätzen wie *representational difference analysis* oder *differential display* hat SSH den Vorteil, dass nur eine einzige, selektive Hybridisierung ohne vorherige Trennung doppel- und einzelsträngiger cDNA nötig ist, um selten auftretende Transkripte exponentiell zu amplifizieren.

Unter Verwendung von 7 h kultivierten, Shh-stimulierten bzw. unstimulierten GCPs wurden mittels SSH 6 potentielle Zielgene isoliert. Interessanterweise befand sich kein bereits bekanntes Zielgen wie *gli1* oder *cyclin D1* unter den Kandidaten der 382 gepickten Klone. Weiterhin war - bis auf *spindlin* - keines der mit dieser Methode isolierten Transkripte auf dem DNA Microarray repräsentiert, was den Vorteil der Anwendung komplementärer Ansätze unterstreicht.

4.3 Neu identifizierte Zielgene können mit unabhängigen Methoden bestätigt werden

Da bei der DNA Microarray-Hybridisierung und der SSH nicht auszuschließen ist, dass falsch positive Kandidaten generiert werden, wurde als Verifizierungsmethode der gewonnenen Daten die kompetitive RT-PCR herangezogen. Dabei werden exogene Kompetitoren verwendet, die sich lediglich durch eine interne Deletion von 10 bis 20 Basen von den jeweiligen Zielfragmenten unterscheiden und nach reverser Transkription in der PCR mit den jeweils gleichen Primern amplifiziert werden. Somit ist die Methode unabhängig von Differenzen in der Effizienz verschiedener PCR-Reaktionen. Durch Abgleich der ermittelten Expressionswerte mit der Expression eines Haushaltsgens können mögliche Unterschiede hinsichtlich der eingesetzten Menge an RNA und ihrer Qualität ausgeglichen werden. Auch bei größeren Differenzen des Expressionsniveaus zweier zu vergleichenden Proben kann durch Verwendung verschiedener Titrationsstufen mit unterschiedlichen Kompetitor-Konzentrationen eine genaue Analyse durchgeführt werden. Im Gegensatz zu anderen Methoden der Genexpressionsanalyse, wie beispielsweise dem Northern Blot, werden für die

cRT-PCR lediglich 250 ng gesamtzelluläre RNA als Ausgangsmaterial benötigt. Je nach Zugabe verschiedener Kompetitoren reichen diese 250 ng gesamtzelluläre RNA aus, um eine Vielzahl von Genexpressionen zu untersuchen. Im Gegensatz zur *Real-time PCR* findet die Expressionsanalyse nach elektrophoretischer Größenauffrennung der amplifizierten PCR-Produkte statt. Durch Verwendung eines mitlaufenden Längenstandards kann die Größe der PCR-Produkte festgestellt werden, so dass die Gefahr der Messung unspezifischer Amplifikationsprodukte nahezu ausgeschlossen ist. Wie bei der Validierung der DNA Microarray-generierten Daten war es notwendig, einen Schwellenwert zu definieren. Expressionsunterschiede unterhalb des Faktors 1,5 wurden als nicht signifikant betrachtet.

Aus der Menge der durch DNA Microarray identifizierten Transkripte wurde die Expression einer Auswahl von 15 Genen mittels cRT-PCR analysiert. Außer für *cdc46*, *nucleolin*, *mmp11* sowie *spindlin* konnte für die verbleibenden 11 Kandidaten eine Shh-induzierte Regulation bestätigt werden. Dazu zählten auch die bekannten Zielgene *gli1* und *cyclin D1*. Neben der Überprüfung der Shh-Responsivität nach 3, 7 und 18 h Kultivierung wurde auch die Expression nach Gabe von Cycloheximid und Cyclopamin verifiziert. In der bereits erwähnten Arbeit von Oliver et al. wurde ebenfalls Cycloheximid zur Identifizierung primärer Transkripte verwendet. Bei der Verifizierung mittels Northern Blot wurden die Gene *cyclin D1* und *N-myc* analysiert. Während die mRNA-Induktion von *cyclin D1* durch Shh in Anwesenheit von Cycloheximid unterbunden wurde, war die Induktion von *N-myc* nicht von einer vorherigen Bioproteinsynthese abhängig. In dieser Arbeit erschienen dagegen sowohl *cyclin D1* als auch *N-myc* als primäre Transkripte. Weiterhin konnte durch die Zugabe von Cyclopamin gezeigt werden, dass zwar *cyclin D1* aber nicht *N-myc* ein spezifisches Zielgen darstellt. Oliver et al. zeigten, dass retrovirale Überexprimierung von *N-myc* ausreicht, um in GCPs Proliferation zu induzieren. Interessanterweise zeigen unsere Ergebnisse, dass Cyclopamin die Proliferation von GCPs blockieren kann, ohne dass dabei die *N-myc* mRNA-Expression betroffen ist. Daraus kann geschlossen werden, dass neben *N-myc* noch andere Komponenten die Shh-induzierte Proliferation steuern.

Ein weiterer verifizierter Kandidat ist *hippocalcin*. Als Apoptose-assoziiertes Protein ist Hippocalcin Mitglied einer Familie neuronenspezifischer, Calcium-bindender Proteine (Takamatsu and Noguchi, 1993). Es existieren nur wenige Expressionsstudien von *hippocalcin* im sich entwickelnden und adulten Hirn (Saitoh et al., 1993; Saitoh et al., 1994). Es wurde beschrieben, dass Hippocalcin in Verbindung mit NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) Neuronen gegen Calcium-induzierten Zelltod schützen kann (Mercer et al.,

2000). Daher ist es möglich, dass Shh durch die Induktion von Genen wie *hippocalcin* proliferierende GCPs vor Apoptose bewahren kann.

Zwar wurden von den 6 durch SSH identifizierten Kandidaten nur 2 verifiziert, allerdings wurde *cct4* als sowohl primäres als auch spezifisches Zielgen bewertet, während *ptbp2* nur im 7 h-Versuch reguliert erschien. Ptbp2 (Polypyrimidine tract binding protein 2) ist eines von drei Isoformen von Ptb/p57/hnRNP1, einer Proteinfamilie, die im RNA-Spleißen sowie Shuttling zwischen Zellkern und Cytoplasma involviert ist. Neben anderen Hirnarealen wird das *ptbp2*-Transkript während der Entwicklung des EGL exprimiert. (Lillevali et al., 2001). Das Genprodukt von *cct4* (*chaperonin subunit 4*) ist eines von 8 Untereinheiten des CCT/TRiC-Komplexes, der an der Proteinfaltung von Tubulin, Aktin und anderen cytosolischen Proteinen beteiligt ist. Mutationen im *cct4*-Gen der Ratte wurden mit dem *mf*-Mutanten in Verbindung gebracht, welcher Neuropathien wie Ataxie, Schmerzunempfindlichkeit sowie massive Reduktion der Anzahl sensorischer Ganglien aufweist. Daher wird dieses Tiermodell zur Erforschung der menschlichen, vererbten, sensorischen Neuropathie (human hereditary sensory neuropathy; HSN) herangezogen. Zwar konnte noch keine *CCT4*-Mutation in HSN-Patienten nachgewiesen werden (Lee et al., 2003), dennoch weist der Phänotyp der *mf*-Mutante auf eine wesentliche Rolle von *cct4* in Nervenzellen hin.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse zum einen, dass es nötig ist, durch Hybridisierungsmethoden generierte Daten zu überprüfen und zu anderen, dass mit der Bestätigung von 11 aus 15 Kandidaten (73%) die DNA Microarray-Hybridisierung wesentlich weniger falsch positive Kandidaten hervorbringt als die SSH mit nur 2 von 6 bestätigten Genen (33%).

4.4 Verifizierte Zielgene tragen potentielle Gli1-Bindungsstellen im proximalen Bereich ihres Translationsstartcodons

Zwei aktuelle Veröffentlichungen zeigen die Gewebsspezifität einer Gli1-regulierten Zielgenaktivierung. So wiesen Sasaki und Kollegen die Gli1-abhängige Induktion von HNF-3beta (Hepatocyte Nuclear Factor-3beta) in der neuronalen Stammzelllinie MNS70 der Ratte nach, während Yoon et al. nach Überexpression von Gli1 in der Rattenzelllinie RK3E Zielgene identifizierten und eine Gli1-Interaktion mit Bindungsmotiven der Gene *cyclin D2*, *IGFBP6*, *osteopontin* und *plakoglobin* nachweisen konnten (Sasaki et al., 1997; Yoon et al., 2001).

Um zu klären, ob in dieser Arbeit identifizierte Zielgene der Shh/Ptc-Kaskade in Körnerzellvorläufern der Maus direkt vom Signalweg-spezifischen Transkriptionsfaktor Gli1 kontrolliert werden, wurden die im proximalen Bereich des jeweiligen Translationsstartcodons detektierten potentiellen Bindungsstellen mittels Dual-Luciferase-Assay in DAOY-Zellen überprüft. Obwohl diese Zelllinie von einem desmoplastischen Medulloblastom herrührt (Jacobsen et al., 1985), zeigten die DAOY-Zellen keine interne Gli1-Aktivität, da die alleinige Transfektion des Reporterplasmids mit einer direkten 8-fachen Wiederholung der Gli1-Consensus-Bindungssequenz (p8xGliBS) keine Induktion des Reportergens bewirkte. Kotransfektion mit einem hGli1-Expressionsvektor hingegen zeigte eine eindeutige Induktion. Insgesamt wurden 4 primäre und 4 nicht-primäre Zielgene von Shh in GCPs der Maus untersucht. Dabei unterschieden sich bei 6 Genen die Motive teils minimal von den bereits bekannten Bindungssequenzen 5'-gaccacca-3' und 5'-gaacacca-3' (Kinzler and Vogelstein, 1990; Sasaki et al., 1997). Da Gli1 und Gli3 dieselben Erkennungssequenzen haben, wurde auch der potentielle Einfluss von Gli3 auf die Regulation der Zielgene durch Kotransfektionen des Gli3-Expressionsvektors untersucht; allerdings war keine Regulation erkennbar. Im Fall von *cct4* wurde nach Kotransfektion von Test-Konstrukt und Gli1-Expressionsvektor eine Reporteragenaktivierung festgestellt, die im Gegensatz zur Positivkontrolle relativ schwach ausfiel. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Positivkontrolle - also die Kotransfektion des Gli1-Expressionsvektors und p8xGliBS - durch das Vorliegen einer 8-fachen Wiederholung des Bindungsmotivs eine weitaus effizientere Gli1-Bindung hervorrufen konnte. Die Verdünnung dieses Reporterplasmids von 1:100 bewirkte hingegen eine mit dem *cct4*-Konstrukt vergleichbare Induktion des Luciferasegens. Eine ausbleibende Zielgeninduktion bei den anderen 7 Kandidaten kann mehrere Gründe haben. So ist es möglich, dass für die Aktivierung der spezifischen Gene essentielle Kofaktoren in den verwendeten Zellen nicht in der benötigten Menge vorliegen. Weiterhin könnten die untersuchten DNA-Fragmente nicht ausreichend für eine Gli1-Bindung sein oder andere funktionelle Bindungsmotive wurden auf Grund ihrer distalen Lage zum jeweiligen Translationsstartcodon im Screening nicht erkannt. Die Tatsache, dass der Expressionsvektor die Sequenz für humanes -und nicht für murines - Gli1 enthält, kann nicht als Grund für das Ausbleiben der Identifizierung weiterer Bindungsstellen herangezogen werden, da ebenfalls unter Verwendung von humanem Gli1 in anderen Arbeiten nicht-humane Bindungsmotive identifiziert werden konnten (Sasaki et al., 1997; Yoon et al., 2001). Darüber hinaus ist die direkte Steuerung durch Gli1 nur eine Möglichkeit der Zielgenregulation. Weiner et al. konnten durch retrovirale Überexpression von Shh in *gli1*-defizienten Mäusen

Medulloblastome erzeugen und damit zeigen, dass Shh auch Gli1-unabhängig wirken kann (Weiner et al., 2002). Für eine - zumindest teilweise - Gli1-unabhängige *cct4*-Induktion sprechen die unterschiedlichen Expressionsprofile von *gli1* und *cct4* während der normalen Kleinhirnentwicklung. Während die *cct4* mRNA-Expression schon zu den embryonalen Zeitpunkten am höchsten ist, hat *gli1* seine stärkste Induktion erst um den Tag P0.

4.5 *SOX18* ist ein Zielgen des Shh/Ptc-Signalwegs in Körnerzellprogenitoren der Maus, und seine Expression ist in humanen desmoplastischen Medulloblastomen signifikant erhöht

Sox18 repräsentierte im DNA Microarray das am stärksten von Shh induzierte Zieltranskript in GCPs der Maus nach 7 h Kultivierung, während andere *sox*-Gene wie *sox7* und *sox11* nicht reguliert und *sox4* herunterreguliert erschienen. Die Modulation von *sox18* konnte mittels cRT-PCR verifiziert werden. Um auszuschließen, dass mit den verwendeten Primern die sequenzähnlichen Transkripte von *sox7* oder *sox17* mit amplifiziert worden sind, wurde das PCR-Produkt sequenziert. *Sox18* erschien bereits nach 3 h Kultivierung heraufreguliert; die Expression nach 18 h hatte allerdings wieder stark abgenommen, so dass es wahrscheinlich ist, dass es ein frühes Zielgen des Shh-Stimulus darstellt. Die Tatsache, dass Cycloheximid die Expression nicht vollständig unterbinden konnte, lässt darauf schließen, dass *sox18* ein sowohl primäres als auch sekundäres Zielgen ist, welches durch unterschiedliche Mechanismen reguliert wird. Die direkte Transkriptionskontrolle durch Gli1 konnte mittels Dual-Luciferase-Assay nicht nachgewiesen werden; die frühe pränatale Expression in der normalen Kleinhirnentwicklung spricht darüber hinaus für eine Gli1-unabhängige Modulation. Die Zugabe von Cyclopamin zeigte, dass es sich um ein spezifisches Zielgen des Shh/Ptc-Signalwegs handelt.

Als Transkriptionsfaktoren gehören Sox-Proteine zur HMG-Box-Superfamilie DNA-bindender Proteine. Sie spielen in der Regulation diverser Entwicklungsprozesse wie Organentwicklung oder Zelltypspezifizierung eine wesentliche Rolle. Der Name *sox* (sry like HMG box gene) bezieht sich auf das erste beschriebene Mitglied der Genfamilie namens Sry, einem Faktor, der an der männlichen Geschlechtsbestimmung beteiligt ist. Sox-Gene werden in die 7 Subgruppen A-G unterteilt. Mitglieder derselben Gruppe haben mehr als 80% Identität der Aminosäuren innerhalb der HMG-Domäne gemeinsam. Zusammen mit *sox7* und *sox17* gehört *sox18* zur Subgruppe F. Das Genprodukt beinhaltet neben der HMG-Box eine Transaktivierungsdomäne (Wegner, 1999).

Verschiedene humane Krankheiten und Syndrome sind mit Defekten in spezifischen *SOX*-Genen assoziiert. So spielt *SOX3* in der X-chromosomal-assoziierten, mentalen Retardierung eine wesentliche Rolle (Stevanovic et al., 1993), *SOX9* in der Kampomelen Dysplasie (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994), *SOX10* in der Waardenberg-Hirschsprung-Erkrankung (Pingault et al., 1998) und dem Yemenite Deafblind Hypopigmentations-Syndrom (Bondurand et al., 1999), sowie *SOX18* in HLT (Hypotrichosis-Lymphödem-Hypopigmentations-Syndrom) (Irrthum et al., 2003). Beim letztgenannten Syndrom treten kardiovasikuläre und Haarentwicklungs-Anomalien, sowie Symptome lymphatischer Dysfunktion auf. In einer Fallstudie von HLT wurden 3 Familien untersucht. *SOX18*-Mutationen wurden dabei bei allen betroffenen Familienmitgliedern festgestellt. Homozygote Missense-Mutationen führten zur Funktionslosigkeit der DNA-Bindungsdomäne, während eine heterozygote Nonsense-Mutation - die zur Trunkierung der Transaktivierungsdomäne führte - ausreichend war, um den beschriebenen Phänotyp zu verursachen (Irrthum et al., 2003). Das Gegenstück zu dieser humanen Erkrankung ist der *ragged (Ra)*-Phänotyp in der Maus. Die *Ra*-Mutation trat spontan in einer Rückkreuzung auf. Homozygoten *Ra*-Tieren fehlen die Tast- und Fellhaare; sie zeigen generalisierte Ödeme und Cyanose und überleben nur selten die Stillzeit. Pennisi und Kollegen konnten *sox18* als das für den *Ra*-Phänotyp verantwortliche Gen identifizieren (Pennisi et al., 2000a). Im Gegensatz zu *Ra*-homozygoten Embryos zeigen *sox18* Knockout-Mäuse keine auffälligen kardiovasikulären Defekte. Sie sind vital, fertil und haben einen nur leichten Felldefekt mit einer reduzierten Anzahl von Zickzack-Haaren. Dieser milde Phänotyp kann durch Redundanz ähnlicher *sox*-Gene erklärt werden, die den Verlust des *sox18*-Gens kompensieren. Demgegenüber könnten die trunkierten Proteine der *Ra*-Mutante eine dominant-negative Wirkung haben, da sie zwar keine Transaktivierungsdomäne mehr besitzen, aber durch die verbliebene DNA-Bindungsdomäne Promotoren von Zielgenen besetzt halten könnten. Interessanterweise wurde mittels RNA *in situ*-Hybridisierung in Wildtyptieren erstmals eine Koexpression von *sox18*, *shh* und *ptc* in sich entwickelnden Haarfollikelzellen nachgewiesen, was auf eine Assoziation von *sox18* mit dem Shh/Ptc-Signalweg in diesem Zellsystem schließen lässt. Dabei war *ptc* eher diffus exprimiert, während *sox18* mesodermal und *shh* im sich invaginierenden Epithel nachgewiesen wurde (Pennisi et al., 2000a). Um die zeitliche und örtliche Expression von *sox18* im sich entwickelnden Kleinhirn der Maus zu dokumentieren, wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls RNA *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Dabei war die *sox18*-Expression am Tag P3 am stärksten und nahm während den Tagen P5 und P8 weiter ab, was auf eine entwicklungszeitlich frühe Bedeutung von *sox18* hinweist. Die

Expression war dabei auf den inneren Bereich des EGL sowie die Meningen beschränkt. Zwar ist die Bedeutung der *sox18*-Expression in den Meningen noch ungeklärt, dennoch ist in diesem Zusammenhang interessant, dass *PTCH*-Mutationen in humanen Meningiomen beschrieben worden sind (Xie et al., 1997), so dass die Kaskade auch in dieser Tumorentität eine Rolle spielen könnte. Während Zellen des inneren Teils des EGL den Zellzyklus verlassen und beginnen, einwärts zu wandern, um später das IGL auszubilden, sind die Zellen des äußeren Teils hoch proliferativ (Ryder and Cepko, 1994; Hatten and Heintz, 1995). Die Tatsache, dass *sox18* im inneren Anteil des EGL exprimiert wird, könnte auf eine Funktion in der Transition von Proliferation zur Migration hinweisen. Dennoch war es wichtig zu klären, ob *sox18* Einfluss auf die Zellteilung von Körnerzellprogenitoren nimmt. Daher wurden ³H-Thymidin-Inkorporations-Assays mit P8 GCPs *sox18*-defizienter Mäuse durchgeführt, wobei kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Versuchen mit Wildtypzellen zu erkennen war. Weiterhin zeigten immunhistochemische Untersuchungen des Cerebellums von *sox18* -/- -Tieren sowie von Wildtypmäusen keine signifikanten Unterschiede in der Kleinhirnentwicklung auf. Diese Ergebnisse geben keinen Hinweis auf eine essentielle Rolle von *sox18* in der Proliferation und Genese von GCPs. Es ist allerdings möglich, dass dieser unauffällige Phänotyp durch die bereits erwähnte Redundanz anderer, verwandter *sox*-Gene wie *sox7* oder *sox17* zustande kommt, denen überlappende Funktionen zugewiesen werden (Pennisi et al., 2000b). Durch Generierung eines Triple-Knockouts aller drei Gene könnte diese Frage geklärt werden.

Ihre Bedeutung in der Tumorentstehung ist noch weitgehend unklar, obwohl die Expression verschiedener *sox*-Gene in diversen Tumorentitäten beschrieben worden ist. Da *sox3*, *sox17alpha* und *sox17beta* im Krallenfrosch, sowie *sox7* in der Maus bereits als negative Regulatoren des WNT-beta-Catenin-TCF-Signalwegs beschrieben worden sind (Zorn et al., 1999; Takash et al., 2001), wird zur Zeit darüber spekuliert, ob die humanen Homologe Krebs-assoziierte Gene darstellen. Die Expression des *SOX7*-Transkripts wurde bereits in Magenkrebs (Katoh, 2002) und die des *SOX18*-Transkripts in Zelllinien von Magen-, Bauchspeicheldrüsen- und Brusttumoren, sowie embryonalen Tumoren nachgewiesen (Saitoh and Katoh, 2002). Nach heutigem Wissensstand entsteht im Gegensatz zur klassischen Form die desmoplastische Variante des Medulloblastoms aus den Körnerzellvorläufern des EGL, und sein Auftreten ist mit Mutationen in Komponenten des Shh/Ptc-Signalwegs assoziiert (Pietsch et al., 1997; Raffel et al., 1997; Reifenberger et al., 1998; Bühren et al., 2000). Daher wurde neben anderen ausgewählten Zielgenen der Kaskade, die im Mausmodell identifiziert wurden, auch die Expression von *SOX18* in humanen

Medulloblastomproben mittels cRT-PCR analysiert, um herauszufinden, ob es in dieser Tumorentität ebenfalls eine Rolle spielt. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass *SOX4* und *SOX11* im Gegensatz zu DMBs und zum EGL stark in klassischen Medulloblastomen und differenzierenden Zellen des sich entwickelnden Kleinhirns exprimiert werden (Lee et al., 2002). Unsere Ergebnisse zeigen, dass neben *GLI1* auch *SOX18* in DMBs sowie in MBs mit extremer Nodularität signifikant stärker exprimiert war als in klassischen. Darüber hinaus korrelierte die Expression von *GLI1* und *SOX18*, und die stärksten *SOX18*-Expressionen traten in den Proben desmoplastischer Medulloblastome auf, die nachweislich eine *PTCH*-Mutation tragen (Pietsch et al., 1997). Dies weist darauf hin, dass *SOX18* auch im humanen System ein Zielgen des Shh/Ptc-Signalwegs ist. Um die Frage zu klären, ob *SOX18* ein generelles Zielgen der Shh/Ptc-Kaskade oder spezifisch für das DMB bzw. neurale Zellen ist, wurden Expressionsuntersuchungen in humanen und murinen Rhabdomyosarkomen durchgeführt, da auch diese Tumorentität mit einer Dysregulation des Signalwegs in Verbindung steht. Die Expression von *GLI1* war in 15 humanen Tumorproben gegenüber 3 Muskelproben erhöht, was die These unterstützt, dass die Aktivierung der Shh/Ptc-Kaskade auch in humanen Rhabdomyosarkomen eine Rolle spielt. Interessanterweise war *SOX18* im humanen Muskel-Kontrollgewebe stärker exprimiert als im Tumor. Als Zeichen für die Aktivierung des Shh/Ptc-Signalwegs war die *gli1*-Expression in den 19 Rhabdomyosarkomproben *ptc*-defizienter Mäuse gegenüber den 4 Muskelproben erhöht. In der Expressionsanalyse von *sox18* in 20 murinen Tumor- und 6 Muskelproben konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass es sich bei *sox18* nicht um ein generelles Zielgen der Kaskade handelt, sondern dass es Gewebe-spezifisch reguliert wird.

4.6 Komponenten des Notch-Signalwegs werden in Körnerzellvorläufern der Maus und in humanen Medulloblastomen differentiell exprimiert

Ein weiteres, neu identifiziertes und verifiziertes Zielgen von Shh in GCPs der Maus ist *deltex1*, dessen Genprodukt Komponente des Notch-Signalwegs ist. Die Notch-Kaskade ist ein hochkonservierter Signalweg, der in vielen Organismen die neuronale Differenzierung inhibiert und dadurch zur Aufrechterhaltung der Zellteilung beiträgt. Durch die Bindung eines der zellmembranständigen Liganden Delta, Jagged oder Serrate einer Nachbarzelle wird eine intrazelluläre Domäne (Abkürzung: ICD oder RAMIC) von Notch durch eine gamma-Sekretase abgespalten. RBPJ (das Mammalia-Homolog des *Drosophila* Suppressor of

Hairless-Proteins) oder Deltex binden an die Ankyrin-Wiederholungssequenz von ICD und translozieren in den Kern (Matsuno et al., 1995; Aster et al., 1997; Kato et al., 1997; Kageyama and Ohtsuka, 1999). RBPJ induziert die Expression von *hes1* und *hes5*. Die Genprodukte fungieren als Repressoren neuronaler Differenzierung, indem sie die Expression pro-differentieller Gene verhindern. Dabei bildet entweder Hes1 oder Hes5 einen Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor Mash1 oder seinem Kofaktor E47, so dass die beiden letztgenannten nicht als Aktivatoren fungieren können. Weiterhin können Hes1 oder Hes5 als Homodimere in einer aktiven Repression die Promotoren pro-neuraler Zielgene blockieren (Kageyama and Ohtsuka, 1999). Deltex inhibiert die Expression pro-differentieller Gene durch Heterodimerisierung mit Kofaktoren pro-neuraler Transkriptionsfaktoren wie p300 oder E47 (Yamamoto et al., 2001). In der Maus wurden bisher 4 Isoformen von *deltex* identifiziert: *deltex1*, *deltex2*, *deltex2ΔE* und *deltex3*, wobei *deltex2* und *deltex2ΔE* aller Wahrscheinlichkeit nach alternative Spleiß-Varianten darstellen. Da alle 4 Formen bei Überexpression in Zellkultur die Supprimierung der transkriptionellen Aktivität von E47 bewirken, werden ihnen überlappende Funktionen zugesprochen (Kishi et al., 2001).

Das in dieser Arbeit durch DNA Microarray-Hybridisierung als Shh-responsiv regulierte Transkript *FXI-T1* (fractionated X-irradiation induced transcript1) entspricht eindeutig *deltex1*. Bei der anschließenden Verifizierung mittels cRT-PCR wurden die Primer so ausgewählt, dass ausschließlich *deltex1* amplifiziert wurde, so dass eine Verwechslung mit anderen Isoformen ausgeschlossen werden konnte. Dabei erschien *deltex1* als sowohl primäres als auch spezifisches Zielgen von Shh.

Im Western Blot zeigte sich, dass die Stimulierung von GCPs mit Shh für 24 h zu einem leichten Anstieg der Deltex-Proteinmenge führte und die Anwesenheit von Cyclopamin diesen Effekt unterdrückte. So konnte gezeigt werden, dass Shh nicht nur die Transkription, sondern auch die Translation von Deltex reguliert.

Der Wnt/beta-Catenin-Signalweg ist in Säugern mitverantwortlich für die Formation der Körperachse, die Entwicklung des ZNS oder die Mammadrüsenentwicklung. Die Bindung des Liganden Wnt an seinen Rezeptor Frizzled bewirkt intrazellulär eine Aktivierung von Dishevelled. Über weitere Schritte kommt es zur Stabilisierung von beta-Catenin, welches im Kern spezifische Zielgene reguliert (Akiyama, 2000). Im Drosophila-System konnte gezeigt werden, dass Dishevelled -wie RBPJ und Deltex- an die Ankyrin-Wiederholungssequenz von Notch bindet und so den Signalweg hemmt (Axelrod et al., 1996). Somit könnte der Wnt-Signalweg die Notch-Kaskade inhibieren. Um herauszufinden, ob Wnt die Shh-induzierte Expression von *deltex1* moduliert, wurden P8 GCPs in An- bzw. Abwesenheit von Wnt1

und/oder Shh kultiviert. Dazu wurde der Zellüberstand der Rattenzelllinie Rat-2/Wnt1 verwendet, die das Maus-Wnt1-Protein sezernieren (A. Brown, Cornell University, Dept. of Cell Biology and Anatomy, New York, USA). Die anschließende Expressionsanalyse mittels cRT-PCR zeigte allerdings keine Regulation, so dass auf weitergehende Experimente verzichtet wurde.

Um die potentielle Bedeutung der Notch-Kaskade in humanen Medulloblastomen zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von Komponenten des Signalwegs analysiert. Zwar wird laut Literatur vornehmlich Notch2 im EGL des sich entwickelnden Kleinhirns der Ratte exprimiert (Irvin et al., 2001), allerdings beinhaltet dieses Protein keine Ankyrin-Wiederholungssequenz, die für die Interaktion mit Deltex nötig ist (Matsuno et al., 1998; Ramain et al., 2001; Yamamoto et al., 2001). Mittels RT-PCR in P5-7 GCPs der Maus wurde nachgewiesen, dass neben *notch2* und weiteren Komponenten des Signalwegs auch *notch1* exprimiert wird (Solecki et al., 2001). Weiterhin wiesen Yamamoto et al. die Interaktion zwischen Notch1 und Deltex1 in Säugetierzellen nach (Yamamoto et al., 2001). Daher wurde die Expression von *NOTCH1* in humanen Medulloblastomen untersucht. Darüber hinaus wurde die Expression von *RBPJ*, *DTX1*, *HES1* und *HES5* analysiert. Außer *HES5* erschien keines der anderen analysierten Gene in Medulloblastomen differentiell exprimiert.

Ohtsuka et al. zeigten in Zellkulturexperimenten neuraler Vorläuferzellen der Maus, dass retrovirale Expression von konstitutiv-aktiviertem Notch die neuronale Differenzierung inhibiert. Gleiches gilt für die Expression in *hes1*- oder *hes5*-defizienten Zellen. Nur bei gleichzeitiger Abwesenheit von *hes1* und *hes5* kann das Notch-vermittelte Signal nicht übertragen werden, so dass beiden Transkriptionsfaktoren redundante Funktionen zugewiesen werden (Ohtsuka et al., 1999). Dass in desmoplastischen Medulloblastomen *HES5* heraufreguliert erscheint, ist ein Hinweis auf die potentielle Bedeutung des Notch-Signalwegs in dieser Tumorentität. Interessanterweise lassen sich diese Ergebnisse auch im Mausmodell bestätigen, da mittels cRT-PCR eine Shh-abhängige mRNA-Induktion nachgewiesen werden konnte. Durch DNA Microarray-Hybridisierung konnte *hes5* nicht detektiert werden, da das Transkript nicht auf dem Chip-Set repräsentiert ist. Zu den Transkripten, die in Anwesenheit von Shh im DNA Microarray herunterreguliert erschienen, gehört *hes6*. Als Antagonist von Hes1 und Hes5 fördert Hes6 die neuronale Differenzierung und seine mRNA-Expression wird durch pro-neurale Transkriptionsfaktoren wie Ngn1 induziert (Koyano-Nakagawa et al., 2000). Somit ist es möglich, dass Shh durch die Regulation mehrerer *hes*-Gene eine neuronale Differenzierung unterbindet. Die Tatsache, dass unsere Ergebnisse die Shh-induzierte Expression von *deltex1* und *hes5* dokumentieren, lässt den Schluss zu, dass Shh die

Differenzierung in GCPs durch eine sowohl Deltex1-abhängige als auch unabhängige Aktivierung der Notch-Kaskade inhibiert. Darüber hinaus könnte die Kaskade auch in der Genese des desmoplastischen Medulloblastoms eine Rolle spielen.

4.7 Die Expression von *IGFBP5* ist in Körnerzellprogenitoren der Maus und in humanen desmoplastischen Medulloblastomen gegensätzlich reguliert

Ein Gen, welches in Anwesenheit von Shh in GCPs der Maus massiv herunterreguliert erschien, ist *igfbp5*. Die Aktivität von IGFs (Insulin-like growth factors) wird durch die Bindung extrazellulärer IGFBPs (Insulin-like growth factor binding proteins) wie IGFBP5 reguliert (Jones and Clemmons, 1995). Roschier et al. beobachteten, dass die *igfbp5* mRNA-Expression während Apoptoseinduktion in P7 GCPs der Ratte herunterreguliert war (Roschier et al., 2001). Sie schlossen daraus, dass innerhalb eines gegen den Zelltod gesteuerten Prozesses der inhibitorische Effekt von IGFBP5 auf die IGF-Aktivität minimiert und so das Überleben der Zellen gefördert wird. Sowohl unsere Ergebnisse als auch Studien von Oliver et al. zeigen im Mausmodell, dass Shh die *igfbp5*-Expression in GCPs herunterreguliert (Oliver et al., 2003). Die durch cRT-PCR verifizierte, schnelle und prominente Herunterregulation nach bereits 3 h Kultivierung weist auf einen aktiven Mechanismus hin, der die *igfbp5* mRNA-Stabilität beeinflusst. In Anwesenheit von Cycloheximid wurde diese Repression aufgehoben, was darauf schließen lässt, dass neu synthetisierte Proteine für die Herunterregulation des *igfbp5*-Transkripts verantwortlich sind. Die Zugabe von Cyclopamin führte wiederum zu einer Heraufregulation des Transkripts, was darauf hindeutet, dass es sich um einen Shh-spezifischen Prozess handelt.

IGF-II ist ein essentielles Mitogen für viele Zelltypen und spielt darüber hinaus in verschiedenen embryonalen Tumoren eine Rolle (Pedone et al., 1994; Toretsky and Helman, 1996). Hahn et al. postulierten, dass *igf2* ein Zielgen der Shh/Ptc-Kaskade darstellt, da die Inzidenz von Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen in *ptc+/-; igf2+/-* -Mäusen gegenüber *ptc*-defizienten Tieren stark erhöht ist (Hahn et al., 1998; Hahn et al., 2000). In unserer Arbeitsgruppe konnte Dr. Wolfgang Hartmann in humanen Medulloblastomen mittels cRT-PCR nachweisen, dass in DMBs die *IGF2* mRNA-Expression durch Regulation der Promotoren P2 und P3 gegenüber CMBs signifikant erhöht ist, was auf eine wichtige Rolle der IGF-II-Kaskade in Medulloblastomen hinweist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass im Gegensatz zu CMBs *IGFBP5* in Proben der desmoplastischen Variante signifikant erhöht exprimiert ist. Dies wird durch Untersuchungen einer aktuellen Studie unterstützt. Pomeroy

und Kollegen verglichen das mRNA-Expressionsprofil von 25 klassischen und 9 desmoplastischen humanen Medulloblastomen mittels DNA Microarray-Technik. Es zeigte sich auch dort, dass *IGFBP5* in DMBs signifikant erhöht exprimiert wurde (Pomeroy et al., 2002). Darüber hinaus waren weitere Gene wie *PTCH*, *GLII*, *IGF2* oder *N-MYC* ebenfalls in DMBs heraufreguliert; also zum größten Teil Gene, die in dieser Arbeit im Mausmodell als Zielgene von Shh identifiziert werden konnten, was nochmals für die zelluläre Herkunft des DMB aus Körnerzellvorläufern spricht.

Die Ursache der gegensätzlichen *IGFBP5*-Regulation zwischen Shh-stimulierten GCPs der Maus und Zellen aus humanen desmoplastischen Medulloblastomen bleibt unklar. Shh könnte in Körnerzellprogenitoren während der Proliferationsinduktion die Expression proapoptischer Gene unterbinden, während die menschlichen Tumorzellen diesbezüglich eine Fehlregulation aufweisen.

In dieser Arbeit wurde die Expression der im Mausmodell verifizierten Zielgene *CCT4*, *TPD53*, *DTX1*, *HIPPOCALCIN*, *GLII*, *SOX18* sowie *IGFBP5* in humanen Medulloblastomen untersucht, wobei die drei letztgenannten differentiell exprimiert erschienen.

5 Zusammenfassung

Der hochkonservierte Sonic Hedgehog/Patched-Signalweg (Shh/Ptc) steuert abhängig vom Gewebetyp unterschiedliche Prozesse wie Zellschicksalsdeterminierung oder Proliferation. Die Bindung von Shh an seinen Rezeptor Ptc reguliert intrazellulär die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie und daraus folgend die Expressionsinduktion von Zielgenen wie *gli1*. Im sich entwickelnden Kleinhirn induziert die Kaskade die Zellteilung von Körnerzellvorläufern (granule cell precursors, GCPs), wobei eine Überaktivierung des Signalweges zur Tumorentstehung wie der des desmoplastischen Medulloblastoms führen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde nach neuen Zielgenen des Shh/Ptc-Weges in Körnerzellvorläufern der Maus gesucht. Dazu wurde ein Zellkultursystem etabliert, um frisch präparierte GCPs in Kultur zu bringen und zu manipulieren. Mittels DNA Microarray-Hybridisierung und Subtraktiver Suppressions-Hybridisierung wurden Shh-regulierte Transkripte identifiziert. 13 von 21 ausgewählten Genen konnten mittels kompetitiver RT-PCR verifiziert werden (*sox18*, *gli1*, *tumor protein d53*, *cyclin D1*, *ptbp2*, *cct4*, *mtf*, *deltex1*, *cdc6-related*, *N-myc*, *hippocalcin*, *sik similar* und *igfbp5*). Dabei handelt es sich in 9 Fällen um primäre Transkripte, da die Expressionsinduktion durch den Translationshemmer Cycloheximid nicht unterbunden werden konnte und in weiteren 9 Fällen um spezifische Transkripte, da ihre Expression durch den Signalweghemmer Cyclopamin inhibiert wurde. Der Identifizierung potentieller Bindungsstellen für den Signalweg-spezifischen Transkriptionsfaktor Gli1 im proximalen Bereich des Translationsstarts verifizierter Zielgene folgten funktionelle Untersuchungen. Im Fall von *cct4* konnte eine Gli1-vermittelte Transkriptionsinduktion nachgewiesen werden. Das am stärksten durch Shh induzierte Transkript ist das Gen für den Transkriptionsfaktor Sox18, welches sowohl ein primäres als auch ein spezifisches Zielgen darstellt. RNA *in situ*-Hybridisierungen zeigten, dass sich die *sox18* mRNA-Expression zu frühen postnatalen Zeitpunkten auf die Meningen und den inneren Bereich der aus GCPs bestehenden äußeren Körnerzellschicht beschränkt. Weiterhin wiesen Expressionsanalysen zu verschiedenen Stadien der normalen Kleinhirnentwicklung ein Expressionsmaximum bereits zu einem prenatalen Zeitpunkt nach. In humanen desmoplastischen Medulloblastomen wurde neben *GLI1* auch *SOX18* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle (klassische Medulloblastome) exprimiert. In Rhabdomyosarkomen - einer Tumorentität, die ebenfalls mit einer Dysregulation der Shh/Ptc-Kaskade assoziiert ist - wurde *SOX18* im Gegensatz zu *GLI1* gegenüber Muskelkontrollgeweben nicht überexprimiert, was darauf hinweist, dass *SOX18* ein Zelltyp-spezifisches Transkript des Signalwegs in neuronalen Progenitoren darstellt. Ein weiteres, primäres sowie spezifisches

Zielgen der Shh/Ptc-Kaskade in murinen Körnerzellvorläufern ist *deltex1*. Das Genprodukt ist Komponente des Notch-Signalwegs, welcher in Nervenzellen anti-differentiell wirkt. Western Blot-Analysen wiesen eine durch Shh induzierte Deltex-Proteinsynthese nach. Nach erfolgreicher Identifizierung und primärer Charakterisierung dieser Zielgene der Shh/Ptc-Kaskade werden weiterführende Untersuchungen ihre genaue Rolle in der normalen Kleinhirnentwicklung und ihre potentielle Beteiligung an der Genese von Neoplasien klären.

6 Literatur

- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615-616
- Adesina, A. M., Nalbantoglu, J., and Cavenee, W. K. (1994). p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma. *Cancer Res* 54, 5649-51.
- Akiyama, T. (2000). Wnt/beta-catenin signaling [In Process Citation]. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 273-82.
- Alderson, L., Fetell, M. R., Sisti, M., Hochberg, F., Cohen, M., and Louis, D. N. (1996). Sentinel lesions of primary CNS lymphoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60, 102-5.
- Altman, J and Bayer, S.A. (1997). *Development of the Cerebellar System: In Relation to Its Evolution, Structure and Functions*. Boca Raton, FL: CRC Press
- Aster, J. C., Robertson, E. S., Hasserjian, R. P., Turner, J. R., Kieff, E., and Sklar, J. (1997). Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-Jkappa or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-Jkappa and activate transcription. *J Biol Chem* 272, 11336-43.
- Axelrod, J. D., Matsuno, K., Artavanis-Tsakonas, S., and Perrimon, N. (1996). Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled. *Science* 271, 1826-32.
- Basille, M., Gonzalez, B. J., Leroux, P., Jeandel, L., Fournier, A., and Vaudry, H. (1993). Localization and characterization of PACAP receptors in the rat cerebellum during development: evidence for a stimulatory effect of PACAP on immature cerebellar granule cells. *Neuroscience* 57, 329-38.
- Bigner, S. H., Mark, J., Friedman, H. S., Biegel, J. A., and Bigner, D. D. (1988). Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 30, 91-101.
- Binns, W., James, L. F., Shupe, J. L., and Thacker, E. J. (1962). Cyclopien-type malformation in lambs. *Arch Environ Health* 5, 106-8.
- Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Pingault, V., Enderich, J., Sajus, M., Tommerup, N., Warburg, M., Hennekam, R. C., Read, A. P., Wegner, M., and Goossens, M. (1999). A molecular analysis of the yemenite deaf-blind hypopigmentation syndrome: SOX10 dysfunction causes different neurocristopathies. *Hum Mol Genet* 8, 1785-9.
- Brewer, G. J. (1995). Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 42, 674-83.

- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., and Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35, 567-76.
- Bühren, J., Christoph, A. H., Buslei, R., Albrecht, S., Wiestler, O. D., and Pietsch, T. (2000). Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 229-40.
- Carpenter, D., Stone, D. M., Brush, J., Ryan, A., Armanini, M., Frantz, G., Rosenthal, A., and de Sauvage, F. J. (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13630-4.
- Chen, E. Y., Mufson, E. J., and Kordower, J. H. (1996). TRK and p75 neurotrophin receptor systems in the developing human brain. *J Comp Neurol* 369, 591-618.
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., and Beachy, P. A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev* 16, 2743-8.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-13
- Chuang, P. T., and McMahon, A. P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617-21.
- Cogen, P. H., and McDonald, J. D. (1996). Tumor suppressor genes and medulloblastoma. *J Neurooncol* 29, 103-12.
- D'Agata, V., Cavallaro, S., Stivala, F., and Canonico, P. L. (1996). Tissue-specific and developmental expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptors in rat brain. *Eur J Neurosci* 8, 310-8.
- Dahmane, N., and Ruiz-i-Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089-100.
- Diatchenko, L., Lau, Y. F., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D., and Siebert, P. D. (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6025-30.
- Eberhart, C. G., and Burger, P. C. (2003). Anaplasia and grading in medulloblastomas. *Brain Pathol* 13, 376-85.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-30.
- Ellison, D. and Love, S. (1998). *Neuropathology*: Mosby Int. Ltd.

- Evans, D. G., Farndon, P. A., Burnell, L. D., Gattamaneni, H. R., and Birch, J. M. (1991). The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. *Br J Cancer* *64*, 959-61.
- Farwell, J., and Flannery, J. T. (1984). Second primaries in children with central nervous system tumors. *J Neurooncol* *2*, 371-5.
- Fishell, G., and Hatten, M. E. (1991). Astrotactin provides a receptor system for CNS neuronal migration. *Development* *113*, 755-65.
- Fletcher, C., Unni, K., Mertens, F., *Tumours of Soft Tissue and Bone* (2002). WHO Classification of Tumours, IARC Press
- Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kowk, G., Weller, P. A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D., Goodfellow, P. N., and et al. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* *372*, 525-30.
- Giangaspero, F., Chieco, P., Ceccarelli, C., Lisignoli, G., Pozzuoli, R., Gambacorta, M., Rossi, G., and Burger, P. C. (1991). "Desmoplastic" versus "classic" medulloblastoma: comparison of DNA content, histopathology and differentiation. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* *418*, 207-14.
- Giangaspero, F., Perilongo, G., Fondelli, M. P., Brisigotti, M., Carollo, C., Burnelli, R., Burger, P. C., and Garre, M. L. (1999). Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis. *J Neurosurg* *91*, 971-7.
- Goodrich, L. V., Milenkovic, L., Higgins, K. M., and Scott, M. P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* *277*, 1109-13.
- Griffin, C. A., Hawkins, A. L., Packer, R. J., Rorke, L. B., and Emanuel, B. S. (1988). Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res* *48*, 175-80.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A. B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffell, D. J., Gerrard, B., Goldstein, A. M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., and Bale, A. E. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* *85*, 841-51.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Specht, K., Kappler, R., Calzada-Wack, J., Potter, D., Zimmer, A., Muller, U., Samson, E., and Quintanilla-Martinez, L. (2000). Patched target *Igf2* is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem* *275*, 28341-4.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Zimmer, A. M., Hall, J., Miller, G., and Zimmer, A. (1998). Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med* *4*, 619-22.
- Hammerschmidt, M., Bitgood, M. J., and McMahon, A. P. (1996). Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo. *Genes Dev* *10*, 647-58.

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* *166*, 557-80.
- Hatten, M. E., and Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* *18*, 385-408.
- Hatten, M. E., Lynch, M., Rydel, R. E., Sanchez, J., Joseph-Silverstein, J., Moscatelli, D., and Rifkin, D. B. (1988). In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Dev Biol* *125*, 280-9.
- Ingham, P. W., and McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* *15*, 3059-87.
- Irrthum, A., Devriendt, K., Chitayat, D., Matthijs, G., Glade, C., Steijlen, P. M., Fryns, J. P., Van Steensel, M. A., and Vikkula, M. (2003). Mutations in the Transcription Factor Gene SOX18 Underlie Recessive and Dominant Forms of Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia. *Am J Hum Genet* *72*, 1470-8.
- Irvin, D. K., Zurcher, S. D., Nguyen, T., Weinmaster, G., and Kornblum, H. I. (2001). Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development. *J Comp Neurol* *436*, 167-81.
- Jacobsen, P. F., Jenkyn, D. J., and Papadimitriou, J. M. (1985). Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol* *44*, 472-85.
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr., and Scott, M. P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* *272*, 1668-71.
- Jones, J. I., and Clemmons, D. R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* *16*, 3-34.
- Kageyama, R., and Ohtsuka, T. (1999). The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res* *9*, 179-88.
- Kato, H., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Minoguchi, S., Sakai, T., Nomura-Okazaki, S., Tamura, K., and Honjo, T. (1997). Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. *Development* *124*, 4133-41.
- Katoh, M. (2002). Expression of human SOX7 in normal tissues and tumors. *Int J Mol Med* *9*, 363-8.
- Katsetos, C. D., Herman, M. M., Frankfurter, A., Gass, P., Collins, V. P., Walker, C. C., Rosemberg, S., Barnard, R. O., and Rubinstein, L. J. (1989). Cerebellar desmoplastic medulloblastomas. A further immunohistochemical characterization of the reticulin-free pale islands. *Arch Pathol Lab Med* *113*, 1019-29.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1990). The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol* *10*, 634-42.

- Kishi, N., Tang, Z., Maeda, Y., Hirai, A., Mo, R., Ito, M., Suzuki, S., Nakao, K., Kinoshita, T., Kadesch, T., Hui, C., Artavanis-Tsakonas, S., Okano, H., and Matsuno, K. (2001). Murine homologs of *deltex* define a novel gene family involved in vertebrate Notch signaling and neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* *19*, 21-35.
- Kleihues, P., and Sobin, L. H. (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer* *88*, 2887.
- Klein, R. S., Rubin, J. B., Gibson, H. D., DeHaan, E. N., Alvarez-Hernandez, X., Segal, R. A., and Luster, A. D. (2001). SDF-1 alpha induces chemotaxis and enhances Sonic hedgehog-induced proliferation of cerebellar granule cells. *Development* *128*, 1971-81.
- Komuro, H., and Rakic, P. (1998). Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci* *18*, 1478-90.
- Koyano-Nakagawa, N., Kim, J., Anderson, D., and Kintner, C. (2000). *Hes6* acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation. *Development* *127*, 4203-16.
- Lee, C. J., Appleby, V. J., Orme, A. T., Chan, W. I., and Scotting, P. J. (2002). Differential expression of *SOX4* and *SOX11* in medulloblastoma. *J Neurooncol* *57*, 201-14.
- Lee, M. J., Stephenson, D. A., Groves, M. J., Sweeney, M. G., Davis, M. B., An, S. F., Houlden, H., Salih, M. A., Timmerman, V., de Jonghe, P., Auer-Grumbach, M., Di Maria, E., Scaravilli, F., Wood, N. W., and Reilly, M. M. (2003). Hereditary sensory neuropathy is caused by a mutation in the delta subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (*Cct4*) gene. *Hum Mol Genet* *12*, 1917-25.
- Lelievre, V., Hu, Z., Byun, J. Y., Ioffe, Y., and Waschek, J. A. (2002). Fibroblast growth factor-2 converts PACAP growth action on embryonic hindbrain precursors from stimulation to inhibition. *J Neurosci Res* *67*, 566-73.
- Lewis, K. E., Concordet, J. P., and Ingham, P. W. (1999). Characterisation of a second patched gene in the zebrafish *Danio rerio* and the differential response of patched genes to Hedgehog signalling. *Dev Biol* *208*, 14-29.
- Li, W., Ohlmeyer, J. T., Lane, M. E., and Kalderon, D. (1995). Function of protein kinase A in hedgehog signal transduction and *Drosophila* imaginal disc development. *Cell* *80*, 553-62.
- Lillevali, K., Kulla, A., and Ord, T. (2001). Comparative expression analysis of the genes encoding polypyrimidine tract binding protein (PTB) and its neural homologue (brPTB) in prenatal and postnatal mouse brain. *Mech Dev* *101*, 217-20.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R. T., and Springer, T. A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in *CXCR4*- and *SDF-1*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 9448-53.
- Matsuda, S., Ii, Y., Desaki, J., Yoshimura, H., Okumura, N., and Sakanaka, M. (1994). Development of Purkinje cell bodies and processes with basic fibroblast growth factor-like immunoreactivity in the rat cerebellum. *Neuroscience* *59*, 651-62.

- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development* *121*, 2633-44.
- Matsuno, K., Eastman, D., Mitsiades, T., Quinn, A. M., Carcanciu, M. L., Ordentlich, P., Kadesch, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1998). Human deltex is a conserved regulator of Notch signalling. *Nat Genet* *19*, 74-8.
- Mercer, E. A., Korhonen, L., Skoglosa, Y., Olsson, P. A., Kukkonen, J. P., and Lindholm, D. (2000). NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways. *Embo J* *19*, 3597-607.
- Ming, J. E., Roessler, E., and Muenke, M. (1998). Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Mol Med Today* *4*, 343-9.
- Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, K., and Hui, C. (1998). Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog [letter]. *Nat Genet* *18*, 104-6.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* *155*, 335-50.
- Murone, M., Rosenthal, A., and de Sauvage, F. J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr Biol* *9*, 76-84.
- Nielsen, H. S., Hannibal, J., and Fahrenkrug, J. (1998). Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *Neuroreport* *9*, 2639-42.
- Ohgaki, H., Eibl, R. H., Schwab, M., Reichel, M. B., Mariani, L., Gehring, M., Petersen, I., Holl, T., Wiestler, O. D., and Kleihues, P. (1993). Mutations of the p53 tumor suppressor gene in neoplasms of the human nervous system. *Mol Carcinog* *8*, 74-80.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* *18*, 2196-207.
- Oliver, T. G., Grasdeder, L. L., Carroll, A. L., Kaiser, C., Gillingham, C. L., Lin, S. M., Wickramasinghe, R., Scott, M. P., and Wechsler-Reya, R. J. (2003). Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: A critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7331-6.
- Packer, R. J., Sutton, L. N., Elterman, R., Lange, B., Goldwein, J., Nicholson, H. S., Mulne, L., Boyett, J., D'Angio, G., Wechsler-Jentsch, K., and et al. (1994). Outcome for children with medulloblastoma treated with radiation and cisplatin, CCNU, and vincristine chemotherapy. *J Neurosurg* *81*, 690-8.
- Pearl, G. S., and Takei, Y. (1981). Cerebellar "neuroblastoma": nosology as it relates to medulloblastoma. *Cancer* *47*, 772-9.

Pedone, P. V., Tirabosco, R., Cavazzana, A. O., Ungaro, P., Basso, G., Luksch, R., Carli, M., Bruni, C. B., Frunzio, R., and Riccio, A. (1994). Mono- and bi-allelic expression of insulin-like growth factor II gene in human muscle tumors. *Hum Mol Genet* 3, 1117-21.

Pennisi, D., Bowles, J., Nagy, A., Muscat, G., and Koopman, P. (2000b). Mice null for *sox18* are viable and display a mild coat defect. *Mol Cell Biol* 20, 9331-6.

Pennisi, D., Gardner, J., Chambers, D., Hosking, B., Peters, J., Muscat, G., Abbott, C., and Koopman, P. (2000a). Mutations in *Sox18* underlie cardiovascular and hair follicle defects in ragged mice. *Nat Genet* 24, 434-7.

Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., Taylor, F. R., Wang, E. A., and Galdes, A. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 273, 14037-45.

Pietsch, T., Fonatsch, C., Albrecht, S., Maschek, H., Wolf, H. K., von Schweinitz, D. (1996). Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab Invest* 74, 809-18

Pietsch, T., Scharmann, T., Fonatsch, C., Schmidt, D., Ockler, R., Freihoff, D., Albrecht, S., Wiestler, O. D., Zeltzer, P., Riehm, H. (1994). Characterization of five new cell lines derived from human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 54, 3278-87

Pietsch, T., Waha, A., Koch, A., Kraus, J., Albrecht, S., Tonn, J., Sorensen, N., Berthold, F., Henk, B., Schmandt, N., Wolf, H. K., von Deimling, A., Wainwright, B., Chenevix-Trench, G., Wiestler, O. D., and Wicking, C. (1997). Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila patched*. *Cancer Res* 57, 2085-8.

Pingault, V., Bondurand, N., Kuhlbrodt, K., Goerich, D. E., Prehu, M. O., Puliti, A., Herbarth, B., Hermans-Borgmeyer, I., Legius, E., Matthijs, G., Amiel, J., Lyonnet, S., Ceccherini, I., Romeo, G., Smith, J. C., Read, A. P., Wegner, M., and Goossens, M. (1998). *SOX10* mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet* 18, 171-3.

Pomeroy, S. L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L. M., Angelo, M., McLaughlin, M. E., Kim, J. Y., Goumnerova, L. C., Black, P. M., Lau, C., Allen, J. C., Zagzag, D., Olson, J. M., Curran, T., Wetmore, C., Biegel, J. A., Poggio, T., Mukherjee, S., Rifkin, R., Califano, A., Stolovitzky, G., Louis, D. N., Mesirov, J. P., Lander, E. S., and Golub, T. R. (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415, 436-42.

Pons, S., Trejo, J. L., Martinez-Morales, J. R., and Marti, E. (2001). Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development* 128, 1481-92.

Porter, J. A., von Kessler, D. P., Ekker, S. C., Young, K. E., Lee, J. J., Moses, K., and Beachy, P. A. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 374, 363-6.

- Porter, J. A., Young, K. E., and Beachy, P. A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255-9.
- Raffel, C., Jenkins, R. B., Frederick, L., Hebrink, D., Alderete, B., Fults, D. W., and James, C. D. (1997). Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res* 57, 842-5.
- Ramain, P., Khechumian, K., Seugnet, L., Arbogast, N., Ackermann, C., and Heitzler, P. (2001). Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate. *Curr Biol* 11, 1729-38.
- Rather, LJ (1978). *The Genesis of Cancer: A Study in the History of Ideas*. Baltimore, MD: John Hopkins Univ. Press
- Reardon, D. A., Michalkiewicz, E., Boyett, J. M., Sublett, J. E., Entrekin, R. E., Ragsdale, S. T., Valentine, M. B., Behm, F. G., Li, H., Heideman, R. L., Kun, L. E., Shapiro, D. N., and Look, A. T. (1997). Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57, 4042-7.
- Reifenberger, J., Wolter, M., Weber, R. G., Megahed, M., Ruzicka, T., Lichter, P., and Reifenberger, G. (1998). Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 58, 1798-803.
- Rocamora, N., Garcia-Ladona, F. J., Palacios, J. M., and Mengod, G. (1993). Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and low-affinity nerve growth factor receptor during the postnatal development of the rat cerebellar system. *Brain Res Mol Brain Res* 17, 1-8.
- Rorke, L. B. (1994). Experimental production of primitive neuroectodermal tumors and its relevance to human neuro-oncology. *Am J Pathol* 144, 444-8.
- Roschier, M., Kuusisto, E., Suuronen, T., Korhonen, P., Kyrylenko, S., and Salminen, A. (2001). Insulin-like growth factor binding protein 5 and type-1 insulin-like growth factor receptor are differentially regulated during apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 76, 11-20.
- Ryder, E. F., and Cepko, C. L. (1994). Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron* 12, 1011-28.
- Saitoh, S., Takamatsu, K., Kobayashi, M., and Noguchi, T. (1993). Distribution of hippocalcin mRNA and immunoreactivity in rat brain. *Neurosci Lett* 157, 107-10.
- Saitoh, S., Takamatsu, K., Kobayashi, M., and Noguchi, T. (1994). Expression of hippocalcin in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 80, 199-208.
- Saitoh, T., and Katoh, M. (2002). Expression of human SOX18 in normal tissues and tumors. *Int J Mol Med* 10, 339-44.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.

- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M., and Kondoh, H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* *124*, 1313-22.
- Skoglosa, Y., Takei, N., and Lindholm, D. (1999). Distribution of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide mRNA in the developing rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* *65*, 1-13.
- Solecki, D. J., Liu, X., Tomoda, T., Fang, Y., and Hatten, M. E. (2001). Activated notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* *31*, 557-68.
- Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P. H., and Journot, L. (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* *365*, 170-5.
- Stevanovic, M., Lovell-Badge, R., Collignon, J., and Goodfellow, P. N. (1993). SOX3 is an X-linked gene related to SRX. *Hum Mol Genet* *2*, 2013-8.
- Stone, D. M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T. A., Gu, Q., Johnson, R. L., Scott, M. P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J. E., de Sauvage, F., and Rosenthal, A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* *384*, 129-34.
- Suh, J., Lu, N., Nicot, A., Tatsuno, I., and DiCicco-Bloom, E. (2001). PACAP is an anti-mitogenic signal in developing cerebral cortex. *Nat Neurosci* *4*, 123-4.
- Tabuchi, A., Koizumi, M., Nakatsubo, J., Yaguchi, T., and Tsuda, M. (2001). Involvement of endogenous PACAP expression in the activity-dependent survival of mouse cerebellar granule cells. *Neurosci Res* *39*, 85-93.
- Taga, T., Suzuki, A., Gonzalez-Gomez, I., Gilles, F. H., Stins, M., Shimada, H., Barsky, L., Weinberg, K. I., and Laug, W. E. (2002). alpha v-Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int J Cancer* *98*, 690-7.
- Taipale, J., Chen, J. K., Cooper, M. K., Wang, B., Mann, R. K., Milenkovic, L., Scott, M. P., and Beachy, P. A. (2000). Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* *406*, 1005-9.
- Taipale, J., Cooper, M. K., Maiti, T., and Beachy, P. A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature* *418*, 892-6.
- Takamatsu, K., and Noguchi, T. (1993). Hippocalcin: a calcium-binding protein of the EF-hand superfamily dominantly expressed in the hippocampus. *Neurosci Res* *17*, 291-5.
- Takash, W., Canizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattei, M. G., Jay, P., and Berta, P. (2001). SOX7 transcription factor: sequence, chromosomal localisation, expression, transactivation and interference with Wnt signalling. *Nucleic Acids Res* *29*, 4274-83.
- Tao, Y., Black, I. B., and DiCicco-Bloom, E. (1996). Neurogenesis in neonatal rat brain is regulated by peripheral injection of basic fibroblast growth factor (bFGF). *J Comp Neurol* *376*, 653-63.

- Toftgard, R. (2000). Hedgehog signalling in cancer. *Cell Mol Life Sci* 57, 1720-31.
- Toretsky, J. A., and Helman, L. J. (1996). Involvement of IGF-II in human cancer. *J Endocrinol* 149, 367-72.
- Traiffort, E., Charytoniuk, D., Watroba, L., Faure, H., Sales, N., and Ruat, M. (1999). Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system. *Eur J Neurosci* 11, 3199-214.
- Ungar, A. R., and Moon, R. T. (1996). Inhibition of protein kinase A phenocopies ectopic expression of hedgehog in the CNS of wild-type and cyclops mutant embryos. *Dev Biol* 178, 186-91.
- Vaudry, D., Gonzalez, B. J., Basille, M., Fournier, A., and Vaudry, H. (1999). Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9415-20.
- Vaudry, D., Rousselle, C., Basille, M., Falluel-Morel, A., Pamantung, T. F., Fontaine, M., Fournier, A., Vaudry, H., and Gonzalez, B. J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6398-403.
- Villavicencio, E. H., Walterhouse, D. O., Iannaccone, P. M. (2000). The sonic hedgehog-patched-Gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 67, 1047-54
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantès, J., Bricarelli, F. D., Keutel, J., Hustert, E., and et al. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79, 1111-20.
- Waha, A., Watzka, M., Koch, A., Pietsch, T., Przkora, R., Peters, N., Wiestler, O. D., and von Deimling, A. (1998). A rapid and sensitive protocol for competitive reverse transcriptase (cRT) PCR analysis of cellular genes. *Brain Pathol* 8, 13-8.
- Wallace, V. A. (1999). Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol* 9, 445-8.
- Wechsler-Reya, R. J. (2003). Analysis of gene expression in the normal and malignant cerebellum. *Recent Prog Horm Res* 58, 227-48.
- Wechsler-Reya, R. J. (2001). Caught in the matrix: how vitronectin controls neuronal differentiation. *Trends Neurosci* 24, 680-2.
- Wechsler-Reya, R. J., and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22, 103-14.
- Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 1409-20.

- Weiner, H. L., Bakst, R., Hurlbert, M. S., Ruggiero, J., Ahn, E., Lee, W. S., Stephen, D., Zagzag, D., Joyner, A. L., and Turnbull, D. H. (2002). Induction of Medulloblastomas in Mice by Sonic Hedgehog, Independent of Gli1. *Cancer Res* 62, 6385-6389.
- Wolter, M., Reifenberger, J., Sommer, C., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (1997). 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* 57, 2581-5.
- Xie, J., Johnson, R. L., Zhang, X., Bare, J. W., Waldman, F. M., Cogen, P. H., Menon, A. G., Warren, R. S., Chen, L. C., Scott, M. P., and Epstein, E. H., Jr. (1997). Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors. *Cancer Res* 57, 2369-72.
- Yachnis, A. T., Rorke, L. B., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (1993). Expression of neuronal and glial polypeptides during histogenesis of the human cerebellar cortex including observations on the dentate nucleus. *J Comp Neurol* 334, 356-69.
- Yamamoto, N., Yamamoto Si, S., Inagaki, F., Kawaichi, M., Fukamizu, A., Kishi, N., Matsuno, K., Nakamura, K., Weinmaster, G., Okano, H., and Nakafuku, M. (2001). Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the notch receptor. *J Biol Chem*.
- Yan, Q., and Johnson, E. M., Jr. (1988). An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J Neurosci* 8, 3481-98.
- Yoon, J. W., Kita, Y., Frank, D., Majewski, R. R., Konicek, B. A., Nobrega, M. A., Jacob, H., Walterhouse, D., and Iannaccone, P. (2001). Gene expression profiling leads to identification of GLI1 binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1 induced cell transformation. *J Biol Chem*.
- Zhao, Q., Kho, A., Kenney, A. M., Yuk Di, D. I., Kohane, I., and Rowitch, D. H. (2002). Identification of genes expressed with temporal-spatial restriction to developing cerebellar neuron precursors by a functional genomic approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5704-9.
- Zorn, A. M., Barish, G. D., Williams, B. O., Lavender, P., Klymkowsky, M. W., and Varmus, H. E. (1999). Regulation of Wnt signaling by Sox proteins: XSox17 alpha/beta and XSox3 physically interact with beta-catenin. *Mol Cell* 4, 487-98.

7

Anhang

Durch Shh heraufregulierte Transkripte - geordnet nach dem 7h-Versuch (202 Transkripte)

GeneID	Ratio +Shh vs øShh 3h	Ratio +Shh vs øShh 7h	Ratio +Shh vs øShh 18h	Ratio +Shh +Chx vs øShh +Chx 7h	Ratio +Shh +CP vs +Shh 7h	gi	Transkript
104408 s at	undef.	>3.5	undef.	>1.8	-3	gi=1663531	sry-box containing gene 18 (sox 18)
161314 r at	>1.9	>3.5	undef.	>2.1	undef.	gi=5217720	EST
161402 r at	undef.	>3.1	undef.	undef.	undef.	gi=6265235	EST
103556 at	undef.	>3	undef.	undef.	<-2.9	gi=5474371	EST
160606 r at	undef.	2.9	>2.7	1.4	-1.5	gi=1813339	disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs
161417 r at	undef.	2.8	>1.7	undef.	undef.	gi=6289873	neuroblastoma myc-related oncogene 1
94097 at	undef.	>2.5	undef.	>3.5	undef.	gi=6009643	gli1
94232 at	1.6	2.5	1.3	1.2	-2.1	gi=5493834	cyclin D1
162021 r at	undef.	>2.4	undef.	undef.	undef.	gi=6410431	bcl2 homolog
93369 at	undef.	>2.3	>2.6	undef.	>1.2	gi=2522234	osteomodulin
95450 at	undef.	>2.3	>1.8	undef.	undef.	gi=5495912	EST
101446 at	1.2	>2.3	>1.3	>1.7	undef.	gi=2895080	tumor protein D52-like 1
94838 r at	undef.	2.3	>2.7	>1.9	-1.1	gi=200400	proliferin
92193 r at	1.2	2.2	3.8	1.7	2.3	gi=220565	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
162124 r at	undef.	2.2	>1.7	undef.	undef.	gi=6337912	EST
101601 at	undef.	>2.1	>1.4	>1.6	undef.	gi=2519355	EST
92244 at	>1.2	>2.1	1.1	1.6	-1.3	gi=5689873	exonuclease 1 homologue
101716 at	undef.	2.1	2.4	-1	undef.	gi=2407241	ribonuclease 5 precursor (mR-5) gene
93457 at	undef.	>2	>2.5	undef.	undef.	gi=311633	crystallin, gamma B
162278 r at	undef.	>2	>1.4	undef.	undef.	gi=6416902	EST
162278 r at	undef.	>2	>1.4	undef.	undef.	gi=6416902	EST
161369 r at	>-1.5	2	>4.7	undef.	<-1.1	gi=6192118	signal transducing adaptor molecule (Stam)
104547 at	-1.1	2	>1.6	-1.1	-1.4	gi=193340	dihydrofolate reductase gene
93372 at	1	2	-2.2	-1.1	-1.3	gi=1763274	acidic nuclear phosphoprotein 32
99828 at	undef.	>1.9	>2.3	undef.	>-1.4	gi=2646534	EST
102160 at	undef.	>1.9	>1.8	undef.	undef.	gi=861032	IAPE-Y retroviral genome
95967 at	undef.	>1.9	>1.5	undef.	undef.	gi=2518025	EST
98285 at	>1.6	>1.9	>1.4	undef.	>1.1	gi=4469276	zinc finger gene OZF
103389 at	<1	>1.9	1.2	undef.	<1.2	gi=4107273	lysine-ketoglutarate reductase/saccharopine dehydrogenase
94732 at	-1.3	1.9	>4.7	<1.4	-1.4	gi=1806131	repetin
97768 at	undef.	>1.8	>1.6	undef.	undef.	gi=498018	desmocollin 2
97725 at	>-1.1	>1.8	>1.5	undef.	>-1.2	gi=437870	alk-6
96775 at	1.5	1.8	1.5	-1.1	>1.3	gi=53162	chromobox homolog (Drosophila HP1 beta)
95733 at	1.3	1.8	-1.1	1.2	-1.8	gi=5472487	solute carrier family 29
103048 at	1.3	1.8	-1.6	1.1	-2	gi=199965	neuroblastoma myc-related oncogene 1
102136 r at	undef.	<1.8	<2.8	undef.	undef.	gi=2519576	EST
104314 r at	undef.	>1.7	6.2	undef.	>1.1	gi=5495112	EST
96487 at	undef.	>1.7	>3.4	undef.	undef.	gi=2521402	EST
101532 g at	undef.	>1.7	>2.5	undef.	undef.	gi=4441489	aldolase B gene for fructose-1,6-biphosphate
162214 r at	undef.	>1.7	>2.4	undef.	undef.	gi=5219308	keratin complex 1, gene 2 (Krt 1-2)
101343 at	>-1	>1.7	>2.1	<1.7	<1	gi=2429353	EWS/FLI1 activated transcript 2 (EAT-2) mRNA
161710 r at	>-1.2	>1.7	2	undef.	undef.	gi=6233105	EST
161142 at	undef.	>1.7	>1.8	>1.8	>-1.2	gi=6145248	EST
161173 f at	undef.	>1.7	>-1.7	>1.1	1.1	gi=6181659	interferon activated gene 202A
161785 f at	undef.	>1.7	undef.	undef.	undef.	gi=6410715	EST
96953 at	undef.	>1.7	undef.	undef.	undef.	gi=6096119	small inducible cytokine subfamily B, member 14 (Scyb14)
101661 r at	-1.1	1.7	>2.7	1.8	>-1.1	gi=2080894	EST
100395 at	1.4	1.7	>1.9	1.1	-1.3	gi=1707589	gli2
104423 at	1	1.7	1.8	1.4	-1.3	gi=6518625	EST
97182 at	1.2	1.7	1.8	1.2	-1.1	gi=3769611	cyclin E2
99944 at	-1.1	1.7	1.4	1.4	-1.8	gi=53162	hippocalcin
103212 at	1.1	1.7	1.3	1.1	-1.4	gi=4030051	dynein
98511 at	1.8	1.7	1	-1	1.3	gi=348995	HnRNP-associated with lethal yellow
95856 at	undef.	>1.6	>3.1	>2	>1.2	gi=2516819	EST
161536 r at	undef.	>1.6	>2.8	undef.	undef.	gi=6187515	EST
99324 at	<-1.1	>1.6	>2.4	1.2	>-1.1	gi=1698877	enteropeptidase
97127 f at	undef.	>1.6	>2.4	undef.	undef.	gi=2367479	putative pheromone receptor (VR15)
161357 r at	>1.1	>1.6	2.4	1.2	>1.6	gi=6148592	EST
104742 at	undef.	>1.6	>2	undef.	undef.	gi=3066611	EST
101873 at	undef.	>1.6	>1.9	undef.	undef.	gi=1771291	inl3 gene
94411 at	undef.	>1.6	>1.7	>1.2	>-1	gi=2832436	cyclin dependent kinase (CDK2L) - the 39 kDa variant of CDK2
94495 at	>-1.5	>1.6	>1.7	undef.	undef.	gi=5498707	EST
160720 at	<-1.2	>1.6	>1.4	<1	-1	gi=5489209	nucleolar protein family A, member 1 (Nola 1)
161791 r at	undef.	>1.6	undef.	<1.7	undef.	gi=6411366	EST
162359 r at	undef.	>1.6	undef.	>2.8	undef.	gi=6169513	EST
95894 at	undef.	>1.6	undef.	-1.2	undef.	gi=6100564	EST
161136 r at	undef.	<1.6	>1.9	undef.	>1.2	gi=6367084	EST
102792 at	1.2	1.6	2.6	1.3	-1.3	gi=1762315	uracil-DNA glycosylase (ung) gene, exon 1
101844 at	1.2	1.6	2	1.2	1	gi=2801410	peroxisomal sarcosine oxidase
160722 at	-1	1.6	>1.3	-1	-1.2	gi=6008277	EST
100890 at	-1	1.6	1.5	<-1	-1.2	gi=3720618	EST
95063 at	1.1	1.6	1.5	-1	-1.5	gi=4615424	dhm1
102796 at	1.2	1.6	1.1	1.1	<-1.7	gi=1785994	nucleoplasmin 3
103821 at	1	1.6	-1	1.1	-1.5	gi=4007644	cdc6-related
101044 at	1.2	1.6	-1.1	1	-1.8	gi=52951	delta-aminolevulinate dehydratase
162409 r at	undef.	>1.5	>2.7	<-1.3	<-1.1	gi=6280642	nuclear protein 220 (Np220)

104072	at	undef.	>1.5	>1.6	undef.	undef.	gi=200923	mouse serum amyloid P component
162088	r at	undef.	>1.5	>1.5	undef.	undef.	gi=6375934	cofilin 2. muscle (Cf12)
160978	at	>-1.2	>1.5	>1.5	undef.	>-1.2	gi=6638385	EST
100926	at	undef.	>1.5	>1.4	<1.6	>-1.1	gi=5471547	EST
162131	f at	undef.	>1.5	>1.3	undef.	undef.	gi=6427789	EST
92909	at	undef.	>1.5	>1.3	>-1.1	>-1.1	gi=1063401	placental growth factor
99032	at	undef.	>1.5	1.2	undef.	undef.	gi=2253712	ras-related protein (DEXRAS1)
98459	at	1.1	>1.5	1.2	undef.	<-1.4	gi=3053386	serine hydroxymethyltransferase
99442	at	undef.	>1.5	1.1	1.1	>2	gi=609540	glucocorticoid regulated endocrine protein (RESP18)
94997	at	<-1.1	>1.5	undef.	undef.	undef.	gi=4159992	endomucin
101203	r at	undef.	>1.5	undef.	undef.	undef.	gi=562960	EST
95989	at	1.1	1.5	2.4	1	1.3	gi=4309126	EST
102083	at	>1.1	1.5	>1.6	>-1.1	>-1.1	gi=4234919	GTP-binding protein ROC2 (Roc2)
103086	at	-1	1.5	>1.6	-1.1	1.1	gi=51371	homeo box A5
102993	at	<-1.1	1.5	>1.4	<-1.1	-1.1	gi=193563	glycoprotein galactosyltransferase alpha 1.3
104030	at	1.3	1.5	1.4	1.2	-1.8	gi=5492747	EST
96554	r at	-1.1	1.5	1.1	-1.2	1.3	gi=6078262	TAF15
103064	at	-1	1.5	-1.1	-1.1	-1.4	gi=2367670	checkpoint kinase (Chk1)
95109	at	1.2	1.5	-1.2	-1	-1.7	gi=6096780	nucleolar protein NOP56
93228	at	1.1	1.5	-1.3	1.1	-1.8	gi=805295	helicase. lymphoid specific
98948	at	1.2	1.5	-1.3	1	-1.8	gi=5333005	ngp1
93590	at	1.5	1.5	undef.	1.1	-1.1	gi=5488276	dynein
162053	i at	undef.	>1.5	>3.6	undef.	undef.	gi=6430474	protein tyrosine phosphatase. non-receptor type 5 (Ptpn5)
94757	at	-1	>1.5	1.8	2	-1.1	gi=192831	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog
160978	at	>-1.2	>1.5	>1.5	undef.	>-1.2	gi=6638385	EST
100926	at	undef.	>1.5	>1.4	<1.6	>-1.1	gi=5471547	EST
98943	at	1	>1.5	>1.2	>-1.1	-1.5	gi=220583	rpa2
102411	at	1.1	>1.5	1.1	undef.	1	gi=199766	kruppel zinc finger protein 2
161326	f at	>1.2	1.5	2.7	-1	-1.3	gi=5251726	EST
93856	at	1.4	1.5	2.3	1.2	-1.9	gi=202413	wilms tumor homolog
97481	r at	1.2	1.5	>2.2	>1.4	<1.2	gi=2286122	testis specific DNA1-homolog
103606	r at	-1	1.5	1.6	1.3	-1.2	gi=6096771	regulator of G-protein signaling 19 (RGS 19)
160496	s at	1	1.5	1.4	-1.1	-1.4	gi=3078639	mini chromosome maintenance deficient 3
98031	at	1.2	1.5	1.3	1.3	-1.3	gi=2689659	apoptosis activator Mtd
100062	at	1.1	1.5	1.2	-1	-1.3	gi=53550	mini chromosome maintenance deficient 3
93620	at	1.2	1.5	1.2	-1	-1.2	gi=2330006	RNA polymerase I largest subunit (rpa1)
100290	f at	1.1	1.5	1.1	-1.1	-1.1	gi=3749943	EST
104195	at	-1	1.5	-1.4	1	-1.6	gi=3100217	EST
95756	at	1.3	1.5	-2.1	1.2	-1.5	gi=5473894	RNA Methyltransferase SPB1
101816	at	<-1.5	>1.4	>3.6	undef.	>-1.1	gi=3885487	squamous cell carcinoma antigen 2
98363	at	undef.	>1.4	>2.9	undef.	undef.	gi=1336012	neuraxophilin 2 (Nxp-2)
103670	at	undef.	>1.4	>2.8	undef.	undef.	gi=293789	steroid cytochrome p450 7-alpha hydroxylase
162402	r at	>1.1	>1.4	2.7	1.2	1.7	gi=6267616	EST
95956	at	undef.	>1.4	>2.3	undef.	>1	gi=2979405	EST
94639	at	undef.	>1.4	>2.2	>-1.1	undef.	gi=1134856	semenoclotin
161725	r at	undef.	>1.4	>2.1	undef.	undef.	gi=6254144	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
95945	at	undef.	>1.4	>1.9	undef.	>-1.5	gi=2516476	EST
100016	at	1	>1.4	1.9	1.6	1.2	gi=467682	matrix metalloproteinase 11
162000	r at	undef.	>1.4	>1.9	undef.	>1.3	gi=6372228	suppressor of K+ transport defect 3 (Skd3)
161025	f at	undef.	>1.4	>1.8	>1.5	-1.4	gi=5470375	sry-box cont. gene 18 (Sox 18)
101991	at	undef.	>1.4	>1.6	>-1.3	undef.	gi=286077	flavin-containing monooxygenase
99030	at	undef.	>1.4	>1.6	undef.	>1.4	gi=198377	interleukin 7 receptor
162180	r at	<-1.1	>1.4	>1.6	undef.	>1.2	gi=6415361	EST
101574	f at	undef.	>1.4	>1.5	undef.	undef.	gi=191849	alpha-1 protease inhibitor 5 (alpha-1 PI-5)
100701	r at	undef.	>1.4	>1.5	undef.	undef.	gi=1805352	elp3
102251	at	undef.	>1.4	>1.5	undef.	1.1	gi=3047241	melastatin
96512	at	undef.	>1.4	>1.5	undef.	1.1	gi=1914848	ww domain binding protein 3
92486	at	<-1.1	>1.4	>1.4	-1.2	>1.3	gi=4996130	octn3
102660	at	<-1.1	>1.4	>1.3	<-1.1	-1.2	gi=396183	hox-3.5
92877	at	-1.2	>1.4	>1.3	undef.	>-1.1	gi=451131	beta ig-43
161422	f at	-1.2	>1.4	1.3	undef.	>-1.2	gi=6326371	EST
101231	at	1	>1.4	1.3	undef.	>-1.3	gi=2518664	EST
102926	at	<-1.2	>1.4	1.2	1.3	>-1.1	gi=2627159	gfr alpha-3
103545	at	>1.4	>1.4	1.1	>1.3	1	gi=1865252	EST
161787	f at	1.2	>1.4	1.1	1	<-1.3	gi=6411065	EST
98006	at	undef.	>1.4	>1	undef.	<-1.3	gi=303658	mRNA for DNA polymerase alpha associated subunit
161917	i at	undef.	>1.4	>-1.2	undef.	undef.	gi=6429496	phenylethanolamine N-methyltransferase
103475	s at	<-1.3	>1.4	-1.9	1.1	>1	gi=3806089	arginine-tRNA-protein transferase 1-1p (Ate1)
100966	at	undef.	>1.4	undef.	undef.	undef.	gi=466373	heparin cofactor II
100391	at	undef.	>1.4	undef.	undef.	undef.	gi=6141550	jnk1
96293	at	>1.1	>1.4	undef.	undef.	<-1.3	gi=5476813	EST
101168	at	undef.	1.4	4.1	>1.1	>-1.3	gi=467579	p/01
92519	at	1	1.4	3.6	1	1.3	gi=436123	phosphorylase kinase alpha 1
162340	r at	-1.1	1.4	2.3	<-1.2	1.2	gi=5314311	calcium binding protein A11 (calgizzarin)(S100a10)
161696	f at	1.1	1.4	>2.1	1.2	1.1	gi=6184807	EST
102264	at	undef.	1.4	>2.1	undef.	undef.	gi=3983147	schlafen1 (slfn1)
93952	r at	1	1.4	2.1	-1.2	1.1	gi=2066285	EST
96791	at	1.1	1.4	2	-1	-1.4	gi=5908404	EST
101938	at	undef.	1.4	>1.9	undef.	<-1.4	gi=473091	polyA binding protein (testis-enriched isoform)
92892	at	1.1	1.4	1.9	>1	1.1	gi=1197810	p24
104173	at	1.1	1.4	1.8	1.2	1.1	gi=2860944	EST
160415	at	1.2	1.4	>1.7	<-1.8	1.2	gi=4613476	claudin 1
97645	f at	1	1.4	1.7	1.1	1	gi=2080905	EST
104686	at	>1.3	1.4	>1.6	>-1.1	-1.1	gi=220412	glutamate receptor. ionotropic. NMDA1 (zeta 1)
93086	at	>1	1.4	>1.6	undef.	undef.	gi=197007	Ig kappa chain V-region
96026	at	<-1.1	1.4	>1.6	<-1.2	-1.3	gi=3167916	s-adenosylhomocysteine hydrolase (Ahcy)
103451	at	<-1.1	1.4	1.6	>-1.1	1.2	gi=5469372	cak-beta
103706	at	1.1	1.4	1.6	undef.	1	gi=3260097	EST
104225	at	1.2	1.4	1.6	-1.2	-1	gi=4723525	EST
93237	s at	1.1	1.4	1.6	-1.1	-1.1	gi=3979525	thymidilate synthase
96151	at	1.3	1.4	>1.5	1.3	-1	gi=2916407	EST
160662	r at	undef.	1.4	>1.5	>1.2	-1.1	gi=2625801	gata 6
103444	at	1.3	1.4	1.5	1	-1.5	gi=3894757	EST

104594 at	>-1	1.4	>1.4	1.3	>-1.1	gi=2460824	EST
94995 at	undef.	1.4	>1.4	1.3	-1.4	gi=5498237	EST
102924 at	1.3	1.4	1.4	1.3	-1.5	gi=1389693	fx-induced thymoma transcript (FXI-T1) / deltex1
104031 at	1	1.4	1.4	1.2	-1.3	gi=1181884	patched homolog
96849 at	1.1	1.4	1.3	-1.1	-1.1	gi=2591523	ddp1
160069 at	-1.1	1.4	1.3	1	-1.1	gi=2663660	EST
98112 r at	1.2	1.4	1.3	-1.1	-1.2	gi=5473438	leucine aminopeptidase (Lap)
101291 at	1.2	1.4	1.3	1.2	-1	gi=1781038	spermidine synthase pseudogene
100769 at	undef.	1.4	1.2	undef.	>-1	gi=3982129	EST
93655 at	1	1.4	1.2	1.1	1.3	gi=1765921	usf1 (exons 2 to 10)
92979 at	-1	1.4	1.2	1.1	1.4	gi=53627	polyomavirus enhancer activator 3
100156 at	1.1	1.4	1.1	-1.1	-1.5	gi=940403	cdc46
97824 at	1.2	1.4	1.1	1	-1.3	gi=6096364	EST
92458 at	>1.1	1.4	1.1	1.2	-1.2	gi=4034784	orc1-related
100458 at	-1	1.4	1	-1	1.1	gi=50741	EST
103420 at	1.3	1.4	-1	-1.1	-1	gi=1916802	emerin
92644 s at	-1.1	1.4	-1	-1	-1.3	gi=199934	myb proto-oncogene
93112 at	1	1.4	-1.1	-1	-1.3	gi=2381484	mMCM2
93041 at	1	1.4	-1.1	-1	-1.4	gi=940405	mcde21
101489 at	1	1.4	-1.1	1	-1.2	gi=220330	s-adenosylmethionine decarboxylase
160672 at	1.2	1.4	-1.1	1	1.1	gi=4316468	EST
160802 at	1.2	1.4	-1.1	1.2	-1.5	gi=2652049	EST
160791 at	-1	1.4	-1.2	1.1	-1.3	gi=5909748	EST
103501 at	-1.1	1.4	-1.2	1	1.1	gi=404649	pur-alpha
93488 at	1.1	1.4	-1.2	1	-1.4	gi=5474792	EST
161897 f at	-1	1.4	-1.3	-1.1	1.1	gi=5254944	EST
96778 at	-1.1	1.4	-1.4	1	-1.5	gi=2592929	EST
92540 f at	1	1.4	-1.5	1	-1.3	gi=1061191	spermidine synthase
100144 at	1.1	1.4	-1.6	-1.1	-1.4	gi=53453	nucleolin
92569 f at	1	1.4	-1.8	-1.2	-1.7	gi=2996193	sik similar
100323 at	-1.3	1.4	-2.1	-1.1	-1.5	gi=396140	s-adenosylmethionine decarboxylase 3
102963 at	1.2	1.4	undef.	>-1.1	-1.3	gi=1091479	e2f transcription factor 1
94297 at	1	1.4	undef.	>-1.1	<-1	gi=915279	fk506 binding protein 5, 51
162337 f at	1	1.4	undef.	-1.1	<1	gi=5248745	EST
98530 at	-1.2	1.4	undef.	undef.	-1.3	gi=5493521	EST

Durch Shh herunterregulierte Transkripte - geordnet nach dem 7h-Versuch) (103 Transkripte)

GeneID	Ratio +Shh vs øShh 3h	Ratio +Shh vs øShh 7h	Ratio +Shh vs øShh 18h	Ratio +Shh +Chx vs øShh +Chx 7h	Ratio +Shh +CP vs +Shh 7h	gi	Transkript
100566 at	-1.3	-2.8	1.1	-1.2	2.1	gi=425405	insulin-like growth factor binding protein 5
98521 at	1.3	-2.4	-1.1	-2.1	1.1	gi=5491878	vamp3
100405 at	-1.6	-1.8	-2.6	1.1	-1	gi=53164	chromobox homolog 3 (Cbx3)
100048 at	1	-1.8	undef.	-1.1	>1	gi=5910214	EST
104722 at	undef.	<-1.7	undef.	undef.	>1.1	gi=6096675	EST
104168 at	undef.	<-1.7	undef.	undef.	1.3	gi=2854697	EST
97760 at	-1.1	-1.7	-3.7	-1.2	-1	gi=199022	microtubule-associated protein 2
93711 at	-1.2	-1.7	-3.4	-1.1	-1	gi=220493	SEC66
98490 at	-1.4	-1.7	-2.7	1.5	-1.2	gi=2892280	EST
102030 at	-1.4	-1.7	-1.2	-1	-1.2	gi=3002557	atrx
103460 at	-1.1	-1.7	1.7	-1	1.8	gi=5493845	EST
96833 at	undef.	<-1.6	<-1.9	undef.	-1.1	gi=5908997	EST
97960 at	-1.4	-1.6	-3	-1	-1.2	gi=6101330	EST
98004 at	-1.2	-1.6	-2.1	1.1	-1.1	gi=200384	inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase (PKIA)
94289 r at	-1.1	-1.6	-1.5	-1	1.1	gi=5495480	EST
93303 at	<-1.1	-1.6	-1.1	<1.1	1	gi=1654347	ubiquitin fusion degradation 1 - like
102703 s at	-1.3	-1.6	undef.	1.2	1.3	gi=1293551	aquaporin 4
99638 at	1	<-1.5	undef.	undef.	>1.2	gi=2160436	procollagen type XV
97369 g at	undef.	<-1.5	undef.	undef.	undef.	gi=2072304	s-akap84
93005 at	-1.7	-1.5	-3.1	-1.2	1.1	gi=688413	synaptotagmin 1
95785 s at	-1.3	-1.5	-3	1.1	1.1	gi=2168154	rab7, member ras oncogene family, pseudogene 1
93892 at	-1.3	-1.5	-2.8	1.1	1	gi=3808155	elav-type, RNA-binding protein (napor; cugbp2)
93908 f at	-1.4	-1.5	-2.1	1	1	gi=51488	type IIB intracisternal A-particle (IAP) element encoding integrase
104492 at	-1.3	-1.5	-2.1	1	1	gi=2114427	early B-cell factor 3 (ebf3; oif-1)
104249 g at	-1.5	-1.5	-1.9	-1	-1.2	gi=6556946	EST
93067 f at	1.1	-1.4	-1.8	1	1.1	gi=1458142	histone H2a.2-615 (H2a-615). and histone H3.2-615 (H3-615) genes
101881 g at	-1.1	-1.5	-1.8	-1.1	1.2	gi=348968	procollagen type XVIII alpha 1
160970 at	-1.2	-1.5	-1.7	-1.4	1.2	gi=5492241	EST
95393 at	-1.2	-1.5	-1.7	1	-1.1	gi=4401213	EST
96653 at	-1.1	-1.5	-1.6	-1.2	1.2	gi=5495668	EST
92502 at	-1.2	-1.5	-1.6	1.1	1.2	gi=2828233	zinc finger protein (plagl1; zac)
96606 at	-1.5	-1.5	-1.4	<-1.3	-1.2	gi=5931554	sid470p
160287 at	-1.3	-1.5	-1.2	1.1	-1.1	gi=5496463	EST
95120 at	1.2	-1.5	-1.1	-1.3	1.2	gi=5471834	EST
97334 at	-1	-1.5	>-1	-1.1	1.5	gi=5909341	hes6
98478 at	-1.2	-1.5	1.1	-1	1.2	gi=2149913	cyclin G2
95656 i at	undef.	-1.5	undef.	undef.	undef.	gi=6100694	EST
102259 at	<-2.7	-1.5	undef.	>1.2	-1.1	gi=3065928	14-3-3 protein gamma
93720 at	<-1.2	<-1.4	<-1.3	undef.	1	gi=2467309	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
93273 at	Undef.	<-1.4	<-1.2	undef.	1.3	gi=2829292	alpha-synuclein
92477 at	<-1.4	<-1.4	<-1.2	undef.	1.1	gi=2664002	spindlin

104087	at	>-1.1	<-1.4	undef.	1.2	undef.	gi=5474811	EST
101503	at	<-1.6	<-1.4	undef.	undef.	-1	gi=861058	ulip protein
101857	at	-1.3	-1.4	-3	1.1	-1	gi=2723281	serine/arginine-rich protein specific kinase 2
102277	at	-1.3	-1.4	-2.9	-1.1	-1	gi=191507	zinc finger protein (mkr3)
99623	s at	-1.2	-1.4	-2.6	1.1	-1.1	gi=3218529	pancortin-4
94805	f at	1.2	-1.4	-2.5	1.2	1.5	gi=193730	histone H2A.1 gene
92673	at	-1.5	-1.4	-2.4	1	1.2	gi=1407658	endophilin 1
99528	at	-1.3	-1.4	-2.3	1	-1.1	gi=6097421	spindlin
93909	f at	-1.4	-1.4	-2.1	1.1	1.1	gi=51502	intracisternal A particles, Thbd linked
101966	s at	undef.	-1.4	-2.1	1.2	-1.1	gi=2746336	ring zinc finger protein (Rzf)
102009	at	-1.2	-1.4	-2	undef.	-1.1	gi=5469487	EST
101946	at	-1.2	-1.4	-2	1.2	-1.1	gi=2916122	EST
98864	s at	undef.	-1.4	-2	1	-1.4	gi=220408	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 (beta 2)
101837	g at	-1.3	-1.4	-2	1.1	-1.3	gi=961469	protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform
100047	at	-1.2	-1.4	-2	-1.1	-1.1	gi=200997	synaptosomal-associated protein. 25 kDa
103035	at	-1.1	-1.4	-2	-1	-1.1	gi=1399904	tap1 g7
160119	at	-1.2	-1.4	-1.9	-1.1	1	gi=5489444	EST
96065	at	-1.1	-1.4	-1.9	1	1.1	gi=1669620	latexin
101945	g at	<-1.9	-1.4	-1.9	-1.1	-1.1	gi=1864158	lysophospholipase 1
93632	g at	-1.2	-1.4	-1.9	1	-1	gi=1771307	new-rhobin
93212	at	<-1.9	-1.4	<-1.8	undef.	-1.3	gi=5777593	b-ind1 protein (B-ind1 gene)
104432	at	-1.1	-1.4	-1.8	-1.1	1.2	gi=2353785	rho7 (rho7)
93669	f at	-1.1	-1.4	-1.8	-1.1	1	gi=6078722	sox 11
95543	at	-1.3	-1.4	-1.8	1.1	-1.2	gi=5477259	EST
95800	s at	-1.1	-1.4	-1.7	1.1	-1.3	gi=55468	zinc finger protein, autosomal
96239	at	1.1	-1.4	-1.6	-1	1	gi=2885099	EST
98339	at	-1.3	-1.4	-1.6	1.1	1	gi=6136793	synaptotagmin XI
93023	f at	<-1.7	-1.4	<-1.5	undef.	undef.	gi=193855	histone H3 (H3.2-221) gene
93646	at	-1.1	-1.4	-1.5	-1.2	-1.2	gi=1769576	a6 protein tyrosine kinase homolog
102704	at	-1	-1.4	-1.5	1	1.2	gi=1857924	aquaporin 4
98540	g at	-1.1	-1.4	-1.5	1.1	-1.1	gi=3309165	cop9 complex subunit 2 (COPS2)
93013	at	-1.1	-1.4	-1.5	-1	1.2	gi=3420740	id 2
160961	at	-1.1	-1.4	-1.4	-1.2	1.2	gi=5497253	EST
93902	at	<-1.3	-1.4	-1.4	-1.1	1	gi=6165414	gab1 gene for GRB2-associated binding protein 1
97173	f at	undef.	-1.4	-1.4	undef.	-1.1	gi=199435	histocompatibility 2. K region locus 2
93056	g at	-1.1	-1.4	-1.3	1.1	1.2	gi=5909905	EST
92499	at	-1.4	-1.4	-1.3	1	1.1	gi=2597989	unc4
97415	at	-1.1	-1.4	<-1.2	-1.1	1.1	gi=200631	gtp-binding protein (Rab3D)
99521	at	1	-1.4	-1.2	-1.2	1	gi=4760605	adenylate kinase 3
103532	at	-1.1	-1.4	-1.2	-1.2	1.3	gi=6095912	EST
96640	at	1	-1.4	-1.2	-1.1	-1.1	gi=4722633	EST
93043	at	-1.1	-1.4	-1.2	-1	-1	gi=1747303	sdr1
95059	at	-1.1	-1.4	-1.1	-1.1	1	gi=5907928	EST
97111	at	-1.4	-1.4	-1.1	-1	1	gi=1936544	EST
95731	at	-1.1	-1.4	-1.1	-1.1	1.2	gi=5477319	EST
102632	at	-1.2	-1.4	>-1.1	-1	1	gi=3283349	calmodulin-binding protein SHA1 (Sha1)
99126	at	-1.2	-1.4	-1	1.1	1.2	gi=202420	inactive X specific transcripts
95036	at	-1.1	-1.4	1.1	undef.	1.3	gi=393386	calretinin
102085	at	-1.5	-1.4	1.1	1.1	1	gi=4321346	insulinoma-associated protein (IA-1)
92867	at	1	-1.4	1.1	1.1	1.2	gi=3220231	polyhomeotic 2 protein (Mph2)
102335	at	-1.3	-1.4	1.1	1.1	1.2	gi=3150442	potassium channel. subfamily K. member 1
94963	at	-1.1	-1.4	1.1	1	-1	gi=4316135	similar to vinculin
97820	at	-1.2	-1.4	>1.1	-1	1	gi=5931607	galactokinase
95603	at	-1.1	-1.4	>1.1	-1.2	1.3	gi=6099485	EST
160615	at	1	-1.4	1.2	-1	1.1	gi=5470176	EST
99494	at	-1.1	-1.4	1.2	>1.3	1	gi=2462594	neuroserpin
98891	at	-1.1	-1.4	>1.3	1.1	1.2	gi=5860494	EST
92423	at	-1	-1.4	>1.3	<-1.1	undef.	gi=4322035	par-6
161082	r at	-1	-1.4	1.4	-1	1.3	gi=1478748	EST
97365	at	1.1	-1.4	1.7	-1.2	1.2	gi=5491938	EST
100706	f at	undef.	-1.4	2.2	<1	<1.2	gi=2065592	EST
98055	at	1.2	-1.4	undef.	undef.	1.1	gi=6096833	EST

Tab. 5-1

Durch DNA Microarray-Hybridisierung detektierte, Shh-responsive Transkripte.

Die Transkripte wurden nach ihrer Expressionsstärke des 7 h-Versuchs geordnet. Als Schwellenwert wurde der Faktor 1,4 festgelegt. Abkürzung: undef: nicht auswertbar; gi: Genidentifizierung; CP: Cyclopamin; vs: versus; +: mit; ø: ohne; Ratio: Expressionsfaktor

Publikationen

1. Brune, H., Buslei, R., Koch, A., Hartmann, W., Schüller, U., Kraetzschmar, J., Wiestler, O.D., Schilling, K. and Pietsch, T. (2004). *SOX18* is a target gene of the Hedgehog/Patched pathway in cerebellar granule cell precursors and is highly expressed in human desmoplastic medulloblastomas. *Cancer Research* (zur Veröffentlichung eingereicht)
2. Brune, H., Buslei, R., Kraetzschmar, J., Sommer, A., Seidel, H., Wiestler, O.D., Schilling, K. and Pietsch, T. (2004). Identification of novel target genes of the Sonic Hedgehog-Patched pathway in murine granule cell precursors of the cerebellum. *Brain Pathology* (zur Veröffentlichung eingereicht)
3. Brune, H., Buslei, R., Koch, A., Hartmann, W., Kraetzschmar, J., Wiestler, O.D., Schilling, K. and Pietsch, T. (2004). Components of the Notch cascade are regulated by activated Sonic Hedgehog-Patched pathway in murine cerebellar granule cell precursors and in human desmoplastic medulloblastomas. (in Vorbereitung)
4. Hartmann, W., Koch, A., Brune, H., Waha, A., Denkhaus, D., Dani, I., Langmann, H., Bode, U., Wiestler, O.D., Schilling, K. and Pietsch, T. (2004). IGF-II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Cancer Research* (zur Veröffentlichung eingereicht)

Kongressbeiträge

Vorträge

XIV. Jahrestagung der Kind-Phillip-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Lüneburger Heide, 06.06.-09.06.2001. "Identification of novel target genes of the Shh signaling pathway in medulloblastoma and granule cell precursors of the cerebellum".

BONFOR-Symposium, Bonn, 22.06.2001. "Identifizierung neuer Zielgene des Sonic Hedgehog-Patched-Signaltransduktionswegs in cerebellären Körnerzellvorläufern der Maus und in humanen Medulloblastomen".

Doktoranden/Postdoktoranden-Symposium, SFB400, Bonn, 29.06.2001. "Identifizierung neuer Zielgene des Sonic Hedgehog-Patched-Signaltransduktionswegs in cerebellären Körnerzellvorläufern der Maus und in humanen Medulloblastomen".

Posterpräsentationen

AACR (American Association for Cancer Research), 93rd Annual Meeting, San Fransisco, USA, 06.04.-10.04.2002. "Identification and characterization of novel target genes of the Shh signaling pathway in granule cell precursors of the cerebellum and medulloblastomas"

AACR (American Association for Cancer Research), 94rd Annual Meeting, Washington D.C., USA, 11.07.-14.07.2003. "*SOX18* is a target gene of the Hedgehog-Patched pathway in murine cerebellar granule cell precursors and is highly expressed in human desmoplastic medulloblastomas"

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Torsten Pietsch danke ich ganz herzlich für die Überlassung dieses hoch interessanten Themas, die intensive wissenschaftliche Betreuung, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie die stets sehr freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Otmar D. Wiestler danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Doktorarbeit am Institut für Neuropathologie an der Universität Bonn.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl Schilling und seinen Mitarbeitern vom Institut für Anatomie und Zellbiologie für das unermüdliche Engagement, die zahlreichen Zellkulturpräparationen und die fruchtbare Kooperation.

Herrn Prof. Dr. Michael Hoch danke ich ganz herzlich für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Jörn Krätzschar und Frau Dr. Annette Sommer sei für die DNA Microarray-Hybridisierungen durch Coporate Research, Schering AG, Berlin gedankt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Pietsch für die Hilfsbereitschaft bedanken, mit der ich immer rechnen konnte; besonders bei Dr. Arend Koch und Dr. Wolfgang Hartmann. Allen voran danke ich Dr. Rolf Buslei, mit dem ich sehr gerne zusammengearbeitet habe und ohne den diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Neuropathologie für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.



Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Bonn, 05. Februar 2004

Hendrik Brune