

Charakterisierung der entwicklungsabhängigen
Genexpression in cerebellären Körnerzellen und
davon abgeleiteten Tumoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sabine Topka

aus Bonn

Bonn, November 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Karl Schilling
2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Fürst

Tag der Promotion: 07.04.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Das Kleinhirn	6
1.1.1	Aufbau und Funktion des Kleinhirns	6
1.1.2	Die Entstehung der Zelltypen des Kleinhirns und ihre Verschaltung	8
1.1.3	Entwicklung von Körnerzellen des Kleinhirns	11
1.1.4	Signalwege in der Körnerzellentwicklung	13
1.2	Das Medulloblastom	16
1.2.1	Definition	16
1.2.2	Klassifizierung	17
1.2.3	Signalwege in der Medulloblastom-Pathogenese	21
1.3	Ziel der Arbeit	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Chemikalien und Enzyme	25
2.1.3	Primersequenzen	26
2.1.4	siRNA Sequenzen	30
2.1.5	Plasmide	31
2.1.6	Bakterienstämme	33
2.1.7	Zelllinien	33
2.1.8	Mauslinien	33
2.1.9	Antikörper	34
2.1.10	Software	35
2.2	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	36
2.2.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA	36
2.2.1.2	Isolierung von genomischer DNA	37
2.2.1.3	Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen	37
2.2.1.4	Phenol-Chloroform Extraktion von Nukleinsäuren	38
2.2.2	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration	38
2.2.3	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA	39
2.2.4	Klonierungstechniken	39
2.2.4.1	Enzymatische Spaltung von DNA über Restriktionsendonukleasen	39
2.2.4.2	Agarose Gelelektrophorese	40
2.2.4.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
2.2.4.4	Modifikation von DNA Fragmentenden zur Klonierung	41
2.2.4.5	Ligation von DNA Fragmenten	42
2.2.4.6	Transformation von chemisch Kompetenten E.coli Bakterien mit Plasmid DNA	42
2.2.4.7	Transformation von elektrisch Kompetenten E.coli Bakterien mit Plasmid DNA	43
2.2.5	Präparation von Plasmid DNA	43
2.2.6	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	44
2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
2.2.7.1	PCR an cDNA, Plasmid DNA und genomischer DNA	44
2.2.7.2	PCR zur direkten Amplifikation von DNA aus Bakterienzellen (Colony-PCR)	45
2.2.7.3	Quantitative Real-Time PCR	47
2.2.8	Silbergel zur Kontrolle von Real-Time PCR Fragmenten	48

2.2.9	In-situ-Hybridisierung	49
2.2.9.1	Herstellung der Sonden für die in-situ-Hybridisierung	51
2.2.9.2	Anfertigung von Kryostat-Gewebeschnitten	52
2.2.9.3	In-situ-Hybridisierung	52
2.2.10	Herstellung von antisense Vektoren für die Zellkultur	53
2.2.10.1	Phosphorylierung und Annealing von antisense RNA Oligonukleotidsequenzen	53
2.2.10.2	Klonierung von shRNAs zur Herstellung von silencing Vektoren	54
2.3	Zellbiologische Methoden	55
2.3.1	Kultivierung und Konservierung von Zelllinien	55
2.3.2	Transfektion von Zelllinien	56
2.3.2.1	Transfektion mit siRNA	56
2.3.2.2	Transfektion mit Plasmiden	57
2.3.3	Stabile Selektion von mit Plasmid DNA transfizierten Zelllinien	58
2.3.3.1	Selektion stabil transfizierter Mischkulturen	58
2.3.3.2	Stabile Selektion von Einzelzellklonen	58
2.3.4	Neuronale Differenzierung humaner Teratokarzinomzellen	59
2.3.5	Real Time Monitoring von Zellkulturen über Impedanzmessung	60
2.3.6	Durchflusszytometrische Bestimmung von Proteinexpression nach Antikörperfärbung an Zellkulturen	60
2.3.7	Time-Lapse Videomikroskopie von Zellkulturen	61
2.4	Biochemische Methoden	62
2.4.1	Proteinextraktion aus Gewebe und Zellkulturen	62
2.4.2	Proteinbestimmung	62
2.4.3	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.4.4	Western Blot Analyse	64
2.5	Histochemische und immunzytochemische Methoden	66
2.5.1	HE Färbung	66
2.5.2	Immunfluoreszenzfärbungen an Zellkulturen	66
2.6	Microarray Datenauswertung	67
2.6.1	Analyse der Microarray Datensets von Math1 ⁺ Körnerzellvorläufern und Gesamtcerebellum	67
2.6.2	Analyse der Expression ausgewählter Gene in Expressionsdatensätzen von nach molekularen Subgruppen klassifizierten humanen Medulloblastomproben	68
2.6.3	Korrelationsanalysen	69
2.7	Statistische Auswertung	69
3	ERGEBNISSE	70
3.1	Microarray-basierte Genexpressionsanalyse von Körnerzellvorläufern des Kleinhirns	70
3.1.1	Selektion differentiell exprimierter Gene	70
3.1.2	Verifikation der mithilfe des Microarrays ermittelten Daten	75
3.2	Der Transkriptionsfaktor Cux1 in der Kleinhirnentwicklung und in der Pathogenese von Medulloblastomen	83
3.2.1	Expression von Cux1 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung	83
3.2.2	Expression von Cux1 in Medulloblastomen	85
3.2.2.1	Cux1 Expression in Medulloblastomen von Mäusen mit konstitutiv aktivem Shh Signalweg	85
3.2.2.2	Expression von Cux1 in menschlichen Medulloblastomen	87
3.2.3	Cux1 Expression und Knockdown in humanen Medulloblastomzelllinien	89
3.2.3.1	siRNA vermittelte Reduktion von Cux1	90

3.2.3.2	shRNA-vermittelte Cux1 Reduktion -----	93
3.2.3.3	Einfluss von Cux1 auf die Zellproliferation und Apoptose in Medulloblastomzellen -----	97
3.2.3.4	Einfluss von Cux1 auf die Motilität von Medulloblastomzellen-----	100
3.2.4	Identifikation von Genen, deren Expression in humanen Medulloblastomen mit der Expression von Cux1 korreliert -----	106
3.3	Die Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2 in der Kleinhirnentwicklung, in Medulloblastomen und in der neuronalen Differenzierung -----	110
3.3.1	Expression von Tgif1 und Tgif2 im postnatalen Kleinhirn der Maus -----	110
3.3.2	Expression von Tgif1 und Tgif2 in murinen und humanen Medulloblastomen -----	112
3.3.3	Reduktion der Expression von Tgif1 und Tgif2 in Medulloblastomen mittels siRNA- -----	118
3.3.4	Expression und Knockdown von Tgif1 und Tgif2 in humanen Teratokarzinomzellen-----	122
3.3.5	Stabile Reduktion von Tgif1 und Tgif2 in humanen Teratokarzinomzellen über einen multiplen shRNA Vektor-----	123
3.3.6	Einfluss der Reduktion von Tgif1 und Tgif2 auf die Differenzierung in der humanen NT- 2 Zelllinie -----	126
3.3.7	Einfluss einer verminderten Expression von Tgif1 und Tgif2 auf das Wachstumsverhalten von NT-2 Zellen-----	127
3.4	Die Expression des Fzd3 Rezeptors im Kleinhirn und in Medulloblastomen -----	129
3.4.1	Expression von Fzd3 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung-----	129
3.4.2	Expression von Fzd3 in Medulloblastomen murinen und humanen Ursprungs-----	131
3.5	Expression des Transkriptionsfaktors Plagl1 während der Kleinhirnentwicklung und in Medulloblastomen -----	134
3.5.1	Expression von Plagl1 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung -----	134
3.5.2	Expression von Plagl1 in Medulloblastomen murinen und humanen Ursprungs-----	135
4	DISKUSSION -----	139
4.1	Identifikation von Körnerzellvorläufer-spezifischen Genen mittels Microarray-Analyse-----	139
4.2	Der Transkriptionsfaktor Cux1 -----	140
4.3	Die Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2-----	150
4.4	Der Wnt Rezeptor Fzd3-----	156
4.5	Der Transkriptionsfaktor Plagl1 -----	161
5	ZUSAMMENFASSUNG -----	164
6	ANHANG -----	166
6.1	Ergänzende Ergebnisse-----	166
6.2	Abkürzungsverzeichnis-----	177
6.3	Literaturverzeichnis -----	179
6.4	Danksagung -----	195

1 Einleitung

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zum Verständnis der Entwicklung von Körnerzellen des Kleinhirns sowie der Medulloblastom-Pathogenese geleistet werden. Das Kleinhirn nimmt eine besondere Rolle bei der Untersuchung des Gehirns ein, da es durch seinen klar strukturierten Aufbau die Analyse komplexer Vorgänge, die während der Entwicklung stattfinden, erleichtert. Obwohl die grundlegende Verschaltung des adulten Kleinhirns seit über 100 Jahren bekannt ist sind die Mechanismen, welche im Verlauf der Entwicklung zur Ausbildung dieser Struktur führen, noch nicht vollständig verstanden. Das Kleinhirn ist bei der Betrachtung maligner Entartung von besonderer Bedeutung, da es den Ursprung für den häufigsten malignen pädiatrischen Hirntumor, das Medulloblastom, bildet.

1.1 Das Kleinhirn

1.1.1 Aufbau und Funktion des Kleinhirns

Das Kleinhirn befindet sich in der hinteren Schädelgrube in enger Nachbarschaft zur Pons, Medulla oblongata und dem IV. Hirnventrikel. Es weist an der Oberfläche dünne, blattartige Windungen auf. Den medialen Anteil des Kleinhirns bildet der sogenannte Wurm (Vermis cerebelli). Die Übergangregionen zu den beiden nach lateral ausladenden Hemisphären (Hemisphaeria cerebelli) werden als Paravermis bezeichnet. Die kaudal gelegenen, entwicklungsgeschichtlich älteren Anteile der Hemisphären werden Paraflocculus bzw. Flocculus genannt (Abb. 1A).

In der Region der Vermis lässt sich das Kleinhirn in vier Hauptbereiche, die Lobi genannt werden untergliedern, den Lobus anterioris, Lobus centralis, Lobus posterioris und Lobus nodularis (Abb. 1B). Die einzelnen Lobi werden wiederum aufgrund ihrer Einfaltungen in Lobuli unterteilt. Insgesamt findet man im inneren

Teil des Kleinhirns zehn Lobuli die von anterior nach posterior in römischen Zahlen durchnummeriert sind (Larsell, 1952).

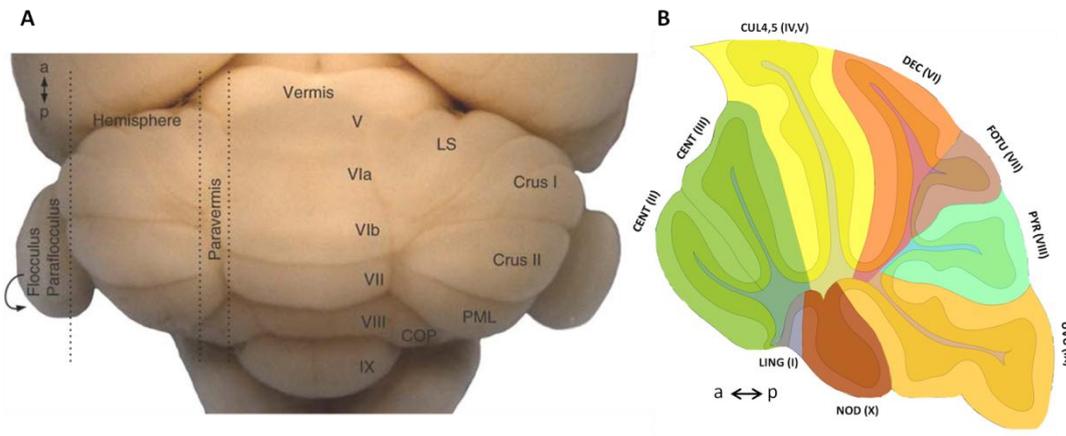


Abb. 1: Makroskopischer Aufbau und Lappchengliederung des Kleinhirns. (A) Makroskopischer Aufbau des Kleinhirns. Verändert nach: White and Sillitoe (2013) (B) Lappchengliederung im vermalen Bereich. Die Lappchen(Lobuli) sind von I-X in römischen Zahlen durchnummeriert. Bezeichnungen der einzelnen Lobuli: LING= Lingula, CENT= zentrale Lobuli, CUL= Culmen, DEC= Declive, FOTU= Folium- Tuber Vermis, PYR= Pyramus, UVU= Uvula, NOD= Nodulus. Achsenorientierung: a=anterior, p= posterior

Vom inneren Aufbau her besitzt das Kleinhirn eine dreischichtige Rindenregion (Cortex cerebelli), welche sich aus Molekularschicht, Purkinjezellschicht und Körnerzellschicht zusammensetzt und die meisten Nervenzellkörper des Kleinhirns beherbergt. Unterhalb des Cortexes befindet sich die weiße Substanz, in welcher sich hauptsächlich Gliazellen und Nervenzellfortsätze befinden. In der weißen Substanz sind auch Ansammlungen von Nervenzellkörpern lokalisiert, die als Kleinhirnerkerne bezeichnet werden.

Zu den Funktionen des Kleinhirns zählen die Regulation koordinierter Bewegungen, des Muskeltonus und des Gleichgewichts. Hierbei werden Eingangssignale

des Hirnstamms, des Rückenmarks und der Großhirnrinde mit sensorischen Informationen aus den Muskeln und anderen Arealen integriert. Neuere Studien zeigen, dass das Kleinhirn auch eine Rolle bei zahlreichen kognitiven Funktionen einnimmt. Hierzu zählen unter anderem Sprache, räumliche Erinnerung und Aufmerksamkeit (Baillieux et al., 2008).

1.1.2 Die Entstehung der Zelltypen des Kleinhirns und ihre Verschaltung

Die Zelltypen des Kleinhirns gehen in der Entwicklung aus drei verschiedenen Populationen von Vorläuferzellen hervor. Eine Population multipotenter Vorläuferzellen des primären Keimepithels am Dach des vierten Ventrikels bildet GABAerge Neurone (VZ, Abb. 2). Zu diesen zählen die Purkinjezellen, Golgi Zellen, Lugaro Zellen, Candelabrum Zellen, Korb- und Sternzellen und GABAerge Zellen der tiefen Kerne. An der Rautenlippe hingegen entsteht eine zweite Population, die Vorläufer der glutamatergen Nervenzellen des Kleinhirns, zu welchen Körnerzellen, unipolare Bürstenzellen und die glutamatergen Neurone der tiefen Kerne zählen (RL, Abb. 2). Eine dritte Gruppe multipotenter Vorläuferzellen wurde erst vor kurzer Zeit im postnatalen Kleinhirn entdeckt (Lee et al., 2005). Es handelt sich hierbei um neurale Stammzellen, die die Marker CD133 und Nestin exprimieren. Sie generieren Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone, jedoch wahrscheinlich keine Körnerzellen.

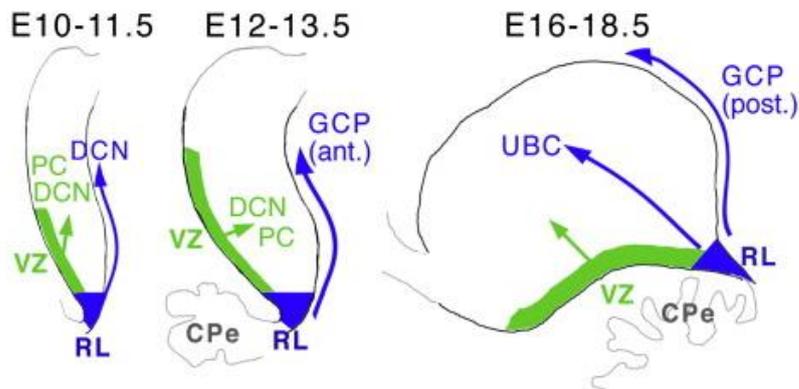


Abb. 2: Generierung verschiedener Zelltypen des Kleinhirns während der Entwicklung in der Kleinhirnanlage. VZ= Ventrikularzone, RL= Rautenlippe, PC= Purkinjezellen, DCN= tiefe Kleinhirnrkerne, GCP= Körnerzellvorläufer, UBC= unipolare Bürstenzellen. Verändert nach: Fernandes et al. (2012)

In der Maus entstehen unter den GABAergen Neuronen zunächst die Purkinjezellen zwischen etwa den Embryonaltagen 10,5 und 13,5 und die GABAergen Zellen der tiefen Kerne (E10,5 – E11,5). Die Golgizellen entstehen kurze Zeit später an der ventrikulären Zone der Kleinhirnanlage ab E13,5 bis etwa zum Tag der Geburt. Die Korb- und Sternzellen, sowie die Candelabrum Zellen entstehen perinatal. Unter den Neuronen, die aus der Rautenlippe entstehen, werden zunächst die glutamatergen Neurone der tiefen Kerne gebildet (E10,5 – E12,5). Anschließend folgt die Genese der unipolaren Bürstenzellen und der Körnerzellen ab dem Embryonaltag E12,5. Die unipolaren Bürstenzellen werden an der Rautenlippe bis etwa E18,5 gebildet, die Körnerzellvorläufer bis um den Zeitpunkt der Geburt herum (Hoshino, 2012).

Die Kleinhirnrinde ist aus drei Schichten aufgebaut. Die äußerste Schicht, die Molekularschicht, ist relativ zellarm (ML, Abb. 3). Hier befinden sich die Zellkörper der Korb- und Sternzellen. Unterhalb der Molekularschicht liegt die Purkinjezellschicht, die nur aus einer Schicht von Zellen besteht (PCL, Abb. 3). Hier liegen die

Zellkörper der Purkinjezellen zwischen denen sich die Zellkörper der Bergmann Gliazellen und vereinzelte Candelabrumzellen befinden. Die innerste Schicht bildet die Körnerzellschicht (IGL, Abb. 3). In dieser liegen in großer Masse die Körnerzellen sowie verschiedene Typen von Interneuronen, die Golgizellen, Lugarozellen und unipolaren Bürstenzellen.

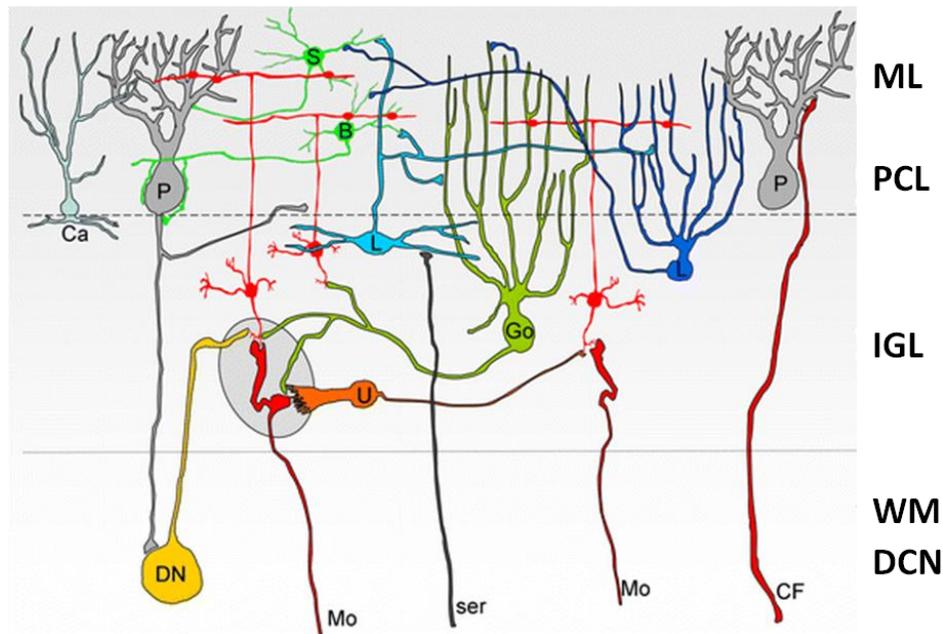


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Verschaltung zwischen den unterschiedlichen Nervenzelltypen in der Kleinhirnrinde. ML= Molekularschicht, PCL= Purkinjezellschicht, IGL= Körnerzellschicht, WM= weiße Substanz, DCN= tiefe Kleinhirnkerne, Die Körnerzellen sind in hellrot dargestellt. P= Purkinjezelle, S= Sternzelle, B= Korbzelle, Ca= Candelabrumzelle, L= Lugarozelle, Go= Golgizelle, U= unipolare Bürstenzelle, DN= tiefe Kerne, Mo= Moosfaser, CF= Kletterfaser, ser= Serotonerge Afferenzen. Verändert nach: Schilling et al. (2008)

Die Purkinjezellen nehmen eine zentrale Rolle bei der Integration von Signalen und der neuronalen Verschaltung innerhalb der Kleinhirnrinde ein. Sie stellen die einzigen Efferenzen der Kleinhirnrinde dar. Sie empfangen exzitatorische Signale von Kletterfasern aus der unteren Olive im Hirnstamm. Weiterhin bilden auch

Körnerzellen erregende Synapsen mit Purkinjezellen aus. Die Körnerzellen ihrerseits empfangen exzitatorischen Input von den sogenannten Moosfasern, deren Ursprungsneurone in mehreren Kernregionen des Hirnstamms sowie im Rückenmark liegen.

Die Purkinjezellen erhalten auch inhibitorische Signale von Korb- und Sternzellen der Molekularschicht. Die ankommenden exzitatorischen und inhibitorischen Signale werden von den Purkinjezellen verrechnet und somit eine Antwort der Purkinjezellen auf die eingehenden Informationen generiert und zu den Zellen der tiefen Kerne des Kleinhirns und zu den vestibulären Kernen gesendet. Diese leiten schließlich die aus dem Kleinhirn kommende Information indirekt an die Großhirnrinde und das Rückenmark weiter.

1.1.3 Entwicklung von Körnerzellen des Kleinhirns

Die Körnerzellen des Kleinhirns entstehen aus Vorläuferzellen, die sich während der Embryonalentwicklung in der oberen Rautenlippe befinden. Sie entstehen an der äußeren Oberfläche des Kleinhirns und wandern nach innen (siehe Abb. 4A), während die meisten anderen Nervenzellen des Kleinhirns im Bereich der Ventrikel gebildet werden und anschließend nach außen wandern. Ab dem Embryonaltag 12,5 verlassen die Körnerzellen die Rautenlippe und migrieren tangential entlang der äußeren Oberfläche des sich entwickelnden Kleinhirns, wo sie die äußere Körnerschicht (EGL) bilden. Die tangentielle Wanderung der Körnerzellvorläufer verläuft saltatorisch, d.h. Phasen der Fortbewegung wechseln sich jeweils mit Pausen ab (Gilthorpe et al., 2002). Die Körnerzellen nehmen schließlich einen Platz in der EGL ein, der mit ihrer räumlich –zeitlichen Entstehung in der Rautenlippe korreliert (Mathis und Nicolas, 2003). Zusammen mit der Beobachtung, dass innerhalb der Körnerzellpopulation unterschiedliche molekulare Muster vorhanden sind, liegt die Vermutung nahe, dass es Subgruppen innerhalb der

Körnerzellpopulation gibt, die sich anhand der von ihnen exprimierten Gene unterscheiden lassen (Gilbertson und Ellison, 2008).

Ein Faktor, der bei der Migration der Körnerzellen in die EGL eine wichtige Rolle spielt ist Sdf1-alpha. Dieser wird von Zellen der Meningen sezerniert. Körnerzellen besitzen den Rezeptor Cxcr4, an welchen Sdf1-alpha bindet. Somit werden die Körnerzellen auch während ihrer nachfolgenden proliferativen Phase in der EGL gehalten (Vilz et al., 2005). Innerhalb der EGL bilden die Körnerzellvorläufer anschließend zwei Schichten aus (siehe Abb. 4B). Im äußeren Teil der EGL befinden sich aktiv proliferierende Körnerzellvorläufer, der innere Anteil der EGL beherbergt postmitotische Körnerzellvorläufer.

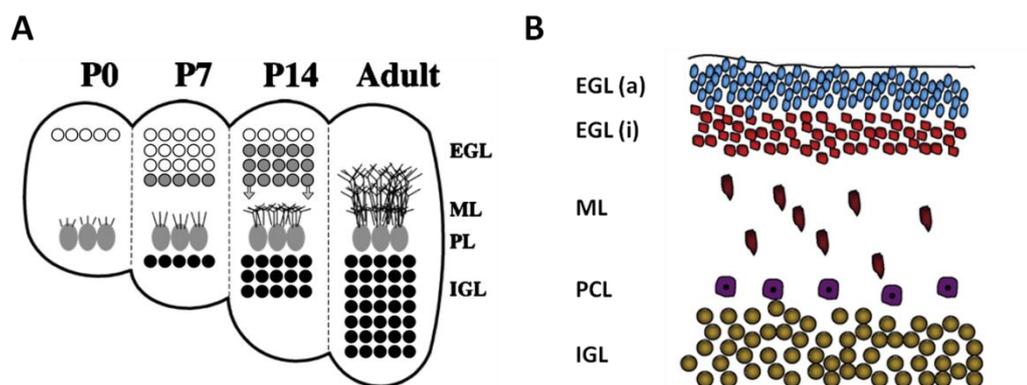


Abb. 4: Postnatale Entwicklung von Körnerzellen des Kleinhirns. (A) Schematische Darstellung der Zellschichten in der Kleinhirnrinde in verschiedenen Postnatalstadien. (B) Schematische Darstellung der Verteilung von Körnerzellen verschiedener Reifungsstadien in der Kleinhirnrinde der Maus etwa eine Woche nach der Geburt. Verändert nach: Wechsler-Reya (2003) und Behesti and Marino (2009)

Die Proliferation der Körnerzellvorläufer wird durch den von Purkinjezellen sezernierten Faktor Sonic Hedgehog (Shh) gesteuert (Dahmane and Ruiz i Altaba, 1999; Wallace, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999). Sie vollzieht sich haupt-

sächlich nach der Geburt und hat ihren Höhepunkt, bei der Maus, zwischen den Postnataltagen vier und acht. Die Zellteilung der meisten Körnerzellvorläufer ist bei der Maus an Postnataltag 15 abgeschlossen. Beim Menschen dauert dieser Prozess bis ins zweite Lebensjahr an (ten Donkelaar et al., 2003). Die postmitotischen Körnerzellen vollziehen zunächst noch einmal eine tangentielle Migration innerhalb der inneren EGL und wandern schließlich entlang der Bergmann Glia Fasern durch die Molekular- und Purkinjellschicht unterhalb derer sie sich ansiedeln und die innere Körnerzellschicht (IGL) bilden (Chédotal, 2010). Die radiale Wanderung der Körnerzellvorläufer in die IGL kann erst erfolgen, wenn diese die Expression des Cxcr4 Rezeptors einstellen und dadurch nicht mehr auf das von den Meningen sezernierte Sdf1-alpha reagieren (Reiss et al., 2002). Weiterhin wirkt der von den Körnerzellen autokrin, sowie auch von den Purkinjellen ausgeschüttete Faktor BDNF fördernd auf die radiale Migration der Körnerzellvorläufer (Zhou et al., 2007). Bevor die Körnerzellvorläufer die innere EGL verlassen beginnen sie ihr Axon auszubilden. Dieses verzweigt sich bei der Wanderung durch die Molekularschicht T-förmig und bildet dort Synapsen mit Purkinjellen. Die Migration der Körnerzellen in die IGL ist bei der Maus etwa an P20 abgeschlossen. Hier erfolgt schließlich die terminale Differenzierung der Körnerzellen.

1.1.4 Signalwege in der Körnerzellentwicklung

Die Entwicklung der Körnerzellen des Kleinhirns ist im Wesentlichen durch Mitglieder der TGF- β , Shh, Wnt und Notch Signalwege reguliert.

Wie in Abschnitt 1.1.3 beschrieben entstehen die Vorläufer der Körnerzellen in der oberen Rautenlippe. Die Spezifizierung der Körnerzellen wird dort durch die Wachstumsfaktoren Bmp6, Bmp7 und Gdf7, die der TGF- β Superfamilie angehören, eingeleitet. Zellen in der anterioren Rautenlippe produzieren Bmp7; Bmp6 und Gdf7 werden von Zellen des dorsalen Neuroepithels in der Nähe der Rauten-

lippe sezerniert. Diese Wachstumsfaktoren fördern die Expression früher Körnerzell-spezifischer Marker. Zu diesen zählen Math1, Zic1 und Zic2 (Alder et al., 1999).

Die Transkriptionsfaktoren Zic1 und Zic2 werden spezifisch in Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert. Die Expression dieser Körnerzellmarker beginnt in Körnerzellvorläufern bereits bei deren Entstehung in der Rautenlippe und bleibt auch in reifen Körnerzellen erhalten (Aruga et al., 1994, 2002). Im Gegensatz dazu stellt Math1 einen Marker speziell für unreife Vorläufer cerebellärer Körnerzellen dar. Der Transkriptionsfaktor Math1 wird auch bereits in frühen Körnerzellvorläufern der Rautenlippe exprimiert, in postmitotischen Körnerzellen jedoch herunterreguliert (Ben-Arie et al., 1997). Math1 wird in der Population der Körnerzellvorläufer der Maus etwa vom Embryonaltag 10 bis zur zweiten Postnatalwoche exprimiert. Körnerzellvorläufer exprimieren Math1 während der ersten Proliferationsphase in der Rautenlippe, der Migration in die EGL und dort während der zweiten Phase der Körnerzellproliferation. Math1 wird in den Körnerzellvorläufern herunterreguliert wenn diese aus dem Zellzyklus austreten und durch in die innere Körnerzellschicht migrieren. Die in Abschnitt 1.1.3 erwähnte Unterteilung der EGL in einen äußeren Anteil mit proliferierenden und einen inneren Anteil mit postmitotischen Körnerzellvorläufern kann daher anhand der Expression von Math1 vorgenommen werden. Es gibt Hinweise dafür, dass Math1 die Teilungsaktivität der Körnerzellvorläufer aufrechterhält, indem es Gene des Notch Signalweges reguliert (Gazit et al., 2004).

Nach der Migration der Körnerzellvorläufer in die externe Körnerzellschicht werden sie dort von dem durch die Purkinjezellen sezernierten Signalmolekül Shh zur Proliferation angeregt. Shh bindet dabei an den in der Membran der Körnerzellvorläufer vorhandenen Rezeptor Patched, wodurch eine Signalkaskade eingeleitet wird die zur Aktivierung von Gli Transkriptionsfaktoren führt, wobei Gli2 der vor-

rangige Regulator der durch Shh ausgelösten Proliferation der Körnerzellen ist. Purkinjezellen beginnen mit der Expression von Shh etwa zum Embryonaltag 17 und behalten diese bis zum Erwachsenenalter bei (Corrales et al., 2004; Fuccillo et al., 2006). Es ist bisher noch nicht eindeutig geklärt wie es im Verlauf der frühen postnatalen Entwicklung dazu kommt, dass Körnerzellen nicht mehr auf Shh reagieren. Vermutlich sind hierbei jedoch die Transkriptionsfaktoren Bmp2 und Bmp4 beteiligt (Rios et al., 2004)

Der Notch Signalweg reguliert den Übergang der Körnerzellvorläufer von der teilungsaktiven Phase zu deren Reifung, indem er die Proliferation der Körnerzellvorläufer fördert und deren Differenzierung verhindert (Klein et al., 2004; Solecki et al., 2001). Der proliferationsfördernde Effekt von Shh auf die Körnerzellvorläufer wird über den Notch Signalweg aufrechterhalten während der Bmp Signalweg diesem Effekt entgegenwirkt und die Differenzierung der Körnerzellvorläufer fördert.

Die Rolle des Wnt Signalwegs bei der Körnerzellentwicklung ist bislang noch nicht hinreichend erforscht. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Wnt Signale wichtig für die Regulation von Proliferation und Differenzierung der Körnerzellen des Kleinhirns sind (Lorenz et al., 2011; Schüller and Rowitch, 2007).

Inwiefern die oben beschriebenen Signalwege miteinander interagieren, um die Entwicklung der Körnerzellen zu regulieren, so wie dies auch in vielen anderen Geweben der Fall ist, bleibt für die Entwicklung des Kleinhirns noch zu zeigen.

1.2 Das Medulloblastom

In den vorherigen Abschnitten wurden die Entwicklung der Körnerzellen des Kleinhirns und die daran beteiligten Regulationsmechanismen beschrieben. Kommt es während der Körnerzellentwicklung zu Fehlregulationen kann dies zur Bildung von malignen Tumoren, den Medulloblastomen, führen. Die Ursache dafür, dass das Medulloblastom, wie die meisten Tumore, aus embryonalen, sich entwickelnden Vorläuferzellen entsteht, liegt darin, dass diese undifferenzierten Zellen noch die Fähigkeit zur Zellteilung besitzen. Prozesse, die Zellproliferation und -differenzierung steuern, werden über verschiedene Signalwege vermittelt. Kommt es innerhalb dieser komplex regulierten und miteinander interagierenden Signalwege zu Störungen, wie sie durch Genmutationen ausgelöst werden können, kann dies zu unkontrollierter Proliferation, gestörter Differenzierung und/oder verstärkter Migration und somit zur vermehrten Metastasierung führen. Da es im menschlichen Kleinhirn noch bis zum Ende des zweiten Lebensjahres teilungsfähige Körnerzellvorläufer gibt, besteht hier ein besonders hohes Risiko, dass es aufgrund von Fehlregulationen zur malignen Entartung der Zellen kommt. Ein tiefgehendes Verständnis der regulatorischen Mechanismen in der Körnerzellentwicklung und bei Medulloblastomen sollte daher dazu beitragen bessere Behandlungsmöglichkeiten für diese Tumorerkrankung erzielen zu können.

1.2.1 Definition

Medulloblastome sind die am häufigsten auftretenden bösartigen Tumore des zentralen Nervensystems bei Kindern. Sie entstehen aus dem Kleinhirn und stellen 20-30% aller pädiatrischen Hirntumore dar. Ein Drittel aller Medulloblastome sind zurzeit nicht heilbar. In vielen Fällen kommt es nach erfolgter Operation zu einer Rückkehr des Tumors und zur Metastasierung. Mittlerweile überleben 70-

80% aller Patienten die auf die Diagnose folgenden 5 Jahre. Die Behandlung besteht meist in einer Kombination aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie (Dhall, 2009; Gajjar et al., 2006, 2013; Packer and Vezina, 2008; Pizer and Clifford, 2008; Rutkowski et al., 2010). Allerdings führt diese bei den meisten Patienten zu schwerwiegenden (kognitiven und psychologischen) Schädigungen.

Medulloblastome zeichnen sich durch infiltratives Wachstum ohne scharfe Grenzen aus. Den initialen Schritt bei der Metastasierung dieses Tumors stellt die Ausbreitung der Tumorzellen zwischen der Pia mater und der Kleinhirnrinde dar (Behesti and Marino, 2009b). Eine schnelle Verbreitung erfolgt dann über die Cerebrospinalflüssigkeit wodurch es zur Bildung von Tumoren unterschiedlicher Größe entlang der Ventrikel kommt (Packer et al., 1999). In 5-9 % der Fälle kommt es zur Ausbildung extraneuraler Metastasen (Subramanian et al., 2002).

1.2.2 Klassifizierung

Medulloblastome stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren dar. Sie wurden zunächst anhand ihrer histologischen Charakteristika in verschiedene Typen eingeteilt. Heute unterscheidet man nach der WHO-Klassifizierung von 2007 fünf Medulloblastomgruppen aufgrund histologischer Merkmale (Ellison, 2010). Dies sind das klassische Medulloblastom, das desmoplastische Medulloblastom, Medulloblastome mit extensiver Nodularität, großzellige und anaplastische Medulloblastome (siehe Abb. 5, großzellige und anaplastische Medulloblastome sind hier zu einer Gruppe zusammengefasst).

Etwa 65% aller Medulloblastome werden histologisch dem klassischen Typ zugeordnet. Dieser entsteht meist in der Vermisregion des Kleinhirns. Die Zellen der klassischen Variante sind klein, rund bis elliptisch und lassen nur wenig Zytoplasma erkennen. Trotz wenig histologischer Anzeichen für Differenzierung exprimiert diese Variante häufig verschiedene Differenzierungsmarker. Die zweitgröß-

te histologische Gruppe ist die nodulare bzw. desmoplastische Variante. Sie umfasst etwa 20-25% aller Medulloblastome. Histologisch definiert sich diese Variante durch knotenförmige (nodulare) Regionen, die kein Retikulin enthalten. Diese sind umgeben von proliferierenden Zellen, die eine große Menge Retikulinreicher Matrix produzieren. Diese Variante entsteht meist in den Hemisphären und besitzt eine bessere Prognose als der klassische Typ. Bei der histologischen Variante des Medulloblastoms mit extensiver Nodularität (MBEN) handelt es sich um eine extreme Form der bei der desmoplastischen Variante beschriebenen histologischen Ausprägung. Diese Variante umfasst nur etwa 5% aller Medulloblastome, sie besitzt den höchsten Differenzierungsgrad unter den histologischen Subgruppen und auch eine besonders gute Prognose. Zwei weitere Gruppen sind die großzellige und die anaplastische Variante. Diese Varianten bilden jedoch ein Kontinuum und werden in vielen Studien daher als großzellig/anaplastische Variante (LC/A) zusammengefasst. Sie ist durch große Tumorzellen, pleomorphe Kerne, auffällige Nucleoli und ein erweitertes Zytoplasma charakterisiert. Tumore dieser Gruppe kommen bei 5% der Medulloblastom Patienten vor, sie zeigen von allen Varianten die geringsten Anzeichen von Differenzierung und besitzen eine besonders schlechte Prognose (Gilbertson and Ellison, 2008; Polkinghorn and Tarbell, 2007).

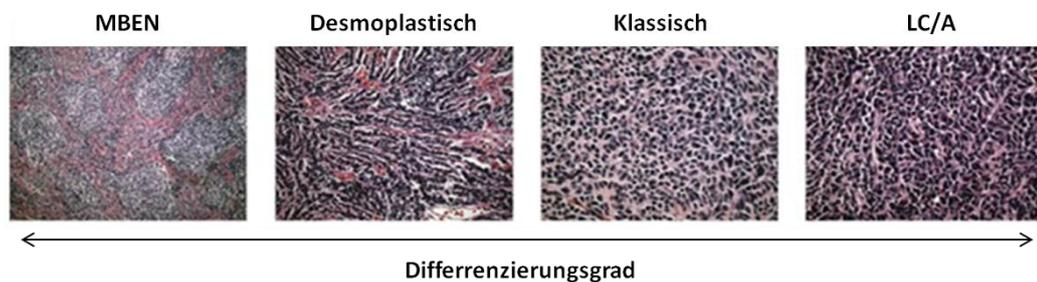


Abb. 5: Histologische Unterteilung von Medulloblastomen mit Sortierung nach Differenzierungsgrad. Verändert nach: Polkinghorn and Tarbell (2007)

Neuere Ansätze zur Klassifizierung von Medulloblastomen basieren auf den molekularen Unterschieden. Die erste großangelegte Studie zur molekularen Analyse von menschlichen Medulloblastomproben wurde 2006 von Thompson et al. durchgeführt (Thompson et al., 2006). Hier wurden zum ersten Mal vier Subgruppen von Medulloblastomen unterschieden, die aufgrund der Aktivierung unterschiedlicher Gencluster voneinander getrennt wurden. Es folgten weitere molekulargenetische Analysen von Kool et al. (2008) Northcott et al. (2010) und Cho et al. (2010) (Cho et al., 2010; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2010a). Die aktuelle Klassifizierung wurde im Herbst 2010 in einer gemeinsamen Konferenz beschlossen und von Taylor et al. (2011) veröffentlicht (Taylor et al., 2011). Die vier Subgruppen die hier unterschieden werden wurden Wnt, Shh Group 3 und Group 4 (letztere werden nachfolgend in dieser Arbeit als Gruppe 3 bzw. Gruppe 4 bezeichnet) genannt (Abb. 6).

Medulloblastome der Wnt Gruppe zeichnen sich durch verstärkte Aktivierung von Genen der Wnt und TGF- β Signalwege aus. Man vermutet, dass dieser Typ aus Vorläuferzellen in der unteren Rautenlippe entsteht (d.h. aus Zellen, die nicht zu Zellen des Kleinhirns, sondern zu präcerebellären Kernen differenzieren würden). Sie umfasst die kleinste Gruppe an Patienten, da in nur etwa 10% aller Fälle ein Tumor dieser Subgruppe zuzuordnen ist. Diese Medulloblastome besitzen zurzeit die beste Prognose, über 95% der Patienten mit Medulloblastomen der Wnt Subgruppe überleben diese Erkrankung. Metastasierungen treten bei dieser Subgruppe selten auf. Vom histologischen Bild her sind Wnt Medulloblastome meist der klassischen Variante zuzuordnen (Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012a, 2012c; Taylor et al., 2011).

Die Shh Gruppe zeichnet sich durch eine erhöhte Aktivierung des Shh Signalweges aus. Es ist bereits seit längerem bekannt und durch zahlreiche Studien belegt, dass diese Tumore meist aus Körnerzellvorläufern der EGL hervorgehen. Neuere

Studien haben gezeigt, dass jedoch auch Körnerzellvorläufer des dorsalen Nucleus Cochlearis (DCN) sowie neurale Stammzellen aus der Ventrikularzone Shh-abhängige Medulloblastome bilden können. Etwa ein Viertel aller Medulloblastome wird dieser Subgruppe zugeordnet. Die 5-Jahres Überlebensrate bei Patienten mit Medulloblastomen dieser Subgruppe liegt zwischen 60 und 80%. Unter diese Gruppe fallen die meisten (jedoch nicht alle) Medulloblastome des desmoplastischen Typs (Grammel et al., 2012; Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012a; Taylor et al., 2011; Yang et al., 2008).

Medulloblastome der Gruppe 3 sind auf molekularer Ebene häufig mit einer Amplifikation, in jedem Fall jedoch mit einer veränderten Expression des Protooncogens Myc assoziiert. Bei Medulloblastomen dieser Gruppe findet man eine hohe genomische Instabilität. Als mögliche Vorläuferzellen dieser Gruppe 3 Medulloblastome kommen Körnerzellvorläufer der EGL sowie neurale Stammzellen in Frage. Die Häufigkeit mit der Medulloblastome dieser Gruppe entstehen liegt bei etwa 25%. Medulloblastome der Gruppe 3 besitzen von allen Subgruppen die schlechteste Prognose, bei mehr als der Hälfte aller Patienten mit dieser Subgruppe sind zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen vorhanden. Die meisten dieser Medulloblastome gehören zum histologischen Typ der großzellig/anaplastischen Medulloblastome (Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012a; Taylor et al., 2011).

Bei Medulloblastomen der Gruppe 4 findet man sehr häufig ein Isochromosom 17q. In mehreren Fällen wurden Amplifikationen der Protooncogene Mycn und Cdk6 gefunden. Insgesamt ist über die Tumore der Gruppe 4 jedoch noch am wenigsten bekannt. Auch eine mögliche Ursprungszelle wurde noch nicht identifiziert. Die meisten Medulloblastome werden der Gruppe 4 zugeordnet, sie umfasst etwa 40% aller Medulloblastome. Die Prognose bei Kindern mit Gruppe 4 Medulloblastomen ist ähnlich der für Patienten mit Medulloblastomen der Shh

Gruppe. Bei Erwachsenen mit Tumoren dieser Subgruppe ist die Prognose jedoch deutlich schlechter. Metastasierungen treten bei etwa einem Drittel aller Patienten auf. Die meisten Gruppe 4 Medulloblastome haben eine klassische Histologie (Kool et al., 2012; Northcott et al., 2012a; Taylor et al., 2011)

Molekulare Subgruppen humaner Medulloblastome					
KONSENS	WNT	SHH	Group 3	Group 4	
Cho (2010)	C6	C3	C1/C5	C2/C4	
Northcott (2010)	WNT	SHH	Group C	Group D	
Kool (2008)	A	B	E	C/D	
Thompson (2006)	B	C, D	E, A	A, C	
Demographie					
Alter					
Geschlecht ♀ ♂	♂♂ : ♀♀	♂♂ : ♀♀	♂♂ : ♀	♂♂ : ♀	
Klinik					
Histologie	klassisch, selten LCA	desmoplastisch, klassisch, LCA	klassisch, LCA	klassisch, LCA	
Metastasierung	selten	sehr selten	sehr häufig	häufig	
Prognose	sehr gut	Kleinkinder gut, andere mittelmäßig	schlecht	mittelmäßig	
Genetik					
Genexpression					
	CTNNB1 Mutation	PTCH1/SMO/SUFU Mutation	MYC Amplifikation	CDK6 Amplifikation MYCN Amplifikation	
	WNT Signalweg	GLI2 Amplifikation MYCN Amplifikation SHH Signalweg	Photorezeptor/ GABAerg	Neuronal/ Glutamaterg	
	MYC +	MYCN +	MYC +++	gering MYC /MYCN	

Abb. 6: Darstellung der vier molekularen Medulloblastom Subgruppen und deren Charakteristika. Verändert nach: Taylor et al. (2011)

1.2.3 Signalwege in der Medulloblastom-Pathogenese

Die in Abschnitt 1.1.4 erwähnten Signalwege, die einen Einfluss auf die Entwicklung der Körnerzellen ausüben, wurden in den letzten Jahren auch zunehmend in Bezug auf die Medulloblastom Pathogenese hin untersucht.

Erste Hinweise auf Signalwege, die in die Entstehung von Medulloblastomen involviert sein könnten liegen in der Untersuchung zweier erblicher Syndrome, die mit der Entstehung von Medulloblastomen einhergehen. Diese sind das Turcot Syndrom und das Gorlin Syndrom.

Bei Patienten mit dem Gorlin Syndrom wurde eine Fehlregulation des Shh Signalweges beobachtet, welche durch Mutationen im Patched Gen ausgelöst wird. Diese Patienten entwickeln Medulloblastome als Teil einer multisystemischen Erkrankung mit einem Risiko von etwa 4%, dass im Verlauf der Erkrankung ein Medulloblastom entsteht. Mutationen im Shh Signalweg finden sich auch bei 25% der sporadischen Medulloblastom Fälle, die mit der desmoplastischen Variante einhergehen (Evans et al., 1991; Gilbertson and Ellison, 2008).

Beim Turcot Syndrom treten Hirntumore gepaart mit kolorektalen Adenomen auf (Paraf et al., 1997). In Patienten mit dem Turcot Syndrom wurden Mutationen des Wnt Signalweges identifiziert. In sporadischen Medulloblastomen findet man in 8-15 % der Fälle aktivierende Mutationen im β -Catenin Gen, wodurch es zu einer verstärkten Aktivierung des Wnt Signalweges kommt und in 12 % der Fälle Mutationen im Axin Gen, einem negativen Regulator des Wnt Signalwegs (Gilbertson and Ellison, 2008).

Nicht zuletzt geben die in den letzten Jahren durchgeführten Arbeiten zur molekularen Klassifizierung von Medulloblastomen (siehe Abschnitt 1.2.2) wichtige Hinweise auf Fehlregulationen in verschiedenen Signalwegen. Fehlregulationen des Wnt und Shh Signalweges sind jeweils für unterschiedliche Subgruppen von Medulloblastomen spezifisch. In diesen beiden Gruppen findet man auch häufig Überexpressionen von Genen des Notch Signalweges. Fehlregulationen von Mitgliedern des TGF- β Signalweges konnten vermehrt bei Tumoren der Wnt und Gruppe 3 Subgruppen beobachtet werden (Kool et al., 2008).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Signalwege, die eine wichtige Rolle bei der normalen Entwicklung des Kleinhirns spielen auch häufig in die Entstehung von Medulloblastomen involviert sind.

1.3 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten Gene identifiziert werden, die eine mögliche Rolle bei der Entwicklung und bei tumorösen Veränderung des Kleinhirns spielen könnten. Hierbei wurde von der These ausgegangen, dass vom Kleinhirn abgeleitete Tumore durch Fehlregulation von Genen begünstigt werden, die während der normalen Kleinhirnentwicklung besonders aktiv sind. Zu diesem Zweck wurde mittels einer Microarray Analyse nach Genen gesucht, die während der Entwicklung des Kleinhirns selektiv oder verstärkt in den Vorläufern von Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert werden. Von diesen wurden zur weiteren Analyse Gene ausgewählt, die in wichtige Signalwege der Körnerzellentwicklung und Medulloblastom-Pathogenese eingebunden sind und deren räumlich-zeitliches Expressionsmuster während der postnatalen Kleinhirnentwicklung untersucht. Um eine mögliche Funktion dieser Gene in Medulloblastomen zu ergründen wurde deren Expression in Medulloblastomen murinen und humanen Ursprungs analysiert. In knockdown Zellkulturexperimenten sollten Rückschlüsse auf die Funktion ausgewählter Gene in Medulloblastomzellen bzw. neuronal differenzierbaren Zellen geschlossen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 1: verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller / Vertrieb
Blotkammer	NovaBlot Multiphor II System	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
Blotkammer	Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Digital-Kamera	DT5	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Digital-Kamera	DFC 350 FX	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Durchflusszytometer	CyFlowSpace	Partec GmbH, Görlitz
Elektrophoresekammer	SubCell Model 96	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammer	Minigel-Twin	Whatman Biometra, Göttingen
Geldokumentation	Geldoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geltrockner	Model 583 Gel Dryer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hybridisierungs-Schrank	BFD 53	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Inkubator	Innova 4000 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
Inkubator Zellkultur	Hera Cell	Hereaus, Thermo Fisher Scientific
Kaltlichtquelle	KL1500LCD	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	Axioskop 2 Mot	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	Axiovert 135	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Mikroskop	DM IRE2	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
PCR-Thermocycler	PTC-200 MJ Research Gradient Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
PCR-Thermocycler	Mastercycler egradient S	Eppendorf AG, Hamburg
PH Meter	350 pH/Temp/mV Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Photometer	Life Science UV/Vis Spectrofotometer DU530	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Photometer	µQuant Mikroplatten Spektrofotometer	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Real-Time PCR Cycler	LightCycler 2.0 Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Stereolupe	Semi 200C	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Stromversorgung	Electrophoresis Power Supply EPS 3501XL	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
Stromversorgung	PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortex-Schüttler	Reagenzglasschüttler 444-1372	VWR International, Radnor, Pennsylvania (USA)
Waagen	Labstyle 303, AG204 Delta Range, PG503-S Delta Range	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Western Blot Detektor	ImageQuant LAS 4000 Mini	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
xCELLigence Real-Time-Cell-Analyser	RTCA DP Instrument	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zentrifugen	Biofuge primo R, Biofuge primo, Biofuge pico, Multifuge 3 S-R	Hereaus, Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den folgenden Herstellern bezogen.

Tab. 2: Bezugsquellen der verwendeten Substanzen

Firma	Vertrieb	
Abcam		Cambridge, UK
ABgene		Hamburg
Ambion	Applied Biosystems	Darmstadt
Amersham Biosciences	GE Healthcare Europe GmbH	München
Biomol	Biomol GmbH	Hamburg
BioRad	Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Calbiochem	Merck KGaA	Darmstadt
Dako	Dako Deutschland GmbH	Hamburg
Dynal	Invitrogen	Paisley, UK
Eurogentec	Eurogentec s.a.	Seraing, B
Fermentas	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
Gibco	Invitrogen	Paisley, UK
Greiner	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen

Hoechst	Sanofi-Aventis	Frankfurt
Invitrogen	Invitrogen	Paisley, UK
Macherey-Nagel	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG	Düren
Merck	Merck KGaA	Darmstadt
Millipore	Millipore GmbH	Schwalbach
Molecular Probes	Invitrogen	Paisley, UK
Nalgene	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
New England Biolabs	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main
Nunc	Fisher Scientific GmbH	Schwerte
Pierce, Perbio	Perbio Science Deutschland	Bonn
Qiagen		Hilden
Roche	Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Serva	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Sigma	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Seelze
Stratagene	Stratagene Europe	Amsterdam, NL
Upstate	Millipore GmbH	Schwalbach
Vector Laboratories	Linaris Biologische Produkte GmbH	Wertheim

2.1.3 Primersequenzen

Tab. 3: Zur semi-quantitativen PCR Analyse und zur Herstellung von Sonden für die in-situ-Hybridisierung verwendete Primersequenzen. Die Oligonukleotidsequenzen wurden mithilfe der Primer3 Software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm>) erstellt oder dem Allen Brain Atlas (brain-map.org) entnommen und bei Invitrogen synthetisiert.

Primer Bezeichnung	Primer Sequenz 5' → 3'
Adamts5 F1	GCTACTGCACAGGGAAGAGG
Adamts5 R1	CGCCAGTTTTCTTCTTCAGG
Adamts5 F2	CGCTACACTCTAAAGCCACTCC
Adamts5 R2	TTCCGTGGTAGGTCTAGCAAAC
Cutl1 F1	TGAGTTCCAGCGAATCTGTG
Cutl1 R1	CCACTCGAGGTTTCTTCAGC
Cutl1 F2	GGCCAGAGCCTGAACAGA
Cutl1 R2	AATTGGGGAAGAGGGCAG
Fzd3 F1	ATCCAGGAAGAATGGCTGTG
Fzd3 R1	TCTCTGGGACACCAAAAACC
Fzd3 F2	GCGGTTGATGGAGTTGCTAT
Fzd3 R2	GCTATAGGCACGCTGACACA

Kntc2 F1	AAAGGACTAGCGGACATGGA
Kntc2 R1	GCAGCTCAGCATCCTCTTCT
Plagl1 F1	AAAATGTGGCAAGTCCTTCG
Plagl1 R1	CTCTGGGCACAGAAGTACTGACA
Plagl1 F2	GCTGATGCAAGAGAATATGCAG
Plagl1 R2	ATCTACCAGCAGCTCTTTGGAC
Rasl11b F1	CCGTTCTTTCCAGTTTCTGC
Rasl11b R1	TTTGTTAGCCACCAACACCA
Rasl 11b F2	CTATTCAGGTCCAGGACTCC
Rasl11b R2	TCCATCTGTCCTCACTTCCTTT
Slc1a5 F1	CAACCAAAGAGGTGCTGGAT
Slc1a5 R1	TAGAAGAGGTCCCGAAAGCA
Slc1a5 F2	AAAGCAGGTGGTTGCTGC
Slc1a5 R2	TGTCATGATGCCCCACAG
Suz12 F1	CTTCCAGCCAGAAGAAAACG
Suz12 R1	TGCTGTGGCAGAGCTTTAGA
Suz12 F2	TCTGCCACAGCAGGTTCA
Suz12 R2	AGCCAAGCAGACCCACAG
Tgif2 F1	GGCTCTATCTGCACCGCTAC
Tgif2 R1	GCGGAGTGTGTAGCAAAGGT
Tgif2 F2	AGTAGGTAGCCAGAAGCACAG
Tgif2 R2	GGGAAAAGGGGAGAGATTAAGA
Troap F1	GGCTTCAGAACAGCATCCTC
Troap R1	CATTTGATCCCCAGAGCTA
Troap F2	GAGGCCATAGGGGCTATAGAGT
Troap R2	CTGAGCCTGCTGAACTTTAGGT

Tab. 4: In der Real-Time PCR verwendete Primer. Die Oligonukleotidsequenzen wurden mithilfe des Beacon Designers (Premier Biosoft) oder über die Primer Quest Software von IDT (Integrated DNA Technologies) erstellt und von Invitrogen synthetisiert. Die humanen Primer für Tgif1 wurden bei Qiagen bestellt (QuantiTect Primer Assay, Hs_Tgif1_1_SG).

Primer Bezeichnung	Primer Sequenz 5' → 3'
Cux1_mm_qPCR F	TCTCTATCAGCCTCTCACTCC
Cux1_mm_qPCR R	CTTGCCTGTTTGCCAATACTG

Cux1_hs_qRT F1	GAGCATAAGGTTTCAGAGC
Cux1_hs_qRT R1	GCAGTAGTTTCTTCATCGTA
Cux1_hs_qRT F2	GGTTCTGGAATAACTCTTA
Cux1_hs_qRT R2	ATAGTGTATTATCGCTCTG
Tgif1_mm_qPCR F1	CTGAGAGCTGAGGGATGGAG
Tgif1_mm_qPCR R1	GCAACAAGACCTTCCAGCTC
Tgif1_mm_qPCR F2	CACAGATACAACGCCTATCCC
Tgif1_mm_qPCR R2	ATCCTTTCTCAGCATGTCAGG
Tgif2_mm_qPCR F1	GGCTCTATCTGCACCGCTAC
Tgif2_mm_qPCR R1	CGGGAGATGGTGAAGTGAAT
Tgif2_mm_qPCR F2	CAGAGCAGGAGAAGCTAAGTC
Tgif2_mm_qPCR R2	CGGGAGATGGTGAAGTGAATAG
Tgif2_hs_qRT F1	GGATGTAACAGAACCGACTC
Tgif2_hs_qRT R1	GCTAACTACTGCCGTGAAT
Tgif2_hs_qRT F2	GGAAAAGTTTACCCAAGG
Tgif2_hs_qRT R2	CTCACCTAGATCACTGTC
Fzd3_mm_qPCR F	AGATGTTTGGTGTCCCGTG
Fzd3_mm_qPCR R	AAAACCATAGTCCCTCTGCAC
Plagl1_mm_qPCR F	AGGCTGAGTGTGGCAAAG
Plagl1_mm_qPCR R	TCCTTCCGGTTGAATGTCTTC
GAPDH_mm_qPCR F	CTTTGTCAAGCTCATTTCTGG
GAPDH_mm_qPCR	TCTTGCTCAGTGCCTTGC
GAPDH_qRT_F1	CATGAGAAGTATGACAACAG
GAPDH_qRT_R1	ATGAGTCCTTCCACGATA

Tab. 5: Zur Herstellung von shRNA Vektoren verwendete Oligonukleotidsequenzen. Das generelle Design der shRNA Oligonukleotidsequenzen wurde wie in Xu et al. (2009) vorgeschlagen durchgeführt. Die für Tgif1 und Tgif2 verwendeten Zielsequenzen wurden anhand der verwendeten siRNAs (siehe Tab. 7) generiert. Als target Sequenz für Cux1 wurde die von Michl et al. (2005) veröffentlichte Sequenz verwendet. Die Oligonukleotidsequenzen wurden von Invitrogen synthetisiert.

Primer Bezeichnung	Primer Sequenz 5' → 3'
Tgif1_sh_1 F	GATCCTCCAAGAACTATAAACTTAAATTCAAGAGATTTAAGTTTATAGT TCTTGGATTTTTTGGAAA
Tgif1_sh_1 R	AGCTTTTCCAAAAATCCAAGAACTATAAACTTAAATCTCTTCAATTTA AGTTTATAGTTCTTGGAG
Tgif1_sh_2 F	GATCCTTGGCTGTATGAGCACCGTTATTCAAGAGATAACGGTGCTCAT ACAGCCAATTTTTTGGAAA
Tgif1_sh_2 R	AGCTTTTCCAAAAATTGGCTGTATGAGCACCGTTATCTCTTCAATAAC GGTGCTCATAACAGCCAAG
Tgif1_sh_4 F	GATCCCTAGTGGATGTTGCACTCAAATTCAAGAGATTTGAGTGCAACA TCCACTAGTTTTTTGGAAA
Tgif1_sh_4 R	AGCTTTTCCAAAAACTAGTGGATGTTGCACTCAAATCTCTTCAATTT GAGTGCAACATCCACTAGG
Tgif2_sh_1 F	GATCCTGCAGTAGTGTGAAATTCCAATTCAAGAGATTGGAATTTACACA CTACTGCATTTTTTGGAAA
Tgif2_sh_1 R	AGCTTTTCCAAAAATGCAGTAGTGTGAAATTCCAATCTCTTCAATTG GAATTTCACTACTGCAG
Tgif2_sh_2 F	GATCCTCCGCTCAGTGATGAGACCAATTCAAGAGATTGGTCTCATCAC TGAGCGGATTTTTTGGAAA
Tgif2_sh_2 R	AGCTTTTCCAAAAATCCGCTCAGTGATGAGACCAATCTCTTCAATTG GTCTCATCACTGAGCGGAG
Tgif2_sh_3 F	GATCCACCATGTCGGACAGTGATCTATTCAAGAGATAGATCACTGTCC GACATGGTTTTTTTGGAAA
Tgif2_sh_3 R	AGCTTTTCCAAAAAACCATGTCGGACAGTGATCTATCTCTTCAATAG ATCACTGTCCGACATGGTG
Tgif2_sh_4 F	GATCCTTCCAAGTTCATATGCGTGAATTCAAGAGATTCACGCATATGA ACTTGAATTTTTTGGAAA

Tgif2_sh_4 R	AGCTTTTCCAAAAAATTCCAAGTTCATATGCGTGAATCTCTTCAATTCA CGCATATGAACTTGGAAG
Cux1_sh_1 F	GATCCAAGAAGAACAACACTCCAGAGGATTTTTCAAGAGAAAATCCTCTG GAGTGTCTTCTTTTTTTTGGAAA
Cux1_sh_1 R	AGCTTTTCCAAAAAAGAAGAACAACACTCCAGAGGATTTTCTCTTCAA AAATCCTCTGGAGTGTCTTCTTG

Tab. 6: Zur Sequenzierung des pU6m4 Vektors und dessen Derivaten verwendete Primersequenzen. Die in der Tabelle dargestellten Primersequenzen wurden von Invitrogen synthetisiert. Alle weiteren Sequenzierungsreaktionen wurden mithilfe von über den GATC Sequenzierungsservice zur Verfügung gestellten Standardprimern durchgeführt.

Primer Bezeichnung	Primer Sequenz 5' → 3'
pU6-m4 Sequ	TTTCTTGGGTAGTTTGCAG
pU6-m4 Sequ2	ATTCGCCATTCAGGCTG

2.1.4 siRNA Sequenzen

Tab. 7: Verwendete siRNAs. Alle siRNAs wurden über Qiagen bezogen (FlexiTube siRNA).

Bezeichnung	Katalog Nr.
Cux1_siRNA1	SI00357049
Tgif1_siRNA1	SI02630677
Tgif1_siRNA2	SI03025113
Tgif1_siRNA3	SI03033744
Tgif1_siRNA4	SI03088050
Tgif2_siRNA5	SI04209100
Tgif2_siRNA6	SI04234573
Tgif2_siRNA7	SI04343346
Tgif2_siRNA8	SI04360678

2.1.5 Plasmide

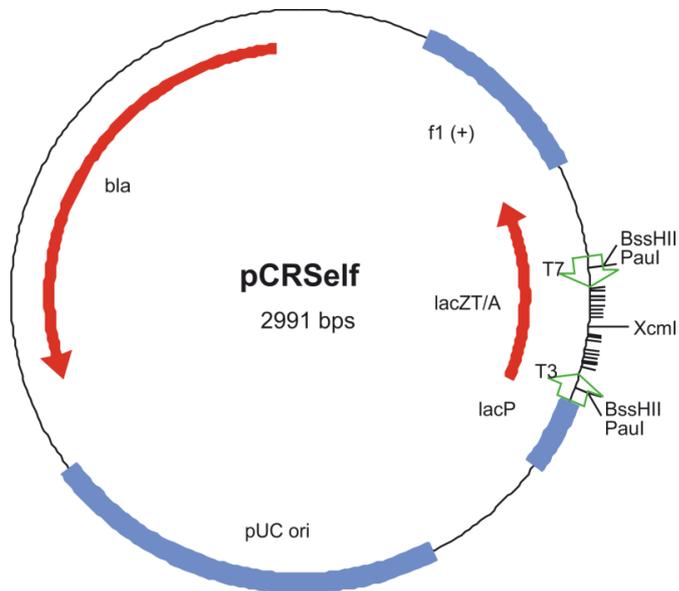


Abb. 7: pCRSelf Vektor. Dieser Klonierungsvektor zur Insertion von PCR Fragmenten stellt ein Derivat des pBluescript II SK (+) Vektors (Stratagene) dar, der zur T/A Klonierung modifiziert wurde (Borovkov and Rivkin, 1997).

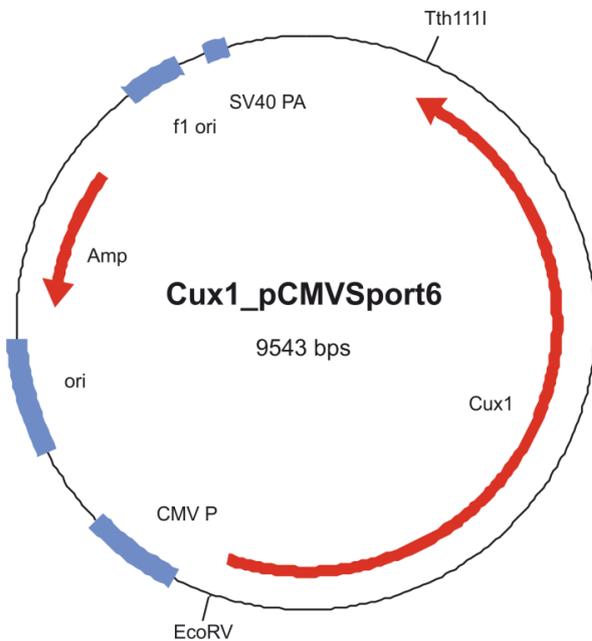


Abb. 8: Cux1_pCMVSPORT6 Vektor. Bezogen über RZPD Imagene (Klon Bez: IRATp970H1293D)

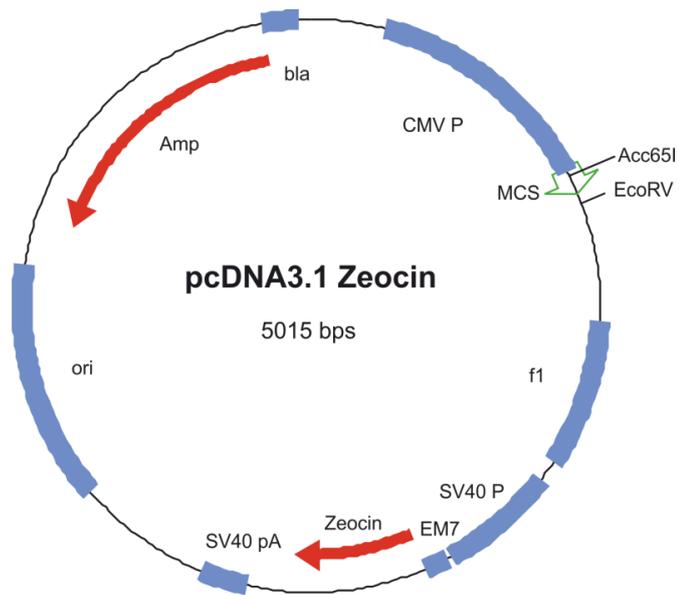


Abb. 9: pcDNA3.1 Zeocin Vektor (Invitrogen). Verwendet zur Generierung von Überexpressionsklonen und stabiler Selektion in Zellkultur.

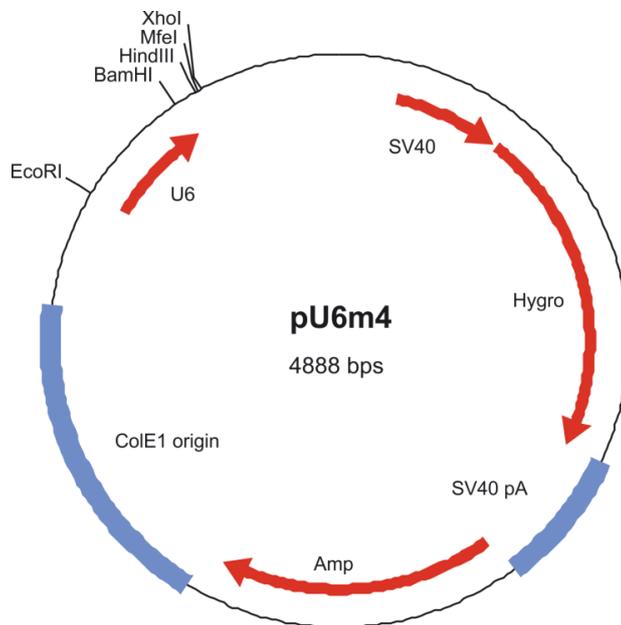


Abb. 10: pU6m4 Silencing Vektor (Xu et al., 2009). Zur Verfügung gestellt von Dolph L. Hatfield

2.1.6 Bakterienstämme

Tab. 8: verwendete Bakterienstämme

E.coli Stamm	Genotyp
XL1-blue (Stratagene)	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)].
ElectroTen-Blue (Stratagene)	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kanr [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

2.1.7 Zelllinien

Tab. 9: verwendete humane Zelllinien

Name	Zelltyp, Referenz	ATCC Nummer
D283 Med	Medulloblastom, (Friedman et al., 1985)	ATCC HTB-185
Daoy	Medulloblastom, (Jacobsen et al., 1985)	ATCC HTB-186
D341 Med	Medulloblastom, (Friedman et al., 1988)	ATCC HTB-187
NT2/D1	Teratokarzinom, (Andrews et al., 1984)	ATCC CRL-1973

2.1.8 Mauslinien

Falls nicht anderweitig ausgewiesen wurde die Inzuchtlinie C57BL/6N (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, USA) verwendet. In Tab. 10 sind die verwendeten genetisch manipulierten Mauslinien aufgelistet.

Tab. 10: verwendete genetisch manipulierte Mauslinien

Name	Referenz
hGFAP-cre:SmO2	(Schüller et al., 2008)

Math1-cre:SmoM2	(Schüller et al., 2008)
Tlx3-cre:SmoM2	(Schüller et al., 2008)

2.1.9 Antikörper

Tab. 11: verwendete Antikörper. ISH: in-situ-Hybridisierung, WB: Western Blot, Flow: Durchflusszytometrie, ICC: Immunzytochemie.

Antikörper	Verdünnung	Anwendung	Spezies	Klonalität	Bezugsquelle
anti-Digoxigenin-AP	1:2000	ISH	Schaf	polyklonal	Roche (11093274910)
anti-Cux1	1:500	WB	Kaninchen	polyklonal	Abcam (ab73885)
anti-GAPDH	1:1000	WB	Kaninchen	polyklonal	Abcam (ab9485)
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:10000	WB	Ziege	polyklonal	DAKO (P0448)
anti-PCNA	1:200	Flow	Maus	monoklonal	Abcam (ab29)
Anti-Cleaved Caspase-3	1:1000	Flow	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling Technology (9664)
Goat anti mouse IgG-Alexa Fluor 488	1:3000	Flow	Ziege	polyklonal	Invitrogen (A11001)
Goat anti rabbit IgG-Alexa Fluor 488	1:3000	Flow	Ziege	polyklonal	Invitrogen (A11008)
anti-βIII Tubulin	1:250	ICC	Maus	monoklonal	Sigma (T8578)
Goat anti mouse IgG-Alexa Fluor 488	1:500	ICC	Ziege	polyklonal	Invitrogen (A11001)

2.1.10 Software

Tab. 12: verwendete Software

Name	Hersteller/Bezugsquelle
BeaconDesigner	Premier Biosoft, Palo Alto, USA
BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.1.3.0	http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
Clone Manager Professional 9	Scientific & Educational Software, Cary, USA
CorelDraw X6	Corel GmbH, München
Excel 2007	Microsoft Co., Redmond, USA
FloMax	Partec GmbH, Görlitz
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html
LightCycler Software 4.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mendeley Desktop	http://www.mendeley.com/download-mendeley-desktop/
PowerPoint 2007	Microsoft Co., Redmond, USA
Primer 3	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.htm
R Software	http://www.r-project.org/
RTCA Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Word 2007	Microsoft Co., Redmond, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben wurden die entsprechenden Gewebe aus Mäusen verschiedener Entwicklungsstadien heraus präpariert, in Trizol aufgenommen (1 ml/100 mg Gewebe) und das Gewebe mittels eines Douncers homogenisiert. Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurden diese jeweils zu 5×10^6 Zellen /ml Trizol resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden 0,2 ml Chloroform pro ml Trizol zugegeben und das Röhrchen mehrfach invertiert. Nach wenigen Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben zur Phasentrennung bei $12000 \times g$, 4°C für 15 min zentrifugiert. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und 0,5 ml Isopropanol/ml Trizol Anfangsvolumen zugegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei $12000 \times g$ für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und das Pellet in 1,5 ml eisgekühltem 75% Ethanol/DEPC gewaschen. Zur Präzipitation wurden die Proben nachfolgend bei $7500 \times g$, 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet für ca. 10 min bei RT an der Luft getrocknet, anschließend in 20-50 μl ddH₂O-DEPC aufgenommen und bei 58°C für 10 min gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch in einem Spektrophotometer (DU530, Beckman Coulter) quantifiziert. Die Lagerung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C .

2.2.1.2 Isolierung von genomischer DNA

DNA Extraktionspuffer: 100 mM NaCl
10 mM TrisCl, pH 8,0
25 mM EDTA, pH 8,0
0.5 % SDS

Vor dem Gebrauch wurde jeweils 0,1 mg/ml Proteinase K zugegeben.

TE-Puffer: 10mM Tris-HCL, pH 8,0
1mM Na₂EDTA

Zur Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurden jeweils 5×10^5 Zellen in 50 μ l DNA Extraktionspuffer aufgenommen und unter Schütteln bei 50°C über Nacht inkubiert. Der Ansatz wurde nachfolgend auf 100 μ l aufgefüllt und die DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion (siehe Abschnitt 2.2.1.4) isoliert. Anschließend wurde die DNA über Zugabe von 1/2 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen 100 % Ethanol gefällt und bei 1700 x g für 2 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, nach einer weiteren Zentrifugation getrocknet und bei 65°C für 2 h in 50 μ l TE-Puffer gelöst.

2.2.1.3 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen

PCR-Produkte wurden zur Aufreinigung mittels Ammoniumacetat gefällt. Hierzu wurden die PCR Proben auf ein Volumen von jeweils 100 μ l mit ddH₂O aufgefüllt und mit Ammoniumacetat in einer Endkonzentration von 2,5 M sowie 2 Volumen 100 % Ethanol versetzt. Die Proben wurden mindestens über Nacht bei 4°C gefällt.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 15000 rpm, 4°C für 1 h. Die Pellets wurden mit 500 μ l 70% EtOH versetzt, kurz gevortext und für 10 min bei 15000 rpm, 4°C nochmals abzentrifugiert. Das Trocknen der Pellets erfolgte nach Abnahme des restlichen Ethanols für 15-45 min in einer Vakuumzentrifuge (Heraeus

VR-maxi). Anschließend wurden die Pellets in 10 µl ddH₂O aufgenommen. Zur Kontrolle der Präzipitation wurde 1 µl der DNA in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.1.4 Phenol-Chloroform Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Inaktivierung von Enzymen, die nicht mittels Hitze inaktiviert werden können wurde nach dem Restriktionsverdau eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde der Restriktionsansatz mit sterilem H₂O auf 100 µl aufgefüllt und anschließend mit einer 25:24:1 Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (Sigma, P2069) versetzt. Dieser Ansatz wurde zunächst gevortext und anschließend für 15 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach der hierbei erfolgten Phasentrennung wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mittels 1/10 Volumen 5M Natriumacetat (pH 5,2) sowie 2 Volumen eiskaltem 100% Ethanol gefällt. Hierzu wurde dieser Ansatz nach vortexen für 1-2 Stunden bei -20°C inkubiert und die DNA anschließend für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die gefällte DNA wurde mit 70% (v/v) Ethanol gereinigt und das Pellet in einem für die nachfolgenden Schritte geeigneten Volumen ddH₂O gelöst.

2.2.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration

Zur Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration von DNA bzw. RNA Proben wurden von diesen eine 1:50 Verdünnung in ddH₂O bzw. ddH₂O/DEPC hergestellt und photometrisch vermessen. Aufgrund ihrer chemischen Struktur haben Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine bei 280 nm. Ist die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gleich eins, entspricht dies einer Konzentration von 50 µg/ml bei der Messung doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml bei der Messung von einzelsträngiger DNA oder RNA. Um die Reinheit der Proben zu überprüfen wurde zusätzlich das Ver-

hältnis der Absorptionswerte $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ bestimmt. Für reine DNA liegt dieser Quotient bei 1,8, für reine RNA bei 2,0.

2.2.3 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Nach photometrischer Bestimmung der RNA Konzentration wurden zur Herstellung von cDNA jeweils 5 µg RNA mithilfe der Superscript III Polymerase (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde der RNA jeweils 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl 50 µM OligoD(T) zugegeben und auf 13 µl mit Ampuwa aufgefüllt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 65°C wurden die Proben auf 0°C herunter gekühlt. Anschließend wurden sie mit 4 µl 5x Puffer und 2 µl 0,1 M DTT versetzt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurde die Synthese durch Zugabe von 1 µl Superscript III Polymerase (200 U/ µl) gestartet und für 1 h bei 42°C vollzogen. Anschließend wurde die Reaktion durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C für 15 min gestoppt und die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.4 Klonierungstechniken

2.2.4.1 Enzymatische Spaltung von DNA über Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA Fragmenten mithilfe von Restriktionsenzymen wurde mittels der laut Herstellern vorgeschlagenen Puffern und Inkubationstemperaturen durchgeführt.

Bei einem analytischen Restriktionsansatz wurde jeweils 500 ng DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10-20 µl über 2 h inkubiert. Für präparative Ansätze wurden jeweils 5 µg DNA mit 20 U Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 30-50 µl für einen Zeitraum von 2 h bis über Nacht inkubiert.

Zur partiellen Restriktion von DNA Molekülen wurde ein Restriktionsansatz, jedoch ohne Zugabe des Enzyms, mit einem Volumen von 100 µl hergestellt und auf fünf Reaktionsgefäße aufgeteilt, wobei das erste Gefäß 30 µl, das 2.-4. Gefäß 20 µl und das fünfte Gefäß 10 µl des Reaktionsansatzes enthielten. Diese Gefäße wurden auf Eis inkubiert und dem ersten Gefäß wurde 5 U Restriktionsendonuklease zugegeben. Anschließend wurde die Lösung gemischt und jeweils mit einer neuen Pipettenspitze 10 µl auf das nächste Gefäß übertragen, bis alle Reaktionsgefäße 20 µl enthielten. Diese wurden für 12-15 min bei der Reaktionstemperatur des Enzyms inkubiert und nach Inaktivierung des Enzyms zur Analyse bzw. Präparation des gewünschten DNA Fragmentes auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.4.2 Agarose Gelelektrophorese

1x TBE-Puffer: 89 mM Tris
 89 mM Borsäure
 2 mM Na-EDTA, pH 8,0

DNA-Ladepuffer: 0,25% [w/v] Bromphenolblau
 0,25 % [w/v] Xylencyanol
 30% Glycerol

Die Kontrolle der PCR Ergebnisse erfolgte mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben. Um die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden sie in einer Agarosematrix einem horizontalen elektrischen Feld ausgesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Gele aus 0.8-1.5% (w/v) Agarose in 1xTBE-Puffer verwendet, denen zum Nachweis der DNA-Banden Ethidiumbromid (10mg/ml) in einer Verdünnung von 1/20000 zugegeben wurde. Vor dem Auftragen der DNA-Proben in die Geltaschen wurden die Proben entsprechend ihres Volumens mit der benötigten Menge an 6x Probenpuffer zur Erhöhung der Dichte versetzt. Die Elektrophoresen wurden je nach Größe und Konzentration der Gele bei 80-140 V für 45-65 min in TBE-Laufpuffer durchgeführt. Die Gele wurden unter UV-Licht betrachtet und mit Hilfe eines Videodokumentationssystems (Bio-

Rad) dokumentiert. Durch paralleles Auftrennen einer Molekulargewichtsstandardlösung ("100bp DNA Ladder Plus", Fermentas oder 1kb Marker, NEB) konnte die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden

2.2.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren wurden die entsprechenden Fragmente unter einer UV-Lampe aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Gel-extraktions Kit (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, 740609) von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben extrahiert.

2.2.4.4 Modifikation von DNA Fragmentenden zur Klonierung

Zur Herstellung glatter DNA Fragmentenden wurde die T4 DNA Polymerase bzw. das große Fragment der E. coli DNA Polymerase I (Klenow Fragment) genutzt. Bei Verwendung der T4 DNA Polymerase wurden die DNA Fragmente mit dem entsprechenden Puffer, 33 μ M dNTPs, 100 μ g/ml BSA und 5 Units T4 DNA Polymerase bei 12°C für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde nach Zugabe von 10mM EDTA über Inkubation bei 75°C für 20 min gestoppt. Die Reaktion des Klenow Fragmentes wurde unter Zugabe von Puffer 2 (NEB), 33 μ M dNTPs und 5 Units Polymerase für 15 min bei RT durchgeführt und anschließend nach Zugabe von 10 mM EDTA durch eine Inkubation des Ansatzes bei 75°C für 20 min abgestoppt.

Um vor der Ligation eines linearisierten Vektors mit einem Insertmolekül die Wahrscheinlichkeit einer Religation des Vektorrückgrades zu minimieren wurden die freien 5'-Phosphatenden des linearisierten Vektors mithilfe der alkalischen Phosphatase aus dem Kalb (CIP) bzw. aus der Krabbe (SAP) abgespalten. Die Dephosphorylierung wurde mit 2,5 Units CIP in dem bei der vorherigen Restriktion verwendeten Puffer bzw. mit 1-2 Units SAP in speziell für dieses Enzym empfohlenen Puffer bei 37°C für 60 min durchgeführt. Die SAP Reaktion wurde durch

anschließende Inkubation bei 75°C für 15 min abgestoppt. Da die CIP nicht mittels Hitze inaktivierbar ist wurde nach einer Inkubation mit diesem Enzym eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.1.4) oder die DNA mittels des NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kits (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

2.2.4.5 Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation eines linearisierten Vektors mit einem Insertmolekül wurden diese Fragmente in einem Ligationsansatz von 20 µl in einem Verhältnis von 1:3 - 1:7 (Vektor : Insert) gemischt und mit 400 Units T4 DNA Ligase (NEB) und 1 x konzentriertem T4 DNA Ligase Puffer für 2 h bei RT bzw. bei 16°C über Nacht inkubiert. Die T4 DNA Ligase wurde anschließend bei 65°C für 10 min inaktiviert und die Ligationsansätze bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.6 Transformation von chemisch Kompetenten E.coli Bakterien mit Plasmid DNA

LB-Medium: 1,0 % (w/v) Select Peptone 140,
0,5 % (w/v) Select Yeast Extrakt,
1,0 % (w/v) NaCl , autoklaviert.

Vor der Verwendung wurden je nach Bedarf folgende Antibiotika und Reagenzien in der jeweils angegebenen Konzentration hinzugefügt:

Ampicillin: 100 µg/ml
Tetracyclin: 12,5 µg/ml
IPTG: 0,1 mM
X-Gal: 20 µg/ml

LB Agar-Platten: 1,5 % (w/v) Agar
1,0 % (w/v) Select Peptone 140
0,5 % (w/v) Select Yeast Extrakt
0,5 % (w/v) NaCl, autoklaviert.

Zur Transformation wurden jeweils 10 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl chemisch kompetenten *E.coli* Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 45 s wurden die Zellen für 2 min auf Eis abgekühlt und mit 900 µl LB Medium versetzt. Der Transformationsansatz wurde daraufhin bei 37°C unter schütteln (250 rpm) für 30-60 min inkubiert. Zum Ausplattieren wurden die Zellen bei 3000 rpm für 5 min pelletiert, das Medium abgeschüttet und die Zellen im Mediumrückstand resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB Agar-Platten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum sowie, im Falle einer Blau/Weiß Selektion, zusätzlich mit IPTG und X-Gal versetzt waren ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.4.7 Transformation von elektrisch kompetenten *E.coli* Bakterien mit Plasmid DNA

Zur Transformation wurden jeweils 40 µl elektrokompetenter ElectroTen bzw. 50 µl Xl1 blue in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (Biozym, 748010) gegeben und bei 1,8 kV und einer Zeitkonstante von 4 - 5,5 ms elektroporiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und für etwa 60 min bei 37°C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Zum Ausplattieren wurden die Zellen bei 3000 rpm für 5 min pelletiert, das Medium abgeschüttet und die Zellen im Mediumrückstand resuspendiert.

2.2.5 Präparation von Plasmid DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien wurde das „NucleoSpin Plasmid QuickPure“ Kit (Macherey-Nagel, 740588), bzw. das „NucleoBond Extra Midi“ Kit (Macherey-Nagel, 740410) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Zur Sequenzierung der generierten Plasmide wurde der Sequenzierungsservice der GATC Biotech AG genutzt.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.7.1 PCR an cDNA, Plasmid DNA und genomischer DNA

Zum Nachweis der Expression der verschiedenen Gene im Cerebellum bzw. Gesamthirn der Maus sowie in humanen Zelllinien wurde die RT-PCR unter den folgenden Bedingungen mit Reagenzien von Fermentas durchgeführt:

Tab. 13: PCR Ansatz für die RT-PCR

Komponente	Konzentration	Einsatz	Endkonzentration
Template	50 ng/ μ l	x μ l	50-250 ng
PCR Puffer , +KCl (w/o MgCl ₂)	10x	2,50 μ l	1x
MgCl ₂	25 mM	1,50 μ l	1,5 mM
dNTP	10 mM	0,50 μ l	200 μ M
Sense Primer	5 μ M	0,50 μ l	100 nM
Antisense Primer	5 μ M	0,50 μ l	100 nM
Taq (Fermentas)	5 U/ μ l	0,20 μ l	1 U
H ₂ O _{MilliQ}		x μ l	
Ansatz		25,00 μ l	

Tab. 14: Temperaturprogramm für die RT-PCR

Standard Cycle Bedingungen:	94°C	3 min	
Eppendorf S Gradient	94°C	30 s	30 x
	55°C	45 s	
	72°C	120 s	
	72°C	7 min	
	4°C	Pause	

2.2.7.2 PCR zur direkten Amplifikation von DNA aus Bakterienzellen (Colony-PCR)

Glycerol-Stocklösung: 65% Glycerol
 0,025 M Tris-HCl (pH 8,0)
 0,1 M MgSO₄

Für die Colony-PCR wurden von jeder Transformation mehrere Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und jeweils eine zunächst in 100 µl LB Amp/Tet Medium in einer 96-Well Microtiter Platte angeimpft. Anschließend wurde der Rest der Kolonie in eine 96 Well PCR Platte mit jeweils 10 µl ddH₂O transferiert. Die 96-Well Microtiter Platte wurde bei 37°C im Brutschrank für 6-8 h inkubiert.

Die Colony-PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tab. 15: Temperaturprogramm für die Colony-PCR

Cycle Bedingungen:	99,9°C	10 min	
	5°C	Pause	
	94°C	2 min	
	94°C	30 s	30x
	52°C	30 s	
	72°C	45 s	
	72°C	10 min	
	4°C	Pause	

→ Zugabe des Mastermix (s.u)

Tab. 16: PCR-Ansatz für die Colony-PCR

	Konzentration	Ansatz 25µl	Endkonzentration
Template		10,00 µl	
PCR Puffer (w/o MgCl ₂) mit KCl	10 x	2,50 µl	1 x
MgCl ₂	25 mM	1,50 µl	1,5 mM
dNTP	10 mM	0,50 µl	200 µM
T7 Primer	5 µM	0,50 µl	100 nm
T3 Primer	5 µM	0,50 µl	100 nm
Taq (MBI Fermentas)	5 U/µl	0,10 µl	0,5 U
H ₂ O _{MilliQ}		9,40 µl	
Ansatz		jew. 15,00 µl	

Von der Colony-PCR wurden jeweils 15 µl auf ein Agarosegel aufgetragen. Von positiven Klonen, die ein Insert in der Größe der erwarteten DNA Fragmente enthielten, wurden aus der Microtiter Platte jeweils 10 µl in 6 ml LB Amp/Tet über Nacht angeimpft. Von diesen wurde am nächsten Tag 1 ml entnommen, mit demselben Volumen Glycerol-Stocklösung versetzt und bei -80°C cryokonserviert.

Die restlichen 5 ml wurden bei 3000 rpm für 5 min pelletiert und das Pellet nach Abschütten des Mediums der Minipräp nach alkalischer Lyse zugeführt. Die Plasmid-Präparation wurde mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Elution der Plasmid DNA wurden 50 µl ddH₂O verwendet.

Um die Ergebnisse der Colony-PCR zu verifizieren, d.h. um festzustellen, ob die Klone die Inserts mit der erwarteten Größe besaßen, wurden die aufgereinigten Plasmide mit dem Restriktionsenzym Paul inkubiert, da dieses Erkennungssequenzen flankierend der Multiklonierungsstellen im pCRSelf Vektor aufweist.

2.2.7.3 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative real-time PCR Analyse, basierend auf der vergleichenden C_T Methode (Schmittgen and Livak, 2008), wurde auf dem Roche Light Cycler 2.0 System durchgeführt. Hierbei wurde das „DyNAmo Capillary SYBR Green qPCR Kit“ (Thermo Scientific, F-420L) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt:

Puffer (SYBR Green MM)	10 μ l
5 μ M sense Primer	2 μ l
5 μ M antisense Primer	2 μ l
ddH ₂ O	1 μ l

Dieser Ansatz wurde in eine auf 4°C gekühlte Glaskapillare (Roche, 04929292001) überführt und anschließend jeweils 5 μ l cDNA ($c = 5$ ng/ μ l) hinzugegeben. Die Kapillaren wurden kurz bei unter 2000 rpm herunter zentrifugiert und in den Light Cycler 2.0 transferiert.

Tab. 17: Temperaturprogramm für die Real Time PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen	Slope	Fluoreszenzmessung
95°C	10 min		20°/s	
95°C	5 s	30x	20°/s	
55-65°C	10 s		20°/s	
72°C	10 s		20°/s	einfach
95°C	5 s		20°/s	
40°C	0		20°/s	
95°C	0		0,2°/s	kontinuierlich
40°C	30 s		20°/s	

Das humane GAPDH Gen wurde als interner Standard verwendet. Die auf den Real Time PCR Daten basierende Genexpressionsanalyse wurde mit der REST 2009 Software (Qiagen) durchgeführt.

2.2.8 Silbergel zur Kontrolle von Real-Time PCR Fragmenten

Tris-Sulfat Puffer:	35 mM Tris-Base pH 9,0 0,2 % (v/v) H ₂ SO ₄
Tris-Borat (TB) Puffer:	1,04 M Tris Base pH 9,0 0,28 M Borsäure 0,001 % (w/v) Bromphenolblau
Pufferstreifen:	2 % (w/v) Agarose TB-Puffer
Färbelösung:	0,1 % (w/v) AgNO ₃ 0,15 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklungslösung:	2,5 % (w/v) NaCO ₃ 2 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ 0,15 % (v/v) Formaldehyd
Stopp-Puffer:	0,5 % (w/v) Na ₂ -EDTA 2 % (w/v) Glycin

Zum Nachweis der Spezifität der SYBR Green Real Time PCR Ergebnisse wurde zusätzlich zu der nach jeder Amplifikation durchgeführten Schmelzkurvenanalyse der PCR Ansatz bei der ersten PCR mit einem neuen Primerpaar auf ein Silbergel zur Kontrolle der amplifizierten Fragmente aufgetragen. Zu diesem Zweck wurde ein 12 % natives Polyacrylamidgel hergestellt und auf eine Gelbondfolie aufgebracht.

Tab. 18: Zusammensetzung 16% PAA Gel

Reagenz	Menge
40 % PAA	4,5 ml
35mM Tris-Sulfat	3 ml
10% APS	105 µl
TEMED	5,3 µl
ddH ₂ O	7,5 ml

Es wurden jeweils 4 µl der PCR Produkte auf das Gel aufgebracht und für 1 h bei 12-15°C und 15 mA in der Multiphor II Elektrophoresekammer aufgetrennt. Die Elektroden wurden hierbei auf zwei Pufferstreifen aufgelegt, die jeweils an den Enden der Trennstrecken aufgebracht wurden. Nach Auftrennung der Proben wurde das Gel für 30 min in 10 % Essigsäure fixiert und 3 Mal für 2 min in ddH₂O gespült. Die Färbung des Gels erfolgte für 20-30 min in Färbelösung, anschließend wurde das Gel kurz in ddH₂O gespült und für 2-5 min in Entwicklungspuffer inkubiert. Die Entwicklungsreaktion wurde durch zehninütige Inkubation in Stopp-Puffer abgestoppt und das Gel in 5 % Glycerol für 10 min imprägniert. Zur langfristigen Konservierung wurde das Gel mittels eines Geltrockners auf ein Whatman Filterpapier aufgebracht.

2.2.9 In-situ-Hybridisierung

Lithiumchlorid:	4 M in DEPC-H ₂ O
EDTA:	0,4 M in DEPC-H ₂ O
10 x PBS:	145 mM NaCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 100 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
1x PBS-DEPC:	aus 10 x PBS verdünnt; mit Zusatz von 0,1 % DEPC bei 37°C über Nacht inkubiert, autoklaviert
4% PFA/PBS-DEPC:	8g PFA wurden bei 60-70°C in 160 ml 1x PBS-DEPC, unter Zugabe einiger Tropfen 5N NaOH gelöst und auf 200 ml mit 1x PBS-DEPC aufgefüllt
Hybridisierungslösung (50ml):	25 ml Formamid 3,5 ml 20 x SSC 0,05 ml 0,5 M EDTA 0,25 ml t-RNA (10mg/ml) /optional: 0,25 ml ssDNA

	0,1 ml Tween 20 2,5 ml 10% Chaps 0,05 ml Heparin (50mg/ml) 18,6 / 18,4 ml DEPC-H ₂ O
10% Chaps (Fluka):	in DEPC-H ₂ O gelöst und sterilfiltriert
1 M Levamisol (Sigma):	in DEPC-H ₂ O gelöst
Heparin (Sigma):	50 mg/ml in DEPC-H ₂ O gelöst, sterilfiltriert
t-RNA (Sigma):	105 ng tRNA (2000 Units) in 10,5 ml DEPC-H ₂ O gelöst, Lagerung bei -20°C
20x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat in DEPC-H ₂ O pH 4,5
MAB:	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl pH 7,5
MABT:	MAB mit Zusatz von 0,1% Tween 20
BBR:	10 % Boehringer Blocking Reagent (Roche) in MAB
NGS (normal goat serum):	hitzeinaktiviert bei 60°C Lagerung bei -20°C
NTMT:	100 mM TRIS, pH 9,5 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 0,1 % Tween 20 2 mM Levamisole
Salmon sperm DNA (ssDNA):	500 mg in 50 ml DEPC-H ₂ O gelöst 1 h bei RT geschüttelt Lagerung bei -20°C

2.2.9.1 Herstellung der Sonden für die in-situ-Hybridisierung

Die Synthese der Sonden für die in-situ-Hybridisierung erfolgte mittels in vitro Transkription. Nach Überprüfung der klonierten DNA Fragmente durch Sequenzierung wurde die Konzentration der aufgereinigten Plasmid DNA gemessen und, je nach Größe des Fragments, zwischen 4 und 7 µg für die in vitro Transkription über Restriktionsenzyme geschnitten. Die Restriktion erfolgte mit den beiden Enzymen NotI und EcoRV (je 10 U), welche jeweils flankierend der XcmI Schnittstelle des pCRSelf Vektors liegen, sowie keine Erkennungssequenz in den klonierten PCR-Fragmenten aufweisen, in einem Reaktionsvolumen von 50 µl über Nacht. Zur Kontrolle wurde anschließend 1/50 des Restriktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen. Die geöffneten Vektoren wurden über gelchromatographische Zentrifugationssäulen (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, 740609, Macherey-Nagel) aufgereinigt und in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen. Nach gelelektrophoretischer Kontrolle der Aufreinigung wurden jeweils 14 µl des Restriktionsverdau in die in vitro Transkription eingesetzt.

Die in vitro Transkription wurde nach folgendem Ansatzschema mit Reagenzien von Roche durchgeführt:

14 µl Template (2-3 µg DNA)
2 µl DIG-NTPs (10x konzentriert)
2 µl 10x Puffer
2 µl Polymerase (20 U/µl) (jeweils ein Ansatz mit T3 und T7 Polymerase)
20 µl Ansatz → 2h Inkubation bei 37°C

+ 7 µl DEPC-H₂O
1 µl 10x DIG-NTPs
1 µl 10x Puffer
1 µl Polymerase

30 µl Ansatz → 1h Inkubation bei 37°C

2.2.9.2 Anfertigung von Kryostat-Gewebeschnitten

Für die Herstellung von Gewebeschnitten wurden Kleinhirne von Mäusen präpariert, kurz in PBS gespült und auf Trockeneis eingefroren. Von diesen bzw. in OCT eingebetteten Kleinhirnen wurden mittels eines Kryostaten 14 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträgerschnipseln aufgenommen und bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.9.3 In-situ-Hybridisierung

Zur Vorbereitung auf die in-situ-Hybridisierung wurden die eingefrorenen Gewebeschnitte zunächst in 4% Paraformaldehyd für 5 min fixiert, dann zweimal in PBT-DEPC gewaschen, in 0,1% Glutaraldehyd für 10 min refixiert und wiederum zweimal für 5 min in PBT-DEPC gewaschen.

Zur Präybridisierung wurden die Kryoschnitte zunächst bei RT für 5 min in 1:1 PBT-DEPC/Hybridisierungslösung und 5 min in Hybridisierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Hybridisierungslösung für 1-2 h bei 70°C.

Zur Hybridisierung wurde ca. 1 µg Sonde in 100 µl Hybridisierungslösung aufgenommen und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde der Sonden-Mix zu 2 ml auf 70°C vorgewärmter Hybridisierungslösung in Bibbi-Sterillin Gefäßen zugegeben und die auf den Objektträgern fixierten Gewebeschnitte in diese überführt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70°C.

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Schnitte dreimal für 30 min bei 70°C in Hybridisierungspuffer gewaschen und noch einmal mit MABT/ Hybridisierungslösung im Verhältnis 1:1 für 15 min. Folgend wurde zweimal mit MABT für 30 min bei RT gewaschen und es erfolgte eine Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindestellen für jeweils eine Stunde mit 2% Boehringer Blocking Reagent

(Roche, 1096176) in MABT und mit in MABT gelöstem 2 % BBR und 20 % hitze-inaktiviertem Ziegenserum (Invitrogen). Die Antikörper Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C in o.g. Blockierungs-Puffer in welchem der anti-DIG Alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper im Verhältnis 1:2000 verdünnt wurde.

Zur Entfernung nicht spezifisch gebundener Antikörper wurden anschließend sieben jeweils einstündige Waschschrte in MABT angeschlossen. Zur Visualisierung der gebundenen Sonden wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase durch das BM-Purple Reagenz (Roche, 11442074001) nachgewiesen.

Nach Ausbildung einer spezifischen Färbung wurde das BM-Purple Reagenz verworfen und die Schnitte mehrmals in PBS gespült. Es folgte eine Gegenfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33342 um die Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die gefärbten Schnitte wurden auf Glasobjektträgern in Mowiol (Sigma, 81381) eingebettet. Die Schnitte wurden mit dem Axioskop 2 vergrößert (Zeiss) und mit der DT5 Digitalkamera (Olympus) dokumentiert.

2.2.10 Herstellung von antisense Vektoren für die Zellkultur

2.2.10.1 Phosphorylierung und Annealing von antisense RNA

Oligonukleotidsequenzen

Zur Herstellung von shRNA Oligonukleotidsequenzen wurden die Oligonukleotide (siehe Tab. 5) zunächst phosphoryliert.

Die Phosphorylierung erfolgte mittels T4 Polynukleotidkinase (PNK) nach folgendem Ansatzschema für 2 h bei RT:

6 µl 50 µM sense Oligonukleotid
6 µl 50 µM antisense Oligonukleotid
3 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer
2 µl PNK
13 µl ddH₂O

Anschließend wurden die phosphorylierten sense und antisense Oligonukleotide miteinander annealed. Hierzu wurde dem Ansatz zunächst 4 µl 0,4 M NaCl zugegeben, dann wurden die Proben für 2 min in kochendem Wasser inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben im Wasserbad belassen bis dieses auf Raumtemperatur abgekühlt war.

2.2.10.2 Klonierung von shRNAs zur Herstellung von silencing Vektoren

Zur Erstellung von einfachen oder multiplen silencing Vektoren wurde der pU6m4 Vektor (siehe Abb. 10) verwendet. Dieser wurde freundlicherweise von Dolph L. Hatfield bereitgestellt. Wie dieser Vektor generiert wurde und zu verwenden ist wurde von Xu, Yoo, Carlson, Gladyshev, & Hatfield (2009) beschrieben.

Der pU6m4 silencing Vektor wurde mit den Enzymen BamHI und HindIII eröffnet und mit den phosphorylierten und annealten shRNA Oligonukleotiden ligiert. Um die Bildung von Multimeren zu verhindern wurden letztere vor der Ligation in ddH₂O verdünnt, auf 65°C erhitzt und der geschnittene Vektor hinzugegeben. Sobald dieser Ansatz auf RT abgekühlt war erfolgte die Zugabe des Ligationspuffers und der Ligase.

Um Vektoren mit mehreren hintereinander folgenden shRNA Sequenzen, jeweils unter Kontrolle des U6 Promotors, zu erstellen wurde einer dieser Vektoren als Backbone verwendet. Dieser wurde mit den Enzymen MfeI und XhoI geschnitten. Der pU6m4 Vektor, der die nachfolgend zu inserierende shRNA Sequenz beinhaltet, wurde mit den Enzymen EcoRI und XhoI geschnitten. Das hierdurch ausgeschnittene Fragment, das den U6 Promotor und die shRNA Sequenz beinhaltet wurde anschließend in den mit MfeI und XhoI eröffneten pU6m4 Vektor hinter die dort bereits vorhandene shRNA Sequenz inkloniert. Diese Schritte wurden mehrfach wiederholt, bis alle gewünschten shRNA Fragmente in einen Vektor inseriert waren.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Konservierung von Zelllinien

DMEM Medium:	DMEM (Gibco, 11965) 10 % FCS (v/v) Foetale Bovine Serum (Gibco, 16000044) 50 µg/ml Gentamycin (Gibco, 15710-049, c= 50 mg/ml)
DMEM/F12 Medium:	DMEM (Gibco, 11965) Ham's F-12 Nutrient Mixture (F12, Gibco, 11765054) 10 % FCS (v/v) Foetale Bovine Serum (Gibco, 16000044) 50 µg/ml Gentamycin (Gibco, 15710-049, c= 50 mg/ml)
Einfriermedium:	DMEM (Gibco, 11965) 50 % FCS (Gibco, 16000044)
Konservierungsmedium:	DMEM (Gibco, 11965) 20 % DMSO (Sigma, D-2651)
10 x PBS:	145 mM NaCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 100 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 → Sterilfiltriert, zur Verwendung mit ddH ₂ O auf 1 x verdünnt
1 x Trypsin-EDTA:	0,05 % Trypsin-EDTA in 1 x PBS aus 0,5 % Trypsin-EDTA (Invitrogen, 15400-054) ver- dünnt

D283Med und Daoy Zelllinien wurden in DMEM Medium, die NT-2 Zelllinie in DMEM/F12 Medium in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:10- 1:20 gesplittet. Hierbei wurde das Medium der Zellen abgesaugt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 x Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden resuspendiert und in ein mit Medium gefülltes Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifuga-

tion bei 225 x g für 6 min wurde das Zellpellet erneut in Medium resuspendiert und ein Teil der Zellen in eine neue Kulturschale überführt.

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst, die Zellzahl mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen à 1×10^6 Zellen / 500 µl Einfriermedium resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend in Kryokonservierungsröhrchen (Nunc, 377267) überführt und jeweils 500 µl Konservierungsmedium tropfenweise zugegeben und vorsichtig resuspendiert. Die Röhrchen wurden dann in eine mit Isoopropanol gefüllte Einfrierbox (Nalgene) gegeben, welche eine langsame Abkühlung der Zellen erlaubt (etwa $1^\circ\text{C} / \text{min}$) und bei -80°C gelagert. Sollten die Zellen über einen Zeitraum von mehreren Monaten gelagert werden wurden sie in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Zum Auftauen der bei -80°C oder im Flüssigstickstofftank gelagerten Zellen wurden die Röhrchen zum Transport jeweils in Flüssigstickstoff überführt und anschließend in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde resuspendiert und zügig in ein mit Medium gefülltes Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 225 x g für 6 min wurden das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Zellen auf eine Zellkultursschale ausplattiert.

2.3.2 Transfektion von Zelllinien

2.3.2.1 Transfektion mit siRNA

Optimem: Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Gibco, 31985070)

DharmaFECT Transfection Reagents: DharmaFECT 2 (Dharmacon, T2002-01)
DharmaFECT 4 (Dharmacon, T2004-01)

Die Transfektion von Zelllinien mit siRNAs wurde mit Reagenzien von Dharmacon durchgeführt. Zur Transfektion von D283Med, Daoy und NT-2 Zellen wurde jeweils Dharmafect 2 oder Dharmafect 4 verwendet. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h zuvor à $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Quadratcentimeter ausgesät. Zur Transfektion wurden die verwendeten siRNAs jeweils in einer Gesamtkonzentration von 50 μM eingesetzt. Bei der parallelen Transfektion mehrerer siRNAs wurde die Menge der einzelnen siRNAs jeweils reduziert.

2.3.2.2 Transfektion mit Plasmiden

Optimem: Opti-MEM I Reduced-Serum Medium
(Gibco, 31985070)

Die Transfektion von Zelllinien mit Plasmid DNA wurde mit Lipofectamine LTX unter Verwendung des Plus Reagenz (Invitrogen, 15338-100) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden 24 h zuvor à $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Quadratcentimeter ausgesät. Die Plasmid DNA wurde jeweils in einer Konzentration von 300 ng pro Quadratcentimeter eingesetzt, und mit einem Verhältnis von 1:1 ($\mu\text{l}:\mu\text{g}$ Plasmid DNA) mit dem Plus Reagenz vermengt. Das Lipofektamin LTX Reagenz wurde in einem Verhältnis von 1:2 ($\mu\text{l}:\mu\text{g}$ Plasmid DNA) zugegeben. Alle Lösungen wurden in Optimem angesetzt. Während des Transfektionsprozesses wurde dem Zellkulturmedium kein Antibiotikum zugegeben. Ein Mediumwechsel mit dem Standardmedium erfolgte 6-8 h nach Zugabe des Transfektionsreagenz.

2.3.3 Stabile Selektion von mit Plasmid DNA transfizierten Zelllinien

Hygromycin B: 50 mg/ml (Gibco, 10687010)
verwendete Konzentrationen:
D283Med/Daoy: 200 µg/ml
NT2: 100 µg/ml

Zeocin: 100 mg/ml (Gibco, R25001)
verwendete Konzentrationen:
D283Med/Daoy: 250 µg/ml

2.3.3.1 Selektion stabil transfizierter Mischkulturen

Zur Erzeugung stabil transfizierter Mischkulturen wurde den Zellen 48 h nach der Transfektion mit dem jeweiligen Selektionsreagenz versetztes Medium zugegeben. Alle 2-3 Tage wurden das Medium abgesaugt um abgestorbene Zellen zu entfernen und frisches Selektionsmedium zugefügt. Die Zellen wurden für mindestens 14 Tage in Selektionsmedium weiter kultiviert und expandiert bevor sie für nachfolgende Experimente verwendet wurden.

2.3.3.2 Stabile Selektion von Einzelzellklonen

Zur Selektion stabil transfizierter Einzelzellklone wurden stabil transfizierte Mischkulturen (siehe vorheriger Abschnitt) mittels Trypsin abgelöst, die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt und eine Zellsuspension von 1000 Zellen / ml hergestellt. Aus dieser Suspension wurden 50 µl abgenommen und dieses Volumen auf 30 Tropfen verteilt auf eine kleine Petrischale aufgebracht. Die Tropfen wurden mit der Pipettenspitze abgeflacht und unter dem Mikroskop betrachtet. Tropfen, die genau eine Zelle enthielten, wurden mit jeweils 50 µl Medium aufgenommen und in eine 96-Well Schale zu 50-100 µl vorgelegtem Medium hinzugegeben. Erfolgreich angewachsene Zellklone wurden anschließend weiter in Selektionsmedium expandiert.

2.3.4 Neuronale Differenzierung humaner Teratokarzinomzellen

Retinsäure:	≥ 98 %, HPLC grade (Sigma, R2625) 10 mM Stock in DMSO Stock Solution wurde jeden Monat frisch hergestellt Lagerung bei -20°C
Zellzyklus-Inhibitoren:	1 µM AraC (aus Sigma, C1768, ≥ 90 %, HPLC grade) 10 µM FudR (aus Sigma, F0503, MW=246,19) 10 µM Urd (aus Sigma, U3750, ≥ 99 %)

Die Differenzierung von NT-2 Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Paquet-Durand, Tan, & Bicker (2003). Hierzu wurden jeweils 6×10^6 Zellen in DMEM/F12 Medium auf 100 mm Petrischalen ausgesät. Um ein adhärentes Wachstum der Zellen zu unterbinden wurden keine behandelten Zellkulturschalen verwendet, sondern unbehandelte Petrischalen. Am darauf folgenden Tag wurde jeweils 10 µM all-trans Retinsäure (ATRA) in das Medium hinzugegeben. In den darauf folgenden Tagen wurde das Medium (DMEM/F12 Medium, mit 10 µM ATRA versetzt) alle 2-3 Tage erneuert. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen abpipettiert, bei 200 x g herunter zentrifugiert und auf jeweils eine neue Petrischale ausgesät. Nach 7-8 Tagen wurden die Zellen auf T75 Zellkulturschalen umgesät. Das DMEM/F12/ATRA Medium wurde auch hier alle 2-3 Tage erneuert, die Zellen wurden jedoch nicht mehr abgelöst, sondern für 6-8 Tage kultiviert bis die Kulturschalen komplett mit einer Zellschicht oder Aggregaten bedeckt waren. Dann wurden sie abgelöst und auf T150 Zellkulturschalen umgesät. Auf diesen Schalen wurden die Zellen für weitere zwei Tage kultiviert, anschließend das Medium abgenommen und bei 4°C aufbewahrt, die Zellen abgelöst und auf eine T75 Zellkulturschale überführt. Dem Medium der Zellen, welches zur Hälfte aus „konditioniertem Medium“ (aus den T150 Zellkulturschalen abgenommenes Medium) und zur Hälfte aus frischem Medium bestand wurden nun Zellzyklus-Inhibitoren zugegeben, um die Expansion glialer Zellen zu unterdrücken. Das Medium wurde

wieder alle 2-3 Tage erneuert und die Zellen nach 7-10 Tagen für die RNA Isolation bzw. Proteinextraktion geerntet oder für die Immunzytochemie in mit PLL beschichtete Zellkulturschalen ausgesät.

2.3.5 Real Time Monitoring von Zellkulturen über Impedanzmessung

Zur Echtzeitanalyse von Zellkulturen wurde das xCelligence Real-Time Cell Analyzer System (Roche) verwendet. Hierbei werden die Zellen in speziellen Kulturplatten (E-Plate 16) kultiviert. In jedem Well dieser Platten befindet sich ein integriertes sensorisches Elektrodenfeld, wodurch die Impedanz der einzelnen Wells gemessen wird. Pro Well wurden jeweils 5000-10000 Zellen ausgesät. Zur Analyse von siRNA-vermittelten Effekten wurden die Zellen nach dem Aussähen zunächst für 18-21 h beobachtet. Nach dieser Beobachtungsphase wurden die Zellen transfiziert und das Wachstumsverhalten zur Analyse möglicher Effekte für mehrere Tage weiterverfolgt. Zur Untersuchung stabil transfizierter Zellen wurden jeweils 10000 Zellen pro Well auf die E-Plates ausgesät und deren Wachstumsverhalten für 40-48 h beobachtet.

2.3.6 Durchflusszytometrische Bestimmung von Proteinexpression nach Antikörperfärbung an Zellkulturen

FACS Puffer: 0,1 % BSA
 1 % sodium azide
 0,1 % Triton X-100
 PBS

Um die Expression von PCNA und Cleaved Caspase3 in Zellen nachzuweisen wurden die Zellen trypsiniert, jeweils á 5×10^5 Zellen in 50 μ l PBS aufgenommen und in ein Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 0,01 % PFA für 10 min bei RT fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde 0,25 % Triton X-100 zugegeben und die Zellen mit diesem für 15 min bei RT inkubiert. Die Antikörper wurden in

FACS Puffer verdünnt und die Zellen wurden für 1-2 h bei 4°C mit den primären Antikörpern inkubiert. Geeignete Alexa-488 gekoppelte sekundäre Antikörper wurden 1:500 in FACS Puffer verdünnt zu den Zellen gegeben und für 30-45 min bei 4°C inkubiert. Nach jedem Antikörper Inkubationsschritt wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem FACS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Durchflusszytometers (CyFlow Space, Partec) analysiert. Es wurden jeweils mindestens 20000 Zellen gezählt.

2.3.7 Time-Lapse Videomikroskopie von Zellkulturen

Laminin: 1 mg/ml (Sigma, L2020)

Zur Beobachtung des Migrationsverhaltens wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/ Well auf mit Laminin beschichtete 24-Well Zellkulturschalen (TPP) ausplattiert. Zur Beschichtung der Zellkulturschalen wurde jeweils 2 µg Laminin pro cm² in die Wells pipettiert und bei 37°C für 2 h oder bei RT über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Laminin abgesaugt und die Wells dreimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden in einer Mikroskopierapparatur bei 37°C und 5 % CO₂ über zehn Stunden alle 10 min fotografiert. Die Time-Lapse Aufnahmen wurden mittels des ImageJ Plugins MTrackJ (<http://www.imagescience.org/meijering/software/mtrackj/>) analysiert. Um die Motilität der Zellen zu bestimmen wurde die zeitabhängige Bewegung von 15 zufällig ausgewählten Zellen pro Position erfasst. Für jede Behandlung (Kontrollen, Leervektor-transfizierte Klone und Cux1shRNA Vektor Klone) wurden jeweils drei Positionen in zwei unterschiedlichen Wells analysiert (insgesamt 90 Zellen pro Behandlung).

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Proteinextraktion aus Gewebe und Zellkulturen

RIPA-Puffer:	50 mM Tris, pH 8,0
	150 mM NaCl
	1% NP-40
	0,1% SDS
	0,5% Sodium Deoxycholate

Dem RIPA-Puffer wurden vor Gebrauch die folgenden Protease-Inhibitoren zugegeben:

Aprotinin:	10 µg/ml
Leupeptin:	10 µg/ml
PMSF:	1 mM
Pepstatin A:	1 µM
0,5M EDTA pH 8,0:	5 mM

Zur Präparation von Gesamtprotein wurden konfluente Zellkulturen in der Kulturschale durch Zugabe von 10 µl RIPA-Puffer/cm² lysiert und die Zelllysate in Eppendorf Cups übertragen. Anschließend wurden die Proben für 45 min bis 1 ½ h bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Die Proben wurden dreimal für 15 s sonifiziert und daraufhin Kerne und Detergenz-unlösliche Membran-Fragmente für 30 min bei 15000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt, die Proteinkonzentrationen bestimmt und die Proben bei -20°C gelagert.

2.4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels der BCA Methode. Hierfür wurde das „Pierce BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. In einer 96-Well Platte wurden der Proteinstandard sowie die Proben jeweils als Doppelansatz in einem Volumen von 10 µl in die Wells vorgegeben. Von der „BCA Working Solution“ wurden jeweils 200 µl zu den Blank Kontrollen

(nur RIPA Puffer), Proteinstandards und Proben zugegeben. Nach kurzem Schütteln wurden die Platten bei 37°C für 30 min inkubiert, kurz bei RT abgekühlt und die Absorption bei 562 nm in einem µQuant Mikrotiterplatten Spektralfotometer (BioTek Instruments GmbH) gemessen.

2.4.3 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris, pH 6,8 0,4% SDS
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% SDS
40 % (w/v) Acrylamid Bis-Acrylamid:	AccuGel 29:1 (National Diagnostics)
10x SDS Elektrophorese-Puffer:	250 mM Tris 192 mM Glycin 1,0 % (w/v) SDS
6x SDS Probenpuffer:	62,5 mM Tris / HCl pH 6,8 25 % (w/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,001 % (w/v) Bromphenolblau 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden jeweils 5 µg der Proben auf 7,5 % bzw. 8 % SDS-Polyacrylamidgele (s. Tabelle 19) aufgetragen.

Tab. 19: Zusammensetzung SDS-Polyacrylamidgele

Trenngel	7,5%	8%	Sammelgel	
Trenngel-Puffer	5,0 ml	5,0 ml	Sammelgel-Puffer	630 µl
H ₂ O	9,6 ml	8,6 ml	H ₂ O	3,6 ml
Acrylamid	5,0 ml	6,0 ml	Acrylamid	625 µl
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml	10 % SDS	50 µl
10 % APS	0,2 ml	0,2 ml	10 % APS	50 µl
TEMED	8 µl	8 µl	TEMED	5 µl

Die Proben wurden vor dem Auftragen in Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proben im Gel erfolgte zunächst bei 10-15 mA bis die Proben an der Grenze zum Trenngel aufkonzentriert waren. Anschließend wurde die Stromstärke 20-30 mA erhöht. Parallel mit den Proben wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) aufgetrennt.

2.4.4 Western Blot Analyse

Semi-dry Transferpuffer:	48 mM Tris, pH 8,0 38 mM Glycin 10 % MeOH
10x TBS:	50 mM Tris 150 mM NaCl, pH 7,5
TBST:	1 x TBS mit Zusatz von 0,1 % Tween20
Ponceau S:	0,5 % Ponceau S 1 % Eisessig
Coomassie Farbstoff:	50 % Methanol 0,05 % Coomassie R-250 25 % Eisessig
Blockierungspuffer:	5 % Milchpulver in 1 x TBS gelöst, filtriert
“Stripping Buffer”:	62,5 mM Tris, pH 6,8 2 % SDS 100 mM β-Mercaptoethanol

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Membran transferiert. Der Marker wurde nach dem Transfer von der Membran abgeschnitten und zur Bestimmung des Molekulargewichts der im Western Blot nachgewiesenen Proteine aufbewahrt.

Der Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine erfolgte über das semi-dry Transfer System (Nova Blot, GE Healthcare). Die verwendeten PVDF Membranen (Millipore, IPVH00010) wurden vor dem Transfer für 5 min in Methanol aktiviert und anschließend für 5-10 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer wurde für 1 ½ h bei 4 W durchgeführt. Die Amperezahl wurde auf 1,5 mA/cm² Gel eingestellt. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen wurden die Membranen kurz in Ponceau S gefärbt, in destilliertem Wasser entfärbt und in Blockierungspuffer überführt. Die Gele wurden nach dem Transfer für mehrere Stunden in Coomassie Lösung gefärbt, in ddH₂O unter Zugabe eines Zellstoff-Papiers über Nacht entfärbt und mithilfe eines Vakuumtrockners eingetrocknet.

Die Blockierung der Membranen erfolgte für 2-4 h bei RT in Blockierungs-Puffer. Die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper wurde über Nacht bei 4°C in Blockierungs-Puffer durchgeführt.

Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Membranen viermal für 5-10 min in TBST gewaschen. Folgend wurden die Membranen mit dem in Blockierungspuffer verdünnten Zweitantikörper bei RT für 2-4 h inkubiert und wiederum viermal für 5-10 min in TBST gewaschen.

Der Nachweis der gebundenen Antikörper wurde mit dem SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, 34077) bzw. dem SuperSignal West Femto (Thermo Scientific, 34095) ECL Substrat durchgeführt.

Um gebundene Antikörper wieder von den Membranen zu entfernen wurden diese für 30-60 min bei 60°C in „Stripping Buffer“ inkubiert, dreimal in TBST gewaschen und die Membranen anschließend erneut blockiert.

2.5 Histochemische und immunzytochemische Methoden

2.5.1 HE Färbung

Hämatoxylin-Lsg.: 1 g Hämatoxylin (Chroma, 2C 163)
0,2 g Natriumiodat
50 g Aluminiumkaliumsulfat
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure
auf 1L ddH₂O, sterilfiltriert

Eosin-Lsg.: 0,1 % Eosin (Chroma, 1B 425)
Essigsäure

Zur besseren Diskriminierung von Tumor- und Normalgewebe wurden Gewebeschnitte von Math1-cre:SmoM2 Mäusen mittels der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gefärbt. Hierzu wurden die zuvor bei -80°C konservierten Schnitte bei RT für 10 min mit 4 % PFA fixiert und anschließend zunächst in PBS und dann in ddH₂O gespült. Daraufhin erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin für 2 min bei RT. Die Schnitte wurden dann in ddH₂O gespült bis die kein Farbstoff mehr ausgespült wurde. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in Leitungswasser gebläut, für 2-5 min in 70 % Ethanol inkubiert und 30 s mit Eosin gefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte noch einmal mit ddH₂O gespült, getrocknet und zur Betrachtung unter dem Mikroskop eingedeckelt.

2.5.2 Immunfluoreszenzfärbungen an Zellkulturen

PLL: 0,2 mg/ml PLL (Sigma, P6282), in ddH₂O gelöst

4% PFA/PBS-DEPC: 8g PFA wurden bei 60-70°C in 160 ml 1x PBS-DEPC, unter Zugabe einiger Tropfen 5N NaOH, gelöst und auf 200 ml mit 1x PBS-DEPC aufgefüllt

0,5 % TX-100: 0,5 % (v/v) Triton X-100 (Sigma, X100), in PBS

Hoechst 33342: Sigma ($\geq 98\%$, B2261), 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurden in PBS gelöst

Für die Immunfluoreszenz wurden unterschiedlich behandelte NT-2 Zellen à 1×10^5 pro Well auf PLL-beschichtete Glas-Coverslips (Warner) in 4-Well Schalen (Nunc) ausgesät. Die Zellen wurden nach 24 h über Zugabe von 4 % PFA für 5 min fixiert und dreimal mit PBS gespült. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mittels 0,5 % TX-100 für 5 min bei RT, anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindestellen wurden die Zellen in 2 % BSA für 2 h bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem in 2% BSA verdünnten Erstantikörper bei 4°C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden ungebundene Reste des Erstantikörpers durch dreimaliges Waschen mit PBS für 5 min bei RT entfernt und die Zellen mit dem 2% BSA verdünnten Zweitantikörper für 2h bei RT inkubiert. Dieser wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit PBS für 5 min bei RT entfernt. Die Zellkerne wurden mittels Hoechst3342 für 10 min bei RT gefärbt und die Coverslips in Kaisers Glyceringelatine (Merck, 109242) eingebettet.

2.6 Microarray Datenauswertung

2.6.1 Analyse der Microarray Datensets von Math1⁺ Körnerzellvorläufern und Gesamtcerebellum

Die in einer Vorarbeit von Dr. G. Weisheit erstellten Microarray Datensätze aus jeweils dem Transkriptom von proliferationsaktiven Körnerzellvorläufern und Gesamtcerebellum (siehe auch Abschnitt 3.1.1) wurden zur Identifikation von in Körnerzellvorläufern spezifisch und/oder verstärkt exprimierten Genen analy-

siert. Die Datenverarbeitung wurde in R (R Development Core Team, 2008) durchgeführt. Hierbei wurden über den CARMA web Server (Rainer et al., 2006) im Bioconductor Software Packet (Gentleman et al., 2004) implementierte Algorithmen verwendet. Eine erste Analyse der Daten zeigte, dass wie erwartet (Irizarry et al., 2006; Lim et al., 2007; Millenaar et al., 2006), sowohl die Anzahl, als auch die Identität der als differentiell exprimiert identifizierten Gene abhängig von der zur Normalisierung verwendeten Methode (Mas5 oder GcRma) stark variierte. Daher wurde auf eine von Millenaar et al (Millenaar et al., 2006) verwendete Strategie zurückgegriffen und nur solche Gene als differentiell exprimiert betrachtet, die nach Normalisierung mit beiden verwendeten Algorithmen einen Expressionsunterschied um mindestens den Faktor zwei aufwiesen. Die Gruppierung der identifizierten Gene nach ihrer biologischen Funktion (basierend auf der Gene Ontology Kategorie „biological process“ (<http://www.geneontology.org/>)) wurde über die David Bioinformatik Datenbank durchgeführt (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>; (Huang et al., 2009a, 2009b)).

2.6.2 Analyse der Expression ausgewählter Gene in Expressionsdatensätzen von nach molekularen Subgruppen klassifizierten humanen Medulloblastomproben

Um die Expression von ausgewählten Genen in nach molekularen Subgruppen unterteilten Datensätzen humaner Medulloblastomproben zu analysieren wurde in der NCBI GEO Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) nach geeigneten Datensätzen gesucht. Es wurden zwei Datensätze zur Analyse ausgewählt, die jeweils Proben von 62 (GSE10327, ID:200010327, (Kool et al., 2008)) bzw. 64 (GSE28245, ID: 200028245, (Remke et al., 2011)) Medulloblastom Patienten enthielten. Die Initiale Analyse und Zusammenstellung der der Genexpressionsdaten ausgewählter Gene wurden in Excel durchgeführt. Zur bildlichen Darstellung wurden die Daten in R importiert und Streudiagramme erstellt.

2.6.3 Korrelationsanalysen

Zur Identifikation von Genen, deren Expression in den humanen Medulloblastomproben der von Kool et al. und Remke et al. publizierten Datensätze mit der von Cux1 korrelieren wurden zwei Korrelationen bestimmt, die auch verschiedene Formen nicht linearer Korrelation identifizieren (Hoeffdingsche Unabhängigkeit und Distanzkorrelation). Hierfür wurden die Expressionsdaten der o.g. Datensätze direkt in R importiert und die Funktion `hoeffd` (Hoeffdingsche Unabhängigkeit) des Paketes „Hmisc“ (<http://cran.r-project.org/web/packages/Hmisc/Hmisc.pdf>) sowie die Funktion `dcor` (Distanzkorrelation) aus dem Paket „energy“ (<http://cran.r-project.org/web/packages/energy/energy.pdf>) verwendet. Mit beiden Korrelationen wurden jeweils aus dem von Remke et al. und dem von Kool et al. veröffentlichten Datensatz die zweihundert am stärksten mit Cux1 korrelierten Gene ermittelt und schließlich die Schnittmenge der in beiden Datensätzen identifizierten Gene bestimmt.

2.7 Statistische Auswertung

Soweit nicht anderweitig angegeben sind alle Daten als Mittelwerte \pm 1 SEM (Standardfehler) dargestellt. Multiple Vergleichstests mehrerer Gruppen wurden mittels ANOVA gefolgt vom Tuckey's HSD Test (Sokal and Rohlf, 1995) durchgeführt. Alle statistischen Verfahren wurden in R (<http://www.r-project.org/>) ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Microarray-basierte Genexpressionsanalyse von Körnerzellvorläufern des Kleinhirns

3.1.1 Selektion differentiell exprimierter Gene

In dieser Arbeit sollten Gene identifiziert werden, welche selektiv in Vorläufern von Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert werden, um deren Einfluss auf die Entwicklung und Pathogenese der cerebellären Körnerzellen zu untersuchen. Hierbei sollten speziell die noch proliferativ aktiven Körnerzellvorläufer ausgewählt werden, da diese Medulloblastome bilden können. Im Rahmen der Genexpressionsanalyse in cerebellären Körnerzellen wurde zuvor in unserer Arbeitsgruppe ein transgenes Mausmodell entwickelt, in welchem GFP unter der Kontrolle des Math1 Genpromotors exprimiert wird (Gliem et al., 2006; basierend auf Arbeiten von: Lumpkin et al., 2003). Der Transkriptionsfaktor Math1 ist ein Marker für Körnerzellvorläufer des Kleinhirns. Math1 ist der früheste bekannte Marker für Körnerzellvorläufer und wird in diesen, ab deren Generierung in der Rautenlippe um etwa E10, exprimiert. Eine starke Expression von Math1 findet sich nur in proliferativ aktiven Körnerzellvorläufern, welche sich postnatal im äußeren Anteil der EGL befinden. Sobald die Körnerzellvorläufer ihre Proliferation einstellen und in den inneren Anteil der EGL eintreten von wo aus sie ihre Migration in Richtung IGL einleiten, wird die Expression von Math1 herunterreguliert (siehe auch: Abschnitt 1.1.4). Aufgrund ihrer starken GFP Expression konnten proliferationsaktive Körnerzellvorläufer somit aus Kleinhirnen von Math1-eGFP Mäusen über Durchflusszytometrie isoliert werden. Das Transkriptom dieser Zellen wurde mittels des Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Genchips analysiert. Zum Vergleich wurde auch das Transkriptom des Gesamtcerebellums untersucht.

In beiden Fällen wurden Kleinhirne von Tieren am Postnataltag 8 (P8) verwendet¹.

Die Expressionsdaten dieser beiden Microarray-Datensätze wurden mithilfe des Carmaweb Servers verglichen. Für die Normalisierung der Microarray Daten wurden hierbei zwei verschiedene Algorithmen benutzt, der Mas5 und der Gcrma Algorithmus. Für die Auswahl der als reguliert angesehenen Gene wurde jeweils ein cutoff bezüglich der Expressionsintensität ($A \geq 1$), sowie des Regulationswertes ($M \geq 1$ bzw. $M \leq -1$) gesetzt (Abb. 11). Über den cutoff des Regulationswertes wurden somit nur solche Gene als in den beiden Datensätzen unterschiedlich reguliert angesehen, die einen Expressionsunterschied von mindestens 2-fach aufwiesen (M Werte sind in logarithmischer Skala angegeben). Die Auswertung mittels dieser beiden Algorithmen führte zur Identifikation von, sowohl in der Anzahl als auch in der Art, unterschiedlicher Sets von Genen als in Körnerzellvorläufern differentiell exprimierte Gene. Im weiteren Verlauf wurden nur die Gene ausgewählt und als in cerebellären Körnerzellen differentiell exprimiert betrachtet, welche über beide Algorithmen identifiziert worden waren (Millenaar et al., 2006). Schließlich wurden auch nur die in den Vorläufern cerebellärer Körnerzellen spezifisch bzw. verstärkt exprimierte Gene ($M \geq 1$) zur weiteren Analyse ausgewählt. Über den Mas5 Algorithmus wurden hierbei 1158 Gene und über den Gcrma Algorithmus 501 Gene als in Körnerzellvorläufern verstärkt exprimiert

¹ Die bis hierher dargestellten Arbeiten wurden bereits im Vorfeld dieser Dissertation von Dr. Gunnar Weisheit durchgeführt. Da es sich hierbei um eine zentrale Vorarbeit zu dieser Arbeit handelt sind diese Schritte hier jedoch der Vollständigkeit halber noch einmal genau aufgeführt.

identifiziert. Die Schnittmenge der mittels beider Algorithmen identifizierten Gene umfasste 154 Gene (Tab. 23, siehe Anhang).

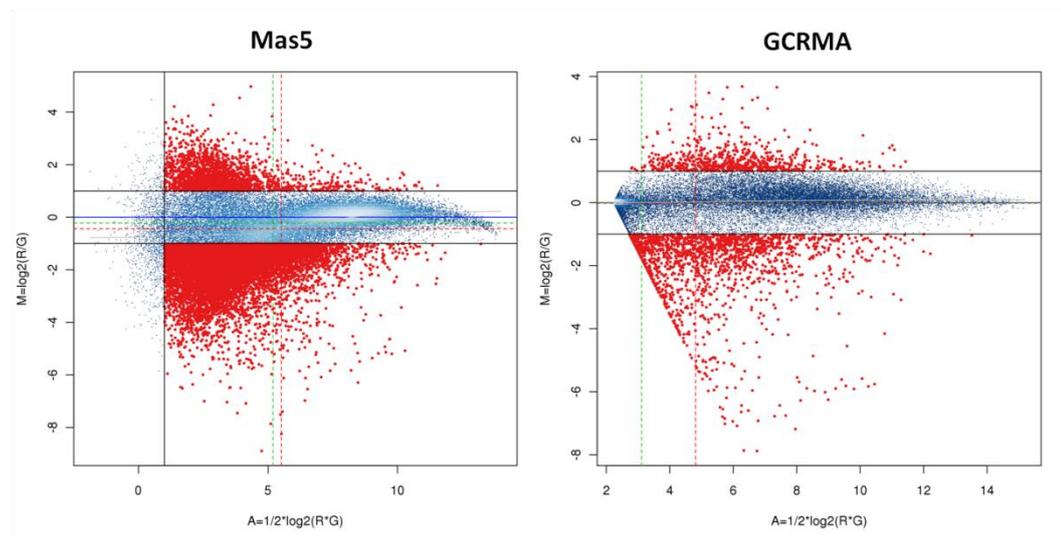


Abb. 11: Darstellung der Genexpression in stark Math1⁺ Zellen gegen Gesamtkleinhirn mit Auswertung über den Mas5 bzw. GCRMA Algorithmus. Rote Punkte repräsentieren Gene, die über die gewählten Kriterien als reguliert identifiziert wurden. Die Farbe der restlichen Punkte stellt die lokale Punktdichte dar, wobei weiß für eine hohe und blau für eine niedrige Punktdichte steht. Die roten gestrichelten Linien repräsentieren jeweils den Mittelwert, die grün gestrichelten Linien den Median der durchschnittlichen Expressions- (A) bzw. Regulations- (M) Werte. Auswertung der Microarray Datensätze mittels des Carmaweb Servers (Rainer et al., 2006).

Eine Übersicht der einzelnen Schritte, die zur Auswahl der untersuchten Zielgene führte ist in Abb. 12 dargestellt.

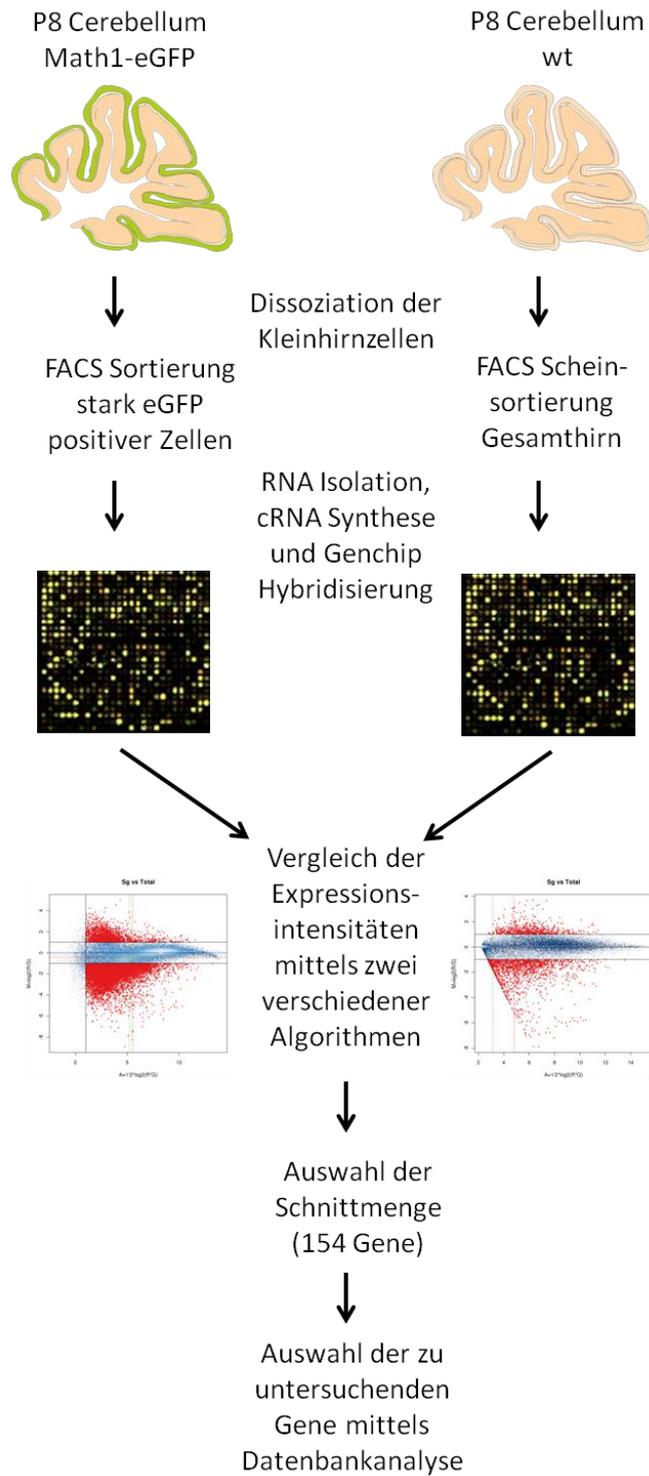


Abb. 12: Darstellung der durchgeführten Strategie zur Auswahl Körnerzellvorläufer-spezifischer Gene

Diese 154 Gene wurden anschließend mithilfe des David Tools (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>; (Huang et al., 2009a, 2009b)) entsprechend ihrer vermuteten biologischen Funktion über die entsprechenden Gene Ontology Kategorien klassifiziert (Abb. 13)

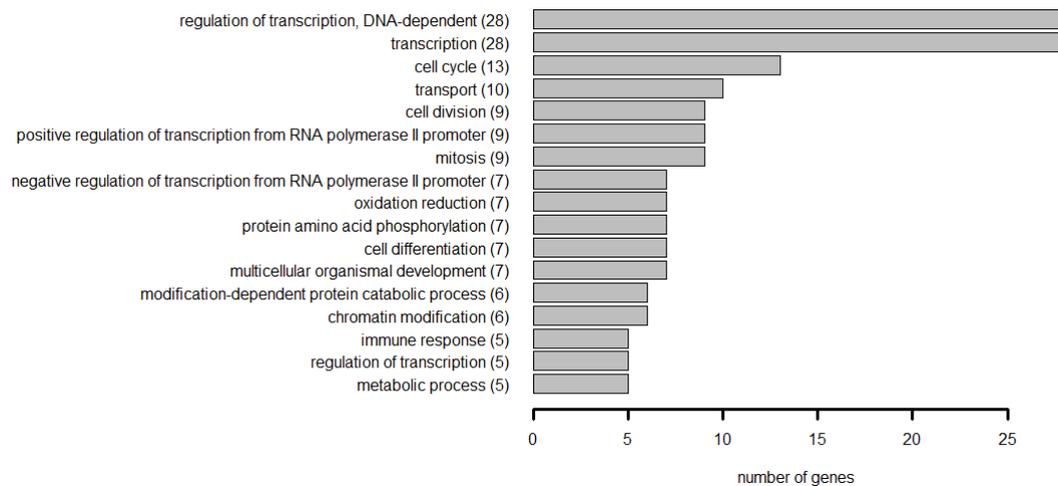


Abb. 13: Gene Ontology Annotierung (biological process) der Gene, die vorwiegend in Math1⁺ Körnerzellvorläufern des Kleinhirns exprimiert werden. Gene, die über den Microarray als in Math1⁺ Zellen verstärkt exprimiert identifiziert wurden sind hier nach ihrer über die GO biological process Kategorie definierten Funktion der David Bioinformatik Datenbank gruppiert. Vorhergesagte GO Bezeichnungen mit einem Benjamini p-Wert <0.001 wurden ausgewählt und die Anzahl an mit den jeweiligen Begriffen assoziierten Genen dargestellt.

Die GO Analyse zeigt unter den 154 mittels der Microarray Analyse identifizierten Genen eine deutliche Überrepräsentation an Genen, die mit der Regulation der Transkription und des Zellzyklus assoziiert sind.

3.1.2 Verifikation der mithilfe des Microarrays ermittelten Daten

Aus den 154 mittels der Microarray Datenauswertung als in cerebellären Körnerzellen differentiell exprimiert vorhergesagten Genen wurden zunächst zehn zur weiteren Analyse ausgewählt. Dies waren die Gene *Adamts5*, *Cux1*, *Fzd3*, *Kntc2*, *Plagl1*, *Rasl11b5*, *Slc1a5*, *Suz12*, *Tgif2* und *Troap*. Die Auswahl dieser Gene beruhte auf verschiedenen Kriterien. Zunächst wurde in unterschiedlichen Expressionsdatenbanken (Allen Brain Atlas, BGEM und GenePaint) nach Expressionsmustern der 154 Kandidatengene im Gehirn gesucht. Anschließend wurden Gene, deren Expression bereits im Kleinhirn und/oder in Medulloblastomen beschrieben wurde aussortiert. Aus den übrigen Genen wurden solche ausgewählt, die anhand ihrer bereits bekannten oder vermuteten Funktionen bzw. basierend auf ihrer Interaktion mit bestimmten Signalwegen (siehe Abschnitt 1.1.4 und 1.2.3) eine Rolle bei der Entwicklung und evtl. der Pathogenese der Körnerzellen des Kleinhirns spielen könnten.

Die Expression der ausgewählten Gene im Kleinhirn sollte anschließend noch einmal über PCR und in-situ-Hybridisierung bestätigt werden. Zum Vergleich wurde auch die Expression dieser Gene im Gesamthirn analysiert. Bei allen selektierten Genen konnte eine Expression in Kleinhirn über semi-quantitative PCR nachgewiesen werden (Abb. 14).

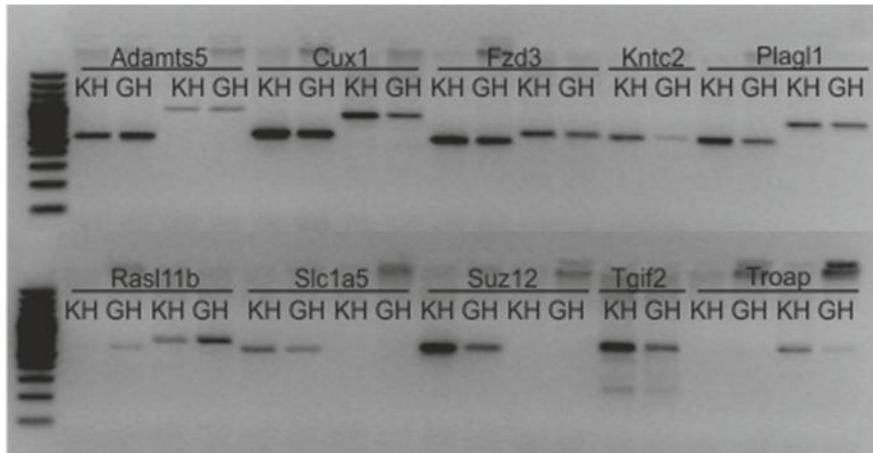


Abb. 14: Semiquantitative PCR für ausgewählte Gene in Kleinhirn (KH) und Gesamthirn (GH) von P8 Tieren. Mit Ausnahme von Kntc2 und Tgif2 wurden jeweils zwei Primerpaare pro Gen verwendet.

Die zelluläre Lokalisation der ausgewählten Gene im Kleinhirn wurde anschließend mittels in-situ-Hybridisierung untersucht. Hierbei wurde die Expression der Gene an Gewebeschnitten von Mäusen des achten Postnatalaltages (P8) sowie an Schnitten des adulten Maushirns analysiert.

Die zehn ausgewählten Gene sowie deren mittels PCR und in-situ-Hybridisierung ermittelten Expression in Kleinhirn sind zusammenfassend in Tab. 20 dargestellt.

Tab. 20: Zur Verifizierung der Microarray Analyse ausgewählte Gene. Alle ausgewählten Gene wurden über PCR im Kleinhirn von Tieren des Postnatalaltages 8 detektiert (siehe Abb. 14). Die in-situ-Hybridisierung zeigte jedoch unterschiedliche Expressionsmuster dieser Gene in der Kleinhirnrinde (siehe Abb. 15 und 16). EGL=äußere Körnerzellschicht, IGL= innere Körnerzellschicht, ML= Molekularschicht, PL= Purkinjzellschicht, nd= nicht detektierbar

Gen	RT-PCR P8 Kleinhirn	In-situ-Hybridisierung P8 Kleinhirn
Adamts5	√	ML
Cux1	√	EGL, IGL
Fzd3	√	EGL, IGL
Kntc2	√	EGL
Plagl1	√	EGL, PL
Rasl11b	√	PL
Slc1a5	√	EGL
Suz12	√	nd
Tgif2	√	EGL
Troap	√	EGL

Zwei Gene, Adamts5 und Rasl11b, zeigten eine Lokalisation, die nicht der Erwartung entsprach (Abb. 15). Adamts5 wurde in Zellen der Molekularschicht detektiert. Ein Signal für Rasl11b hingegen konnte ausschließlich in den Purkinjzellen des Kleinhirns nachgewiesen werden. Die Expression von Suz12 konnte im Kleinhirn mithilfe der in-situ-Hybridisierung zu keinem der beiden untersuchten Zeitpunkte nachgewiesen werden.

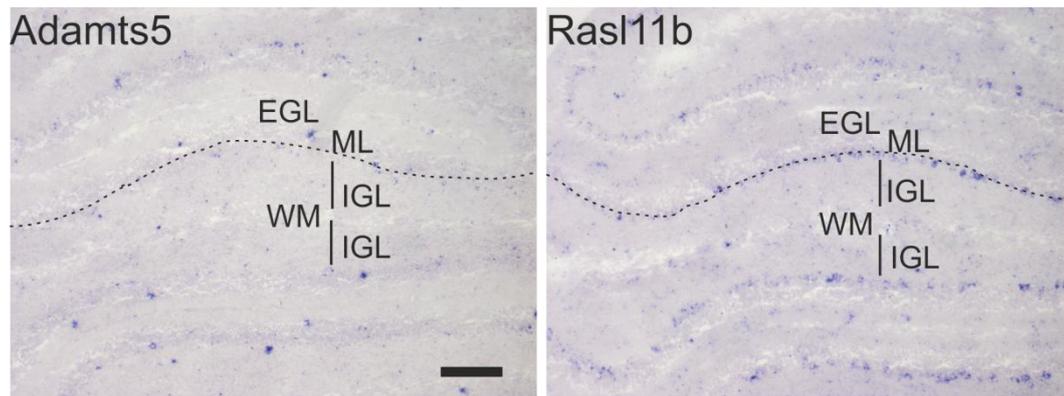


Abb. 15: Zwei der aus den Math1 Microarray Daten ausgewählten Gene zeigen keine Expression in Körnerzellen. Ein Signal für Adamts5 ist in Zellen der Molekularschicht zu finden, Rasl11b hingegen wird in Purkinjezellen exprimiert. Die gezeigten Ausschnitte liegen im Bereich des Lobulus IV/V. Größenbalken in Adamts5 =500 µm. Die gestrichelte Linie markiert den Verlauf der Purkinjezellschicht.

Bei sieben der zehn Gene konnte die aufgrund der Microarray Auswertung vermutete Expression bestätigt werden, sie alle zeigten an P8 ein Expressionssignal in den Körnerzellvorläufern des Kleinhirns (Abb. 16). Bei vier dieser Gene (Kntc2, Slc1a5, Tgif2 und Troap) wurde an P8 ausschließlich eine Expression in Körnerzellvorläufern detektiert. Die Gene Cux1 und Fzd3 zeigten zusätzlich ein Signal in Zellen der inneren Körnerzellschicht. In beiden Fällen war jedoch das Expressionssignal in den Körnerzellvorläufern der äußeren Körnerzellschicht stärker als in den reifen Körnerzellen Zellen der inneren Körnerzellschicht.

In Hirnschnitten adulter Tiere fand sich für keines der untersuchten Gene ein Expressionssignal.

Aus den sieben Genen, deren Expression in Körnerzellvorläufern über in-situ-Hybridisierung bestätigt worden war, wurden wiederum die Gene Cux1, Fzd3, Plagl1 und Tgif2 zur weiteren Analyse ausgewählt. Die Selektion dieser vier Gene

basierte zum einen darauf, dass sie wiederholt mit der Regulation von Entwicklungsprozessen (Nepveu, 2001; Powers et al., 2010a; Spengler et al., 1997; Wang et al., 2002) oder Erkrankungen (Bilanges et al., 1999; Hamid and Brandt, 2009a; Imoto et al., 2000; Michl et al., 2005) in verschiedenen Geweben assoziiert worden waren. Ihre Rolle bei der Histogenese und/oder Tumorgenese des Kleinhirns war zum Zeitpunkt der Auswahl noch nicht bekannt. Ein weiterer Grund für die Auswahl der genannten Gene stellte deren Einbindung in Signalwege dar, die eine wichtige Rolle, sowohl bei der normalen Entwicklung der Körnerzellen des Kleinhirns, als auch in die Entstehung von Medulloblastomen spielen (Abb. 17).

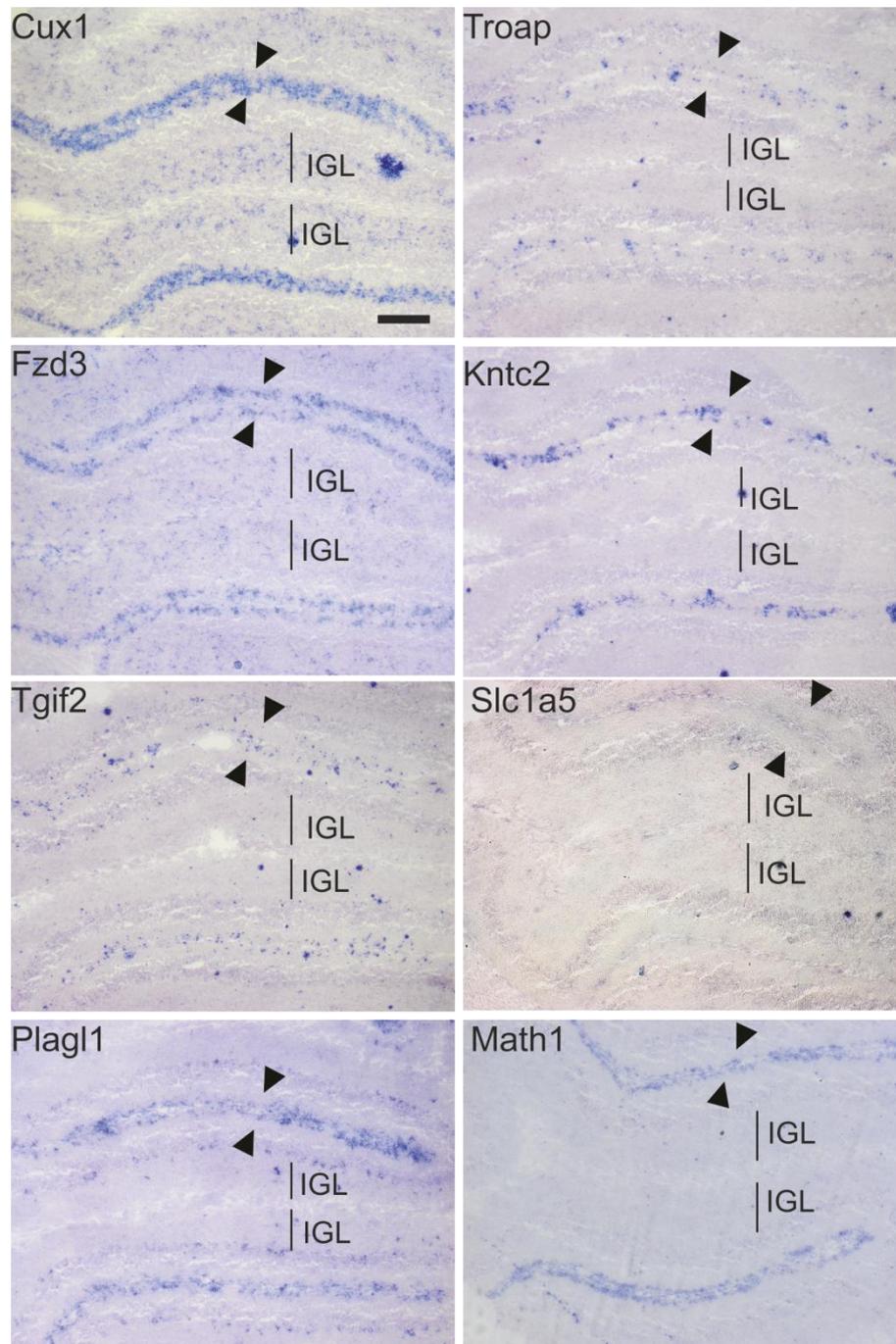


Abb. 16: Ausgewählte Gene mit Expression in der EGL. In-situ-Hybridisierung der über die Math1 Microarray Analyse identifizierten Gene, die am Postnataltag 8 vorwiegend oder ausschließlich in der äußeren Körnerzellschicht exprimiert werden. Die Math1 in-situ-Hybridisierung, in der ausschließlich die Körnerzellvorläufer angefärbt werden dient zum Vergleich. Ausschnitt aus dem Bereich von Lobulus IV/V. Größenbalken in Cux1 = 500 μ m. Pfeilspitzen deuten auf die EGL.

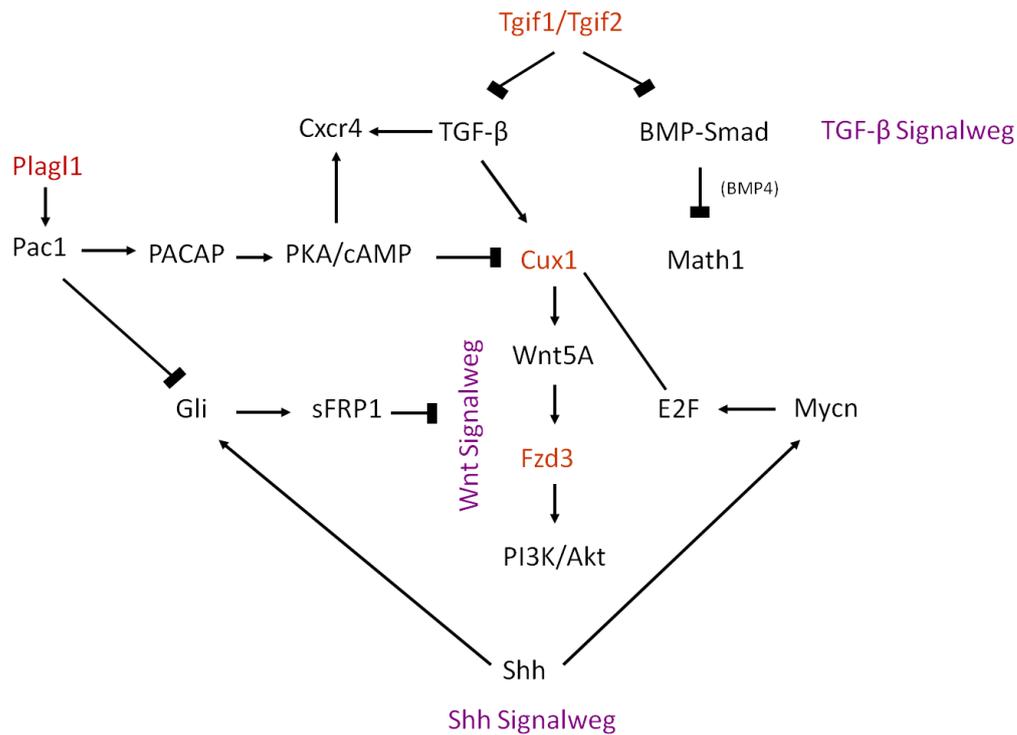


Abb. 17: Einbindung der ausgewählten Gene in wichtige Signalwege der Körnerzellentwicklung.

Als Basis zur Erstellung dieses Schemas dienten Arbeiten von Grimmer and Weiss, 2008; Kawasaki et al., 2007; Michl et al., 2005; Oliver et al., 2003; Ripka et al., 2007a; Rodríguez-Henche et al., 2002; Spagnoli and Brivanlou, 2008; Truscott et al., 2008 & Wotton and Massagué, 2001.

Zusätzlich wurde auch der Transkriptionsfaktor Tgif1 in die Auswahl mit einbezogen, da dieser in enger Verwandtschaft mit Tgif2 steht und eine funktionelle Redundanz dieser beiden Gene vermutet wird (Powers et al., 2010a). Tgif1 ist nicht in den 154 aus der Microarray Analyse selektierten Genen enthalten, da es nur über den Gcrma Algorithmus als in Körnerzellvorläufern differentiell exprimiert identifiziert wurde. Eine in-situ-Hybridisierung zeigte, dass wie Tgif2 auch Tgif1 an P8 ausschließlich in Zellen der äußeren Körnerzellschicht exprimiert wird (siehe Abb. 25). Die in der Microarray Auswertung ermittelten Regulations- und Expres-

sionswerte der für die weiteren Analysen ausgewählten Gene sind nochmals in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tab. 21: Regulations- und Expressionswerte der zur weiteren Analyse aus den Microarray Daten ausgewählten Gene.

Gensymbol	Sonde	GenBank ID	Regulationswert (M)	Expressionswert (A)	Algorithmus
Cux1	1424667_a_at	BC014289	1.28059	7.69444	Mas5
Cux1	1424668_a_at	BC014289	2.09605	0.69354	Mas5
Cux1	1424667_a_at	BC014289	2.81018	6.34708	Gcrma
Cux1	1424668_a_at	BC014289	2.22731	6.02898	Gcrma
Fzd3	1420087_at	AU020229	1.55795	0.37465	Mas5
Fzd3	1421157_at	AU043193	1.03024	4.82463	Gcrma
Plagl1	1450533_a_at	NM_009538	1.42793	6.07092	Mas5
Plagl1	1450533_a_at	NM_009538	1.43686	5.65233	Gcrma
Tgif1	1422286_a_at	NM_009372	1.03516	8.21613	Gcrma
Tgif2	1431115_at	AK017884	1.35439	7.47551	Mas5
Tgif2	1431115_at	AK017884	1.11689	7.34131	Gcrma

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Untersuchungen zur Funktion dieser fünf Gene in der Ontogenese und Pathogenese des Kleinhirns dargestellt.

3.2 Der Transkriptionsfaktor Cux1 in der Kleinhirnentwicklung und in der Pathogenese von Medulloblastomen

Der Transkriptionsfaktor Cux1 ist an der Regulation von Zellproliferation, Motilität und Differenzierung in peripheren Geweben, sowie an Prozessen neuronaler Reifung beteiligt (Alcalay and Vanden Heuvel, 2009; Cubelos et al., 2010; Kedinger and Nepveu, 2010; Xu et al., 2010). Die Expression von Cux1 wird über den TGF- β Signalweg reguliert, Cux1 wiederum beeinflusst die Expression von Mitgliedern des Wnt Signalweges (Jackson et al., 1999; Kedinger et al., 2009; Michl et al., 2005; Ripka et al., 2007b). Cux1 interagiert mit E2F Transkriptionsfaktoren, die auch Shh-induzierte Genexpression vermitteln (Truscott et al., 2008). Als DNA-bindende Untereinheit des HIN1-D Komplexes reguliert Cux1 die Expression Zellzyklus-abhängig regulierter Gene (van Wijnen et al., 1996). Die Microarray Daten zeigten für Cux1 am Postnataltag 8 eine in Körnerzellvorläufern um 2,4-8-fach höhere Expression an, als in reifen Körnerzellen.

3.2.1 Expression von Cux1 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung

Die Cux1 mRNA konnte während der postnatalen Kleinhirnentwicklung innerhalb der gesamten EGL (innere und äußere EGL) ab dem Postnataltag 0 (P0) detektiert werden. Am Postnataltag 3 zeigte sich ein starkes Signal in der EGL (Abb. 18A). An P8 fand sich auch eine Expression in der inneren Körnerzellschicht (IGL). Die Färbung in der IGL war jedoch eher schwach und auf eine unregelmäßig verteilte Gruppe an Körnerzellen beschränkt (Abb. 18B). An P15 war die Färbung in der EGL intensiver als in früheren Stadien. Weiterhin war an diesem Stadium auch die Dichte an Cux1-positiven Zellen höher als an P8 (Abb. 18C). An P21 nahm die Intensität der Färbung in der IGL ab und im adulten Kleinhirn konnten keine Cux1-positiven Zellen mehr detektiert werden (Abb. 18D, adult nicht gezeigt). Zum Entwicklungszeitpunkt P15 und P21 war die Färbung in der IGL in posterioren

Lobuli vergleichsweise stärker als in den restlichen Lobuli. Das mag damit zusammenhängen, dass die Körnerzellen in den posterioren Lobuli eine im Vergleich zu den anterioren und zentralen Lobuli verzögerte Entwicklung zeigen (Schaller and Caldwell, 2000).

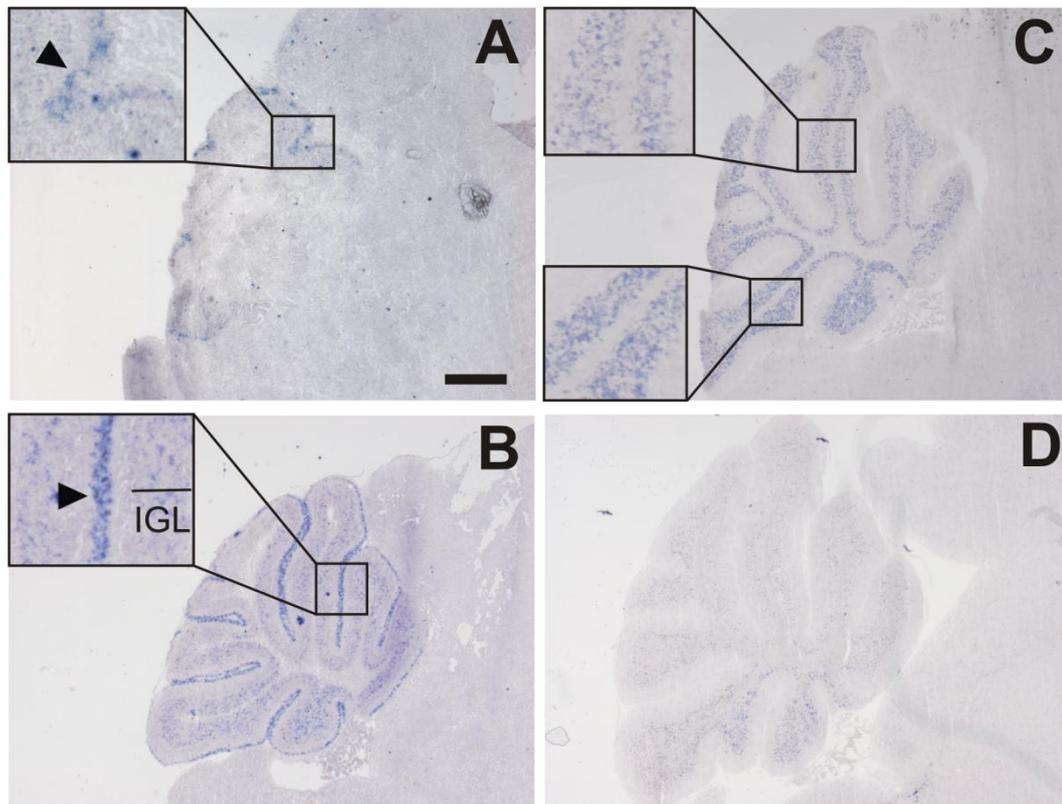


Abb. 18: Expression von Cux1 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung. In-situ-Hybridisierung. (A) An P3 kann die mRNA von Cux1 in der äußeren Körnerzellschicht (EGL) detektiert werden. (B) An P8 wird Cux1 in der äußeren Körnerzellschicht stark und in vereinzelten Zellen der inneren Körnerzellschicht (IGL) schwach exprimiert. (C, D) Von P15 bis P21 kann das Cux1 Transkript mit abnehmender Intensität in der IGL detektiert werden. Die markierten Ausschnitte wurden nochmals um den Faktor 10 nachvergrößert. Die Pfeile in den Einsätzen zeigen auf die EGL. Skalierungsbalken in A = 500 μ m für A-D.

3.2.2 Expression von Cux1 in Medulloblastomen

3.2.2.1 *Cux1 Expression in Medulloblastomen von Mäusen mit konstitutiv aktivem Shh Signalweg*

Da Cux1 transient in Körnerzellvorläufern des Kleinhirns exprimiert wird und diese Zellen auch potentielle Vorläufer von Medulloblastomen sind, lautete die nächste Frage, ob und wie Cux1 auch in diesen Tumoren exprimiert wird. Dazu wurde zunächst ein Mausmodell für menschliche Medulloblastome untersucht. Zur Analyse wurden drei Mauslinien verwendet, in denen der Smoothened Rezeptor in Körnerzellvorläufern konstitutiv aktiviert ist. In diesen Tieren kommt es regelmäßig zur Entstehung von Medulloblastomen. Die drei Mauslinien unterscheiden sich darin, wann und wo eine konstitutive Aktivierung des Smoothened Rezeptors während ihrer Entwicklung stattfindet. In GFAP-cre:SmoM2 Mäusen wird der Shh Signalweg in multipotenten Vorläufern, die unter anderem zu Körnerzellen differenzieren können, aktiviert. In Math1-cre:SmoM2 und Tlx3-cre:SmoM2 Mäusen erfolgt die Aktivierung des Shh Signalweges in unipotenten Körnerzellvorläufern. Math1 exprimierende Körnerzellvorläufer finden sich in der gesamten EGL, während Tlx3 von einer Subgruppe von Körnerzellvorläufern der Lobuli VI-IX exprimiert wird. Sie bilden jedoch alle Medulloblastome aufgrund eines dauerhaft aktivierten Sonic Hedgehog (Shh) Signalweges. Der zeitliche Rahmen in dem diese Mäuse Medulloblastome ausbilden unterscheidet sich abhängig davon, wann und wo die Aktivierung des Shh Signalweges stattfindet. Zur Analyse wurde daher RNA aus einer sechs Tage alten GFAP-cre:SmoM2 Maus, einer 23 Tage alten Math1-cre:SmoM2 Maus und einer 49 Tage alten Tlx3-cre:SmoM2 Maus verwendet.

Im Tumorgewebe all dieser Mauslinien fand sich mittels Real-Time PCR Analyse eine mehr als zehnfach höhere Cux1 Expression als im Kleinhirn von P8 Tieren (Abb. 19). Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass im

adulten Kleinhirn die Menge an Cux1 mRNA deutlich geringer ist als in acht Tage alten Tieren. Dieser Befund bestätigt die mittels in-situ-Hybridisierung gemachten Beobachtungen (siehe Abschnitt 3.2.1, Abb. 18)

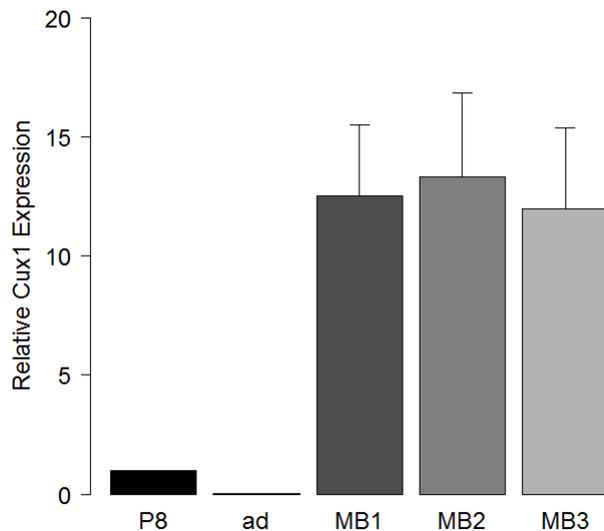


Abb. 19: Quantifizierung der Cux1 mRNA in Kleinhirnen von wildtyp Tieren der Stadien P8 und adult (ad) und in Medulloblastom- / Kleinhirngewebe dieser verschiedenen Mauslinien, die aufgrund einer konstitutiven Aktivierung von Smo Medulloblastome entwickeln (MB1: GFAP-cre:SmoM2; MB2: Math1-cre:SmoM2; MB3: Tlx3-cre:SmoM2). Real-Time PCR. Die Cux1 mRNA Level an P8 wurden als Referenz genommen und gleich 1 gesetzt. Die Cux1 Expression nimmt in der normalen Kleinhirnentwicklung ab, ist in den Tumoren jedoch stark erhöht. n=3, Fehlerbalken = SEM. Der Fehlerbalken der adulten Probe ist sehr klein und daher nicht sichtbar.

Mittels in-situ-Hybridisierung an Gewebeschnitten von Kleinhirnen der Math1-cre:SmoM2 Mäuse wurde anschließend gezeigt, dass Cux1 tatsächlich im Tumorgewebe und nicht im verbleibenden normalen Gewebe dieser Mäuse exprimiert wird (Abb. 20).

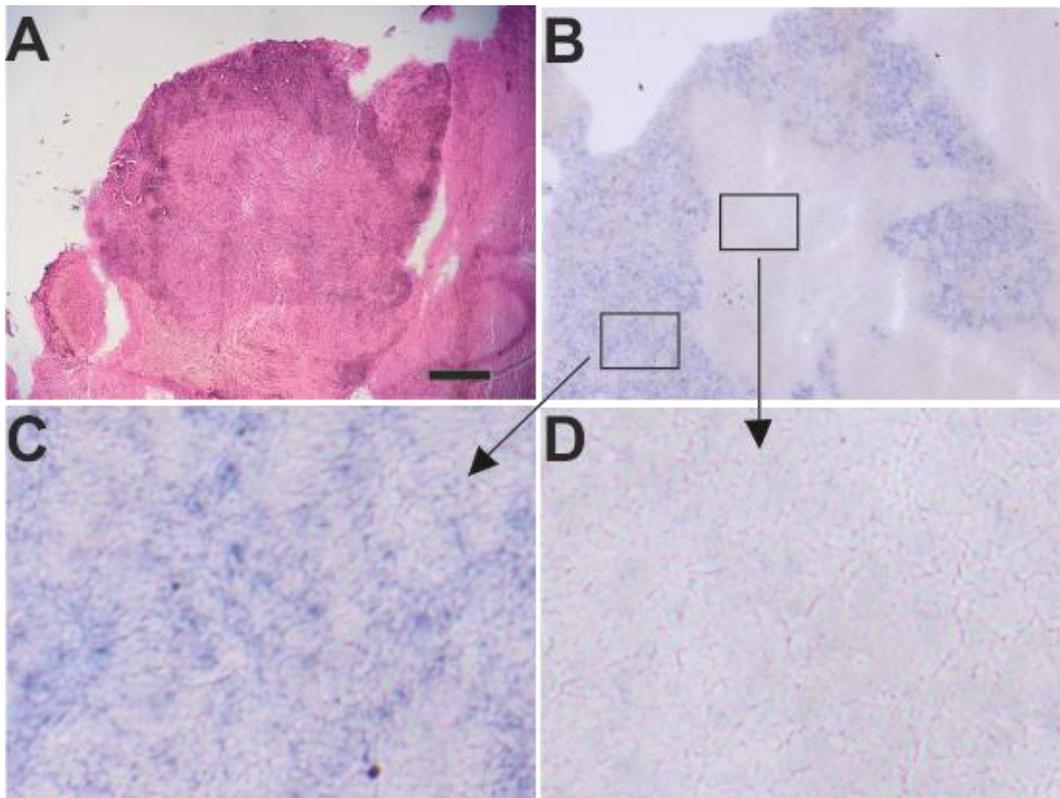


Abb. 20: Cux1 Expression im Kleinhirn einer Math1-cre:SmoM2 Maus, die ein Medulloblastom entwickelt hatte. (A) H&E Färbung. (B-D) In-situ-Hybridisierung. Das Tumorgewebe zeigt eine starke Cux1 Färbung. (C) Vergrößerung einer Region aus dem Tumorgewebe. (D) Vergrößerung einer Region im verbleibenden Normalgewebe. Skalierungsbalken in A = 500 μ m für A , 250 μ m für B und 33 μ m für C, D.

3.2.2.2 Expression von Cux1 in menschlichen Medulloblastomen

Menschliche Medulloblastome können nach morphologischen und molekularen Kriterien klassifiziert werden (siehe Einleitung, Abschnitt 1.2.2). Nach aktuellem Konsensus (Taylor et al., 2011) werden nach molekularen Kriterien vier Subgruppen unterschieden, die als Wnt, Shh, Gruppe 3 und Gruppe 4 bezeichnet werden. Die oben analysierten Mäuse gelten als Tiermodell für die Shh Gruppe. Daher stellte sich die Frage, ob die Hochregulation von Cux1, welche in dem spezifi-

schen SmoM2 Mausmodell beobachtet worden war auch in den humanen Tumoren nachzuweisen sein würde und ob hier gruppenspezifische Unterschiede zu beobachten sind. Um dieser Frage nachzugehen wurde zunächst die Expression von Cux1 in den nach Subgruppen unterteilten Expressionsdaten von 62 humanen Medulloblastoma Gewebeproben, welche von Kool et al., 2008 beschrieben worden waren, analysiert. Basierend auf der Expression der Sondengruppe für Exon 22, die spezifisch Cux1 erkennt und es erlaubt den Cux1 Transkriptionsfaktor von dessen alternativem Spleißprodukt CASP zu unterscheiden, zeigte sich eine Expression von Cux1 in allen Subgruppen. Interessanterweise war die mittlere Cux1 Expression in Gruppe 4 Medulloblastomen am höchsten; diese Gruppe zeigte auch die stärkste Streuung (Abb. 21A). Die Expressionspiegel in der Shh Subgruppe waren im Gegensatz dazu eher niedrig.

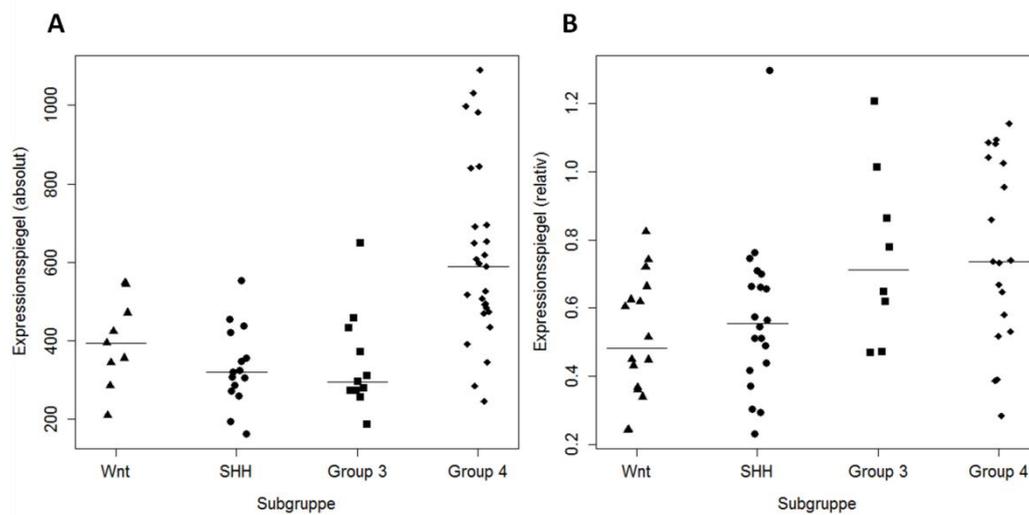


Abb. 21: Expression von Cux1 in Gewebeproben menschlicher Medulloblastome. (A) Expressionslevel von Cux1 aus den ursprünglich von Kool et al. beschriebenen Daten (verfügbar über die NCBI GEO Datensätze (GSE10327, ID:200010327)). (B) Expressionslevel von Cux1 aus den ursprünglich von Remke et al. beschriebenen Daten (NCBI GEO Datensätze: GSE28245, ID: 200028245). Die Gruppierung der Daten erfolgte nach dem aktuellen Konsens der zu verwendenen Nomenklatur (Taylor et al., 2011).

Ein Problem bei der Analyse der Cux1 Expression mittels des von Kool et al. beschriebenen Datensatzes ist, dass darin keine Proben aus normalem (nicht-tumorösen) Kleinhirn enthalten sind. Sie erlauben also nicht, die Expression von Cux1 in Medulloblastomen mit der in normalem Kleinhirn zu vergleichen. Um hier Abhilfe zu schaffen, wurden im Folgenden auch Daten analysiert, die ursprünglich von Remke et al. (2011) beschrieben wurden (Abb. 21B). Diese sind ebenfalls über die NCBI GEO Datensätze verfügbar (GSE28245). In diesen Datensätzen wurden die Expressionsspiegel der Medulloblastomproben relativ zu einem gemischten Satz von humanen fetalen Kleinhirnen standardisiert. Ähnlich wie die von Kool et al. publizierten Datensätze zeigen auch die von Remke et al. veröffentlichten Daten die höchste Expression von Cux1 in Tumoren der Subgruppe 4, sowie eine eher niedrige Expression in der Shh Subgruppe. Ein überraschendes Ergebnis der Analyse der von Remke et al. publizierten Datensätze war jedoch, dass die Expression von Cux1 in allen hier analysierten Tumoren niedriger war als im fetalen Kleinhirn. Dieses Ergebnis wird weiterhin durch die Reanalyse eines weiteren, ursprünglich von Pomeroy et al., (2002) veröffentlichten Datensatzes bekräftigt. Dieser Datensatz enthält vier Werte für normales Kleinhirn (unbestimmten Alters). In diesem sind die Expressionsspiegel für Cux1 („Cutl1“) um etwa die Hälfte niedriger als in den hier enthaltenen Medulloblastomproben (hier nicht gezeigt).

3.2.3 Cux1 Expression und Knockdown in humanen Medulloblastomzelllinien

Um die funktionelle Rolle von Cux1 in Medulloblastomen näher zu beleuchten wurden knockdown Experimente an den humanen Medulloblastomzelllinien D283Med und Daoy durchgeführt. In beiden Zelllinien, sowie einer weiteren zur Verfügung stehenden humanen Medulloblastomzelllinie (D341Med) wurde zuvor eine robuste Cux1 Expression über semiquantitative PCR festgestellt (Abb. 22).

Die D341Med Zelllinie wurde jedoch nicht weiter analysiert, da sie nicht adhärent wächst und sich daher nicht gut für die durchgeführten Assays eignet.

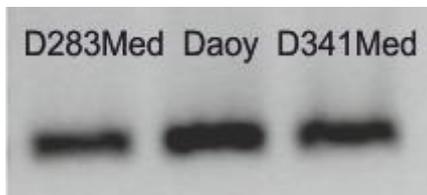


Abb. 22: Expression von Cux1 in Medulloblastom Zelllinien. Semiquantitative PCR.

3.2.3.1 siRNA vermittelte Reduktion von Cux1

Um die Expression von Cux1 in Medulloblastomen experimentell zu manipulieren, wurden zunächst Daoy Medulloblastomzellen mit siRNA gegen Cux1 transient transfiziert. Die daraus resultierenden Veränderungen der Cux1 mRNA Mengen wurden über quantitative Real-Time PCR analysiert (Abb. 23). Hierbei zeigte sich 24 Stunden nach der siRNA Transfektion eine Reduktion des Cux1 Transkripts von über 80%. Dieser Effekt war 48 Stunden nach der Transfektion etwas schwächer ausgeprägt.

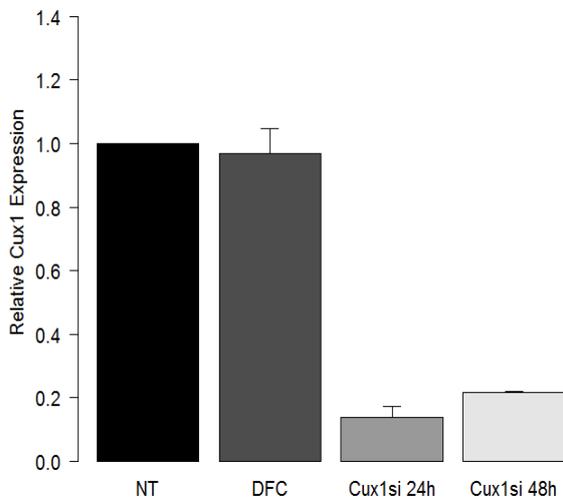


Abb. 23: Real-Time PCR Analyse der siRNA vermittelten Reduktion der Cux1 mRNA in Daoy Medulloblastom-Zelllinien. Die Reduktion der Cux1 Expression 24 Stunden nach der siRNA Transfektion liegt bei über 80%, nach 48 Stunden scheint sie etwas geringer ausgeprägt. Cux1 mRNA Spiegel in unbehandelten Zellen wurde als Referenz genutzt und gleich 1 gesetzt. Zur Normalisierung der mRNA Level wurde GAPDH verwendet. NT=unbehandelte Zellen, DFC=Dharmafect Kontrolle (d.h. nur mit dem Transfektionsreagenz behandelte Zellen). n=3, Fehlerbalken=SEM.

Um dann potentielle Effekte des Cux1 Knockdowns auf die Medulloblastomzellen zu untersuchen, wurden die Zellen über Echtzeit Impedanzmessung untersucht (Abb. 24). Hierfür wurden die Zellen auf spezielle Kulturplatten ausgesät, die es erlauben, in Echtzeit die Impedanz der Zellen zu messen. Dieser Parameter gilt als Maß für die Vitalität der Zellen (Limame et al., 2012; Vistejnova et al., 2009) und ist sowohl von der Zellzahl, als auch der Größe der Zellen abhängig. Die Zellen wurden hierzu in speziellen Kulturplatten ausgesät und deren Wachstumsverhalten über 21 Stunden verfolgt bevor eine Transfektion mit siRNA gegen Cux1 erfolgte. Untersucht wurden unbehandelte Zellen, Zellen die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden und mit Cux1 siRNA transfizierte Zellen. Bei den unbehandelten Zellen zeigte sich, dass allein das Herausnehmen der Zellen aus

dem Brutschrank und der erfolgte Mediumwechsel einen Einfluss auf die Wachstumskurve ausübten. Es kam hierbei zu einer Stagnation im Anstieg der Impedanzkurve für einen Zeitraum von etwa zwanzig Stunden bevor diese wieder einen linearen Anstieg zeigte. Das Transfektionsreagenz selbst schien sich unterschiedlich auf die beiden Zelltypen auszuwirken. In D283Med Zellen kam es zunächst zu einem stärkeren Anstieg der Impedanzkurve und schließlich wieder zu einem Abfall der Kurve. In Daoy Zellen zeigte sich bei der Behandlung mit dem Transfektionsreagenz prinzipiell ein ähnlicher Gesamteffekt wie bei den untransfizierten Zellen, der genaue Kurvenverlauf war jedoch unterschiedlich. Die Behandlung mit siRNA gegen Cux1 hatte in beiden untersuchten Medulloblastomzelllinien einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Vitalität der Zellen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. In beiden Zelllinien kommt es für etwa zwanzig Stunden nach der Transfektion zu einer Abnahme der Impedanz, was auf eine zytotoxische Wirkung der siRNA (einen Effekt der Cux1 Reduktion- Effekt setzt hierfür allerdings zu schnell und zu stark ein) schließen lässt. In D283Med Zellen verläuft die Impedanzkurve anschließend über die letzten dreißig Stunden weitgehend flach. In Daoy Zellen hingegen steigt die Impedanz etwa vierzig Stunden nach der Transfektion wieder an.

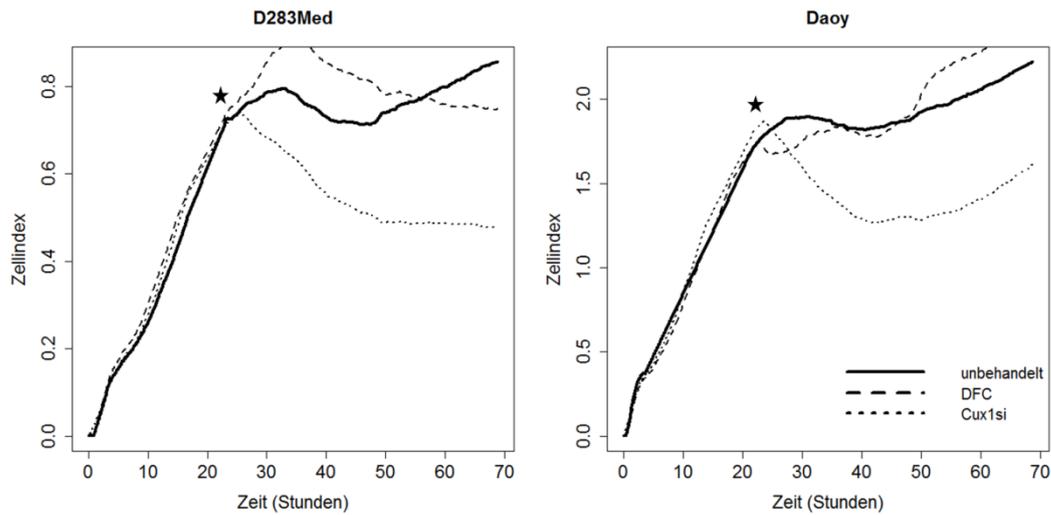


Abb. 24: Impedanz-basierte Echtzeit Beobachtung von Medulloblastom Zelllinien vor und nach siRNA Transfektion. D283Med und Daoy Zellen wurden jeweils a 5000 Zellen pro Well ausgesät. Die Transfektion mit siRNA gegen Cux1 (Cux1si) bzw. dem Transfektionsreagenz alleine (Dharmafect 4 = DFC) erfolgte nach etwa 21 Stunden (Stern).

3.2.3.2 shRNA-vermittelte Cux1 Reduktion

Um diese Beobachtung weiterzuverfolgen wurde ein shRNA Vektor für Cux1 generiert (pU6m4_Cux1sh; im Folgenden kurz Cux1sh genannt) und stabil in D283Med und Daoy Medulloblastom-Zelllinien transfiziert (Abb. 25).

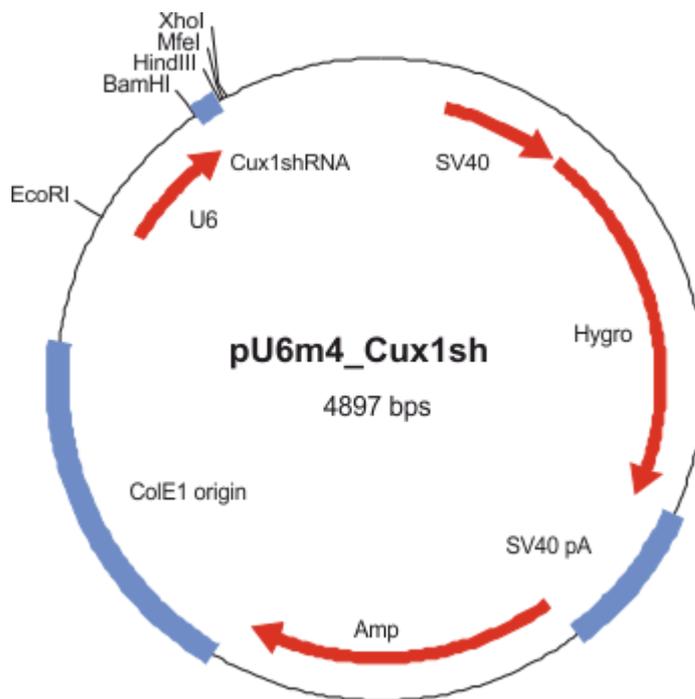


Abb. 25: shRNA Vektor pU6m4_Cux1sh zur stabilen Suppression der Expression von Cux1 in Medulloblastomzelllinien.

Die mit diesem Vektor stabil transfizierten Zelllinien enthielten deutlich weniger Cux1 mRNA als die Ausgangszelllinien und Kontrollen, die allein mit dem Vektor ohne die Cux1 shRNA Sequenz transfiziert worden waren (Abb. 26).

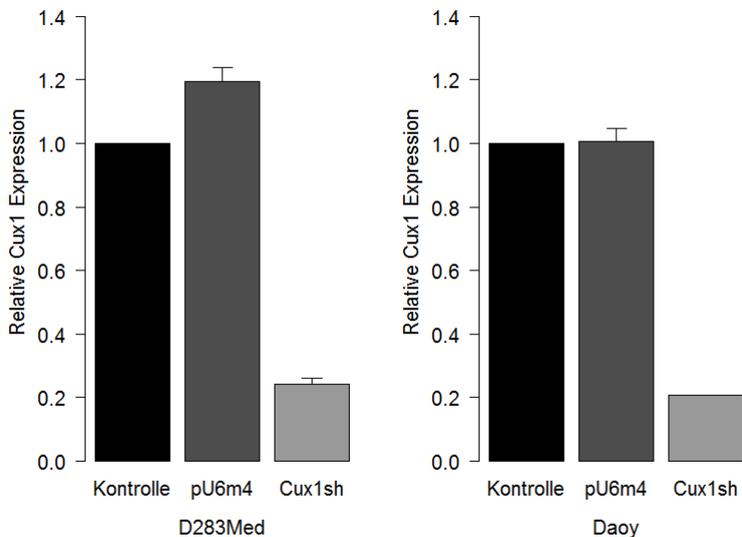


Abb. 26: Antisense- vermittelter knockdown führt zu effizienter Reduktion von Cux1 mRNA Leveln. Die Real Time PCR Analyse zeigt eine Reduktion des Cux1 Transkripts um circa 80% in D283Med und Daoy Zelllinien, die stabil mit dem pU6m4_Cux1shRNA Vektor transfiziert wurden. Die Transfektion mit dem Leervektor vermindert die Cux1 Expression nicht. n=3, Fehlerbalken =SEM.

Die Reduktion von Cux1 konnte auch auf der Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 27). Hier zeigte sich auch, dass untransfizierte D283Med und Daoy Zellen unterschiedliche Cux1 Isoformen exprimieren. In Daoy Zellen wird die Isoform p75 relativ stark exprimiert; die Banden der p110 und p200 Isoformen sind weniger stark und die p150 Isoform ist kaum detektierbar. In D283Med Zellen sind die Isoformen p150 und p200 am stärksten exprimiert, die Isoformen p110 und p75 hingegen eher schwach. Die Behandlung der Zellen mit dem shRNA Vektor führt in Daoy Zellen zu einer Reduktion der p110 und p200 Banden. In D283Med Zellen sind hauptsächlich die Isoformen p200, p150 und p110 reduziert. Ein antisense

Effekt auf die p75er Isoform war nicht zu erwarten, da die genutzte shRNA Sequenz die alternativ gespleißte mRNA, die diese Isoform generiert nicht erkennt.

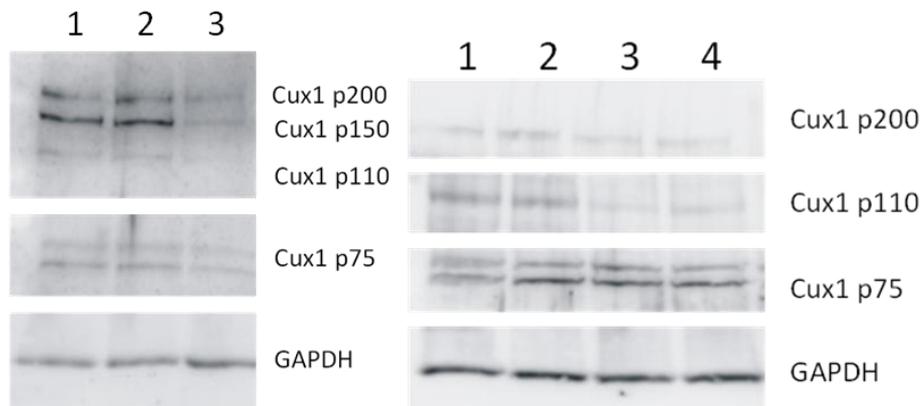


Abb. 27: Cux1 Proteingehalt in Medulloblastomzellen und dessen Manipulation durch spezifische antisense RNA gegen Cux1. (A) Expression von Cux1 Isoformen in D283Med Zellen. Die Cux1 Isoformen p200, p150 und p110 sind in Cux1 knockdown Zellen (3) stark reduziert im Vergleich zu untransfizierten D283Med Zellen (1) und mit dem Leervektor transfizierten Zellen (2) (B) Western Blot Analyse der Expression von ausgewählten Cux1 Isoformen in Daoy Zellen. Die größeren Isoformen p200 und p110 sind in zwei stabilen Cux1 knockdown Zelllinien (3 und 4) stark vermindert im Vergleich zu untransfizierten (1) und mit dem Leervektor stabil transfizierten (2) Zellen.

Um potentielle Effekte des Cux1 Knockdowns zu untersuchen wurde wieder das oben (siehe Abschnitt 3.2.3.1) beschriebene Impedanz-basierte Analysesystem genutzt (Abb. 28). Untransfizierte Zellen und mit dem Leervektor transfizierte Zellen wurden als Kontrollen verwendet. Es zeigten sich zwei wichtige Unterschiede zwischen den shRNA transfizierten Zelllinien und den Kontrollen. Erstens war, sowohl in D283Med als auch in Daoy Zellen, der Anstieg der Impedanz in den ersten Stunden nach dem Aussähen bei den knockdown Zellen stärker als in den Kontrollzellen, was für eine stärkere Anhaftung der shRNA transfizierten Zellen spricht. Der zweite Unterschied zeigte sich nach zwanzig bis dreißig Stunden.

In dieser späteren Phase zeigen die Cux1shRNA transfizierten Zellen eine geringere Wachstumsrate als die Kontrollzellen. Ein Nachteil der Impedanzmessung ist, dass diese, während sie die Beobachtung der Zellen in Echtzeit erlaubt, es jedoch nicht ermöglicht eindeutig zu unterscheiden, ob das veränderte Wachstumsverhalten der Zellen durch verminderte Proliferation, oder einen Verlust von Zellen aufgrund verstärkter Apoptose zustande kommt.

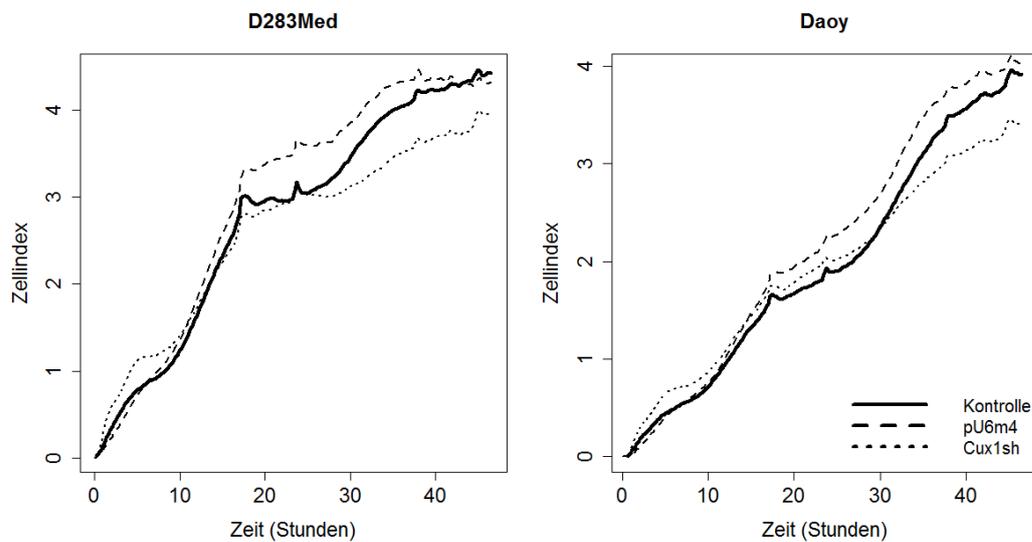


Abb. 28: Impedanz-basierte Analyse von Medulloblastomzelllinien nach stabilem knockdown von Cux1. Sowohl in D283Med als auch in Daoy Zellen führt die stabile Reduktion von Cux1 zu einem steileren Anstieg der Impedanz in den ersten 5-6 Stunden der Kultivierung. Im späteren Verlauf nimmt die Impedanz bei den Cux1 knockdown Zellen weniger stark zu als bei den unbehandelten Parentalzellen oder bei den Leervektor-Kontrollen.

3.2.3.3 Einfluss von Cux1 auf die Zellproliferation und Apoptose in Medulloblastomzellen

Um Effekte des Cux1 Knockdowns auf die Zellproliferation beziehungsweise den Zelltod weiter zu untersuchen wurde die Expression des Proliferationsmarkers

PCNA sowie die Expression von cleaved Caspase 3, einem Indikator für apoptotische Zellen, mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 29). Hierzu wurden subkonfluente Zellen geerntet, vereinzelt und in Suspension mit Antikörpern gegen PCNA bzw. Caspase 3 gefärbt. Für jede Bedingung wurde die Fluoreszenz von 2500-5000 Zellen mittels der Durchflusszytometrie quantifiziert. Die shRNA vermittelte Reduktion von Cux1 führte in den beiden untersuchten Medulloblastomzelllinien zu einer deutlichen Verminderung der PCNA Expression (Abb. 29 A, B). Wenn man die Zellen betrachtet, deren Fluoreszenzsignal über dem Hintergrundsignal liegt (definiert als das Fluoreszenzsignal, das gemessen wird, wenn der Erstantikörper weggelassen wird), zeigt sich eine Reduktion der PCNA-positiven Zellen in den Cux1sh Zelllinien in beiden untersuchten Medulloblastomzelllinien von über 40%. Die Transfektion mit dem Kontrollplasmid hatte hingegen kaum einen Effekt auf den Prozentsatz an PCNA-positiven Zellen. Dies deutet darauf hin, dass Cux1 einen wichtigen Faktor für die Aufrechterhaltung der Proliferationsaktivität von Medulloblastomzellen darstellt.

Die Expression von cleaved Caspase 3 wurde über den knockdown von Cux1 jedoch nicht beeinflusst (Abb. 29 C, D). Dies zeigte sich darin, dass keine Unterschiede im Fluoreszenzsignal zwischen Cux1sh Zelllinien und den Kontrollen (untransfizierte Zellen und Kontrollplasmid-transfizierte Zellen) zu beobachten waren. Das gemessene Caspase 3 Fluoreszenzsignal der unterschiedlichen Zellen lag im selben Bereich wie das der nur mit dem Zweitantikörper behandelten Zellen. Um sicherzustellen, dass der Caspase 3 Antikörper zuverlässig funktioniert wurden zusätzlich als Positivkontrolle mit Staurosporin behandelte Zellen gemessen.

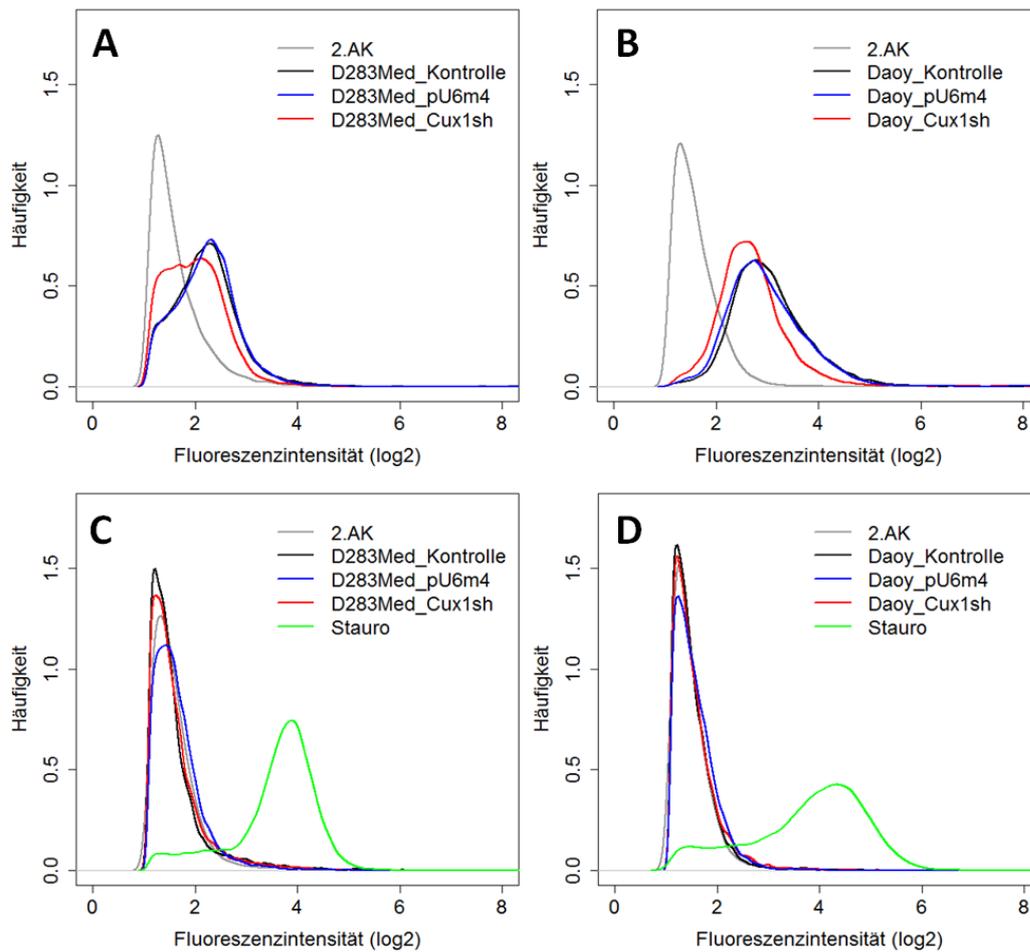


Abb. 29: Zellteilung und Apoptose nach Reduktion von Cux1 in Medulloblastomzelllinien. (A, B) Die Proliferationsaktivität der Zellen wurde über PCNA Färbung ermittelt. Stabile Transfektion mit Cux1shRNA, nicht jedoch mit dem Leervektor, führt zu einer deutlichen Reduktion der PCNA-assoziierten Fluoreszenzintensität, erkennbar an der Linksverschiebung der Häufigkeitsverteilung. (C, D) Antisense-vermittelte Herunterregulation von Cux1 führt nicht zu einer Änderung in der Anzahl Apoptotischer Zellen, die über die Expression des Apoptosemarkers Cleaved-Caspase3 mithilfe der Durchflusszytometrie ermittelt wurde. Zur Kontrolle wurden auch mit Staurosporin behandelte Zellen analysiert (Stauro). Die y-Achse gibt den Anteil der Zellen einer bestimmten Fluoreszenzintensität an. Da in einzelnen Experimenten unterschiedliche Zellzahlen (2500-5000 Zellen) analysiert wurden sind die Kurven normiert (d.h. die Flächen unter den Kurven sind jeweils gleich).

3.2.3.4 Einfluss von Cux1 auf die Motilität von Medulloblastomzellen

Da die mit der Impedanz-Messung beobachteten Effekte der Reduktion der Expression von Cux1 auch auf mögliche Änderungen der Zelladhäsivität hindeuteten, wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob eine Manipulation der Cux1 Expression auch die Motilität dieser Zellen beeinflusst.

Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Vektor zur stabilen Überexpression von Cux1 erstellt, indem die ersten 24 Exons des Cux1 Gens, die für den Transkriptionsfaktor Cux1 kodieren, in den pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen) kloniert wurden (Abb. 30).

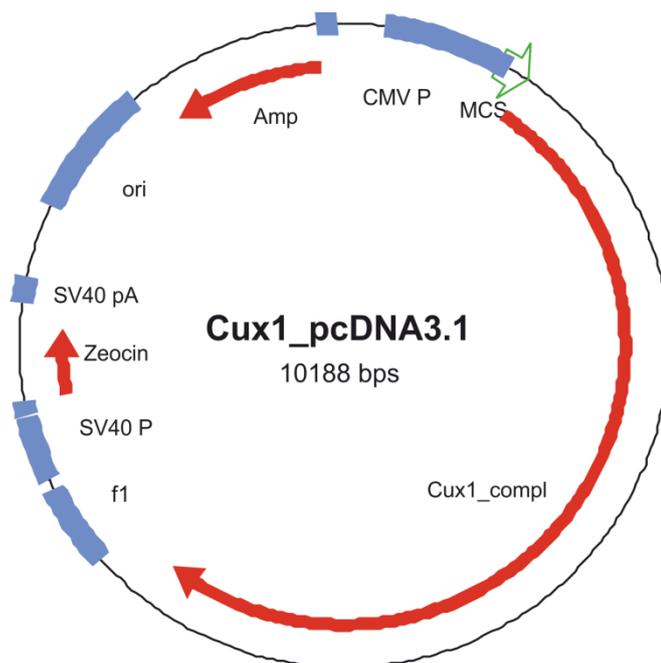


Abb. 30: Vektor Cux1_pcDNA3.1 zur stabilen Überexpression von Cux1.

Dieser Vektor wurde stabil in D283Med und Daoy Zelllinien transfiziert und jeweils mehrere Einzelzellklone generiert. Die Expression von Cux1 in den verschiedenen Einzelzellklonen wurde mittels Western Blotting überprüft (Abb. 31 A und B) und die Expressionsintensitäten mithilfe der ImageJ Software gegen β -Tubulin normalisiert und quantifiziert (Abb. 31 C und D).

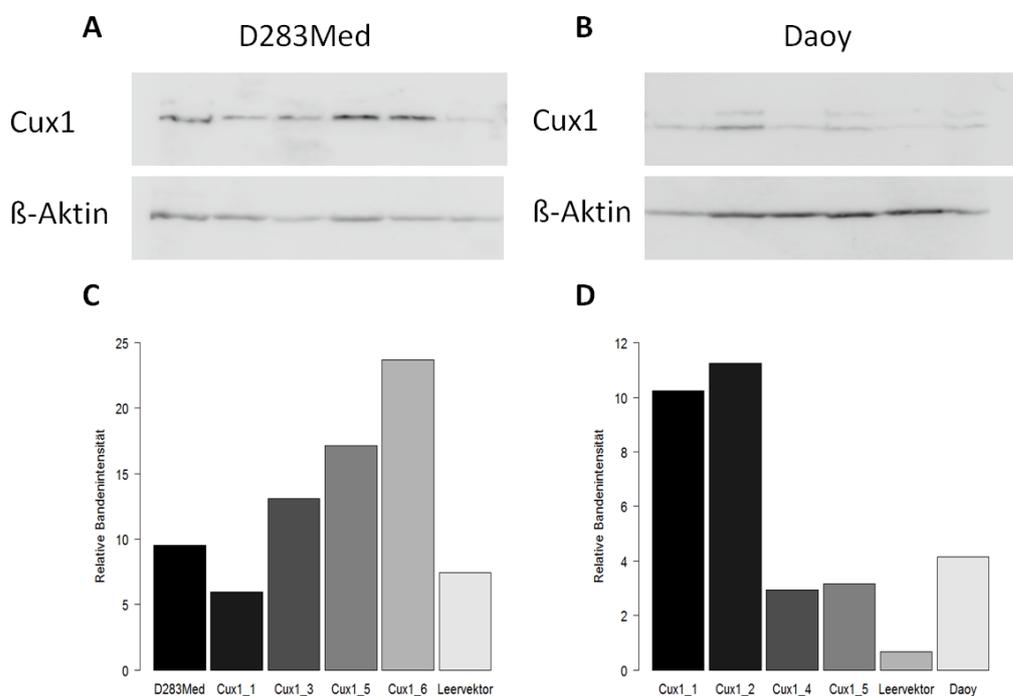


Abb. 31: Analyse und Quantifizierung der Cux1 Expression in Medulloblastomzelllinien und stabil transfizierten Einzelzellklonen. (A,B) Western Blot. (C,D) Quantifizierung der Intensität der Cux1 Western Blot Banden und Normalisierung gegen β -Aktin mittels ImageJ.

Mittels Time-Lapse Videomikroskopie wurde die Motilität von Klonen mit deutlich verstärkter Cux1 Expression mit der parentaler Zelllinien sowie stabil mit dem Leervektor transfizierten Zellen verglichen (Abb. 32). Für D283Med wurden die

Klone 5 und 6, für Daoy die Klone 1 und 2 verwendet. Die Kulturen wurden etwa 24 Stunden nach Aussaat mit dem Lebendfarbstoff Draq5 gefärbt und anschließend über einen Zeitraum von 22 Stunden alle 15 min fotografiert. Aus den daraus resultierenden Bildsequenzen wurde mittels des ImageJ Migration Plugins für jede Position die Pixelzunahme über die Zeit gemessen. Diese soll als Maß für die Wanderungsaktivität der Zellen dienen. Abb. 32 zeigt die Kurven der Pixelzunahme über die Zeit für parentale untransfizierte Zellen, eines Leervektor Kontrollklons und jeweils zweier Cux1 Überexpressionsklone.

Zur weiteren Analyse der Kurven wurde ein gemischt lineares Regressionsmodell verwendet. Gemischte Modelle (mixed models) erlauben sowohl die Modellierung fixierter Effekte, als auch zufälliger Effekte. Bei dem hier gewählten Modell wurden der Transfektionsstatus und die Zeit als fixe Effekte modelliert. Für jede Messposition wurden zudem ein zufälliger Schnittpunkt mit der y-Achse und eine zufällige Steigung, sowie unkorrelierte Zufallseffekte angenommen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Kurven der Cux1 Überexpressionsklone bei der D283Med Zelllinie signifikant von denen der Kontrollen unterscheiden. Bei den Überexpressionsklonen zeigte sich ein steilerer Anstieg der Kurven, was auf eine vermehrt gerichtete Migration der Zellen hinweist. Bei den Daoy Zellen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven der Kontrollgruppen und den Cux1 Überexpressionsklonen festgestellt werden.

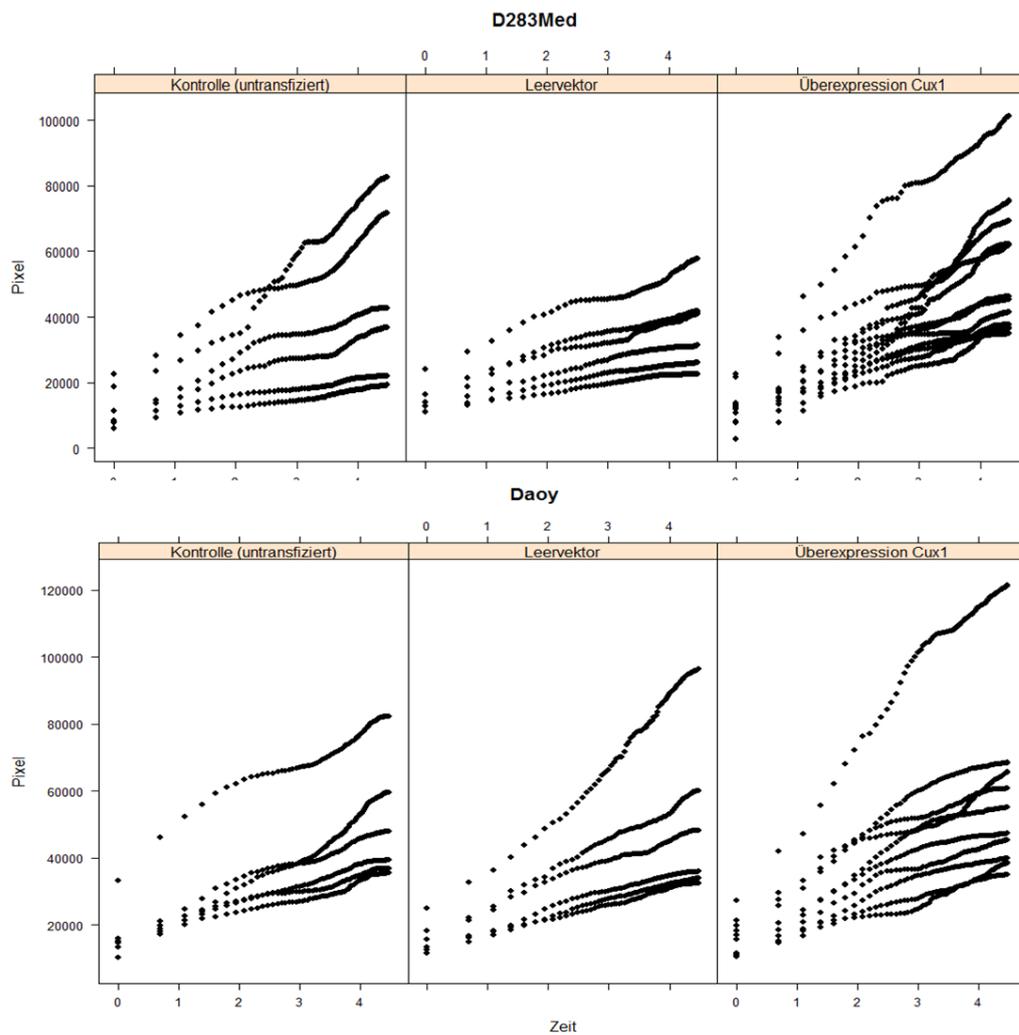


Abb. 32: Motilität von D283Med und Daoy Medulloblastomzelllinien nach Überexpression von Cux1. Als Maß für die Motilität der Zellen wurde die Pixelzunahme über die Zeit bestimmt. Die Zeitachse wurde logarithmisch transformiert.

Nach den an den Cux1 Überexpressionsklonen beobachteten Effekten von Cux1 auf die Motilität der Medulloblastomzellen sollte anschließend der Einfluss einer reduzierten Cux1 Expression auf die Wanderungsaktivität der D283Med und Daoy Medulloblastomzelllinien analysiert werden. Hierzu wurden neben den parental Zellen stabil mit dem Cux1sh Vektor bzw. dem pU6m4 Leervektor

transfizierte Mischkulturen verwendet. Die lebenden Kulturen wurden etwa 24 Stunden nach Aussaat auf mit Laminin beschichteten Zellkulturplatten über einen Zeitraum von 10 Stunden alle 10 min fotografiert. Aus den so gewonnenen Bildsequenzen wurden dann folgende Parameter bestimmt: Die Gesamtlänge der zurückgelegten Wegstrecke und die mittlere quadratische Teilchenverschiebung (Mean squared displacement, MSD). Sowohl für Kontrollzellen (nicht-transfizierte und Leervektor-transfizierte Zellen) als auch Cux1sh-transfizierte Zellen wurden jeweils drei Kulturen angelegt, und in jeder Kultur die Migration von 30 zufällig ausgewählten Zellen quantifiziert. Der Vergleich der Gesamtdistanz, die von den wandernden Zellen innerhalb von zehn Stunden zurückgelegt wurde zeigt, dass der Knockdown von Cux1, sowohl in D283Med als auch in Daoy Zellen, zu einer Verminderung der Motilität um circa 20% führt ($p < 0.001$; Abb. 33 A, B). Die Analyse der MSD über die Zeit bietet noch weitere Einsichten in die Art und Weise der Zellwanderung. Hierdurch kann überprüft werden, ob sich die Bewegung der Zellen als klassische Diffusion beschreiben lässt (also als Abfolge rein zufälliger und voneinander unabhängiger Schritte gesehen werden kann), oder ob sie einen supradiffusiven („zielgerichteten“) oder subdiffusiven („restringierten“) Charakter aufweist. Dies würde auf gerichtete, beziehungsweise beeinträchtigte Bewegung hinweisen. Wie in Abb. 33 D dargestellt lassen sich die MSD Kurven von Kontroll Daoy Zellen und von Cux1sh transfizierten Daoy Zellen nicht unterscheiden. Alle steigen im beobachteten Zeitraum linear an. Das heißt die Migration einzelner Daoy Zellen ist weder zielgerichtet noch restringiert. Dasselbe gilt für die untransfizierten und die Kontrollvektor transfizierten D283Med Zellen. Im Gegensatz dazu führt die Reduktion von Cux1 in D283Med Zellen zu einer sublinearen Zunahme des MSD, was auf eine subdiffusive oder restringierte Migration hinweist (Abb. 33 C).

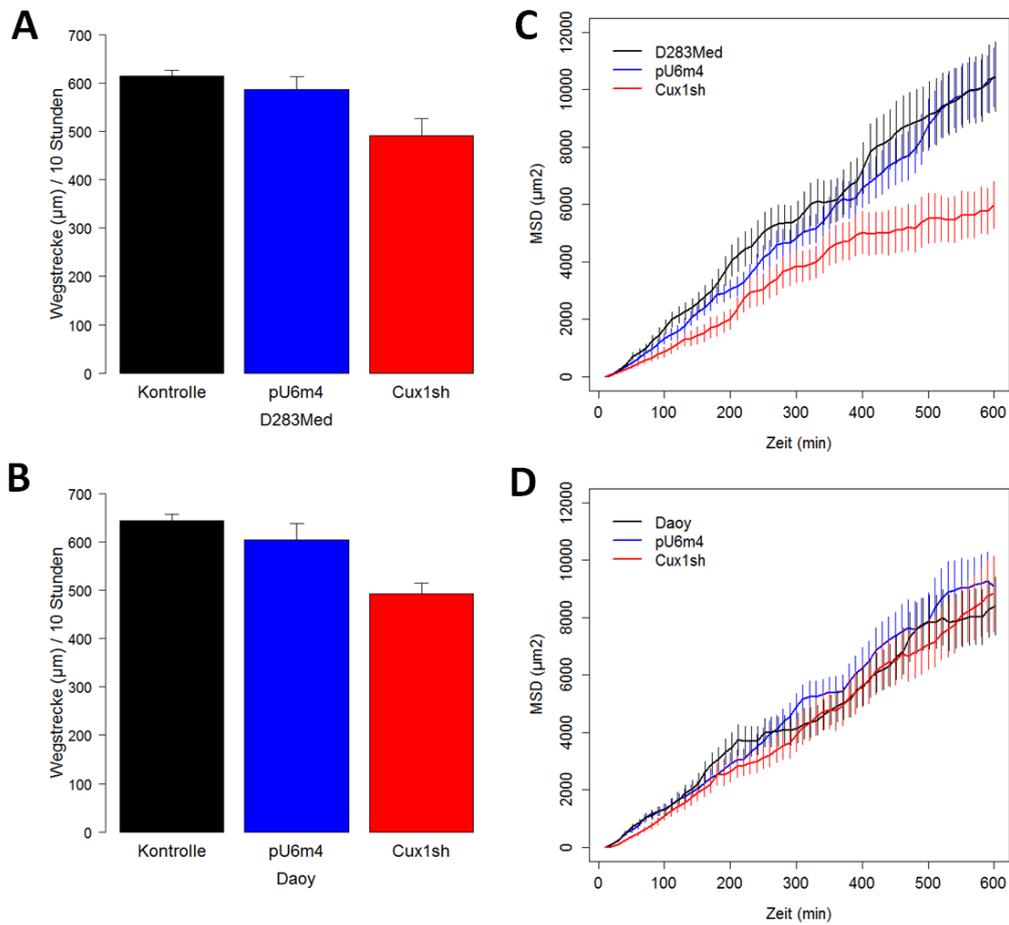


Abb. 33: Cux1 Reduktion und Migrationsverhalten von Medulloblastomzellen. (A, B) Reduktion von Cux1, jedoch nicht die Behandlung mit dem Leervektor, führt zu einer Verminderung der von D283Med und Daoy Zellen zurückgelegten Gesamtdistanz um ca. 20%. Bei beiden Zelllinien ist dies statistisch signifikant ($p < 0.001$ für antisense gegen unbehandelte Kontrollen und antisense gegen Leervektorkontrollen, $p > 0.25$ für unbehandelte Kontrollen gegen Leervektor-transfizierte Zellen. Anova mit nachfolgendem Tuckeys HSD) (C, D) MSD von nicht-transfizierten Kontrollen, Leervektor-transfizierten und Cux1shRNA transfizierten D283Med (A) und Daoy (B) Zellen. Mit Ausnahme der shRNA transfizierten D283Med Zellen ist die Steigung der MSD Kurven annähernd linear. $n = 90$ Zellen pro Behandlung. Fehlerbalken= SEM.

3.2.4 Identifikation von Genen, deren Expression in humanen Medulloblastomen mit der Expression von Cux1 korreliert

Um eine erste Vorstellung möglicher Ursachen der hier beobachteten Effekte von Cux1 auf Medulloblastomzellen zu erlangen, sollten Gene identifiziert werden, deren Expression in den humanen Medulloblastomproben der von Kool et al. und Remke et al. publizierten Datensätze mit der von Cux1 korrelieren.

Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Korrelationen bestimmt (Hoeffdingsche Unabhängigkeit und Distanzkorrelation), über die nicht nur einfache lineare Korrelationen, sondern auch verschiedenste nicht-lineare Arten der Korrelation ermittelt werden können. Mittels dieser beiden Methoden wurden in beiden Datensätzen zunächst jeweils die 200 Gene, deren Expression am stärksten mit Cux1 korreliert, ermittelt. Anschließend wurden die 200 am stärksten mit Cux1 korrelierten Gene aus dem von Kool et al. veröffentlichten Datensatz mit denen aus dem von Remke et al. publizierten Datensatz verglichen. Die Schnittmenge der mittels dieser Methode in beiden Datensätzen identifizierten Gene umfasste 16 (Distanz Korrelationstest) bzw. 11 (Hoeffdingscher Unabhängigkeitstest) Gene. Fasst man die Ergebnisse aus diesen beiden Tests zusammen fanden sich über diese Analyse 19 verschiedene Gene deren Expression in beiden Datensätzen stark mit der von Cux1 korreliert (Tab. 22). Betrachtet man die Art der Korrelation dieser Gene mit Cux1 ist die Expression von 17 dieser Gene positiv, die Expression der übrigen zwei Gene negativ mit der Expression Cux1 in den Medulloblastomproben korreliert.

An der chromosomalen Lokalisation dieser Gene fällt auf, dass mehr als ein Drittel der identifizierten Gene (7/19 Genen: Casp2, Hipk2, Kmt2c, Lrrc4, Tecpr1, Trrap und Znf3) auf Chromosom 7q in der Region zwischen 7q21 und 7q42 lokalisiert sind. Das Cux1 Gen liegt bei 7q22.

Tab. 22: Gene, deren Expression eine starke Korrelation mit der Cux1 Expression aufweist.

Gen ID	KorrTest	Cux1 Korr	Chromosom
Add1	D	pos	4p16.3
C7orf26	D	pos	7p22.1
Casp2	D/H	pos	7q34-35
Clec16a	D/H	pos	16p13.13
Cops5	H	neg	8q13.1
Hipk2	D	pos	7q32-42
Kdm3b	D	pos	5q31
Kmt2c	D/H	pos	7q36.1
Lrrc4	D	pos	7q31.3
Mrpl13	H	neg	8q22.1-22.3
Pdpk1	D/H	pos	16p33.3
Slc6a6	H	pos	3p25.1
Sp2	D/H	pos	17q21.32
Tecpr1	D	pos	7q21.3
Trrap	D/H	pos	7q21.2-22.1
Ubtf	D/H	pos	17q21.31
Usp42	D/H	pos	7p22.1
Zmiz2	D	pos	7p13
Znf3	D	pos	7q22.1

Eine besonders interessante Perspektive bietet weiterhin ein Blick auf mögliche Überschneidungen der Funktionen dieser Gene. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass für sechs dieser Gene ein Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 dokumentiert ist (Pubmed Recherche im September 2013). Für Cux1 wurde bereits eine Funktion als transkriptioneller Aktivator von p53 beschrieben (Harada et al., 2008). Bemerkenswert ist hierbei auch, dass die Expression von fünf dieser Gene (Casp2, Hipk2, Kmt2c, Trrap und Usp42) positiv mit der von Cux1 korreliert und diese Gene alle, wenn auch auf unterschiedliche Weise, die Aktivität von p53 fördern. Die Expression von Cops5 jedoch, welche zur Degradation von p53 führt, korreliert negativ mit der Expression von Cux1. Die Korrelation der Expression der sechs mit p53 assoziierten Gene mit Cux1 in

den Medulloblastomproben der von Kool et al. und Remke et al. veröffentlichten Datensätze ist in Abb. 34 dargestellt.

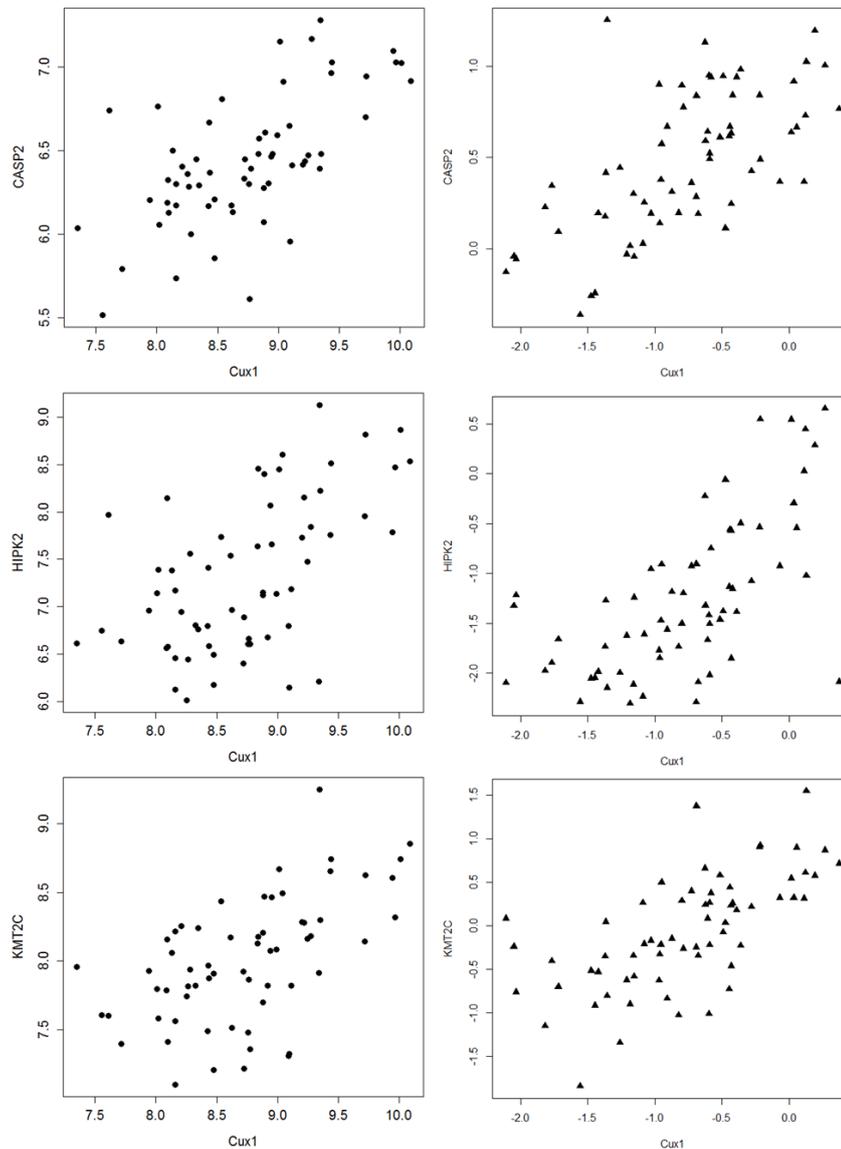


Abb. 34_1: Gene, deren Expression stark mit der von Cux1 korreliert ist und bei denen eine direkte Interaktion mit p53 bekannt ist. Kreise = von Kool et al. publizierter Datensatz, Dreiecke = von Remke et al. publizierter Datensatz

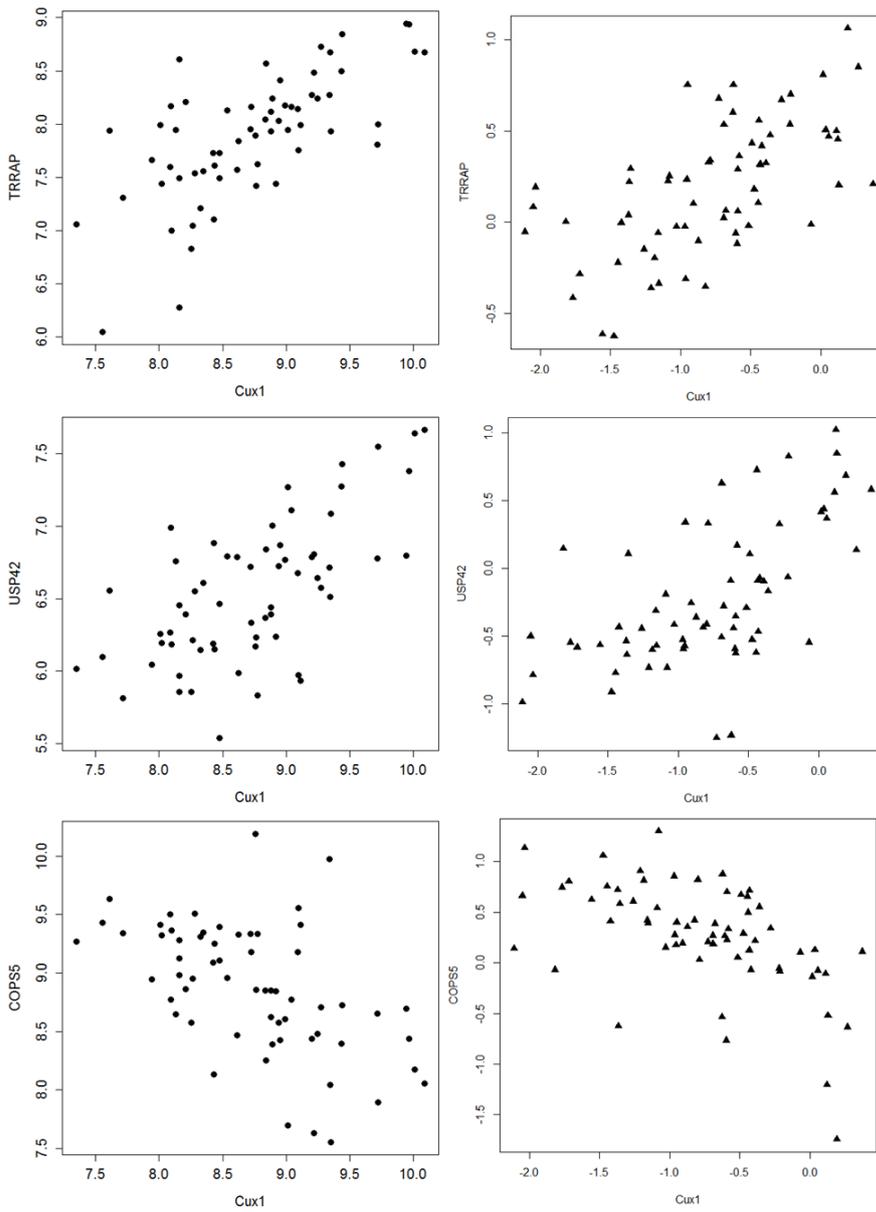


Abb. 34_2: Gene, deren Expression stark mit der von Cux1 korreliert ist und bei denen eine direkte Interaktion mit p53 bekannt ist. Kreise = von Kool et al. publizierter Datensatz, Dreiecke = von Remke et al. publizierter Datensatz

3.3 Die Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2 in der Kleinhirnentwicklung, in Medulloblastomen und in der neuronalen Differenzierung

Wie bereits in Tab. 21 (Abschnitt 3.1.2) dargestellt wurde mittels der Microarray Analyse für den Transkriptionsfaktor Tgif1 am Postnataltag 8 eine in Körnerzellvorläufern um 2-fach höhere Expression und für Tgif2 eine um etwa 2,4-fach höhere Expression, als in reifen Körnerzellen, ermittelt. Die Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2 wirken als negative Regulatoren des TGF- β Signalweges (Melhuish et al., 2001). Tgif1 ist auch an der Regulation von Signalen des Retinsäuresignalweges beteiligt (Bartholin et al., 2006a).

3.3.1 Expression von Tgif1 und Tgif2 im postnatalen Kleinhirn der Maus

Zur Bestätigung der Microarray Ergebnisse wurde die genauere zelluläre Lokalisation der Expression von Tgif1 und Tgif2 im Kleinhirn von P8 Mäusen mittels ISH nachgewiesen. Die Expression von Tgif1 und Tgif2 ist ausschließlich auf die EGL beschränkt (Abb. 35). In späteren Stadien der Kleinhirnentwicklung (P15, P21 und adult) konnte die Expression dieser beiden Transkriptionsfaktoren nicht mehr nachgewiesen werden. An P8 ist die Expression beider Gene innerhalb der EGL hauptsächlich im äußeren Anteil zu finden, wo die proliferationsaktiven Körnerzellvorläufer liegen. Während das Expressionssignal von Tgif1 über den gesamten Bereich der eEGL recht gleichmäßig erscheint, ist das Signal für Tgif2 recht uneinheitlich. Es scheint, als sei die Expression von Tgif2 in weitaus höherem Maße auf einzelne Zellen bzw. vereinzelte Anhäufungen/Gruppen von Zellen in der eEGL beschränkt. Auffällig ist außerdem, dass die stark Tgif2-positiven Zellen hauptsächlich in den Fissuren der Kleinhirnlobuli lokalisiert sind.

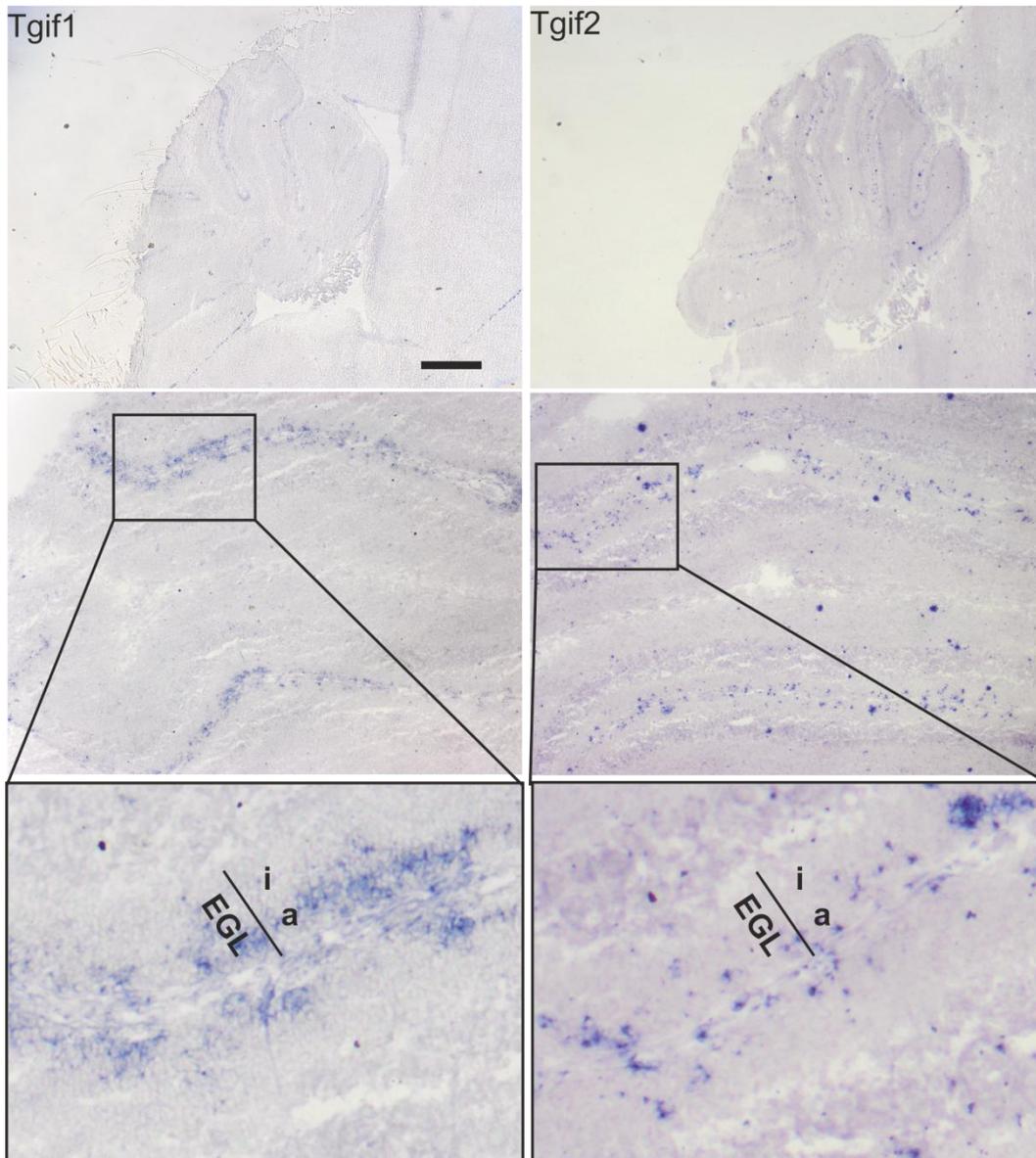


Abb. 35: Expression von Tgif1 und Tgif2 im Kleinhirn der Maus an P8. Die Expression beider Gene findet sich hauptsächlich im äußeren Anteil der EGL. Die meisten Zellen in der äußeren EGL erscheinen Tgif1-positiv. Die Expression von Tgif2 ist auf wenige, innerhalb der EGL verstreute Zellen/Zellgruppen beschränkt. EGL= äußere Körnerzellschicht, i=innerer Anteil der EGL, a=äußerer Anteil der EGL. Skalierungsbalken in Tgif1 = 500 µm. Die markierten Ausschnitte wurden nochmals um den Faktor 4,5 nachvergrößert.

3.3.2 Expression von Tgif1 und Tgif2 in murinen und humanen Medulloblastomen

Auch für Tgif1 und Tgif2 stellte sich die Frage nach einer Expression in Medulloblastomen. Dazu wurde zunächst die Expression von Tgif1 und Tgif2 in dem unter Abschnitt 3.2.2.1 beschriebenen murinen Modell Shh-abhängiger Medulloblastome mittels qPCR analysiert. In den drei Mauslinien, die in Körnerzellvorläufern einen konstitutiv aktivierten Smoothed Rezeptor exprimieren fand sich eine vielfach höhere Expression von sowohl Tgif1, als auch Tgif2, im Vergleich zum P8 Kleinhirn (Abb. 36).

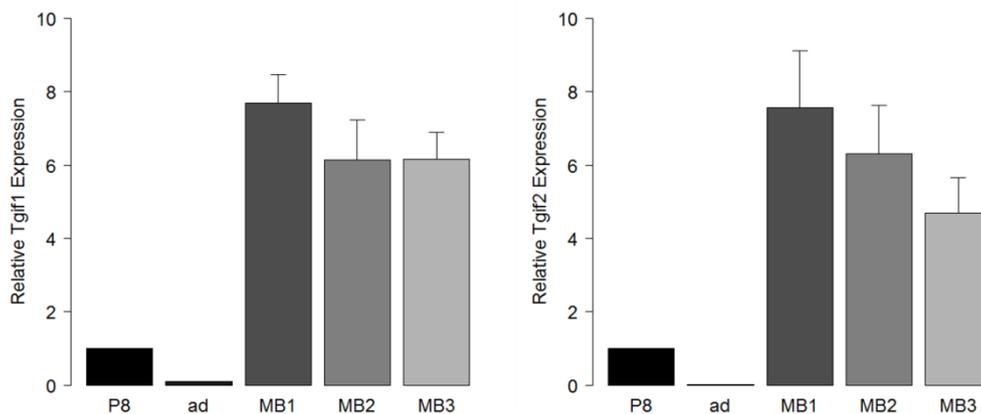


Abb. 36: Quantifizierung der mRNA von Tgif1 und Tgif2 in Kleinhirnen von 8 Tage alten und adulten C57BL/6 Mäusen und in drei verschiedenen Mauslinien, die aufgrund einer konstitutiven Aktivierung von Smo Medulloblastome entwickeln (MB1: GFAP-cre:Smom2; MB2: Math1-cre:Smom2; MB3: Tlx3-cre:Smom2). In den Kleinhirnen der mutanten Mäuse fanden sich makroskopisch erkennbare Tumoren. Die mRNA Level an P8 wurden als Referenz genommen und gleich 1 gesetzt. Die Expression von Tgif1 und Tgif2 nimmt in der normalen Kleinhirnentwicklung ab, ist in den Tumoren jedoch stark erhöht. n=3, Fehlerbalken = SEM. Der Fehlerbalken der adulten Probe ist sehr klein und daher nicht sichtbar.

Anschließend wurden Kleinhirne der die Math1-cre:SmoM2 Mäuse verwendet, um mittels in-situ-Hybridisierung an Gewebeschnitten dieser Kleinhirne die zelluläre Lokalisation von Tgif1 und Tgif2 nachzuweisen. Hierbei zeigte sich, dass Tgif1 tatsächlich im Tumorgewebe und nicht im verbleibenden normalen Gewebe dieser Mäuse exprimiert wird (Abb. 37).

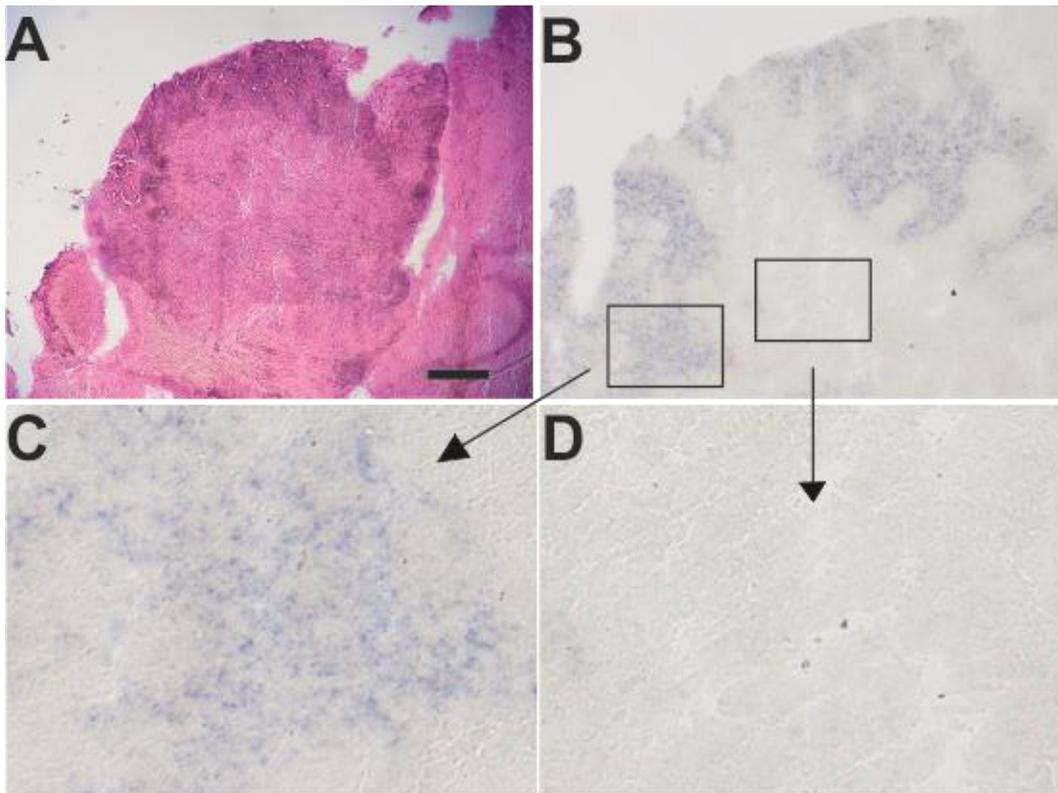


Abb. 37: Tgif1 Expression in Kleinhirn-Gewebeschnitten 10 Tage alter Math1-cre:SmoM2 Mäuse. (A) H&E Färbung. (B-D) In-situ-Hybridisierung. Das Tumorgewebe zeigt eine starke Tgif1 Färbung. (C) Vergrößerung einer Region aus dem Tumorgewebe. (D) Vergrößerung einer Region im verbleibenden Normalgewebe. Skalierungsbalken in A = 500 μ m für A, 250 μ m für B und 62,5 μ m für C, D.

Auch für Tgif2 konnte in Kleinhirnen bzw. im Tumorgewebe der Math1-cre:SmoM2 Mäuse ein positives ISH Signal nachgewiesen werden.

Da der Tumor der hier verwendeten Mäuse bereits sehr groß war kann nicht das gesamte Gehirn abgebildet werden. Es ist daher ein Bereich am Rand des Kleinhirns gezeigt, sowie Vergrößerungen einzelner Bereiche mit Tgif2 Färbung (Abb. 38).

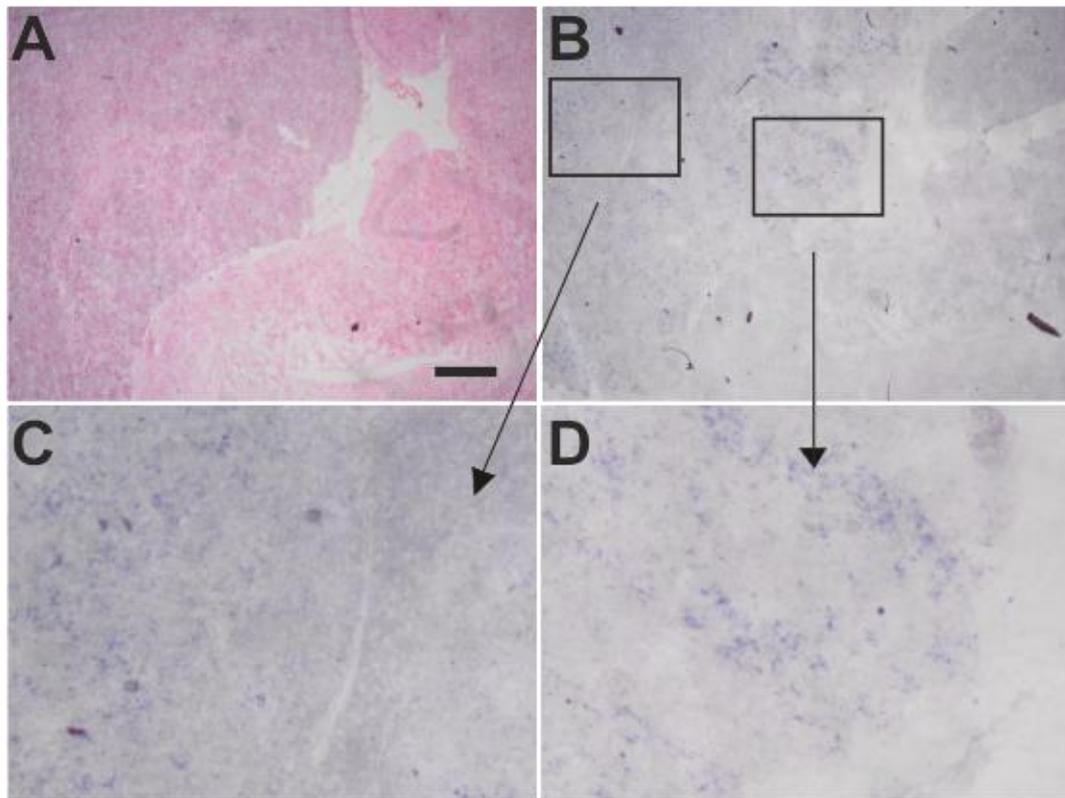


Abb. 38: Tgif2 Expression in Kleinhirn-Gewebeschnitten 18 Tage alter Math1-cre:SmoM2 Mäuse. (A) H&E Färbung. (B-D) In-situ-Hybridisierung. Das Tumorgewebe zeigt eine starke Tgif1 Färbung. (C) Vergrößerung einer Region aus dem Tumorgewebe. (D) Vergrößerung einer Region im verbleibenden Normalgewebe. Skalierungsbalken in A = 500µm für A , 250µm für B und 62,5µm für C, D.

Aufgrund der starken Expression von Tgif1 und Tgif2 in dem murinen Medulloblastom-Modell wurde die Expression dieser Gene auch in den nach Subgruppen unterteilten Expressionsdaten von 62 humanen Medulloblastom Gewebeprobe-

welche von Kool et al. beschrieben worden waren, analysiert (Abb. 39A und Abb. 40). Zum Vergleich der Expression in den Medulloblastomproben mit fetalem Normalgewebe wurde auch wieder der von Remke et al. veröffentlichte Datensatz verwendet (Abb. 39B). Dies war jedoch nur für Tgif1 möglich, da sich in diesem Datensatz keine Expressionsdaten für Tgif2 befanden. Im Gegensatz zu Cux1 ist die Expression von Tgif1 in nahezu allen Medulloblastomproben im Vergleich zum fetalen Kleinhirn deutlich erhöht. Dies trifft insbesondere auf Tumore der Wnt und Shh Subgruppe zu. Diese beiden Subgruppen zeigen auch in den von Kool et al. publizierten Array Daten die im Mittel höchste Tgif1 Expression.

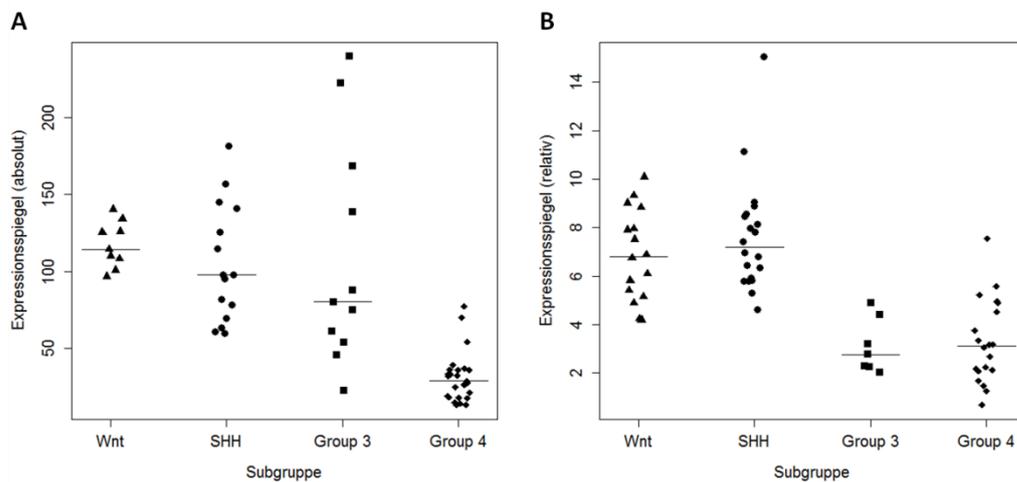


Abb. 39: Expression von Tgif1 in Gewebeproben menschlicher Medulloblastome. (A) Expressionsspiegel von Tgif1 aus den ursprünglich von Kool et al. beschriebenen Daten (verfügbar über die NCBI GEO Datensätze (GSE10327, ID:200010327). (B) Expressionsspiegel von Tgif1 aus den ursprünglich von Remke et al. beschriebenen Daten (NCBI GEO Datensätze: GSE28245, ID: 200028245). Die Gruppierung der Daten erfolgte nach dem aktuellen Konsens der zu verwendenden Nomenklatur (Taylor et al., 2011). Die mittlere Expression von Tgif1 ist in Wnt und Shh Medulloblastomen am höchsten.

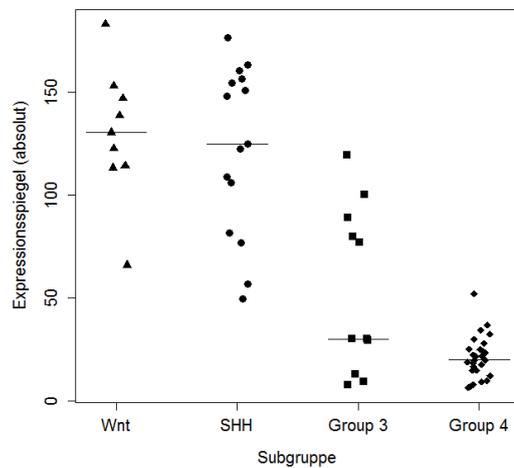


Abb. 40: Expressionsspiegel von Tgif2 aus den ursprünglich von Kool et al. beschriebenen Daten (verfügbar über die NCBI GEO Datensätze (GSE10327, ID:200010327)). Die Gruppierung der Daten erfolgte nach dem aktuellen Konsens der zu verwendenden Nomenklatur (Taylor et al., 2011). Die Expression von Tgif2 ist in Wnt und Shh Medulloblastomen signifikant höher als in den übrigen beiden Gruppen. Die Gruppe 3 Medulloblastome scheinen sich in zwei Untergruppen zu spalten.

Die absoluten Expressionsspiegel von Tgif2 in den Medulloblastomen des Kool Datensatzes zeigen eine im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant höhere Expression dieses Transkriptionsfaktors in den Tumoren der Wnt und Shh Subgruppen (Abb. 40). Die mittlere Expression von Tgif2 ist in Medulloblastomen der Gruppe 3 relativ niedrig, weist jedoch eine hohe Streuung auf. Die Tumoren dieser Subgruppe scheinen sich in zwei Fraktionen zu unterteilen, eine mit niedrigerer und eine mit höherer Tgif2 Expression. Diese Aufspaltung der Gruppe 3 Tumoren kann auch bei den Tgif1 Expressionsspiegeln beobachtet werden (Abb. 39A), hier ist sie allerdings nicht ganz so deutlich wie bei Tgif2.

Da die beiden Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2 eine, besonders in ihrer DNA bindenden Domäne, hohe Homologie aufweisen und bereits mehrfach eine mögliche funktionelle Redundanz dieser Transkriptionsfaktoren vermutet wurde, sollte überprüft werden, ob die Expression dieser beiden Gene in den Medulloblastomproben des Kool et al. Datensatzes miteinander korreliert. Hierzu wurde eine Hauptachsen-Regression (major axis regression, MA) verwendet, welche die natürliche Variabilität innerhalb der Proben berücksichtigt. Hierbei zeigte die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren in den Medulloblastomproben eine positive Korrelation (Abb. 41).

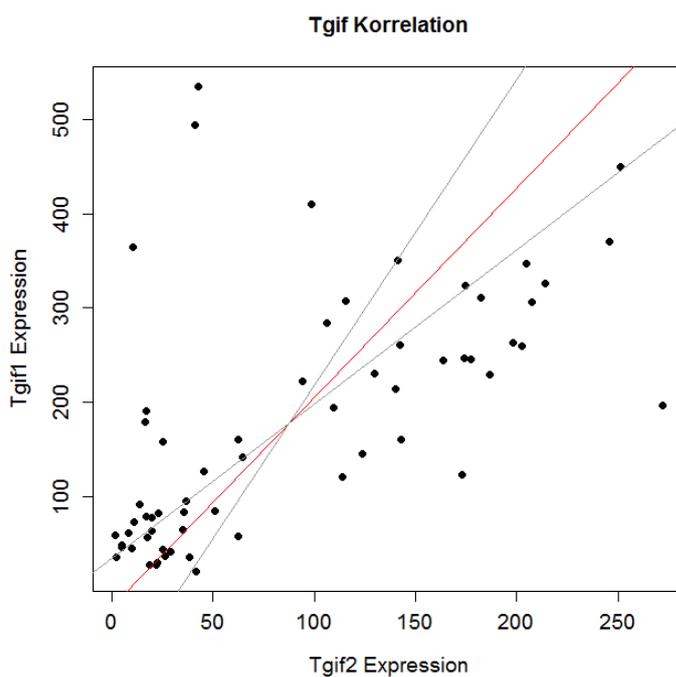


Abb. 41: Korrelation der Expression von Tgif1 und Tgif2 in den Medulloblastomproben des Datensatzes von Kool et al. (2008). Die rote Linie veranschaulicht die Regressionsgerade, die grauen Linien das 95% Konfidenzintervall.

3.3.3 Reduktion der Expression von Tgif1 und Tgif2 in Medulloblastomen mittels siRNA

Um Hinweise auf die Funktion von Tgif1 und Tgif2 in Medulloblastomen zu erlangen wurden knockdown Experimente an D283Med und Daoy Medulloblastom Zelllinien durchgeführt. Zunächst wurde die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren in diesen Zelllinien und der D341Med Medulloblastom Zelllinie mittels semiquantitativer PCR verifiziert (Abb. 42). Hier zeigt sich für Tgif1 eine stabile Expression in den drei Zelllinien. Tgif2 wird in geringerer Menge exprimiert; in D341Med Zellen scheint die Expression von Tgif2 etwas schwächer zu sein als in den beiden anderen untersuchten Zelllinien. Da sie nicht adhärent wächst wurde die D341Med Zelllinie für die weiteren Analysen nicht verwendet.

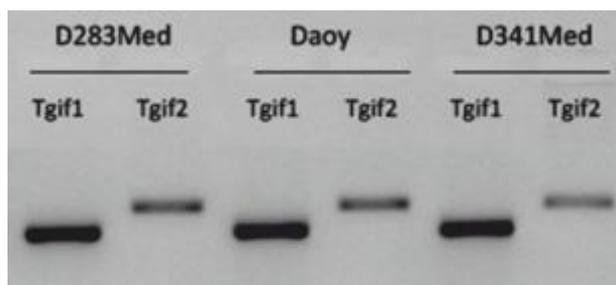


Abb. 42: Expression von Tgif1 und Tgif2 in humanen Medulloblastomzellen. Semiquantitative PCR.

Zur Reduktion von Tgif1 und Tgif2 wurden D283Med und Daoy Medulloblastomzelllinien zunächst transient mit vier gegen Tgif1 gerichteten (siRNA1-4) und mit vier gegen Tgif2 gerichteten (siRNA5-8) siRNAs jeweils getrennt transfiziert (Abb. 43).

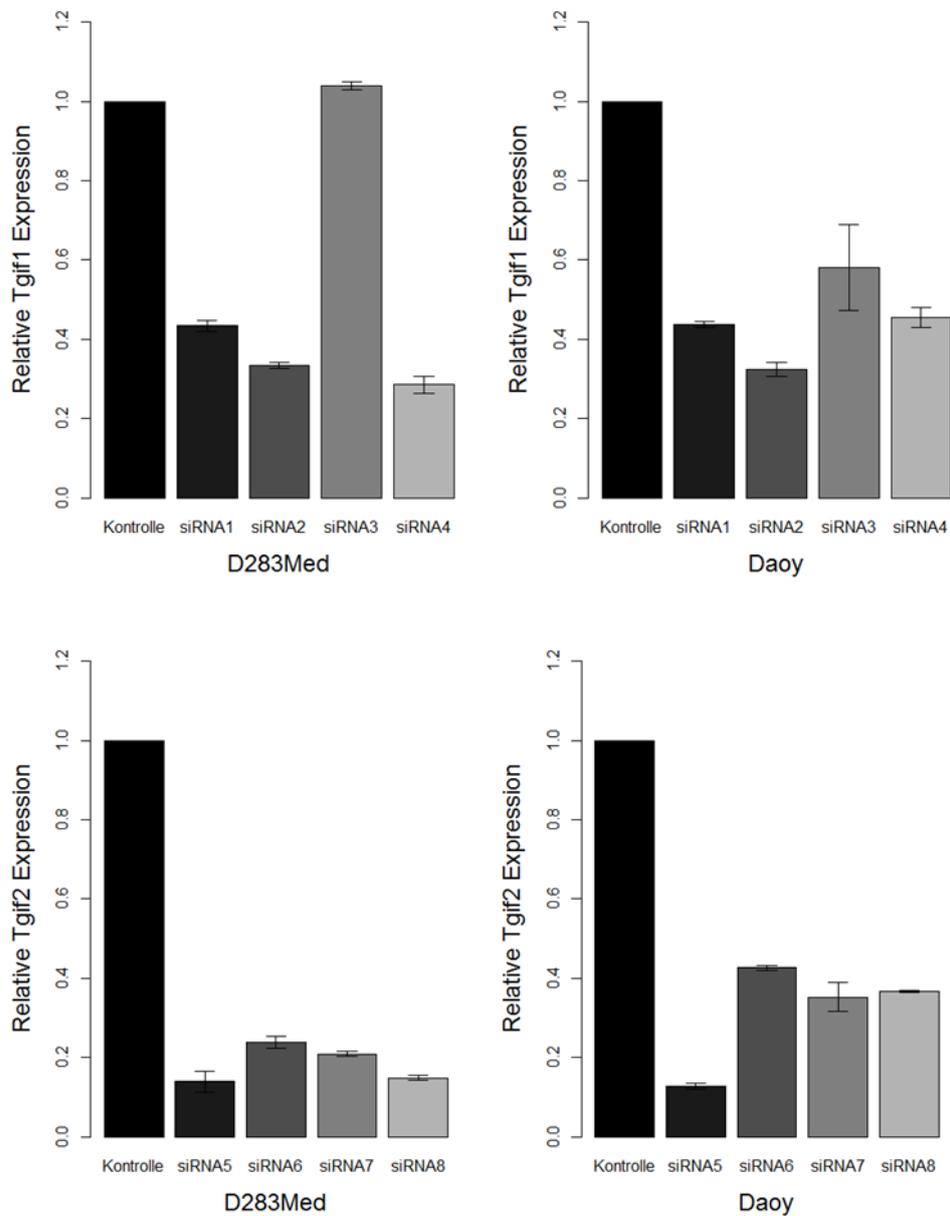


Abb. 43: Reduktion der Expression von Tgif1 und Tgif2 in Medulloblastomzellen nach transienter Transfektion mit siRNAs. Die Bestimmung der mRNA Spiegel erfolgte 24h nach siRNA Transfektion mittels Real-Time PCR. n=2, Fehlerbalken = SD.

Während in Daoy Zellen alle vier siRNAs gegen Tgif1 zu einer effektiven Reduktion der Tgif1 mRNA Spiegel führten, war eine dieser siRNAs in D283Med Zellen unwirksam. Die vier gegen Tgif2 gerichteten siRNAs führten zu einer Reduktion der Tgif2 Expression von mehr als 50% sowohl in D283Med als auch in Daoy Zellen. Für die weiteren Experimente wurde zum Knockdown von Tgif1 die siRNA4 und zur Reduktion von Tgif2 die siRNA5 verwendet.

Um einen potentiellen Effekt des siRNA-vermittelten Knockdowns gegen Tgif1 und Tgif2 zu untersuchen wurde die Vitalität der transfizierten Medulloblastomzellen mit Hilfe der Echtzeit Impedanzmessung untersucht (Abb. 44). Die Zellen wurden dazu direkt auf die Impedanz-Messplatten ausgesät. Während der ersten 18 Stunden wurden sie nicht behandelt. Nach 18 Stunden erfolgte die Transfektion mit siRNA gegen Tgif1 bzw. Tgif2 sowie mit einer Kombination beider siRNAs. Als Negativkontrolle wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt (Kontrolle). Als weitere Kontrolle wurden Zellen mit einer Kontroll siRNA (NTC) behandelt, die keine regulatorische Funktion auf bekannte Gene ausüben sollte. Als methodische Kontrolle wurde zusätzlich eine siRNA gegen Kif11 verwendet. Kif11 ist ein Motorprotein, das für die Ausbildung des Spindelapparates benötigt wird. Eine Reduktion dieses Proteins bewirkt daher einen Zellzyklusarrest.

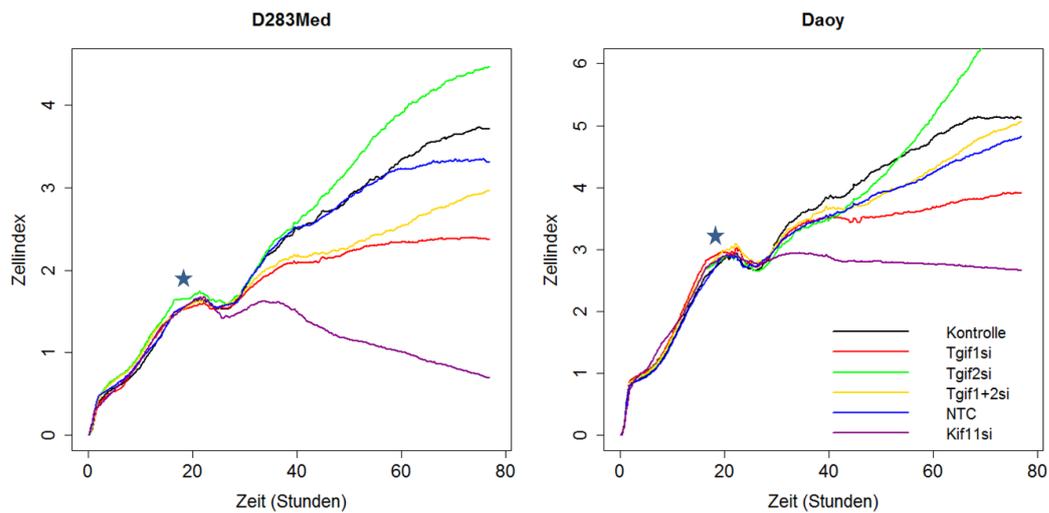


Abb. 44: Zeitabhängige Änderung der Impedanz (Zellindex) in Medulloblastomzelllinien nach siRNA-vermitteltem knockdown von Tgif1 und/oder Tgif2. Zum Zeitpunkt 0 wurden jeweils 10000 Zellen pro Well ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach 18 Stunden (Stern).

In beiden Zelllinien kann man unmittelbar nach der Transfektion unabhängig davon ob die Zellen mit siRNA gegen Tgif1, Tgif2, Kif11 oder der NTC transfiziert wurden eine zeitlich begrenzte Absenkung des Kurvenverlaufs von etwa 8-10 Stunden beobachten. Diese Absenkung des Kurvenverlaufs ist auch nach Behandlung mit dem Transfektionsreagenz alleine zu sehen. Die Kurven der Transfektionsreagenz- und NTC-Kontrollzellen beginnen nach kurzer Zeit jedoch wieder anzusteigen; die Impedanz nahm weiter zu. Hierbei war auffällig, dass im Gegensatz dazu die Behandlung mit siRNAs gegen Tgif1 und Tgif2 in beiden Zelllinien deutliche Effekte auf die Wachstumskurven der Zellen ausübte. Während die Reduktion von Tgif1 zu einer deutlichen Abflachung der Impedanzkurve im Vergleich zu den Kontrollzellen führte, hatte die Behandlung mit der siRNA gegen Tgif2 einen gegenteiligen Effekt. In diesen Zellen stieg die Impedanzkurve circa zwanzig Stunden nach der Transfektion deutlich steiler an, als die der Kontrollen.

Die Impedanzkurven der mit siRNA gegen beide Gene behandelten Zellen liegen jeweils zwischen denen der mit den einzelnen siRNAs behandelten Zellen, sind jedoch in beiden Zelllinien noch flacher als die der Kontrollzellen. Bei den mit siRNA gegen Kif11 behandelten Zellen zeigte sich etwa zwanzig Stunden nach der Transfektion bei D283Med Zellen ein stetiger Abfall der Impedanzkurve. Bei Daoy Zellen blieb die Impedanzkurve über den restlichen Zeitraum der Beobachtung flach.

3.3.4 Expression und Knockdown von Tgif1 und Tgif2 in humanen Teratokarzinomzellen

Die beiden Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2 fungieren als Regulatoren des TGF- β Signalweges. Tgif1 wurde zudem bereits mehrfach mit dem Retinsäuresignalweg in Verbindung gebracht. Beide Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der neuronalen Differenzierung. Daher sollte auch der Effekt dieser Gene auf die neuronale Differenzierung untersucht werden. Hierfür wurden NT-2 Zellen benutzt. Die NT-2 Zelllinie ist eine menschliche Teratokarzinomzelllinie, welche sich über eine Behandlung mit Retinsäure in neuronale Zellen differenzieren lässt (Pleasure et al., 1992).

Um die Expression von Tgif1 und Tgif2 in unbehandelten NT-2 Zellen mit der in mittels Retinsäure differenzierten NT-2 Zellen zu vergleichen, wurde RNA aus kultivierten NT-2 Zellen vor und nach der Behandlung mit Retinsäure isoliert und die Expression der beiden Gene mittels semi-quantitativer PCR bestimmt. Dies zeigte, dass sowohl Tgif1 als auch Tgif2 in unbehandelten NT-2 Zellen exprimiert werden. Nach neuronaler Differenzierung der NT-2 Zellen war die Expression von Tgif1 jedoch deutlich reduziert. Tgif2 konnte in den differenzierten Zellen über semiquantitative PCR nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 45).

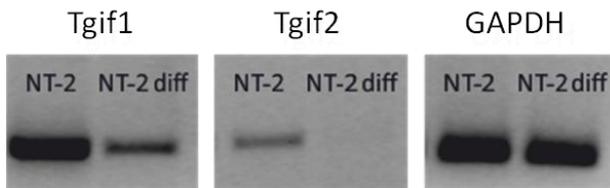


Abb. 45: Expression von Tgif1 und Tgif2 in undifferenzierten und mit Retinsäure differenzierten NT2 Zellen. Die Expression von Tgif1 und Tgif2 in NT-2 Zellen nimmt nach Behandlung mit Retinsäure deutlich ab. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA Mengen wurde zusätzlich GAPDH amplifiziert. Semiquantitative PCR.

3.3.5 Stabile Reduktion von Tgif1 und Tgif2 in humanen Teratokarzinomzellen über einen multiplen shRNA Vektor

Bei der in Abschnitt 3.3.4 beschriebenen Behandlung von NT-2 Zellen mit Retinsäure und der damit einhergehenden neuronalen Differenzierung dieser Zellen kommt es zur Änderung der Expression einer ganzen Reihe von Genen (Katoh, 2002; Przyborski et al., 2000; Younkin et al., 1993). Hier wurde nun auch die Verminderung der Expression von Tgif1 und Tgif2 in diesem System beobachtet. Um die Funktionen von Tgif1 und Tgif2 in diesem Szenario näher untersuchen zu können, wurde ein shRNA Vektor konstruiert, der die Unterdrückung der Expression beider Gene erlauben sollte. Dazu wurden in den pU6m4 Vektor insgesamt sieben shRNA Sequenzen inkloniert, von denen drei gegen Tgif1 und vier gegen Tgif2 gerichtet sind (Abb. 46).

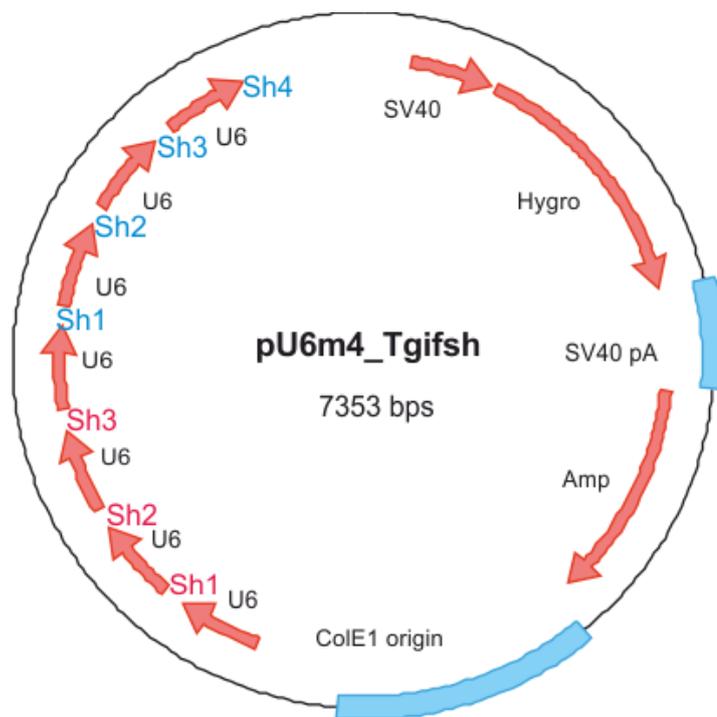


Abb. 46: Schematisierte Darstellung des pU6m4-basierten Plasmids, das zur Unterdrückung der Expression von Tgif1 und Tgif2 benutzt wurde. shRNA Sequenzen gegen Tgif1 sind in rot dargestellt, shRNA Sequenzen gegen Tgif2 in blau.

NT-2 Zellen wurden mit dem oben beschriebenen Plasmid stabil transfiziert. Nach mehrwöchiger Selektion der stabilen Mischkulturen wurde die Stärke der shRNA-vermittelten Reduktion von Tgif1 und Tgif2 mittels Real-Time-PCR ermittelt. Die über den multiplen shRNA Vektor erzielte Reduktion der Expression der beiden Gene wurde mit der Retinsäure differenzierter NT-2 Zellen verglichen (Abb. 47). Die Expression von Tgif1 konnte über diesen Vektor in NT-2 Zellen um mehr als 90% verringert werden, was in etwa der Expression in differenzierten NT-2 Zellen entspricht. Die Expression von Tgif2 wurde mithilfe des multiplen shRNA Vektors um circa 55% reduziert. In differenzierten NT-2 Zellen ist die ermittelte Tgif2 Expression hingegen um noch etwa 10% geringer.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Expressionsanalysen von Tgif1 und Tgif2, dass die stabile Reduktion dieser Gene mittels eines multiplen shRNA Plasmids zu einer Verminderung der Expressionsspiegel von Tgif1 und Tgif2 führt, wie sie auch bei Retinsäure-Behandlung beobachtet wurden. Nun stellte sich die Frage, ob die Unterdrückung der Expression der beiden Gene in NT-2 Zellen auch zu deren Differenzierung führt.

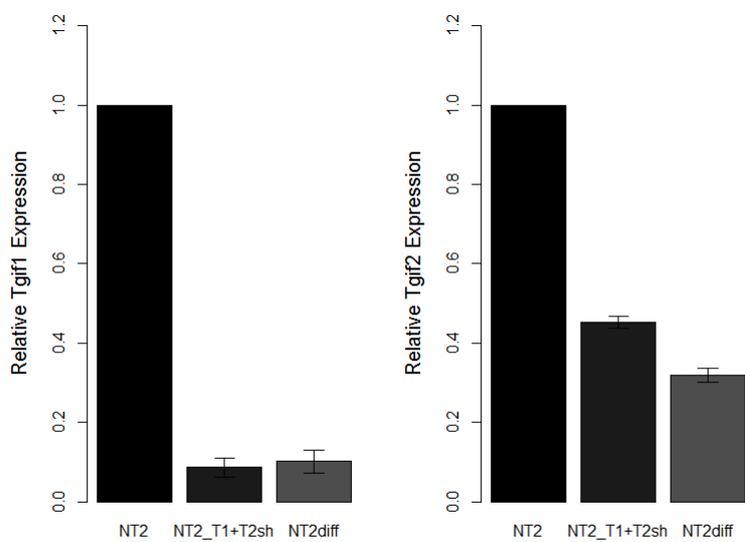


Abb. 47: Reduktion der Expression von Tgif1 und Tgif2 über einen multiplen shRNA Vektor. Vergleich der Expressionsintensität in den knockdown Zelllinien mit unbehandelten und differenzierten NT-2 Zellen. Expressionslevel in unbehandelten NT-2 Zellen wurden als Referenz verwendet und gleich 1 gesetzt. n=2, Fehlerbalken= SD. Real-Time PCR.

3.3.6 Einfluss der Reduktion von Tgif1 und Tgif2 auf die Differenzierung in der humanen NT-2 Zelllinie

Um den Einfluss von Tgif1 und Tgif2 auf die Differenzierung von NT-2 Zellen zu überprüfen, wurden NT-2 Zellen, in denen die beiden Gene über stabile Transfektion mit dem multiplen shRNA Vektor herunterreguliert wurden mit einem Antikörper gegen β III-Tubulin gefärbt (Abb. 48). Dieses Protein wird spezifisch in neuronalen Zellen exprimiert. Zum Vergleich wurden auch stabil mit dem Kontrollvektor transfizierte (Negativkontrolle) sowie mittels Retinsäure differenzierte NT-2 Zellen (Positivkontrolle) gegen β III-Tubulin gefärbt. Bei den mit Retinsäure differenzierten NT-2 Zellen zeigen zahlreiche Zellen eine starke Färbung für β III-Tubulin. Auch die Morphologie dieser stark β III-Tubulin-positiven Zellen ist charakteristisch für Neurone. Die Zellen besitzen mehrere, häufig sehr lange Ausläufer und sind untereinander vernetzt. Auch die NT-2 Zellen, bei denen Tgif1 und Tgif2 reduziert wurde, zeigen zumeist eine intensive β III-Tubulin Färbung. Morphologisch kann man auch bei den mit dem shVektor behandelten Zellen die Bildung mehrerer Ausläufern beobachten. Im Gegensatz zu den mit Retinsäure differenzierten Zellen erscheinen die Fortsätze der Tgifsh-transfizierten Zellen etwas kürzer und die Zellen untereinander weniger stark vernetzt zu sein. Die nur mit dem Kontrollvektor stabil transfizierten NT-2 Zellen sind in ihrer Morphologie den unbehandelten NT-2 Zellen sehr ähnlich. Nur bei vereinzelt Zellen ist eine β III-Tubulin Färbung, die über dem Hintergrund liegt (d.h. unterhalb der bei nur mit dem Sekundärantikörper behandelten Zellen beobachteten Fluoreszenz) zu erkennen. Hierbei könnte es sich um spontan differenzierte Zellen handeln. Die Bildung von Ausläufern kann bei diesen Zellen jedoch nur ansatzweise beobachtet werden.

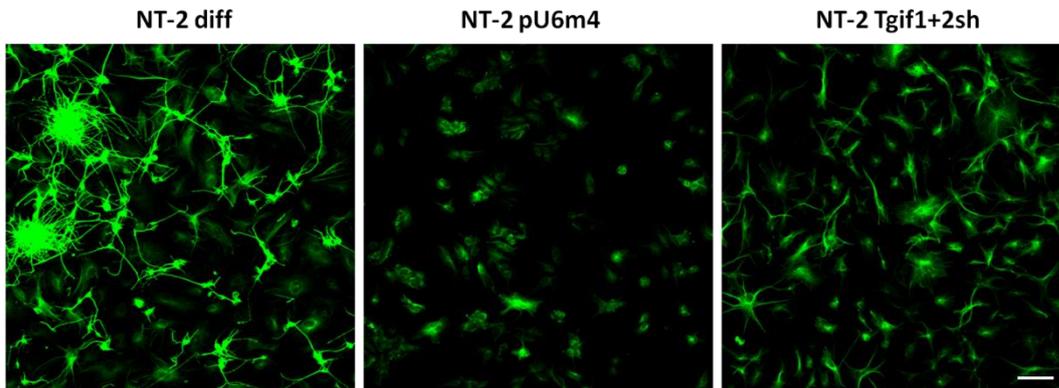


Abb. 48: Knockdown von Tgif1 und Tgif2 führt zu verstärkter Expression von β III-Tubulin und neuronaler Morphologie in NT-2 Zellen. Immuncytochemische Färbung von NT-2 Zelllinien mit β III-Tubulin. Meßbalken = 50 μ m

3.3.7 Einfluss einer verminderten Expression von Tgif1 und Tgif2 auf das Wachstumsverhalten von NT-2 Zellen

Mögliche Effekte der verminderten Expression von Tgif1 und Tgif2 auf das Wachstumsverhalten der NT-2 Zellen wurden mithilfe der Impedanzmessung in Echtzeit beobachtet. Untransfizierte Zellen und Leervektor transfizierte Zellen wurden als Kontrollen verwendet (Abb. 49).

Verglichen mit der parentalen NT-2 Zelllinie fällt zunächst auf, dass bereits die stabil mit dem Leervektor transfizierten Zellen einen deutlich unterschiedlichen Verlauf der Impedanzkurve zeigen. Betrachtet man den initialen Anstieg der Kurven innerhalb der ersten vier Stunden, so kann man bei den beiden Kontrollen zunächst keinen Unterschied erkennen. Der Anstieg der Impedanz bei den Zellen mit reduzierter Expression von Tgif1 und Tgif2 verläuft jedoch flacher als bei den Kontrollzellen. In der nachfolgenden Phase verlaufen die Impedanzkurven recht unterschiedlich. Während die Kurven der unbehandelten Kontrollzellen weiter anstiegen, zeigen die Leervektor Kontrollen einen eher linearen Kurvenverlauf.

Die Impedanzkurve der stabil mit dem multiplen shRNA Vektor gegen Tgif1 und Tgif2 transfizierten Zellen verläuft jedoch noch deutlich flacher, als die der beiden Kontrollzelllinien. Mittels Retinsäure differenzierte NT-2 Zellen konnten in diesem Assay nicht als Kontrollen verwendet werden, da diese aufgrund des Differenzierungsprozesses nicht mehr teilungsfähig sind.

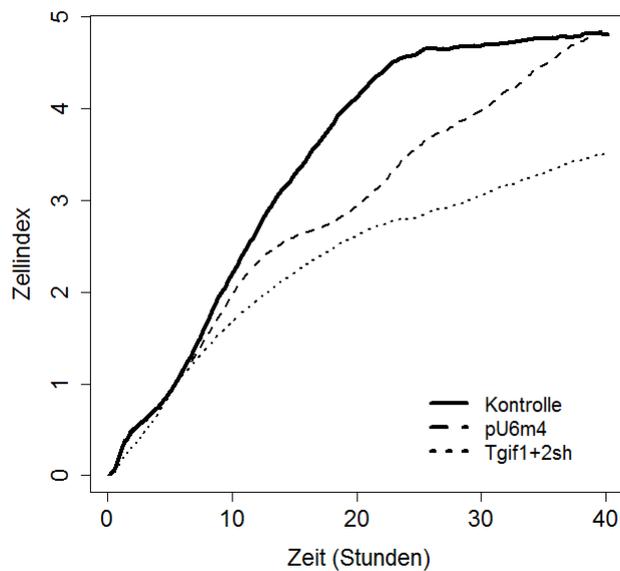


Abb. 49: Impedanz-basierte Echtzeit Analyse von NT-2 Zelllinien nach stabilem knockdown von Tgif1 und Tgif2. Die stabile Reduktion der beiden Transkriptionsfaktoren führt zu einem flacheren Anstieg der Impedanz im Vergleich zu den Kontrollen. Pro Well wurden jeweils 10 000 Zellen ausgesät.

3.4 Die Expression des Fzd3 Rezeptors im Kleinhirn und in Medulloblastomen

Der Fzd3 Rezeptor fungiert als Mediator von Signalen des nicht-kanonischen Wnt bzw. nicht-kanonischen Wnt/PCP Signalweges. Über diese Signale ist Fzd3 hauptsächlich an der Regulation von Adhäsion, Migration und Invasion beteiligt (Hansen et al., 2009; Kaucká et al., 2013; Luyten et al., 2010; Mahadevan et al., 2009; Pourreyron et al., 2012; Valastyan et al., 2009; Wada et al., 2006). Die Expression von Fzd3 sollte nach den über die Microarrayanalyse erzielten Daten am Postnataltag 8 in Körnerzellvorläufern um etwa 2-3-fach höher sein, als in reifen Körnerzellen.

3.4.1 Expression von Fzd3 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung

Mittels in-situ-Hybridisierung zeigte sich, dass Fzd3 während der frühen postnatalen Entwicklung des Kleinhirns der Maus in der Körnerzelllinie exprimiert wird (Abb. 50). Ein Expressionssignal konnte hier von P0 an detektiert werden. An P3 zeigt sich sowohl in der EGL, als auch in der sich bildenden IGL eine Fzd3 Färbung, wobei die Intensität der Färbung in beiden Schichten etwa gleich stark ist. An P8 hingegen erscheint die Färbung in der EGL deutlich stärker als in der IGL. In diesem Stadium, in dem die Zweischichtigkeit der EGL gut erkennbar ist, zeigt sich auch, dass Fzd3 hauptsächlich im inneren Teil der äußeren Körnerzellschicht und nicht in der äußeren EGL exprimiert wird. Von P15 an kann keine Expression von Fzd3 mehr detektiert werden.

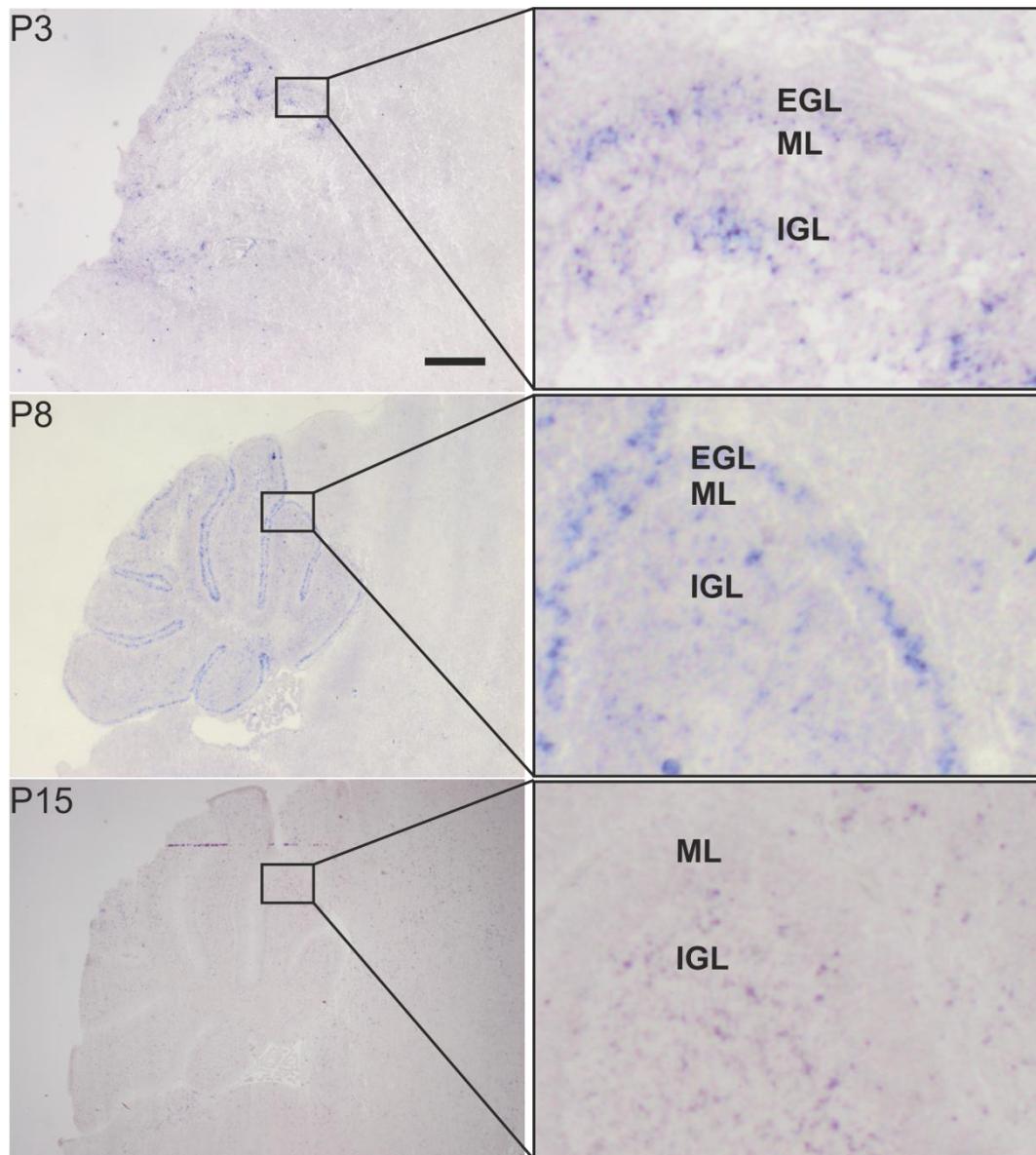


Abb. 50: Expression von Fzd3 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung der Maus. Fzd3 wird während der frühen postnatalen Entwicklung der Maus (P3, P8) im inneren Anteil der EGL, sowie in vereinzelt Zellen innerhalb der IGL exprimiert. An P15 ist kein Fzd3 Expressionssignal mehr im Kleinhirn detektierbar. Skalierungsbalken in P3 = 500 μm für P3, P8 und P15. Die markierten Ausschnitte wurden nochmals um den Faktor 8 nachvergrößert.

3.4.2 Expression von Fzd3 in Medulloblastomen murinen und humanen Ursprungs

Um zu untersuchen, ob Fzd3 auch in Medulloblastomen exprimiert wird, wurde zunächst die Expression des Fzd3 Rezeptors in dem unter Abschnitt 3.2.2.1 beschriebenen murinen Modell Shh-abhängiger Medulloblastome mittels qPCR analysiert (Abb. 51). Die Expression von Fzd3 ist in diesen Mauslinien um mehr als das zehnfache höher als im P8 Kleinhirn. Zwischen den drei Linien zeigt sich kein Unterschied in der Fzd3 Expression.

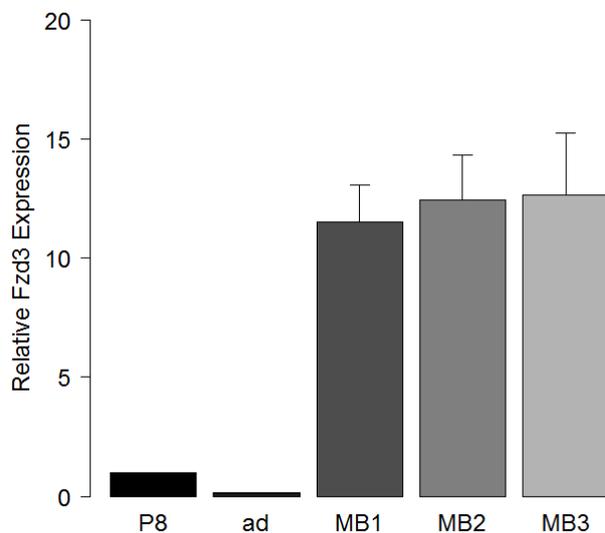


Abb. 51: Quantifizierung der mRNA von Fzd3 in Kleinhirnen von 8 Tage alten und adulten C57BL/6 Mäusen und in Kleinhirnen von Mäusen, die aufgrund einer konstitutiven Aktivierung von Smo Medulloblastome entwickelt hatten (MB1: GFAP-cre:SmoM2; MB2: Math1-cre:SmoM2; MB3: Tlx3-cre:SmoM2). Die mRNA Gehalt an P8 wurden als Referenz genommen und gleich 1 gesetzt. Die Expression von Fzd3 nimmt in der normalen Kleinhirnentwicklung ab, ist in den Tumoren jedoch stark erhöht. n=3, Fehlerbalken = SEM. Der Fehlerbalken der adulten Probe ist sehr klein und daher nicht sichtbar.

Mittels in-situ-Hybridisierung an Gewebeschnitten von Kleinhirnen der Math1-cre:SmoM2 Mäuse wurde anschließend gezeigt, dass Fzd3 vor allem im Tumorgewebe und kaum in dem angrenzenden Normalgewebe exprimiert wird (Abb. 52B,C). An anderen Regionen zeigt sich in lokal abgegrenzten Bereichen eine noch intensivere Fzd3 Färbung (Abb. 52B,D). Hierbei ließ sich jedoch nicht eindeutig feststellen, ob es sich um Tumor oder Normalgewebe handelt.

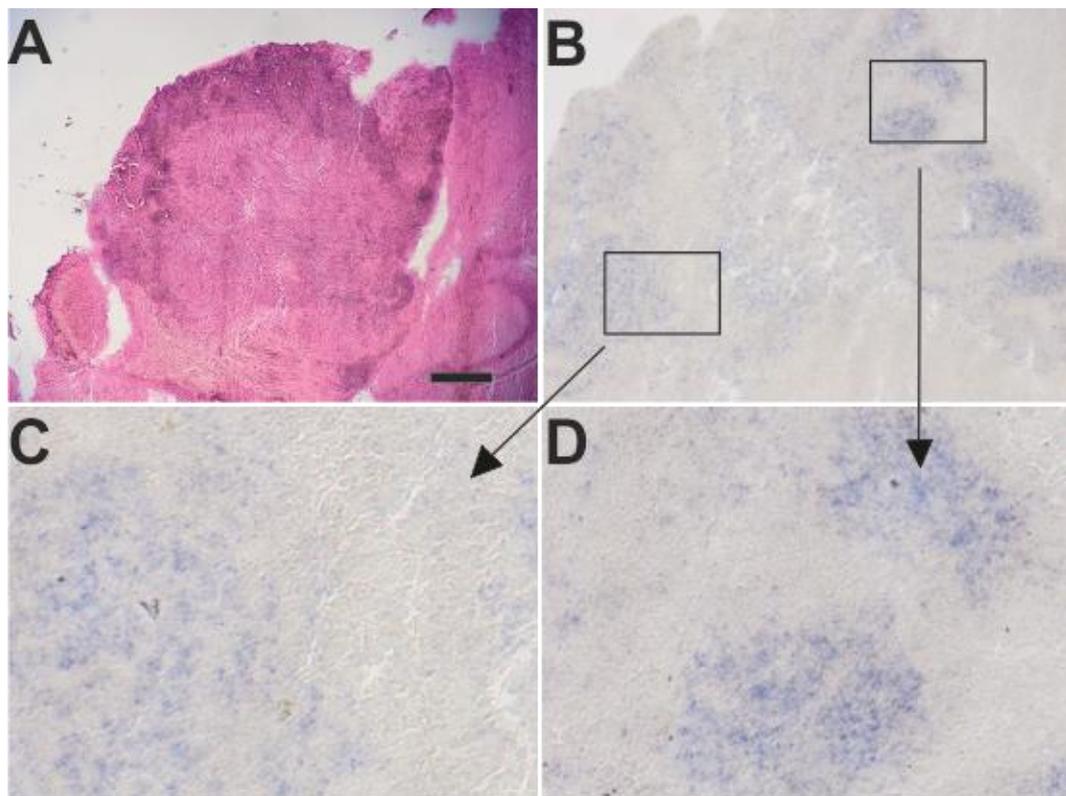


Abb. 52: Fzd3 Expression in Gewebeschnitten 10 Tage alter Math1-cre:SmoM2 Mäuse. (A) H&E Färbung. (B-D) In-situ-Hybridisierung. (C) Das Tumorgewebe zeigt eine Fzd3 Färbung. (D) Ausschnitt aus einem anderen Bereich mit starker Fzd3 Färbung. Skalierungsbalken in A = 500 μ m für A , 250 μ m für B und 62,5 μ m für C, D.

Aufgrund der starken Expression von Fzd3 in dem murinen Medulloblastom-Modell stellte sich auch hier wieder die Frage nach der Expression dieses Gens in

humanen Medulloblastomen. Daher wurde auch die Expression von Fzd3 in den nach Subgruppen unterteilten Expressionsdaten von 62 humanen Medulloblastoma Gewebeproben, welche von Kool et al. beschrieben worden waren, analysiert (Abb. 53A). Zum Vergleich der Expression in den Medulloblastomproben mit fetalem Normalgewebe wurde auch hier wieder der von Remke et al. veröffentlichte Datensatz verwendet (Abb. 53B).

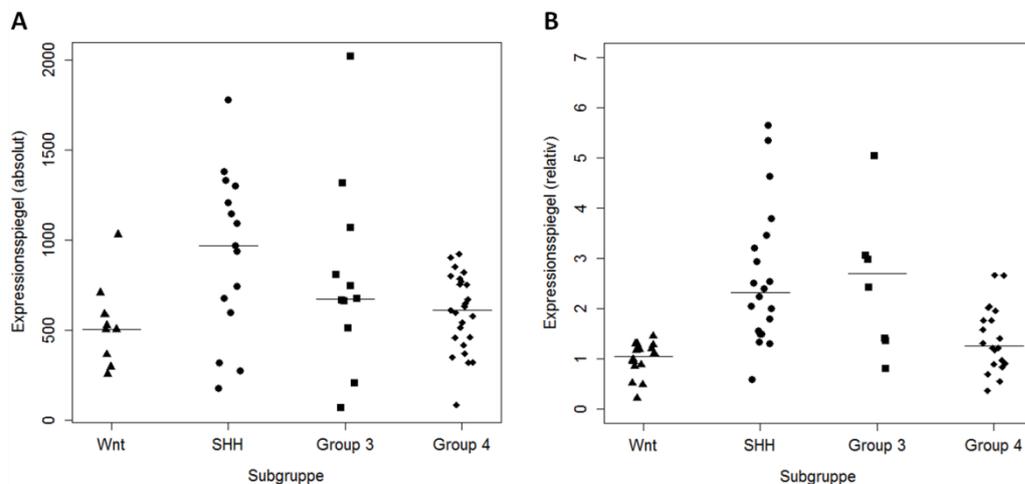


Abb. 53: Expression von Fzd3 in Gewebeproben menschlicher Medulloblastome. (A) Expressionsspiegel von Fzd3 aus den ursprünglich von Kool et al. beschriebenen Daten (verfügbar über die NCBI GEO Datensätze (GSE10327, ID:200010327). (B) Expressionsspiegel von Fzd3 aus den ursprünglich von Remke et al. beschriebenen Daten (NCBI GEO Datensätze: GSE28245, ID: 200028245). Um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen deutlicher herauszustellen wurde die Skalierung angepasst, hierdurch liegt eine Probe mit hoher Fzd3 Expression aus der Gruppe 3 außerhalb des Bildbereichs. Die Gruppierung der Daten erfolgte nach dem aktuellen Konsens der zu verwendenden Nomenklatur.

Die höchste Fzd3 Expression wurde in Tumoren der Shh Gruppe und der Subgruppe 3 beobachtet. Obwohl Fzd3 in den Wnt Signalweg involviert ist, war die mittlere Expressionsintensität von Fzd3 in der Wnt Subgruppe am niedrigsten.

Die Expression von Fzd3 in diesen Tumoren ist Vergleichbar mit der im fetalen Normalgewebe. In Tumoren die der Shh und Gruppe 3 Subgruppen zugeordnet wurden zeigt sich allerdings im Vergleich mit dem fetalen Normalgewebe eine deutlich erhöhte Expression von Fzd3.

3.5 Expression des Transkriptionsfaktors Plagl1 während der Kleinhirnentwicklung und in Medulloblastomen

Der Transkriptionsfaktor Plagl1 wirkt regulierend auf den Zellzyklus und das Überleben von Zellen (Spengler et al., 1997). Aufgrund dessen wirkt Plagl1 als Tumorsuppressor, ein Funktionsverlust von Plagl1 findet sich in zahlreichen Tumoren (Bilanges et al., 1999; Varrault et al., 1998). Die Microarray Daten zeigten für Plagl1 am Postnataltag 8 eine in Körnerzellvorläufern um 2,3 bis 2,7-fach höhere Expression an, als in reifen Körnerzellen.

3.5.1 Expression von Plagl1 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung

Die Analyse der zellulären Expression des Transkriptionsfaktors Plagl1 mittels in-situ-Hybridisierung zeigte, dass sich die Expression von Plagl1 deutlich von der der übrigen hier untersuchten Gene unterscheidet (Abb. 54). Plagl1 Transkripte sind zwischen den Postnataltagen 3 und 8 hauptsächlich in der EGL nachweisbar, jedoch auch in einigen größeren Zellen, die tief in der Kleinhirnanlage liegen. In den Zellen der IGL wird Plagl1 nicht mehr exprimiert. An P8 ist die Expression in der EGL in den posterioren Lobuli IX und X wesentlich stärker als in den restlichen Lobuli. In Schnitten von Tieren der Postnataltage 15 und 21 sind die Körnerzellen Plagl1 negativ. Die großen Plagl1-positiven Zellen können nun eindeutig als Purkinjezellen identifiziert werden.

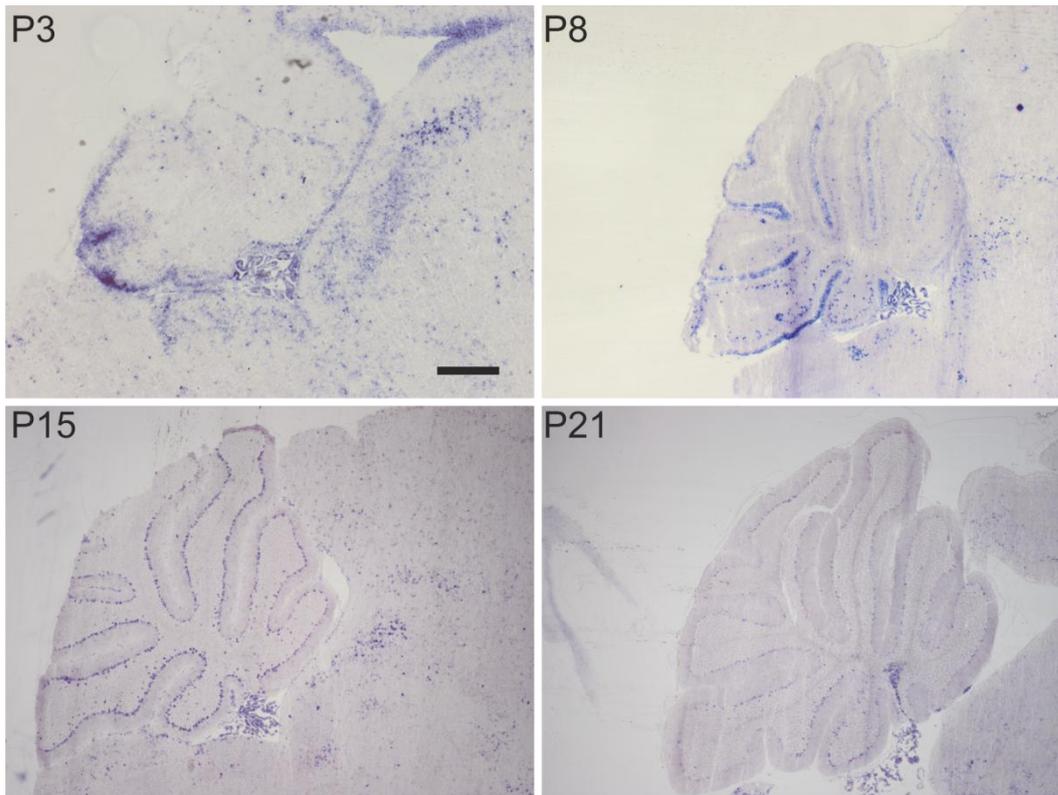


Abb. 54: Expression von Plagl1 während der postnatalen Kleinhirnentwicklung der Maus. Plagl1 wird während der frühen postnatalen Entwicklung zunächst in Körnerzellvorläufern in der EGL exprimiert. Von P8 an zeigt sich auch eine Expression in Purkinjezellen, die bis in die späte postnatale Entwicklung anhält. Im adulten Tier wird Plagl1 jedoch auch in den Purkinjezellen nicht mehr exprimiert (hier nicht gezeigt). Skalierungsbalken in P3 =500 μ m für alle gezeigten Entwicklungsstadien.

3.5.2 Expression von Plagl1 in Medulloblastomen murinen und humanen Ursprungs

Im Medulloblastom Mausmodell zeigte sich auch für Plagl1 eine höhere Expression als im P8 Kleinhirn (Abb. 55). In den drei untersuchten Mauslinien unterschied sich die Expression von Plagl1 leicht, jedoch nicht signifikant. Verglichen mit den

anderen untersuchten Genen zeigt *Plagl1* insgesamt jedoch eine geringere Erhöhung in den Medulloblastom Mauslinien im Vergleich zu P8.

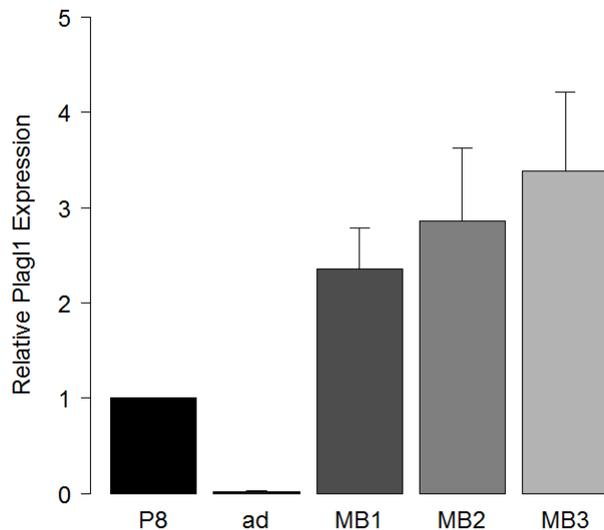


Abb. 55: Quantifizierung der mRNA von *Plagl1* in Kleinhirnen von 8 Tage alten und adulten C57BL/6 Mäusen und in drei verschiedenen Mauslinien, die aufgrund einer konstitutiven Aktivierung von *Smo* Medulloblastome entwickeln (MB1: *GFAP-cre:SmoM2*; MB2: *Math1-cre:SmoM2*; MB3: *Tlx3-cre:SmoM2*). Die mRNA Spiegel an P8 wurden als Referenz genommen und gleich 1 gesetzt. Die Expression von *Plagl1* nimmt während der normalen Kleinhirnentwicklung ab. In den Tumoren ist sie etwa 2-3 Mal höher als im P8 Kleinhirn. n=3, Fehlerbalken = SEM. Der Fehlerbalken der adulten Probe ist sehr klein und daher kaum sichtbar.

Bei der in-situ-Hybridisierung an Gewebeschnitten von Kleinhirnen der *Math1-cre:SmoM2* Mäuse zeigte sich auch für *Plagl1* eine Expression in Bereichen des Kleinhirns, in der die meisten Tumorzellen lokalisiert sind (Abb. 56). Auffallend war aber auch, dass die Färbung für *Plagl1* an einigen Stellen beinahe wie ein Negativ zur *Fzd3* Färbung erscheint (Vergleich Abb. 52B, D mit Abb. 56B, D).

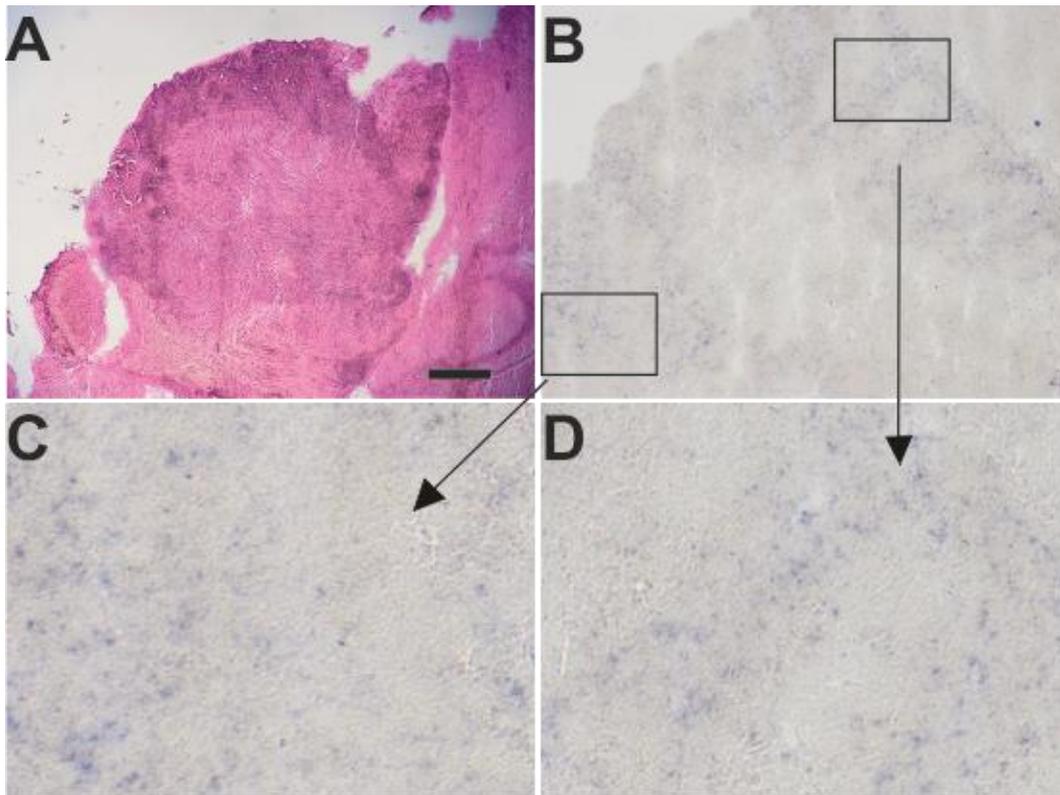


Abb. 56: Plagl1 Expression in Gewebeschnitten 10 Tage alter Math1-cre:SmoM2 Mäuse. (A) H&E Färbung. (B-D) In-situ-Hybridisierung. (C) Expression von Plagl1 im Tumorgewebe (D) nicht sicher tumoröser Bereich mit Plagl1 Expression. Skalierungsbalken in A = 500 μ m für A , 250 μ m für B und 62,5 μ m für C, D.

Auch die Expression von Plagl1 wurde in den nach Subgruppen unterteilten Expressionsdaten von humanen Medulloblastoma Gewebeprobe, welche von Kool et al. und von Remke et al. beschrieben worden waren, analysiert (Abb. 57A und B).

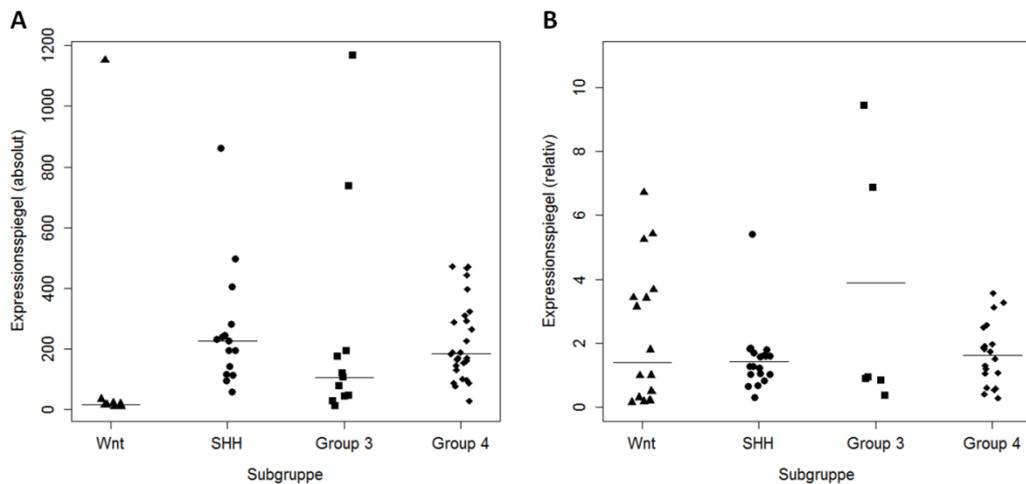


Abb. 57: Expression von Plag1 in Gewebeproben menschlicher Medulloblastome. (A) Expressionsspiegel von Plag1 aus den ursprünglich von Kool et al. beschriebenen Daten (verfügbar über die NCBI GEO Datensätze (GSE10327, ID:200010327). (B) Expressionslevel von Plag1 aus den ursprünglich von Remke et al. beschriebenen Daten (NCBI GEO Datensätze: GSE28245, ID: 200028245). Um Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen deutlicher herauszustellen wurde die Skalierung angepasst, hierbei liegen eine Probe mit hoher Plag1 Expression aus der Shh Gruppe und zwei Proben mit hoher Plag1 Expression aus der Gruppe 3 außerhalb des Bildbereichs. Die Gruppierung der Daten erfolgte nach dem aktuellen Konsens der zu verwendenden Nomenklatur (Taylor et al., 2011).

Besonders auffällig ist hier, dass die Plag1 Expressionsspiegel in Tumoren der Wnt Subgruppe aus dem von Kool et al. publizierten Datensatz mit einer Ausnahme sehr niedrig sind. Dieser Ausreißer hingegen zeigt eine extrem starke Expression. In allen anderen Gruppen wird Plag1 in variabler Menge exprimiert. Im Durchschnitt findet man bei diesen Gruppen eine moderate Expressionsintensität von Plag1. Die im Durchschnitt stärkste Expression wurde in der Gruppe der Shh-assozierten Tumore ermittelt. Auch in der Shh Gruppe und in Gruppe 3 findet man Ausreißer mit stark erhöhter Plag1 Expression. Dies lässt sich auch in dem von Remke et al. veröffentlichten Datensatz beobachten. Im Gegensatz zum Kool

et al Datensatz zeigt sich hier bei etwa der Hälfte der Tumoren innerhalb der Wnt Gruppe eine erhöhte *Plagl1* Expression.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Gene zu identifizieren, die eine differentielle Regulation während der Entwicklung der Körnerzellen des Kleinhirns zeigen. Insbesondere sollten hierbei in Körnerzellvorläufern selektiv bzw. verstärkt exprimierte Gene und deren mögliche Funktion bei der Entwicklung des Kleinhirns und während der Medulloblastom-Pathogenese untersucht werden. Mithilfe der Microarray Analyse konnten Gene identifiziert werden, die in Körnerzellvorläufern differentiell exprimiert werden. Die Expressionsmuster dieser Gene in der postnatalen Körnerzellentwicklung, sowie deren Expression in Medulloblastomen murinen und humanen Ursprungs, sollten einen Hinweis auf deren mögliche Rolle bei den oben erwähnten Prozessen bieten. Bei den Transkriptionsfaktoren *Cux1*, *Tgif1* und *Tgif2* wurden zusätzlich funktionelle Analysen durchgeführt, um die über deren mögliche Funktion in der Entwicklung und Pathogenese des Kleinhirns aufgestellten Thesen zu überprüfen.

4.1 Identifikation von Körnerzellvorläufer-spezifischen Genen mittels Microarray-Analyse

Die Suche nach entwicklungsabhängig regulierten Genen, die verstärkt in proliferierenden und prämitotischen Körnerzellvorläufern exprimiert werden, basierte auf der starken und spezifischen Expression von *Math1* in diesen Zellen (Ben-Arie et al., 1997). Da keine Mittel zur Verfügung standen, um reife Körnerzellen spezifisch zu selektionieren, wurde die Genexpression in *Math1*⁺ Zellen mit der im Gesamtkleinhirn verglichen. Über diesen Ansatz sollten hauptsächlich Gene

identifiziert werden, die in Körnerzellen exprimiert werden, da diese die bei weitem größte Anzahl an Zellen im Kleinhirn ausmachen. In Übereinstimmung mit dieser Überlegung war unter den 154 Genen, die eine starke differentielle Expression in Math1⁺ Zellen zeigten, eine überproportional hohe Zahl an Genen, die in Zellzyklusregulation und Zellteilung involviert sind. Weiterhin waren Gene darunter, die bereits spezifisch mit der Entwicklung von Körnerzellen in der EGL assoziiert worden waren, wie Cxcr4 (Klein et al., 2001; Ma et al., 1998; Vilz et al., 2005; Zou et al., 1998) und Sufu (Kim et al., 2011). Trotzdem birgt dieser Ansatz das Risiko auch Gene als entwicklungsabhängig reguliert zu identifizieren, die in der Körnerzelllinie per se angereichert sind, unabhängig vom Entwicklungsstadium der Zellen. Die an zehn aus diesen Microarray Daten ausgewählten Genen durchgeführten in-situ-Hybridisierungen zeigen jedoch, dass über diesen Ansatz ein hoher Prozentsatz an positiven Ergebnissen erzielt werden kann.

4.2 Der Transkriptionsfaktor Cux1

Der Transkriptionsfaktors Cux1 wurde aus den Microarray Daten ausgewählt, da Cux1 in der Literatur wiederholt mit der Regulation der Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen in peripheren Geweben assoziiert wurde (Alcalay and Vanden Heuvel, 2009; Kedinger and Nepveu, 2010; Xu et al., 2010). Weiterhin wurde eine Dysregulation von Cux1 in verschiedenen Tumoren peripheren Ursprungs beobachtet (Michl et al., 2005; Ripka et al., 2010). Außerdem wurde dieser Transkriptionsfaktor mit Prozessen neuronaler Reifung, wie z.B. der dendritischen Verzweigung, Entwicklung von Spines und Bildung von Synapsen im Neocortex, in Verbindung gebracht (Cubelos et al., 2010). Inwieweit Cux1 eine Rolle bei der Histogenese und Pathogenese des Kleinhirns spielt ist bisher jedoch noch nicht bekannt.

Auf molekularer Ebene wurde Cux1 sowohl mit dem Wnt Signalweg, als auch dem TGF- β Signalweg assoziiert (Jackson et al., 1999; Kedinger et al., 2009; Michl et al., 2005; Ripka et al., 2007b) (Abb. 58). Cux1 erhöht die Expression von Mitgliedern den kanonischen und auch des nicht-kanonischen Wnt Signalweges (Cadieux et al., 2009; Ripka et al., 2007a). Außerdem ist Cux1 ein Zielgen des TGF- β Signalweges und wirkt seinerseits als Repressor TGF- β -aktivierter Gentranskription, indem es die Expression des TGF- β TypII Rezeptors unterdrückt (Jackson et al., 1999). Die Wnt und TGF- β Signalwege spielen eine wichtige Rolle in der normalen Kleinhirnentwicklung und auch in der Tumorgenese des Kleinhirns (Aref et al., 2012; Pöschl et al., 2013; Schüller and Rowitch, 2007).

Weiterhin nimmt Cux1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellteilung ein. Cux1 interagiert mit E2F Transkriptionsfaktoren, die auch Shh-induzierte Genexpression vermitteln, bei der transkriptionellen Aktivierung Zellzyklus-abhängig regulierter Gene (Truscott et al., 2008) (Abb. 58). Cux1 stellt außerdem die DNA-bindende Untereinheit des HINF-D Komplexes dar und beeinflusst somit die Expression von Histon Proteinen, mittels derer die bei der Zellteilung neu synthetisierte DNA in Chromatin verpackt wird (van Wijnen et al., 1996). Cux1 kann jedoch, bei Schädigung der DNA, auch hemmend auf den Zellzyklus wirken. In diesem Zusammenhang reguliert es die Expression von wichtigen, die Zellteilung unterdrückenden Genen, die bei Schädigung der DNA aktiviert werden wie Cdkn1a (p21), p53 und ATM (Coqueret et al., 1998; Vadnais et al., 2012).

Einen weiteren wichtigen Punkt für die Auswahl dieses Gens stellte die Lokalisation des Cux1 Gens auf Chromosom 7q22 dar, einer Region, die in Medulloblastomen häufig amplifiziert ist (Avet-Loiseau et al., 1999; Nishizaki et al., 1999; Reardon et al., 1997; Tong et al., 2004). Daher muss man fragen, ob der Transkriptionsfaktor Cux1 eine Rolle bei der Körnerzellentwicklung des Kleinhirns und der Entstehung von Medulloblastomen einnimmt.

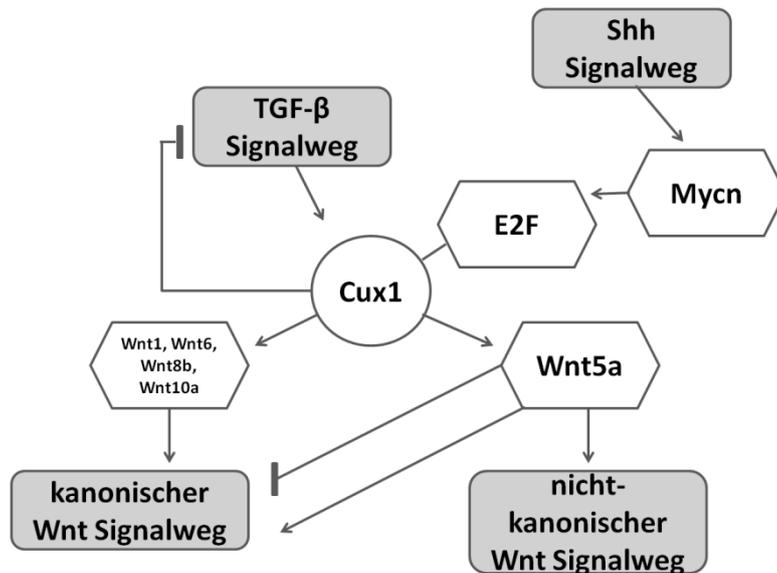


Abb. 58: Interaktion von Cux1 mit dem TGF- β , Wnt und Shh Signalweg. Die Aktivität von Cux1 wird direkt durch den TGF- β Signalweg reguliert, umgekehrt kann Cux1 hemmend auf den TGF- β Signalweg wirken. Cux1 aktiviert sowohl den kanonischen, als auch den nicht-kanonischen Wnt Signalweg über verschiedene Zielgene. Wnt5a, das über Cux1 hochreguliert wird, ist ein Effektor des nicht-kanonischen Wnt Signalweges, kann allerdings auch sowohl eine aktivierende, als auch eine hemmende Wirkung auf den kanonischen Wnt Signalweg ausüben. Weiterhin interagiert Cux1 mit E2F Transkriptionsfaktoren, deren Expression in den Körnerzellen des Kleinhirns über den Shh Signalweg induziert wird. Basierend auf Cadieux et al., 2009; Jackson et al., 1999; Michl et al., 2005; Oliver et al., 2003; Ripka et al., 2007a & Truscott et al., 2008.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Cux1 während der normalen Histogenese der Kleinhirnrinde der Maus spezifisch und transient in Zellen der Körnerzelllinie exprimiert wird. Die Vermutung, dass es eine regulatorische Rolle während der Körnerzellentwicklung spielt wird zusätzlich über seine starke Expression in Körnerzell-abgeleiteten Medulloblastom-Mausmodellen bestärkt. In humanen Medulloblastomproben wird Cux1 konsistent, jedoch weniger stark, als in fetalem Kleinhirngewebe, exprimiert. In den humanen Tumorproben ist die Expression von Cux1 auffällig mit der anderer in die DNA-Schadensantwort involvierter Gene

korreliert. Die Reduktion von Cux1 in humanen Medulloblastomzelllinien, die eine robuste Cux1 Expression aufweisen, beeinflusst die Proliferation, Adhäsion und Migration dieser Zellen.

Die zelluläre und räumlich-zeitliche Expression von Cux1 im Kleinhirn der Maus wurde über in-situ-Hybridisierung verifiziert. Die starke Expression in proliferierenden Körnerzellvorläufern, in unreifen, migrierenden Körnerzellen und in der unreifen, sich entwickelnden IGL lässt eine Rolle für Cux1 während dieser essenziellen Schritte der Körnerzellentwicklung vermuten. Daher erscheint die starke Expression von Cux1 in einem Mausmodell für Medulloblastome, aufgrund des Körnerzellursprungs dieser Tumore, nicht allzu überraschend. Im Gegensatz dazu findet sich in humanen Medulloblastomen keine Überexpression von Cux1, es wird jedoch in allen Subgruppen dieses Tumors exprimiert. Bei der Suche nach der Funktion von Cux1 bieten humane Medulloblastomzelllinien die Möglichkeit, die Expression von Cux1 experimentell mit dem Verhalten der Zellen in Verbindung zu bringen.

Um eine genauere Aussage über die Funktion von Cux1 in der Körnerzellentwicklung und in Medulloblastomen treffen zu können, wurde die Expression von Cux1 in zwei Medulloblastomzelllinien reduziert. Hierbei sollte speziell die p110 Isoform von Cux1 herunterreguliert werden, da vorhergehende Studien diese Isoform mit Zellproliferation (Sansregret et al., 2006), und der Migration und Invasion von Tumorzellen in Verbindung gebracht hatten (Kedinger et al., 2009). Die selektive Reduktion der Cux1 p110 Isoform (und auch der p200 Isoform, von welcher die p110er Isoform über proteolytische Spaltung generiert wird (Moon et al., 2001)) bringt diese Isoform, mehr noch als die p75er Cux1 Isoform, direkt mit den hier beobachteten Effekten in Verbindung. Sowohl die Reduktion der Proliferation (Abb. 29A, B), als auch die verminderte Motilität (Abb. 33A, B) die in D283Med und Daoy Zellen nach der Cux1 Reduktion beobachtet wurden, stim-

men mit den in mehreren nicht-Hirntumoren beschriebenen Effekten auf die Proliferation und Migration überein (Kedinger and Nepveu, 2010; Michl et al., 2005; Ripka et al., 2007c).

Der Effekt von Cux1 auf die Proliferation von Medulloblastomzellen kann zudem über dessen Wirkung auf die Expression von Cdkn1a, einem Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, erklärt werden. In nicht-Tumorzelllinien murinen (NIH3T3) und humanen (Hek293T) Ursprungs konnte gezeigt werden, dass Cux1 die Expression von Cdkn1a während der S-Phase des Zellzyklus unterdrückt (Coqueret et al., 1998). Cdkn1a blockiert das Fortschreiten des Zellzyklus, indem es über eine direkte Interaktion mit dem proliferating cell nuclear antigen (PCNA) dessen Funktion hemmt und somit die Replikation der DNA unterdrückt (Flores-Rozas, 1994; Waga et al., 1994). Die nach stabiler antisense-vermittelter Reduktion von Cux1 mittels Durchflusszytometrie beobachtete Reduktion PCNA-positiver Zellen deutet auf einen ähnlichen Mechanismus in Medulloblastomzellen hin. In diesem Fall wäre es denkbar, dass die Bindestelle des PCNA Antikörpers aufgrund der Interaktion von PCNA und Cdkn1a nicht mehr zugänglich wäre. Dass es in den beiden verwendeten Medulloblastomzelllinien nach dem knockdown von Cux1 tatsächlich zu verminderter Zellproliferation kommt wird weiterhin durch die mittels Impedanz-basierter Echtzeitanalysen erzielten Beobachtungen bekräftigt.

Die Analyse der mittleren quadratischen Teilchenverschiebung (MSD) der Medulloblastomzellen deutet auf eine weitere Funktion von Cux1 hin. In D283Med Zellen führt die Reduktion von Cux1 zu einer MSD, die auf eine subdiffusive oder „eingezäunte“ Migration hinweist (Burov et al., 2011). Aufgrund der unstrukturierten, anisotropen Beschaffenheit des verwendeten Zellkultursubstrates würde man jedoch diffusive Migration (wie dies bei den Daoy Zellen und den untransfizierten, sowie Leervektor transfizierten D283Med Zellen beobachtet wurde) erwarten. Es stellt sich daher die Frage, wodurch die bei den D283Med Zellen nach

Cux1 knockdown beobachtete eingeschränkte Migration hervorgerufen wird. Eine mögliche Erklärung hierfür wären transiente Zell-Zell Kontakte, oder eine veränderte Interaktion der Zellen an Stellen, an denen das Substrat durch andere migrierende Zellen modifiziert wurde. Es ist bekannt, dass Zellen zumindest Teile ihrer Wegstrecke über spezifische Komponenten „markieren“ (Thurner et al., 2003). Unter diesen Umständen könnte der knockdown von Cux1 die Abgabe dieser markierenden Komponenten verändern oder die Auswirkung dieser Markierungen auf die Wanderung der Zellen. Auch die normale Migration der Körnerzellen in vivo hängt von sich dynamisch verändernden Interaktionen mit zellulären und extrazellulären Substraten ab, insbesondere von Reelin (Rice and Curran, 2001). Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, dass Cux1 im Vorderhirn bereits mit der Kontrolle der Expression von Reelin in Verbindung gebracht wurde (Cubelos et al., 2008); zudem wird Reelin auch in Medulloblastomen (Corcoran and Scott, 2001; Wetmore et al., 2000) sowie in den hier verwendeten Medulloblastomzelllinien exprimiert (Mayanil et al., 2001; Vibhakar et al., 2007).

Die unterschiedlichen Effekte der Reduktion von Cux1 auf die MSD in D283Med und Daoy Zellen kommen zu den bereits bekannten molekularen Unterschieden zwischen diesen Zelllinien hinzu (Lau et al., 2010; Studebaker et al., 2010). Wie in vorhergegangenen Studien beschrieben, ist die molekulare Biologie der Daoy Zelllinie weniger typisch für Medulloblastome, als die der D283Med Zelllinie (Studebaker et al., 2010). Konzeptionell weisen die vorliegenden Ergebnisse auf Unterschiede in den Möglichkeiten dieser, von einem primären Tumor abgeleiteten (Daoy (Jacobsen et al., 1985)) und von einer Metastase abgeleiteten, (D283Med (Friedman et al., 1985)) Zelllinien die extrazelluläre Matrix zu verändern oder mit dieser zu interagieren, hin.

Die unterschiedlichen Auswirkungen der Reduktion von Cux1 in D283Med und Daoy Zelllinien deuten darauf hin, dass der Effekt von Cux1 (und dessen Manipulation) Medulloblastom Typ-spezifisch sind. Cux1 wird in allen von Taylor et al. (2011) aufgrund molekularer Unterschiede definierten Subgruppen menschlicher Medulloblastome exprimiert. Die Mittlere Cux1 Expression in den einzelnen Subgruppen unterscheidet sich jedoch in den beiden analysierten Datensätzen. Relativ zu der mittleren Expression von Cux1 in den anderen Subgruppen ist diese in den Tumoren des von Remke et al. publizierten Datensatzes in den Subgruppen Shh und Gruppe 3 deutlich höher, als in den Tumoren des von Kool et al. veröffentlichten Datensatzes. Da die in den beiden Datensätzen enthaltenen Tumorproben von unterschiedlichen Patienten stammen und die Gruppierung der einzelnen Tumorproben in die verschiedenen Subgruppen zwar nach ähnlichen Kriterien, jedoch nicht identisch durchgeführt wurde, sind gewisse Unterschiede bei der Analyse der beiden Datensätze zu erwarten. Beiden Datensätzen gemeinsam ist jedoch, dass die im Mittel höchste Cux1 Expression in Medulloblastomen der Gruppe 4 zu finden ist. Diese ist durch eine Überrepräsentation von Genen, die in neuronale Differenzierung involviert sind, gekennzeichnet. Die stärkste Abweichung unter der mittleren Cux1 Expression in den Subgruppen der beiden Datensätze findet sich bei Medulloblastomen der Subgruppe 3. Innerhalb dieser Gruppe findet sich laut Taylor et al. (2011) die höchste Heterogenität, was eine Erklärung für die oben beobachtete Abweichung bieten könnte. In einigen Tumoren dieser Subgruppe wurde zudem eine hohe Zahl an genetischen Veränderungen in Genen des TGF- β Signalweges identifiziert (Northcott et al., 2012b). Wie bereits erwähnt wurde Cux1 wiederholt mit den Wnt und TGF- β Signalwegen assoziiert. Die hohe Cux1 Expression in einigen Tumoren der Subgruppe 3 könnte daher mit einer Fehlregulation des TGF- β Signalweges in diesen Medulloblastomproben einhergehen.

Dass Cux1 in allen Subgruppen humaner Medulloblastome heterogen exprimiert wird deutet jedoch auf eine fundamentalere Rolle dieses Transkriptionsfaktors als nur die Modifikation der Wnt und TGF- β Signalwege hin. Um weitere Hinweise auf eine mögliche Rolle des Cux1 Gens in Medulloblastomen zu erlangen wurde überprüft mit welchen Genen die Expression von Cux1 in den Medulloblastomproben der beiden Datensätze am stärksten korreliert.

Um Korrelate der Expression verschiedener Gene zu finden und zu quantifizieren wurden Methoden entwickelt, die nicht nur einfache lineare Korrelation erfassen. Hier sei zum Beispiel auf die MIC Methode von Reshef et al. hingewiesen (Reshef et al., 2011). Bei der hier durchgeführten Korrelationsanalyse wurde die Distanzkorrelation (Székely and Rizzo, 2009) bzw. die Hoeffdingsche Unabhängigkeit (Hoeffding, 1948) verwendet. Die Auswahl dieser Methoden stützte sich dabei auf die Kritik und Empfehlungen von Simon und Tibshirani (Simon and Tibshirani, 2011). Da die Interpretation der Stärke der gezeigten Korrelationen nicht trivial ist (Reimherr and Nicolae, 2013) wurde hier bewusst auf eine numerische Quantifizierung verzichtet und stattdessen die bildliche Darstellung der Korrelationsergebnisse gewählt. Damit soll auch betont werden, dass die Korrelation als initiale „screening“-Technik benutzt werden soll, um Kandidaten für nachfolgende funktionelle Experimente zu identifizieren.

Bei den neunzehn mittels dieses Ansatzes identifizierten Genen fiel zum einen auf, dass mehr als ein Drittel dieser Gene auf Chromosom 7q lokalisiert sind, auf welchem sich auch das Cux1 Gen befindet. Dies spricht für den methodischen Ansatz zur Identifikation von mit Cux1 korrelierten Genen. Ein wichtiges Ergebnis dieser Korrelationsanalyse ist die Beobachtung, dass ein großer Teil der identifizierten Gene, wie auch Cux1, die Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 regulieren. Für Cux1 konnte bereits in verschiedenen Zelllinien eine Funktion als transkriptioneller Aktivator des p53 Gens nachgewiesen werden (Harada et al., 2008;

Vadnais et al., 2012). Fünf der neunzehn in den Medulloblastomproben der beiden Datensätze positiv mit Cux1 korrelierten Gene unterstützen die Funktion von p53, indem sie als Ko-Aktivatoren p53-aktivierter Gentranskription fungieren (Ttrap: Ard et al., 2002; Kmt2c: J. Lee et al., 2009), den proteasomalen Abbau von p53 verhindern (Usp42: Hock, Vigneron, Carter, Ludwig, & Vousden, 2011; Casp2: Oliver et al., 2011) oder eine direkte Aktivierung von p53 mittels Proteinmodifikation bewirken (Hipk2: Puca, Nardinocchi, Givol, & D’Orazi, 2010). Ein Gen, dessen Expression mit der von Cux1 negativ korreliert, vermittelt hingegen den Export von p53 aus dem Zellkern und dessen Degradation (Cops5: X.-C. Zhang, Chen, Su, Yang, & Lee, 2008). Die mittels der Korrelationsanalyse gewonnenen Beobachtungen deuten somit darauf hin, dass Cux1 in humanen Medulloblastomen an der p53 vermittelten zellulären Antwort auf DNA Schädigung beteiligt ist. Bei einigen Medulloblastomproben, die eine vergleichsweise hohe Expression von Cux1 aufweisen, scheint die p53-vermittelte DNA Schadensantwort demnach initialisiert zu werden. Dass es in diesen Tumoren daraufhin nicht zu einem Wachstumsarrest bzw. zur Auslösung des Zelltodes kommt deutet auf eine Fehlregulation dieses Signalweges downstream von p53 hin. Umgekehrt deutet die generell im Vergleich zum fetalen Kleinhirn verminderte Expression von Cux1, und den mit Cux1 ko-regulierten Genen, die in die DNA-Schadensantwort involviert sind, in den Medulloblastomproben auf eine Unterdrückung dieses Signalweges hin. Somit könnte Cux1 durch seine Rolle in diesem Prozess in Medulloblastomen eher als Tumorsuppressor wirken. Diese These wird auch durch eine kürzlich erschienene Studie unterstützt, in der mittels des Sleeping Beauty Transposons in Mäusen, die heterozygot Träger der Patched Mutation sind, zufällig Gene ausgeschaltet wurden (Genovesi et al., 2013). In Mäusen, die infolgedessen Medulloblastome entwickelten wurde ermittelt, welche Gene besonders häufig aufgrund der Insertion des Transposons ausgeschaltet wurden. Cux1 wurde hier als eines dieser Gene identifiziert. Weiterhin wurde die Cux1 Expression auch von

den Autoren dieser Studie in menschlichen Medulloblastom-Subgruppen untersucht. Wie bei der hier durchgeführten Analyse der Datensätze von Kool et al. und Remke et al. war Cux1 auch in dem von Genovesi et al. analysierten Datensatz (GSE21140, (Northcott et al., 2010b)) in der Gruppe 4 am stärksten exprimiert. Da hier jedoch Vergleichsproben fehlen, kann keine Aussage über die Stärke der Expression im Vergleich zum gesunden Kleinhirn gemacht werden.

Die durch die Analyse der Cux1 Expression in humanen Medulloblastomproben gewonnenen Erkenntnisse werfen die Frage auf, warum im hier untersuchten Mausmodell eine Überexpression von Cux1 zu beobachten ist, während Cux1 in nahezu allen humanen Medulloblastomproben eine im Gegensatz zum sich entwickelnden Kleinhirn verminderte Expression aufweist. Möglicherweise kommt es im verwendeten Mausmodell als Reaktion auf die tumorigene Mutation im Shh Signalweg zur Induktion der DNA-Schadensantwort, die jedoch nicht erfolgreich ausgeführt wird. Unterstützt wird diese These durch von Leonard et al. und Vadnais et al. durchgeführte Studien. Im Jahr 2008 beschrieben Leonard et al., dass die Aktivierung des Shh Signalweges die über die Kinasen ATM und ATR vermittelte DNA-Schadensantwort verhindert (Leonard et al., 2008). Weiterhin konnten sie nachweisen, dass die Shh-induzierte Unterbrechung der DNA-Schadensantwort downstream der Aktivierung dieser beiden Kinasen stattfindet. In einer 2012 erschienenen Studie zeigten Vadnais et al., dass Cux1 die DNA-Schadensantwort unterstützt, indem es die Expression der Kinasen ATM und ATR fördert (Vadnais et al., 2012).

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass der Transkriptionsfaktor Cux1 in Körnerzellenvorläufern des Kleinhirns exprimiert wird und während der terminalen Differenzierung dieser Zellen herunterreguliert wird. Die funktionellen Daten stützen weiterhin die Annahme, dass Cux1 einen Einfluss auf ein ganzes Spektrum von Entwicklungsprozessen ausübt, von der Proliferation bis zur

Enddifferenzierung und bei Veränderungen der Zelladhäsion und Motilität, die für die postmitotische neuronale Migration benötigt werden.

Das Verständnis des Mechanismus über welchen Cux1 die Körnerzellen entweder in Richtung Proliferation oder zur terminalen Differenzierung anregt, sollte auch dabei helfen die Biologie von Medulloblastomen eingehender zu verstehen, in welchen es konsistent exprimiert wird. Eine ursächliche Rolle von Cux1 bei der Entstehung von Medulloblastomen ist aufgrund der hier gewonnenen Daten jedoch unwahrscheinlich. Dennoch zeigen die vorliegenden Daten, dass Cux1 in Medulloblastomen Prozesse reguliert, die essentiell für das Wachstum und Überleben dieser Tumorzellen sind. Cux1 fördert die Proliferation von Medulloblastomzellen, trägt jedoch gleichzeitig zur Aktivierung eines Schutzmechanismus bei, der, bei Schädigung des Erbgutes, die Zellteilung unterbindet. Daher ist es wichtig zu verstehen welche Prozesse zur Aktivierung der diversen Funktionen des Cux1 Transkriptionsfaktors in Medulloblastomen führen und welche Rolle die verschiedenen Isoformen von Cux1 in diesen Tumoren spielen.

Eine weitere spannende Frage, der in Zukunft nachgegangen werden sollte, ist wie Cux1 die Interaktion zwischen Zellen und mit der extrazellulären Matrix reguliert, da dieses Zusammenspiel einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die normale Entwicklung des Kleinhirns, als auch auf die Pathogenese von Medulloblastomen ausübt.

4.3 Die Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben wurde der Transkriptionsfaktor Tgif2 mittels der hier durchgeführten Microarray-Analyse als in Körnerzellvorläufern verstärkt exprimiert identifiziert. Der Transkriptionsfaktor Tgif1 wurde in die weiteren Analysen mit einbezogen, da bereits in einigen Geweben eine funktionelle Redundanz dieser beiden Transkriptionsfaktoren vermutet wurde (Powers et al.,

2010b; Satoh and Watanabe, 2008; Shen and Walsh, 2005; Taniguchi et al., 2012). Die Expression des Transkriptionsfaktors Tgif1 in Körnerzellvorläufern des Kleinhirns wurde bereits beschrieben, es konnte jedoch noch keine Aussage über dessen Funktion in der Körnerzellentwicklung gemacht werden (Bertolino et al., 1996a). Eine Expression von Tgif1 in Medulloblastomen wurde noch nicht beschrieben. Der Transkriptionsfaktor Tgif2 wurde aus den über die Microarrayanalyse identifizierten Genen zur weiteren Analyse ausgewählt, da er in der Literatur mehrfach als wichtiger Regulator von Entwicklungsprozessen beschrieben wurde (Powers et al., 2010a; Spagnoli and Brivanlou, 2008). Seine Rolle bei der Körnerzellentwicklung des Kleinhirns und der Pathogenese von Medulloblastomen wurde bisher jedoch nicht erörtert. Sowohl Tgif1, als auch Tgif2 fungieren als Regulatoren des TGF- β Signalweges, indem sie die Smad-aktivierte Genexpression unterdrücken (Melhuish et al., 2001). Somit wird die Antwort der Zelle auf ein TGF- β Signal vermindert. Aus der TGF- β Superfamilie unterdrücken Tgif1 und Tgif2 die Antwort auf TGF- β , Bmp und Nodal Signale (Melhuish et al., 2001; Powers et al., 2010b; Spagnoli and Brivanlou, 2008). Für Tgif1 konnte gezeigt werden, dass es durch TGF- β 1 und Activin hochreguliert wird und deren Effekt über eine negative Feedback-Schleife kontrolliert (Chen et al., 2003). Weiterhin konnte auch eine Rolle von Tgif1 als Repressor im Retinsäure (RA) Signalweg nachgewiesen werden (Bartholin et al., 2006a). Es wird vermutet, dass die negative funktionelle Interaktion zwischen dem TGF- β und dem Retinsäure Signalweg über Tgif1 vermittelt wird und dadurch die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung mit reguliert wird (Hamid and Brandt, 2009b; Zhang et al., 2009). Eine Interaktion von Tgif2 mit dem RA Signalweg wurde bereits mehrfach angenommen konnte jedoch noch nicht experimentell untermauert werden (Powers et al., 2010b; Satoh and Watanabe, 2008).

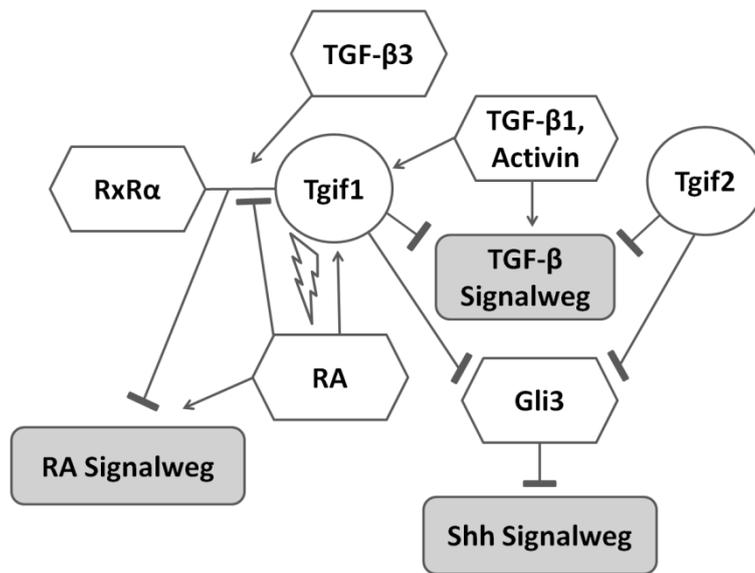


Abb. 59: Interaktion von Tgif1 und Tgif2 mit dem TGF- β und Retinsäure Signalweg. Sowohl Tgif1, als auch Tgif2 fungieren als Repressoren des TGF- β Signalweges. Die Aktivität von Tgif1 wird zudem über TGF- β Signalmoleküle beeinflusst. Weiterhin ist Tgif1 in den Retinsäure Signalweg involviert, indem es zusammen mit RXRa die Aktivierung des RA Signalweges unterdrückt, sowie die Degradation von RA induziert. Auch die Interaktion zwischen dem TGF- β und dem RA Signalweg wird über Tgif1 vermittelt. Basierend auf Bartholin et al., 2006b; Chen et al., 2003; Gongal & Waskiewicz, 2008; Knepper, James, & Ming, 2006; Melhuish et al., 2001; Wen, Li, Hu, Dai, & Liu, 2005 und Zhang et al., 2009.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2 spezifisch und transient in proliferationsaktiven Körnerzellvorläufern des Kleinhirns exprimiert werden. Dies spricht für eine mögliche Funktion dieser beiden Gene bei der Förderung bzw. Aufrechterhaltung der Teilungsaktivität dieser Zellen. Diese Hypothese wird auch durch die hohe Expression dieser Transkriptionsfaktoren in Medulloblastomen, sowie über die beobachteten Effekte einer Reduktion dieser Gene in Medulloblastomzelllinien, unterstützt. Die Vermutung, dass die Unterdrückung der Expression von Tgif1 und Tgif2 zur Einleitung der Differen-

zierung von Körnerzellvorläufern beitragen könnte wird durch die Effekte des Knockdowns dieser Gene in NT-2 Zellen nahegelegt.

Die räumlich-zeitlichen Expressionsmuster von Tgif1 und Tgif2 wurden über in-situ-Hybridisierung analysiert. Die bei Tgif1 beobachtete Expression im äußeren Teil der EGL deckt sich mit dem von Bertolino, Wildt, Richards, & Clerc (1996) beschriebenen Expressionsmuster. Da diese Schicht die teilungsaktiven Vorläufer der Körnerzellen des Kleinhirns beherbergt liegt die Vermutung nahe, dass Tgif1 eine Rolle bei der Proliferation der Körnerzellvorläufer spielt. Für verschiedene periphere Gewebe konnte bereits ein proliferations-fördernder Effekt von Tgif1 gezeigt werden (Hamid and Brandt, 2009a; Mar and Hoodless, 2006; Yeh et al., 2012). Dass ein ähnliches Expressionsmuster auch bei Tgif2 beobachtet wurde spricht für die bereits mehrfach postulierte Hypothese, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren eine funktionelle Redundanz zeigen (Satoh and Watanabe, 2008; Shen and Walsh, 2005; Taniguchi et al., 2012). Tgif2 wurde bisher noch nicht konkret mit der Regulation der Zellproliferation in Verbindung gebracht, allerdings bewirkt es wie auch Tgif1 die Repression TGF- β -aktivierter Gentranskription (Melhuish et al., 2001), welche meist eine inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum ausübt.

Der Effekt der beiden Transkriptionsfaktoren auf die Zellproliferation wurde hier in vitro an humanen Medulloblastom-, sowie an Teratokarzinomzelllinien überprüft. Während eine Reduktion beider Gene in den untersuchten Zelllinien zu einer Verminderung der Zellteilung führte, zeigte die Herunterregulation nur eines der beiden Gene in den Medulloblastomzelllinien einen stark unterschiedlichen Effekt. Die Ursache, warum die Reduktion von Tgif1 zu einer Abschwächung der Proliferation führte, die Reduktion von Tgif2 allerdings zu verstärkter Zellteilung, könnte an einer kompensatorischen Überexpression von Tgif1 in den Zellen, in denen die Tgif2 Expression unterdrückt wird, liegen.

In Tumoren peripheren Ursprungs wurden Tgif1 und Tgif2 bereits mehrfach als mögliche Onkogene beschrieben (Hamid and Brandt, 2009a; Imoto et al., 2000; Lips et al., 2008; Lujambio et al., 2008; Yeh et al., 2012). Hier konnte nun auch in Medulloblastomen eine hohe Expression von Tgif1 und Tgif2 nachgewiesen werden. Mithilfe der Regressionsanalyse zeigte sich zudem, dass die Expression dieser beiden Gene in den Medulloblastomproben stark miteinander korreliert. Dies legt die Vermutung nahe, dass Tgif1 und Tgif2 auch in Medulloblastomen redundante Funktionen ausüben könnten.

Dass beide Transkriptionsfaktoren sowohl im Shh-assoziierten Mausmodell, als auch in der Shh Subgruppe humaner Medulloblastome eine stark erhöhte Expression zeigen könnte an einem Effekt auf den Transkriptionsfaktor Gli3 zurückzuführen sein. Taniguchi et al., (2012) beschreiben, dass ein Funktionsverlust von sowohl Tgif1, als auch Tgif2 zu einer Hochregulation von Gli3 führt. Da Gli3 antagonistisch auf den Shh Signalweg wirkt ist hierbei auch eine verminderte Aktivität dieses Signalweges zu beobachten. Vorstellbar wäre nun, dass eine erhöhte Expression der Tgif Transkriptionsfaktoren, wie sie in den Medulloblastomen detektiert wurde über eine Reduktion von Gli3 zu verstärkter Aktivität des Shh Signalweges führt. In diesem Szenario könnte das konstitutiv aktivierte Smo im Shh Mausmodell indirekt über eine Aktivierung der Tgif Transkriptionsfaktoren und die dadurch gehemmte Aktivität von Gli3 die Aktivierung des Shh Signalweges weiter verstärken. Eine negative funktionelle Interaktion des Shh und des TGF- β Signalweges ist auch bei der Reifung der Körnerzellvorläufer des Kleinhirns beteiligt (Rios et al., 2004).

Dass beide Transkriptionsfaktoren auch in der Wnt Subgruppe humaner Medulloblastome hoch exprimiert werden war zu erwarten, da diese Gruppe auch durch eine erhöhte Expression von Mitgliedern des TGF- β Signalweges charakterisiert ist (Kool et al., 2008). Möglicherweise kommt es in dieser Gruppe aufgrund

der Aktivierung einer negativen Feedback-Schleife zur Hochregulation der Tgif Transkriptionsfaktoren. Tgif1 zeigt zudem, im Gegensatz zu Tgif2 eine im Mittel verstärkte Expression in der Gruppe 3 Medulloblastom Subgruppe. Bei Tgif2 ist die mittlere Expression in Gruppe 3 Tumoren relativ niedrig, ein Teil dieser Tumoren zeigt jedoch auch für Tgif2 eine stärkere Expression. Vor kurzem wurde auch diese Subgruppe mit dem TGF- β Signalweg in Verbindung gebracht. In einer Studie, in der bei über tausend Medulloblastomen nach Veränderungen im Erbgut gesucht wurde, fand man speziell in Gruppe 3 Tumoren eine hohe Zahl an Veränderungen, die Gene der TGF- β Superfamilie betrafen (Northcott et al., 2012b). Taylor et al. (2011) beschreiben zudem die Existenz von Subtypen innerhalb der Medulloblastom Subgruppen, welche besonders innerhalb der Gruppe 3 auftreten. Auch für die Expression von Tgif1 und Tgif2 zeigt sich in dieser Gruppe eine deutliche Spaltung der Tumore in zwei Untergruppen. Interessant ist auch, dass sowohl Tgif1 als auch Tgif2 in Tumoren der Subgruppe 4 eine sehr niedrige Expression zeigen und dass trotz der Größe dieser Gruppe hier kaum eine Streuung auftritt. In dieser Gruppe findet man häufig Überexpressionen von Genen, die in die neuronale Differenzierung involviert sind bzw. Marker für neuronale Differenzierung darstellen (Cho et al., 2010; Kool et al., 2008; Northcott et al., 2010b). Dies steht in Einklang mit dem in vivo Expressionsmuster dieser beiden Transkriptionsfaktoren, sowie den Ergebnissen der hier durchgeführten in vitro Experimente an humanen Teratokarzinomzellen.

Die Beobachtung, dass Tgif1 und Tgif2 in der humanen NT-2 Zelllinie exprimiert werden, nach der neuronalen Differenzierung dieser Zellen über Retinsäure jedoch stark herunterreguliert werden, deckt sich mit dem über die in-situ-Hybridisierung identifizierten Expressionsmustern der beiden Gene, welches zeigt, dass diese auch in vivo nur in undifferenzierten Vorläuferzellen exprimiert werden. Die Reduktion der beiden Transkriptionsfaktoren führte auch in der NT-2 Zelllinie zu verminderter Proliferation was deren mögliche Rolle als proliferations-

fördernde Faktoren weiter unterstützt. Die Beobachtung, dass eine stabile Reduktion von sowohl Tgif1, als auch Tgif2 in NT-2 Zellen zusätzlich zur Proliferationshemmung auch zu einer Veränderung des Phänotyps und der Genexpression in Richtung neuronalem Zelltyp führt, legt die Vermutung nahe, dass diese Transkriptionsfaktoren an der Schnittstelle von Proliferation zu Differenzierung stehen und an deren Regulation beteiligt sind.

Der Mechanismus, über den Tgif1 und Tgif2 in den Übergang von Proliferation zu Differenzierung involviert sind stellt eine für die Zukunft interessante Fragestellung dar, da dies ein essentieller Prozess in der normalen Entwicklung des Kleinhirns ist, der auch bei der Entstehung von Medulloblastomen eine wichtige Rolle spielt. Hierbei wäre auch noch zu klären, inwiefern Tgif1 und Tgif2 eine redundante Funktion in diesem Prozess ausüben. Einen besonders spannenden Untersuchungsgegenstand stellt die Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren mit dem Shh Signalweg dar, da dieser unerlässlich für die Entwicklung der Körnerzellpopulation ist und dessen Dysfunktion eine häufige Ursache bei Entstehung von Medulloblastomen darstellt.

4.4 Der Wnt Rezeptor Fzd3

Der Fzd3 Rezeptor wurde aus den Microarray Daten zur weiteren Analyse ausgewählt, da er ein Mitglied des Wnt Signalweges und an diversen Entwicklungsprozessen, sowie an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt ist (Lee et al., 2008; Wang et al., 2002). Die Rolle von Fzd3 bei der Entwicklung des Kleinhirns und in der Entstehung von Medulloblastomen wurde jedoch noch nicht untersucht. Fzd3 wird hauptsächlich mit der Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt Signalweges in Verbindung gebracht. Innerhalb der neuronalen Entwicklung ist der Fzd3 Rezeptor in die Ausbildung von axonalen Fortsätzen involviert (Sasselli et al., 2013; Wang et al., 2002). Fzd3 ist in vielen Tumoren hochreguliert (Caldwell

et al., 2008, 2010; Katoh, 2005; Lee et al., 2008; Liss et al.; Lu et al., 2004; Mahadevan et al., 2009; Reins et al., 2010). Dies konnte in einer kürzlich erschienenen Studie auch für Medulloblastome gezeigt werden (Salsano et al., 2012). Mechanistisch wurde Fzd3 bereits mehrfach eine Rolle in der Regulation von Zellmigration zugeschrieben (Hansen et al., 2009; Kaucká et al., 2013; Luyten et al., 2010; Mahadevan et al., 2009; Pourreyron et al., 2012; Valastyan et al., 2009; Wada et al., 2006). Ein Signalmolekül, über das Fzd3 die Adhäsion, Migration und Invasion reguliert ist Wnt5a (Katoh, 2005; Kawasaki et al., 2007; Pourreyron et al., 2012). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass Fzd3 die Expression von Cdc42 reguliert und dass dieser Prozess über ein Wnt5a initiiert werden kann (Hansen et al., 2009; Luyten et al., 2010). Im Kleinhirn kontrolliert Cdc42 die Migration der unreifen Körnerzellvorläufer, sowie das Auswachsen neuronaler Fortsätze von Körnerzellen (Ahmed et al., 2006; Solecki et al., 2006).

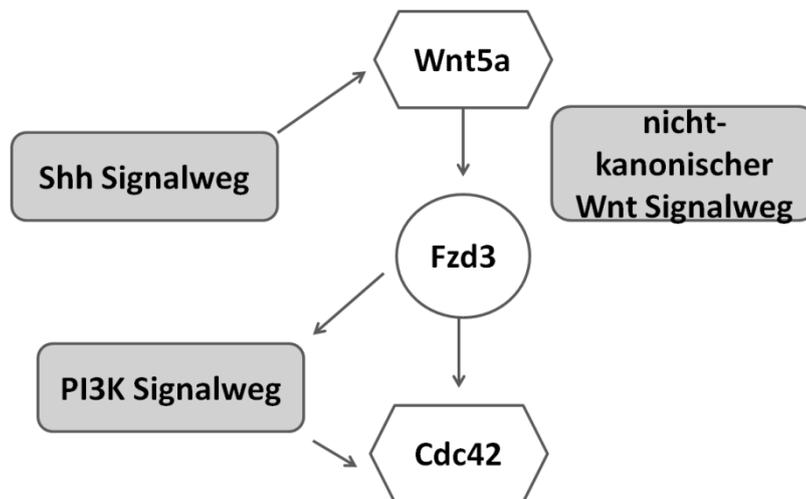


Abb. 60: Interaktion von Fzd3 mit verschiedenen Signalwegen. Der Fzd3 Rezeptor vermittelt über Wnt Liganden Signale des nicht-kanonischen Wnt und PCP Signalweges. Ein bekannter Ligand des Fzd3 Rezeptors ist Wnt5a, welches eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellmigration ausübt. Die Expression von Wnt5a wird auch über den Shh Signalweg reguliert. Fzd3 Signale können den PI3 Kinase Signalweg aktivieren und somit sowohl direkt, als auch indirekt die Expression von Cdc42 regulieren. Basierend auf M. Katoh, 2005; Y. Katoh & Katoh, 2009; Kawasaki et al., 2007 und Luyten et al., 2010.

Die hier beobachtete Expression von Fzd3 in der inneren EGL des postnatalen Kleinhirns deutet auf eine Rolle von Fzd3 bei der Migration der Körnerzellen hin. Die hohe Expression von Fzd3 in Medulloblastomen spricht für eine verstärkte Aktivierung und eine Rolle des nicht-kanonischen Wnt Signalweges in diesen Tumoren.

Mittels in-situ-Hybridisierung konnte das Fzd3 Transkript in frühen Postnatalstadien im inneren Anteil der EGL, sowie in vereinzelt Zellen innerhalb der IGL detektiert werden. Es wurde jedoch keine Expression in späteren Postnatalstadien sowie in reifen Körnerzellen beobachtet. Die Expression von Fzd3 im Kleinhirn der Maus wurde bereits von Tissir & Goffinet (2006) beschrieben.

ben. Auch hier wurde das Fzd3 Transkript an P0 und P10 in der EGL detektiert, wobei hier nicht zwischen innerer und äußerer EGL unterschieden wurde. Mit der in dieser Studie verwendeten Sonde zeigte sich jedoch auch an P21 ein starkes Signal für Fzd3 in der gesamten IGL. Da die hier erstellte Sonde an einen anderen Bereich des Fzd3 Transkripts bindet, wäre es möglich, dass diese eine andere Isoform von Fzd3 erkennt, als die in oben genannter Studie verwendete Sonde. Für das humane Fzd3, welches auf dem Aminosäurelevel eine 98%ige Identität mit dem Maus Fzd3 besitzt, sind bereits mehrere im Kleinhirn exprimierte Isoformen bekannt (Kirikoshi et al., 2000; Sala et al., 2000). Über das räumlich-zeitliche Expressionsmuster dieser Isoformen im humanen Kleinhirn gibt es jedoch keine Daten. Das hier nachgewiesene Expressionsmuster im Kleinhirn der Maus, welchem möglicherweise eine Spleißvariante von Fzd3 zugrunde liegt, lässt zusammen mit den bereits bekannten Funktionen von Fzd3 einen Einfluss auf die Migration und das initiale Auswachsen von Axonen der Körnerzellen vermuten. Dies könnte über den Fzd3 Effektor Cdc42 vermittelt werden.

Im Shh Medulloblastom Mausmodell konnte eine starke Expression von Fzd3 nachgewiesen werden. Die Färbung ist hier jedoch teilweise homogen im Tumorgewebe, im Unterschied zu Cux1, Tgif1 und Tgif2, jedoch auch teilweise in konkret abgegrenzten Zonen verteilt. Ein solches Verteilungsmuster wurde für Fzd3 bereits in Tumoren der Haut beschrieben (Pourreyron et al., 2012). Es wurde vermutet, dass die Ursache hierfür in der Ausbildung von Wnt5a Gradienten zu finden sein könnte, wodurch die Motilität unterschiedlicher Subpopulationen von Tumorzellen erhöht werden sollte. Aufgrund der beobachteten Verteilung der Fzd3 Expression wäre es möglich, dass auch die Auswanderung einzelner Medulloblastomzellgruppen über einen solchen Mechanismus vermittelt wird.

Die starke Expression im Shh Mausmodell findet sich auch bei den humanen Medulloblastomgruppen wieder. Hier ist Fzd3 in allen Subgruppen robust expri-

miert. In Tumoren der Wnt und Gruppe 4 Subgruppen liegt die Expression von Fzd3 etwa auf dem Level der Expression im fetalen Kleinhirn. Eine im Vergleich zum fetalen Kleinhirn erhöhte Expression findet sich in Tumoren der Shh und Gruppe 3 Subgruppen. Die Vermutung, dass die verstärkte Expression des nicht-kanonischen Wnt Signalweges über Fzd3 mit einer Dysregulation des Shh Signalweges assoziiert ist wurde bereits von Salsano et al. (2012) aufgeworfen, da dessen Gruppe eine Hochregulation von Fzd3 in allen untersuchten Gewebeproben von Patched (Ptc)^{+/-} Mäusen beobachtet hatten. Da Ptc ein Antagonist des Shh Signalweges ist kommt es auch in diesen Mäusen zur Ausbildung von Medulloblastomen über eine Verstärkte Aktivierung des Shh Signalweges. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte in der Beobachtung liegen, dass der Fzd3 Ligand Wnt5a über den Shh Signalweg hochreguliert wird (Katoh and Katoh, 2009). Die schwächste Expression von Fzd3 findet sich in der Wnt Subgruppe, möglicherweise da in dieser Mitglieder des kanonischen Wnt Signalweges hochreguliert sind und dieser antagonistisch zum nicht-kanonischen Wnt Signalweg reguliert wird.

Zusammenfassend stellt Fzd3 ein weiteres Gen dar, welches eine wichtige Rolle während der Körnerzellentwicklung und der Medulloblastom Pathogenese spielen könnte. Hierbei ist hauptsächlich dessen Funktion bei der Migration dieser Zellen von Interesse. Inwiefern Wnt5a über den Fzd3 Rezeptor die Migration der Körnerzellen beeinflusst, beziehungsweise bei der Metastasierung von Medulloblastomen eine Rolle spielen könnte und ob diese Effekte über Cdc42 vermittelt werden stellt für die Zukunft eine interessante Fragestellung dar.

4.5 Der Transkriptionsfaktor Plagl1

Die Expression des Transkriptionsfaktors Plagl1 (Lot1/Zac1) war zum Zeitpunkt der Auswahl dieses Gens für die weitere Analyse aus den Math1 Microarray Daten bereits im Kleinhirn der Ratte beschrieben worden (Ciani et al., 2003). Die Auswahl von Plagl1 zur weiteren Untersuchung basierte darauf, dass es in der Entwicklung als Regulator von Apoptose und Zellzyklus-Arrest, sowie als mögliches Tumorsuppressorgen beschrieben worden war (Bilanges et al., 1999; Spengler et al., 1997; Varrault et al., 1998). Diese Funktion basiert neben seiner Eigenschaft als Co-Aktivator des p53 Transkriptionsfaktors, sowie als Co-Aktivator bzw. Co-Repressor von nukleären Rezeptoren auch auf einer direkten transkriptionellen Regulation (Hoffmann et al., 2003; Huang and Stallcup, 2000; Huang et al., 2001). Des Weiteren wird die Expression von Plagl1 über wachstumsfördernde Signalwege, wie den EGF Rezeptor Signalweg, unterdrückt (Abdollahi et al., 1999). Eine mögliche Rolle von Plagl1 in der Pathogenese von Medulloblastomen wurde bisher noch nicht beschrieben. Das humane Plagl1 Gen liegt auf Chromosom 6q24-6q25, einer Region, die in vielen Tumoren deletiert ist (Abdollahi et al., 1997). Auch bei Medulloblastomen kommt es häufig zu einem Verlust von 6q, oder einer Monosomie des Chromosoms 6 (Lo et al., 2007; Thompson et al., 2006). Zusätzlich kommt es auch über epigenetische Mechanismen häufig zu einer Unterdrückung der Plagl1 Expression in Tumoren (Abdollahi et al., 2003).

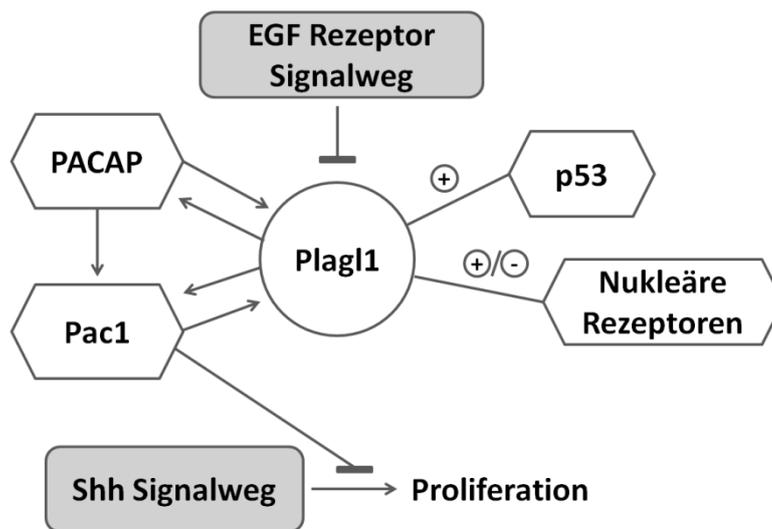


Abb. 61: Interaktion von Plagl1 mit dem EGF Rezeptor und Shh Signalweg, sowie mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Plagl1 wirkt als Inhibitor der Zellproliferation und als Initiator von Apoptose. Die Expression von Plagl1 wird über den proliferationsfördernden EGF Rezeptor Signalweg gehemmt. Plagl1 fördert die Expression von PACAP und dessen Rezeptor Pac1 und übt somit einen hemmenden Einfluss auf die Shh induzierte Proliferation aus. Zusätzlich zu seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor wirkt Plagl1 als Co-Aktivatoren von p53 bzw. als Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren von nukleären Rezeptoren. Basierend auf A Abdollahi et al., 1999; Gillardon, Hata, & Hossmann, 1998; A Hoffmann et al., 1998; Anke Hoffmann et al., 2003; Huang & Stallcup, 2000 und Nicot, Lelièvre, Tam, Waschek, & DiCicco-Bloom, 2002.

Die Expression von Plagl1 im Kleinhirn lässt auf eine mögliche Rolle während der Entwicklung der Körnerzellen schließen, in denen es transient in der Vorläuferpopulation der äußeren Körnerzellschicht exprimiert wird. Die Untersuchungen der Expression im Medulloblastom Mausmodell und in Subgruppen humaner Medulloblastome zeigen in Shh-assoziierten Medulloblastomen eine Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors was einerseits auf den Körnerzell-Ursprung dieser Tumore und andererseits auf eine Einbindung dieses Transkriptionsfaktors in die Regulation des Shh Signalweges zurückzuführen sein könnte.

Die über in-situ-Hybridisierung ermittelte Expression von Plagl1 in Körnerzellvorläufern während der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Expression. Da Plagl1 nur in frühen proliferativ aktiven Körnerzellvorläufern hergestellt wird deutet dies zusammen mit den bereits bekannten Funktionen dieses Transkriptionsfaktors auf eine Rolle bei der Zellzyklusregulation hin. Möglicherweise wird Plagl1 in Zellen der EGL exprimiert, um deren Proliferation zu unterbinden und den Austritt aus dem Zellzyklus zu initiieren.

Die Tatsache, dass Plagl1 in Shh-assoziierten Medulloblastomen eine robuste Expression aufweist steht damit in Einklang, dass diese aus proliferativ aktiven Körnerzellvorläufern entstehen, in denen Plagl1 zumindest transient exprimiert wird. In diesem Fall scheint die Funktion von Plagl1 als Zellzyklus Regulator bzw. Initiator von Apoptose über Mechanismen die downstream von Plagl1 liegen gestört zu sein. Weiterhin aktiviert Plagl1 die Expression von PACAP und dessen Rezeptors Pac1 und wirkt somit als negativer Regulator Shh-induzierter Proliferation. Möglicherweise kommt es aufgrund des konstitutiv aktiven Shh Signalweges zu einer kompensatorischen Verstärkung der Plagl1 Expression, die jedoch nicht ausreicht, um die proliferationsfördernde Wirkung des überaktiven Shh Signalweges zu hemmen.

Insgesamt könnte ein genaueres Verständnis der Regulation der transkriptionellen Aktivität von Plagl1, dessen komplexes Interaktionsnetzwerk mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie p53 und der Superfamilie der nukleären Rezeptoren und somit dessen Einfluss auf Signalwege die zu Apoptose bzw. Zellzyklushemmung führen, und im speziellen auch die Mechanismen, über welche Plagl1 die proliferationsfördernde Wirkung des Shh Signalweges in Körnerzellvorläufern hemmen könnte, die Möglichkeit bieten über deren Manipulation das Fortschreiten von Medulloblastomen zu unterbinden.

5 Zusammenfassung

Die Körnerzellen des Kleinhirns stellen die größte Zellpopulation des gesamten Gehirns dar. Vorläufer dieser Zellen können den häufigsten pädiatrischen Hirntumor, das Medulloblastom, bilden. Hierbei kommt es häufig zu Fehlregulationen in Signalwegen, die auch die Entwicklung der Körnerzellvorläufer steuern. In den letzten Jahren konnte das Verständnis der molekularen Grundlagen der Entwicklung von Medulloblastomen vertieft werden, es sind jedoch weitaus noch nicht alle beteiligten Gene identifiziert. In dieser Arbeit wurde nach neuen Genen gesucht, die möglicherweise eine Rolle in der Körnerzellentwicklung und der Medulloblastom-Pathogenese spielen könnten. Durch den Vergleich des Transkriptom von Körnerzellvorläufern und des gesamten Kleinhirns mittels Microarray-Analyse konnten zahlreiche Gene, die bisher noch nicht mit der Körnerzellentwicklung und/oder Pathogenese von Medulloblastomen in Verbindung gebracht worden waren, identifiziert werden. Bei sieben von zehn hieraus ausgewählten Genen konnte eine Expression in Körnerzellvorläufern verifiziert werden. Zur weiteren Analyse wurden die Gene *Cux1*, *Tgif1*, *Tgif2*, *Fzd3* und *Plagl1* ausgewählt. Die Expression dieser Gene wurde anschließend in einem Mausmodell Shh-abhängiger Medulloblastome analysiert. Alle fünf Gene zeigten eine im Vergleich zum sich entwickelnden und zum reifen Kleinhirn verstärkte Expression im Tumorgewebe dieser Mäuse. Weiterhin wurde die Expression der ausgewählten Gene in nach molekularen Subgruppen unterteilten menschlichen Medulloblastomen untersucht. Der Transkriptionsfaktor *Cux1* zeigte im Gegensatz zum Mausmodell in den humanen Tumoren eine im Vergleich zum sich entwickelnden Kleinhirn niedrigere Expression. Eine Korrelationsanalyse der Expression von *Cux1* in den humanen Medulloblastomproben ergab eine starke Häufung von Genen, die an der Regulation der p53-vermittelten DNA-Schadensantwort beteiligt sind. *Cux1* könnte daher in Medulloblastomen über die Beteiligung an der

Aktivierung der DNA-Schadensantwort als Tumorsuppressor fungieren. In humanen Medulloblastomzelllinien führte ein siRNA-vermittelter knockdown von Cux1, der in der Reduktion einiger Cux1 Isoformen resultiert, zu einer Verminderung der Proliferation und Motilität. Cux1 reguliert demnach wichtige Prozesse wie Zellproliferation und -migration, trägt jedoch im Falle von Schädigungen der DNA auch zur Aktivierung eines Schutzmechanismus bei. Die anderen untersuchten Gene, Tgif1, Tgif2, Fzd3 und Plagl1 waren jeweils in mehreren Subgruppen humaner Medulloblastome überexprimiert. Konsistent mit dem Mausmodell zeigten all diese Gene auch in der Subgruppe, die durch eine Fehlregulation des Shh Signalweges charakterisiert ist, eine verstärkte Expression. Funktionelle Analysen zur Rolle der Transkriptionsfaktoren Tgif1 und Tgif2 deuten auf eine mögliche Funktion dieser Gene bei der Regulation des Übergangs von Proliferation zu Differenzierung hin. So führte eine siRNA-vermittelte Reduktion von Tgif1 und Tgif2 zu einer Hemmung der Proliferation in humanen Medulloblastom- und Teratokarzinomzellen. In den untersuchten Teratokarzinomzellen kam es zudem zu einer Veränderung der Zellen in Richtung neuronaler Differenzierung. Das Expressionsmuster des Wnt Rezeptors Fzd3 in Körnerzellvorläufern und im Tumorgewebe des Medulloblastom-Mausmodells deutet auf eine Rolle bei der Migration sowohl der Körnerzellvorläufer, als auch der Medulloblastomzellen hin. Der Transkriptionsfaktor Plagl1 wirkt als Inhibitor der Zellproliferation und Initiator von Apoptose und wird in Körnerzellvorläufern transient exprimiert. Die Überexpression von Plagl1 im Medulloblastom-Mausmodell und einigen humanen Medulloblastomproben deutet auf eine erfolglose Einleitung eines Schutzmechanismus in den Tumorzellen hin. Weiterführende Analysen sollen die hier vermuteten Funktionen dieser Gene in der Entwicklung cerebellärer Körnerzellen und der Medulloblastom-Pathogenese aufklären.

6 Anhang

6.1 Ergänzende Ergebnisse

Tab. 23: Mittels der Microarray Datenanalyse als in Körnerzellvorläufern des Kleinhirns verstärkt exprimiert identifizierte Gene. Verglichen wurde die Expression in Math1⁺, proliferationsaktiven Körnerzellvorläufern mit der im Gesamtcerebellum. Insgesamt 154 verschiedene Gene wurden mittels des gewählten Ansatzes (mehr als zweifach erhöhte Expression in Körnerzellvorläufern im Vergleich zum Gesamtcerebellum, Identifikation über beide verwendeten Algorithmen) als differentiell exprimiert identifiziert. Probeset_ID: Sondengruppe für das jeweilige Gen auf dem Affymetrix Genchip, M: relativer Expressionswert, A: absoluter Expressionswert.

probeset_ID	Gensymbol	M	A	Algorithmus
1452415_at	Actn1	1.90860064	4.50676913	mas5
1427385_s_at	Actn1	1.56837815	3.44619894	gcrma
1452415_at	Actn1	1.39797804	3.49129575	gcrma
1431722_a_at	Afmid	1.01991847	2.84376524	mas5
1447638_at	Afmid	1.34819703	2.58543839	mas5
1452944_at	Afmid	1.83583868	4.24889993	mas5
1452944_at	Afmid	1.01987152	4.15157024	gcrma
1417826_at	Akr1e1	1.33818003	7.69998082	mas5
1417826_at	Akr1e1	1.49159594	7.53581772	gcrma
1455673_at	Alkbh2	1.58793861	6.21647826	mas5
1455673_at	Alkbh2	2.05143295	4.58836882	gcrma
1446534_at	Angptl2	-1.66596201	2.58547182	mas5
1450085_at	Angptl2	1.05501427	7.10365193	mas5
1421002_at	Angptl2	1.40113978	6.97911869	gcrma
1450085_at	Angptl2	1.14909722	6.60059528	gcrma
1455090_at	Angptl2	1.01519417	8.21819453	gcrma
1443978_at	Ankle1	1.03472694	7.29004212	mas5
1443978_at	Ankle1	1.2388304	6.72173565	gcrma
1450407_a_at	Anp32a	1.61530266	10.2460234	mas5
1450407_a_at	Anp32a	1.73809328	10.9303289	gcrma
1457827_at	Arsj	3.83883159	5.16221388	mas5
1457827_at	Arsj	3.2842501	5.67655261	gcrma
1425691_at	B3gat1	1.22159491	6.48183105	mas5
1425691_at	B3gat1	1.18850619	5.5429839	gcrma
1421282_at	Bmp5	2.17458788	4.20242233	mas5

1421283_at	Bmp5	1.04624451	5.43018542	gcrma
1435225_s_at	Brpf3	1.13049609	6.1821945	mas5
1435225_s_at	Brpf3	1.48853613	4.45471955	gcrma
1428377_at	Btbd11	1.29084825	8.78001044	mas5
1428377_at	Btbd11	1.31894424	8.99788669	gcrma
1438571_at	Bub1	1.15244511	7.16041802	mas5
1438571_at	Bub1	1.98853713	6.83831849	gcrma
1448659_at	Casp7	1.01564076	6.86572444	mas5
1448659_at	Casp7	1.30771359	5.96649569	gcrma
1451531_at	Cbwd1	1.18753749	5.89434635	mas5
1451531_at	Cbwd1	1.24077263	6.148901	gcrma
1424971_at	Ccdc99	1.01092819	8.6624292	mas5
1424971_at	Ccdc99	1.34440913	8.31293936	gcrma
1456077_x_at	Cdc25c	1.17841419	7.86604041	mas5
1422252_a_at	Cdc25c	1.23159249	7.72215559	gcrma
1456077_x_at	Cdc25c	1.44387323	7.79521761	gcrma
1456860_at	Cdc26	1.65133233	4.95231165	mas5
1452992_at	Cdc26	1.00591253	7.75935691	gcrma
1448466_at	Cdca5	1.17525407	9.04885484	mas5
1448466_at	Cdca5	1.21807484	9.0917832	gcrma
1451306_at	Cdca7l	1.01559447	9.41483657	mas5
1451306_at	Cdca7l	1.12542601	9.68021025	gcrma
1449637_at	Cdh4	-1.50499914	2.63876868	mas5
1456397_at	Cdh4	1.03598412	7.6413199	mas5
1456397_at	Cdh4	1.38596779	7.35877317	gcrma
1422494_s_at	Cdk20	1.32546774	5.61996399	mas5
1422494_s_at	Cdk20	1.01512351	5.38857932	gcrma
1421512_at	Cep250	2.78708619	5.03440669	mas5
1421512_at	Cep250	1.85466304	4.5619685	gcrma
1437209_at	Cep76	1.15087032	8.1223376	mas5
1437209_at	Cep76	1.42581279	7.94859828	gcrma
1437254_at	Cep76	1.11407949	6.03810672	gcrma
1425849_at	Chrn4	1.07177657	6.17890361	mas5
1425849_at	Chrn4	1.02672556	4.73689993	gcrma
1457008_at	Chrn4	1.51808306	6.42536267	gcrma
1421635_at	Cnnm4	-1.40087801	3.14072235	mas5
1431233_at	Cnnm4	1.03414952	8.01907912	mas5
1431233_at	Cnnm4	2.00124972	7.31985779	gcrma
1424667_a_at	Cux1	1.28059385	7.69444001	mas5
1424668_a_at	Cux1	2.09605168	6.93539992	mas5

1437431_at	Cux1	-1.03155764	6.63334287	mas5
1437686_x_at	Cux1	1.64654005	5.565077	mas5
1424667_a_at	Cux1	3.00030128	6.28680672	gcrma
1424668_a_at	Cux1	2.37828052	6.48107674	gcrma
1448710_at	Cxcr4	1.13130948	9.29017297	mas5
1448710_at	Cxcr4	1.18192739	9.07410851	gcrma
1439947_at	Cyp11a1	1.43086741	8.93870115	mas5
1448804_at	Cyp11a1	4.53951123	3.90795455	mas5
1457604_x_at	Cyp11a1	-1.13271684	1.7071639	mas5
1439947_at	Cyp11a1	1.35526825	8.86575376	gcrma
1448804_at	Cyp11a1	2.07707374	3.27933995	gcrma
1429847_a_at	Dcaf17	1.18447744	7.42060324	mas5
1433831_at	Dcaf17	1.48407026	6.79247532	mas5
1429847_a_at	Dcaf17	1.78979874	6.90913695	gcrma
1433831_at	Dcaf17	2.54031708	6.27599376	gcrma
1426438_at	Ddx3y	1.32305588	7.97608142	mas5
1452077_at	Ddx3y	1.16746871	7.52033984	mas5
1426438_at	Ddx3y	1.64065198	8.0039292	gcrma
1426439_at	Ddx3y	1.11979082	7.19043271	gcrma
1452077_at	Ddx3y	1.62635377	7.40322533	gcrma
1448616_at	Dvl2	1.44196123	5.9652115	mas5
1448616_at	Dvl2	1.06760351	5.13623909	gcrma
1427183_at	Efemp1	1.03794043	5.36140115	mas5
1427183_at	Efemp1	1.60829578	4.64399618	gcrma
1417065_at	Egr1	1.20671074	11.5535383	mas5
1417065_at	Egr1	1.30124302	11.4331459	gcrma
1427683_at	Egr2	1.67294395	8.2122405	mas5
1427682_a_at	Egr2	1.82037816	8.63009382	gcrma
1427683_at	Egr2	1.86107675	8.50197823	gcrma
1421486_at	Egr3	1.16992645	4.23132371	mas5
1436329_at	Egr3	1.4446301	5.19216753	mas5
1436329_at	Egr3	2.31118981	4.00571869	gcrma
1418276_at	Elf2	1.77439584	4.88858695	mas5
1428045_a_at	Elf2	1.19143239	7.04946728	gcrma
1420854_at	Eln	2.38670295	6.86625087	mas5
1420855_at	Eln	1.61169576	8.87007035	mas5
1420854_at	Eln	2.39001717	5.36942071	gcrma
1420855_at	Eln	1.51359992	8.26343851	gcrma
1454229_a_at	Eri2	1.00944201	7.26543879	mas5
1454229_a_at	Eri2	1.02020876	6.93921738	gcrma

1457882_at	Etaa1	1.12410275	5.76009752	mas5
1457882_at	Etaa1	1.07309222	4.46317555	gcrma
1430225_at	Exo1	1.14030975	5.2508659	mas5
1430225_at	Exo1	1.50959144	4.42793713	gcrma
1432052_at	Exosc1	2.92333366	5.76951397	mas5
1432052_at	Exosc1	2.81281031	5.6107618	gcrma
1417393_a_at	Fam132a	1.20195346	7.40188886	mas5
1455264_at	Fam132a	-1.15719439	3.00718119	mas5
1417393_a_at	Fam132a	1.43922812	6.57010347	gcrma
1439422_a_at	Fam132a	1.19654138	6.67527577	gcrma
1455467_at	Fam188b	1.17022306	5.34267435	mas5
1455467_at	Fam188b	1.79964329	3.47871893	gcrma
1436550_at	Fbxo30	1.1776889	7.8132369	mas5
1436550_at	Fbxo30	1.10313698	7.38029112	gcrma
1434309_at	Fntb	1.25942527	7.69458148	mas5
1434309_at	Fntb	1.51846118	6.39598437	gcrma
1422134_at	Fosb	2.54867596	7.08617562	mas5
1422134_at	Fosb	3.65977679	5.81528077	gcrma
1430829_s_at	Fto	1.03095591	6.75950509	mas5
1430829_s_at	Fto	2.39011794	6.38028854	gcrma
1454924_at	Fut10	1.15146147	7.14605286	mas5
1437388_at	Fut10	1.75365271	6.08143221	gcrma
1454924_at	Fut10	1.100599	7.15645925	gcrma
1437159_at	Glb1	1.02154408	5.65289378	mas5
1437159_at	Glb1	1.26886446	5.09299145	gcrma
1448045_at	Gm10658	1.23477601	4.01459901	mas5
1448044_a_at	Gm10658	1.06687359	2.90461689	gcrma
1426607_at	Gm7120	1.88731471	7.07138734	mas5
1426608_at	Gm7120	-1.16349068	2.16317203	mas5
1426607_at	Gm7120	3.68448596	6.28622161	gcrma
1436013_at	Gsg1l	1.16232361	8.1853464	mas5
1436013_at	Gsg1l	1.4409147	8.2663187	gcrma
1416969_at	Gtse1	1.35637919	8.09471665	mas5
1416969_at	Gtse1	1.2773698	7.84616332	gcrma
1450196_s_at	Gys1	1.03866325	5.23739821	gcrma
1447894_x_at	H2afb3	1.12448933	7.36702936	mas5
1447894_x_at	H2afb3	1.45776227	6.71289516	gcrma
1450170_x_at	H2-D1	-3.77971278	4.59041467	mas5
1451784_x_at	H2-D1	2.03753952	7.96717661	mas5
1451934_at	H2-D1	1.15831878	3.10457938	mas5

1450170_x_at	H2-D1	-2.00111665	3.36145098	gcrma
1451784_x_at	H2-D1	1.59468997	7.97185844	gcrma
1427746_x_at	H2-K1	2.56562436	3.89583489	mas5
1425336_x_at	H2-K1	1.35480396	4.49581476	gcrma
1427746_x_at	H2-K1	1.13024773	3.21166959	gcrma
1451931_x_at	H2-L	2.34753576	7.50336185	mas5
1451931_x_at	H2-L	3.25830298	6.60831872	gcrma
1418536_at	H2-Q7	1.93081246	6.31821115	mas5
1418536_at	H2-Q7	3.4819579	5.23731278	gcrma
1454112_a_at	Haus2	1.29276646	7.63233437	mas5
1430577_at	Haus2	1.32885002	7.15537926	gcrma
1432511_s_at	Haus2	1.16694474	6.33401151	gcrma
1454112_a_at	Haus2	1.42029411	6.72695161	gcrma
1433696_at	Hn1l	1.01221677	10.0557063	mas5
1433696_at	Hn1l	1.1576888	10.3105427	gcrma
1443034_at	Hps1	2.75811104	2.98306309	mas5
1459827_x_at	Hps1	1.00592016	6.89637255	mas5
1459827_x_at	Hps1	1.02630392	4.08980204	gcrma
1424622_at	Hsf1	1.02266407	7.44710686	mas5
1424622_at	Hsf1	1.44824074	6.89845618	gcrma
1450760_a_at	Ing3	1.00092813	7.42446833	mas5
1450760_a_at	Ing3	1.37978509	7.46124282	gcrma
1448694_at	Jun	1.03604292	10.1087886	mas5
1448694_at	Jun	1.08098383	10.1355638	gcrma
1429663_at	Katnal2	1.14621862	5.0295854	mas5
1429663_at	Katnal2	1.52492374	3.55800575	gcrma
1431436_a_at	Katnal2	1.53812755	4.03556683	gcrma
1441275_at	Kbtbd8	1.14417345	6.11198477	mas5
1441275_at	Kbtbd8	1.29502186	5.26385946	gcrma
1425885_a_at	Kcnab2	1.54576782	5.01696914	mas5
1416956_at	Kcnab2	1.21160393	5.65855654	gcrma
1438890_at	Kdm2a	-1.17552673	6.32012996	mas5
1458449_at	Kdm2a	1.80928219	3.2983153	mas5
1435329_at	Kdm2a	1.09059403	6.03625048	gcrma
1424903_at	Kdm5d	1.59165386	6.08397634	mas5
1452563_a_at	Kdm5d	1.48042487	4.4048483	mas5
1424903_at	Kdm5d	1.8581306	5.76247637	gcrma
1455182_at	Kif1b	1.08732169	8.43745083	mas5
1455182_at	Kif1b	1.27420697	8.23863449	gcrma
1418429_at	Kif5b	1.45493573	9.6318032	mas5

1453524_at	Kif5b	-2.11695231	5.78739777	mas5
1418429_at	Kif5b	1.12299513	10.6202813	gcrma
1453524_at	Kif5b	-2.63413011	4.51364064	gcrma
1417394_at	Klf4	1.26605289	6.92175705	mas5
1417394_at	Klf4	1.28404547	6.47092105	gcrma
1436763_a_at	Klf9	1.04286364	6.88953241	mas5
1436952_at	Klf9	1.03841324	6.97691806	mas5
1452723_at	Klf9	-1.29378547	4.25598107	mas5
1436763_a_at	Klf9	1.41103109	7.1773056	gcrma
1436952_at	Klf9	2.04824453	5.24189913	gcrma
1427009_at	Lama5	1.31740758	6.17630351	mas5
1427010_s_at	Lama5	2.20292602	4.6322098	mas5
1427009_at	Lama5	1.75808037	3.16177779	gcrma
1418898_at	Lin7c	1.44127751	8.58478937	mas5
1423322_at	Lin7c	1.69032187	10.1838512	mas5
1449262_s_at	Lin7c	1.87210401	8.55572464	mas5
1418898_at	Lin7c	1.92776615	8.25529592	gcrma
1423322_at	Lin7c	2.13483565	10.0913648	gcrma
1449262_s_at	Lin7c	2.30592621	8.4252928	gcrma
1433744_at	Lrtm2	1.13397455	5.68891606	mas5
1433744_at	Lrtm2	1.25923762	3.68113463	gcrma
1456189_x_at	Ltbp3	1.16512947	5.42172045	mas5
1456189_x_at	Ltbp3	1.57756018	4.22617966	gcrma
1442364_at	Mapk14	-3.64916838	5.26048843	mas5
1459617_at	Mapk14	1.03283145	4.69607535	mas5
1442364_at	Mapk14	-1.34351406	2.93007295	gcrma
1451927_a_at	Mapk14	1.18395856	5.68114953	gcrma
1457977_at	Meaf6	1.16656274	6.1663553	mas5
1457977_at	Meaf6	1.07962674	4.27656487	gcrma
1439155_at	Mettl1	1.0525829	6.73542562	mas5
1447683_x_at	Mettl1	1.44639749	6.25301486	mas5
1439155_at	Mettl1	1.12568822	6.22048621	gcrma
1447683_x_at	Mettl1	1.38921883	5.39087436	gcrma
1436021_at	Mfsd4	-1.47222852	1.74909006	mas5
1455531_at	Mfsd4	-1.4104872	2.29286542	mas5
1455623_at	Mfsd4	2.12246936	2.75455409	mas5
1444199_at	Mfsd4	1.39515219	3.64485907	gcrma
1417120_at	Miip	1.1438879	7.70746731	mas5
1417120_at	Miip	1.4819734	7.25780635	gcrma
1448599_s_at	Miip	1.38518641	7.09763476	gcrma

1443971_x_at	Mpp7	2.00928059	1.08594771	mas5
1453690_at	Mpp7	-1.72770232	1.85040379	mas5
1455179_at	Mpp7	1.10253302	5.35287646	gcrma
1419362_at	Mrpl35	2.48877102	4.20371327	mas5
1440989_at	Mrpl35	1.74235101	4.99464869	gcrma
1418420_at	Myod1	1.26527698	7.06117709	mas5
1447675_x_at	Myod1	1.71391604	3.24698084	mas5
1418420_at	Myod1	2.78179333	4.79824853	gcrma
1417445_at	Ndc80	1.19978983	8.34372146	mas5
1417445_at	Ndc80	1.0928659	8.62426983	gcrma
1417299_at	Nek2	1.42387219	8.59421603	mas5
1417299_at	Nek2	1.30262714	9.10259916	gcrma
1450661_x_at	Nfic	1.48558078	5.23585937	mas5
1422565_s_at	Nfic	1.77171056	5.76314375	gcrma
1429148_at	Nfic	1.00454904	7.02920716	gcrma
1450661_x_at	Nfic	1.01546751	3.66172962	gcrma
1455034_at	Nr4a2	1.17044776	7.86838679	mas5
1455034_at	Nr4a2	1.51229245	7.88003553	gcrma
1455852_at	Nsl1	1.1125412	7.25741329	mas5
1455852_at	Nsl1	1.57295209	7.03369852	gcrma
1416818_at	Parva	1.00729532	6.48807739	mas5
1416818_at	Parva	1.1472171	5.83772708	gcrma
1422889_at	Pcdh18	1.09734515	7.71961522	mas5
1422889_at	Pcdh18	1.63241124	7.49057947	gcrma
1422890_at	Pcdh18	1.47186738	5.90941473	gcrma
1430427_a_at	Pcdh18	1.81399644	4.41856295	gcrma
1420645_at	Pcgf2	1.57085002	5.28470086	mas5
1420645_at	Pcgf2	1.19127175	4.06665801	gcrma
1419327_at	Pdxdc1	-2.57752707	7.74905049	mas5
1428200_a_at	Pdxdc1	1.06371117	5.49599453	mas5
1452705_at	Pdxdc1	1.72978331	7.79878432	mas5
1419327_at	Pdxdc1	-4.18008349	7.24332329	gcrma
1452705_at	Pdxdc1	2.9830722	7.08821349	gcrma
1418471_at	Pgf	1.29015065	7.23662166	mas5
1418471_at	Pgf	1.8514571	6.52656498	gcrma
1433462_a_at	Pi4k2a	1.00272769	6.78319977	mas5
1433462_a_at	Pi4k2a	1.65991666	6.30117632	gcrma
1418481_at	Pkmyt1	1.20865681	8.10189651	mas5
1418481_at	Pkmyt1	1.29991482	8.25622501	gcrma
1450533_a_at	Plagl1	1.42792512	6.07092253	mas5

1450533_a_at	Plagl1	1.21446294	6.07113849	gcrma
1427103_at	Plekho2	1.33241405	8.49250858	mas5
1427103_at	Plekho2	1.70394243	8.04246945	gcrma
1416707_a_at	Pmf1	1.72402373	7.32044152	mas5
1416707_a_at	Pmf1	2.0882608	6.69006753	gcrma
1438173_x_at	Pmf1	1.45127732	6.61830435	gcrma
1437018_at	Pnma2	2.44403461	4.15262057	mas5
1437018_at	Pnma2	1.14572346	3.47530382	gcrma
1417775_at	Polr1a	1.14369854	7.36287756	mas5
1460215_at	Polr1a	1.97183923	5.36122194	mas5
1417775_at	Polr1a	1.14839575	6.74482562	gcrma
1436922_at	Ppil5	1.03407203	6.84643381	mas5
1436922_at	Ppil5	1.57018512	6.47936294	gcrma
1425725_s_at	Ppp2r5c	1.02744897	5.85049748	mas5
1455520_at	Ppp2r5c	-1.27308197	5.90397936	mas5
1425725_s_at	Ppp2r5c	1.09948577	5.3890306	gcrma
1442719_at	Prmt3	-1.3748499	3.71187264	mas5
1454008_at	Prmt3	2.9649084	3.27013234	mas5
1431768_a_at	Prmt3	1.09921359	7.30673534	gcrma
1419839_x_at	Prpf19	1.33473995	10.8327754	mas5
1449635_at	Prpf19	1.19045364	10.7332018	mas5
1419839_x_at	Prpf19	1.8132177	11.0156843	gcrma
1449635_at	Prpf19	1.67289773	11.0823328	gcrma
1418078_at	Psme3	1.03494209	8.65019581	mas5
1418078_at	Psme3	1.18173632	8.67251256	gcrma
1431352_s_at	Pvt1	1.7310831	3.6120719	mas5
1450541_at	Pvt1	-1.04299836	4.1320742	mas5
1452324_at	Pvt1	2.40388287	4.5665848	mas5
1452324_at	Pvt1	1.2823915	3.47656694	gcrma
1452331_s_at	Qser1	1.25469226	9.19957893	mas5
1452331_s_at	Qser1	1.28218547	9.1886568	gcrma
1424648_at	Rabl4	1.1011129	9.22886173	mas5
1434299_x_at	Rabl4	1.19638007	10.2802596	mas5
1424648_at	Rabl4	1.19665068	8.88405864	gcrma
1434299_x_at	Rabl4	1.17021742	11.0619394	gcrma
1434734_at	Rad54b	1.18738188	6.47851785	mas5
1434734_at	Rad54b	2.08743169	6.25731829	gcrma
1423854_a_at	Rasl11b	1.33861943	8.39383294	mas5
1423854_a_at	Rasl11b	1.52890382	7.99556957	gcrma
1454791_a_at	Rbbp4	1.48995682	10.1023999	mas5

1454791_a_at	Rbbp4	1.2728615	10.0814522	gcrma
1417302_at	Rcor2	1.06220918	9.99460226	mas5
1417302_at	Rcor2	1.23551544	10.0008481	gcrma
1429661_at	Rhobtb3	1.25999526	6.74226634	mas5
1447869_x_at	Rhobtb3	1.24319207	7.68470375	mas5
1429661_at	Rhobtb3	1.2068905	6.17454336	gcrma
1447869_x_at	Rhobtb3	1.01287418	7.78724686	gcrma
1436684_a_at	Riok2	1.14837694	7.35672533	mas5
1436684_a_at	Riok2	1.37059476	7.55533054	gcrma
1435733_x_at	Rnaseh2c	1.08427063	9.16376409	mas5
1439453_x_at	Rnaseh2c	1.08200144	9.99718522	mas5
1417427_at	Rnaseh2c	1.39738219	9.40799846	gcrma
1439453_x_at	Rnaseh2c	1.18831901	9.4767005	gcrma
1448043_x_at	Rnf2	2.24474537	3.62989705	mas5
1448042_s_at	Rnf2	1.12111306	3.93174939	gcrma
1459903_at	Sema7a	1.09336293	10.9476029	mas5
1459903_at	Sema7a	1.28781258	10.2959283	gcrma
1423851_a_at	Shisa2	1.73474644	6.62233861	mas5
1423852_at	Shisa2	1.31325744	7.31757619	mas5
1423851_a_at	Shisa2	1.84943262	6.42264768	gcrma
1423852_at	Shisa2	1.77610721	7.06125397	gcrma
1459014_at	Slc1a2	1.4744456	3.38294226	mas5
1457800_at	Slc1a2	1.34433131	3.79436842	gcrma
1416629_at	Slc1a5	1.43935807	6.66621222	mas5
1440379_at	Slc1a5	-1.83522014	3.98661228	mas5
1416629_at	Slc1a5	1.62260581	6.51727213	gcrma
1429658_a_at	Smc2	1.07233394	8.42118436	mas5
1458479_at	Smc2	-1.08523776	5.01642362	mas5
1429658_a_at	Smc2	1.21260597	8.84000476	gcrma
1429659_at	Smc2	1.03448791	7.05520368	gcrma
1458479_at	Smc2	-1.00391985	3.29628693	gcrma
1454772_at	Snrnp200	1.26044683	7.63802382	mas5
1454772_at	Snrnp200	1.89866116	7.11584792	gcrma
1451602_at	Snx6	2.72571112	6.71803659	mas5
1451602_at	Snx6	3.32892234	6.77543327	gcrma
1451538_at	Sox9	1.51269439	7.69488967	mas5
1424950_at	Sox9	1.09346769	7.34949413	gcrma
1451538_at	Sox9	1.25917315	7.61371365	gcrma
1455863_at	Spata5l1	1.24080489	5.79718251	mas5
1455863_at	Spata5l1	2.15120165	5.87225514	gcrma

1432372_a_at	Spr	1.0306127	6.20035495	mas5
1432372_a_at	Spr	1.55773562	5.00578891	gcrma
1425348_a_at	Srprb	1.03142779	8.69719404	mas5
1425348_a_at	Srprb	1.07091218	8.0273993	gcrma
1450089_a_at	Srprb	1.11620358	8.43992632	gcrma
1431713_at	Sufu	1.27877758	4.19587124	mas5
1420848_at	Sufu	1.04691314	3.61445871	gcrma
1436561_at	Suv39h2	2.15430164	5.36291543	mas5
1436561_at	Suv39h2	1.20957284	4.73700889	gcrma
1449661_at	Suz12	1.27023203	6.25641033	mas5
1449661_at	Suz12	1.59018867	5.65054049	gcrma
1451045_at	Syt13	1.13996438	6.11956805	mas5
1434470_at	Syt13	1.14194646	6.05049255	gcrma
1451045_at	Syt13	2.48876209	4.68278357	gcrma
1423169_at	Taf7	2.04221617	6.03118079	mas5
1423170_at	Taf7	1.62752269	6.65387197	mas5
1423169_at	Taf7	2.40843749	5.73941756	gcrma
1423170_at	Taf7	2.20813647	5.59708628	gcrma
1431115_at	Tgif2	1.35439097	7.4755087	mas5
1431115_at	Tgif2	1.1319277	7.477583	gcrma
1431789_s_at	Tmed5	1.05411792	7.02762585	mas5
1445343_at	Tmed5	-2.85844302	2.21083585	mas5
1431789_s_at	Tmed5	2.1922217	5.62645145	gcrma
1434783_at	Tmem106c	1.1811901	7.77766493	mas5
1434783_at	Tmem106c	1.24376355	7.65262691	gcrma
1429495_at	Tmem107	1.05230386	5.36844526	mas5
1429058_at	Tmem107	1.29787787	9.90043176	gcrma
1429059_s_at	Tmem107	1.17922988	6.85400555	gcrma
1459814_at	Tmem109	3.03201567	1.21898125	mas5
1416032_at	Tmem109	1.16310726	6.74610236	gcrma
1424880_at	Trib1	1.73149326	6.76844915	mas5
1424881_at	Trib1	-1.22645713	3.68790177	mas5
1424880_at	Trib1	1.58010682	6.3110638	gcrma
1433790_at	Troap	1.01282956	7.58548406	mas5
1433790_at	Troap	1.32904137	6.1545145	gcrma
1451609_at	Tspan33	1.15722829	4.96915396	mas5
1455618_x_at	Tspan33	1.30537326	6.0115583	gcrma
1459031_at	Ttll4	2.07916945	3.01060013	mas5
1436249_at	Ttll4	1.25863112	5.1451378	gcrma
1417137_at	Uck2	1.07430249	4.27386881	mas5

1426909_at	Uck2	1.03361189	6.91579758	gcrma
1439740_s_at	Uck2	1.14710409	9.51676444	gcrma
1424079_x_at	Urm1	1.03971922	7.53098387	mas5
1431752_a_at	Urm1	1.58776877	6.42846419	gcrma
1442274_at	Zdhhc15	1.65736381	5.07365798	mas5
1436582_at	Zdhhc15	1.22735323	5.95897724	gcrma
1442274_at	Zdhhc15	1.1919127	3.78670411	gcrma
1418684_at	Zfp33b	1.80919359	5.77677332	mas5
1418684_at	Zfp33b	1.36176161	3.62087704	gcrma
1433623_at	Zfp367	1.02894032	9.5686983	mas5
1438772_at	Zfp367	1.67802094	5.71687285	mas5
1433623_at	Zfp367	1.01177022	9.51453931	gcrma
1438772_at	Zfp367	2.71004448	5.02855465	gcrma
1452336_at	Zfp395	1.09097528	6.452274	mas5
1452336_at	Zfp395	2.01724654	4.77877852	gcrma
1434171_at	Zfp874	1.81206362	5.39928044	mas5
1434171_at	Zfp874	2.49878298	3.97440426	gcrma
1431154_at	Znrf2	1.01331335	1.85266721	mas5
1455290_at	Znrf2	1.0781417	5.09518635	gcrma

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Abb.	Abbildung
βIII-Tub	betaIII-Tubulin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
d. h.	das heißt
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser bzw. Reinstwasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
E	embryonal Tag
E.coli	Escherichia coli
eGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein
EGL	äußere Körnerzellschicht
EtOH	Ethanol
g	Schleuderziffer
g	Gramm
GCL	Körnerzellschicht
GCP	Körnerzellvorläufer
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
hs	Homo Sapiens
IGL	innere Körnerzellschicht
ISH	in-situ-Hybridisierung
Kb	Kilobasen
M	mol pro Liter
MB	Medulloblastom
min	Minute(n)
mm	Mus Musculus
n	Anzahl
OD	optische Dichte
P	Postnataltag
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte-Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RA	Retinsäure

RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
Shh	Sonic Hedgehog
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF- β	Transforming growth factor beta
U	Enzym Aktivitätseinheit
UTR	nicht translatierte Bereich
(v/v)	Volumen / Volumen
Wnt	Zusammensetzung aus Wg (wingless) und Int1 (heute Wnt1)
wt	Wildtyp
(w/v)	Gewichtsanteil / Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

6.3 Literaturverzeichnis

Abdollahi, A., Roberts, D., Godwin, A.K., Schultz, D.C., Sonoda, G., Testa, J.R., and Hamilton, T.C. (1997). Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors. *Oncogene* 14, 1973–1979.

Abdollahi, A., Bao, R., and Hamilton, T.C. (1999). LOT1 is a growth suppressor gene down-regulated by the epidermal growth factor receptor ligands and encodes a nuclear zinc-finger protein. *Oncogene* 18, 6477–6487.

Abdollahi, A., Pisarcik, D., Roberts, D., Weinstein, J., Cairns, P., and Hamilton, T.C. (2003). LOT1 (PLAGL1/ZAC1), the candidate tumor suppressor gene at chromosome 6q24-25, is epigenetically regulated in cancer. *J. Biol. Chem.* 278, 6041–6049.

Ahmed, I., Calle, Y., Iwashita, S., and Nur-E-Kamal, A. (2006). Role of Cdc42 in neurite outgrowth of PC12 cells and cerebellar granule neurons. *Mol. Cell. Biochem.* 281, 17–25.

Alcalay, N.I., and Vanden Heuvel, G.B. (2009). Regulation of cell proliferation and differentiation in the kidney. *Front. Biosci.* 14, 4978–4991.

Alder, J., Lee, K.J., Jessell, T.M., and Hatten, M.E. (1999). Generation of cerebellar granule neurons in vivo by transplantation of BMP-treated neural progenitor cells. *Nat. Neurosci.* 2, 535–540.

Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C., and Føgh, J. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab. Invest.* 50, 147–162.

Ard, P.G., Chatterjee, C., Kunjibettu, S., Adside, L.R., Gralinski, L.E., and McMahon, S.B. (2002). Transcriptional regulation of the mdm2 oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5650–5661.

Aref, D., Moffatt, C.J., Agnihotri, S., Ramaswamy, V., Dubuc, A.M., Northcott, P. a, Taylor, M.D., Perry, A., Olson, J.M., Eberhart, C.G., et al. (2012). Canonical TGF- β Pathway Activity Is a Predictor of SHH-Driven Medulloblastoma Survival and Delineates Putative Precursors in Cerebellar Development. *Brain Pathol.*

Aruga, J., Yokota, N., Hashimoto, M., Furuichi, T., Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (1994). A novel zinc finger protein, zic, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 63, 1880–1890.

Aruga, J., Inoue, T., Hoshino, J., and Mikoshiba, K. (2002). Zic2 Controls Cerebellar Development in Cooperation with Zic1. *J. Neurosci.* 22, 218–225.

Avet-Loiseau, H., Vénuat, A.M., Terrier-Lacombe, M.J., Lellouch-Tubiana, A., Zerah, M., and Vassal, G. (1999). Comparative genomic hybridization detects many recurrent imbalances in central nervous system primitive neuroectodermal tumours in children. *Br. J. Cancer* 79, 1843–1847.

- Baillieux, H., De Smet, H.J., Paquier, P.F., De Deyn, P.P., and Mariën, P. (2008). Cerebellar neurocognition: insights into the bottom of the brain. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *110*, 763–773.
- Bartholin, L., Powers, S.E., Melhuish, T.A., Lasse, S., Weinstein, M., and Wotton, D. (2006a). TGIF Inhibits Retinoid Signaling. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 990–1001.
- Bartholin, L., Powers, S.E., Melhuish, T.A., Lasse, S., Weinstein, M., and Wotton, D. (2006b). TGIF inhibits retinoid signaling. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 990–1001.
- Behesti, H., and Marino, S. (2009a). Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 435–445.
- Behesti, H., and Marino, S. (2009b). Cerebellar granule cells: insights into proliferation, differentiation, and role in medulloblastoma pathogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 435–445.
- Ben-Arie, N., Bellen, H.J., Armstrong, D.L., McCall, a E., Gordadze, P.R., Guo, Q., Matzuk, M.M., and Zoghbi, H.Y. (1997). Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* *390*, 169–172.
- Bertolino, E., Wildt, S., Richards, G., and Clerc, R.G. (1996a). Expression of a novel murine homeobox gene in the developing cerebellar external granular layer during its proliferation. *Dev. Dyn. an Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *205*, 410–420.
- Bertolino, E., Wildt, S., Richards, G., and Clerc, R.G. (1996b). Expression of a novel murine homeobox gene in the developing cerebellar external granular layer during its proliferation. *Dev. Dyn.* *205*, 410–420.
- Bilanges, B., Varrault, A., Basyuk, E., Rodriguez, C., Mazumdar, A., Pantaloni, C., Bockaert, J., Theillet, C., Spengler, D., and Journot, L. (1999). Loss of expression of the candidate tumor suppressor gene ZAC in breast cancer cell lines and primary tumors. *Oncogene* *18*, 3979–3988.
- Borovkov, A.Y., and Rivkin, M.I. (1997). XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *Biotechniques* *22*, 812–814.
- Burov, S., Jeon, J.-H., Metzler, R., and Barkai, E. (2011). Single particle tracking in systems showing anomalous diffusion: the role of weak ergodicity breaking. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *13*, 1800–1812.
- Cadioux, C., Kedingler, V., Yao, L., Vadnais, C., Drossos, M., Paquet, M., and Nepveu, A. (2009). Mouse mammary tumor virus p75 and p110 CUX1 transgenic mice develop mammary tumors of various histologic types. *Cancer Res.* *69*, 7188–7197.
- Caldwell, G.M., Jones, C.E., Soon, Y., Warrack, R., Morton, D.G., and Matthews, G.M. (2008). Reorganisation of Wnt-response pathways in colorectal tumorigenesis. *Br. J. Cancer* *98*, 1437–1442.
- Caldwell, G.M., Jones, C.E., Ashley, A.M., Wei, W., Hejmadi, R.K., Morton, D.G., and Matthews, G.M. (2010). Wnt signalling in adenomas of familial adenomatous polyposis patients. *Br. J. Cancer* *103*, 910–917.

- Chédotal, A. (2010). Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends Neurosci.* 33, 163–172.
- Chen, F., Ogawa, K., Nagarajan, R.P., Zhang, M., Kuang, C., and Chen, Y. (2003). Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor- β . 263, 257–263.
- Cho, Y.-J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C.G., et al. (2010). Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J. Clin. Oncol.* 29, 1424–1430.
- Ciani, E., Frenquelli, M., and Contestabile, A. (2003). Developmental expression of the cell cycle and apoptosis controlling gene, *Lot1*, in the rat cerebellum and in cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 100, 133–138.
- Coqueret, O., Bérubé, G., and Nepveu, A. (1998). The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. *EMBO J.* 17, 4680–4694.
- Corcoran, R.B., and Scott, M.P. (2001). A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome. *J. Neurooncol.* 53, 307–318.
- Corrales, J.D., Rocco, G.L., Blaess, S., Guo, Q., and Joyner, A.L. (2004). Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through Gli genes during cerebellum development. *Development* 131, 5581–5590.
- Cubelos, B., Sebastián-Serrano, A., Kim, S., Redondo, J.M., Walsh, C., and Nieto, M. (2008). *Cux-1* and *Cux-2* control the development of Reelin expressing cortical interneurons. *Dev. Neurobiol.* 68, 917–925.
- Cubelos, B., Sebastián-Serrano, A., Beccari, L., Calcagnotto, M.E., Cisneros, E., Kim, S., Dopazo, A., Alvarez-Dolado, M., Redondo, J.M., Bovolenta, P., et al. (2010). *Cux1* and *Cux2* regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron* 66, 523–535.
- Dahmane, N., and Ruiz i Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126, 3089–3100.
- Dhall, G. (2009). Medulloblastoma. *J. Child Neurol.* 24, 1418–1430.
- Ten Donkelaar, H.J., Lammens, M., Wesseling, P., Thijssen, H.O.M., and Renier, W.O. (2003). Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J. Neurol.* 250, 1025–1036.
- Ellison, D.W. (2010). Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta Neuropathol.* 120, 305–316.
- 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, 959–961.

Fernandes, M., Antoine, M., and Hébert, J.M. (2012). SMAD4 is essential for generating subtypes of neurons during cerebellar development. *Dev. Biol.* *365*, 82–90.

Flores-Rozas, H. (1994). Cdk-Interacting Protein 1 Directly Binds with Proliferating Cell Nuclear Antigen and Inhibits DNA Replication Catalyzed by the DNA Polymerase Holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 8655–8659.

Friedman, H.S., Burger, P.C., Bigner, S.H., Trojanowski, J.Q., Wikstrand, C.J., Halperin, E.C., and Bigner, D.D. (1985). Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283. *Med. J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *44*, 592–605.

Friedman, H.S., Burger, P.C., Bigner, S.H., Trojanowski, J.Q., Brodeur, G.M., He, X.M., Wikstrand, C.J., Kurtzberg, J., Berens, M.E., and Halperin, E.C. (1988). Phenotypic and genotypic analysis of a human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft (D341 Med) demonstrating amplification of c-myc. *Am. J. Pathol.* *130*, 472–484.

Fuccillo, M., Joyner, A.L., and Fishell, G. (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 772–783.

Gajjar, A., Chintagumpala, M., Ashley, D., Kellie, S., Kun, L.E., Merchant, T.E., Woo, S., Wheeler, G., Ahern, V., Krasin, M.J., et al. (2006). Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. *Lancet Oncol.* *7*, 813–820.

Gajjar, A., Packer, R.J., Foreman, N.K., Cohen, K., Haas-Kogan, D., and Merchant, T.E. (2013). Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: central nervous system tumors. *Pediatr. Blood Cancer* *60*, 1022–1026.

Gazit, R., Krizhanovsky, V., and Ben-Arie, N. (2004). Math1 controls cerebellar granule cell differentiation by regulating multiple components of the Notch signaling pathway. *Development* *131*, 903–913.

Genovesi, L.A., Ng, C.G., Davis, M.J., Remke, M., Taylor, M.D., Adams, D.J., Rust, A.G., Ward, J.M., Ban, K.H., Jenkins, N.A., et al. (2013). Sleeping Beauty mutagenesis in a mouse medulloblastoma model defines networks that discriminate between human molecular subgroups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E4325–34.

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* *5*, R80.

Gilbertson, R.J., and Ellison, D.W. (2008). The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu. Rev. Pathol.* *3*, 341–365.

Gillard, F., Hata, R., and Hossmann, K.A. (1998). Delayed up-regulation of Zac1 and PACAP type I receptor after transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *61*, 207–210.

- Gilthorpe, J.D., Papantoniou, E.-K., Chedotal, A., Lumsden, A., and Wingate, R.J.T. (2002). The migration of cerebellar rhombic lip derivatives. *Development* 129, 4719–4728.
- Gliem, M., Weisheit, G., Mertz, K.D., Endl, E., Oberdick, J., and Schilling, K. (2006). Expression of classical cadherins in the cerebellar anlage: quantitative and functional aspects. *Mol. Cell. Neurosci.* 33, 447–458.
- Gongal, P.A., and Waskiewicz, A.J. (2008). Zebrafish model of holoprosencephaly demonstrates a key role for TGIF in regulating retinoic acid metabolism. *Hum. Mol. Genet.* 17, 525–538.
- Grammel, D., Warmuth-Metz, M., von Bueren, A.O., Kool, M., Pietsch, T., Kretschmar, H.A., Rowitch, D.H., Rutkowski, S., Pfister, S.M., and Schüller, U. (2012). Sonic hedgehog-associated medulloblastoma arising from the cochlear nuclei of the brainstem. *Acta Neuropathol.* 123, 601–614.
- Grimmer, M.R., and Weiss, W. a (2008). BMPs oppose Math1 in cerebellar development and in medulloblastoma. *Genes Dev.* 22, 693–699.
- Hamid, R., and Brandt, S.J. (2009a). Transforming growth-interacting factor (TGIF) regulates proliferation and differentiation of human myeloid leukemia cells. *Mol. Oncol.* 3, 451–463.
- Hamid, R., and Brandt, S.J. (2009b). Transforming growth-interacting factor (TGIF) regulates proliferation and differentiation of human myeloid leukemia cells. *Mol. Oncol.* 3, 451–463.
- Hansen, C., Howlin, J., Tengholm, A., Dyachok, O., Vogel, W.F., Nairn, A.C., Greengard, P., and Andersson, T. (2009). Wnt-5a-induced phosphorylation of DARPP-32 inhibits breast cancer cell migration in a CREB-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 284, 27533–27543.
- Harada, R., Vadnais, C., Sansregret, L., Leduy, L., Bérubé, G., Robert, F., and Nepveu, A. (2008). Genome-wide location analysis and expression studies reveal a role for p110 CUX1 in the activation of DNA replication genes. *Nucleic Acids Res.* 36, 189–202.
- Hock, A.K., Vigneron, A.M., Carter, S., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (2011). Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42. *EMBO J.* 30, 4921–4930.
- Hoeffding, W. (1948). A Non-Parametric Test of Independence. *Ann. Math. Stat.* 19, 546–557.
- Hoffmann, A., Ciani, E., Houssami, S., Brabet, P., Journot, L., and Spengler, D. (1998). Induction of type I PACAP receptor expression by the new zinc finger protein Zac1 and p53. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 865, 49–58.
- Hoffmann, A., Ciani, E., Boeckardt, J., Holsboer, F., Journot, L., and Spengler, D. (2003). Transcriptional activities of the zinc finger protein Zac are differentially controlled by DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 23, 988–1003.
- Hoshino, M. (2012). Neuronal subtype specification in the cerebellum and dorsal hindbrain. *Dev. Growth Differ.* 54, 317–326.

- Huang, S.M., and Stallcup, M.R. (2000). Mouse *Zac1*, a transcriptional coactivator and repressor for nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1855–1867.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* *37*, 1–13.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* *4*, 44–57.
- Huang, S.M., Schönthal, A.H., and Stallcup, M.R. (2001). Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator *Zac1*. *Oncogene* *20*, 2134–2143.
- Imoto, I., Pimkhaokham, A., Watanabe, T., Saito-Ohara, F., Soeda, E., and Inazawa, J. (2000). Amplification and overexpression of *TGIF2*, a novel homeobox gene of the TALE superclass, in ovarian cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *276*, 264–270.
- Irizarry, R.A., Wu, Z., and Jaffee, H.A. (2006). Comparison of Affymetrix GeneChip expression measures. *Bioinformatics* *22*, 789–794.
- Jackson, R.J., Antonia, S.J., Wright, K.L., Moon, N.S., Nepveu, a, and Muñoz-Antonia, T. (1999). Human cut-like repressor protein binds TGFbeta type II receptor gene promoter. *Arch. Biochem. Biophys.* *371*, 290–300.
- 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*.
- Katoh, M. (2002). Regulation of WNT signaling molecules by retinoic acid during neuronal differentiation in NT2 cells: threshold model of WNT action (review). *Int. J. Mol. Med.* *10*, 683–687.
- Katoh, M. (2005). WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncol. Rep.* *14*, 1583–1588.
- Katoh, Y., and Katoh, M. (2009). Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.* *9*, 873–886.
- Kaučká, M., Plevová, K., Pavlová, S., Janovská, P., Mishra, A., Verner, J., Procházková, J., Krejčí, P., Kotasková, J., Ovesná, P., et al. (2013). The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. *Cancer Res.* *73*, 1491–1501.
- Kawasaki, A., Torii, K., Yamashita, Y., Nishizawa, K., Kanekura, K., Katada, M., Ito, M., Nishimoto, I., Terashita, K., Aiso, S., et al. (2007). *Wnt5a* promotes adhesion of human dermal fibroblasts by triggering a phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signal. *Cell. Signal.* *19*, 2498–2506.
- Kedinger, V., and Nepveu, A. (2010). The roles of CUX1 homeodomain proteins in the establishment of a transcriptional program required for cell migration and invasion. *Cell Adhes. Migr.* *4*, 348–352.

- Kedinger, V., Sansregret, L., Harada, R., Vadnais, C., Cadieux, C., Fathers, K., Park, M., and Nepveu, A. (2009). p110 CUX1 homeodomain protein stimulates cell migration and invasion in part through a regulatory cascade culminating in the repression of E-cadherin and occludin. *J. Biol. Chem.* *284*, 27701–27711.
- Kim, J.J., Gill, P.S., Rotin, L., van Eede, M., Henkelman, R.M., Hui, C.-C., and Rosenblum, N.D. (2011). Suppressor of fused controls mid-hindbrain patterning and cerebellar morphogenesis via GLI3 repressor. *J. Neurosci.* *31*, 1825–1836.
- Kirikoshi, H., Koike, J., Sagara, N., Saitoh, T., Tokuhara, M., Tanaka, K., Sekihara, H., Hirai, M., and Katoh, M. (2000). Molecular cloning and genomic structure of human frizzled-3 at chromosome 8p21. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *271*, 8–14.
- Klein, A.-L., Zilian, O., Suter, U., and Taylor, V. (2004). Murine numb regulates granule cell maturation in the cerebellum. *Dev. Biol.* *266*, 161–177.
- 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. *Dev. Cambridge Engl.* *128*, 1971–1981.
- Knepper, J.L., James, A.C., and Ming, J.E. (2006). TGIF, a gene associated with human brain defects, regulates neuronal development. *Dev. Dyn.* *235*, 1482–1490.
- Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N.E., Lakeman, A., Van Sluis, P., Troost, D., Meeteren, N.S., Caron, H.N., Cloos, J., et al. (2008). Integrated Genomics Identifies Five Medulloblastoma Subtypes with Distinct Genetic Profiles, Pathway Signatures and Clinicopathological Features. *PLoS One* *3*, 14.
- Kool, M., Korshunov, A., Remke, M., Jones, D.T.W., Schlanstein, M., Northcott, P.A., Cho, Y.-J., Koster, J., Schouten-van Meeteren, A., van Vuurden, D., et al. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* *123*, 473–484.
- Larsell, O. (1952). The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J. Comp. Neurol.* *97*, 281–356.
- Lau, K.-M., Chan, Q.K.Y., Pang, J.C.S., Li, K.K.W., Yeung, W.W., Chung, N.Y.F., Lui, P.C., Tam, Y.-S., Li, H.-M., Zhou, L., et al. (2010). Minichromosome maintenance proteins 2, 3 and 7 in medulloblastoma: overexpression and involvement in regulation of cell migration and invasion. *Oncogene* *29*, 5475–5489.
- Lee, A., Kessler, J.D., Read, T.-A., Kaiser, C., Corbeil, D., Huttner, W.B., Johnson, J.E., and Wechsler-Reya, R.J. (2005). Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat. Neurosci.* *8*, 723–729.
- Lee, E.H.L., Chari, R., Lam, A., Ng, R.T., Yee, J., English, J., Evans, K.G., Macaulay, C., Lam, S., and Lam, W.L. (2008). Disruption of the non-canonical WNT pathway in lung squamous cell carcinoma. *Clin. Med. Oncol.* *2008*, 169–179.

- Lee, J., Kim, D.-H., Lee, S., Yang, Q.-H., Lee, D.K., Lee, S.-K., Roeder, R.G., and Lee, J.W. (2009). A tumor suppressive coactivator complex of p53 containing ASC-2 and histone H3-lysine-4 methyltransferase MLL3 or its paralogue MLL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8513–8518.
- Leonard, J.M., Ye, H., Wetmore, C., and Karnitz, L.M. (2008). Sonic Hedgehog signaling impairs ionizing radiation-induced checkpoint activation and induces genomic instability. *J. Cell Biol.* *183*, 385–391.
- Lim, W.K., Wang, K., Lefebvre, C., and Califano, A. (2007). Comparative analysis of microarray normalization procedures: effects on reverse engineering gene networks. *Bioinformatics* *23*, i282–8.
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., and Pauwels, P. (2012). Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* *7*, e46536.
- Lips, E.H., van Eijk, R., de Graaf, E.J.R., Oosting, J., de Miranda, N.F.C.C., Karsten, T., van de Velde, C.J., Eilers, P.H.C., Tollenaar, R.A.E.M., van Wezel, T., et al. (2008). Integrating chromosomal aberrations and gene expression profiles to dissect rectal tumorigenesis. *BMC Cancer* *8*, 314.
- Liss, M.A., Schlicht, M., Kahler, A., Fitzgerald, R., Thomassi, T., Degueme, A., Hessner, M., and Datta, M.W. Characterization of soy-based changes in Wnt-frizzled signaling in prostate cancer. *Cancer Genomics Proteomics* *7*, 245–252.
- Lo, K.C., Rossi, M.R., Burkhardt, T., Pomeroy, S.L., and Cowell, J.K. (2007). Overlay analysis of the oligonucleotide array gene expression profiles and copy number abnormalities as determined by array comparative genomic hybridization in medulloblastomas. *Genes. Chromosomes Cancer* *46*, 53–66.
- Lorenz, A., Deutschmann, M., Ahlfeld, J., Prix, C., Koch, A., Smits, R., Fodde, R., Kretschmar, H. a, and Schüller, U. (2011). Severe alterations of cerebellar cortical development after constitutive activation of Wnt signaling in granule neuron precursors. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 3326–3338.
- Lu, D., Zhao, Y., Tawatao, R., Cottam, H.B., Sen, M., Leoni, L.M., Kipps, T.J., Corr, M., and Carson, D.A. (2004). Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3118–3123.
- Lujambio, A., Calin, G. a, Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J., et al. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 13556–13561.
- Lumpkin, E.A., Collisson, T., Parab, P., Omer-Abdalla, A., Haeberle, H., Chen, P., Doetzlhofer, A., White, P., Groves, A., Segil, N., et al. (2003). Math1-driven GFP expression in the developing nervous system of transgenic mice. *Gene Expr. Patterns* *3*, 389–395.
- Luyten, A., Su, X., Gondela, S., Chen, Y., Rompani, S., Takakura, A., and Zhou, J. (2010). Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* *21*, 1521–1532.

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, 9448–9453.

Mahadevan, D., Choi, J., Cooke, L., Simons, B., Riley, C., Klinkhammer, T., Sud, R., Maddipoti, S., Hehn, S., Garewal, H., et al. (2009). Gene Expression and Serum Cytokine Profiling of Low Stage CLL Identify WNT/PCP, Flt-3L/Flt-3 and CXCL9/CXCR3 as Regulators of Cell Proliferation, Survival and Migration. *Hum. Genomics Proteomics* 2009, 453634.

Mar, L., and Hoodless, P.A. (2006). Embryonic fibroblasts from mice lacking Tgif were defective in cell cycling. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4302–4310.

Mathis, L., and Nicolas, J.-F. (2003). Progressive restriction of cell fates in relation to neuroepithelial cell mingling in the mouse cerebellum. *Dev. Biol.* 258, 20–31.

Mayanil, C.S., George, D., Freilich, L., Miljan, E.J., Mania-Farnell, B., McLone, D.G., and Bremer, E.G. (2001). Microarray analysis detects novel Pax3 downstream target genes. *J. Biol. Chem.* 276, 49299–49309.

Melhuish, T. a, Gallo, C.M., and Wotton, D. (2001). TGIF2 interacts with histone deacetylase 1 and represses transcription. *J. Biol. Chem.* 276, 32109–32114.

Michl, P., Ramjaun, A.R., Pardo, O.E., Warne, P.H., Wagner, M., Poulsom, R., D'Arrigo, C., Ryder, K., Menke, A., Gress, T., et al. (2005). CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 7, 521–532.

Millenaar, F.F., Okyere, J., May, S.T., van Zanten, M., Voeselek, L.A.C.J., and Peeters, A.J.M. (2006). How to decide? Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics* 7, 137.

Moon, N.S., Premdas, P., Truscott, M., Leduy, L., Bérubé, G., and Nepveu, A. (2001). S phase-specific proteolytic cleavage is required to activate stable DNA binding by the CDP/Cut homeodomain protein. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6332–6345.

Nepveu, a (2001). Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development. *Gene* 270, 1–15.

Nicot, A., Lelièvre, V., Tam, J., Waschek, J. a, and DiCicco-Bloom, E. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and sonic hedgehog interact to control cerebellar granule precursor cell proliferation. *J. Neurosci.* 22, 9244–9254.

Nishizaki, T., Harada, K., Kubota, H., Ozaki, S., Ito, H., and Sasaki, K. (1999). Genetic alterations in pediatric medulloblastomas detected by comparative genomic hybridization. *Pediatr. Neurosurg.* 31, 27–32.

Northcott, P. a, Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C.G., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S.C., Hawkins, C.E., French, P., et al. (2010a). Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J. Clin. Oncol.* 29, 1408–1414.

- Northcott, P. a, Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C.G., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S.C., Hawkins, C.E., French, P., et al. (2010b). Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J. Clin. Oncol.* *29*, 1408–1414.
- Northcott, P. a, Jones, D.T.W., Kool, M., Robinson, G.W., Gilbertson, R.J., Cho, Y.-J., Pomeroy, S.L., Korshunov, A., Lichter, P., Taylor, M.D., et al. (2012a). Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 818–834.
- Northcott, P. a, Shih, D.J.H., Peacock, J., Garzia, L., Sorana Morrissy, a, Zichner, T., Stütz, A.M., Korshunov, A., Reimand, J., Schumacher, S.E., et al. (2012b). Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* *488*, 49–56.
- Northcott, P.A., Dubuc, A.M., Pfister, S., and Taylor, M.D. (2012c). Molecular subgroups of medulloblastoma. *12*, 871–884.
- 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*, 7331–7336.
- Oliver, T.G., Meylan, E., Chang, G.P., Xue, W., Burke, J.R., Humpton, T.J., Hubbard, D., Bhutkar, A., and Jacks, T. (2011). Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. *Mol. Cell* *43*, 57–71.
- Packer, R.J., and Vezina, G. (2008). Management of and prognosis with medulloblastoma: therapy at a crossroads. *Arch. Neurol.* *65*, 1419–1424.
- Packer, R.J., Cogen, P., Vezina, G., and Rorke, L.B. (1999). Medulloblastoma: clinical and biologic aspects. *Neuro. Oncol.* *1*, 232–250.
- Paquet-Durand, F., Tan, S., and Bicker, G. (2003). Turning teratocarcinoma cells into neurons: rapid differentiation of NT-2 cells in floating spheres. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *142*, 161–167.
- Paraf, F., Jothy, S., and Van Meir, E.G. (1997). Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J. Clin. Oncol.* *15*, 2744–2758.
- Pizer, B., and Clifford, S. (2008). Medulloblastoma: new insights into biology and treatment. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* *93*, 137–144.
- Pleasure, S.J., Page, C., and Lee, V.M. (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *J. Neurosci.* *12*, 1802–1815.
- Polkinghorn, W.R., and Tarbell, N.J. (2007). Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* *4*, 295–304.
- Pomeroy, S.L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L.M., Angelo, M., McLaughlin, M.E., Kim, J.Y.H., Goumnerova, L.C., Black, P.M., Lau, C., et al. (2002). Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* *415*, 436–442.

- Pöschl, J., Grammel, D., Dorostkar, M.M., Kretzschmar, H.A., and Schüller, U. (2013). Constitutive activation of β -Catenin in neural progenitors results in disrupted proliferation and migration of neurons within the central nervous system. *Dev. Biol.* *374*, 319–332.
- Pourreyron, C., Reilly, L., Proby, C., Panteleyev, A., Fleming, C., McLean, K., South, A.P., and Foerster, J. (2012). Wnt5a is strongly expressed at the leading edge in non-melanoma skin cancer, forming active gradients, while canonical Wnt signalling is repressed. *PLoS One* *7*, e31827.
- Powers, S.E., Taniguchi, K., Yen, W., Melhuish, T. a, Shen, J., Walsh, C. a, Sutherland, A.E., and Wotton, D. (2010a). Tgif1 and Tgif2 regulate Nodal signaling and are required for gastrulation. *Dev. Cambridge Engl.* *137*, 249–259.
- Powers, S.E., Taniguchi, K., Yen, W., Melhuish, T.A., Shen, J., Walsh, C.A., Sutherland, A.E., and Wotton, D. (2010b). Tgif1 and Tgif2 regulate Nodal signaling and are required for gastrulation. *259*, 249–259.
- Przyborski, S.A., Morton, I.E., Wood, A., and Andrews, P.W. (2000). Developmental regulation of neurogenesis in the pluripotent human embryonal carcinoma cell line NTERA-2. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 3521–3528.
- Puca, R., Nardinocchi, L., Givol, D., and D’Orazi, G. (2010). Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. *Oncogene* *29*, 4378–4387.
- Rainer, J., Sanchez-Cabo, F., Stocker, G., Sturn, A., and Trajanoski, Z. (2006). CARMAweb: comprehensive R- and bioconductor-based web service for microarray data analysis. *Nucleic Acids Res.* *34*, W498–503.
- 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., et al. (1997). Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* *57*, 4042–4047.
- Reimherr, M., and Nicolae, D.L. (2013). On Quantifying Dependence: A Framework for Developing Interpretable Measures. *Stat. Sci.* *28*, 116–130.
- Reins, J., Mossner, M., Neumann, M., Platzbecker, U., Schumann, C., Thiel, E., and Hofmann, W.-K. (2010). Transcriptional down-regulation of the Wnt antagonist SFRP1 in haematopoietic cells of patients with different risk types of MDS. *Leuk. Res.* *34*, 1610–1616.
- Reiss, K., Mentlein, R., Sievers, J., and Hartmann, D. (2002). Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* *115*, 295–305.
- Remke, M., Hielscher, T., Korshunov, A., Northcott, P.A., Bender, S., Kool, M., Westermann, F., Benner, A., Cin, H., Ryzhova, M., et al. (2011). FSTL5 is a marker of poor prognosis in non-WNT/non-SHH medulloblastoma. *J. Clin. Oncol.* *29*, 3852–3861.

Reshef, D.N., Reshef, Y. a, Finucane, H.K., Grossman, S.R., McVean, G., Turnbaugh, P.J., Lander, E.S., Mitzenmacher, M., and Sabeti, P.C. (2011). Detecting novel associations in large data sets. *Science* 334, 1518–1524.

Rice, D.S., and Curran, T. (2001). R OLE OF THE R EELIN S IGNALING P ATHWAY IN C ENTRAL N ERVOUS S YSTEM D EVELOPMENT.

Rios, I., Alvarez-Rodríguez, R., Martí, E., and Pons, S. (2004). Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Dev. Cambridge Engl.* 131, 3159–3168.

Ripka, S., König, a, Buchholz, M., Wagner, M., Sipos, B., Klöppel, G., Downward, J., Gress, T., and Michl, P. (2007a). WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28, 1178–1187.

Ripka, S., König, a, Buchholz, M., Wagner, M., Sipos, B., Klöppel, G., Downward, J., Gress, T., and Michl, P. (2007b). WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28, 1178–1187.

Ripka, S., König, a, Buchholz, M., Wagner, M., Sipos, B., Klöppel, G., Downward, J., Gress, T., and Michl, P. (2007c). WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 28, 1178–1187.

Ripka, S., Neesse, A., Riedel, J., Bug, E., Aigner, A., Poulosom, R., Fulda, S., Neoptolemos, J., Greenhalf, W., Barth, P., et al. (2010). CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Gut* 59, 1101–1110.

Rodríguez-Henche, N., Jamen, F., Leroy, C., Bockaert, J., and Brabet, P. (2002). Transcription of the mouse PAC1 receptor gene: cell-specific expression and regulation by Zac1. *Biochim. Biophys. Acta* 1576, 157–162.

Rutkowski, S., von Hoff, K., Emser, A., Zwiener, I., Pietsch, T., Figarella-Branger, D., Giangaspero, F., Ellison, D.W., Garre, M.-L., Biassoni, V., et al. (2010). Survival and prognostic factors of early childhood medulloblastoma: an international meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* 28, 4961–4968.

Sala, C.F., Formenti, E., Terstappen, G.C., and Caricasole, a (2000). Identification, gene structure, and expression of human frizzled-3 (FZD3). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 27–34.

Salsano, E., Pattera, R., Figus, M., Menghi, F., Maderna, E., Pollo, B., Solero, C.L., Massimi, L., and Finocchiaro, G. (2012). Expression profile of frizzled receptors in human medulloblastomas. *J. Neurooncol.* 106, 271–280.

Sansregret, L., Goulet, B., Harada, R., Wilson, B., Leduy, L., Bertoglio, J., and Nepveu, A. (2006). The p110 isoform of the CDP/Cux transcription factor accelerates entry into S phase. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2441–2455.

Sasselli, V., Boesmans, W., Vanden Berghe, P., Tissir, F., Goffinet, A.M., and Pachnis, V. (2013). Planar cell polarity genes control the connectivity of enteric neurons. *J. Clin. Invest.* 123, 1763–1772.

- Satoh, S., and Watanabe, S. (2008). TGIF, a homeodomain transcription factor, regulates retinal progenitor cell differentiation. *Exp. Eye Res.* *87*, 571–579.
- Schaller, K.L., and Caldwell, J.H. (2000). Developmental and regional expression of sodium channel isoform NaCh6 in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* *420*, 84–97.
- Schilling, K., Oberdick, J., Rossi, F., and Baader, S.L. (2008). Besides Purkinje cells and granule neurons: an appraisal of the cell biology of the interneurons of the cerebellar cortex. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 601–615.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* *3*, 1101–1108.
- Schüller, U., and Rowitch, D.H. (2007). Beta-catenin function is required for cerebellar morphogenesis. *Brain Res.* *1140*, 161–169.
- Schüller, U., Heine, V.M., Mao, J., Kho, A.T., Dillon, A.K., Han, Y.-G., Huillard, E., Sun, T., Ligon, A.H., Qian, Y., et al. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* *14*, 123–134.
- Shen, J., and Walsh, C.A. (2005). Targeted Disruption of Tgif , the Mouse Ortholog of a Human Holoprosencephaly Gene , Does Not Result in Holoprosencephaly in Mice †. *25*, 3639–3647.
- Simon, N., and Tibshirani, R. (2011). comment on “detecting novel associations in large data sets” by Reshef et al, Science dec 16, 2011. *Science* (80-).
- Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. (1995). *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research* (New York: Freeman).
- Solecki, D.J., Liu, X.L., Tomoda, T., Fang, Y., and Hatten, M.E. (2001). Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* *31*, 557–568.
- Solecki, D.J., Govek, E.-E., and Hatten, M.E. (2006). mPar6 alpha controls neuronal migration. *J. Neurosci.* *26*, 10624–10625.
- Spagnoli, F.M., and Brivanlou, A.H. (2008). The Gata5 target, TGIF2, defines the pancreatic region by modulating BMP signals within the endoderm. *Dev. Cambridge Engl.* *135*, 451–461.
- Spengler, D., Villalba, M., Hoffmann, A., Pantaloni, C., Houssami, S., Bockaert, J., and Journot, L. (1997). Regulation of apoptosis and cell cycle arrest by Zac1, a novel zinc finger protein expressed in the pituitary gland and the brain. *EMBO J.* *16*, 2814–2825.
- Stuebaker, A.W., Kreofsky, C.R., Pierson, C.R., Russell, S.J., Galanis, E., and Raffel, C. (2010). Treatment of medulloblastoma with a modified measles virus. *Neuro. Oncol.* *12*, 1034–1042.
- Subramanian, A., Harris, A., Piggott, K., Shieff, C., and Bradford, R. (2002). CNS metastases Metastasis to and from the central nervous system — the “relatively protected site.” *3*, 498–507.

- Székely, G.J., and Rizzo, M.L. (2009). Brownian distance covariance. *Ann. Appl. Stat.* *3*, 1236–1265.
- Taniguchi, K., Anderson, A.E., Sutherland, A.E., and Wotton, D. (2012). Loss of Tgif function causes holoprosencephaly by disrupting the SHH signaling pathway. *PLoS Genet.* *8*, e1002524.
- Taylor, M.D., Northcott, P. a, Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y.-J., Clifford, S.C., Eberhart, C.G., Parsons, D.W., Rutkowski, S., Gajjar, A., et al. (2011). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* *123*, 465–472.
- Thompson, M.C., Fuller, C., Hogg, T.L., Dalton, J., Finkelstein, D., Lau, C.C., Chintagumpala, M., Adesina, A., Ashley, D.M., Kellie, S.J., et al. (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J. Clin. Oncol.* *24*, 1924–1931.
- Thurner, S., Wick, N., and Hanel, R. (2003). Anomalous diffusion on dynamical networks : a model for interacting epithelial cell migration. *320*, 475–484.
- Tissir, F., and Goffinet, A.M. (2006). Expression of planar cell polarity genes during development of the mouse CNS. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 597–607.
- Tong, C.Y.K., Hui, A.B.Y., Yin, X.-L., Pang, J.C.S., Zhu, X.-L., Poon, W.-S., and Ng, H.-K. (2004). Detection of oncogene amplifications in medulloblastomas by comparative genomic hybridization and array-based comparative genomic hybridization. *J. Neurosurg.* *100*, 187–193.
- Truscott, M., Harada, R., Vadnais, C., Robert, F., and Nepveu, A. (2008). p110 CUX1 cooperates with E2F transcription factors in the transcriptional activation of cell cycle-regulated genes. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3127–3138.
- Vadnais, C., Davoudi, S., Afshin, M., Harada, R., Dudley, R., Clermont, P.-L., Drobetsky, E., and Nepveu, A. (2012). CUX1 transcription factor is required for optimal ATM/ATR-mediated responses to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4483–4495.
- Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szász, A.M., Wang, Z.C., Brock, J.E., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2009). A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* *137*, 1032–1046.
- Varrault, A., Ciani, E., Apiou, F., Bilanges, B., Hoffmann, A., Pantaloni, C., Bockaert, J., Spengler, D., and Journot, L. (1998). hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region frequently lost in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8835–8840.
- Vibhakar, R., Foltz, G., Yoon, J.-G., Field, L., Lee, H., Ryu, G.-Y., Pierson, J., Davidson, B., and Madan, A. (2007). Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma. *Neuro. Oncol.* *9*, 135–144.
- Vilz, T.O., Moepps, B., Engele, J., Molly, S., Littman, D.R., and Schilling, K. (2005). The SDF-1/CXCR4 pathway and the development of the cerebellar system. *Eur. J. Neurosci.* *22*, 1831–1839.

- Vistejnova, L., Dvorakova, J., Hasova, M., Muthny, T., Velebny, V., Soucek, K., and Kubala, L. (2009). The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuro Endocrinol. Lett.* *30 Suppl 1*, 121–127.
- Wada, H., Tanaka, H., Nakayama, S., Iwasaki, M., and Okamoto, H. (2006). Frizzled3a and Celsr2 function in the neuroepithelium to regulate migration of facial motor neurons in the developing zebrafish hindbrain. *Development* *133*, 4749–4759.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* *369*, 574–578.
- Wallace, V.A. (1999). Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr. Biol.* *9*, 445–448.
- Wang, Y., Thekdi, N., Smallwood, P.M., Macke, J.P., and Nathans, J. (2002). Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS. *J. Neurosci.* *22*, 8563–8573.
- Wechsler-Reya, R.J. (2003). Analysis of gene expression in the normal and malignant. *Recent Prog. Horm. Res.* *58*, 227–48.
- Wechsler-Reya, R.J., and Scott, M.P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* *22*, 103–114.
- Wen, X., Li, Y., Hu, K., Dai, C., and Liu, Y. (2005). Hepatocyte growth factor receptor signaling mediates the anti-fibrotic action of 9-cis-retinoic acid in glomerular mesangial cells. *Am. J. Pathol.* *167*, 947–957.
- Wetmore, C., Eberhart, D.E., and Curran, T. (2000). The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched. *Cancer Res.* *60*, 2239–2246.
- White, J.J., and Sillitoe, R. V. (2013). Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *2*, 149–164.
- Van Wijnen, A.J., van Gurp, M.F., de Ridder, M.C., Tufarelli, C., Last, T.J., Birnbaum, M., Vaughan, P.S., Giordano, A., Krek, W., Neufeld, E.J., et al. (1996). CDP/cut is the DNA-binding subunit of histone gene transcription factor HiNF-D: a mechanism for gene regulation at the G1/S phase cell cycle transition point independent of transcription factor E2F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 11516–11521.
- Wotton, D., and Massagué, J. (2001). Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *254*, 145–164.
- Xu, H., He, J.-H., Xiao, Z.-D., Zhang, Q.-Q., Chen, Y.-Q., Zhou, H., and Qu, L.-H. (2010). Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. *Hepatology* *52*, 1431–1442.

- Xu, X.-M., Yoo, M.-H., Carlson, B. a, Gladyshev, V.N., and Hatfield, D.L. (2009). Simultaneous knockdown of the expression of two genes using multiple shRNAs and subsequent knock-in of their expression. *Nat. Protoc.* *4*, 1338–1348.
- Yang, Z.-J., Ellis, T., Markant, S.L., Read, T.-A., Kessler, J.D., Bourboulas, M., Schüller, U., Machold, R., Fishell, G., Rowitch, D.H., et al. (2008). Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* *14*, 135–145.
- Yeh, B.-W., Wu, W.-J., Li, W.-M., Li, C.-C., Huang, C.-N., Kang, W.-Y., Liu, Z.-M., and Huang, H.-S. (2012). Overexpression of TG-interacting factor is associated with worse prognosis in upper urinary tract urothelial carcinoma. *Am. J. Pathol.* *181*, 1044–1055.
- Younkin, D.P., Tang, C.M., Hardy, M., Reddy, U.R., Shi, Q.Y., Pleasure, S.J., Lee, V.M., and Pleasure, D. (1993). Inducible expression of neuronal glutamate receptor channels in the NT2 human cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 2174–2178.
- Zhang, H., Li, N., Tang, Y., Wu, W., Zhang, Q., and Yu, Z. (2009). Negative functional interaction of retinoic acid and TGF-beta signaling mediated by TG-interacting factor during chondrogenesis. *Cell. Physiol. Biochem.* *23*, 157–164.
- Zhang, X.-C., Chen, J., Su, C.-H., Yang, H.-Y., and Lee, M.-H. (2008). Roles for CSN5 in control of p53/MDM2 activities. *J. Cell. Biochem.* *103*, 1219–1230.
- Zhou, P., Porcionatto, M., Pilapil, M., Chen, Y., Choi, Y., Tolias, K.F., Bikoff, J.B., Hong, E.J., Greenberg, M.E., and Segal, R.A. (2007). Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron* *55*, 53–68.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., and Littman, D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* *393*, 595–599.

6.4 Danksagung

Für die Überlassung dieses äußerst interessanten Themas, sowie für die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie durchzuführen, die fortwährende Unterstützung meines Projektes, für seine Anregungen und Diskussionsbereitschaft möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Karl Schilling bedanken.

Bei Herrn Dr. Alexander Glassmann bedanke ich mich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die fortwährende Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Dieter Fürst danke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Für die Unterstützung bei Medulloblastom-spezifischen Fragestellungen und Anregungen sowie für die Übersendung von Materialien möchte ich mich bei Herrn Dr. Ulrich Schüller bedanken.

Allen Mitarbeitern des anatomischen Institutes möchte ich ganz herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, die stets für mich da war und mich unterstützt hat. Insbesondere danke ich meinem Freund Christian, der mir zum einen auf wissenschaftlicher Ebene stets ein guter Diskussionspartner war und mir außerdem durch viele schöne Stunden das Schreiben dieser Arbeit erleichtert hat.