

Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

Morphologische Charakterisierung
von konditional Patched1 defizienten Mäusen
als Modell für das Medulloblastom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Bahar Sayin
geboren in Baden-Baden

2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Wagner

2. Berichterstatter: PD Dr. Bernd Baumann

Tag der Promotion: 13.02.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Cerebellum	1
1.1.1 Die embryonale Entwicklung des Cerebellums	1
1.2 Das Medulloblastom	4
1.3 Der Hedgehog/Patched-Signaltransduktionsweg	8
1.3.1 Der Shh/Ptch-Signalweg.....	8
1.3.2 Der Shh/Ptch-Signalweg bei der Entwicklung des Cerebellums.....	10
1.3.3 Weitere Klinik durch Mutationen im Shh/Ptch-Signalweg.....	10
1.4 Ziel dieser Arbeit	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Laborgeräte.....	13
2.1.2 Chemikalien, Lösungen	13
2.1.3 Puffer	14
2.1.4 Primer	15
2.1.5 Primär-Antikörper	15
2.1.6 Sekundär-Antikörper.....	16
2.1.7 Verbrauchsmaterial	16
2.1.8 Tiere	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Konditional Patched1 defiziente Tiere: Zuchtschema und Genotypisierung	17
2.2.2 DNA-Isolierung	17
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (=PCR)	17
2.2.4 Gelelektrophorese	18
2.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)	19
2.2.6 Immunhistochemische Färbung.....	20
2.2.7 Quantitative Methodik: Numerische Auswertung/Morphometrie	22
2.2.8 Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve	22

3	Ergebnisse	23
3.1	Die p48 ^{+/Cre} _Ptch1 ^{flox/flox} Maus	23
3.1.1	Zuchtschema und Genotypisierung der Tiere	23
3.1.2	Konditionale Ptch1-Deletion bei der p48 ^{+/Cre} _Ptch1 ^{flox/flox} Maus	25
3.2	Tumorinzidenz bei konditional Ptch1 defizienten Mäusen	27
3.3	Veränderungen im Cerebellum der p48 ^{+/Cre} _Ptch1 ^{flox/flox} Maus	28
3.3.1	Makroskopie	28
3.3.2	Histologie (H.E.-Färbungen)	30
3.4	Die Expression von Markern: Immunhistochemische Färbungen der Kleinhirne (pnd 0, pnd 7, pnd 10 und pnd 21).....	33
3.5	Quantitative Auswertung: Morphometrie	44
3.5.1	Breite der EGL des Kleinhirnkortex: Wildtyp- und Ptch1-Knockout-Mäuse im Vergleich	46
4	Diskussion	51
4.1	Ptf1a ^{+/Cre} _Ptch1 ^{flox/flox} Maus – ein Mausmodell für das Medulloblastom	51
4.2	Konditionale Ptch1-Deletion führt zur Entstehung eines Medulloblastoms und endet in einem letalen Phänotyp	54
4.3	Immunhistochemische Charakterisierung: Die Expression von Markern	55
4.4	Körnerzellvorläufer (GCP) als Ursprungszellen des Medulloblastoms und die Verbreiterung der äußeren Körnerzellschicht (EGL)	58
4.5	Bedeutung und Ausblick für die Therapie des Medulloblastoms.....	62
4.6	Schlussfolgerung	63
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	66
7	Abbildungsverzeichnis	75
8	Tabellenverzeichnis	77
	Danksagung	78
	Lebenslauf	79

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
bHLH	basisches Helix-Loop-Helix-Protein
bp	Basenpaare
H.E.	Hämatoxylin-Eosin (-Färbung)
C	Cytosin
Cb	Cerebellärer Lobulus
cCT	Craniale Computertomographie
CDK6	Cyclin-dependent Kinase 6
Chr.	Chromosom
CMB	Klassisches Medulloblastom
CPe	choroid plexus epithelium
DCN	Deep cerebellar nuclei
Disp1	Dispatched 1 Protein
DMB	Desmoplastisches Medulloblastom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGL	External germinal layer; Äußere Körnerzellschicht
G	Guanin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GCP	Granule cell precursors; Körnerzellvorläufer
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
Gli	Glioma-associated oncogene homolog
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IGL	Internal granule layer; Innere Körnerzellschicht
kDa	Kilodalton
KO/K.O.	Knockout
MB	Medulloblastom
Min	Minuten
ML	Molecular layer
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRI	magnetic resonance imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
NeuN	Neuronal Nuclei
PCL	Purkinje cell layer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PdgfR α	Platelet-derived growth factor receptor Typ α
pnd	Post natal day; Postnataltag
Ptch	Patched
Ptf1a	pancreatic transcription factor 1a
r1/R1	Rhombomer 1

rRL	rostrale Rautenlippe
Shh	Sonic hedgehog
Sek	Sekunden
Sufu	Suppressor of fused
Smo	Smoothened
Sz	Stammzellen
Tab.	Tabelle
VZ	Ventrikularzone
Wnt	Wingless
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Cerebellum

Das ausgereifte Kleinhirn liegt in der hinteren Schädelgrube und wird vom dorsalen Hirnstamm durch den vierten Ventrikel getrennt.

Histologisch wird es in Rinde und Mark (Cortex - und Corpus medullare cerebelli) unterteilt. Der Cortex des reifen Kleinhirns besteht aus drei Schichten: Der außen gelegenen Molekularzellschicht (Molecular layer; ML) gefolgt von der Purkinjezellschicht (Purkinje cell layer; PCL) und der inneren Körnerzellschicht (Internal granule layer; IGL).

1.1.1 Die embryonale Entwicklung des Cerebellums

Die Entwicklung des Kleinhirns der Maus beginnt an Embryonaltag (E) 9 und dauert bis etwa Tag 21 nach der Geburt an. Beim Menschen geht dieser Entwicklungs-Prozess bis ins 2. Lebensjahr (Butts, Green, and Wingate 2014; Donkelaar et al. 2003; Gilbertson and Ellison 2008; Hatten and Heintz 1995; Hoshino 2012).

Die lange Entwicklungsphase des Kleinhirns macht es besonders vulnerabel für die Entstehung von Malignomen und für Abnormalitäten die während der Entwicklungsphase auftreten (Archer, Weeraratne, and Pomeroy 2012).

Für die Entwicklung des murinen Kleinhirns aus dem Rhombomer 1 (R1), spielen die Transkriptionsfaktoren Otx2 und Hoxa2 eine entscheidende Rolle (Hatten and Roussel 2011).

R1 enthält zwei verschiedene Keimepithelien: die Ventrikularzone (VZ) und die rostrale Rautenlippe (rRL). Aus den Keimepithelien entstehen die verschiedenen Vorläufer der Zellen des Kleinhirns. Die VZ ist der Ursprungsort für die GABAergen Vorläuferzellen, wie die Purkinjezellen, die inhibitorischen Interneurone und die GABAergen Neurone der tiefen Kleinhirnerne (deep cerebellar nuclei; DCN). Aus der rRL entstehen glutamaterge Vorläuferzellen, wie die Körnerzellvorläufer (granule cell precursors; GCP), Vorläufer der unipolaren Bürstenzellen und die glutamatergen Neurone der DCN (Fink et al. 2006; Hatten and Roussel 2011; Hoshino 2012; Machold and Fishell 2005; Schüller et al. 2008). Die Expression von Math1 im Keimepithel der rRL führt dann ab E12.5 zur tangentialen Wanderung der GCP von der Rautenlippe über die Kleinhirnoberfläche nach rostral, wo sie dann die äußere Körnerzellschicht (external germinal layer; EGL) formen (Machold and Fishell 2005; Schüller et al. 2008; Yang et al. 2008). Math1 ist ein Transkriptionsfaktor der

basic helix-loop-helix-Familie und dient u.a. als Marker speziell für unreife GCP. Die Math1-Expression wird bis zum Austritt der GCP aus dem Zellzyklus und Wanderung aus der EGL in die innere Körnerzellschicht (internal granule layer; IGL) aufrechterhalten. Die GABAergen Neurone werden durch die Expression von Ptf1a aus den neuroepithelialen Zellen der VZ abgeleitet. Ptf1a ist ebenfalls ein basic helix-loop-helix-Transkriptionsfaktor und für die Produktion der Zellen der VZ zuständig (Hoshino 2012; Hoshino et al. 2005; Lumpkin et al. 2003; Lundell, Zhou, and Doughty 2009; Machold and Fishell 2005; Storm et al. 2009; Yang et al. 2008) (Abb. 1).

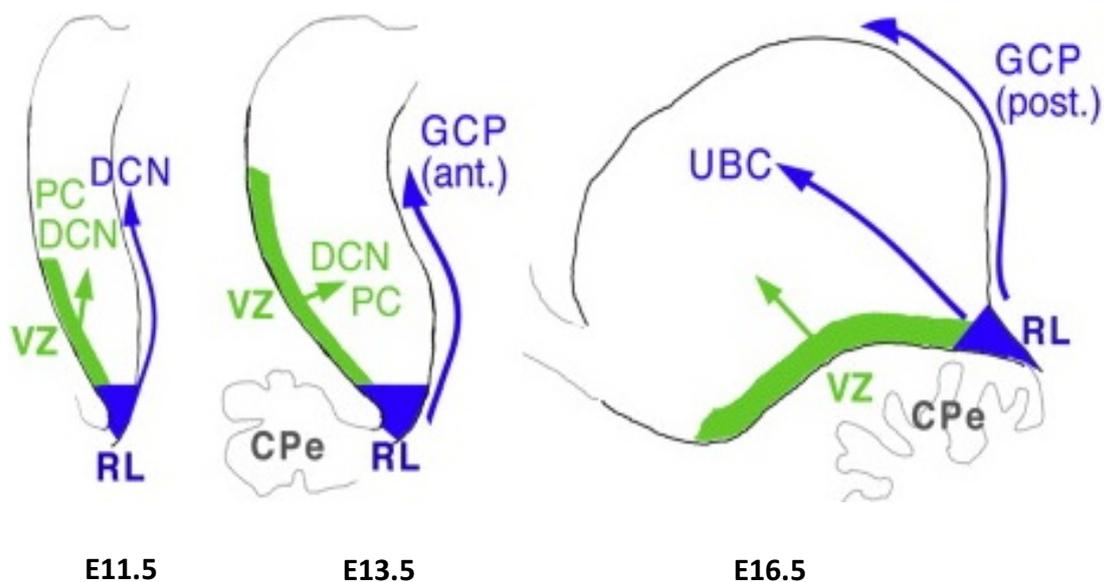


Abb. 1: Schematische Darstellung der Kleinhirnentwicklung [entnommen aus: (Fernandes, Antoine, and Hébert 2012)]. VZ=Ventricularzone, PC=Purkinjezellen, DCN=tiefe Kleinhirnkerne, RL=Rautenlippe, GCP=Körnerzellvorläufer, UBC=unipolare Bürstenzellen, CPe=Plexus choroideus.

Nach der Formung der EGL beginnen die GCP zwischen pnd 4 und 8 durch den Einfluss von Shh (sonic hedgehog) massiv zu proliferieren. Shh wird dabei von den Purkinjezellen sezerniert und wirkt über den Ptch1-Rezeptor an den GCP. (Die genaue Beschreibung des Shh/Ptch-Signaltransduktionswegs wird unter 1.3. besprochen.) Math1-induziert wird die EGL in eine außen gelegene Schicht mit proliferierenden Zellen und eine nach innen gelegene Zellschicht mit differenzierenden/postmitotischen Zellen unterteilt (Archer et al. 2012; Gilbertson and Ellison 2008; Hatten and Heintz 1995; Machold and Fishell 2005). Nach und nach Verlassen die GCP den Zellzyklus und migrieren von der EGL radial ins Innere des Kleinhirns und bilden als reife Körnerzellen die IGL (vgl. Abb. 2 zur Verdeutlichung der

Schichtung des unreifen cerebellären Cortex). Bei der Maus ist die Migration etwa an pnd 20 abgeschlossen, welches beim Menschen bis ins zweite Lebensjahr andauern kann (Gilbertson and Ellison 2008; Hatten and Heintz 1995; Machold and Fishell 2005; Wechsler-Reya and Scott 2001). Nach der vollständigen Migration liegt der dreischichtige Cortex des reifen Kleinhirns vor: Molekularzellschicht, Purkinjezellschicht, innere Körnerzellschicht (von außen nach innen betrachtet; Abb. 3).

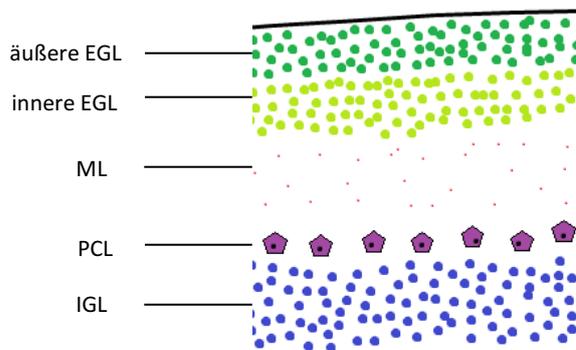


Abb. 2: Schematische Darstellung der Schichtung des noch unreifen cerebellären Cortex

Von außen nach innen: EGL=äußere Körnerzellschicht, ML=Molekularzellschicht, PCL=Purkinjezellschicht, IGL=innere Körnerzellschicht

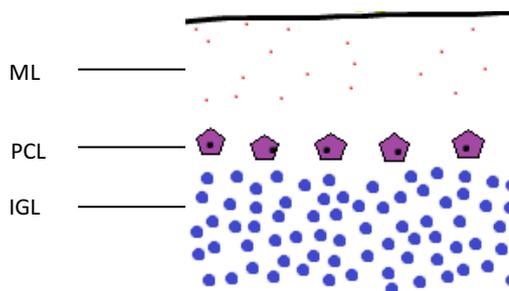


Abb. 3: Schematische Darstellung des 3-schichtigen Cortex des reifen Cerebellums

Von außen nach innen: ML=Molekularzellschicht, PCL=Purkinjezellschicht, IGL=innere Körnerzellschicht

1.2 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom ist ein hochmaligner embryonaler Tumor des Kleinhirns (Nord et al. 2012). Es zählt zu den primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) und wird in der WHO-Klassifikation der Tumore des Nervensystems als Grad IV eingeordnet (Louis et al. 2007; Saran et al. 2008). Mit einem Anteil von 15-20 % aller Hirntumore beim Kind, ist das Medulloblastom der häufigste maligne Tumor des Zentralen Nervensystems des Kindesalters (Park et al. 2012; Yang et al. 2008). Die Inzidenz des Medulloblastoms bei Erwachsenen nimmt mit steigendem Alter ab. Mit einer Häufigkeit von 0,5 pro 1 Million ist es ein sehr seltener Tumor bei erwachsenen Patienten (Shonka, Brandes, and De Groot 2012). Die 5-Jahres-Überlebensrate bei entsprechender Therapie beträgt 55-80 % (Rossi et al. 2008).

Klinisch auffällig wird das Medulloblastom durch Symptome wie Ataxie, Fallneigung, Lethargie und Zeichen der intrakraniellen Drucksteigerung wie Kopfschmerzen, beidseitige Stauungspapillen und morgendliches Erbrechen (Brasme et al. 2012).

Die Diagnostik des Medulloblastoms erfolgt durch die Computertomographie (Abb. 4) und/oder Magnetresonanztomographie. Mit der Histopathologie kann dann zwischen den verschiedenen histologischen Subgruppen unterschieden werden. Auch die Immunhistochemie kann durch den Nachweis der Expression von Markern wie ki67, Synaptophysin und GFAP zur Diagnostik dienen (McLendon et al. 1999). Eine weitere Einteilung des Medulloblastoms erfolgt durch die jeweilige Zuordnung zur molekularen Subgruppe.



Abb. 4: Craniale Computertomographie, axial, ohne Kontrastmittel: Das Medulloblastom zeigt sich im cCT als hyperdenser Tumor (*) in der hinteren Schädelgrube mit Obliteration des vierten Ventrikels und des Kleinhirnwurms. Außerdem sieht man eine Dilatation der lateralen (L) und des dritten (3) Ventrikels. [entnommen aus: (Weintraub et al. 2013)]

Mikroskopisch zeigt sich das Medulloblastom als dicht angeordnete Zellen, die klein, rund und blau erscheinen und eine hohe mitotische Aktivität haben (Louis et al. 2007). Unterschieden werden histologisch vier verschiedene Haupt-Subtypen des Medulloblastoms: Das klassische Medulloblastom (CMB) ist, mit etwa 70%, die häufigste Variante des Medulloblastoms. Als Ursprungszellen denkt man an multipotente Vorläuferzellen, die den Ventrikel umgeben. Oft findet man eine rosettenartige Anordnung der Zellen (sog. Homer-Wright-Rosetten). Das CMB ist vor allem im Kleinhirnwurm lokalisiert (Taylor et al. 2012). Im Gegensatz dazu entsteht das Medulloblastom vom desmoplastischen Typ (DMB), mit einem Anteil von 20%, eher in den Kleinhirnhemisphären. Beim desmoplastischen Medulloblastom vermutet man als Ursprungszellen die Körnerzellvorläufer der äußeren Körnerzellschicht (External granular layer; EGL) des fetalen Kleinhirns (Bühren et al. 2000; Gibson et al. 2010). Weiterhin unterscheidet man histologisch das extrem noduläre Medulloblastom, auch cerebelläres Neuroblastom, und das anaplastische Medulloblastom, mit einem Anteil von jeweils 5% aller Medulloblastome.

Das Medulloblastom kann auch auf molekulargenetischer Ebene in verschiedene Subgruppen eingeteilt werden. Vier verschiedene molekulare Einteilungen werden nach aktuellem Stand unterschieden (Remke et al. 2013; Taylor et al. 2012) (Abb. 5). Die

molekulare Subgruppeneinteilung lässt Rückschlüsse auf die Ätiologie der Medulloblastome zu.

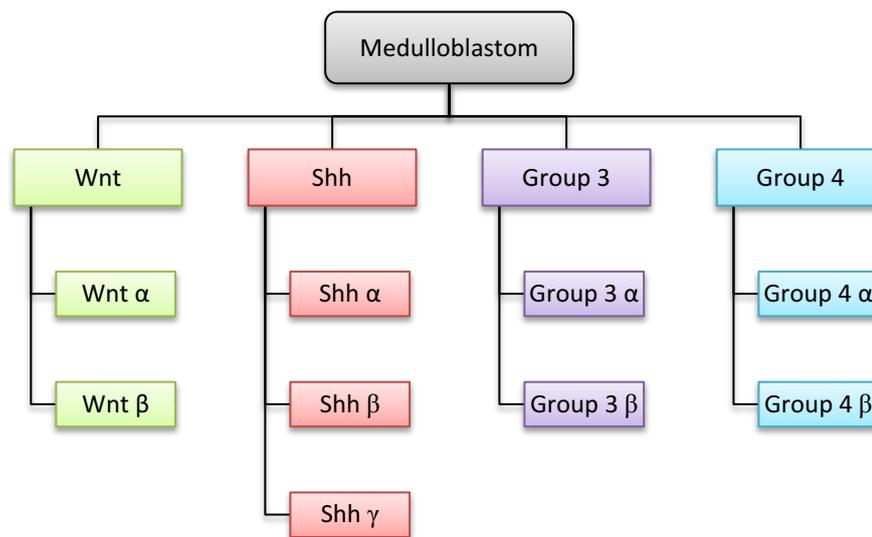


Abb. 5: Molekulare Subgruppen des Medulloblastoms (Abbildung erstellt nach (Taylor et al. 2012), CC BY-NC 2.0, <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

Die Subgruppen zeigen deutliche Unterschiede u.a. in der Epidemiologie, Prognose, vorherrschenden Histologie, genetischen Ursache und dem klinischen Bild. Innerhalb der Hauptgruppen können wiederum weitere Subtypen unterschieden werden, deren Anzahl noch nicht ganz bekannt ist.

Die Wnt-Subgruppe ist am besten untersucht und zeigt eine sehr gute Langzeitprognose. Benannt wurde die Subgruppe nach dem Wnt-Signalweg, der in der Pathogenese dieser molekularen Gruppe, bspw. aufgrund einer Mutation im CTNNB1-Gen, eine Rolle spielt. Histologisch findet man bei der Wnt-Subgruppe meist ein klassisches Medulloblastom oder sehr selten auch den anaplastischen Typ (Northcott et al. 2011; Remke et al. 2013; Taylor et al. 2012). Die Shh-Subgruppe hat ihren Namen durch den Sonic Hedgehog/Patched-Signalweg (s. 1.3). Durch Genmutationen, die in den Stammzellen oder sporadisch entstanden sein können, im Patched1-, Shh-, Smo- oder Sufu-Gen, kommt es zu Fehlregulationen des Shh/Patched-Signalwegs, die eine Prädisposition für ein Medulloblastom hervorrufen. Gli1- oder MYCN-Amplifikationen findet man ebenfalls beim Medulloblastom der Shh-Subgruppe. Auch eine Deletion des Chromosom 9q, auf dem das Patched-Gen zu finden ist, wird beschrieben. Bei einer enorm großen Anzahl von Mausmodellen mit einem MB wird von der molekularen Zugehörigkeit des MBs zur Shh-Subgruppe berichtet. Histologisch findet man zumeist einen desmoplastischen oder

nodulären Typ, selten auch ein klassisches MB. Die Prognose von Patienten mit einem MB dieser Subgruppe ist schlechter als bei der Wnt-Gruppe, aber besser als die der „Group 3“-Medulloblastome, die eine sehr schlechte Prognose haben. Betroffene sind vor allem Kleinkinder im Alter von 0-3 Jahren oder Patienten die älter als 16 Jahren sind. Bei Kindern zwischen 3 und 16 Jahren tritt es weniger häufig auf. Die „Group 3“-Subgruppe hat eine sehr schlechte Prognose, mit häufigem Auftreten von Metastasen. Man findet MYC-Amplifikationen und histologisch insbesondere einen anaplastischen Typ des Medulloblastoms. Die Patienten sind vor allem männlich und Kleinkinder oder Kinder.

„Group 4“-Medulloblastome haben eine ähnliche Prognose wie die der Shh-Subgruppe. Diese Subgruppe zeigt gehäuft MYCN- oder CDK6-Amplifikationen. Die häufigste zytogenetische Veränderung ist das Isochrom 17q. Histologisch findet man das klassische Medulloblastom oder den anaplastischen Typ. Es sind keine Mausmodelle mit Group 4-Medulloblastomen beschrieben (Kool et al. 2012; Taylor et al. 2012).

Die Therapie des Medulloblastoms besteht in erster Linie aus der neurochirurgischen Entfernung des Tumors, mit dem Ziel einer kompletten Resektion um ein mögliches Rezidiv-Risiko zu senken (Zeltzer et al. 1999). Postoperativ folgt dann eine Strahlentherapie, die meist kraniospinal durchgeführt und bei Kindern unter 3-4 Jahren vermieden wird. Eine Chemotherapie kann simultan mit der Strahlentherapie als kombinierte Radiochemotherapie oder adjuvant nach der Strahlentherapie im Sinne einer Erhaltungskemotherapie durchgeführt werden. Bei Kindern unter 3-4 Jahren wird eine postoperative Induktionschemotherapie bevorzugt (Kortmann et al. 2000; Köhl et al. 1998). Begleitend kann zur antiödematösen Therapie Dexamethason eingesetzt werden.

1.3 Der Hedgehog/Patched-Signaltransduktionsweg

Erstmals beschrieben wurde der Hedgehog-Patched-Signalweg 1980 von Wieschaus und Nüsslein-Volhard (Nüsslein-Volhard & Wieschaus, 1980) bei *Drosophila melanogaster*. Bei Vertebraten entdeckte man drei Homologe für den Hedgehog (Hh)-Liganden, die Desert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh) und Sonic hedgehog (Shh) genannt werden (Echelard et al., 1993; Ryan & Chiang, 2012). Am besten untersucht ist der Shh-Ligand, der in Vertebraten neben der Entwicklung der Zellen des Nervensystems (Gliazellen, Neuronen und Körnerzellvorläufer im Kleinhirn) auch bei vielen weiteren Prozessen, wie beispielsweise der Extremitätenentwicklung, von Bedeutung ist (Ingham & McMahon, 2001). Als ein Zwölf-Transmembranprotein fungiert Patched1 (Ptch1) als Hauptrezeptor in der Differenzierung der Zellen während der Embryogenese (Cohen Jr., 2010). Aberrante Aktivierungen des Signalwegs führen zu Störungen in der Entwicklung und zur Tumorgenese.

1.3.1 Der Shh/Ptch-Signalweg

Der Shh-Vorläufer wird als ein 45 kDa Protein im endoplasmatischen Retikulum einem autokatalytischen Prozess unterzogen und dabei entstehen ein Shh-N- und ein Shh-C-Protein. Dabei wird das N-terminale Fragment des Shh-N-Proteins palmytiert und am C-terminalen Ende ein Cholesterol-Molekül angehängt (Abb. 6, A). Dieser Vorgang ist wichtig für die Shh-Funktion, da Shh-N erst dann als aktiver Ligand für seinen Rezeptor Patched1 fungieren kann (Cohen Jr. 2010; Kawakami et al. 2002; Tukachinsky et al. 2012). Danach erfolgt eine parakrine Sekretion des jetzt lipidmodifizierten Shh-Liganden, vermittelt durch das Dispatched1 Protein (Disp1), worauf es mit seinem Rezeptor Patched1 (Ptch1) interagieren kann (Abb. 6, B). Disp1 ist ein Zwölf-Transmembranprotein, welches für die Sekretion des lipidmodifizierten Shh-Liganden zuständig ist (Cohen Jr. 2010). Der Ptch1-Rezeptor ist ein Zwölf-Transmembranprotein und bindet in Abwesenheit seines Liganden Smoothened (Smo), ein Sieben-Transmembranprotein, und inhibiert dieses (Abb. 6, D). Durch die Shh-Ptch1-Interaktion wird der Ptch1-Rezeptor inaktiviert (Abb. 6, C), wodurch Smo phosphoryliert und aktiviert wird (Chen and Jiang 2013; Cohen Jr. 2010). Dadurch werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gebracht, die wiederum Gli-Proteine aktivieren (Abb. 6, E), die dann in den Zellkern gelangen und dort als Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren ihre Zielgene regulieren (Abb. 6, F und G) (Archer et al. 2012; Milla et al. 2012; Stecca and Ruiz I Altaba 2010). Wenn der Shh-Ligand nicht an seinen Rezeptor

Ptch1 bindet und Smo inhibiert ist, werden, die Gli-Transkriptionsfaktoren durch Suppressor of fused (Sufu) inaktiviert und die Transkription der Gli-Zielgene wird unterdrückt (Archer et al. 2012; Cohen 2003). Die Gli-Proteinfamilie besteht aus Gli1, Gli2 und Gli3 (Milla et al. 2012). Gli1 funktioniert transkriptionsaktivierend, wobei Gli2 und Gli3 zusätzlich auch über eine Transkriptions-hemmende Komponente verfügen (Atwood, Chang, and Oro 2012).

Nach der Translokation in den Zellkern binden die Gli-Transkriptionsfaktoren an ihre Erkennungs-Sequenz GACCACCCA (Gli-binding site; GBS) und induzieren die Transkription ihrer Zielgene. Zu denen gehören unter anderem CyclinD1, CyclinD2, N-Mc, PdgfR α , IGF2, Ptch1 und Gli1 selbst (Cohen 2003; Milla et al. 2012; Stecca and Ruiz I Altaba 2010). Durch die direkte Wirkung auf das Ptch1- und Gli1-Gen, wird die Signalkaskade durch einen positiven bzw. negativen Feedbackmechanismus autoreguliert (Ingham and McMahon 2001; Milla et al. 2012).

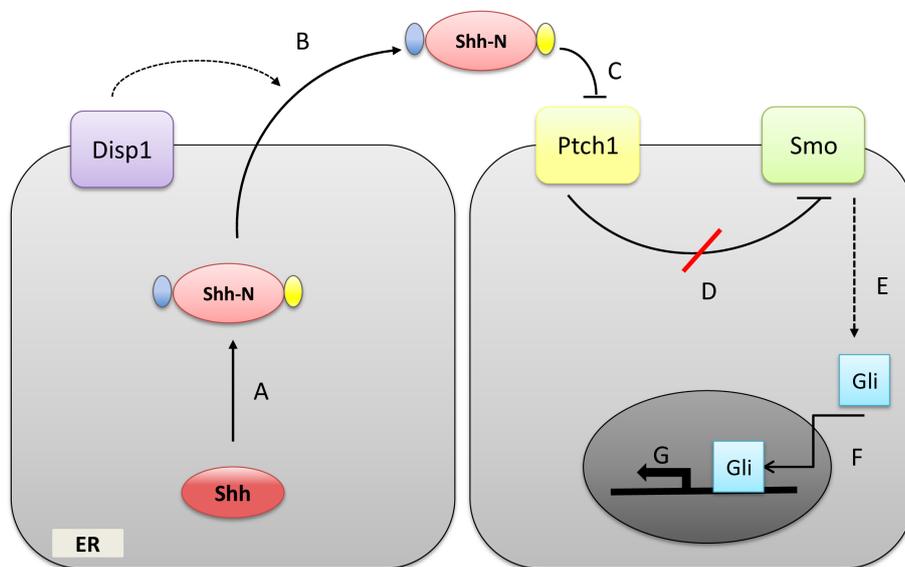


Abb. 6: Schematische Darstellung des Shh/Ptch-Signalwegs

(A) Das Shh-Vorläuferprotein wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) autokatalytisch gespalten und es entstehen ein Shh-N- und ein Shh-C-Protein. An das C-terminale Ende des Shh-N wird dann ein Cholesterol-Molekül (blau) angehängt und am N-terminalen Ende wird es palmitoyliert (gelb). (B) Parakrine Sekretion des lipidmodifiz. Shh-N vermittelt durch Disp1. (C) Shh bindet an seinen Rezeptor Ptch1 und inaktiviert ihn. (D) Durch die Inaktivierung wird die Hemmung von Smo aufgehoben und (E) eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gebracht, die eine Aktivierung von Gli-Proteinen induziert. (F+G) Gli-Proteine gelangen in den Zellkern und regulieren dort als Transkriptionsfaktoren ihre Zielgene. Shh=Sonic hedgehog. Disp1=Dispatched 1 Protein. Ptch=Patched. Smo=Smoothened. Gli=Glioma-associated oncogene homolog. (Quelle: Schematisch nach eigener Darstellung, (Archer et al. 2012; Chen and Jiang 2013; Cohen Jr. 2010))

Die Transkription der CyclinD1- und D2-Gene wirkt sich auf die Regulation des Zellzyklus aus:

- Gli1 wirkt als Transkriptionsfaktor auf das CyclinD1- und CyclinD2-Gen (Duman-Scheel et al. 2002; Shahi et al. 2010).
- Ptch1 interagiert mit CyclinB1, was die nukleäre Translokation von CyclinB1 inhibiert und somit den Beginn der Mitose (M-Phase) verhindert. Shh kann die Bindung zwischen Ptch1 und CyclinB1 aufheben, wodurch CyclinB1 in den Zellkern wandert und den Beginn des Zellzyklus initiiert (Jiang, Yang, and Ma 2009).

Ptch1 wirkt also als Zellzyklusinhibitor, was die Wichtigkeit der Regulation des Zellzyklus über den Shh/Ptch-Signalweg zeigt. Bei Dysregulation, z.B. durch Ptch1-inaktivierende Mutationen, kann es zu massiven Zellproliferationen kommen. Daher zählt Ptch1 zu den Tumorsuppressorgenen (Peng et al. 2013).

1.3.2 Der Shh/Ptch-Signalweg bei der Entwicklung des Cerebellums

Der Shh/Ptch-Signalweg hat eine wichtige Bedeutung bei der embryonalen Entwicklung des Kleinhirns (siehe unter 1.1). Es hat eine mitogene und morphogene Wirkung auf das Kleinhirn (Archer et al. 2012; Fuccillo, Joyner, and Fishell 2006).

Als Mitogen wird Shh von den Purkinjezellen sezerniert und wirkt über den Ptch1-Rezeptor an den GCP. Dies führt zur Proliferation und Differenzierung der GCP in der EGL.

Die morphogene Rolle von Shh zeigt sich simultan zur Proliferation der GCP in der Entwicklungsphase des Kleinhirns. Dabei ist Shh zuständig für die Strukturierung des Kleinhirns durch Ausbildung der typischen blattförmigen Kleinhirnwindungen (Folia cerebelli), die Regulierung der Größe des Organs und die Ausrichtung entlang der anterior-posterior Achse (Archer et al. 2012; Dahmane and Ruiz-i-Altaba 1999; Fuccillo et al. 2006; Haldipur et al. 2012). Im Kleinhirn der Maus findet die Ausformung der Kleinhirnwindungen innerhalb der ersten zwei Wochen postnatal statt (Corrales et al. 2006).

1.3.3 Weitere Klinik durch Mutationen im Shh/Ptch-Signalweg

Veränderungen die im Shh/Ptch-Signalweg entstehen, können sich in verschiedenen Phänotypen zeigen. Mutationen im Ptch1-Gen, das sich zytogenetisch auf 9q22.3 befindet (Cohen Jr. 2010), können u.a. beim Gorlin-Goltz-Syndrom (Basalzellnävus-Syndrom), Medulloblastom, Meningiom, Neuroektodermalem Tumor, Mammakarzinom, Ösophaguskarzinom, Plattenepithel-Karzinom, Trichoepitheliom und Rhabdomyosarkom

gefunden werden (Cohen 2003; Cohen Jr. 2010). Ebenso können auch phänotypische Veränderungen durch Mutationen des Shh-Gens, lokalisiert auf Chromosom 7q36 zu finden, entstehen. Diese können sich u.a. als Holoprosencephalie, Gorlin-Goltz-Syndrom, Medulloblastom und Mammakarzinom äußern (Cohen 2003; Cohen Jr. 2010). Auch weitere Gene, wie das Disp1-, Smo-, Sufu-Gen und die Gli-Gene, können verändert sein und zu Fehlregulationen im Shh/Ptch-Signalweg führen. Diese Mutationen können sich u.a. auch als Medulloblastom zeigen (Cohen Jr. 2010).

1.4 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse eines konditionalen Ptch1-defizienten Mausmodells und die Charakterisierung des Shh-assoziierten Medulloblastoms. Dabei bildeten morphologische und immunhistochemische Untersuchungsmethoden den Schwerpunkt der Arbeit. Hauptaugenmerk der gesamten Untersuchungen lag dabei bei der Frage nach der Ursprungszelle des Shh-Subtyps bei der Medulloblastomentstehung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

BioDoc Analyse	Biometra, Göttingen
Gelelektrophoresekammern	Stratagene, La Jolla CA, USA
Hybaid GmbH, Heidelberg	
Glasküvetten	Engelbrecht, Edermünde
Magnetic Immuno Staining Tray	CellPath, Hempstead
Messzylinder	Schott, Mainz
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop	Leica DM 5500
Mikrotom	Mikrom GmbH, Walldorf
Mikrowellenküvetten	Engelbrecht, Edermünde
PCR-Geräte	Thermo Electron, Dreieich
Biometra, Göttingen	
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Software	LAS (Leica Application Suite) 4.1.0.
Spannungsgeräte	Bio-Rad, München
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Thermopapier	Sony, Japan
UV-Tisch	Bachofer, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Zürich
Waage	PAG Oerlikon, Zürich
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Chemikalien, Lösungen

Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
BSA (Bovin Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dako-Pen	Dako Denmark AIS, Gostrup, Dänemark
DNA-Isolierungs-Kit	Qiagen, Hilden
dNTP-Mix	Invitrogen, Karlsruhe

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glacial acetic acid	AppliChem, Darmstadt
Hämalaun	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Qiagen, Hilden
NaCl	J.T. Baker, Deventer, Holland
Na ₂ HPO ₄	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumcitrat	AppliChem, Darmstadt
Nova Red Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame
PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SuperScriptII Rev. Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Tris base	USB Corporation, Cleveland OH, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Vectastain ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame
Vitroclud	Langenbrinck, Emmendingen
Wasserstoffperoxid-Lösung 30%	Fischar, Saarbrücken
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Zitronensäure	Fluka, Buchs, Schweiz

2.1.3 Puffer

Na-Citrat-Puffer pH 6,0

Stock A: 21,01 g 0,1M Zitronensäure (C₆H₈O₇ H₂O) wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. Stock B: 29,41 g 0,1M Natriumcitrat (C₆H₅Na₃O₇ H₂O) wurden in 1000 ml Aqua dest. gelöst. 18 ml Stock A und 82 ml Stock B wurden zu 900 ml Aqua dest. zugegeben und auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt.

TAE (Tris-acetate, EDTA buffer)

2M Tris base (242,2 g), 2M Glacial acetic acid (57,1 ml) und 50mM EDTA (18,61g Na₂ EDTA 2 H₂O) wurden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

TBST (Tris-Buffer-Saline Tween) pH 7,6

60,5 g Tris base wurde in 700 ml Aqua dest. gelöst. Mit 2N Salzsäure wurde auf pH 7 eingestellt, mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt und darin 90 g NaCl gelöst. Anschließend wurde 1 ml 0,1% Tween-20 hinzugegeben.

2.1.4 Primer

Tab. 1: Primer

Name	Sequenz (5'-3')
P48 Cre-F	ACCAGCCAGCTATCAACTCG
P48 Cre-R	TTACATTGGTCCAGCCACC
p910F.4	ACGACCCTGGACGACATCCTAAA
p1011R.2	TCTGTCCTGTTTCACTGAATGCATGG
Neo-F	CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGG
Neo-R	GCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG
Exon 7	AGGAAGTATATGCATTGGCAGGAG
wt/flox_R	CAATCAAGGAGCAGAGGCCCAA

2.1.5 Primär-Antikörper

Tab. 2: Primär-Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestell-Nr.
Anti-Ki67	Rat	1:100	DakoCytomation	M 7249
Anti-NeuN	Mouse	1:100	Chemicon	MAB377
Anti-Nestin	Mouse	1:1000	Abcam	Ab6142
Anti-MAP2	Chicken	1:200	Abcam	ab5392
Anti-PAX6	Rabbit	1:500	Berkeley	PR-B278-P
Anti-Calbindin	Mouse	1:1000	Biomol	WA-ALS14655
Anti-Calretinin	Mouse	1:2000	ZYMED invitrogen	18-0291
Anti-Cre	Rabbit	1:1000	Novagen	69050

2.1.6 Sekundär-Antikörper

Tab. 3: Sekundär-Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma	Bestell-Nr.
Anti-Rat	Rabbit	1:100	Vector Lab.	BA-4000
Anti-Mouse	Horse	1:100	Vector Lab.	BA-2000
Anti-Chicken	Goat	1:100	Vector Lab.	BA-9010
Anti-Rabbit	Goat	1:100	Vector Lab.	BA-1000

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Einmalpipetten	Becton Dickison, Berges
Objektträger	SuperFrost Plus Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,7 ml	Roth, Karlsruhe
0,2 ml Thin Wall Strip Tubes	Biozym Scientific, Oldendorf
0,2 ml Thin Wall Strip Caps	Biozym Scientific, Oldendorf

2.1.8 Tiere

P48_Cre Mauslinie	Arbeitsgruppe Martin Wagner, Innere Medizin I, Ulm (Nakhai et al. 2007)
Ptch1 ^{flox/flox} Mauslinie	Arbeitsgruppe Heidi Hahn, Universität Göttingen (Hahn et al. 1998)

2.2 Methoden

2.2.1 Konditional Patched1 defiziente Tiere: Zuchtschema und Genotypisierung

Um die konditional Ptch1 defiziente Mauslinie zu erhalten wurden p48^{+cre} (Nakhai et al. 2007) Mäuse mit Ptch1^{flox/flox} Mäusen (Hahn et al. 1998) gekreuzt.

Die Genotypisierung erfolgte durch PCR-Amplifikation der aus Schwanzbiopsien extrahierten DNA mit anschließender Markierung der Tiere mit einer Ohrkerbe.

Die Zucht und Analysen der Tiere erfolgten in Übereinstimmung mit den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes und der übergeordneten EU-Richtlinie zum Schutz von Versuchstieren (Tierversuch 86o vom 25.10.2006).

2.2.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung aus Schwanzspitzen wurde mit dem DNA-Isolierungs-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dem Gewebe in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube wurden 180 µl Buffer ATL und 20 µl Proteinase K zur Lysierung hinzugefügt. Nach anschließendem Durchmischen wurde über Nacht bei 55°C bis zur vollständigen Lyse des Gewebes inkubiert. Nach erneutem Durchmischen wurden zuerst 200 µl Buffer AL und nach dem Vortexen 200µl Ethanol hinzugefügt und wieder durchmischt. Die gesamte Suspension wurde nun in eine 2ml Spin-Säule pipettiert, welche eine Membran enthält (DNeasy Mini spin column), und bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Dadurch gelangten die flüssigen Bestandteile der Suspension in ein Sammelröhrchen, während die DNA an der Membran gebunden wurde. Das Sammelröhrchen wurde verworfen und durch ein leeres ersetzt. Auf die Membran wurde 500 µl Buffer AW1, ein Waschpuffer, pipettiert und 1 min lang bei 8.000 rpm zentrifugiert.

Nach Austausch des Sammelröhrchens wurde ein zweiter Waschpuffer (Buffer AW2) hinzugefügt und zur Trocknung der Membran bei 14.000 rpm 2 min lang zentrifugiert.

Zur Eluierung der DNA aus der Membran wurde schließlich das Sammelröhrchen durch ein 1,5 ml Eppendorfgesäß ersetzt, 200 µl Buffer AE auf die Membran aufgetragen und nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur abzentrifugiert (1 min bei 8000rpm).

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (=PCR)

Die PCR dient zur in vitro-Amplifikation eines genau definierten DNA-Abschnittes.

Die isolierte murine DNA wurde mit Hilfe des Taq DNA Polymerase Kit der Firma Qiagen vervielfältigt.

Der Reaktionsansatz beinhaltet die zu kopierende DNA, Primer, DNA-Polymerase: Taq-Polymerase des *Thermus aquaticus*, Nukleotide, Puffer zur Konstanthaltung des pH-Wertes und Mg^{2+} -Ionen, die essentiell für die Taq-Polymerase sind.

Folgender 50 μ l PCR-Ansatz wurde für die Genotypisierung verwendet:

DNA-Template	2 μ l
Destilliertes Wasser	36,5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l
Primer A (10 mM)	0,5 μ l
Primer B bzw. Primer C (10 mM)	0,5 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
PCR-Puffer P (10x)	5 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5 μ l

Als Negativkontrolle wurde der PCR-Ansatz ohne Zugabe von DNA verwendet, als Positivkontrolle die DNA einer nachweislich *Ptch1* defizienten Maus.

Folgende Abläufe wurden in die PCR-Geräte einprogrammiert, wobei Denaturierung, Annealing und Extension 36-mal wiederholt wurden:

Initiale Denaturierung	94°C	3 min		
36x	[Denaturierung	94°C	1 min
		Annealing	58°C	1 min
		Extension	72°C	1 min
Finale Extension	72°C	10 min		

2.2.4 Gelelektrophorese

Die Trennung der aus der PCR resultierenden DNA-Fragmente wurde in 1%igem Agarosegel durchgeführt. Hierzu wurde 1g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer eingewogen und in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose aufgekocht. Nach Abkühlen wurde die Lösung mit 5 μ l 1%igem Ethidiumbromid versetzt, das dem Anfärben der Nukleinsäuren dient. Einzelne Ethidiumbromidmoleküle lagern sich interkalierend zwischen die DNA-Basen ein, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid derart verändert, dass die Fluoreszenz bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird.

Anschließend wurde das Gel in die vorbereitete Horizontalgelkammer gegossen und es wurden die Kämme für die Probenaschen eingesetzt. Nach Aushärten des Gels wurden jeweils 12 µl der Proben in die Taschen pipettiert. Neben den Proben wurde bei jedem Lauf 1 µl 100 bp DNA-Ladder als Längenstandard, eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle aufgetragen. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 Volt durchgeführt und nach etwa 40 min beendet. Die Ethidiumbromid-haltigen DNA-Banden wurden schließlich durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht sichtbar gemacht, abfotografiert und ausgewertet.

2.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine histologische Übersichtsfärbung, bei der die Zellkerne blau und das Zytoplasma rosa dargestellt werden. Zunächst wurden die 4 µm dicke, paraffinierte Hirnschnitte 2 mal 15 min lang in Xylol eingetaucht um sie vom Paraffin zu lösen. Danach erfolgte die Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (2 mal 100%iger Alkohol, 2 mal 90%iger Alkohol, 1 mal 80%iger Alkohol und 1 mal 70%iger Alkohol) für eine Dauer von jeweils 3 min. Nachdem die Präparate in Aqua dest. gespült wurden, wurden sie 30 Sek lang mit Hämatoxylin nach Mayer gefärbt und 5 Minuten lang in heißem Leitungswasser gebläut. Nach erneutem Spülen wurden sie dann mit Eosin für 30 Sek gegengefärbt.

Das Entwässern erfolgte mit der aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 70%iger Alkohol, 1x 80%iger Alkohol, 2 x 90%iger Alkohol und 2 x 100%iger Alkohol) für jeweils 1 min. Schließlich wurden die Präparate für 2 x 3 min in Xylol getaucht und mit Vitro-Clud eingebettet und gedeckelt.

2.2.6 Immunhistochemische Färbung

Grundlage für die Durchführung einer immunhistochemischen Färbung ist ein Antikörper, der spezifisch gegen das gewünschte Zielantigen gerichtet ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die dreistufige Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) angewendet.

Bei der Avidin- bzw. Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode nutzt man die starke Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) bzw. Streptavidin (aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*) zu Biotin (Hsu and Raine 1981). Es kommt zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin/Streptavidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundärantikörpern.

Hierzu bindet ein spezifischer unkonjugierter Antikörper (Primärantikörper) an das Antigen der Probe. Daraufhin wird ein, gegen den Primärantikörper gerichteter, zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) zugegeben, der mit Biotin markiert ist und spezifisch gegen die konstante Domäne des Primärantikörpers gerichtet ist. Dieser Sekundärantikörper stellt die Verbindung zum hinzugefügten (Strept-)Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex her. Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin und bildet eine Brücke zwischen einem biotinylierten Antikörper und einem Peroxidase-assoziierten Biotinmolekül.

Zur Sichtbarmachung der Reaktion wird eine Chromogenlösung verwendet. Durch die Enzymaktivität der Peroxidase wird das Substrat umgesetzt und es kommt zu einem Farbumschlag an der Stelle des zu nachweisenden Antigens.

Durchführung:

Von, in Formaldehyd fixierten und in Paraffin eingebetteten, Hirnschnitten wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht und getrocknet.

Um das Paraffin aus dem Gewebe herauszulösen, wurden die Präparate 2 x 15 min in Xylol getaucht. Zur Rehydrierung durchliefen die Schnitte die absteigende Alkoholreihe für jeweils 3 min: 2 x 100%iger Alkohol, 2 x 90%iger Alkohol, 1 x 80%iger Alkohol und 1 x 70%iger Alkohol. Nach dem Spülen in vollentsalztem Wasser wurden die Schnitte 10 min bei Raumtemperatur in einer 3%igen Wasserstoffperoxidlösung inkubiert, wodurch die endogen im Gewebe vorkommende Peroxidase blockiert wird. Daraufhin wurde wieder mit vollentsalztem Wasser gespült.

Um auch Antigene darstellen zu können, die durch chemische Vernetzungen wie zum Beispiel Aldehydbindungen maskiert sind, wurde eine hitzeinduzierte Demaskierung in der

Mikrowelle durchgeführt. Dabei wurden die Objektträger in eine mikrowellengeeignete Küvette gestellt und mit einem 10 mM Natriumcitratpuffer bis zum Küvettenrand befüllt. Die Anzahl der Objektträger in der Küvette wurde mit Hilfe von Leerobjektträgern konstant gehalten, um bei jedem Färbedurchgang eine gleiche Wärmeverteilung gewährleisten zu können. Zusammen mit einer Leerküvette, die nur vollentsalztes Wasser enthielt, wurden die Präparate 20 min bei 800 W gekocht. Danach verblieben die Schnitte weitere 20 min in der Küvette und kühlten bei Raumtemperatur ab. Im Anschluss wurden die Schnitte 15 min mit TBST 0,1% inkubiert. Durch das enthaltene Normalserum werden die unterschiedlichen Ladungen im Gewebe abgesättigt, so dass der Primärantikörper keine unspezifischen Bindungen mit dem zu untersuchenden Gewebe eingehen kann.

Nachdem man den Normalserumüberschuss hatte ablaufen lassen und der Objektträger um die Schnitte herum mit einem Zellstoff getrocknet wurde, wurden die Schnitte mit einem Wachsstift (DAKO Pen) umkreist. Nun wurde eine einstündige Inkubation mit den Primärantikörpern bei Raumtemperatur bzw. eine Inkubation bei 4°C über Nacht in der Feuchtkammer vorgenommen.

Danach wurden die Schnitte mit TBST 0,1% gespült und mit den biotinylierten Sekundärantikörpern für 30 min in der Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem Spülen mit TBST 0,1% folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem ABC-Peroxidase-Komplex in der Feuchtkammer. Die Schnitte wurden wiederum mit TBST 0,1% gespült und mit dem Chromogen Nova Red überschichtet. Die Färbung dauerte je nach Primärantikörper zwischen 3 und 12 Minuten und wurde durch das Spülen mit vollentsalztem Wasser beendet.

Zum Entwässern durchliefen die Schnitte daraufhin die aufsteigende Alkoholreihe für jeweils 1 min: 1 x 70%iger Alkohol, 1 x 80%iger Alkohol, 2 x 90%iger Alkohol und 2 x 100%iger Alkohol. Zum Abschluss wurden die Präparate 2 x 3 min in Xylol getaucht und mit Vitroclud eingebettet und gedeckelt.

2.2.7 Quantitative Methodik: Numerische Auswertung/Morphometrie

Bei der morphometrischen Auswertung wurde die äußere Körnerzellschicht (EGL) des Kleinhirnkortex von Wildtyp-Mäusen und Knockout-Mäusen gemessen.

Dafür wurden die sagittalen Kleinhirnschnitte von Mäusen im Alter von pnd 0, pnd 7 und pnd 10 verwendet. Die paraffinierten Schnitte wurden immunhistochemisch gefärbt (s. 2.2.6). Die Ausmessung der EGL erfolgte für die Marker ki67, NeuN und Nestin.

Für das Ausmessen der EGL wurde das Mikroskopsystem Leica DM 5500 und die Fotoanalyse-Software LAS (Leica Application Suite) 4.1.0. verwendet. Mit Hilfe des 40x-Objektives wurden dann mit der Bildanalysierungssoftware, von rostral nach kaudal, mehrere Punkte an den (etwa) sieben bis zehn Kleinhirn-Lobuli (abhängig vom Ausreifungsgrad des Kleinhirns) die EGL ausgemessen. Etwa alle 15µm wurde die EGL-Dicke bestimmt so wurde pro Lobulus an etwa zehn Stellen die Dicke/Breite der EGL bestimmt. Eine weitere morphometrische Auswertung war, dass die Anzahl der Zellschichten in der EGL gezählt wurden. Wie beim Ausmessen der EGL wurde, mit dem gleichen Mikroskop und der gleichen Software, an bestimmten Punkten, von rostral nach kaudal, die Anzahl der Zellschichten bestimmt.

2.2.8 Kaplan-Meier-Überlebenszeitkurve

Das Gesamtüberleben der Ptch1-defizienten Mäuse stellten wir graphisch mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurve dar. Dabei wurden die Überlebenszeiten der k.o.-Mäuse mit denen der Wildtyp-Mäuse in der Kontrollgruppe verglichen. Dazu definierten wir auf der x-Achse das Alter in Wochen der Mäuse und in der y-Achse das Überleben (in Prozent) der Mäuse (Kaplan, E.L. & Meier 1958).

3 Ergebnisse

3.1 Die p48^{+/Cre}_Ptch1^{flox/flox} Maus

3.1.1 Zuchtschema und Genotypisierung der Tiere

Das Zwölf-Transmembranprotein Ptch1 ist der Rezeptor für Sonic hedgehog und spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, Tumorgenese und fungiert als Tumorsuppressor. Der Genlocus des Ptch1-Gens befindet sich beim Menschen auf Chromosom 9q22.3. Um konditional Ptch1 defiziente Tiere zu erhalten, wurden Ptch1^{flox/flox}-Mäuse mit der p48^{+/Cre}-Mauslinie gekreuzt. Dadurch erhielten wir p48^{+/Cre}_Ptch1^{flox/flox}-Mäuse, mit einem konditionalen Ptch1-knockout.

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte durch PCR-Analyse der DNA, die aus den Schwanzspitzen der Mäuse gewonnen wurde (2.2.2, 2.2.3). Die Bestimmung der Ptch1-Allele Ptch1^{wt} (=Ptch1⁺), Ptch1^{flox} (=Ptch1⁻) und Ptch1^{del} (=Ptch1^{-//Cre^{+/-}) durch PCR gelang durch die benutzten Primer-Konstellationen: NeoF/p1011R.2, p910F.4/p1011R.2 und Exo7/NeoR. Für die Identifikation des Ptch1^{flox}- und Ptch1^{wt}-Allels wurden zusätzlich die Primer p910F.4/wt/flox_R benutzt (Abb. 8).}

Das Ptch1^{flox}-Allel wurde dabei bei 2500bp und 1735bp, das Ptch1^{wt}-Allel bei 1400bp und 521 bp, das Ptch1^{del}-Allel bei 950bp und die Cre-Rekombinase bei 200bp identifiziert. Die Abb. 7 zeigt beispielhaft die Genotypisierung von 9 Tieren im Alter von pnd 12.5.

Bei einer Wildtyp-Maus ohne Cre-Rekombinase wurde die Allelkonstellation Ptch1^{+/+}_Cre^{+/+} erwartet, bei den Tieren mit einer Cre-Rekombinase und Ptch1^{flox}-Allel zeigte die heterozygote Maus die Allelkonstellation Ptch1^{+/flox}_Cre^{+/-} und bei homozygoten Mäusen Ptch1^{flox/flox}_Cre^{+/-}.

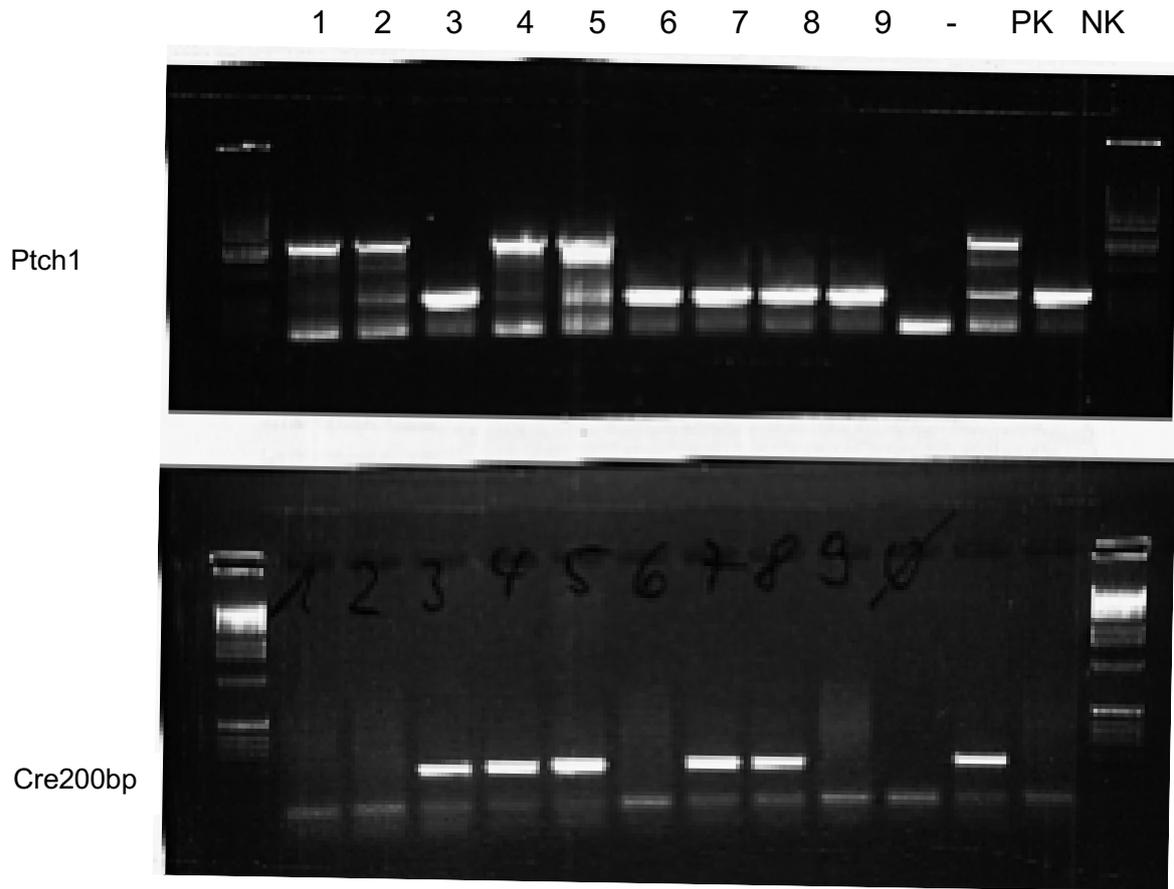


Abb. 7: Genotypisierung der Tiere an pnd 12.5

Das Bild zeigt exemplarisch bei 9 Tieren die Genotypisierung mittels PCR. Die obere Hälfte zeigt die Bestimmung der Ptch1-Allele ($Ptch1^{fllox}$, $Ptch1^{wt}$ und $Ptch1^{del}$) und die untere Hälfte die Bestimmung der Cre-Rekombinase. So ergibt sich hier die folgende Allelkonstellation (von links nach rechts): **1.** $Ptch1^{-/-} Cre^{+/+}$, **2.** $Ptch1^{-/-} Cre^{+/+}$, **3.** $Ptch1^{+/-} Cre^{+/-}$, **4.** $Ptch1^{-/-} Cre^{+/-}$, **5.** $Ptch1^{-/-} Cre^{+/-}$, **6.** $Ptch1^{+/-} Cre^{+/+}$, **7.** $Ptch1^{+/-} Cre^{+/-}$, **8.** $Ptch1^{+/-} Cre^{+/-}$, **9.** $Ptch1^{+/-} Cre^{+/+}$, PK=Positivkontrolle, NK=Negativkontrolle

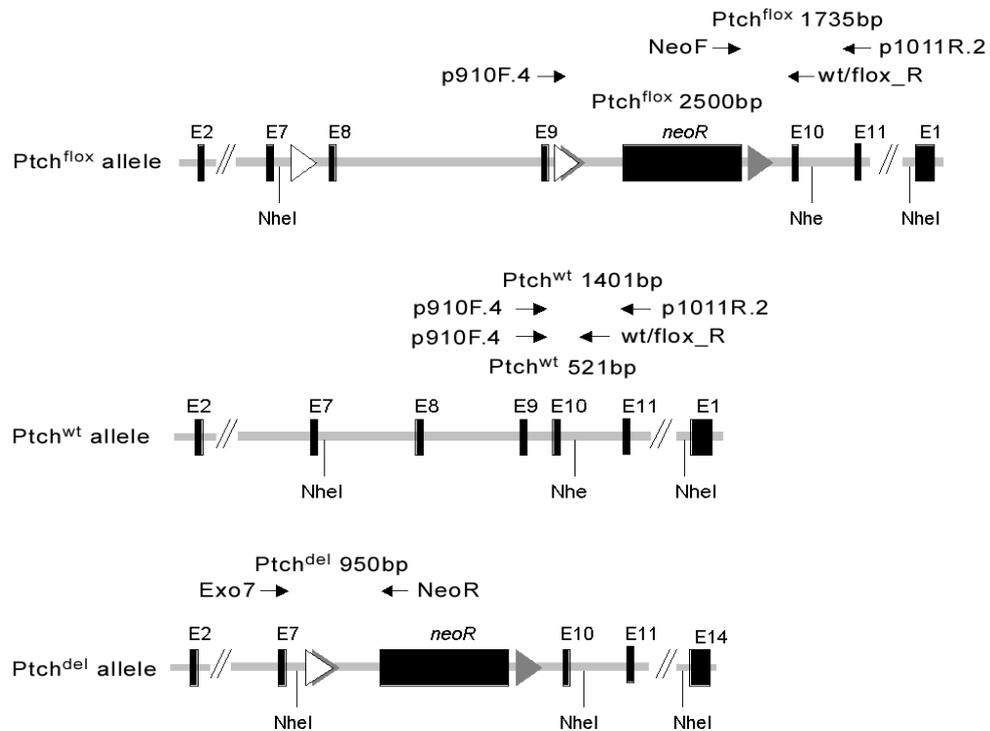


Abb. 8: Darstellung der PCR: Die Abbildung zeigt schematisch die PCR-Fragmente mit der die drei Ptch1-Allele analysiert wurden (von oben nach unten): das Ptch1^{flox}-Allel (2500bp und 1735bp), das Ptch1^{wt}-Allel (1400bp und 521bp) und das Ptch1^{del}-Allel (950bp)

3.1.2 Konditionale Ptch1-Deletion bei der p48^{+/Cre}_Ptch1^{flox/flox} Maus

Die Deletion des Ptch1^{flox}-Allels in der p48^{+/Cre}_Ptch1^{flox/flox} Maus wird durch p48-Cre induziert. Die p48^{+/Cre}-Mäuse besitzen einen knockin von Cre im p48-Lokus und exprimieren in p48-positiven Zellen die Cre-Rekombinase. Um eine gewebsspezifische Expression der Cre-Rekombinase zu erhalten, wurden diese Mäuse mit der geflochten Ptch1-Allel Mausmutante gekreuzt. Durch die Cre-Rekombinase wurde bei Ptch1^{wt/flox}_Cre^{+/-} oder Ptch1^{flox/flox}_Cre^{+/-}-Mäusen die „geflochte“ DNA-Stelle erkannt und gebunden. Die entsprechende Stelle wurde dann von der Cre-Rekombinase gespalten, exzidiert und der DNA-Strang wieder neuverknüpft. So erfolgte eine gewebsspezifische Inaktivierung des Ptch1-Gens (s. Abb. 9).

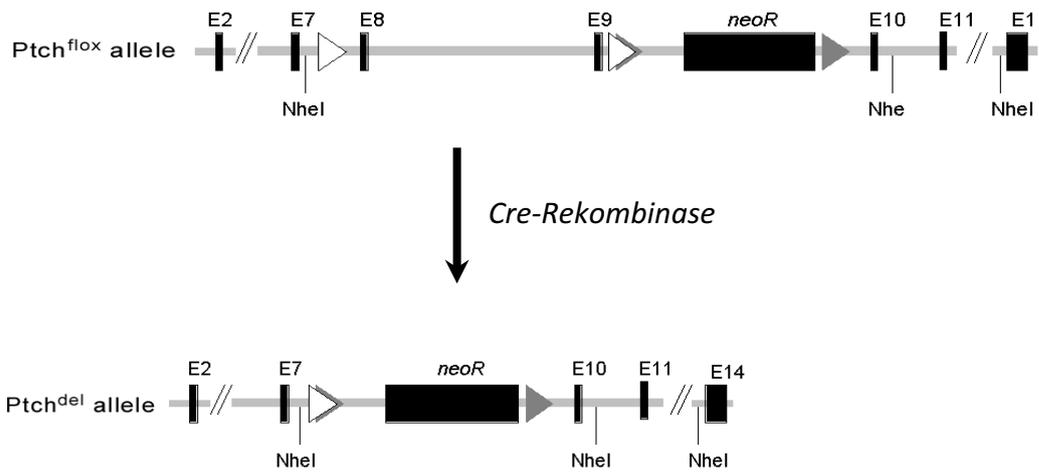


Abb. 9: Deletion von Exon 8 und Exon 9 im Patched1 Gen durch die Cre-Rekombinase: Die Abb. zeigt schematisch das *Ptch1^{lox}*-Allelfragment (3700bp) (oben) und das *Ptch1^{del}*-Allel, nach der Exzision des geflochten *Ptch1*-Allels durch die Cre-Rekombinase aus dem DNA-Fragment (unten).

3.2 Tumorinzidenz bei konditional Ptch1 defizienten Mäusen

Die $p48^{+/Cre}$ _Ptch1^{flox/flox} Mäuse zeigten im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe bis etwa zur achten Lebenswoche eine unauffällige und ähnliche Entwicklung in Hinblick auf das Überleben. Ab der achten Woche postnatal kam es jedoch bei allen Tieren, die homozygot für das gefloخته Ptch1-Allel waren, zum Tod (Abb. 10). Die Ptch1 defizienten Mäuse entwickelten alle ein Medulloblastom und überlebten maximal bis zur 15. Lebenswoche. Somit zeigte sich im Verlauf eine 100%ige Tumorinzidenz und 100%ige Letalität für alle $p48^{+/Cre}$ _Ptch1^{flox/flox} Mäuse.

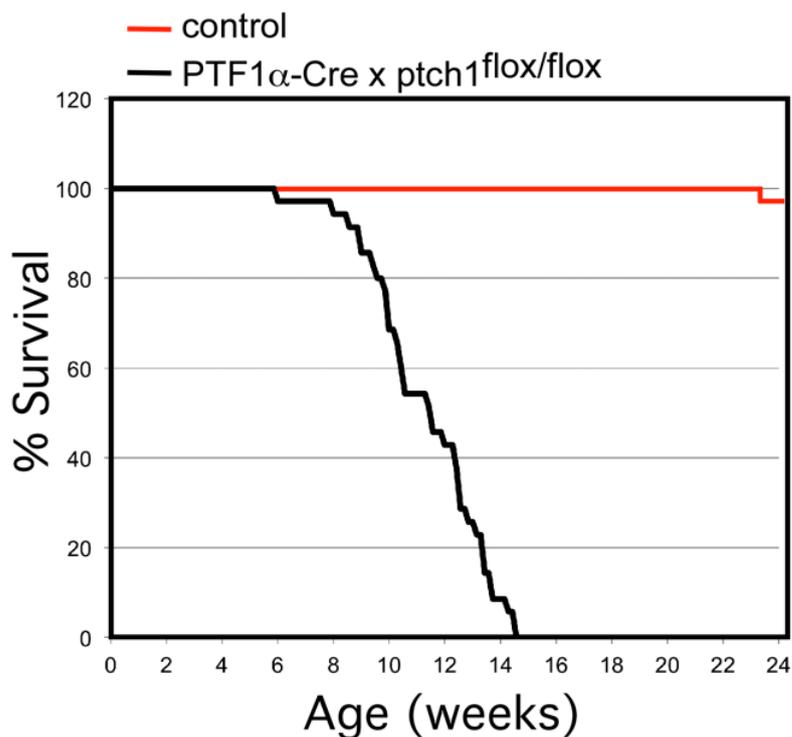


Abb. 10: Überlebenskurve der $p48^{+/Cre}$ _Ptch1^{flox/flox} Mäus: Die Kaplan-Meier-Kurve zeigt die Überlebenszeitkurve der $p48^{+/Cre}$ _Ptch1^{flox/flox} Mäuse (schwarze Linie) im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe (rote Linie); n=18

3.3 Veränderungen im Cerebellum der p48^{+/Cre}_Ptch1^{flox/flox} Maus

3.3.1 Makroskopie

Makroskopisch beobachteten wir im Vergleich der Kleinhirne der Wildtyp- und der Ptch1 defizienten Maus schon sehr früh in der Entwicklung deutliche Unterschiede. Vor allem rostrale Anteile des Kleinhirns der Ptch1-knockout Mäuse erscheinen im Vergleich makroskopisch sichtbar vergrößert (Abb. 11, Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14).

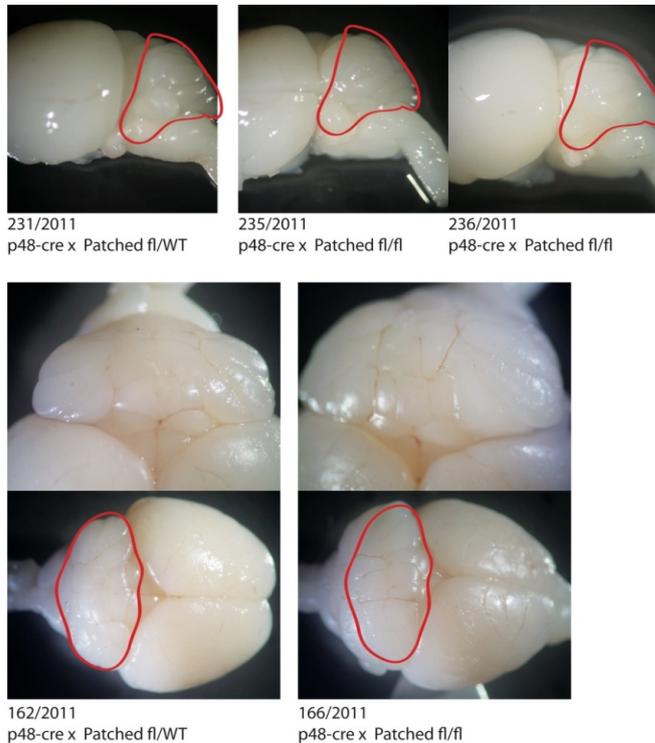


Abb. 11: Makroskopie des Medulloblastoms

Oben: pnd 10, sagittale Ansicht; Unten: pnd 21, axiale Ansicht. Die rote Umrandung zeigt das unauffällige Kleinhirn bei den Ptch^{flox} heterozygoten Mäusen und im Vergleich dazu das deutlich vergrößerte Kleinhirn der homozygoten Mäuse.

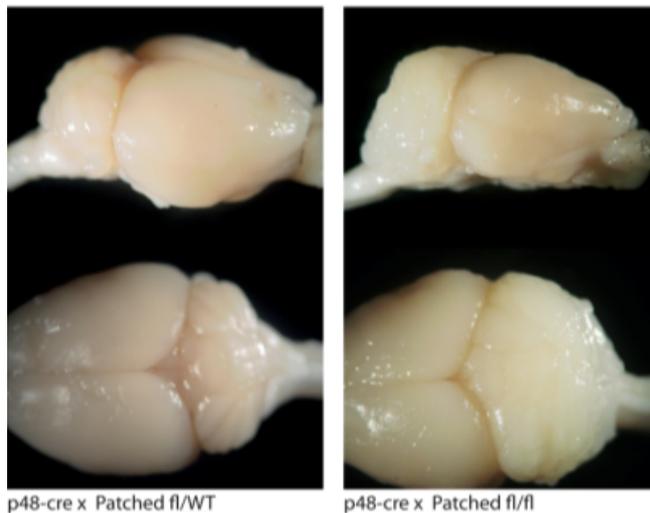


Abb. 12: Makroskopie des Medulloblastoms

Deutlich sichtbare Vergrößerung des Kleinhirns bei der p48^{+/Cre}_Ptch1^{flox/flox} Maus (rechts) an pnd 40.

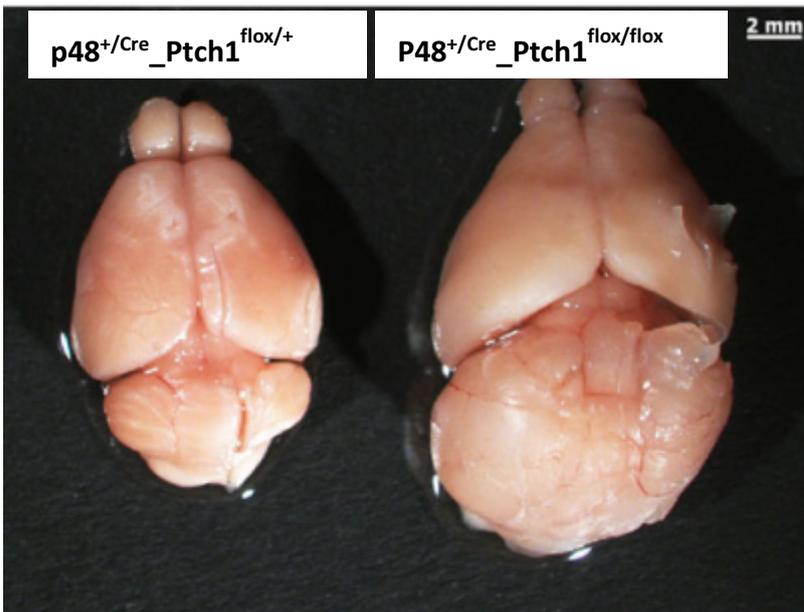


Abb. 13: Makroskopie des Medulloblastoms an pnd 72

Vergleich zweier Gehirne von Mäusen mit heterozygotem (links) und homozygotem (rechts) $Ptch1^{flox}$ -Allel; Ansicht von axial (pnd 72).

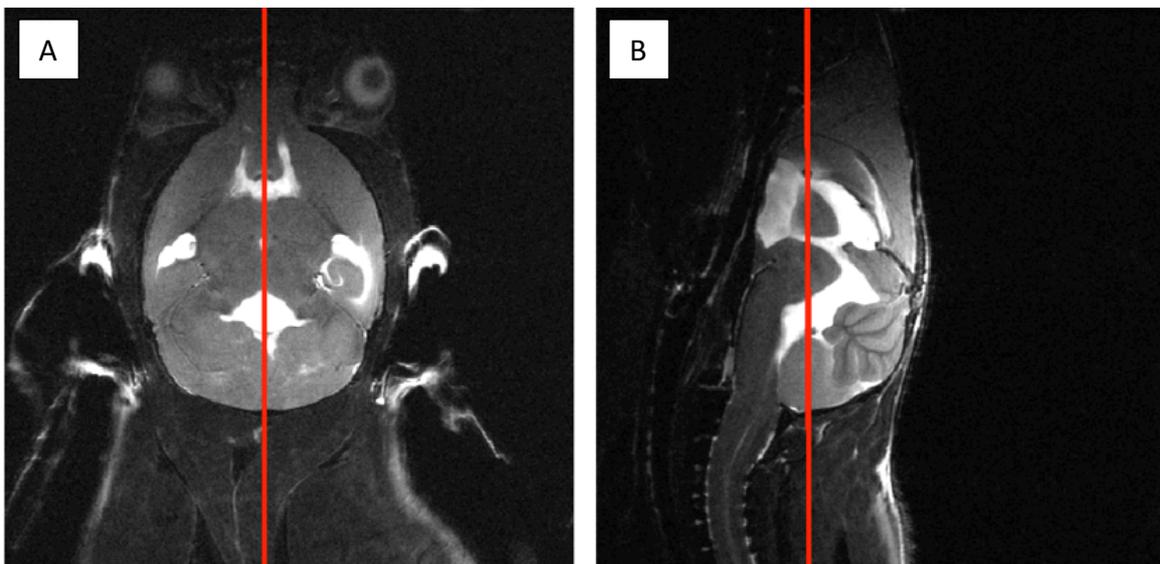


Abb. 14: MRT in T2-Wichtung eines $Ptch1$ -defizienten Tieres an pnd 72

A. Axiale MRT-Aufnahme, B. Sagittale MRT-Aufnahme

3.3.2 Histologie (H.E.-Färbungen)

Die schon makroskopisch sichtbaren Unterschiede wurden in der histologischen Betrachtung deutlicher beobachtet. Die $p48^{+/Cre}$ _Ptch1^{flox/flox} Mäuse, die homozygot für das Ptch1^{flox}-Allel sind, entwickelten massive cerebelläre Tumore.

Untersucht wurden dabei die Kleinhirne von Wildtyp- und Knockout-Mäusen im Alter von pnd 0, pnd 7, pnd 10 und pnd 21. Die Kleinhirn-Paraffinschnitte wurden mit der histologischen Übersichtsfärbung Hämatoxylin-Eosin analysiert (siehe unter 2.2.5.). Man konnte so die histologische Entwicklung der Kleinhirne im Vergleich beobachten (s. Abb. 15, Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18 und Abb. 19).

Man kann deutlich erkennen, dass die Knockout-Mäuse im Verlauf einen Tumor im Kleinhirn entwickeln. Bereits ab pnd 7 sieht man insbesondere in den rostralen Lobuli (vergleiche Abb. 38) eine progrediente Zunahme der äußeren Körnerzellschicht (EGL) des noch unreifen cerebellären Kortex. Mit zunehmendem Entwicklungsalter des Cerebellums wird die Verbreiterung der EGL auch deutlicher sichtbar (veranschaulicht durch rote Pfeile in den Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 18). Auffällig ist auch, dass die EGL bei den Knockout-Mäusen noch abgrenzbar ist, wenn bei den Wildtyp-Mäusen bereits die 3-Schichtung des reifen cerebellären Kortex vorliegt (s. rote Pfeile in Abb. 18). In der histologischen Untersuchung des reifen Kleinhirns an pnd 82 ist dann die eindeutige tumoröse Zellwucherung im Bereich der ehemaligen EGL sichtbar (s. rote Pfeile in Abb. 19).

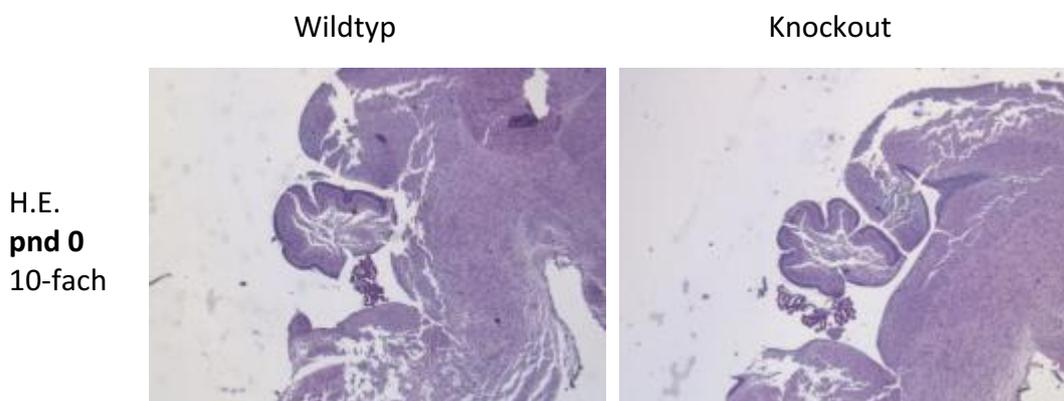


Abb. 15: Sagittalschnitt des Kleinhirns der Wildtyp- und Knockout-Maus an pnd 0
H.E.-Färbungen der Kleinhirne von Mäusen im Alter; noch keine eindeutigen Lobuli-Einteilungen oder Tumorformationen zu erkennen; pnd=Postnataltag



Abb. 16: Sagittalschnitt des Kleinhirns der Wildtyp- und Knockout-Maus an pnd 7
 H.E.-Färbung von Mäusen im Alter von 7 Tagen postnatal in 10-facher Vergrößerung. Die Aufteilung in die einzelnen Kleinhirnlobuli ist deutlich zu erkennen. Bereits sichtbar ist auch die verbreiterte EGL der Knockout-Maus im Bereich der rostralen Lobuli des Cerebellums (rechts; siehe Pfeile). pnd=Postnataltag

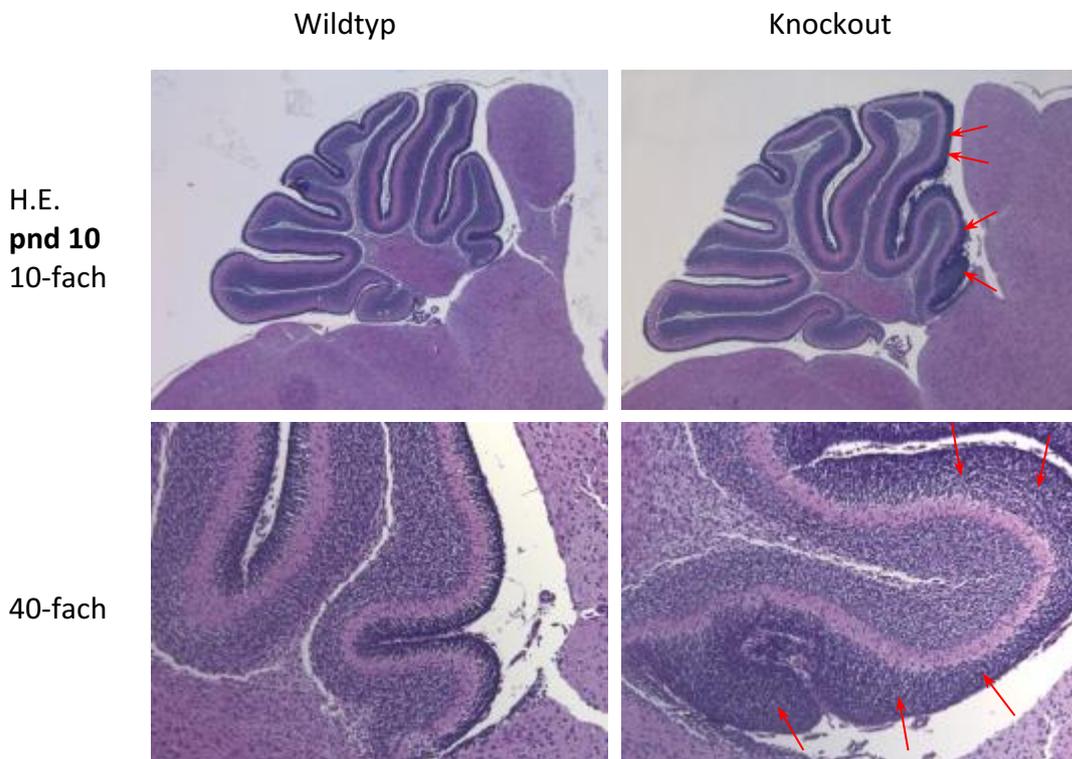


Abb. 17: H.E.-Färbung von Wildtyp- und Knockout-Mäusen im Alter von pnd 10
 Oben: Sagittalschnitt des Cerebellums, Unten: Vergrößerte Aufnahme des ersten Lobulus
 H.E.-Färbung von Wildtyp- und Knockout-Mäusen im Alter von 10 Tagen postnatal in 10-facher (oben) und 40-facher (unten) Vergrößerung. Nun ist die EGL-Verbreiterung bei den Knockout-Mäusen deutlich zu erkennen (rechts; s. rote Pfeile); pnd=Postnataltag

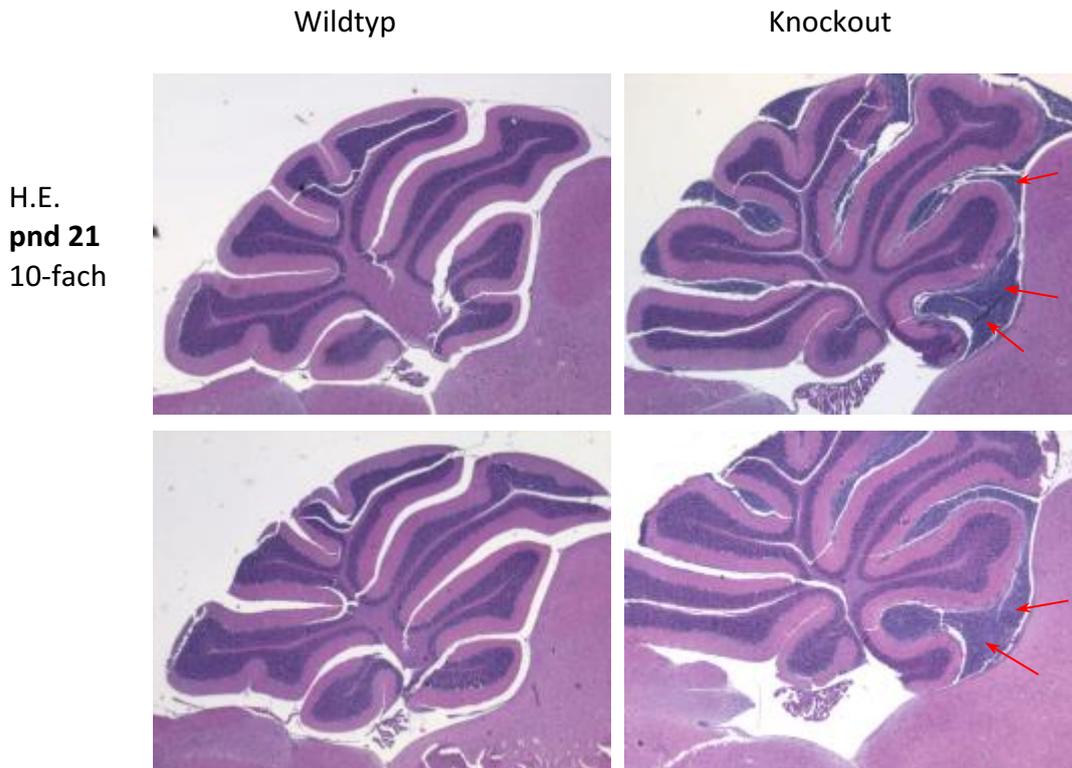


Abb. 18: Sagittalschnitt des Cerebellums der Wildtyp- und Knockout-Mäuse an pnd 21 H.E.-Färbung von Mäusen im Alter von 21 Tagen postnatal in 10-facher Vergrößerung; pnd=Postnataltag. Bei der Wildtyp-Maus (links) sieht man bereits den 3-schichtigen reifen cerebellären Kortex (keine EGL mehr vorhanden), wogegen bei der Knockout-Maus (rechts) noch eine massive EGL zu erkennen ist (s. rote Pfeile). pnd=Postnataltag.

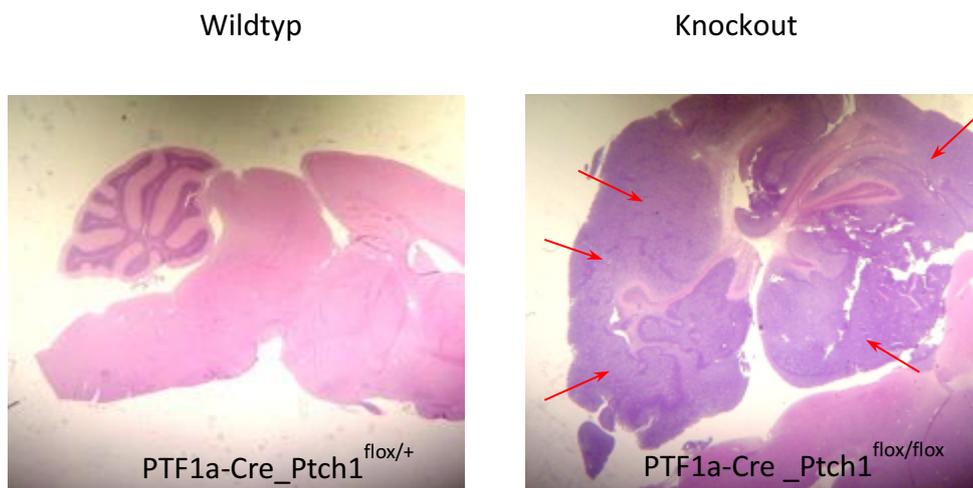


Abb. 19: Kleinhirnhistologie im Vergleich
Vergleich der Kleinhirne einer für das Ptch1^{flox}-Allel heterozygoten (links) und homozygoten (rechts) Maus jeweils an pnd 82. Bei der Knockout-Maus ist die eindeutige tumoröse Zellwucherung erkennbar (rechts, s. rote Pfeile), wogegen im Vergleich dazu bei der Wildtyp-Maus mittlerweile das reife Cerebellum mit seinem 3-schichtigen Kortex vorliegt. (H.E.-Färbung)

3.4 Die Expression von Markern: Immunhistochemische Färbungen der Kleinhirne (pnd 0, pnd 7, pnd 10 und pnd 21)

Um die histologischen Effekte des Ptch1-knockouts beim Medulloblastom genauer zu untersuchen, wurden die Kleinhirne von Wildtyp- und Knockout-Mäusen mit verschiedenen immunhistochemischen Markern analysiert und verglichen (siehe unter 2.2.6). Bei den Paraffinschnitten der Kleinhirne bzw. Medulloblastome konnten verschiedene immunhistochemische Markerexpressionen nachgewiesen werden. Untersucht wurden Tiere im Alter von pnd 0, pnd 7, pnd 10 und pnd 21 (s. Tab. 4). Insgesamt wurden die Kleinhirne von 33 Tieren analysiert.

Tab. 4: Übersicht der untersuchten Tiere
(pnd=Postnataltag, n= Anzahl)

Alter	Wildtyp n=	Knockout n=
pnd 0	2	2
pnd 7	3	4
pnd 10	8	10
pnd 21	2	2

Tab. 5: Übersicht der immunhistochemischen Marker

Marker/Antikörper	Zellen	Bindungsort
ki67	Proliferierende Zellen	Nukleus
NeuN	Postmitotische/Reife Körnerzellen	Nukleus
Nestin	Stammzellen des ZNS	Zytoplasma
Calretinin	Körnerzellen	Zytoplasma
Calbindin	Purkinjellen	Zytoplasma

Analyse der Expression des Markers ki67

Ki67 ist ein Zellzyklusmarker, mit dem sich teilende Zellen kenntlich gemacht werden können. Es reagiert mit einem nukleären Antigen, dementsprechend sind in dieser immunhistochemischen Färbung die Zellkerne positiv. Untersucht wurden auf diesen Marker sagittale Kleinhirnschnitte von Tieren im Alter von 0, 7, 10 und 21 Tagen postnatal. Die Expression von ki67 wurde vor allem in der äußeren Körnerzellschicht (EGL) des Kleinhirnkortex beobachtet. Die Mäuse im Alter von pnd 0 zeigen noch keine Unterschiede in der Expression von ki67 (Abb. 20). Ab dem 7. Tag postnatal sieht man aber schon eine vermehrte Proliferation in der äußeren Körnerzellschicht (EGL) bei den Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Abb. 21, s. rote Pfeile). Mit zunehmendem Alter der Maus wird dieser Unterschied deutlicher und die EGL der Knockout-Mäuse auch immer breiter im Vergleich zur gleichaltrigen Wildtyp-Maus. Vor allem die EGL der rostral gelegenen Kleinhirnlobuli (mit Stern gekennzeichnet) der Knockout-Mäuse erscheint breiter als die der Wildtyp-Mäuse (Abb. 22, s. rote Pfeile). Zum Zeitpunkt von pnd 21 sieht man bei der Wildtyp-Maus keine ki67-Expression mehr und erkennt einen 3-schichtigen, reifen Kleinhirnkortex, während die Knockout-Mäuse eine massive Proliferation in der EGL an den rostralen Kleinhirnlobuli aufweisen (Abb. 23).

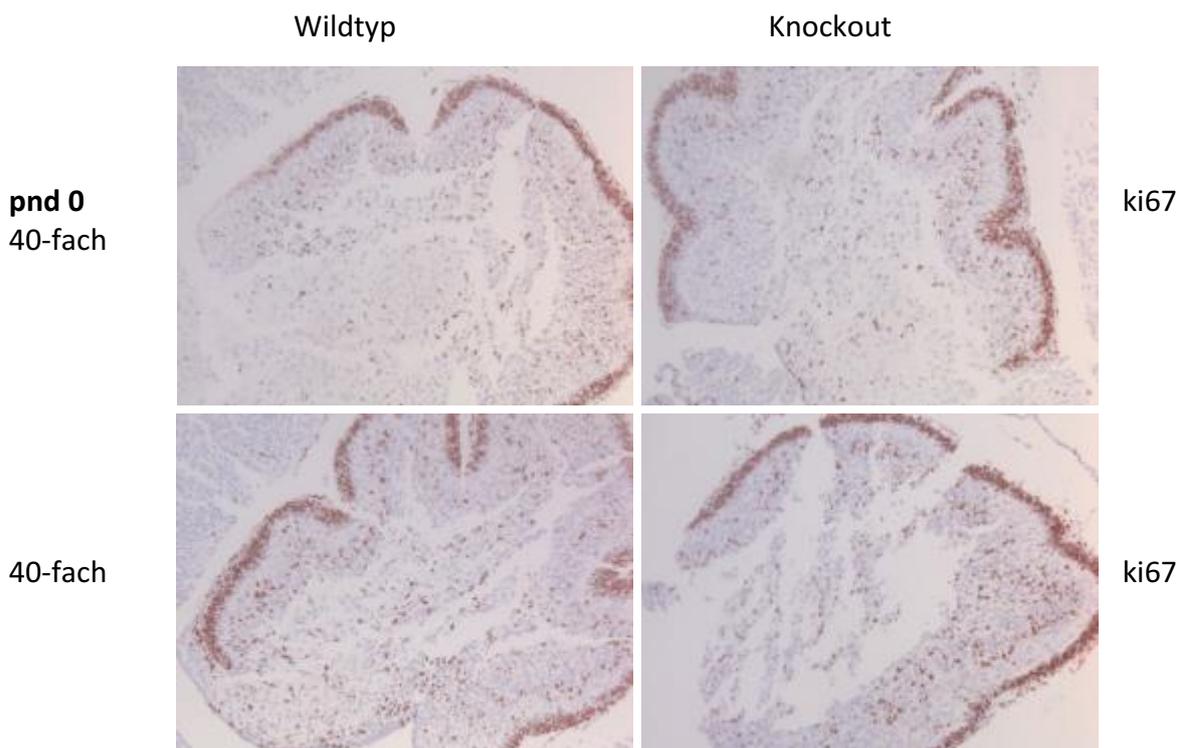


Abb. 20: Analyse der Expression des Zellproliferationsmarkers ki67 zum Zeitpunkt pnd 0: Noch sind keine sichtbaren Veränderungen im Vergleich festzustellen.

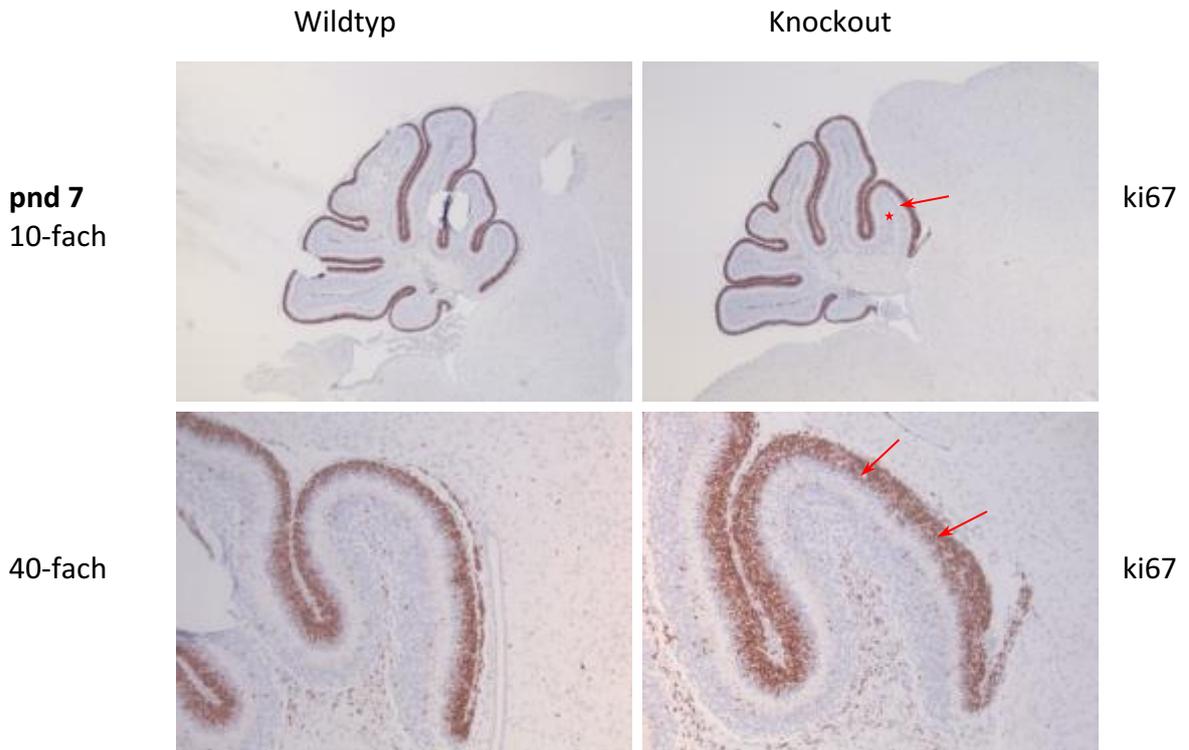


Abb. 21: Analyse der Expression des Zellproliferationsmarkers ki67 zum Zeitpunkt pnd 7 Verbreiterung der EGL bei den Knockout-Mäusen mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Vor allem die EGL der rostralen Lobuli (s. Stern*) ist von den Veränderungen betroffen.

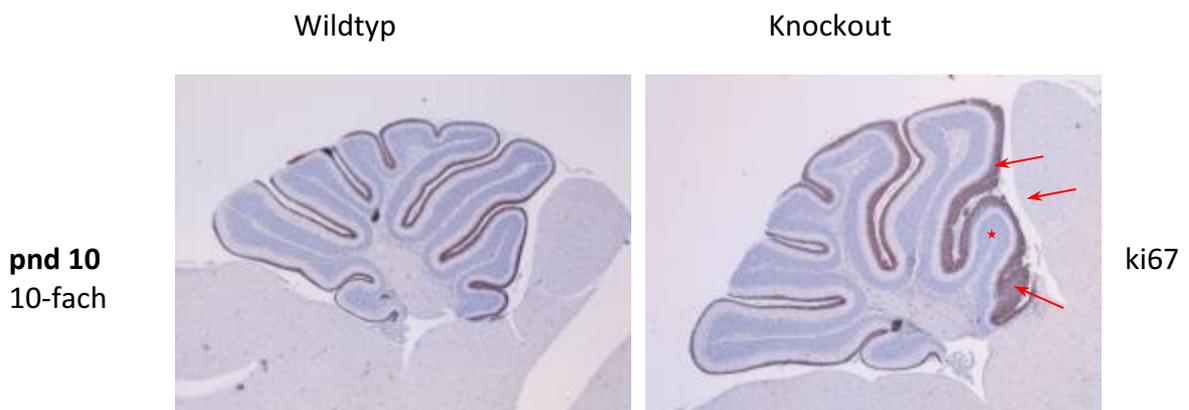


Abb. 22: Analyse der Expression des Zellproliferationsmarkers ki67 zum Zeitpunkt pnd 10 Rostraler Lobus mit Stern gekennzeichnet. Die roten Pfeile weisen auf die EGL-Verbreiterung bei der Knockout-Maus hin.

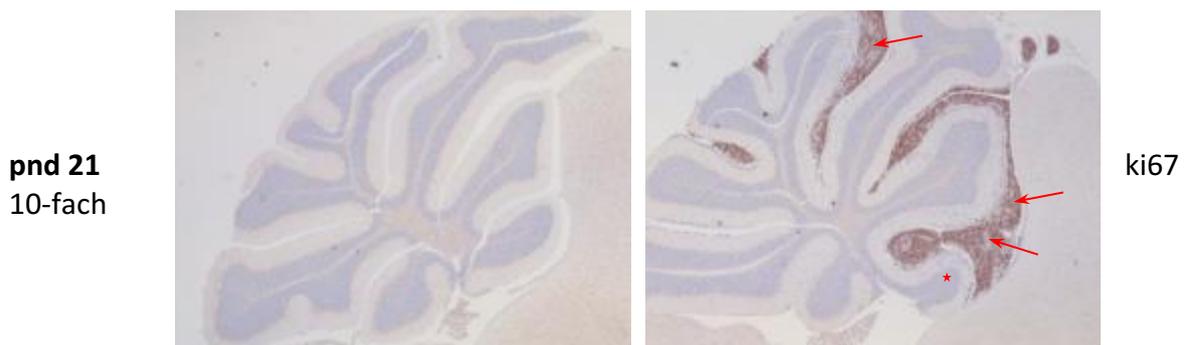


Abb. 23: Analyse der Expression des Zellproliferationsmarkers ki67 zum Zeitpunkt pnd 21 Rostraler Lobus mit Stern gekennzeichnet. Die roten Pfeile weisen auf die weiterhin nachweisbare EGL bei der Knockout-Maus hin.

Analyse der Expression des Markers NeuN

NeuN (Neuronal Nuclei) ist ein Marker für die reifen und postmitotischen Zellen des ZNS. Im Cerebellum wird es als Marker für die reifen Körnerzellen verwendet. Als nukleäres Antigen führt es zur positiven Färbung der Zellkerne. Während der Entwicklung des Cerebellums von Wildtyp-Mäusen, konnte beobachtet werden, dass NeuN-positive Zellen in der inneren Schicht der EGL (s. Pfeile in den Abb. 25 und Abb. 26), aber auch in der ML (Molekularschicht) und IGL (innere Körnerzellschicht) zu finden sind. Mit zunehmendem Alter der Mäuse nahm die Anzahl der NeuN-positiven Zellen in der EGL ab, dafür aber in der ML und IGL zu. Bei der erwachsenen Maus war dann die EGL vollkommen verschwunden und es lag der 3-schichtige cerebelläre Kortex vor, der nur noch sehr wenige NeuN-positive Zellen in der ML, aber sehr viele in der IGL besaß (s. Abb. 25 und Abb. 26; IGL mit Stern gekennzeichnet). Im Vergleich dazu blieb bei der *ptch1*-knockout-Maus jedoch die NeuN-positive, innere EGL sehr lange bestehen, selbst als bei der WT-Maus die EGL bereits komplett verschwunden war (s. Pfeile in den Abb. 25 und Abb. 26).

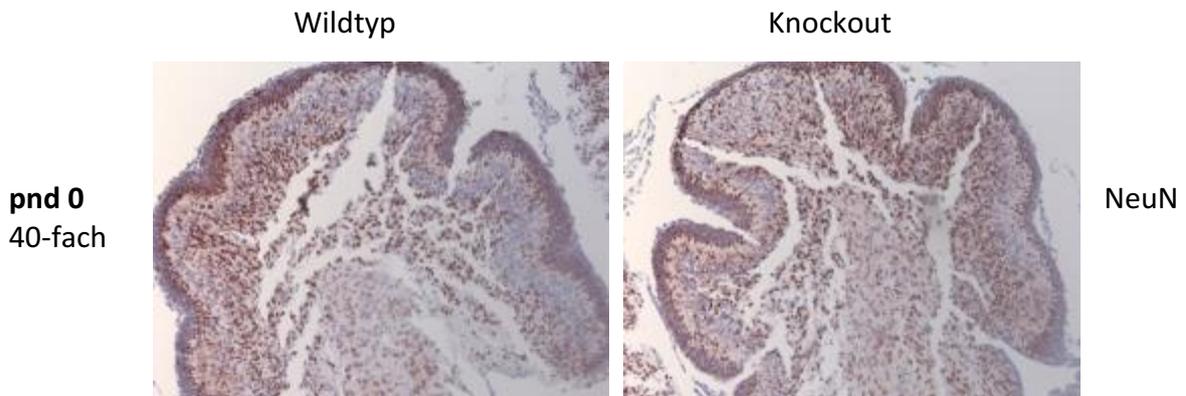


Abb. 24: Analyse der Expression von NeuN als Marker für reife Nervenzellen zum Zeitpunkt pnd 0 Noch sind keine sichtbaren Veränderungen im Vergleich zwischen der Wildtyp- und Knockout-Maus zu erkennen.

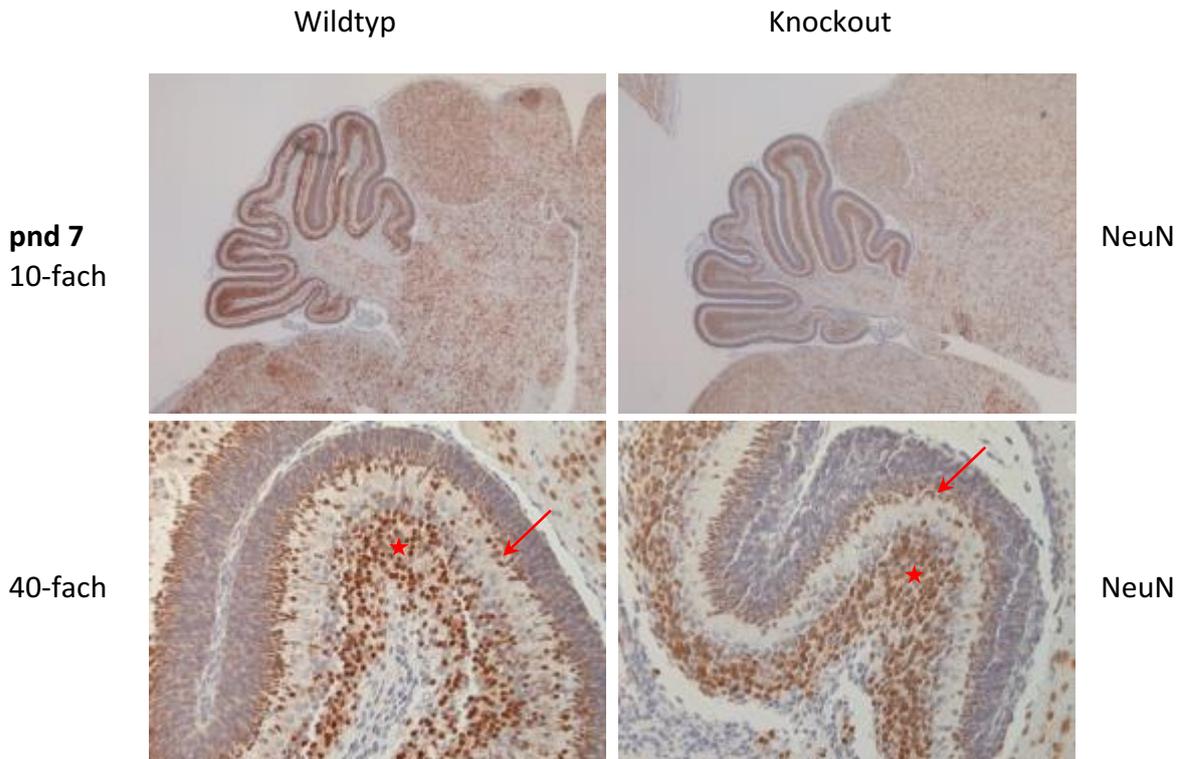


Abb. 25: Analyse der Expression von NeuN als Marker für reife Nervenzellen zum Zeitpunkt pnd 7 Man erkennt bei beiden Mäusen die NeuN-positiven Zellen in der inneren EGL (siehe rote Pfeile). Ebenso sieht man auch die hohe Anzahl an NeuN-positiven Zellen in der IGL beider Mäuse (mit Stern markiert).

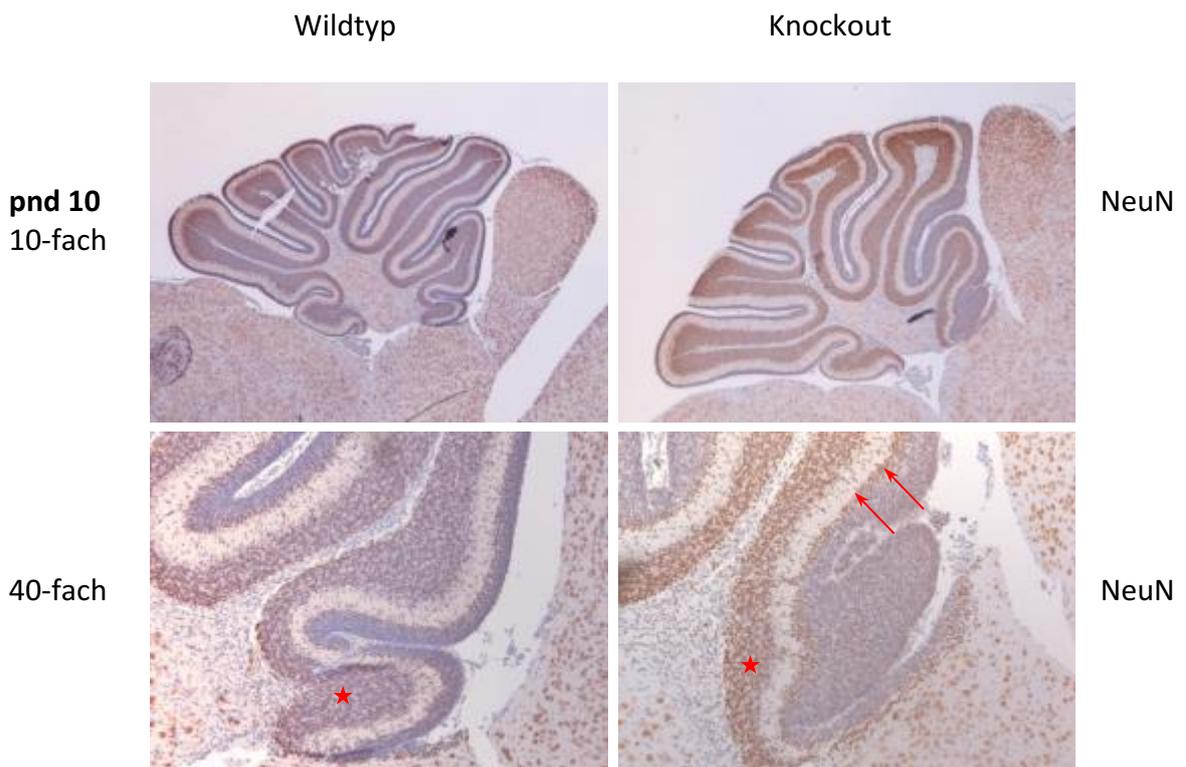


Abb. 26: Analyse der Expression von NeuN als Marker für reife Nervenzellen zum Zeitpunkt pnd 10 Mittlerweile sind die NeuN-positiven Zellen bei der Wildtyp-Maus nur noch in der IGL zu erkennen (IGL in der Abb. mit Stern gekennzeichnet), wogegen jedoch bei der ptch1-knockout Maus die NeuN-positive, innere EGL weiterhin gut abgrenzbar ist (siehe Pfeile).

Analyse der Expression des Markers Nestin

Nestin ist ein Typ IV Intermediärfilament und wird in neuroepithelialen Stammzellen (Sz) exprimiert. Im Cerebellum kann man durch die immunhistochemische Färbung die Stammzellen detektieren und deren Entwicklung verfolgen. Im Laufe der Entwicklung wird Nestin nämlich durch Neurofilament und GFAP ersetzt, weshalb es nur in Stammzellen nachweisbar ist. Somit können Nestin-positive Stammzellen im sich entwickelnden Cerebellum und im cerebellären Tumor, dem Medulloblastom, nachgewiesen werden.

Wir beobachteten bei Wildtyp- und KO-Mäusen eine Nestin-Expression im sich entwickelnden Cerebellum. Mit zunehmendem Alter der Maus nahm jedoch die Nestin-Expression bei den Wildtyp-Mäusen ab. Bei den KO-Mäusen konnte diese aber noch sehr lange nachgewiesen werden (s. Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30).

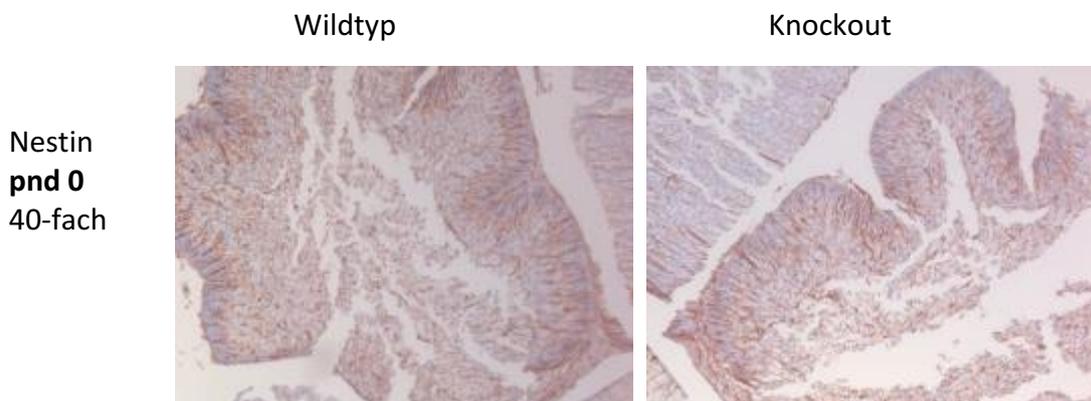


Abb. 27: Analyse der Expression von Nestin als Marker für Sz des ZNS zum Zeitpunkt pnd 0 Man sieht bei beiden Mäusen die beginnende Entwicklung des Cerebellums mit Einteilung in die Lobuli. Unterschiede sind in diesem Stadium der Entwicklung noch nicht erkennbar.

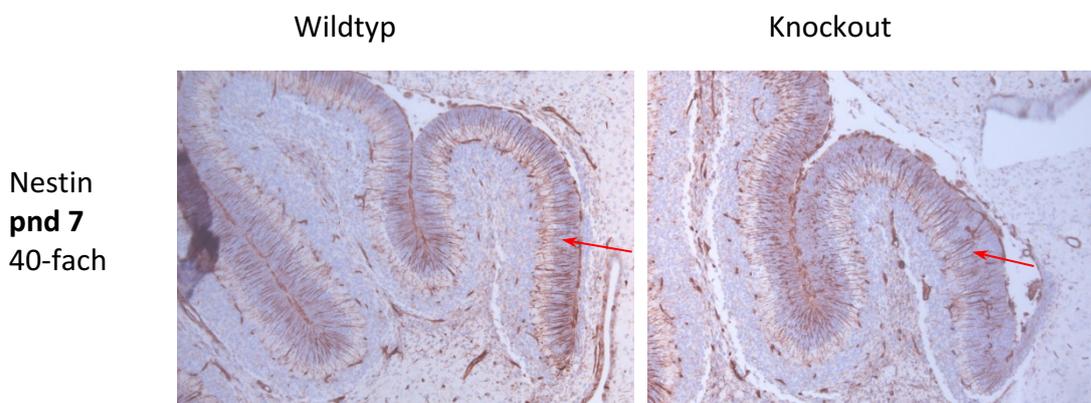


Abb. 28: Analyse der Expression von Nestin als Marker für Sz des ZNS zum Zeitpunkt pnd 7 Mit Pfeilen gekennzeichnet sieht man bei beiden Mäusen die Nestin-Expression, welche von der EGL bis zur Purkinjezellschicht des cerebellären Kortex reicht. In diesem Entwicklungsstadium (pnd7) kann man noch keine Unterschiede zwischen den beiden Mäusen erkennen.

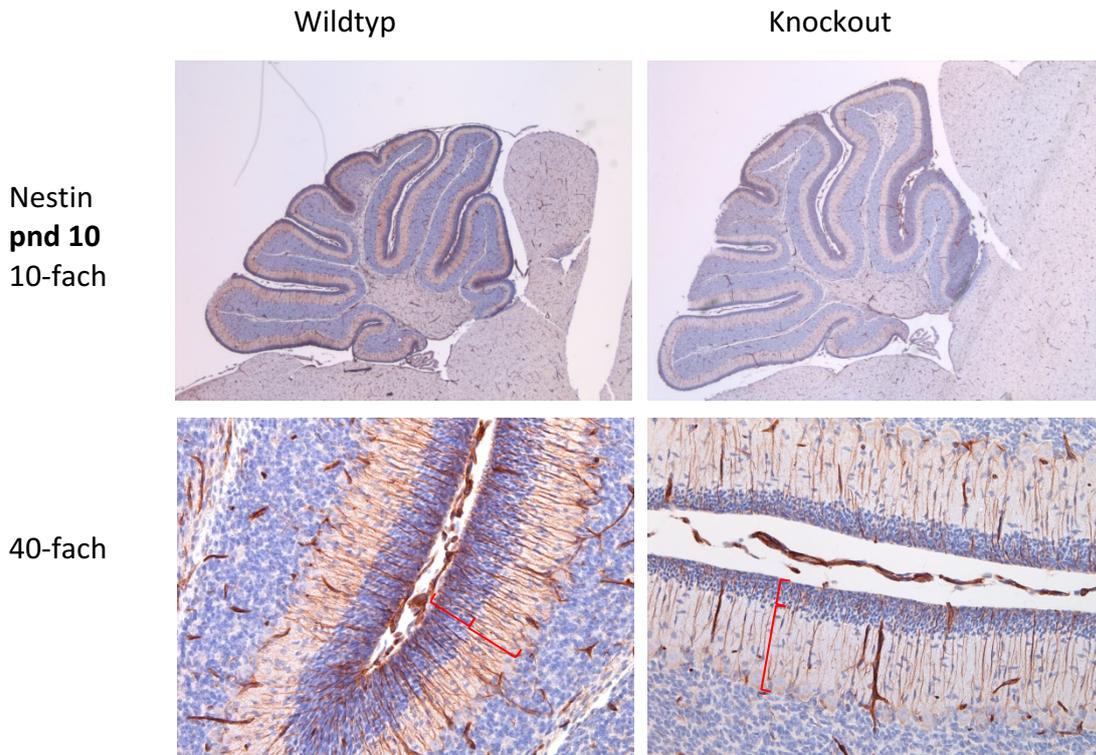


Abb. 29: Analyse der Expression von Nestin als Marker für Sz des ZNS zum Zeitpunkt pnd 10 Mittlerweile ist bei beiden Mäusen die Unterscheidung der EGL in eine äußere und innere Schicht möglich (rote Markierung in der Abb.). Noch sind aber keine relevanten Unterschiede in der Entwicklung des cerebellären Kortex zu erkennen.

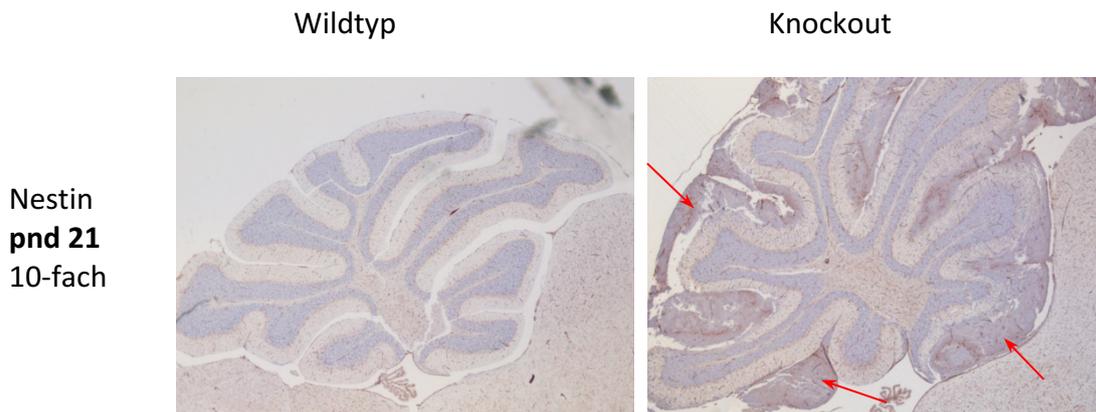


Abb. 30: Analyse der Expression von Nestin als Marker für Sz des ZNS zum Zeitpunkt pnd 21 Bei der Knockout-Maus (rechts) sind weiterhin die in der Nestinfärbung positiven Zellen, insbesondere im Bereich der EGL, noch sichtbar (siehe Pfeile), wogegen man bei der Wildtyp-Maus (links) keine Nestin-positiven Zellen mehr abgrenzen kann.

Analyse der Expression des Markers Calretinin

Calretinin ist ein intrazelluläres Calcium-bindendes Protein mit 31,5 kDa. Das Färbungsmuster zeigt sich im Zytoplasma und Kern.

Im Cerebellum wird es in den Körnerzellen exprimiert. In der Entwicklung des Kleinhirns nimmt die Färbung mit der Reife an Intensität zu.

Im Vergleich zwischen Wildtyp- und Knockout-Maus konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Abb. 31, Abb. 32 und Abb. 33).

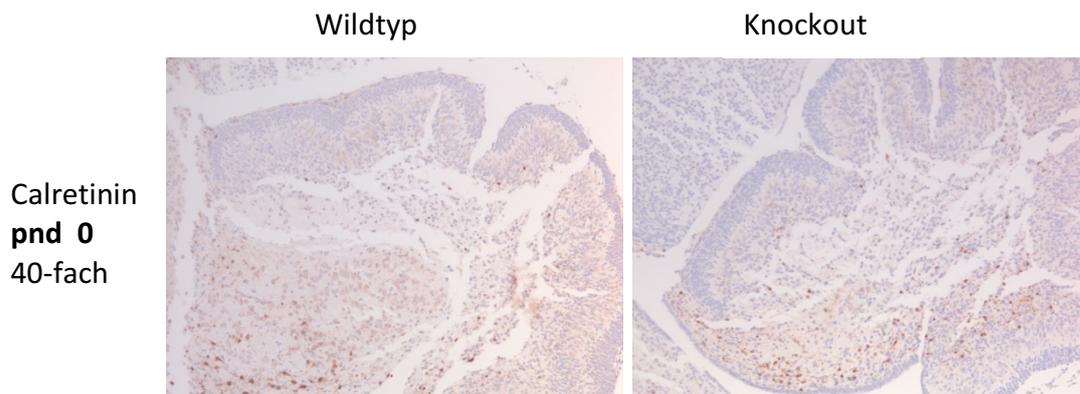


Abb. 31: Analyse der Expression von Calretinin als Marker für Körnerzellen zum Zeitpunkt pnd 0

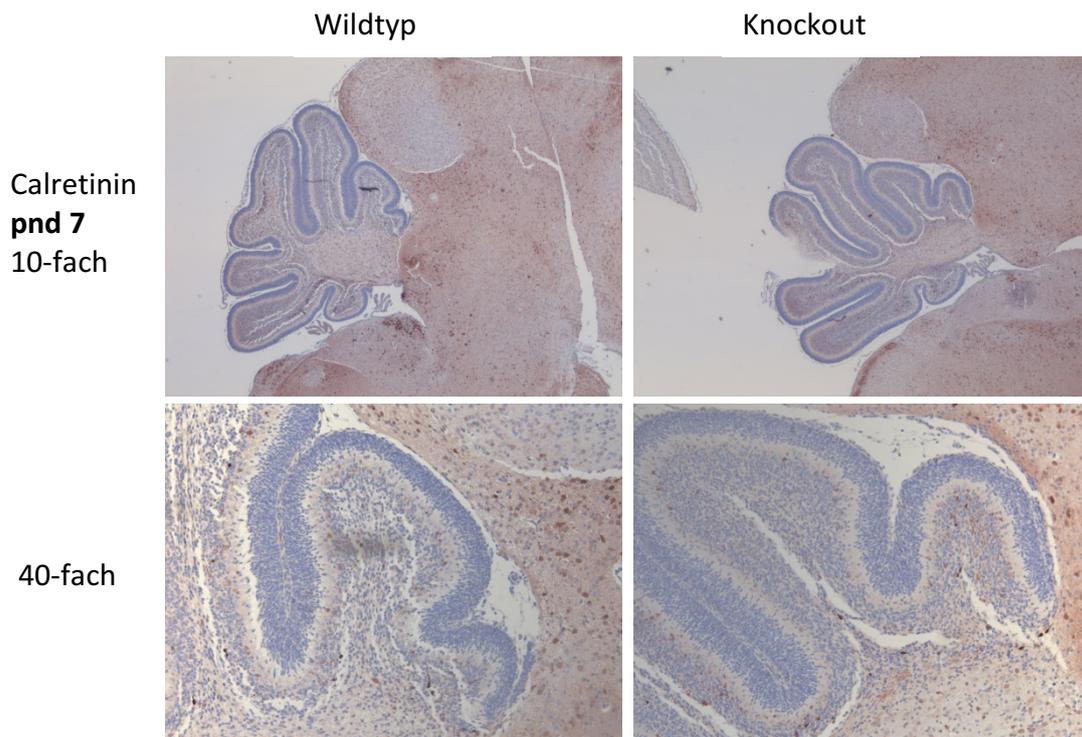


Abb. 32: Analyse der Expression von Calretinin als Marker für Körnerzellen zum Zeitpunkt pnd 7

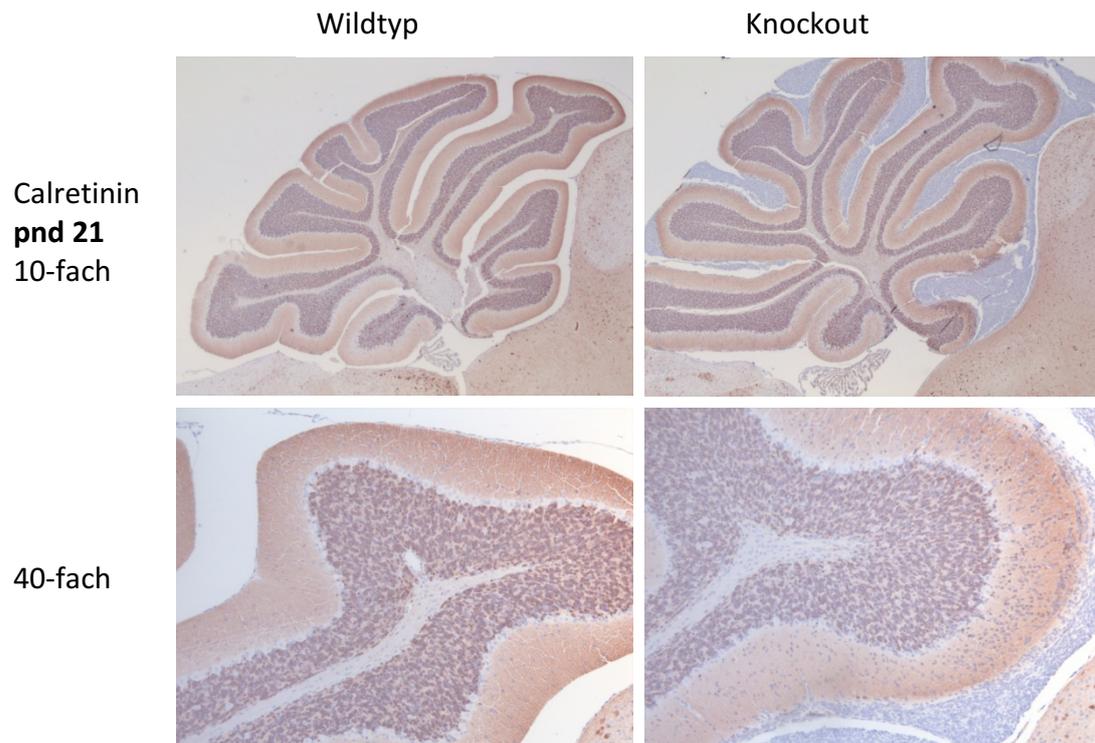


Abb. 33: Analyse der Expression von Calretinin als Marker für Körnerzellen zum Zeitpunkt pnd 21 Trotz zunehmendem Entwicklungsalter sind keine wesentlichen Unterschiede in der Calretinin-Expression der cerebellären Zellen zu erkennen.

Analyse der Expression des Markers Calbindin

Calbindin ist ebenfalls ein Calcium-bindendes Protein. Im Cerebellum wird es ausschließlich von Purkinjezellen exprimiert. Somit wurde Calbindin zur Detektion der Purkinjezellen im sich entwickelnden Kleinhirn eingesetzt. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Anzahl oder Anordnung der Purkinjezellen in beiden Genotypen zu allen Entwicklungsstadien des Cerebellums (s. Abb. 34, Abb. 35, Abb. 36, Abb. 37).

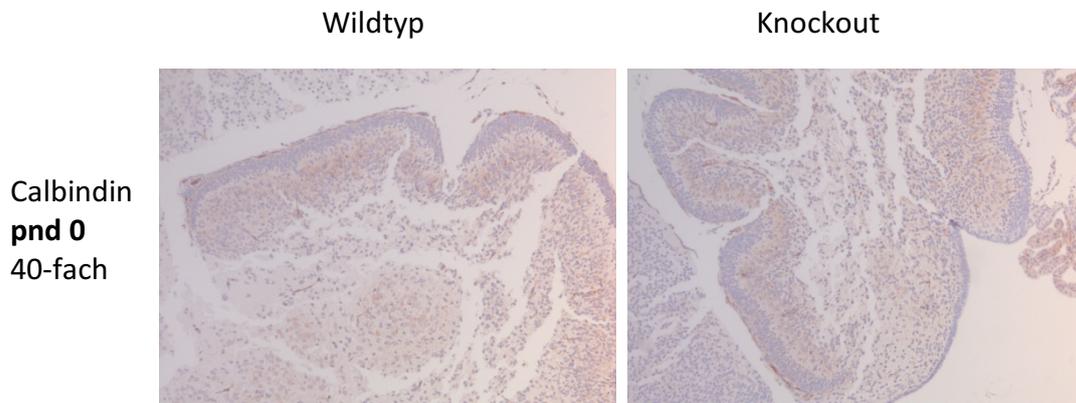


Abb. 34: Analyse der Expression von Calbindin als Marker für Purkinjezellen zum Zeitpunkt pnd 0

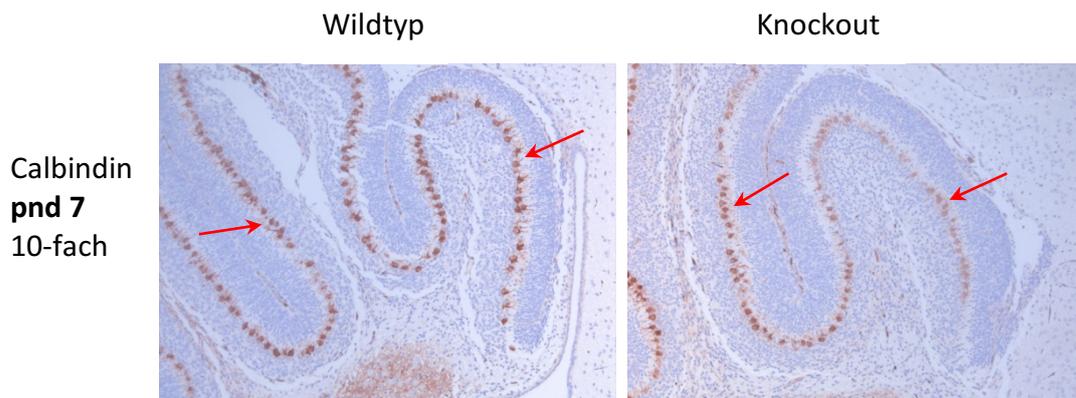


Abb. 35: Analyse der Expression von Calbindin als Marker für Purkinjezellen zum Zeitpunkt pnd 7 Die Purkinjezellen sind an pnd 7 bereits mit ihrer Anordnung zwischen der ML und IGL als Purkinjezellschicht zu erkennen.

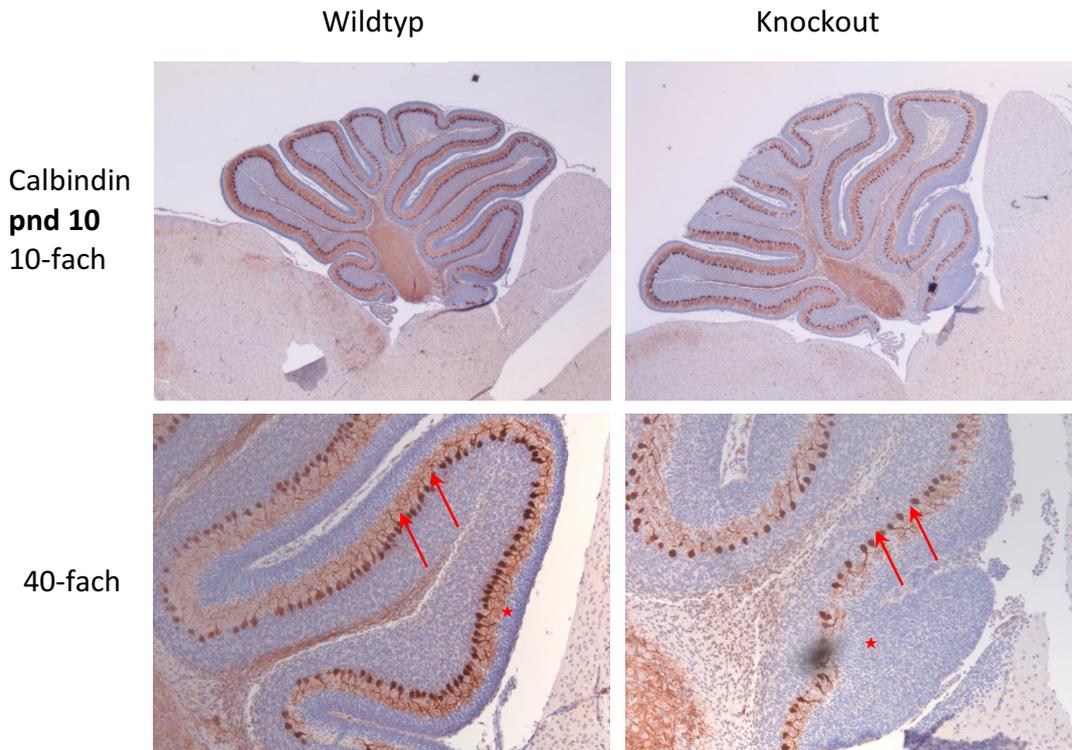


Abb. 36: Analyse der Expression von Calbindin als Marker für Purkinjezellen zum Zeitpunkt pnd 10 Mit zunehmendem Reifealter etabliert sich die Purkinjezellschicht (mit Pfeilen markiert). An pnd 10 ist bei beiden Genotypen noch die EGL abgrenzbar (mit Sternen gekennzeichnet), wobei auch hier die deutliche Verbreiterung der EGL bei der Knockout-Maus (rechts) erkennbar wird.

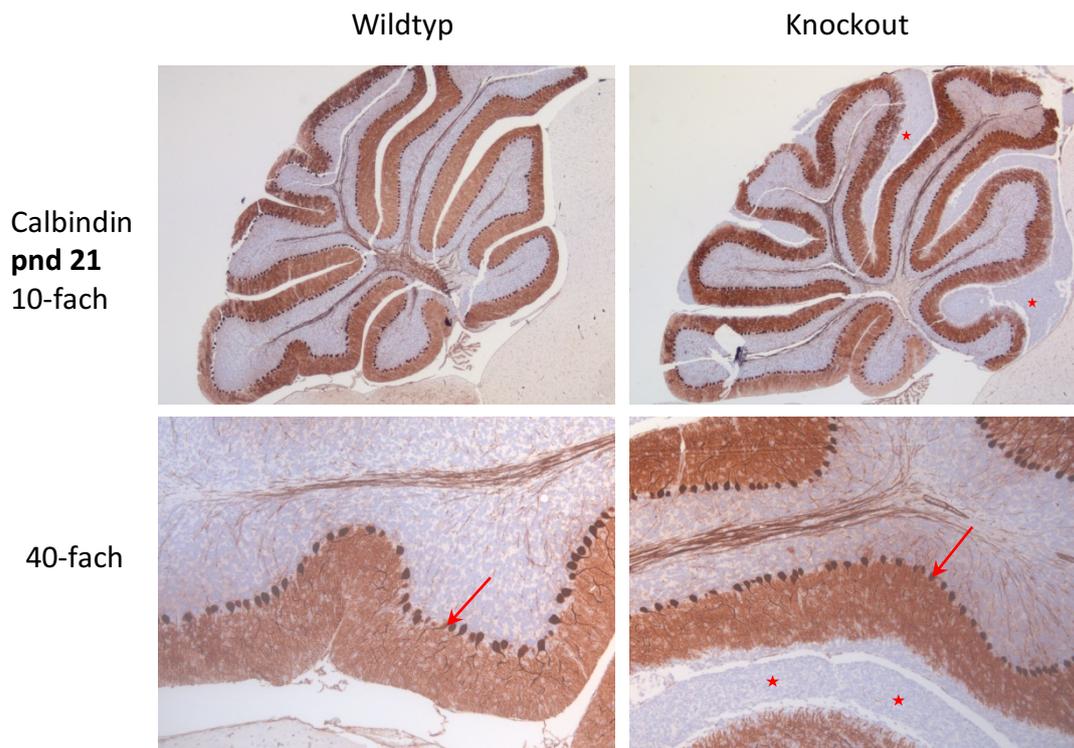


Abb. 37: Analyse der Expression von Calbindin als Marker für Purkinjezellen zum Zeitpunkt pnd 21 Die Purkinjezellschicht ist auch beim reifen Cerebellum gut erkennbar (siehe Pfeile). Bei der Wildtyp-Maus sieht man, dass aktuell der reife, dreischichtige Cortex vorliegt, wobei die Purkinjezellschicht sich zwischen ML und IGL befindet. Bei der Knockout-Maus ist dagegen weiterhin eine EGL (siehe Sterne) abgrenzbar.

3.5 Quantitative Auswertung: Morphometrie

Gemessen und verglichen wurde die äußere Körnerzellschicht (EGL) des cerebellären Cortex der Wildtyp- und Ptch1-Knockout-Mäuse (s. 1.1.1). Zusätzlich wurde auch die Anzahl der Zellen in der EGL gezählt. Insgesamt wurden die Kleinhirne von 29 Mäusen im Alter von pnd 0, pnd 7 und pnd 10 analysiert (s. Tab. 6).

Es handelt sich hierbei um das sich entwickelnde murine Cerebellum, da die EGL bei der physiologischen Kleinhirnentwicklung am Ende der Entwicklungsphase üblicherweise nicht mehr vorhanden ist.

Die Ausmessung der EGL erfolgte für die immunhistochemischen Marker ki67, NeuN und Nestin. Es wurden dabei mehrere Punkte an den einzelnen Lobuli der Kleinhirne gemessen und miteinander verglichen. Bereits vor dem Ausmessen sah man die deutliche Verbreiterung der EGL bei den Knockout-Mäusen. Vor allem die EGL der rostral gelegenen Lobuli erschienen im Vergleich sichtbar verbreitert.

Tab. 6: Übersicht der Anzahl analysierter Mäuse bzw. Kleinhirne

Alter	Wildtyp n=	Knockout n=
pnd 0	2	2
pnd 7	3	4
pnd 10	8	10
TOTAL	13	16

Zur Verdeutlichung: die schematische Darstellung der Kleinhirn-Lobuli und des histologischen Aufbaus des Kleinhirn-Kortex siehe in den Abb. 38 und Abb. 39. In Abb. 38 sieht man die Lobuli-Einteilung des sich entwickelnden Kleinhirns. Das Schema zeigt ein mäuseiches Cerebellum im Alter von etwa pnd 7 bzw. pnd 10. Zu Beginn der Kleinhirnentwicklung sind noch nicht alle hier dargestellten Lobuli vorhanden (in Abb. 38 als Cb abgekürzt), da sie sich erst mit der Zeit entwickeln. In Abbildung 39 ist dann die Schichtung des unreifen, murinen Cerebellums schematisch dargestellt.

(Die Abbildungen Abb. 38 und Abb. 39 sollen lediglich eine schematische Darstellung zur einfacheren Nachvollziehung der Lobuli-Einteilung bzw. der Schichtung des unreifen cerebellären Cortex dienen; nicht maßstabsgetreu.)

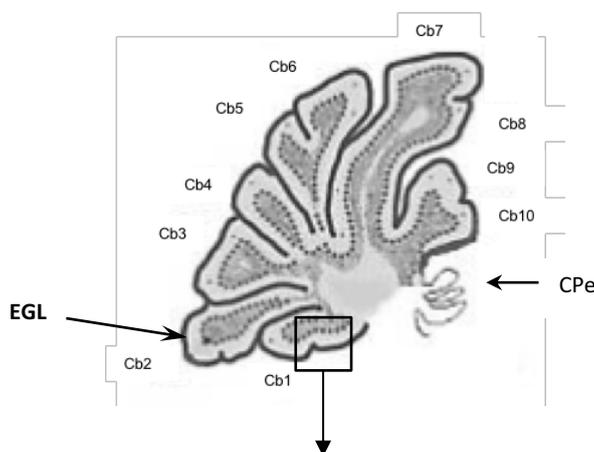


Abb. 38: Schematische Darstellung eines mäuseichen Cerebellums (wie etwa an pnd 10)

Sagittalschnitt; beschriftet sind Cb1 – Cb10 = Lobuli des Cerebellums von rostral nach kaudal; EGL=Äußere Körnerzellschicht, CPe=Plexus choroideus

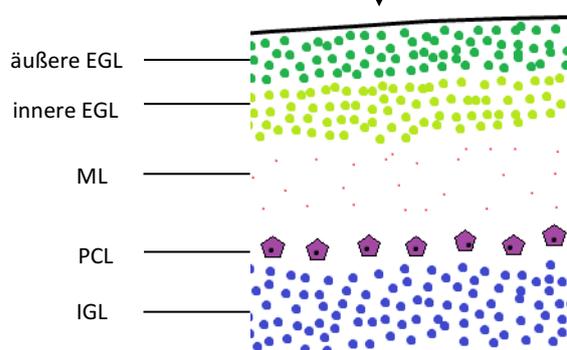


Abb. 39: Schematische Darstellung des unreifen cerebellären Cortex

Von außen nach innen: EGL = äußere Körnerzellschicht, ML = Molekularzellschicht, PCL = Purkinjezellschicht, IGL = innere Körnerzellschicht

3.5.1 Breite der EGL des Kleinhirnkortex: Wildtyp- und Ptch1-Knockout-Mäuse im Vergleich

Im Folgenden sind die morphometrischen Auswertungen der unter 3.5 beschriebenen Messungen zu sehen. Die Ergebnisse sind im Säulendiagramm visualisiert (s. Abb. 40, 41, 42, 43, 44, 45 und 46).

In den einzelnen Messungen wurde die Breite der EGL bei der Wildtyp-Maus und Ptch1-Knockout-Maus zum gleichen Zeitpunkt der Entwicklung (jeweils an pnd 0, pnd 7 und pnd 10) gemessen und verglichen. Dabei wurden die immunhistochemischen Marker ki67, NeuN und Nestin genutzt, welche eine Expression bei den sich proliferierenden Zellen bzw. Stammzellen zeigen.

Die EGL-Verbreiterung als Hinweis für den Entstehungsort des Medulloblastoms ist von großer Bedeutung für die Schlussfolgerung auf die Ursprungszelle des Medulloblastoms.

Die Ergebnisse dieser Messungen zeigen ab pnd 7 eine progrediente Zunahme der EGL-Breite bei den Ptch1-Knockout-Mäusen. Im weiteren zeitlichen Verlauf sieht man dann immer deutlicher, dass bei den Ptch1-Knockout-Mäusen die EGL im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen immer breiter wird. An pnd 10 sind die Unterschiede in der Breite unverkennbar. Wenn man die EGL-Breite der einzelnen Lobuli dann untereinander betrachtet, ist zudem zu erkennen, dass die Unterschiede der EGL-Breite zwischen den WT- und K.O.-Mäusen in den rostralen Lobuli sehr groß sind. Mit Verlagerung der Messungen zu den kaudalen Lobuli zeigt sich eine immer weitere Annäherung der EGL-Breite der beiden Genotypen an, so dass hier kaum noch Unterschiede in der EGL-Breite erkennbar sind.

In den folgenden Diagrammen (Abb. 40, 41, 42, 43, 44, 45 und 46) sind die EGL-Breiten der WT-Mäuse mit grau und die der Ptch1-defizienten Mäuse in dunkelrot markiert. Die Messungen und Visualisierungen der Ergebnisse wurden im zeitlichen Verlauf nach postnatalem Entwicklungsalter und separat für die einzelnen Lobuli beginnend von rostral nach kaudal (vgl. Abb. 38) durchgeführt.

Die Höhe der Balken zeigt die gemessenen Mittelwerte an. In den Abbildungen 41-45 sind zudem die Fehlerbalken zur graphischen Darstellung der Standardabweichungen als Maß für die Streubreite für die jeweilige EGL-Breite gezeigt.

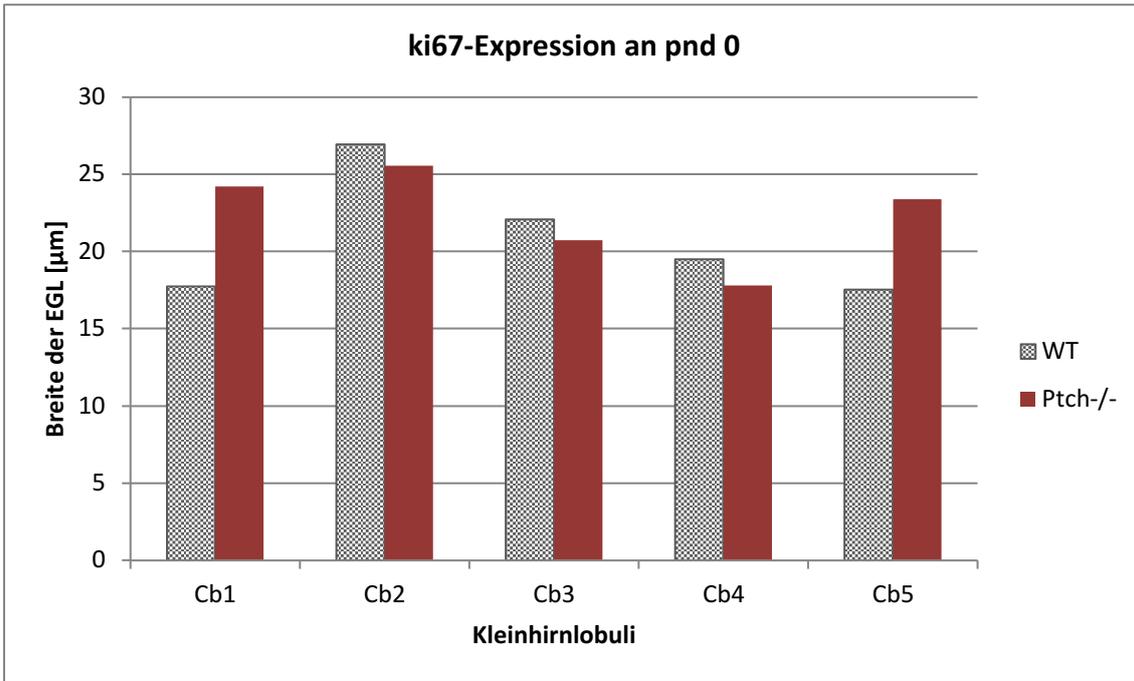


Abb. 40: Breite der ki67-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 0
 EGL = Äußere Körnerzellschicht; Cb1-Cb5 beschreiben die jeweiligen Lobuli des Kleinhirns, nummeriert von rostral nach kaudal; WT = Wildtyp; Ptch = Patched; pnd = Postnataltag

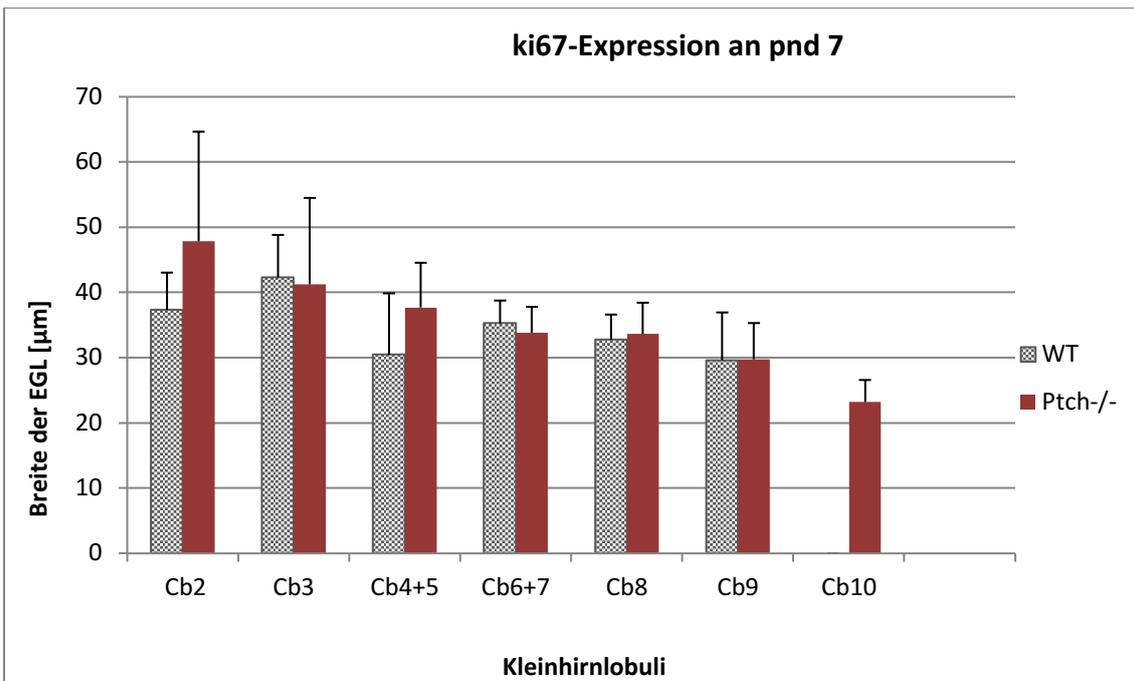


Abb. 41: Breite der ki67-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 7
 Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. EGL = Äußere Körnerzellschicht; Cb2-Cb10 beschreiben die jeweiligen Lobuli des Kleinhirns, nummeriert von rostral nach kaudal; WT = Wildtyp; Ptch = Patched; pnd = Postnataltag

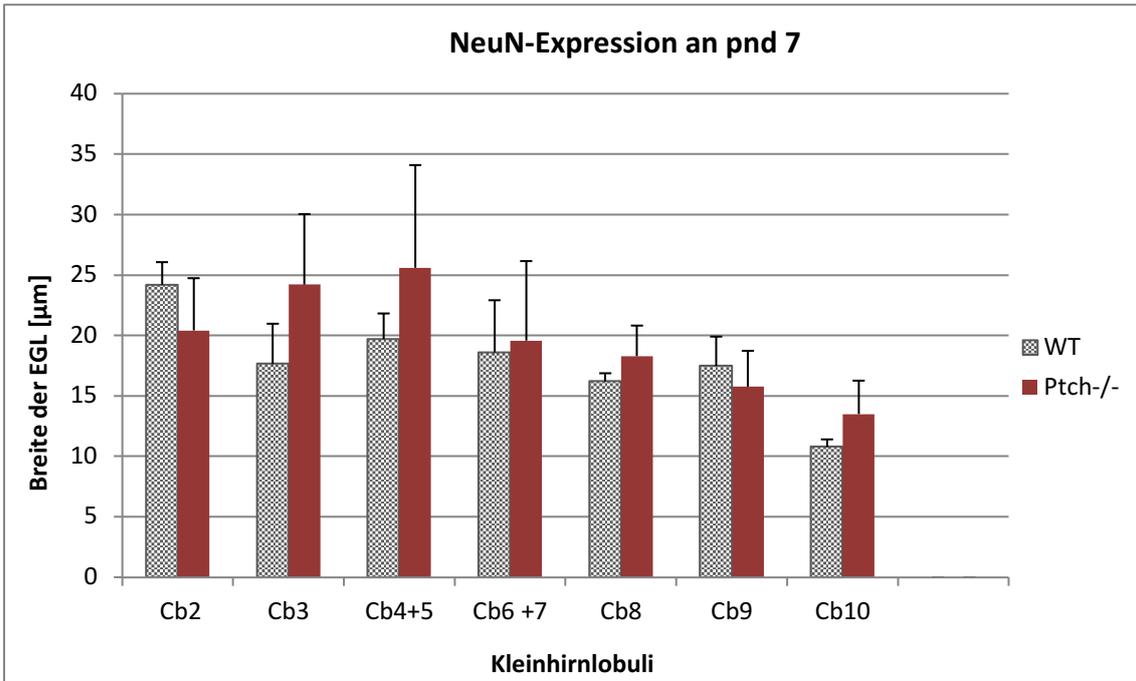


Abb. 42: Breite der NeuN-positiven Schicht der EGL bei Tieren im Alter von pnd 7

Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. NeuN = Neuronal Nuclei; EGL = Äußere Körnerzellschicht; Cb2-Cb10 beschreiben die jeweiligen Lobuli des Kleinhirns, nummeriert von rostral nach kaudal; WT = Wildtyp; Ptch = Patched; pnd = Postnataltag

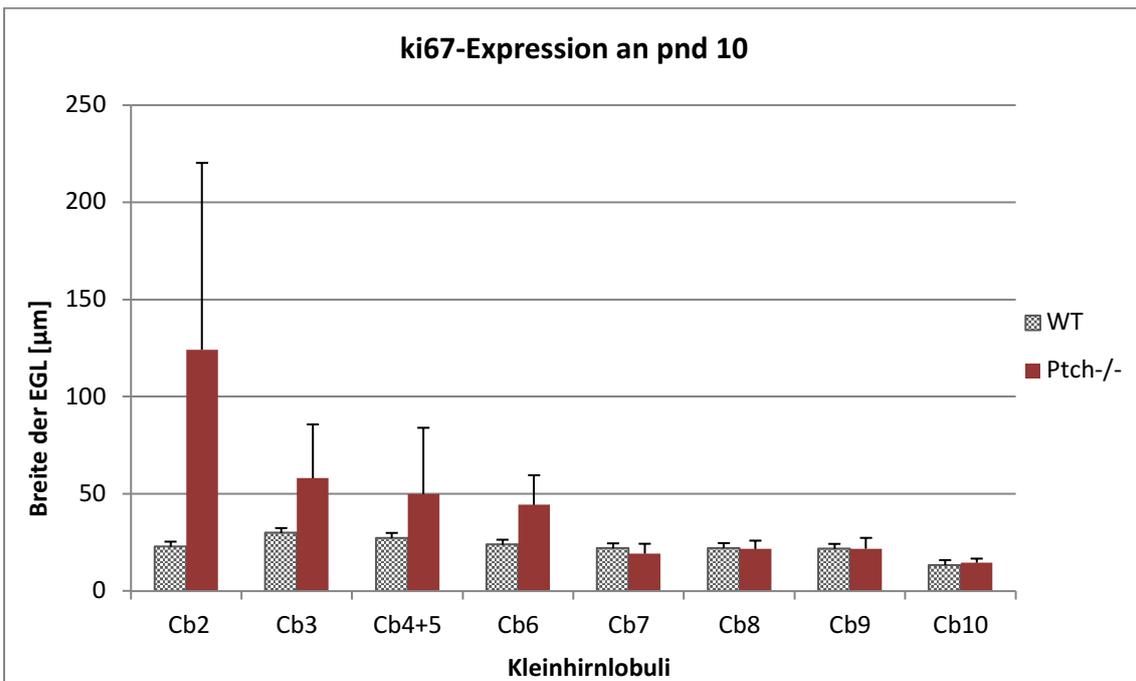


Abb. 43: Breite der ki67-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 10

Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. NeuN = Neuronal Nuclei; EGL = Äußere Körnerzellschicht; Cb2-Cb10 beschreiben die jeweiligen Lobuli des Kleinhirns, nummeriert von rostral nach kaudal; WT = Wildtyp; Ptch = Patched; pnd = Postnataltag

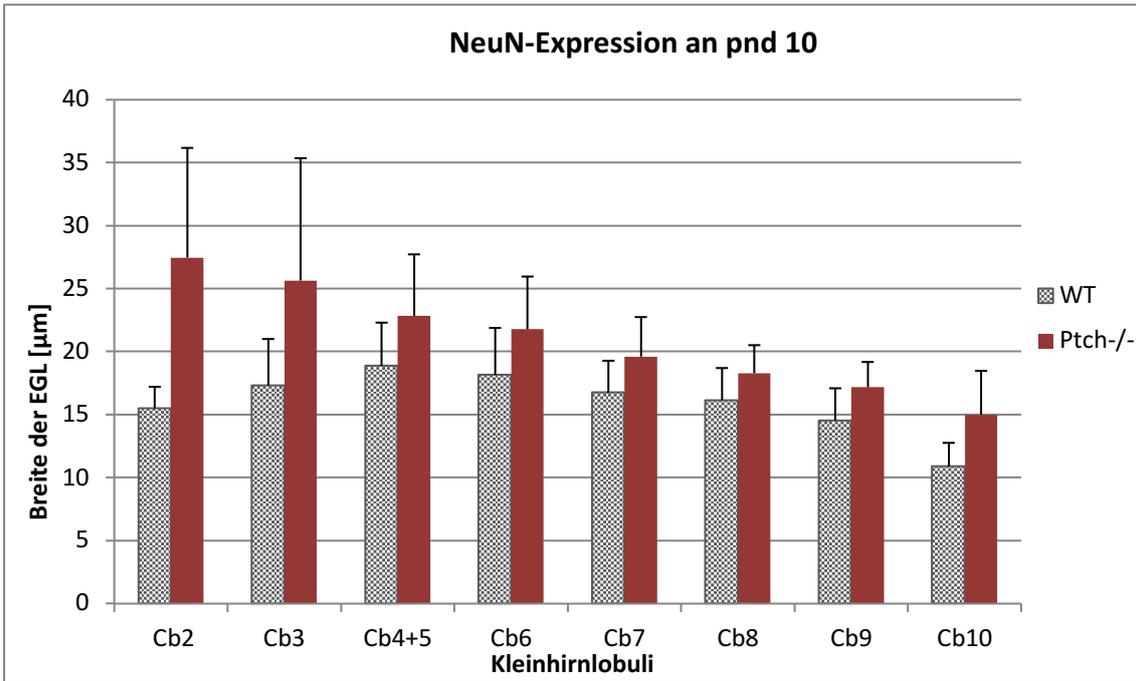


Abb. 44: Breite der NeuN-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 10
 Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. NeuN = Neuronal Nuclei; EGL = Äußere Körnerzellschicht; Cb2-Cb10 beschreiben die jeweiligen Lobuli des Kleinhirns, nummeriert von rostral nach kaudal; WT = Wildtyp; Ptch = Patched; pnd = Postnataltag

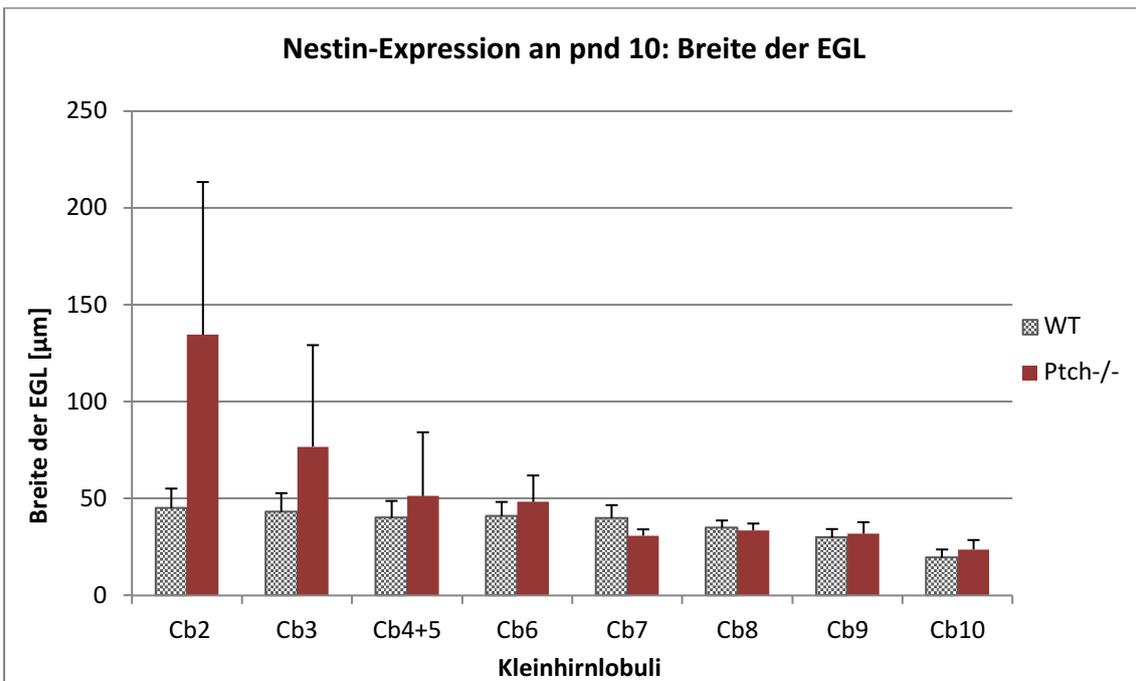


Abb. 45: Breite der Nestin-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 10
 Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. EGL = Äußere Körnerzellschicht; Cb2-Cb10 beschreiben die jeweiligen Lobuli des Kleinhirns, nummeriert von rostral nach kaudal; WT = Wildtyp; Ptch = Patched; pnd = Postnataltag

Bei der Nestin-Färbung war bei Mäusen mit Ptch-Deletion zusätzlich eine Unterscheidung der EGL in eine äußere, hyperplastische und eine innere, reguläre EGL-Schicht möglich (s. Abb. 46)

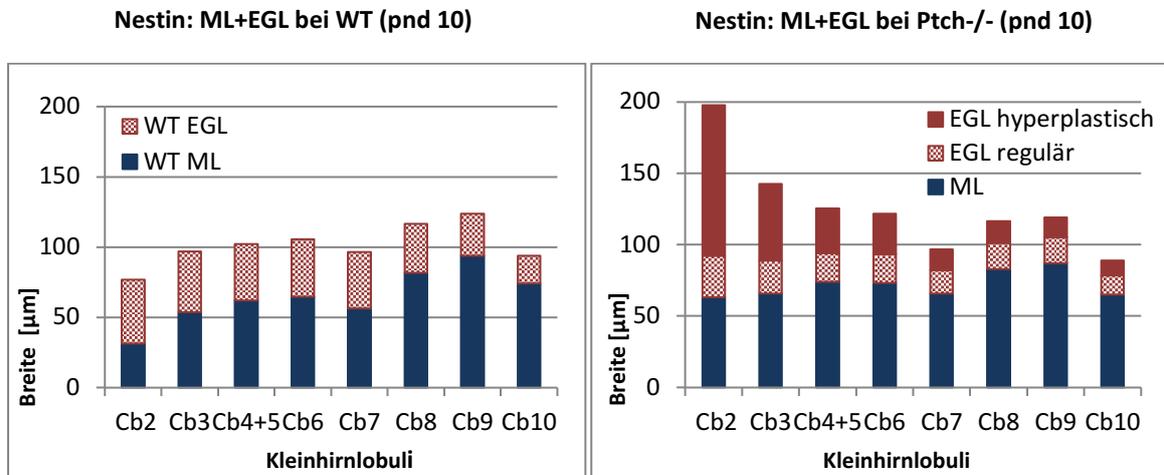


Abb. 46: Vergleich EGL- und ML-Schicht bei der Nestin-Färbung von Wildtyp- und Knockout-Mäusen an pnd 10
 ML = Molecular layer; EGL = Äußere Körnerzellschicht; WT = Wildtyp; Ptch = Patched; Cb2-Cb10 beschreiben die jeweiligen Lobuli des Kleinhirns, nummeriert von rostral nach kaudal

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Effekte der p48-Cre induzierten konditionalen Ptch1-Deletion auf das Cerebellum der Maus untersucht.

Den Schwerpunkt der Arbeit bildeten die histologischen und morphologischen Auswertungen des Kleinhirns und der Vergleich zwischen Wildtyp- und Ptch1-Knockout-Maus. Dabei wurde die Rolle des Shh-Rezeptors Ptch1 bei der Medulloblastomentstehung untersucht. Interessiert hat vor allem die Frage, ob man durch eine spezifische Markerexpression und den frühen morphologischen Veränderungen im Cerebellum auf die mögliche Ursprungszelle des Medulloblastoms schließen kann. Die Ursprungszellen für das Medulloblastom sind schon jahrelang Forschungs- und Diskussionsthema der Wissenschaft. Man konnte noch nicht nachweisen, welche Herkunftszellen für die Entstehung des Medulloblastoms verantwortlich sind. Vermutet werden unterschiedliche Ursprünge für die verschiedenen molekularen Subgruppen des Medulloblastoms. Bei den Kleinhirntumoren des vorliegenden Mausmodells scheint es sich um ein Medulloblastom, das mit dem Shh/Ptch-Signalweg assoziiert ist zu handeln, bei dem man derzeit die Körnerzellvorläufer (GCP) als Ursprungszellen für wahrscheinlich hält. Dabei könnte man den durch Ptch1-Deletion bei der Maus entstehenden Tumor mit dem menschlichen Medulloblastom der Shh-Subgruppe gleichsetzen, weshalb dieses Mausmodell ein besonderes Forschungsinteresse weckt und einen wichtigen Ansatzpunkt auch für die Therapie des Medulloblastoms beim Menschen darstellt.

4.1 Ptf1a^{+/Cre}_Ptch1^{flox/flox} Maus – ein Mausmodell für das Medulloblastom

Mäuse sind dem Menschen in vieler Hinsicht - physiologisch, biochemisch, genetisch – sehr ähnlich und leicht zugänglich für Genveränderungen. Deshalb sind genveränderte Mausmodelle mittlerweile unverzichtbar in der Grundlagen- und translationalen Krebsforschung und auch sehr geeignet für die Untersuchung der Pathogenese des Medulloblastoms und den Genmutationen, die zu dessen Entstehung führen (Wu et al. 2011).

Das Zwölf-Transmembranprotein Ptch1 ist der Rezeptor für Sonic hedgehog und spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, Tumorgenese und fungiert als Tumorsuppressor (Archer et al. 2012; Peng et al. 2013). Ptch1 wirkt nämlich als Antagonist

des Shh-Signalwegs und bei Ptch1-inaktivierenden Mutationen kommt es durch aberrante Aktivierung des Shh-Signalwegs zu massiven Zellproliferationen und zur Tumorentstehung (Peng et al. 2013; Yang et al. 2008).

Auch in der Entwicklung des Cerebellums und der Entstehung von cerebellären Tumoren wird dem Shh/Ptch-Signalweg eine große Bedeutung beigemessen. Der Shh/Ptch-Signalweg ist u.a. zuständig für die Strukturierung des Kleinhirns durch Ausbildung der typischen blattförmigen Kleinhirnwindungen (Folia cerebelli), die Regulierung der Größe des Organs und die Ausrichtung entlang der anterior-posterior Achse (s. 1.3.2).

Eine von vier molekularen Subgruppen des Medulloblastoms, ein hochmaligner embryonaler Tumor des Cerebellums (Nord et al. 2012), ist die Shh-Subgruppe. Sie zeigt molekulare Veränderungen durch Genmutationen im Shh/Ptch-Signalweg, welche zur Entstehung eines Medulloblastoms führen (Taylor et al. 2012). Dementsprechend ist das Ptch1-Knockout-Mausmodell sehr ideal zur Untersuchung von Veränderungen in der Entwicklung des Medulloblastoms, die durch aberrante Aktivierung des Shh-Ptch-Signalwegs entstehen (Vaillant et al. 2015).

Um frühe Veränderungen in der Entwicklung des Medulloblastom aufzuzeigen, wurden bereits mehre konditional Ptch1-deletierte Mausmodelle generiert und untersucht. Um beide Ptch1-Allele zu deaktivieren, werden Mauslinien mit verschiedenen Cre-Knockins als Treiber der Ptch1-Deletion eingesetzt. Bei der in dieser Arbeit untersuchten Mauslinie wurde die konditionale Ptch1-Deletion durch das Einkreuzen einer p48-Cre-Knockin Treiberlinie induziert. Dementsprechend wurden Ptch1^{flox/flox}-Mäuse mit der p48^{+/Cre}-Mauslinie verpaart, um eine konditionale Deletion des Ptch1-Allels zu erreichen. P48 ist ein basisches Helix-Loop-Helix-Protein und Teil des PTF1a-Komplexes. Hoshino et al. (2005, 2012) und Sellick et al. (2004) konnten bereits zeigen, dass PTF1a, der pankreatische Transkriptionsfaktor 1a, an der Pankreasentwicklung aber auch an der embryonalen Entwicklung des Kleinhirns beteiligt ist. Es wird vom Keimepithel der Ventrikularzone exprimiert und ist für die Differenzierung der GABAergen Neurone des Kleinhirns, wie die Purkinjezellen, zuständig (siehe auch unter 1.1.1 und Abb. 1). Dementsprechend wurde die p48-Cre induzierte Deletion des Ptch1-Allels in PTF1a bzw. p48 positiven Zellen, also im Pankreas und Gehirn, gefunden (Livacic 2012).

So erhielten wir ein Mausmodell mit gewebspezifischer, konditionaler Deletion des Ptch1-Allels in allen p48-Cre positiven Zellen.

Die konditionale Deletion des Ptch1-Gens ist nötig zur Untersuchung der Effekte eines Ptch1-Knockouts, da eine nicht-konditionale Ptch1-Deletion in allen Zellen zu einem embryonal letalen Phänotyp führt (Ellis et al. 2003; Jiang et al. 2009).

Die Untersuchung einer $Ptf1a^{+/Cre}$ _Ptch1^{flox/flox}-Mauslinie bezüglich der möglichen Frühdiagnostik und Verlaufskontrolle des Medulloblastoms mittels Magnetresonanztomographie wurde auch von Suero-Abreu et al. durchgeführt.

4.2 Konditionale Ptch1-Deletion führt zur Entstehung eines Medulloblastoms und endet in einem letalen Phänotyp

Wir konnten zeigen, dass die konditionale Ptch1-Deletion bei allen $p48^{+/Cre}Ptch1^{flox/flox}$ Mäusen zur Entwicklung eines Medulloblastoms führt und mit dem Tod der Mäuse endet. Somit ergibt sich eine 100%ige Tumorinzidenz und unbehandelt eine 100%ige Letalität für den p48-Cre induzierten konditionalen knockout des Ptch1-Gens. Die Letalität der Mäuse begann ab der achten Lebenswoche und 15 Wochen postnatal waren alle $p48^{+/Cre}Ptch1^{flox/flox}$ -Mäuse bereits verstorben.

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Yang et al., 2008 und Li et al., 2013 und 2016. Sie beobachteten das Überleben bei konditionalem Patched-knockout (heterozygot für das $Ptch^{del}$ -Allel) induziert durch Math1-Cre bzw. Nestin-Cre. Auch diese Mäuse entwickelten ein Medulloblastom und begannen alle ab der achten Lebenswoche zu sterben und wurden maximal 11-12 bzw. 19-20 Wochen alt. Die Math1-Expression ist spezifisch für die Körnerzellvorläufer im postnatalen Kleinhirn.

Der Unterschied zwischen unserer Mauslinie und den beiden anderen Mauslinien in der genannten Literatur ist, dass verschiedene Loci für den Cre-Knockin gewählt wurden. Bei Yang et al. wurde die Ptch1-Deletion durch Math1-Cre und bei Li et al. auch zusätzlich durch Nestin-Cre induziert. Das Ergebnis bezüglich der Überlebenskurve ist für alle drei Mauslinien sehr ähnlich. Wenn man die Ptch1-Inaktivierung bei p48-Cre-Mäusen mit Math1-Cre- und Nestin-Cre-Mäusen vergleicht, sieht man bei beiden Mauslinien, ebenso wie bei unserer Mauslinie, ein maximales Überlebensalter von 10-20 Lebenswochen (Li et al. 2013, 2016; Yang et al. 2008).

4.3 Immunhistochemische Charakterisierung: Die Expression von Markern

Um frühe Veränderungen im Cerebellum der Ptch1-Knockout-Maus zu erkennen und Hinweise auf den Ursprung der Tumorzellen zu erhalten, haben wir die immunhistochemische Markerexpression im Vergleich zur WT-Maus untersucht.

Ki67 ist ein Proliferationsmarker, mit dem man die Möglichkeit hat, den mitotischen Index von Tumorzellen zu bestimmen. Da das Medulloblastom ein sehr schnell wachsender Tumor ist, findet man, im Vergleich zum gesunden Cerebellum, erhöhte Level der ki67-positiven Zellen (Meurer et al. 2008).

Wir untersuchten das Cerebellum von Wildtyp- und Ptch1-defizienten-Mäusen auf ki67, als Marker für sich teilende Zellen, in verschiedenen Entwicklungsstadien um frühe Veränderungen im Cerebellum zu erkennen. Eine ki67-Expression konnte in beiden Mäusen nachgewiesen werden. Ab dem 7. Tag postnatal war aber eine wesentlich höhere Anzahl von ki67-positiven Zellen in der EGL der Knockout-Maus, im Vergleich zur Wildtyp-Maus, zu erkennen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Proliferation bei der Ptch1-defizienten Maus in der EGL deutlich erhöht ist. Dieser Unterschied wurde mit zunehmendem Alter der Mäuse zudem immer immenser. Mit Zunahme der Reife des Cerebellums, zeigte sich bei höherer Anzahl ki67-positiver Zellen in der äußeren Körnerzellschicht (EGL), in der die Entwicklung der Körnerzellen stattfindet, auch eine deutliche Verbreiterung dieser im Vergleich zur Wildtyp-Maus. Dass die Proliferation beim Shh-assoziierten Medulloblastom in der EGL erhöht ist, gibt uns Anhaltspunkte für die Ursprungszellen des Kleinhirntumors. Pathophysiologisch entwickeln sich in der EGL aus den Körnerzellvorläufern (GCP) die reifen Körnerzellen und migrieren nach dem Verlassen des Zellzyklus in die innere Körnerzellschicht (IGL) (siehe hierzu Diskussionspunkt 4.4).

Außer der Unterschiede in der Anzahl und des Verteilungsmusters ki67-positiver Zellen bei Ptch1-defizienten Mäusen zeigten Matsuo et al. 2013, dass es sich bei ki67-positiven Foki bei Ptch1-Mäusen um Zellen mit gleichem Muster wie der Körnerzellen der äußeren EGL der WT-Mäuse handelt, jedoch mit dem wesentlichen Unterschied, dass diese undifferenzierter in der Histologie sind und mit einer hohen Proliferationsaktivität einhergehen. Dadurch kann man einerseits als Fokus der Entstehung eines Medulloblastoms von diesen GCP-like Zellen ausgehen, die man mithilfe von ki67 detektieren kann und andererseits diese Foki mit fokaler EGL-Verbreiterung als

Präneoplasien ansehen.

NeuN ist ein immunhistochemischer Marker für reife Körnerzellen. Weyer & Schilling konnten im Jahr 2003 zeigen, dass die Expression von NeuN im murinen Cerebellum auf die Körnerzellen und eine kleine Population von Zellen in der Molekularschicht (ML) beschränkt ist. In der Entwicklung des Cerebellums zeigen sich NeuN-positive Zellen zuerst vermehrt in der inneren Schicht der EGL, in der sich die differenzierten Körnerzellvorläufer aufhalten. Mit zunehmender Entwicklung und Reife des Cerebellums sind die NeuN-positiven Zellen in der ML und inneren Körnerzellschicht zu erkennen, wohin die GCP nach der Differenzierung migrieren, und die EGL zeigt keine NeuN-Expression mehr. Dieses Expressionsprofil von NeuN beobachteten wir auch genauso bei der Wildtypmaus. Bei der *Ptch1*-Knockout-Maus jedoch blieb die NeuN-Expression in der inneren EGL-Schicht auch nach pnd 20, an dem im Normalfall die Migration der GCP aus der EGL in die IGL bei der Maus abgeschlossen ist, erhalten. Man erkennt eine deutliche NeuN-positive Zellschicht und Verbreiterung der (inneren) EGL. Dieses Expressionsprofil lässt uns ebenfalls vermuten, dass das Medulloblastom bei der *Ptch1*-defizienten Maus von GCP abstammt (s.u. 4.4).

Nestin ist ein Typ IV Intermediärfilament und wird in den Stammzellen des ZNS (undifferenzierte Zellen) nachgewiesen, da es im Laufe der Entwicklung in den differenzierten Zellen durch Neurofilament und GFAP ersetzt wird.

Wir konnten in der Immunhistochemie zeigen, dass die Nestin-Expression bei den K.O.-Mäusen für eine deutlich längere Zeit als bei der Wildtyp-Maus nachzuweisen ist. Das kann man einerseits erklären als die längere Anwesenheit von undifferenzierten Stammzellen durch die *Ptch1*-Deletion, welche durch Ihre erhöhte Proliferationsrate zur Medulloblastom-Entwicklung führen. Bei *Ptch1*-defizienten Mäusen konnte in Nestin-positiven GCP auch eine deutlich erhöhte *ki67*-Positivität der Zellen nachgewiesen werden, die ebenfalls für eine vermehrte Proliferation spricht (Li et al. 2016). Andererseits zeigten Untersuchungen von Li et al., 2013 und 2016, dass Nestin in konventionellen cerebellären GCP nicht exprimiert wurde. Die Nestin-Expression beschränkte sich auf die *Ptch1*-defizienten GCP der Medulloblastomzellen und stieg mit der Medulloblastom-Entstehung, somit zeigte sich der Verdacht, dass Nestin selbst auch eine Rolle in der Medulloblastomentstehung haben könnte. Li et al. vermuten, dass Nestin durch Bindung und Inhibierung des nukleären Gli3-Transkriptionsfaktors in den Shh-Signalweg eingreift.

Man glaubt hier aber nicht, dass Nestin alleine zur Tumorentstehung beiträgt, sondern lediglich durch die Präsenz die Dauer der Shh-Signalwegaktivierung verlängert und somit die Proliferation der Ptch1-defizienten GCP fördert, welche in der Untersuchung schneller einen Tumor entwickelten als die Nestin-negativen Zellen.

Calretinin ist ein intrazelluläres Calcium-bindendes Protein mit 31,5 kDa, das im Cerebellum von den reifen Körnerzellen exprimiert wird, es zeigt sich keine Expression durch Purkinjezellen (Gall et al. 2003; Marini, Strauss, and Jacobowitz 1997). Als Marker reifer Körnerzellen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede bei beiden Genotypen. Somit liegt weiterhin der Verdacht nahe, dass die Ursprungszellen des Medulloblastoms auf der Entwicklungsachse vor der Differenzierung in ihre endgültigen Zellen, liegen.

Calbindin ist ebenfalls ein intrazelluläres Calcium-bindendes Protein mit 24 kDa, welches von Purkinjezellen (und Bergmann-Glia) exprimiert wird. Es wird beschrieben, dass der Eingriff in die GCP-Entstehung und Verhinderung ihrer Migration und Differenzierung, zu Abnormalitäten in den Purkinjezellen, welche Shh sezernieren, führen kann. Um GCP als alleinige Verursacher des Medulloblastoms und die Rolle der Purkinjezellen zu untersuchen, erfolgte die immunhistochemische Analyse der Purkinjezellen mittels Calbindin. Es konnten in dieser Arbeit jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich Anzahl oder Anordnung der Purkinjezellen in beiden Genotypen zu allen Entwicklungsstadien des Cerebellums festgestellt werden. Somit weiterhin der Verdacht, dass GCP unabhängig von Purkinjezell-Abnormalitäten zur Medulloblastomentstehung beitragen. Sehr ähnliche Ergebnisse erzielten auch Matsuo et al., welche ebenfalls bei Ptch1-defizienten Mäusen die Cerebella immunhistochemisch untersuchten. Hier konnten ebenfalls keine histologischen Unterschiede der Purkinjezellentwicklung zwischen der WT- und Ptch-Knockout-Mäuse festgestellt werden (Gall et al. 2003; Matsuo et al. 2013).

4.4 Körnerzellvorläufer (GCP) als Ursprungszellen des Medulloblastoms und die Verbreiterung der äußeren Körnerzellschicht (EGL)

Die Ursprungszellen des Medulloblastoms sind bereits seit Jahren Diskussionsthema der wissenschaftlichen Forschung und derzeit noch nicht vollständig geklärt. Man geht mittlerweile von unterschiedlichen Ursprungszellen der verschiedenen molekularen Medulloblastom-Subgruppen aus. Beim humanen Medulloblastom des molekularen Subtyps Shh vermutet man die Vorläuferzellen der äußeren Körnerzellschicht (GCP) als die Herkunftszellen, welche für die Entstehung des Medulloblastoms dieser Gruppe verantwortlich sind. (Gibson et al. 2010; Matsuo et al. 2013; Northcott et al. 2011; Schüller et al. 2008; Wang and Wechsler-Reya 2014; Yang et al. 2008; Zhang et al. 2016).

Das Wissen über die Ursprungszelle ist für eine frühe Diagnosestellung und einen effektiven und gezielten therapeutischen Ansatz in der Medizin von großer Bedeutung. Um dies zu erforschen stellt die Ptch1-deletierte Maus mit seinen erheblichen parallelen zum menschlichen Medulloblastom ein ideales Modell zur Untersuchung dieser Entwicklungsprozesse dar (Goodrich 1997; Yang et al. 2008).

Die physiologische Entwicklung des Kleinhirns beginnt mit der tangentialen Wanderung der Körnerzellvorläufer (GCP) von der Rautenlippe über die Kleinhirnoberfläche nach rostral und Bildung der EGL. Dabei bilden sich zwei Zonen in der EGL: die äußere EGL, in der sich die proliferierenden Zellen befinden und die innere EGL mit den postmitotischen, differenzierten Zellen, welche dann nach dem Austritt aus dem Zellzyklus von der EGL in die innere Körnerzellschicht (IGL) wandern. In der IGL halten sich nur noch reife Körnerzellen auf. Nach Beendigung dieser Migration ist die EGL dann nicht mehr nachzuweisen (Details siehe unter 1.1.1).

Um die Rollen der GCP in der Entwicklung des Shh-assoziierten Medulloblastoms und der EGL-Breite zu untersuchen, haben wir in dieser Arbeit die frühen Veränderungen in der äußeren Körnerzellschicht charakterisiert und WT- und KO-Mäuse miteinander verglichen. Dafür wurde eine morphometrische Auswertung auf Basis der immunhistochemischen Färbung zur Charakterisierung der unterschiedlichen Zellen der Kleinhirne durchgeführt, wobei das Augenmerk auf die EGL, in der sich die GCP aufhalten, gelegt wurde. Die Ergebnisse wurden im Säulendiagramm visualisiert (s. 3.5.1). Hierbei konnte gezeigt werden, dass bis pnd 7 keine eindeutigen Unterschiede bei der Entwicklung der äußeren

Körnerzellschicht festzustellen waren. Erst mit zunehmendem, postnatalem Entwicklungsstand der Kleinhirne, wurden jedoch deutliche Unterschiede in der EGL-Breite der WT- und KO-Mäuse sichtbar und messbar. Zudem wurden die EGL der unterschiedlichen Lobuli des Cerebellums ausgewertet und miteinander verglichen, wobei die Differenzen der EGL-Breite beider Genotypen eindeutig auf die rostraleren Lobuli des Cerebellums beschränkt waren. Mit anatomisch kaudalerer Lage der Cerebella waren auch keine Unterschiede mehr in der Breite der EGL zwischen der KO-Maus und der Wildtyp-Maus nachzuweisen.

Interessant ist auch die Auswertung bei der Nestin-Färbung des Cerebellums. Hier ist bei KO-Mäusen zusätzlich die Unterscheidung der EGL in eine äußere, hyperplastische und eine innere EGL möglich. Wenn man diese zwei Schichten einzeln auswertet, wird deutlich, dass die EGL-Verdickung die äußere EGL-Schicht mit den hyperplastischen Zellen betrifft. Wie bereits oben beschrieben befinden sich in dieser äußeren Schicht die proliferierenden GCP und in der inneren EGL die postmitotischen, differenzierten Zellen, welche nach dem Austritt aus dem Zellzyklus von der EGL in die IGL wandern. Dies deutet erneut darauf hin, dass die Tumorentwicklung des Kleinhirns von den Vorläufern der Körnerzellen ausgeht. Damit haben wir eine weitere Bestätigung der Vermutung, dass die GCP als Ursprungszellen des Medulloblastoms vom Shh-Subtyp fungieren.

Auch in der Literatur wird die EGL-Verbreiterung bei der Medulloblastomentstehung sowie das Abstammen Shh-assoziiierter Medulloblastome von den GCP der EGL des Cerebellums aus der oberen Rautenlippe bereits mehrfach beschrieben (Bühren et al. 2000; Matsuo et al. 2013; Schüller et al. 2008; Wechsler-Reya and Scott 1999).

Matsuo et al. (2013) untersuchten ebenfalls Ptch1-deletierte Mäuse und konnten dabei auch zeigen, dass im Kleinhirn dieser Mäuse bereits frühe, morphologische und immunhistochemische Veränderungen festzustellen waren. Sie beschreiben fokale Verbreiterungen der EGL und proliferative Läsionen in diesem Bereich bei Tieren in den ersten Wochen nach Geburt. Diese Bereiche wurden zudem auch immunhistochemisch untersucht und zeigten eine ki67-positive Schicht. Die Zellen des ki67-positiven Fokus erwiesen sich dabei immunhistochemisch und morphologisch als GCPs, jedoch mit einer erhöhten Proliferationsaktivität und Verlust der Fähigkeit zur weiteren neuronalen Differenzierung im Vergleich mit den GCPs der gesunden murinen Cerebella. Wie in der Nestin-Färbung in unserer Arbeit, war die EGL in eine äußere und innere Schicht

unterteilbar. Die GCP mit der erhöhten Proliferationsaktivität befanden sich auch hier in der äußeren, verbreiterten Schicht der EGL. Insgesamt werden in dieser Arbeit von Matsuo et al., 2013 die frühen Veränderungen mit fokaler EGL-Verbreiterung und immunhistochemisch ki67-positivem Fokus als Präneoplasie des Medulloblastoms vom Shh-Subtyp beschrieben. Im weiteren Verlauf zeigte sich die Entwicklung der Präneoplasien zum Medulloblastom. Diese Präneoplasien in der Ptch1-Maus leiteten sich von GCP in der EGL des cerebellären Cortexes her (Matsuo et al. 2013).

Suero-Abreu et al. (2014) untersuchten auch konditional P48-Cre induzierte Ptch1-KO-Mäuse zur frühen Tumordiagnostik mittels MRI-Bildgebung und Histopathologie. Hier konnten sie ebenfalls eine verbreitete, hyperplastische EGL bei den KO-Mäusen mit langanhaltender Persistenz in der Entwicklung des Kleinhirns nachweisen (EGL sollte normalerweise ab pnd 16 nicht mehr nachzuweisen sein, jedoch hier bei den KO-Mäusen bis pnd 21 nachweisbar).

Li et al. beschreiben 2013 und 2016 ebenfalls eine durch Ptch1-Deletion ausgelöste aberrante Aktivierung des Shh-Signalweges in GCP mit der Konsequenz der Medulloblastomentstehung. Daher werden auch hier die Vorläufer der Körnerzelllinie als die Ursprungszellen diskutiert. Zudem konnten Li et al. auch nachweisen, dass nicht durch eine alleinige Ptch1-Deletion in allen GCP eine erhöhte Proliferationsaktivität ausgelöst wird, sondern nur bei einem kleinem Teil, der noch nicht differenzierten GCP, die Proliferation fortgeführt wird und es dann zu einer Tumorentwicklung kommt (Li et al. 2013, 2016).

Yang et al. beschäftigten sich bereits 2008 mit der Frage der Ursprungszelle des Shh-assoziierten Medulloblastoms. Da eine Ptch1-Deletion sowohl bei den GCP als auch bei den multipotenten Stammzellen nachzuweisen war, wurden eine konditionale Ptch1-Deletion der GCP und der Stammzellen durchgeführt und diese Ergebnisse dann miteinander verglichen. Es zeigten sich hier ebenfalls viele Indizien, die für die Vorläufer der Körnerzelllinie als Ursprungszellen sprechen: die Morphologie der Tumorzellen, die Lokalisation an der Kleinhirnoberfläche als Entstehungsort und die Expression der GCP-spezifischen Marker. Bei der konditionalen Ptch1-Deletion in GCP, zeigte sich eine starke Verbreiterung der EGL und es führte zu einer Tumorentwicklung bei allen betroffenen Mäusen. Zudem konnte bei der konditionalen Ptch1-Deletion der Stammzellen keine andere Tumorentwicklung als das Medulloblastom, beispielsweise ein Astrozytom,

festgestellt werden, wodurch gezeigt werden konnte, dass nur die GCP sensitiv auf die Shh-Signalweg-induzierte Medulloblastomentstehung reagieren (Yang et al. 2008).

Insgesamt zeigen sich unsere Ergebnisse im Einklang mit dem aktuellen Wissensstand. Eine EGL-Verbreiterung, vor allem der äußeren Schicht, spricht bei aktuellem Forschungsstand für die Vorläuferzellen der Körnerzelllinie, da diese sich nachgewiesener Maßen hier entwickeln.

Auch die immunhistochemischen Markeranalysen und die Medulloblastom-Histologie, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigen ebenfalls große Gemeinsamkeiten mit den GCP und sprechen in erster Linie für die Körnerzelllinie als Ursprungszellen des Medulloblastoms. Wichtig ist dieses Wissen über die Ursprungszelle des Medulloblastom für viele Punkte in Hinblick auf die weitere Forschung und neue Ansatzpunkte für die therapeutischen Strategien.

4.5 Bedeutung und Ausblick für die Therapie des Medulloblastoms

Ein Ansatzpunkt für die medikamentöse Therapie des Medulloblastoms der Shh/Ptch-Signalweg-assoziierten Subgruppe sind Shh-Inhibitoren. Sie bekommen derzeit eine immer wichtigere klinische Bedeutung. Romer et al. konnten zeigen, dass die Shh-Inhibition u.a. die Zellproliferation hemmt, den Zelltod der Medulloblastomzellen induziert und in der Höchstdosis sogar eine komplette Eradikation des Medulloblastoms hervorruft.

Shh-Inhibitoren sind derzeit in verschiedenen Entwicklungsstadien. Es gibt bereits zugelassene Inhibitoren für die Behandlung von anderen Shh-induzierten Karzinomen, wie das Basalzellkarzinom, und Inhibitoren, die sich in Phase I und II der klinischen Studie befinden (Samkari et al. 2015).

Das Wissen über die Entstehung und den Ursprung des Medulloblastoms ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von neuen Therapiestrategien. Die aktuelle 5-Jahres-Überlebensrate bei entsprechender Therapie beträgt bei Kindern 55-80 %.

4.6 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die konditionale Ptch1-Deletion zur Medulloblastomentstehung vom Shh-Subtyp führt. Die immunhistochemischen Analysen zeigen einen eindeutigen Hinweis, dass es sich bei den Ursprungszellen des Shh-assoziierten Medulloblastoms um die Vorläufer der Körnerzellen (GCP) handelt. Genauso ist auch die morphologische Charakterisierung der Medulloblastome mit eindeutiger EGL-Verbreiterung bei der Ptch1-defizienten Maus, ein weiterer Nachweis, der für die GCP als Ursprungszellen dieser Medulloblastom-Subgruppe spricht.

5 Zusammenfassung

Das Medulloblastom ist ein hochmaligner embryonaler Tumor, der insbesondere im Kindesalter auftritt. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt trotz entsprechender Therapie 55-80 %, weshalb neuere therapeutische Ansätze ein relevantes Forschungsgebiet bilden. Zur Entwicklung von neuen Therapiezielen sind das Wissen und die Identifikation der Ursprungszelle der Tumore sowie das Verständnis der Tumorgenese von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Mausmodells $p48^{+/Cre}$ _Ptch1^{flox/flox} Medulloblastome vom Shh-Subtyp (Shh=Sonic hedgehog) mit p48-cre induziertem, konditionalem Ptch1-knockout (Ptch=Patched) untersucht. Der Rezeptor Ptch1 fungiert dabei als Tumorsuppressorgen und bei dessen Defizienz kommt es zu einer aberranten Aktivierung des Shh/Ptch-Signalwegs.

Es konnte gezeigt werden, dass es bei Ptch1-defizienten Mäusen eine 100%ige Tumorzinzidenz für das Medulloblastom gibt und es unbehandelt immer letal für alle Mäuse endet.

Bereits makroskopisch und auch in der histologischen Übersichtsfärbung waren frühe Veränderungen der Kleinhirne der Knockout-Mäuse im Vergleich zur Wildtyp-Maus deutlich sichtbar. Die unverkennbare Medulloblastomentwicklung zeigte sich durch die eindeutig tumoröse Kleinhirnveränderung.

In der immunhistochemischen und morphologischen Untersuchung bildete die Frage nach der Ursprungszelle des Shh-assoziierten Medulloblastoms das Augenmerk der Arbeit. Mittels immunhistochemischen Analysen der murinen Cerebella konnte durch die Lokalisation und das Verteilungsmuster gezeigt werden, dass die Ursprungszellen des Kleinhirntumors die GCP (GCP=granule cell precursors; Körnerzellvorläufer) sind. Unsere quantitativen bzw. morphologischen Untersuchungen zeigten eine deutliche EGL-Verbreiterung beim Shh-assoziierten Medulloblastom (EGL=external germinal layer; äußere Körnerzellschicht), insbesondere der äußeren EGL-Schicht. Mit Verständnis der embryonalen Entwicklung des Kleinhirns, wissen wir, dass sich hier die GCP entwickeln und aufhalten, weshalb eine EGL-Breitenzunahme beim Medulloblastom des Shh-Subtyps ebenfalls für die GCP als Ursprung der Tumorzellen spricht.

Dieses Wissen ist von großer Bedeutung für neue therapeutische Ansätze. Shh-Inhibitoren sind für diesen Zweck bereits in Erforschung. Auch Ptch-Agonisten oder weitere Signalweg-

spezifische Optionen könnten neue Perspektiven bei der medikamentösen Behandlung von Medulloblastomen der molekulargenetischen Subgruppe Shh darstellen.

Wir haben uns auf die immunhistochemische und quantitative Charakterisierung des konditional Ptch1-defizienten Mausmodells für das Medulloblastom konzentriert. Dieses Mausmodell könnte aber auch für weitere Forschungsthemen von Bedeutung sein: beispielsweise eine qualitative Auswertung oder zur Untersuchung von neuen Therapiemethoden des Shh-assoziierten Medulloblastoms.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Archer, Tenley C., Shyamal D. Weeraratne, and Scott L. Pomeroy. 2012. 'Hedgehog-Gli Pathway in Medulloblastoma'. *Journal of Clinical Oncology* 30:2154–56.
- 2 Atwood, Scott X., Anne Lynn S. Chang, and Anthony E. Oro. 2012. 'Hedgehog Pathway Inhibition and the Race against Tumor Evolution'. *The Journal of Cell Biology* 199:193-97.
- 3 Brasme, Jean François, Martin Chalumeau, François Doz, Brigitte Lacour, Dominique Valteau-Couanet, Stephan Gaillard, Olivier Delalande, Nozar Aghakhani, Christian Sainte-Rose, Stéphanie Puget, and Jacques Grill. 2012. 'Interval between Onset of Symptoms and Diagnosis of Medulloblastoma in Children: Distribution and Determinants in a Population-Based Study'. *European Journal of Pediatrics* 171:25–32.
- 4 Bühren, J., A. H. Christoph, R. Buslei, S. Albrecht, O. D. Wiestler, and T. Pietsch. 2000. 'Expression of the Neurotrophin Receptor P75NTR in Medulloblastomas Is Correlated with Distinct Histological and Clinical Features: Evidence for a Medulloblastoma Subtype Derived from the External Granule Cell Layer'. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 59:229–40.
- 5 Butts, Thomas, Mary J. Green, and Richard J. T. Wingate. 2014. 'Development of the Cerebellum: Simple Steps to Make a "Little Brain"'. *Development* 141(21):4031–41.
- 6 Chen, Yongbin and Jin Jiang. 2013. 'Decoding the Phosphorylation Code in Hedgehog Signal Transduction'. *Cell Research* 23:186–200.
- 7 Cohen Jr., M. Michael. 2010. 'Hedgehog Signaling Update'. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A:1875–1914.
- 8 Cohen, M. Michael. 2003. 'The Hedgehog Signaling Network'. *American Journal of Medical Genetics Part A* 123A:5–28.
- 9 Corrales, JoMichelle D., Sandra Blaess, Eamonn M. Mahoney, and Alexandra L. Joyner. 2006. 'The Level of Sonic Hedgehog Signaling Regulates the Complexity of Cerebellar Foliation'. *Development* 133:1811–21.
- 10 Dahmane, N. and A. Ruiz-i-Altaba. 1999. 'Sonic Hedgehog Regulates the Growth and Patterning of the Cerebellum'. *Development* 126:3089–3100.
- 11 Donkelaar, H. J. ten, M. Lammens, P. Wesseling, H. O. Thijssen, and W. O. Renier.

2003. 'Development and Developmental Disorders of the Human Cerebellum'. *Journal of Neurology* 250:1025–36.
- 12 Duman-Scheel, Molly, Li Weng, Shijie Xin, and Wei Du. 2002. 'Hedgehog Regulates Cell Growth and Proliferation by Inducing Cyclin D and Cyclin E'. *Nature* 417:299–304.
- 13 Ellis, Tammy, Ian Smyth, Emily Riley, Scott Graham, Kate Elliot, Monica Narang, Graham F. Kay, Carol Wicking, and Brandon Wainwright. 2003. 'Patched 1 Conditional Null Allele in Mice'. *Genesis* 36:158–61.
- 14 Fernandes, Marie, Michelle Antoine, and Jean M. Hébert. 2012. 'SMAD4 Is Essential for Generating Subtypes of Neurons during Cerebellar Development'. *Developmental Biology* 365:82–90.
- 15 Fink, Andrew J., Chris Englund, Ray A. M. Daza, Diane Pham, Charmaine Lau, Mary Nivison, Tom Kowalczyk, and Robert F. Hevner. 2006. 'Development of the Deep Cerebellar Nuclei: Transcription Factors and Cell Migration from the Rhombic Lip'. *The Journal of Neuroscience* 26:3066–76.
- 16 Fuccillo, Marc, Alexandra L. Joyner, and Gord Fishell. 2006. 'Morphogen to Mitogen: The Multiple Roles of Hedgehog Signalling in Vertebrate Neural Development'. *Nature Reviews Neuroscience* 7:772–83.
- 17 Gall, David, Céline Roussel, Isabella Susa, Egidio D'Angelo, Paola Rossi, Bertrand Bearzatto, Marie Christine Galas, David Blum, Stéphane Schurmans, and Serge N. Schiffmann. 2003. 'Altered Neuronal Excitability in Cerebellar Granule Cells of Mice Lacking Calretinin'. *Journal of Neuroscience* 23:9320–27.
- 18 Gibson, Paul, Yiai Tong, Giles Robinson, Margaret C. Thompson, D. Spencer Currie, Christopher Eden, Tanya A. Kranenburg, Twala Hogg, Helen Poppleton, Julie Martin, David Finkelstein, Stanley Pounds, Aaron Weiss, Zoltan Patay, Matthew Scoggins, Robert Ogg, Yanxin Pei, Zeng-Jie Yang, Sonja Brun, Youngsoo Lee, Frederique Zindy, Janet C. Lindsey, Makoto M. Taketo, Frederick A. Boop, Robert A. Sanford, Amar Gajjar, Steven C. Clifford, Martine F. Roussel, Peter J. McKinnon, David H. Gutmann, David W. Ellison, Robert Wechsler-Reya, and Richard J. Gilbertson. 2010. 'Subtypes of Medulloblastoma Have Distinct Developmental Origins'. *Nature* 468:1095–99.
- 19 Gilbertson, Richard J. and David W. Ellison. 2008. 'The Origins of Medulloblastoma Subtypes.' *Annual Review of Pathology* 3:341–65.
- 20 Goodrich, L. V. 1997. 'Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse Patched Mutants'. *Science* 277:1109–13.

- 21 Hahn, H., L. Wojnowski, A. M. Zimmer, J. Hall, G. Miller, and A. Zimmer. 1998. 'Rhabdomyosarcomas and Radiation Hypersensitivity in a Mouse Model of Gorlin Syndrome'. *Nature Medicine* 4:619–22.
- 22 Haldipur, Parthiv, Upasna Bharti, Subashika Govindan, Chitra Sarkar, Soumya Iyengar, Pierre Gressens, and Shyamala Mani. 2012. 'Expression of Sonic Hedgehog during Cell Proliferation in the Human Cerebellum'. *Stem Cells and Development* 21:1059–68.
- 23 Hatten, M. E. and N. Heintz. 1995. 'Mechanisms of Neural Patterning and Specification in the Developing Cerebellum.' *Annual Review of Neuroscience* 18:385–408.
- 24 Hatten, Mary E. and Martine F. Roussel. 2011. 'Development and Cancer of the Cerebellum'. *Trends in Neurosciences* 34:134–42.
- 25 Hoshino, Mikio. 2012. 'Neuronal Subtype Specification in the Cerebellum and Dorsal Hindbrain'. *Development, Growth & Differentiation* 54:317–26.
- 26 Hoshino, Mikio, Shoko Nakamura, Kiyoshi Mori, Takeshi Kawauchi, Mami Terao, Yoshiaki V. Nishimura, Akihisa Fukuda, Toshimitsu Fuse, Naoki Matsuo, Masaki Sone, Masahiko Watanabe, Haruhiko Bito, Toshio Terashima, Christopher V. E. Wright, Yoshiya Kawaguchi, Kazuwa Nakao, and Yo-ichi Nabeshima. 2005. 'Ptf1a, a BHLH Transcriptional Gene, Defines GABAergic Neuronal Fates in Cerebellum'. *Neuron* 47:201–13.
- 27 Ingham, Philip W. and Andrew P. McMahon. 2001. 'Hedgehog Signaling in Animal Development: Paradigms and Principles'. *Genes & Development* 15:3059–87.
- 28 Jiang, Xi, Peng Yang, and Lan Ma. 2009. 'Kinase Activity-Independent Regulation of Cyclin Pathway by GRK2 Is Essential for Zebrafish Early Development'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:10183–88.
- 29 Kaplan, E.L. & Meier, Paul. 1958. 'Nonparametric Estimation from Incomplete Observations'. *Journal of the American Statistical Association* 53:457–81.
- 30 Kawakami, Takatoshi, T'Nay Kawcak, Ya-Jun Li, Wanhui Zhang, Yongmei Hu, and Pao-Tien Chuang. 2002. 'Mouse Dispatched Mutants Fail to Distribute Hedgehog Proteins and Are Defective in Hedgehog Signaling'. *Development* 129:5753–65.
- 31 Kool, Marcel, Andrey Korshunov, Marc Remke, David T. W. Jones, Maria Schlanstein, Paul A. Northcott, Yoon Jae Cho, Jan Koster, Antoinette Schouten-Van Meeteren, Dannis Van Vuurden, Steven C. Clifford, Torsten Pietsch, Andre O. Von Bueren, Stefan

- Rutkowski, Martin McCabe, V. Peter Collins, Magnus L. Bäcklund, Christine Haberler, Franck Bourdeaut, Olivier Delattre, Francois Doz, David W. Ellison, Richard J. Gilbertson, Scott L. Pomeroy, Michael D. Taylor, Peter Lichter, and Stefan M. Pfister. 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 Neuropathologica* 123:473–84.
- 32 Kortmann, Rolf-D., Joachim Kühl, Beate Timmermann, Uwe Mittler, Christian Urban, Volker Budach, Eckart Richter, Normann Willich, Michael Flentje, Frank Berthold, Irene Slavc, Johannes Wolff, Christoph Meisner, Otmar Wiestler, Nils Sörensen, Monika Warmuth-Metz, and Michael Bamberg. 2000. 'Postoperative Neoadjuvant Chemotherapy before Radiotherapy as Compared to Immediate Radiotherapy Followed by Maintenance Chemotherapy in the Treatment of Medulloblastoma in Childhood: Results of the German Prospective Randomized Trial Hit '91'. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 46:269–79.
- 33 Kühl, J., H. L. Müller, F. Berthold, R. D. Kortmann, F. Deinlein, E. Maass, N. Graf, A. Gnekow, W. Scheurlen, U. Göbel, J. E. Wolff, M. Bamberg, P. Kaatsch, P. Kleihues, D. Rating, N. Sörensen, and O. D. Wiestler. 1998. 'Preradiation Chemotherapy of Children and Young Adults with Malignant Brain Tumors: Results of the German Pilot Trial HIT'88/'89'. *Klinische Pädiatrie* 210:227–33.
- 34 Li, Peng, Fang Du, Larra W. Yuelling, Tiffany Lin, Renata E. Muradimova, Rossella Tricarico, Jun Wang, Grigori Enikolopov, Alfonso Bellacosa, Robert J. Wechsler-Reya, and Zeng-jie Yang. 2013. 'A Population of Nestin-Expressing Progenitors in the Cerebellum Exhibits Increased Tumorigenicity'. *Nature Neuroscience* 16:1737–44.
- 35 Li, Peng, Eric H. Lee, Fang Du, Renata E. Gordon, Larra W. Yuelling, Yongqiang Liu, Jessica M. Y. Ng, Hao Zhang, Jinhua Wu, Andrey Korshunov, Stefan M. Pfister, Tom Curran, and Zeng-jie Yang. 2016. 'Nestin Mediates Hedgehog Pathway Tumorigenesis'. *Cancer Research* 76:5573–83.
- 36 Livacic, C. Alvarado. 2012. 'Characterization of the Role of RITA and KDM5A as RBP-Jx Interacting Proteins Involved in the Transcriptional Control of Notch Target Genes, and Characterization of the Role of Patched1 Conditional Deletion in Mouse Exocrine Pancreas Development'. Biol. Dissertation, Universität Ulm (2012).
- 37 Louis, David N., Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavenee, Peter C. Burger, Anne Jouvét, Bernd W. Scheithauer, and Paul Kleihues. 2007. 'The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System'. *Acta Neuropathologica* 114:97–109.

- 38 Lumpkin, Ellen A., Tandi Collisson, Preeti Parab, Adil Omer-Abdalla, Henry Haeberle, Ping Chen, Angelika Doetzlhofer, Patricia White, Andrew Groves, Neil Segil, and Jane E. Johnson. 2003. 'Math1-Driven GFP Expression in the Developing Nervous System of Transgenic Mice'. *Gene Expression Patterns* 3:389–95.
- 39 Lundell, T. G., Q. Zhou, and M. I. Doughty. 2009. 'Neurogenin1 Expression in Cell Lineages of the Cerebellar Cortex in Embryonic and Postnatal Mice'. *Developmental Dynamics* 238:3310–25.
- 40 Machold, Rob and Gord Fishell. 2005. 'Math1 Is Expressed in Temporally Discrete Pools of Cerebellar Rhombic-Lip Neural Progenitors'. *Neuron* 48:17–24.
- 41 Marini, Ann M., Kenneth I. Strauss, and David M. Jacobowitz. 1997. 'Calretinin-Containing Neurons in Rat Cerebellar Granule Cell Cultures'. *Brain Research Bulletin* 42:279–88.
- 42 Matsuo, Saori, Miwa Takahashi, Kaoru Inoue, Kei Tamura, Kaoru Irie, Yukio Kodama, Akiyoshi Nishikawa, and Midori Yoshida. 2013. 'Thickened Area of External Granular Layer and Ki-67 Positive Focus Are Early Events of Medulloblastoma in Ptch1+/- Mice'. *Experimental and Toxicologic Pathology* 65:863–73.
- 43 McLendon, Friedman, Fuchs, Kun, and Bigner. 1999. 'Diagnostic Markers in Paediatric Medulloblastoma: A Paediatric Oncology Group Study'. *Histopathology* 34:154–62.
- 44 Meurer, Rosalva Thereza, Daniele Tondolo Martins, Arlete Hilbig, Marlise de Castro Ribeiro, Adriana Vial Roehe, Ligia Maria Barbosa-Coutinho, and Marilda da Cruz Fernandes. 2008. 'Immunohistochemical Expression of Markers Ki-67, Neun, Synaptophysin, P53 and HER2 in Medulloblastoma and Its Correlation with Clinicopathological Parameters'. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 66:385–90.
- 45 Milla, Luis A., Claudio R. Cortes, Christian Hodar Q, Maritza G. Onate, Veronica Cambiazo, Shawn M. Burgess, and Veronica Palma. 2012. 'Yeast-Based Assay Identifies Novel Shh/Gli Target Genes in Vertebrate Development'. *BMC Genomics* 13:2.
- 46 Nakhai, Hassan, Saadettin Sel, Jack Favor, Lidia Mendoza-Torres, Friedrich Paulsen, Gernot I. W. Duncker, and Roland M. Schmid. 2007. 'Ptf1a Is Essential for the Differentiation of GABAergic and Glycinergic Amacrine Cells and Horizontal Cells in the Mouse Retina'. *Development* 134:1151–60.
- 47 Nord, Helena, Susan Pfeifer, Pelle Nilsson, Johanna Sandgren, Svetlana Popova, Bo Strömberg, Irina Alafuzoff, Monica Nistér, and Teresita Díaz de Ståhl. 2012. 'Novel

Amplifications in Pediatric Medulloblastoma Identified by Genome-Wide Copy Number Profiling'. *Journal of Neuro-Oncology* 107:37–49.

- 48 Northcott, Paul A., Andrey Korshunov, Hendrik Witt, Thomas Hielscher, Charles G. Eberhart, Stephen Mack, Eric Bouffet, Steven C. Clifford, Cynthia E. Hawkins, Pim French, James T. Rutka, Stefan Pfister, and Michael D. Taylor. 2011. 'Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants'. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29:1408–14.
- 49 Park, Ae Kyung, Seung-Jun Lee, Ji Hoon Phi, Kyu-Chang Wang, Dong Gyu Kim, Byung-Kyu Cho, Christine Haberler, Sarah Fattet, Christelle Dufour, Stéphanie Puget, Christian Sainte-Rose, Franck Bourdeaut, Jacques Grill, Olivier Delattre, Seung-Ki Kim, and Woong-Yang Park. 2012. 'Prognostic Classification of Pediatric Medulloblastoma Based on Chromosome 17p Loss, Expression of MYCC and MYCN, and Wnt Pathway Activation'. *Neuro-Oncology* 14:203–14.
- 50 Peng, Liang, Jingjing Hu, Shujun Li, Zhongqiu Wang, Bingqing Xia, Bo Jiang, Bingsheng Li, Yu Zhang, Jing Wang, and Xinying Wang. 2013. 'Aberrant Methylation of the PTCH1 Gene Promoter Region in Aberrant Crypt Foci'. *International Journal of Cancer* 132:E18–E25.
- 51 Remke, Marc, Vijay Ramaswamy, John Peacock, David J. H. Shih, Christian Koelsche, Paul A. Northcott, Nadia Hill, Florence M. G. Cavalli, Marcel Kool, Xin Wang, Stephen C. Mack, Mark Barszczyk, A. Sorana Morrissy, Xiaochong Wu, Sameer Agnihotri, Betty Luu, David T. W. Jones, Livia Garzia, Adrian M. Dubuc, Nataliya Zhukova, Robert Vanner, Johan M. Kros, Pim J. French, Erwin G. Van Meir, Rajeev Vibhakar, Karel Zitterbart, Jennifer A. Chan, László Bognár, Almos Klekner, Boleslaw Lach, Shin Jung, Ali G. Saad, Linda M. Liao, Steffen Albrecht, Massimo Zollo, Michael K. Cooper, Reid C. Thompson, Oliver O. Delattre, Franck Bourdeaut, François F. Doz, Miklós Garami, Peter Hauser, Carlos G. Carlotti, Timothy E. Van Meter, Luca Massimi, Daniel Fults, Scott L. Pomeroy, Toshiro Kumabe, Young Shin Ra, Jeffrey R. Leonard, Samer K. Elbabaa, Jaume Mora, Joshua B. Rubin, Yoon Jae Cho, Roger E. McLendon, Darell D. Bigner, Charles G. Eberhart, Maryam Fouladi, Robert J. Wechsler-Reya, Claudia C. Faria, Sidney E. Croul, Annie Huang, Eric Bouffet, Cynthia E. Hawkins, Peter B. Dirks, William A. Weiss, Ulrich Schüller, Ian F. Pollack, Stefan Rutkowski, David Meyronet, Anne Jouvét, Michelle Fèvre-Montange, Nada Jabado, Marta Perek-Polnik, Wiesława A. Grajkowska, Seung Ki Kim, James T. Rutka, David Malkin, Uri Tabori, Stefan M. Pfister, Andrey Korshunov, Andreas Von Deimling, and Michael D. Taylor. 2013. 'TERT Promoter Mutations Are Highly Recurrent in SHH Subgroup Medulloblastoma'. *Acta Neuropathologica* 126:917–29.
- 52 Romer, Justyna T., Hiromichi Kimura, Susan Magdaleno, Ken Sasai, Christine Fuller, Helen Baines, Michele Connelly, Clinton F. Stewart, Stephen Gould, Lee L. Rubin, and Tom Curran. 2004. 'Suppression of the Shh Pathway Using a Small Molecule Inhibitor Eliminates Medulloblastoma in Ptc1+/-p53-/- Mice'. *Cancer Cell* 6:229–40.

- 53 Rossi, Alessandra, Valentina Caracciolo, Giuseppe Russo, Krzysztof Reiss, and Antonio Giordano. 2008. 'Medulloblastoma: From Molecular Pathology to Therapy'. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 14:971–76.
- 54 Samkari, Ayman, Jason White, and Roger Packer. 2015. 'SHH Inhibitors for the Treatment of Medulloblastoma'. *Expert Review of Neurotherapeutics* 1–8.
- 55 Saran, Frank, Brigitta G. Baumert, Antonia L. Creak, Alan P. Warrington, Sue Ashley, Daphne Traish, and Michael Brada. 2008. 'Hypofractionated Stereotactic Radiotherapy in the Management of Recurrent or Residual Medulloblastoma/PNET'. *Pediatric Blood & Cancer* 50:554–560.
- 56 Schüller, Ulrich, Vivi M. Heine, Junhao Mao, Alvin T. Kho, Allison K. Dillon, Young-Goo Han, Emmanuelle Huillard, Tao Sun, Azra H. Ligon, Ying Qian, Qiufu Ma, Arturo Alvarez-Buylla, Andrew P. McMahon, David H. Rowitch, and Keith L. Ligon. 2008. 'Acquisition of Granule Neuron Precursor Identity Is a Critical Determinant of Progenitor Cell Competence to Form Shh-Induced Medulloblastoma'. *Cancer Cell* 14:123–34.
- 57 Sellick, Gabrielle S., Karen T. Barker, Irene Stolte-Dijkstra, Christina Fleischmann, Richard J. Coleman, Christine Garrett, Anna L. Gloyn, Emma L. Edghill, Andrew T. Hattersley, Peter K. Wellauer, Graham Goodwin, and Richard S. Houlston. 2004. 'Mutations in PTF1A Cause Pancreatic and Cerebellar Agenesis.' *Nature Genetics* 36:1301–5.
- 58 Shahi, Mehdi H., Mohammad Afzal, Subrata Sinha, Charles G. Eberhart, Juan A. Rey, Xing Fan, and Javier S. Castresana. 2010. 'Regulation of Sonic Hedgehog-Gli1 Downstream Target Genes PTCH1, Cyclin D2, Plakoglobin, PAX6 and NKX2.2 and Their Epigenetic Status in Medulloblastoma and Astrocytoma'. *BMC Cancer* 10:614.
- 59 Shonka, Nicole, Alba Brandes, and John F. De Groot. 2012. 'Adult Medulloblastoma, from Spongioblastoma Cerebelli to the Present Day: A Review of Treatment and the Integration of Molecular Markers'. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 26:1083–91.
- 60 Stecca, Barbara and Ariel Ruiz I Altaba. 2010. 'Context-Dependent Regulation of the Gli Code in Cancer by Hedgehog and Non-Hedgehog Signals'. *Journal of Molecular Cell Biology* 2:84–95.
- 61 Storm, Robert, Justyna Cholewa-Waclaw, Katja Reuter, Dominique Bröhl, Martin Sieber, Mathias Treier, Thomas Müller, and Carmen Birchmeier. 2009. 'The BHLH

Transcription Factor Olig3 Marks the Dorsal Neuroepithelium of the Hindbrain and Is Essential for the Development of Brainstem Nuclei'. *Development* 136:295–305.

- 62 Suero-Abreu, Giselle A., G. Praveen Raju, Orlando Aristizábal, Eugenia Volkova, Alexandre Wojcinski, Edward J. Houston, Diane Pham, Kamila U. Szulc, Daniel Colon, Alexandra L. Joyner, and Daniel H. Turnbull. 2014. 'In Vivo Mn-Enhanced MRI for Early Tumor Detection and Growth Rate Analysis in a Mouse Medulloblastoma Model'. *Neoplasia* 16:993–1006.
- 63 Taylor, Michael D., Paul A. Northcott, Andrey Korshunov, Marc Remke, Yoon-Jae Cho, Steven C. Clifford, Charles G. Eberhart, D. Williams Parsons, Stefan Rutkowski, Amar Gajjar, David W. Ellison, Peter Lichter, Richard J. Gilbertson, Scott L. Pomeroy, Marcel Kool, and Stefan M. Pfister. 2012. 'Molecular Subgroups of Medulloblastoma: The Current Consensus'. *Acta Neuropathologica* 123:465–72.
- 64 Tukachinsky, Hanna, Ryan P. Kuzmickas, Cindy Y. Jao, Jing Liu, and Adrian Salic. 2012. 'Dispatched and Scube Mediate the Efficient Secretion of the Cholesterol-Modified Hedgehog Ligand'. *Cell Reports* 2:308–20.
- 65 Vaillant, Catherine, Paola Valdivieso, Sandro Nuciforo, Marcel Kool, Alexandra Schwarzentruher-Schauerte, Hélène Méreau, Erik Cabuy, Johannes A. Lobrinus, Stefan Pfister, Aimée Zuniga, Stephan Frank, and Rolf Zeller. 2015. 'Serpine2/PN-1 Is Required for Proliferative Expansion of Pre-Neoplastic Lesions and Malignant Progression to Medulloblastoma'. *PLoS ONE* 10:e0124870.
- 66 Wang, Jun and Robert J. Wechsler-Reya. 2014. 'The Role of Stem Cells and Progenitors in the Genesis of Medulloblastoma'. *Experimental Neurology* 260:69–73.
- 67 Wechsler-Reya, Robert J. and Matthew P. Scott. 1999. 'Control of Neuronal Precursor Proliferation in the Cerebellum by Sonic Hedgehog'. *Neuron* 22:103–14.
- 68 Wechsler-Reya, Robert and Matthew P. Scott. 2001. 'The Developmental Biology of Brain Tumors'. *Annual Review of Neuroscience* 24:385–428.
- 69 Weintraub, Lauren, Todd Miller, Ilana Friedman, Rick Abbott, and Adam S. Levy. 2013. 'Misdiagnosing Recurrent Medulloblastoma: The Danger of Examination and Imaging without Histological Confirmation'. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 13:33–37.
- 70 Weyer, Anja and Karl Schilling. 2003. 'Developmental and Cell Type-Specific Expression of the Neuronal Marker NeuN in the Murine Cerebellum'. *Journal of Neuroscience Research* 73:400–409.

- 71 Wu, Xiaochong, Paul A. Northcott, Sidney Croul, and Michael D. Taylor. 2011. 'Mouse Models of Medulloblastoma'. *Chinese Journal of Cancer* 30:442–49.
- 72 Yang, Zeng-Jie, Tammy Ellis, Shirley L. Markant, Tracy-Ann Read, Jessica D. Kessler, Melissa Bourboulas, Ulrich Schüller, Robert Machold, Gord Fishell, David H. Rowitch, Brandon J. Wainwright, and Robert J. Wechsler-Reya. 2008. 'Medulloblastoma Can Be Initiated by Deletion of Patched in Lineage-Restricted Progenitors or Stem Cells'. *Cancer Cell* 14:135–45.
- 73 Zeltzer, Paul M., James M. Boyett, Jonathan L. Finlay, A. LeI Albright, Lucy B. Rorke, Jerrold M. Milstein, Jeffrey C. Allen, Kenneth R. Stevens, Philip Stanley, Hao Li, Jeffrey H. Wisoff, J. Russell Geyer, Patsy McGuire-Cullen, James A. Stehbens, Susan B. Shurin, and Roger J. Packer. 1999. 'Metastasis Stage, Adjuvant Treatment, and Residual Tumor Are Prognostic Factors for Medulloblastoma in Children: Conclusions From the Children's Cancer Group 921 Randomized Phase III Study'. *Journal of Clinical Oncology* 17:832–832.
- 74 Zhang, Chenlu, Zhongzhong Ji, Minglei Wang, Weiwei Zhang, Rong Yang, Huanping An, Ru Yang, Daan van Abel, Marie van Dijk, Xiaohang Yang, Guangshuo Ou, Helen He Zhu, and Wei-Qiang Gao. 2016. 'Stox1 as a Novel Transcriptional Suppressor of Math1 during Cerebellar Granule Neurogenesis and Medulloblastoma Formation'. *Cell Death & Differentiation* 23:2042–53.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Schematische Darstellung der Kleinhirnentwicklung	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der Schichtung des noch unreifen cerebellären Kortex .	3
Abb. 3: Schematische Darstellung des 3-schichtigen Cortex des reifen Cerebellums	3
Abb. 4: Craniale Computertomographie, axial, ohne Kontrastmittel	5
Abb. 5: Molekulare Subgruppen des Medulloblastoms	6
Abb. 6: Schematische Darstellung des Shh/Ptch-Signalwegs	9
Abb. 7: Genotypisierung der Tiere an pnd 12.5	24
Abb. 8: Darstellung der PCR	25
Abb. 9: Deletion von Exon 8 und Exon 9 im Patched1 Gen durch die Cre-Rekombinase ...	26
Abb. 10: Überlebenskurve der p48 ^{+cre} _Ptch1 ^{flox/flox} Maus.....	27
Abb. 11: Makroskopie des Medulloblastoms	28
Abb. 12: Makroskopie des Medulloblastoms	28
Abb. 13: Makroskopie des Medulloblastoms an pnd 72	29
Abb. 14: MRT in T2-Wichtung eines Ptch1-defizienten Tieres an pnd 72.....	29
Abb. 15: Sagittalschnitt des Kleinhirns der Wildtyp- und Knockout-Maus an pnd 0	30
Abb. 16: Sagittalschnitt des Kleinhirns der Wildtyp- und Knockout-Maus an pnd 7	31
Abb. 17: H.E.-Färbung von Wildtyp- und Knockout-Mäusen im Alter von pnd 10	31
Abb. 18: Sagittalschnitt des Cerebellums der Wildtyp- und Knockout-Mäuse an pnd 21 ..	32
Abb. 19: Kleinhirnhistologie im Vergleich.....	32
Abb. 20: Analyse der Expression des Zellproliferationsmarkers ki67 zum Zeitpunkt pnd 0	34
Abb. 21: Analyse der Expression des Zellproliferationsmarkers ki67 zum Zeitpunkt pnd 7	35
Abb. 22: Analyse der Expression des Zellproliferationsmarkers ki67 zum Zeitpunkt pnd 10	35
Abb. 23: Analyse der Expression des Zellproliferationsmarkers ki67 zum Zeitpunkt pnd 21	35
Abb. 24: Analyse der Expression von NeuN als Marker für reife Nervenzellen zum Zeitpunkt pnd 0	36
Abb. 25: Analyse der Expression von NeuN als Marker für reife Nervenzellen zum Zeitpunkt pnd 7.....	37

Abb. 26: Analyse der Expression von NeuN als Marker für reife Nervenzellen zum Zeitpunkt pnd 10.....	37
Abb. 27: Analyse der Expression von Nestin als Marker für Sz des ZNS zum Zeitpunkt pnd 0	38
Abb. 28: Analyse der Expression von Nestin als Marker für Sz des ZNS zum Zeitpunkt pnd 7	38
Abb. 29: Analyse der Expression von Nestin als Marker für Sz des ZNS zum Zeitpunkt pnd 10	39
Abb. 30: Analyse der Expression von Nestin als Marker für Sz des ZNS zum Zeitpunkt pnd 21	39
Abb. 31: Analyse der Expression von Calretinin als Marker für Körnerzellen zum Zeitpunkt pnd 0.....	40
Abb. 32: Analyse der Expression von Calretinin als Marker für Körnerzellen zum Zeitpunkt pnd 7.....	40
Abb. 33: Analyse der Expression von Calretinin als Marker für Körnerzellen zum Zeitpunkt pnd 21.....	41
Abb. 34: Analyse der Expression von Calbindin als Marker für Purkinjezellen zum Zeitpunkt pnd 0.....	42
Abb. 35: Analyse der Expression von Calbindin als Marker für Purkinjezellen zum Zeitpunkt pnd 7.....	42
Abb. 36: Analyse der Expression von Calbindin als Marker für Purkinjezellen zum Zeitpunkt pnd 10.....	43
Abb. 37: Analyse der Expression von Calbindin als Marker für Purkinjezellen zum Zeitpunkt pnd 21.....	43
Abb. 38: Schematische Darstellung eines mäuseichen Cerebellums (wie etwa an pnd 10)	45
Abb. 39: Schematische Darstellung des unreifen cerebellären Kortex.....	45
Abb. 40: Breite der ki67-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 0 ...	47
Abb. 41: Breite der ki67-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 7 ...	47
Abb. 42: Breite der NeuN-positiven Schicht der EGL bei Tieren im Alter von pnd 7	48
Abb. 43: Breite der ki67-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 10.	48
Abb. 44: Breite der NeuN-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 10	49

Abb. 45: Breite der Nestin-Proliferationsschicht in der EGL bei Tieren im Alter von pnd 10	49
Abb. 46: Vergleich EGL- und ML-Schicht bei der Nestin-Färbung von Wildtyp- und Knockout-Mäusen an pnd 10.....	50

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer	15
Tab. 2: Primär-Antikörper	15
Tab. 3: Sekundär-Antikörper.....	16
Tab. 4: Übersicht der untersuchten Tiere	33
Tab. 5: Übersicht der immunhistochemischen Marker	33
Tab. 6: Übersicht der Anzahl analysierter Mäuse bzw. Kleinhirne	44

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Wagner für die Überlassung des Themas, die wertvolle Unterstützung sowie die Betreuung und Erstbetrachtung der Arbeit bedanken.

Herrn PD Dr. Bernd Baumann danke ich für die Bereitschaft, die Zweitbegutachtung der Dissertation zu übernehmen. Ebenfalls möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Franz Oswald und Herrn PD Dr. Frank Rücker für die Übernahme des Wahlprüfamtens danken.

Uschi Möhnle und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die Hilfestellung und Betreuung bei den Laborarbeiten.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Freunden für die vielen Ratschläge, Tipps und motivierenden Worte.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern Ayşe und Ramazan sowie meinem Bruder Onur, die mit ihrer bedingungslosen und moralischen Unterstützung immer für mich da sind.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.