

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung des Wnt/Wingless Tumorsuppressorgens *WTX*
im Medulloblastom und im Kleinhirn

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eve Kristin Wenzl
aus Berlin

Datum der Promotion: 5. Juni 2016

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VII
Abstract	IX
1 Einleitung	1
1.1 Das Medulloblastom	1
1.2 Medulloblastome der Wnt-Gruppe - klinische Besonderheiten und Diagnostik	5
1.3 Der Wnt-Signalweg - Bedeutung und Ablauf.....	5
1.4 Das <i>WTX</i> -Gen	10
1.5 Kleinhirnentwicklung und Bedeutung des Wnt-Signalwegs auf die zerebelläre Genese	11
2 Zielsetzung	13
3 Material	15
4 Methoden	19
4.1 Untersuchungskollektiv	19
4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion	23
4.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
4.4 RNA-Isolation.....	26
4.5 DNase-Verdau.....	28
4.6 Messung von Nukleinsäuren.....	28
4.7 Reverse Transkription - Synthese von cDNA.....	28
4.8 Real-Time PCR.....	30
4.9 Mutationssuche mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse..	34
4.10 Färbung der Polyacrylamid-Gele zur SSCP-Analyse	37

4.11 Sequenzierung.....	38
4.12 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	38
4.13 Zellkultur.....	41
4.14 Stimulation mit Wnt3a	43
4.15 Transfektion	44
5 Ergebnisse	47
5.1 Nachweis von somatischen <i>WTX</i> -Mutationen im Medulloblastom.....	47
5.2 Expressionsanalyse von <i>WTX</i> in Medulloblastomen - Expressionsunterschiede zwischen Tumor und Kontrollgewebe	51
5.3 Bedeutung der detektierten <i>WTX</i> -Mutationen sowie Varianzen des <i>WTX</i> -Transkripts für die Wnt-Signaltransduktion in Medulloblastomen	55
5.4 <i>mWtx</i> -Expression in der postnatalen Entwicklung des murinen Kleinhirns - deutliche Hochregulation von <i>mWtx</i> im frühen postnatalen Stadium.....	57
5.5 <i>mWtx</i> -Aktivität während der murinen Kleinhirngenesese - <i>mWtx</i> -Expression zeigt sich stark erhöht im frühen postnatalen Stadium in EGL, IGL sowie der Purkinjezellschicht.....	59
5.6 Tumorzelllinien mit aktivierter Wnt-Transduktion zeigen eine Überexpression von <i>WTX</i>	61
5.7 Aktivierung der Wnt-Signalkaskade in Medulloblastomzellen führt zu keinem signifikanten Expressionsunterschied des <i>WTX</i> -Transkripts	62
5.8 Keine Regulation des <i>WTX</i> -Transkripts nach Inhibition der Wnt-Signalkaskade durch dominant-negatives <i>TCF-4</i> in Zellen des hepatozellulären Karzinoms.....	63
6 Diskussion	65
6.1 Mutationsanalyse des Wilms Tumor Suppressor Gens <i>WTX</i> in Medulloblastomen	65

6.2	<i>WTX</i> -Expression im Kleinhirn und im Medulloblastom	68
6.3	Expressionsunterschiede des <i>WTX</i> -Gens in Tumorzelllinien unterschiedlicher Wnt-Aktivitätszustände.....	69
6.4	Die Regulation von <i>Wtx</i> im murinen Kleinhirn während der postnatalen Entwicklung	71
7	Literaturverzeichnis	75
8	Abkürzungen	87
	Eidesstattliche Versicherung	XI
	Curriculum vitae	XIII
	Komplette Publikationsliste	XV
	Danksagung	XVII

Zusammenfassung

Das Medulloblastom (MB) ist ein hochmaligner embryonaler Tumor des zentralen Nervensystems und stellt den häufigsten malignen Hirntumor im Kindesalter dar. Sowohl morphologisch als auch molekulargenetisch kann das Medulloblastom in verschiedene Subgruppen unterteilt werden. Eine dieser Untergruppen, die sogenannten Wnt-Medulloblastome, ist durch eine pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs charakterisiert. Dieser Wnt-Entwicklungskontrollsignalweg ist u.a. für die Embryogenese des Kleinhirns essentiell und kann bei pathologischer Aktivierung die Entstehung verschiedener epithelialer, mesenchymaler und neuraler Tumore auslösen. Das Wilms Tumorsuppressorgen *WTX* kodiert für eine wesentliche, negativ regulierende Komponente dieses Entwicklungskontrollsignalwegs. Ziel dieser Arbeit war es nachzuweisen, ob sich in Medulloblastomen genetische Veränderungen wie somatische Mutationen oder Expressionsunterschiede im Wilms Tumorsuppressorgen detektieren lassen, die möglicherweise für die pathologische Wnt-Aktivierung im Medulloblastom verantwortlich sind.

Mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus- (SSCP) und Sequenzierungs-Analyse konnten in einem Kollektiv von 67 humanen Medulloblastomen und 5 Medulloblastomzelllinien in 3 Proben somatische Mutationen im *WTX*-Gen nachgewiesen werden, die größtenteils zu einer pathologischen Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen, was die funktionelle Relevanz dieser somatischen Mutationen untermauert.

Zum Nachweis einer möglichen Regulierung von *WTX* im Medulloblastom wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse von *WTX* in 43 MB sowie 5 MB Zelllinien durchgeführt. Im Vergleich zu adultem Kleinhirngewebe konnte in Medulloblastomen eine signifikante *WTX*-Überexpression beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich die *WTX*-Expression im Medulloblastom verglichen mit fetalem Kleinhirngewebe vermindert; dies könnte auf eine mögliche Beteiligung von *WTX* innerhalb der Entwicklung des Kleinhirns hinweisen.

Weitere Expressionsanalysen an fetalen und postnatalen Kleinhirnproben unterschiedlichen Alters sowie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen an murinem Kleinhirn unterschiedlicher Entwicklungsstadien belegten die Regulation von *WTX* während der Kleinhirnentwicklung und somit auch den Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die zerebelläre Genese.

Anhand von Wnt-aktivierten/inaktivierten humanen Tumorzelllinien konnte darüber hinaus funktionell nachgewiesen werden, dass die Expression von *WTX* mit der Wnt-Aktivität korreliert. So kann *Wtx* als indirekter Marker für den Wnt-Aktivitätszustand in der Tumorzelle betrachtet werden.

Zusammenfassend konnten in Medulloblastomen somatische *WTX*-Mutationen detektiert werden, die zu einer funktionellen Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Medulloblastom führen. Die gesteigerte *WTX*-Expression in fetalem Kleinhirngewebe sowie in Wnt-aktiven Zellen unterstreicht *WTX* als indirekten Marker der Wnt-Aktivität während der zerebellären Genese und in Tumorzellen. Postnatal konnte die *WTX*-Expression bzw. die Wnt-Aktivität einer spezifischen Phase des sich entwickelnden Kleinhirns zugeordnet werden.

Entgegen vereinzelter Studien, ist das *WTX*/Wnt-Signal nicht nur auf die Purkinjezellen der ventrikulären Zone beschränkt, sondern auch in granulären Zellen mit Ursprung der rhombischen Lippe, einem gemutmaßtem Zentrum der Medulloblastom-Entstehung, zu detektieren.

Abstract

Medulloblastoma (MB) represents the most frequent malignant brain tumor of childhood. It is morphologically and molecularly divided into different subgroups. One of them, the so-called Wnt group is characterized by a pathological activation of the Wnt signaling pathway. The Wnt pathway controls development and is essential in the cerebellar embryogenesis. Its pathological activation can cause diverse epithelial, mesenchymal and neural tumors. Previous genetic studies in MBs have identified mutations in genes coding for *β-CATENIN*, *AXIN1* and *CONDUCTIN (AXIN2)*, which cause activation of the Wnt signaling pathway in about 10 to 15% of medulloblastoma. The Wnt signaling pathway is negatively controlled by the Wilms tumor suppressor gene *WTX*, a component of this signaling complex. The aim of this study was to investigate genetic alteration in Wilms Tumor Suppressor Gene which could activate the Wnt signaling pathway pathologically.

A mutational screening of the *WTX* gene in 67 MB biopsy samples and 5 MB cell lines using single-strand conformation polymorphism and sequencing analysis should illuminate whether alterations in *WTX* may also be involved in the pathogenesis of sporadic MBs. Beside two MBs with a rare *WTX* single nucleotide polymorphism, three somatic mutations of the *WTX* gene were identified in three different MBs. Mostly, the somatic mutations shows a functional relevance by inducing the pathological activation of Wnt pathway.

A quantitative expression analysis of the tumor suppressor *WTX* in 43 MBs and 5 MB cell lines was initially performed to clarify a possible regulation of *WTX* expression in medulloblastoma. Apart from a few expression alterations of *WTX* in between the MB, the analysis revealed significant over-expression of *WTX* mRNA in MB compared to adult cerebellar tissue. Interestingly, when compared to fetal cerebellar tissue of different embryonic ages, *WTX* is down-regulated in medulloblastoma. These results could indicate a possible involvement of *WTX* during cerebellar development. Further postnatal expression analyses in fetal and postnatal cerebellum of different ages and fluorescence in situ hybridization of murine cerebellum substantiate the regulation of *WTX* in cerebellar development and, consequently, the influence of Wnt signaling pathway on the cerebellar genesis. Moreover, wild-type *WTX* was found to be over-expressed in tumor cell lines in

which the Wnt signaling pathway is activated by mutations in β -*CATENIN*. Therefore the activation state of Wnt signaling in tumor cells can be defined indirectly by Wtx.

Our findings indicate that a subset of MBs reveal mutations in the *WTX* tumor suppressor gene, which cause a functional activation of Wnt signaling. The up-regulation of *WTX* in fetal cerebellar tissue and in Wnt-activated tumor cells suggests that *WTX* could be a potential marker within tissue in which the Wnt signaling pathway is activated but *WTX* seems not to be a direct target gene of the Wnt pathway. The activity of *WTX* and Wnt could be related to a specific postnatal stage of cerebellar development. In contrary to several studies, the *WTX/Wnt* signal is not only restricted to the Purkinje cells of the ventricular zone, but also detectable in granular cells of the rhombic lip, a presumed pathogenetic origin of the medulloblastoma.

1 Einleitung

1.1 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom (MB) ist ein hochmaligner primitiv neuroektodermaler Tumor des zentralen Nervensystems (ZNS). Gemäß der Klassifikation der World Health Organization (WHO) für zentralnervöse Tumore wird das Medulloblastom den embryonalen Tumoren zugeordnet [1]. Mit ca. 25% aller intrakraniellen pädiatrischen Tumoren stellt das Medulloblastom den häufigsten malignen Hirntumor im Kindesalter dar. Das Auftreten schließt Erwachsene mit ein, wobei 70% aller Patienten mit MB jünger als 16 Jahre sind, der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 2. und 9. Lebensjahr [2, 3].

Klinisch präsentiert sich das Medulloblastom häufig primär mit Zeichen der intrakraniellen Drucksteigerung wie Kopfschmerz, Stauungspapille und Emesis bei Nüchternheit. Je nach Sitz und Ausbreitung des Tumors sind Lokalsymptome zu beobachten. Seitenbetonte Medulloblastome zeigen mit gangbetonter Ataxie, Intentionstremor sowie einer skandierenden Sprache zunächst spinozerebelläre Symptome. Von der Mittellinie ausgehende Raumforderungen sind durch rasch auftretende okklusive Liquorzirkulationsstörungen und resultierende Hirndrucksymptome charakterisiert. Auch okulomotorische Störungen sowie Paresen des IV. und VI. Hirnnerven können beobachtet werden. In der Bildgebung stellt sich das Medulloblastom typischerweise als solide Raumforderung mit starker Kontrastmittelaufnahme dar (Abb. 1.1a).

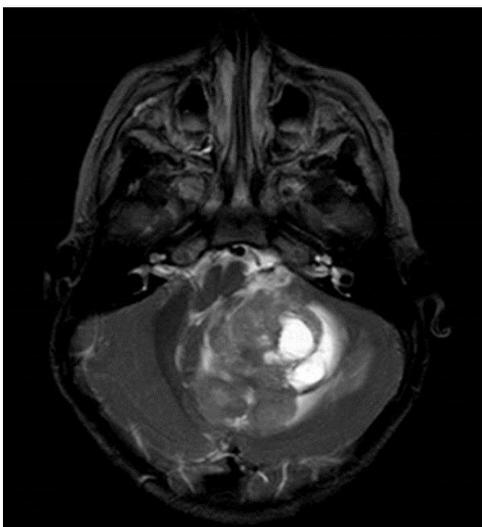


Abb. 1.1a Medulloblastom in der Magnetresonanztomographie, T2-Wichtung

Die makroskopische Struktur des Tumors divergiert stark von derb und gut abgrenzbar bis weich ohne definierte Grenzen [1, 4]. Mikroskopisch besteht das Medulloblastom aus undifferenzierten primitiv neuroektodermalen Zellen und charakterisiert sich als klein-, rund- und blauzelliger, mitunter nodulär imponierender Tumor mit hoher Proliferationsaktivität. Entsprechend der WHO-Klassifikation wird das Medulloblastom den Grad IV Tumoren zugeordnet und histopathologisch ein klassischer Typ von weiteren Varianten abgegrenzt: desmoplastisch, MB mit extensiver Nodularität, anaplastisch sowie großzellig [1]. Beim klassischen Medulloblastom finden sich zytoplasmaarme Zellen mit hyperchromatischen Kernen, vielen Apoptosen und Mitosen. Typisch sind neuroblastäre Rosetten, die sogenannten Homer-Wright-Rosetten (Abb. 1.1b). Der desmoplastische Subtyp zeigt Retikulinfaser-freie zellarme Noduli mit beginnender neuronaler Differenzierung, die umgeben von zelldichten, retikulinfaserreichen Tumoranteilen sind. Letztere haben eine gesteigerte mitotische und proliferative Aktivität. Die extensive Nodularität hat eine traubenähnliche Bildgebung. Das großzellige Medulloblastom zeichnet sich durch große Tumorzellen mit stark eosinophilem Zytoplasma und prominenten Nukleolen aus und tritt häufig als Mischform mit dem anaplastischen mitose- und apoptosereichen Subtyp auf (Abb. 1.1b) [1].

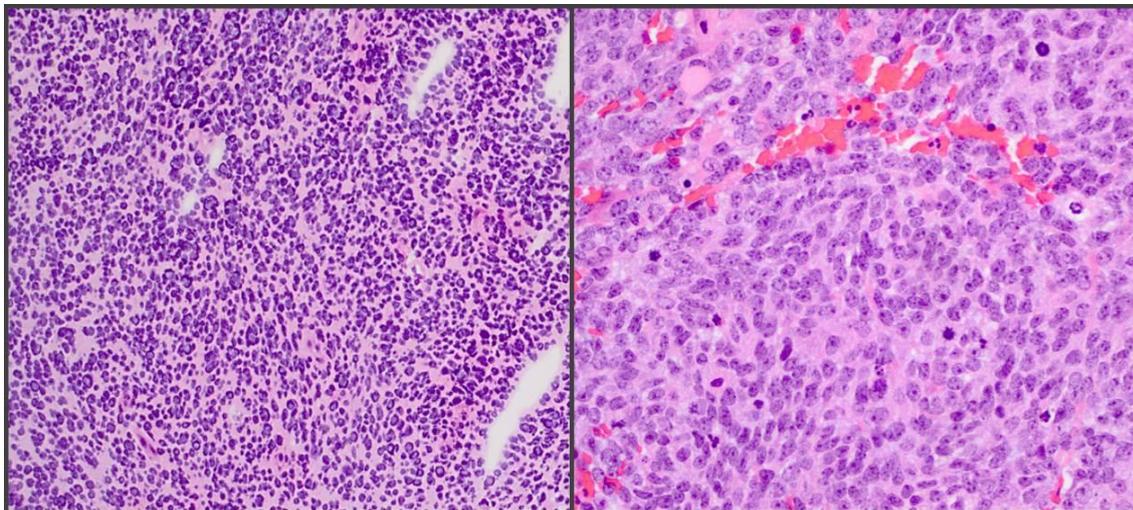


Abb. 1.1b Mikroskopische Varianten des Medulloblastoms, Hämatoxylin-Eosin-Färbung; links klassisches MB (4x), rechts großzelliges MB (10x)

Die Ätiologie des Medulloblastoms ist weitestgehend unbekannt. Medulloblastome treten zumeist sporadisch auf. Aber auch familiäre Syndrome wie Ataxia-telangiectasia, Rubinstein-Taybi Syndrom, Gorlin Syndrom, Li-Fraumeni Syndrom und das Turcot Syndrom sind mit einer erhöhten Inzidenz des Medulloblastoms assoziiert. Beim autosomal-dominanten Turcot-

Syndrom liegt eine Keimbahnmutation des *APC*-Gens zugrunde, welches ebenso Bestandteil des Wnt-Signalwegs (wingless type MMTV integration site) ist. Klinisch wird es durch die Kombination von Adenomatosis polyposis coli (APC) und einem Tumor des ZNS gekennzeichnet [5, 6].

Moderne Technologien wie genomweite Expressions- und epigenetische Analysen oder CGH-Untersuchungen (komparative genomische Hybridisierung) belegen neben der bekannten histologischen Einteilung des Medulloblastoms nun auch eine Heterogenität auf molekularer Ebene. Genetische Veränderungen in Schlüsselmolekülen onkogener Signalwege führen zur Genese des Medulloblastoms. Diese molekulargenetischen Subgruppen werden durch spezifische Gensignaturen sowie klinikopathologische Eigenschaften charakterisiert. Aktuell sind verschiedene Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen wie *APC*, *CTNNB1* (β -*CATENIN*), *PTCH1/2* bekannt, die in den molekularen Untergruppen des Medulloblastoms eine Rolle spielen und somit auch Einfluss auf Diagnose, Prognose und Prädiktion des Medulloblastoms haben. Die neuen Erkenntnisse deuten auf unterschiedliche Ursprungszellen und Stadien der neuronalen Entwicklung hin [7-10].

Eigenschaften		Molekulare Subgruppen des Medulloblastoms			
		WNT	SHH	Gruppe 3	Gruppe 4
Demographie	Alter	Kind>Erw.	Säugling/Erw.>Kind	Kind>Säugling	Kind>Säugling/Erw.
	Geschlecht	1:1	1:1	m>w	m>w
Klinik	Histologie	klassisch, selten LCA	desmoplastisch/nodulär, klassisch, LCA	klassisch, LCA	klassisch, LCA
	Mx	sehr selten	selten	sehr häufig	häufig
	Prognose	sehr gut	Säugling gut, andere intermediär	schlecht	intermediär
Genetik		6- Monosomie <i>CTNNB1</i> Mutation	3q+ 9q- 10q- <i>PTCH1/SMO/SUFU</i> Mutation <i>GLI2</i> Amplifikation <i>MYCN</i> Amplifikation	7+ 1q+ 17q+ 18q+ 8-11p- 5q- 10q-16q- i17q <i>MYC</i> Amplifikation	7+ 17q+ 18q+ 8-11p- i17q X- <i>CDK6</i> Amplifikation <i>MYCN</i> Amplifikation
Genexpression		Wnt Signalweg <i>MYC</i> +	SHH Signalweg <i>MYCN</i> +	Photorezeptor/ GABAerg <i>MYC</i> +++	neuronal/glutaminerg minimal <i>MYC/MYCN</i>

Tab. 1.1 Molekulare Subgruppen des Medulloblastoms – aktueller Konsensus, modifiziert nach [11]; SHH – Sonic Hedgehog; Erw. – Erwachsene; m – männlich; w – weiblich; LCA – großzellig/ anaplastisches MB; Mx- Metastasen; + chromosomaler Gewinn, - chromosomaler Verlust, i Isochromosom

Tab. 1.1 zeigt die aktuell definierten 4 molekularen Subgruppen: Gruppe 1 beschreibt die Wntless Gruppe (Wnt), Gruppe 2 die Sonic hedgehog Gruppe (Shh) und Gruppe 3 und 4 verschiedene molekulare Profile mit signifikanten Merkmalen von Demographie, Klinik und Metastasierungsverhalten sowie Prognose. Sie ermöglichen gezielte subgruppenspezifische Therapieregimen. So erhalten Patienten mit Medulloblastomen der Wnt-Gruppe ein weniger belastendes Bestrahlungsprotokoll als Patienten, die an einem MB der Gruppe 3 oder 4 erkrankt sind.

Medulloblastome mit SHH-Signatur sind zumeist desmoplastisch und entstehen vermutlich aus primitiven pluripotenten Vorläuferzellen der äußeren Körnerzellschicht des Kleinhirns. Der Hedgehog-Signalweg reguliert ihre Proliferation während der neonatalen Entwicklung des Kleinhirns [12-15]. 10-20% der (sporadischen) Medulloblastome werden der Wnt-Gruppe zugeordnet und zeigen eine Aktivierung des kanonischen Wnt sowie TGF- β Signalwegs (transforming growth factor β) [8, 16-18]. Hier finden sich überwiegend klassische Medulloblastome. Ursprung der Wnt-Medulloblastome sind wahrscheinlich Zellen der unteren rhombischen Lippe und des Hirnstamms [19]. Über die Medulloblastome der Gruppe 3 und 4 ist bislang weniger bekannt, sie stellen 60% aller Medulloblastome dar und werden in der Literatur vereinzelt als Non-Wnt/Shh-Medulloblastome bezeichnet. Ihre Subgruppenspezifikationen unterscheiden sich jedoch klar von denen der Gruppe 1 und 2, da sie durch eine hohe Metastasierungsrate und eine sehr schlechte Prognose (insbesondere Gruppe 3) charakterisiert sind.

In Deutschland erfolgt die Therapie des Medulloblastoms gemäß des HIT-Studienprotokolls der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). Einer primären chirurgischen Tumorentfernung folgt die kraniospinale Radiatio für Kinder über 3-5 Jahren. Adjuvant findet eine Chemotherapie bestehend aus Lomustine, Vincristin und Cisplatin statt. In den 1980er Jahren lag die Zehnjahres-Überlebensrate international zwischen 40 und 60%, bei der multizentrisch angelegten HIT'91 lag das 3-Jahres-progressionsfreie Überleben bereits bei 79%. Neben der Mortalität sind Spätfolgen der Therapie einer in der Kindheit auftretenden Erkrankung von großer Bedeutung. Prognostisch relevante Marker zur Therapiestratifizierung sowie der Einsatz spezifischer Wirkstoffe, die zielgerichtet Tumor-assoziierte Signalwege beeinflussen können, sollen maßgeblich zur Therapieoptimierung beitragen [3].

1.2 Medulloblastome der Wnt-Gruppe - klinische Besonderheiten und Diagnostik

Medulloblastome der molekularen Wnt-Gruppe haben mit Langzeitüberlebensraten von über 90% die beste Prognose [11, 20, 21]. Genetische Alterationen des *APC*- und *CTNNB1*-Gens aktivieren den Wnt-Signalweg und führten zur Namensgebung „Medulloblastome der Wnt-Gruppe“. Weiterhin ist die Monosomie 6 ausschließlich innerhalb der Wnt-Gruppe vorzufinden [9, 11]. Histopathologisch sind MBs der Wnt-Gruppe überwiegend dem klassischen Typ, selten dem großzellig/anaplastischen zuzuordnen. In der Diagnostik werden neben histologischen Kriterien der WHO die nukleäre Immunpositivität von β -Catenin und Mutationsanalysen im Exon 3 des β -*CATENIN*-Gens sowie FISH-Analysen (Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung) zum Nachweis einer Monosomie 6 eingesetzt. Die primäre Metastasierungsrate ist sehr niedrig. Während in anderen molekularen Gruppen die Tendenz zum männlichen Geschlecht beschrieben wird, ist die Geschlechterverteilung bei Wnt-Tumoren 1:1 mit leichter Tendenz zum weiblichen Geschlecht. MBs der Wnt-Gruppe werden vorwiegend bei älteren Kindern und jungen Erwachsenen diagnostiziert [11]. Aktuell erfolgt die Therapie nach allgemeiner HIT-Leitlinie, ein spezifisches Protokoll der Wnt-Gruppe ist derzeit in Planung. Die höhere Überlebensrate der Wnt-Gruppe erklärt das Ziel einer Therapiereduktion, um Spät- bzw. Folgeschäden von Radiatio und Chemotherapie zu minimieren. Bei diesem Ansatz einer zielgerichteten Therapie spielt die molekulare Diagnostik des Medulloblastoms eine große Rolle und könnte einen hohen prädiktiven Wert für den Patienten darstellen [7, 9-11, 21].

1.3 Der Wnt-Signalweg - Bedeutung und Ablauf

Erste Erkenntnisse über den Wnt-Signalweg wurden in den 1970er/80er Jahren gemacht, als das *wingless*-Gen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sowie sein Homolog in der Maus, das Protoonkogen *Int-1* mit Schlüsselfunktion in der Embryogenese beschrieben wurden [22, 23]. Im letzten Jahrzehnt wurde die Familie der Wnt-Gene „vervollständigt“ und ihr herausragender Einfluss auf Zelldifferenzierung, Segmentierung sowie Proliferation und Motilität im embryonalen und adulten Organismus verstanden [24]. Bereits die entwicklungs-geschichtlich hohe Konservierung der Wnt-Signalkaskade weist auf ihre wesentliche Bedeutung hin. Mittels Modulierung der Genexpression wird eine Balance zwischen

Proliferation und Differenzierung sowie Apoptose realisiert. Dies und die Steuerung der interzellulären Kommunikation ermöglichen eine koordinierte Gewebsorganisation [25-30]. In den Genomen von Mensch und Maus wurden bereits jeweils 19 Wnt-Gene identifiziert, eine Übersicht hierzu findet sich auf www.stanford.edu [31]. Die Familie der Wnt-Gene kodiert für eine Gruppe von 300 bis 400 Aminosäuren langen Glykoproteinen, die von der produzierenden Zelle sezerniert werden und durch Interaktion spezifischer Rezeptoren die weitere Differenzierung der Zelle bestimmt. Die Bindung erfolgt an 7-Helix-G-Proteingekoppelten Rezeptoren der Frizzled-Familie und/oder LDL-Rezeptor-verwandten Proteinen 5 und 6 (LRP-5/6) als Corezeptor [32, 33]. Klassisch wird bis dato der Effekt der Wnt-Proteine in einen kanonischen Wnt-/ β -Catenin Signalweg und die nicht-kanonischen Signalkaskaden, zu denen der PCP-Signalweg und der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg gehören, unterteilt. Die Kombination des jeweiligen extrazellulären Wnt-Proteins und des spezifischen Rezeptors aus der Frizzled-Familie an der Zelloberfläche bestimmt, welcher Signalweg induziert wird [30, 34]. Weitere Wnt-Signalkaskaden sind nicht auszuschließen [35]. Entsprechend seiner nachgewiesenen Rolle innerhalb der Medulloblastomentstehung wird in dieser Arbeit der kanonische Wnt-Signalweg betrachtet und im Folgenden der Bezeichnung „Wnt-Signalweg“ gleichgesetzt.

Der Wnt-Signalweg im Detail

Zentrales Element der Wnt-Signaltransduktion ist das Protoonkoprotein β -Catenin, welches sowohl an der Verknüpfung von Cadherin-Zelladhäsionsmolekülen mit dem Zytoskelett beteiligt ist als auch über die Interaktion mit *LEF/TCF*-Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen als Kotransaktivator steuert. Die Funktion von β -Catenin wird stark durch seine intrazelluläre Konzentration, dem Phosphorylierungsstatus sowie der Bindung an spezifische Transkriptionsfaktoren beeinflusst. β -Catenin ist das Säugetier-Homolog des *Drosophila*-Proteins Armadillo. Stabilität sowie Aktivität von β -Catenin wird vom sog. destruction complex (Zerstörungs-/Degradationskomplex) reguliert. Der Degradationskomplex ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus Axin sowie seinem Homolog Axin 2 (Conductin), dem Tumorsuppressor APC, GSK-3 β , CKI α und dem in dieser Arbeit im Fokus stehenden Protein Wtx [36-40].

Zelle ohne Wnt-Signal/ Abbau von β -Catenin

In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird β -Catenin durch die Serin/Threonin-Kinasen CKI und GSK-3 β phosphoryliert und so vom F-Box-Protein β -TrCP erkannt, welches die Ubiquitinierung von β -Catenin und den Abbau über das Proteasomensystem vermittelt. Somit hat die Zelle im sog. „canonical off state“ eine geringe zytoplasmatische und nukleäre β -Catenin-Konzentration [41-43].

Zelle mit Wnt-Signal/ kein Abbau von β -Catenin

Zur Aktivierung des Wnt-Signalwegs interagiert ein Wnt-Protein mit dem Frizzled-LRP-Rezeptorkomplex. Extrazelluläre Inhibitoren wie sFRPs können die Signalkaskade modulieren [30]. Intrazellulär hyperphosphoryliert das Protein Dishevelled (Dvl, Dsh in *Drosophila*) und interagiert mit dem Tumorsuppressorgen Axin (Dishevelled-Axin-Domäne) sowie GSK-3 β . Hierdurch werden der Abbau des Axins bzw. die Inhibition des GSK-3 β und konsekutiv die Dissoziation des Destruktionskomplexes vermittelt. Die Phosphorylierung des β -Catenin unterbleibt und die Translokation des akkumulierten, unphosphorylierten β -Catenin in den Nukleus kann erfolgen [44]. β -Catenin bindet im Zellkern an Transkriptionsfaktoren der *TCF/LEF*-Familie. Gemeinsam bilden sie einen funktionellen Transkriptionsaktivator für die *WNT*-Zielgene, die in primäre, direkt regulierte Zielgene sowie sekundäre bzw. indirekt über direkte Transkriptionsfaktoren stimulierte Zielgene unterteilt werden [45]. Neben den Zielgenen *C-MYC* und *AXIN2*, beide sicher *TCF-4*-vermittelt, existiert nach heutigem Kenntnisstand eine Vielzahl von weiteren Zielgenen wie *CYCLIN D1*, *C-JUN*, *MMP7*, *FRA-1* und *ITF-2* [31, 46-51].

Eine schematische Übersicht über den inaktivierten bzw. aktivierten Wnt/ β -Catenin-Signalweg bietet Abbildung 1.3.

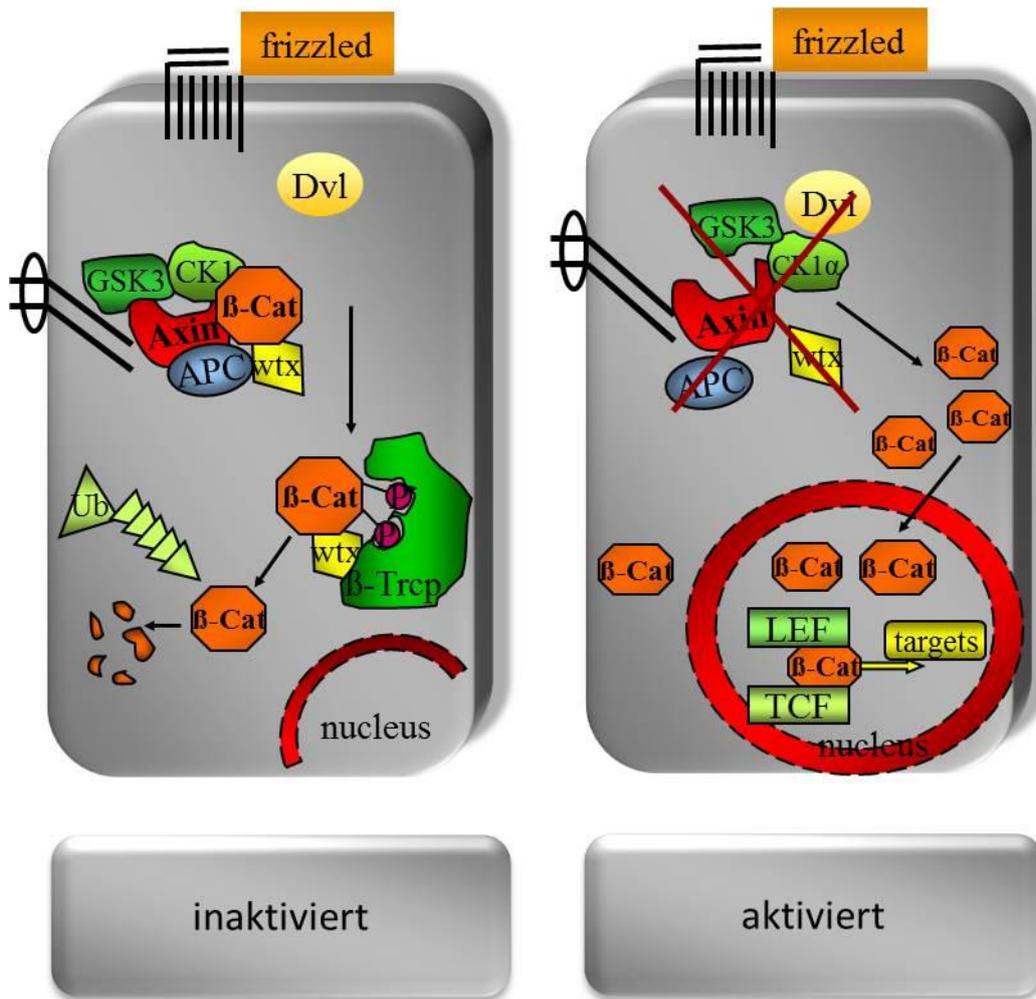


Abb. 1.3 Übersicht des Wnt/β-Catenin-Signalwegs im inaktiven sowie aktivierten Zustand, vereinfacht modifiziert nach [31]; Dsh/Dvl – Dishevelled; GSK3β - Glycogen-Synthase Kinase 3β; CKI - Casein Kinase I; APC - Adenomatosis Polyposis coli; β-TrCP - β-Transducin repeat Containing Protein; LEF/ TCF - lymphoid enhancer factor/ T-cell factor

Regulation und potenzielle Intervention

Die Zielgene des Wnt-Signalwegs werden zumeist in Subgruppen eingeteilt. Zunächst sind sie nach der Funktion zu unterscheiden in Gene 1) zur Feedback-Kontrolle, 2) zur Regulation der Zellproliferation, 3) zur Kontrolle der Apoptose, 4) zur Regulation anderer zellulärer Prozesse wie Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren sowie 5) Gene von Zelladhäsionsmolekülen. Tierexperimentelle Versuche mit knock-out-Mäusen zeigten die Auswirkung des jeweiligen Zielgenverlusts. Für das Verständnis und die Regulation der Signalkaskade scheint vor allem eine Einteilung in positive und negative Feedback-Loops (Rückkopplungsschleifen) als spezifischer Transkriptionseffekt hilfreich. Dies verdeutlicht auch die Umsetzung einer

fein abgestimmten Signalweiterleitung, die zudem vermutet wird zelltypspezifisch definiert zu werden. Die definierte Wnt-Konzentration, die Auswahl der Wnt-Rezeptoren sowie Transkriptions-Aktivatoren und -Repressoren beeinflussen das effektive Signal im Gewebe [24]. Neben der konstitutiven Aktivierung im pathophysiologischen Rahmen kann die positive Rückkopplung auch durch gesteigerte Rezeptorpräsenz und Proteinverfügbarkeit erfolgen [48]. Der Abbau von β -Catenin und somit eine Inaktivierung bzw. Abschwächung des Wnt-Signals ist ebenso multimodal.

Für diese Arbeit von grundlegender Bedeutung ist *CONDUCTIN (AXIN2)*. *CONDUCTIN* wird nicht wie sein Homolog *AXIN1* ubiquitär exprimiert, sondern Wnt-gesteuert exprimiert und vermittelt eine negative Feedback-Loop [52, 53]. Das Gerüstprotein Axin2 interagiert direkt mit wichtigen Komponenten des β -Catenin-Degradationskomplexes (APC, GSK3 β , β -Catenin) und nimmt somit eine zentrale Rolle beim intrazellulären Abbau von β -Catenin ein [36]. Die Expression von *AXIN2* ist Ausdruck einer Wnt-Aktivierung und kann folglich als Indikator Wnt-aktiver Zellen eingesetzt werden.

Wnt-Signalweg und Tumorigenese

Ableitend aus der physiologischen Funktion der Wnt-Signaltransduktion ergibt sich ihre Relevanz bei pathologischen Prozessen durch vermehrte oder verminderte Expression der beteiligten Wnt-Moleküle oder einer Fehlregulation. Bereits vor mehr als 10 Jahren wurde eine pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs bei epithelialen Tumoren wie Mammakarzinomen oder Kolonkarzinomen beschrieben. Desweiteren kann ein konstitutiv aktiver Wnt-Signalweg neben dem Medulloblastom, auch das Prostatakarzinom, die Leukämie oder das maligne Melanom begünstigen [54, 55].

In der Formation des Medulloblastoms scheint die Dysregulation von Signalkaskaden, welche die Neuroembryogenese stark beeinflussen, maßgeblich zu sein [56-59]. In adulten Stammzellnischen regulieren sie die Umgebung [60]. Etwa 15% der Medulloblastome werden dem molekularen Cluster der Wnt-Signaltransduktion zugeordnet. Die bisher identifizierten Mutationen, die eine Aktivierung der Wnt-Signalkette verursachen, liegen im Protoonkogen *CTNNB1* (β -*CATENIN*) sowie in Genen, die für Elemente des destruction complex kodieren wie *AXIN1*, *CONDUCTIN (AXIN2)* oder *APC*. Diese genetischen Alterationen blockieren die Bildung des Multiproteinkomplexes. Hierdurch wird der proteasomale Abbau von β -Catenin beeinträchtigt und β -Catenin stabilisiert. Es resultiert eine vermehrte Expression von Wnt-Zielgenen und somit eine pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs [16, 17, 61-65].

1.4 Das WTX-Gen

Das *WTX*-Gen (Wilms Tumor Gen auf dem X-Chromosom) ist ein erst kürzlich näher umschriebenes Gen, das als One-Hit-Tumorsuppressorgen fungiert und einen wichtigen Modulator innerhalb des Wnt-Signalwegs darstellt. Das auch als *AMERI* oder *FAM123B* (APC membrane recruitment 1; family with sequence similarity 123B) bekannte Gen wird in Vertebraten ubiquitär exprimiert, liegt zentromernah in der Region Xq11.1 und kodiert mit seinen 2 Exonen, von denen nur 1 Exon translatiert wird, ein aus 1135 Aminosäuren bestehendes Protein [40].

WTX besitzt ein vermutetes Kernlokalisierungssignal, zwei Coiled-coil Strukturen sowie eine saure und eine Prolin-reiche Region (siehe hierzu auch Abb. 1.4). Kürzlich wurde eine alternative 858 Aminosäuren lange Splicingform beschrieben, bei der die Aminosäuren 50 bis 326 deletiert sind und somit die N-terminale Phospholipid-Bindungsaktivität und das Kernlokalisierungssignal fehlen [66]. Beide Regionen definieren die Lokalisation an der Plasmamembran. Drei verschiedene *APC* binding domains und die C-terminal gelegene β -*CATENIN*-Bindungsregion (ab Gly368) bestehend aus REA-Motiven (repeated arginine-glutamic acid-alanine) gewährleisten die Interaktion mit *APC* und β -*CATENIN* [67].

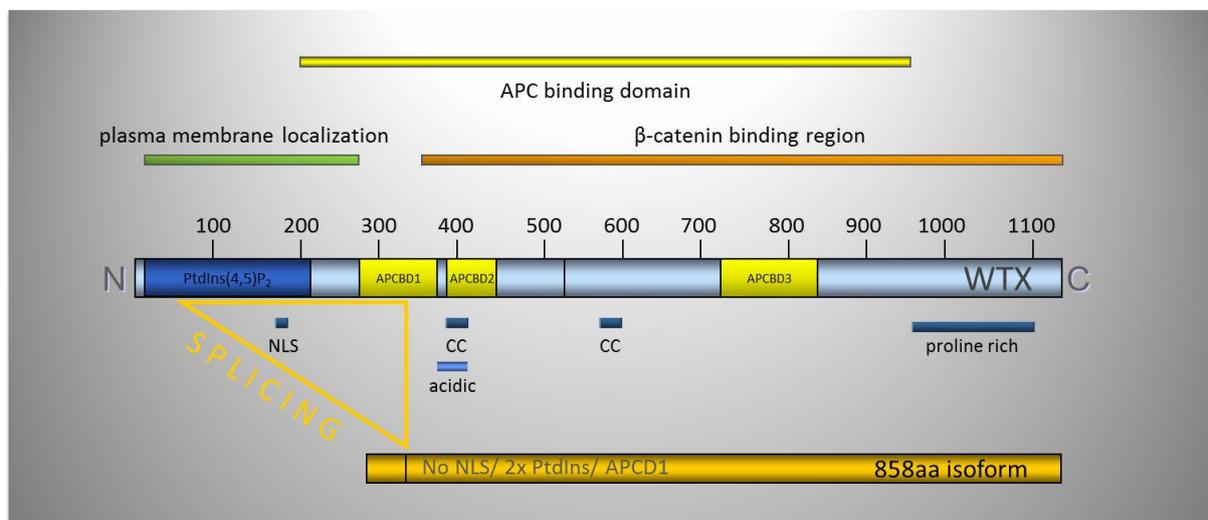


Abb. 1.4 *WTX*-Gen modifiziert nach [39, 40, 68]; APCBD – APC Bindungsdomäne; Plasma membrane localization – Plasmamembranlokalisation; β -catenin binding region – β -Catenin Bindungsregion; PtdIns – N-terminale Phospholipid-Bindungsaktivität; NLS – Kernlokalisierungssignal; CC- Coiled-coil Struktur; proline rich – Prolin-reiche Region; acidic – saure Region

Das *WTX*-Gen kodiert für eine Komponente des Wnt-Destruktionskomplexes und induziert den Abbau von β -Catenin durch Interaktion mit β -Catenin, Axin, β -TrCP und Apc [39]. Aktuell wird Wtx als sog. Scaffold-Protein (Gerüstprotein) für den Degradationskomplex gewertet und stabilisiert zusätzlich Axin1 [67]. Außerdem reguliert Wtx die Rekrutierung von Apc an die Zellmembran, bei Wtx-Verlust assoziiert Apc mit Mikrotubuli [69]. Noch teilweise ungeklärt ist seine essentielle Position an der Membran für die Wnt-Signaltransduktion [67].

Das Tumorsuppressorgen *WTX* liegt auf dem X-Chromosom, sodass bei männlichem Geschlecht bereits durch ein einzelnes Mutationsereignis eine vollständige Inaktivierung des Gens stattfindet. Auch bei Frauen kann dies zutreffen, liegt die Mutation auf dem aktiven X-Chromosom. Dennoch folgt daraus eine erhöhte Penetranz von Mutationen bei männlichen Patienten.

Erstmals wurde *WTX* als Tumorsuppressor im Wilms Tumor, einem embryonalen Tumor der Niere beschrieben [40]. Die Mutationsrate in Wilms Tumoren ist mit 10-30% dokumentiert. Auch in anderen malignen Erkrankungen wie Osteopathia striata congenita mit kranialer Sklerose (OSCS), akuter myeloischer Leukämie und kolorektalen Karzinomen treten Mutationen in *WTX* auf [40, 66, 70-73].

1.5 Kleinhirnentwicklung und Bedeutung des Wnt-Signalwegs auf die zerebelläre Genese

Der dorsale Anteil des Metencephalons sowie das kaudale Mesencephalon bilden das Ursprungsgewebe des Kleinhirns [74, 75]. Eine paarige Verdickung des dorsalen Flügelplattenabschnitts wächst in den 4. Ventrikel ein und bildet in der Mittellinie den unpaaren Vermis sowie lateral die paaren Hemisphären [76]. Neben einer Mantel- sowie einer Marginalschicht besteht die Kleinhirnplatte aus den beiden Keimzentren der ventrikulären Zone (dorsal des 4. Ventrikels) sowie den Rautenlippen (rhombic lips) mit Neuroepithel.

Die Neuroblasten verlassen die Rautenlippe, wandern zur Oberfläche des Kleinhirns und bilden die Vorläufer der Körnerzellen bzw. die äußere Körnerzellschicht (EGL) [77, 78].

Eine weitere Population an Neuroblasten durchwandert ausgehend von der ventrikulären Zone die Mantelzone und differenziert sich in der Marginalzone zu Purkinjezellen aus. Die Bergmann-Glia folgt der radialen Migration der Purkinjezellen [79]. Postnatal bewegen sich die Körnerzellen mit Hilfe der glialen Leitschiene der Bergmann-Zellen von der äußeren

Körnerzellschicht durch die Purkinjezellschicht (Stratum ganglionare) und bilden unterhalb dieser ausdifferenziert die innere Körnerzellschicht (IGL; siehe hierzu auch Abb. 1.5) [80, 81]. Früh postnatal besteht der zerebelläre Kortex der Maus aus 4 Schichten: die externe Körnerzellschicht, eine gering ausgeprägte Molekularschicht, die noch mehrlagige Purkinjezellschicht sowie die innere Körnerzellschicht. Zunehmend verschwindet die EGL und nach der zweiten Postnatalwoche ist die grobe morphologische Entwicklung des Kleinhirns abgeschlossen [80, 82]. Neben der weißen Substanz gibt es drei Schichten des Kortex- Stratum moleculare (Molekularschicht), Stratum ganglionare (Purkinjezellschicht) und Stratum granulosum (Körnerzellschicht).



Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Kleinhirngnese

Der Wnt-Signalweg spielt in der Embryogenese des Kleinhirns eine besondere Rolle, die jedoch bisher nur partiell beschrieben ist. In der frühen Phase der zerebellären Genese, zum Zeitpunkt der Bildung einer Metencephalon-Mesencephalon-Grenze stellt Wnt-1 einen wichtigen Regulator dar. Mutationen in Wnt-1 bewirken schwerwiegende Defekte in Mes- und Metencephalon. Die Expression von Wnt-1 wurde auch in Vorläufern der Körnerzellen beschrieben [25, 83, 84]. Für die spätere Phase der Kleinhirnentwicklung gibt es kaum Hinweise auf die Funktion des Wnt-Signals. Purkinjezellen besitzen ein erhöhtes Wnt3a-Signal. Bei der postnatalen Ausbildung axonaler Vernetzungen ist Wnt7a essentiell, Wnt7a knockout Mäuse zeigten eine verspätete Reifung der Synapsen [85-87].

2 Zielsetzung

Das Medulloblastom, ein hochmaligner primitiv neuroektodermaler Tumor des zentralen Nervensystems, ist der häufigste solide maligne Hirntumor im Kindesalter. Etwa 15% der Medulloblastome werden der sogenannten Wnt-Gruppe zugeordnet. Hierbei führen Mutationen in Genen, die für zentrale Komponenten des Wnt-Signalwegs kodieren, zu einer pathologischen Aktivierung dieses Entwicklungskontrollsignalwegs.

Derzeit ist der zugrundeliegende Mechanismus einer solchen Wnt-Aberration in nur wenigen Fällen geklärt. Ziel dieser Arbeit war es nachzuweisen, inwieweit *Wtx* als vielversprechender Kandidat für ein Schlüsselmolekül innerhalb der Wnt-Signalkaskade an der Aktivierung des Wnt-Signalwegs und somit an der Entstehung des Medulloblastoms beteiligt ist. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- 1) Können in humanen Medulloblastomen somatische Mutationen des *WTX*-Gens nachgewiesen werden, die im Tumor zu einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen?
- 2) Zeigen diese Genaberrationen von *WTX* eine funktionelle Relevanz?
- 3) Wie verhält sich die Expression von *WTX* in humanen Medulloblastomen gegenüber zerebellärem Kontrollgewebe unterschiedlichen Alters (fetal/adult)?

Im Weiteren sollte für ein besseres Verständnis des pathologischen Ursprungs Wnt-aberrierter Meulloblastome hinterfragt werden:

- 4) Wie stellt sich die räumliche und zeitliche Expression von *Wtx* und Zielgenen der Wnt-Kaskade in Kleinhirngewebe unterschiedlichen Alters dar?

3 Material

Gerät/ Material	Hersteller/ Vertrieb
allgemein	
Feinwaage	Scaltec
Vortex genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen Heraeus multifuge 3SR+/ fresco 17/ pico 17/ megafuge 1.OR	Thermo Scientific
Pipettenspitzen - Safe seal tips professional	Biozym
Reaktionsgefäße - Safe lock (tube)	Eppendorf
Pipette - research pipette variabel	Eppendorf
Pipetman	Gilson
PCR	
PCR thermal cycler uno cycler	VWR
PCR thermal cycler t gradient	Biometra
DMSO	Sigma
Q-solution	Qiagen
Betaine	Sigma-Aldrich
Mineralöl HP 50.3	Roth
Gotaq colorless	Promega
Platinum Taq	Invitrogen
MgCl ₂	Invitrogen
10x PCR Puffer ohne MgCl ₂	Invitrogen
dNTPs	ThermoScientific, Fermentas
Optical Adhesive Covers	ABI
96well G96high-N	Kisker
Gelelektrophorese	
Gelelektrophoresekammer	Biozym
Electrophorese power supply	Consort
G:Box System-UV-Transilluminators	Syngene
Gene tools Software	Syngene
Agarose	Sigma
TAE 1x	Applichem (50x)
GelPilot DNA Loading dye 5x	Qiagen
Ethidiumbromid	Merck
HyperLadder II	Bioline

Gerät/ Material	Hersteller/ Vertrieb
RNA isolation/ DNase Verdau/ Reverse Transkription	
Ultra-Turrax Work Station	Ika
Homogenisation System Dispomix Drive	Xiril
Zellschaber	Sarstedt
RNase Zap	Sigma
RNase away	Fulka
Nuclease freies Wasser	Qiagen
peqGOLD Trifast	PeqLab
Chloroform	Merck
2 - Propanol/ Isopropanol	Merck
abs. Ethanol	J.T.Baker
Rnase-freies Glykogen	Invitrogen
PBS (phosphate-buffered salines)	Gibco, Thermo Scientific
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Reverse Transcription DNafree Kit	Ambion, Applied Biosystems/ABI
High-Capacity cDNA reverse ranscription kit; 100 rx	Applied Biosystems
Konzentrationsbestimmung	
Infinite 200 pro nanoquant reader	Tecan
i-control Software	Tecan
2100 Bioanalyzer	Agilent
RNA 6000 Nano Kit	Agilent
Real-Time PCR	
7900 HT fast RT PCR system	Applied Biosystems
SDS-Software v2.3	Applied Biosystems
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2x	Applied Biosystems
diverse TaqMan Assay human/murin	Applied Biosystems
qPCR human Reference Total RNA	Stratagene

Gerät/ Material	Hersteller/ Vertrieb
SSCP/ Färbung der Polyacrylamid-Gele	
Elektrophoresekammer und Zubehör	Biometra
Glasplattensystem Multigel- Long, 110x120x1mm mit fixiertem Spacer & U-Dichtung	Biometra
Essigsäure 1L	Roth
Whatman-Papier	Roth
Hamilton Spritze 700 series 25µl 702N	Sigma
Polyacrylamid-Gel	
40% Acrylamid	Merck
2% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid-Lösung	Serva
10x TBE	Fermentas
Glycerin	Merck
Ammoniumpersulfat (APS) 98%	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth
Bromphenolblau	Sigma-Alldrich
Xylencyanol	Sigma-Alldrich
Saccharose	Sigma-Alldrich
SybrGold (Nucleic Acid)	Invitrogen
Alufolie (Dicke 15µm)	Roth
Sequenzierung	
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Fermentas
Exonuclease I (Exo I)	Fermentas
LGC Genomics AGOWA Sequencing Service Berlin, Deutschland	
Zellkultur	
Axio Observer Z1 Immuno-Fluoreszenz Mikroskop	Carl Zeiss
Axio Vision Imaging Software	Carl Zeiss
HERA cell 240i CO2 incubator	Thermo Scientific
Zellkulturflasche 50ml/25cm ²	BD Falcon
Zellkulturflasche 250ml/75cm ²	BD Falcon
Polypropylen-Zentrifugen-Röhrchen 15ml/ 50ml	BD Falcon
Kryoröhrchen	Nunc
Kryobox Mr Frosty	Nunc
10x TRYPSIN/EDTA (0,5%/0,2%) in PBS	PAA
RPMI 1640, L-Glutamine, Phenol Red	PAA
DMEM, high Glucose (4.5g/l), L-Glutamine	PAA
Natrium-Pyruvat/ Sodium-Pyruvate-Solution 100mM	PAA
1x DPBS w/o Ca, Mg	PAA
FBS/ Fetal Bovine Gold	Gibco
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Alldrich

Gerät/ Material	Hersteller/ Vertrieb
Funktionsassays Zellkultur	
Recombinant Human Wnt3a	R&D
pcDNA3.1 HisB dnTcf-4 ΔN31	Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn
pGL3-Basic reporter	Promega
Lipofectamine™ LTX Reagent	Invitrogen
PLUS™ Reagent 3μg/μl	Invitrogen
FISH	
Hybridisierungssofen	Fisher, Thermo Scientific
Microm Cryo-Star HM 560 Cryostat	Fisher, Thermo Scientific
PBS	PAA Cell Culture Company
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Applichem
NaCl	Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Applichem
DEPC-H ₂ O	Sigma-Aldrich
Triethanolamin	Sigma-Aldrich
HCl 37%	Applichem
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck; J.T.Baker
Whatman-Papier	Roth
Formamid	Applichem
50x Denhardts Reagenz	Sigma-Aldrich
Dextransulfat	Applichem
10 mg/ml ss Heringssperma-DANN	Sigma-Aldrich
10mg/ml Hefe-t-RNA	Invitrogen
Tris Base	Sigma-Aldrich
EDTA pH 8,0	Applichem
RNAse A	Applichem
30% H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
Blocking Reagent für TSA System	Perkin Elmer
Tween 20	Sigma-Aldrich
DPX mounting solution	Sigma-Aldrich
TSA™-Plus Fluorescence Palette System, Fluorophore Tyramide	Perkin Elmer
TSA-System Cy3	Perkin Elmer
Anti-Digoxigenin-HRP, Fab Fragment vom Schaf	Roche
DAPI (4,6-Diaminidino-2-Phenylindol)	Invitrogen
Shandon Immu-Mount	Thermo Scientific

4 Methoden

4.1 Untersuchungskollektiv

Zur Durchführung der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen stand Tumor-DNA und -RNA von 78 humanen Medulloblastomen zur Verfügung. Desweiteren wurden Kontroll-DNA von 100 Individuen ohne Tumor oder sonstigen zentralnervösen Erkrankungen in der Anamnese und RNA aus fetalen und adulten Kleinhirngeweben als Kontrolle verwendet. Zellbiologische Methoden wurden an 5 humanen Medulloblastom- und 2 Tumorzelllinien der Leber durchgeführt. Zerebelläres Gewebe postnataler C57Bl/6 Mäuse ermöglichte die Untersuchung entwicklungsspezifischer Fragestellungen.

Tumorkollektiv sowie humanes Kontrollgewebe

Das Probenmaterial im Rahmen dieser Arbeit wurde durch das Institut für Neuropathologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, die Klinik für Allgemeine Neurochirurgie, Universitätsklinikum Köln und das Institut für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt (Ethikkommission Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 046/05; 01.04.2005). Die konstitutionelle DNA aus peripherem Blut stand in den meisten Fällen nicht zur Verfügung. Das Tumorkollektiv umfasst 78 Medulloblastome (WHO Grad IV) vom klassischen, desmoplastischen und großzellig/anaplastischen Subtyp im Alter von 6 Monaten bis 57 Lebensjahren.

Sämtliche Tumor-Gewebeproben wurden nochmals histopathologisch entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikation für zentralnervöse Tumore reevaluiert [1]. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden nur Gewebestücke verwendet, die einen Mindesttumoranteil von 80% aufwiesen.

Als Kontrollgruppe für die Mutationsanalyse diente extrahierte DNA von 100 Individuen ohne Tumoranamnese oder ZNS-Erkrankung, die freundlicherweise von Herrn Dr. Andreas Weimann, Labor Berlin GmbH zur Verfügung gestellt wurden.

Ergänzt wurde das Kontrollkollektiv durch RNA aus nicht-neoplastischem, fetalem und adulten Kleinhirngewebe, welches post mortem entnommen wurde. Tab. 4.1a zeigt eine detaillierte Übersicht über Probenmaterial und Referenzgewebe.

Tumorkollektiv								
Probe	Alter (J)	w/ m	Histologie/ Diagnose	Subtyp	β -Catenin Akkumulation	Lokalisierung	DNA	RNA
A1	9	m	MB R	klassisch	kA	Kleinhirn	x	-
A2	6	m	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
A3	22	m	MB Mx	kA	kA	temporal	x	-
A4	17	f	MB	desmoplastisch	kA	zerebellär	x	x
A6	12	m	MB	klassisch	kA	Ventrikel	x	x
A7	3	m	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
A8	4	m	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
A9	2	f	MB	klassisch	kA	Kleinhirn	x	-
A10	11	f	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
B1	7	m	MB	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
B2	23	m	MB	desmoplastisch	kA	zerebellär	x	x
B4	17	f	MB	klassisch	kA	Vermis cerebelli	x	-
B5	5	f	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
B6	57	f	MB	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
B7	10	f	MB R	klassisch	kA	hint. SG	x	x
B8	6	m	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
B9	21	m	MB	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
B10	17	m	MB	klassisch	kA	KHBW	x	-
C1	12	f	MB	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
C2	7	m	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
C3	3	m	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	-
C4	12	m	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
C5	10	f	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
C6	14	m	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
C7	20	f	MB R	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
C8	10	f	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
C9	1,9	m	MB R	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
D1	3	m	MB	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
D2	8	m	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
D3	15	m	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
D6	10	f	MB	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
D7	28	m	MB	klassisch	kA	zerebellär	x	x
D9	12	f	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
D10	44	m	MB	klassisch	kA	Kleinhirn	x	x
E1	3	m	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
E2	7	f	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
E3	29	f	MB R	desmoplastisch	kA	zerebellär	x	x
E4	8	m	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x
E5	0,9	f	MB	desmoplastisch	kA	hint. SG	x	x
E6	13	f	MB	klassisch	kA	hint. SG	x	x
E7	5	m	MB	anaplastisch	kA	hint. SG	x	x
E8	25	f	MB	klassisch	kA	4. Ventrikel	x	x

Tumorkollektiv								
Probe	Alter (J)	w/ m	Histologie/ Diagnose	Subtyp	β-Catenin Akkumulation	Lokalisierung	DNA	RNA
F1	9,3	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
F2	22,8	m	MB	desmoplastisch	-	kA	x	-
F3	1,6	f	MB	desmoplastisch	-	kA	x	-
F4	39,7	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
F5	45,6	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
F7	30,5	f	MB	desmoplastisch	-	kA	x	-
F8	30,7	f	MB	desmoplastisch	-	kA	x	-
F9	16,5	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
F10	10,6	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
G1	29,3	f	MB	klassisch	-	kA	x	-
G2	5,5	f	MB	klassisch	-	kA	x	-
G3	7	m	MB	klassisch	+	kA	x	-
G4	26,5	f	MB	desmoplastisch	-	kA	x	-
G5	7,9	f	MB	klassisch	+	kA	x	-
G6	7,5	m	MB	desmoplastisch	-	kA	x	-
G7	4,9	m	MB	klassisch	+	kA	x	-
G8	3,1	f	MB	klassisch	+	kA	x	-
G9	2,9	f	MB	extensiv nodulär	-	kA	x	-
G10	6,2	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
H1	2,2	f	MB	desmoplastisch	-	kA	x	-
H2	9,3	m	MB	klassisch	+	kA	x	-
H3	7,9	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
H4	36,8	f	MB	klassisch	+	kA	x	-
H5	22,3	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
H6	3,6	f	MB	klassisch	-	kA	x	-
H7	13,5	m	MB	klassisch	-	kA	x	-
H8	9,9	m	MB	klassisch	kA	kA	x	-
I1	0,5	m	MB	desmoplastisch	kA	kA	-	x
I2	9	m	MB	klassisch	kA	kA	-	x
I3	9	w	MB	großzellig	kA	kA	-	x
I4	7	m	MB	klassisch	kA	kA	-	x
I5	4	w	MB	klassisch	kA	kA	-	x
I6	12	w	MB	klassisch	kA	kA	-	x
I7	11	m	MB	klassisch	kA	kA	-	x
I8	7	m	MB	anaplastisch	kA	kA	-	x
I9	9	m	MB	klassisch	kA	kA	-	x

Referenzgewebe					
Probe	Alter	w/ m	Gruppe	DNA	RNA
cll_1	15.SSW		fetal	-	x
cll_2	21.SSW		fetal	-	x
cll_3	22.SSW		fetal	-	x
cll_4	0,6	m	fetal	-	x
cll_5	3,2	f	adult	-	x
cll_6	54,1	m	adult	-	x
cll_7	57,6	m	adult	-	x
cll_8	60,9	m	adult	-	x
cll_9	61,3	m	adult	-	x

Tab. 4.1a Übersicht über das humane Untersuchungskollektiv; MB Mx metastasiertes Medulloblastom; R Rezidiv; SG Schädelgrube; KHBW Kleinhirnbrückenwinkel; SSW Schwangerschaftswoche; m maskulin; f feminin; kA keine Angaben; x verfügbar; - nicht verfügbar

Zelllinien

Für die funktionellen *in-vitro* Versuche wurden 5 humane Medulloblastom-Zelllinien (D283med, DAOY, R300, UW228, UW473) verwendet (siehe hierzu auch Tab. 4.1b). Desweiteren wurden eine Hepatoblastom-Zelllinie (HUH6) und eine Zelllinie, die aus einem humanen hepatozellulären Karzinom (HCC) etabliert wurde (HepG2), eingesetzt. DAOY, D283med, HepG2 und HUH6 wurden bei der American Type Culture Collection, VA, USA erworben. UW228, UW473 sowie R300 wurden freundlicherweise von Dr. Michael S. Bobola zur Verfügung gestellt (Tab. 4.1b).

Bezeichnung	Tumortyp	Herkunft	Beschreibung
D283med	Medulloblastom	ATCC, Rockland, USA	[88]
DAOY	Medulloblastom (desmoplastisch)	ATCC, Rockland, USA	[89]
R300	Medulloblastom	Dr. M. S. Bobola (Children's Hospital & Regional Medical Center, Seattle, WA)	Dr. M. S. Bobola
UW228	Medulloblastom	Dr. M. S. Bobola (Children's Hospital & Regional Medical Center, Seattle, WA)	[90]
UW473	Medulloblastom	Dr. M. S. Bobola (Children's Hospital & Regional Medical Center, Seattle, WA)	Dr. M. S. Bobola
HepG2	HCC	ATCC, Rockland, USA	[91-93]
HUH6	Hepatoblastom	ATCC, Rockland, USA	[94]

Tab. 4.1b Zusammenstellung der verwendeten Zelllinien mit Herkunft

Murines Kleinhirngewebe

In dieser Arbeit wurde kryoasserviertes murines Kleinhirngewebe aus C57Bl/6 Mäusen verschiedener postnataler Stadien (postnataler Tag 3-13, 18, 100) durch das Institut für Neuropathologie, Charité- Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin IC 113 – G0020/12; 25.05.2012).

4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Prinzip

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) als eine der maßgebenden Methoden der Molekularbiologie dient der *in-vitro* Amplifikation spezifischer Nukleinsäure-Sequenzen [95-97]. Ein DNA-Doppelstrang (dsDNA; template) wird unter Thermoenergie (Denaturierung) in zwei Einzelstränge (ssDNA) aufgetrennt, um eine Anlagerung von zwei verschiedenen sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) an die freien 5'-Enden der beiden Einzelstränge zu ermöglichen (annealing). Unter Verwendung freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die an die ssDNA komplementär angelagerten Primer (elongation). Dieser Zyklus wiederholt sich mit dem Resultat einer exponentiell steigenden Anzahl neusynthetisierter DNA der ursprünglichen Zielsequenz. Eine abschließende Extension führt die einzelsträngige DNA wieder zusammen und beendet die Reaktion.

Durchführung

Die Durchführung der PCR wurde für jedes zu amplifizierende DNA-Fragment optimiert. Hierzu gehören das Primerdesign, die primerspezifische Annealingtemperatur sowie Wahl der Polymerase (Gotaq, Phusion, Platinum Taq), differierende relative Konzentrationen im Reaktionsansatz, Zusätze wie DMSO (Dimethylsulfoxid), Q-solution (für GC-reiche Sequenzen buffer) oder Betaine (N,N,N-Trimethylglycin) oder auch eine grundlegend andere Herangehensweise mit Hilfe einer Touchdown-PCR. Das Primerdesign erfolgte unterstützend durch die Plattform Primer3 (p3). Der Einsatz von Mineralöl steigerte neben der Erhitzung des Cycler-Deckels die Produktausbeute. Es wurden Thermocycler der Firmen VWR und Biometra verwendet. Nachfolgend sind das verwendete PCR-Protokoll (Promega, Invitrogen) sowie der Programmablauf im PCR-Cycler dargestellt (Tab. 4.2a sowie 4.2b).

	1. Variante	2. Variante	3. Variante	4. Variante
Template DNA 10ng/μl	1	2	1	2
Forward Primer 10μM	0,75	1,5	1	1,5
Reverse Primer 10μM	0,75	1,5	1	1,5
Polymerase Gotaq colorless	10	10		
Platinum Taq Polymerase			0,2	10
MgCl₂ 50mM			1,5	
10x PCR-Puffer- Mg			5	
2mM dNTP-Mix			5	
Aqua dest	7,5	5	7,5	5

Tab. 4.2a Pipettierschema des PCR-Ansatzes
Mengenangaben in ml der angegebenen Konzentration

Reaktionsschritt	Temperatur (°C)	Dauer in s/ Zyklus	
initiale Denaturierung	94	120	} 35x/ 39x bei frg14
Denaturierung	94	30	
Annealing	55,6-63,8	30	
Elongation	72	30	
finale Elongation	72	600	

Tab. 4.2b PCR-Thermocycler-Programm

Die oben beschriebenen PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Bei mehreren PCR-Ansätzen diente ein Mastermix der Vermeidung von Pipettierfehlern.

In Tab. 4.2c und Tab. 4.2d sind die innerhalb der Arbeit verwendeten PCR-Primer aufgelistet.

Fragment	Primer	Richtung	Primer Sequenz (5' > 3')	Amplikon (bp)	Zyklus (n)	Annealing (°C)
1	7	F	CAGCAAGCCAAGCATATCG	395	35	63,8
	8	R	AGGATGGCTCTGAGGTTGG			
2	9	F	CTGGACGTACCTCAGTTGTCC	313	35	63,8
	10	R	GTCTTGCTCTTGCTGAGACC			
3	11	F	AGCAAAGGTTCTGGGAAAGG	327	35	60,9
	12	R	CCCAGTGACCTTGCTCTTCC			
4.1	13	F	GCTGTGGCTGAGAAGTTTCC	281	40	60,6
	51	R	GGAGAAGGTTCTGGTGTGG			
4.2	52	F	AGGTGCCCTGCTTTGAGG	233	35	61,9
	14	R	CCCTGTTTCTGGGCTATGG			
5	15	F	CACATGTGCAACCCAAGC	340	35	58,1
	16	R	TCCTCGTCATCATCATCTGG			
6	17	F	CAGAGAGCAAACCGAGATGG	399	35	60,9
	18	R	ATCCTCAAATCCAGGTGTGG			
7	19	F	TGCTCCTTGACCCAGTTAGG	381	35	60,9
	20	R	TGGTCACTAGCCGTTCTTCC			
8	21	F	CTCCACCTGGAGATGACTGC	360	35	60,9
	22	R	TCTCTCTACAACGAACCTCTCG			
9	23	F	CACACTTGGGAAGCTCATGG	368	35	55,6
	24	R	TTTGCTTCTTGCATGTCTGG			
10	25	F	CTCCGTCCTCTGGAGAAGC	352	35	63,8
	26	R	CACATCAGCGATGTCAAAGG			
11	27	F	CATGGTGACCTTTGACATCG	410	35	60,9
	28	R	GGCTCCATTCTCCTTCTTCC			
12	29	F	CACTTGGTCCAGGGCTACC	386	35	63,8
	30	R	GGCTGGAGGTTATAGCAAGG			
13	31	F	ACTAGCTCGTCCCTCACACC	340	35	60,9
	32	R	GTTTCCATTCATGGCAGTGG			
14	47	F	TCACCCATGGCATTCTCAG	197	39	58,9
	48	R	GTGTCCCTACTCCAGAATTG			
14.1	43	R	CCCATTACATGCTCAGG	247		
14.2	44	R	CCCGTGTCCCTACTCCA	228		

Tab. 4.2c Verzeichnis der verwendeten PCR-Primer für die WTX-Mutationsanalyse

Fragment	Nr.	Richtung	Primer Sequenz (5' > 3')	Amplikon (bp)
β-Catenin	35	F	AAAATCCAGCGTGGACAATGG	467
	36	R	TGTGGCAAGTTCTGCATCATC	

Tab. 4.2d Verzeichnis der verwendeten PCR-Primer für die *β-CATENIN* Mutationsanalyse

4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des PCR-Produkts wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Agarose wirkt hierbei als Molekularsieb und führt zur Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe. Über einen aufgetragenen Molekulargewichtsstandard können die Nukleotidlängen der Amplifikate ermittelt werden. Die fluoreszierenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht detektiert. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert dabei in die Basen der DNA, wobei das Anregungsspektrum des Farbstoffs verändert und die Fluoreszenz bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird.

Die PCR-Amplifikate wurden in einem 1-2%igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

1.5-2g Agarose wurden dazu in 150ml 1x TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst und mit 150µl Ethidiumbromid (1:1000) versetzt. Die Gelpolymerisation fand bei Raumtemperatur statt. 5µl des PCR-Produkts sowie 1µl des Ladepuffers (Qiagen GelPilot DNA Loading dye 5x) wurden in die Geltaschen pipettiert. Ein mitgeführter Standard mit definierten DNA-Molekülen erlaubte eine Größenbestimmung des PCR-Produkts (HLII). Die Elektrophorese wurde bei 80-100V für 40-70 Min. in 1x TAE-Puffer in horizontalen Gelelektrophoresekammern durchgeführt. Die Auswertung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei einer Wellenlänge von 312nm.

4.4 RNA-Isolation

Gesamt-RNA für spätere Expressionsstudien mittels Real-Time PCR wurde überwiegend unter Verwendung der Guanidinisothiocyanit/Phenol-Methode mit Hilfe der Substanz

peqGOLD Trifast (peqlab) isoliert. Das Ausgangsmaterial war sowohl kryoasserviertes Gewebe von Tumorproben und murinem Kleinhirngewebe als auch Zelllysate, sodass die Durchführung der Homogenisierung entsprechend angepasst wurde. Die zu analysierenden Zellen wurden nach Entfernung des Mediums und Resuspension in PBS (Phosphate-buffered saline) mit 800µl Trifast Reagenz überschichtet. Vorsichtiges Auf- und Abpipettieren ermöglichte eine Homogenisierung. Per Zellschaber löste sich das Zelllysate und konnte dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Die schockgefrorenen Gewebestücke des murinen Kleinhirns wurden mit 800-1000µl Trifast vermischt (80-800µl/mg Gewebe) und in der Ultra-Turrax Work Station (Ika) homogenisiert. Zell- und Kleinhirngewebe-Homogenat werden zur kompletten Zellaufschlüsselung und Nukleinsäurefreisetzung bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Die Phasentrennung wird durch Zugabe von 160µl Chloroform eingeleitet, die Probe wird kräftig geschüttelt und nach dreiminütiger Inkubation bei RT schließt sich eine Zentrifugation für 10 Min. bei 13.000 rpm/4°C an. Das Probengemisch separiert sich in eine untere rötliche Phenol-Chloroform, eine weiße Interphase aus DNA und Protein sowie eine obere farblos wässrige Schicht. In letzterer hält sich die aquaphile RNA auf, zusammengesetzt aus messengerRNA, transferRNA sowie ribosomaler RNA. Diese Phase wird vorsichtig abpipettiert und in ein weiteres Reaktionsgefäß zur RNA-Ausfällung mit 400µl Isopropanol überführt. Das Gemisch wird kurz geschwenkt, 10 Min. bei 4 °C inkubiert und erneut für 10 Min. bei 13.000 rpm/4°C zentrifugiert. Das hierbei entstandene RNA-Präzipitat stellt sich als gelartiges Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes dar. Zur Präzipitationshilfe kann 1µl RNase-freies Glykogen bei diesem Schritt zugegeben werden. Der Überstand wurde verworfen. Nun kann die RNA durch Zugabe von 800µl 75%igem Ethanol gewaschen werden. Es folgt kurzes Vortexen und eine Zentrifugation von 13.000 rpm/4°C für 10 Min. Erneut wird der Überstand verworfen und der gesamte Waschschritt wiederholt. Das RNA-Pellet konnte nun für einige Minuten lufttrocknen. Anschließend wird die RNA in 20-60µl Nuclease-freiem H₂O resuspendiert. Eine Inkubation bei 57°C erhöht die Löslichkeit. Vor RNA-gerechter Lagerung wird, wie in 4.6 beschrieben, die RNA-Konzentration gemessen.

Zusätzlich wurde das RNeasy-Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben zur RNA-Isolation verwendet. Hierbei werden Prinzipien der selektiven RNA-Bindung einer Silikagel-Membran sowie die Mikrosäulenzentrifugationstechnik angewendet. Innerhalb eines Experiments wurde durchgängig eine Methode der RNA-Extraktion eingesetzt.

4.5 DNase-Verdau

Die zuvor isolierte RNA wird zur Eliminierung einer möglichen Kontamination mit genomischer DNA mit DNase verdaut. Hierfür wurde das DNasefree Kit von Ambion/Applied Biosystems genutzt. 2.2µg RNA wird mit 1µl rekombinanter DNase I sowie 5µl DNase-Puffer versetzt und als Volumen von 50µl nach kurzem Vortexen bei 37°C für 30 Min. inkubiert. Nach Zugabe des DNase Inactivation Reagents erfolgt eine erneute Durchmischung und kurze Zentrifugation bei 13.000 rpm/RT. Der Überstand kann überführt werden.

4.6 Messung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA und RNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260nm (OD₂₆₀) in einem Photometer gegen den jeweils verwendeten Puffer als Referenz gemessen. Die Schichtdicke der Lösung in der Küvette betrug 1cm. Aus der Extinktion wurde durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 1 und dem molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für RNA/DNA die Konzentration der RNA/DNA in der Lösung in µg/µl berechnet. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ wird als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen, die für DNA zwischen 1.6-1.8 und für RNA zwischen 1.8-2.0 definiert ist.

Zur qualitativen Beurteilung einiger RNA-Proben wurde mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers die Integrität (RIN, RNA Integrity Number) der isolierten RNA überprüft.

Mittels kapillarelektrophoretischer Auftrennung und gleichzeitiger Analyse eines Leiters mit definiertem RNA-Gehalt kann ein Fluoreszenzdetektor RNA-Fragmente und Laufzeit registrieren. Das generierte Elektropherogramm fließt in die Bewertung der RNA per RIN (1=komplett degradiert; 10=ohne Degradation) mit ein.

4.7 Reverse Transkription - Synthese von cDNA

Die extrahierte Gesamt-RNA kann nicht direkt als Template für die Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt werden, da sie keine geeignete Matrize für die Polymerase darstellt. So bedient man sich einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die eine zur RNA komplementäre cDNA (komplementäre DNA) synthetisiert. Der sehr geringe mRNA-Anteil (messenger

RNA) der isolierten RNA wird durch die anschließende hohe Amplifikationsrate der cDNA innerhalb der PCR ausgeglichen.

Die reverse Transkription wurde mit dem „High-Capacity cDNA Archive reverse transcription Kit“ der Firma Applied Biosystems, Deutschland gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Durch Einsatz unspezifischer Primer (random primer) wird die Strangsynthese an allen vorhandenen RNA-Molekülen (mRNA, rRNA) gewährleistet. Die komplette RNA wird umgeschrieben und verschiedene Gene können mit unterschiedlichsten Primern untersucht werden.

Pro Reaktion wurden 2.2µg DNase I behandelte RNA in einem 50µl Ansatz eingesetzt. Eine kurze Auflistung des Mastermix ist Tab. 4.7a zu entnehmen. Die Inkubationsbedingungen sind in Tab. 4.7b dargestellt. Die cDNA-Syntheseansätze wurden in einem PCR Cycler zunächst bei 25°C für 10 Min. und dann bei 37°C für 2h inkubiert. Bei 85°C kann die reverse Transkriptase innerhalb von 5 Sekunden inaktiviert werden.

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C. Die so synthetisierten cDNA-Proben dienen in einer 22ng/µl Verdünnung als Matrize für die qRT-PCR (quantitative RealTime PCR).

Reagenz	Volumenmenge
10x RT-Puffer	10µl
25x dNTP-Mix	4µl
10x random Primer 10mM	10µl
MultiScribe RT Enzym (50U/µl)	5µl
RNase-freies H₂O	21µl

Tab. 4.7a Zusammensetzung Mastermix zur cDNA-Synthese

Vorgang	Zeiteinheit	Temperatur
Anlagerung random Primer	10 Min.	25°C
cDNA-Synthese	120 Min.	37°C
Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase	5s	85°C

Tab. 4.7b Inkubationsbedingungen cDNA-Synthese

4.8 Real-Time PCR

Prinzip

Die Real-Time PCR stellt eine Methodik zur Detektion und exakten Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit dar. Grundlage ist die konventionelle PCR, bei der mit nahezu exponentieller Amplifikationsrate eine DNA-Zielsequenz – definiert durch flankierende Primer *in-vitro* – repliziert werden kann. Hierbei erfolgt der semi-quantitative Nachweis von PCR-Produkten erst nach dem Abschluss aller Reaktionszyklen. Wechselnde Aktivität der DNA-Polymerase, Cofaktoren-Verbrauch sowie Zyklenanzahl beeinflussen die Auswertung; nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich. Bei der Real-Time-PCR hingegen finden Amplifikation und Detektion der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß statt. Schon während der exponentiellen Amplifikationsphase wird eine Echtzeit-Quantifizierung ermöglicht [98-100]. Die TaqMan Real-Time PCR eignet sich als Verfahren zur präzisen Untersuchung des Expressionsverhaltens einiger weniger Gene und ist mit ihrer hohen Spezifität und Sensitivität für die vorliegenden Analysen besonders geeignet. Zugrunde liegt eine Kombination aus PCR-Gerät mit integrierter Fluoreszenz-Detektion, spezifischem Oligonukleotid und das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer). Neben den klassischen zwei Primern wird ein drittes sequenzspezifisches Oligonukleotid, die sog. Sonde (engl.: probe) verwendet. Sie hybridisiert zwischen beiden Primern, kann jedoch am 3'Ende über Phosphatgruppenblockade nicht durch die Polymerase verlängert werden [101]. Am 5'Ende befindet sich ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (Fluoreszein-Derivat, FAM) am 3'OH-Ende ein Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat, TAMRA), der das Fluoreszenzsignal des Reporters durch räumliche Nähe unterdrücken kann, das sog. FRET quenching. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit der Zielsequenz. Durch die zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase entfernen sich Reporter und Quencher, detektierbare Fluoreszenz kann emittiert werden [102]. Die dadurch bedingte Fluoreszenzzunahme korreliert mit der Menge neu synthetisierter DNA-Menge und lässt sich leicht quantifizieren, sodass aus diesen Daten die Ausgangsmenge des Templates bestimmt werden kann. Hierfür ist ein signifikantes Fluoreszenzsignal der Probe erforderlich, das aus dem Hintergrundrauschen hervortritt, der sog. Schwellenwert (threshold). Die Zyklenzahl, bei der diese Schwelle übertreten wird, ist als C_t -Wert definiert. Er verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der

DNA-Template-Menge im Reaktionsansatz [103]. Bei konstanter Vermehrungsrate könnte ausgehend vom C_t -Wert auf die ursprüngliche Matrizenmenge geschlossen werden. Aufgrund von verschiedensten beeinflussenden Faktoren wird jedoch häufig die relative Quantifizierung präferiert, bei dem die Veränderungen eines im Gleichgewicht befindlichen Systems analysiert werden [104]. Das Verhältnis von RNA bzw. cDNA in verschiedenen Proben wird bestimmt und kann zudem mit der Gesamt-RNA in der Probe mittels endogener Kontrolle (Housekeeping-Gen) abgeglichen werden [104-106].

Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von *hWTX* in 43 Medulloblastomen sowie in HB- und MB-Zelllinien im Rahmen funktioneller Assays mit Hilfe der TaqMan RealTime-PCR untersucht. Im Weiteren diente murines postnatales Kleinhirn als Ausgangsmaterial für die Analyse einer möglichen entwicklungsabhängigen Genexpression von *mWtx*. *AXIN2* stellt als bekanntes Zielgen des kanonischen Wnt-Signalwegs ein zusätzliches Korrelat dar. Außerdem wurde eine endogene Kontrolle (Housekeeping-Gen) mitamplifiziert. Als endogene Kontrolle sollten ubiquitär vorkommende Gene verwendet werden, die weitgehend konstant im untersuchten Gewebe exprimiert werden. *HPRT* (Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase), *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) sowie *β 2-Microglobulin* wurden als Kandidaten-Referenzgene bezüglich ihrer Expressionsstabilität evaluiert. Dazu wurde die im Internet frei verfügbare Software geNorm VBA verwendet [107]. *HPRT* zeigte die geringste Variation in seiner Expression und diente als Housekeeper für alle unten aufgeführten Quantifizierungen. Durch Normalisierung der Zielgenexpression zur endogenen Kontrolle können Störfaktoren wie differierende PCR-Effektivität minimiert werden. Um die Inter-Assay-Varianz bewusst zu kontrollieren und gegebenenfalls zu minimieren, wurde zusätzlich eine standardisierte Referenz-RNA von Stratagene eingesetzt. Zur Durchführung der Messungen wurde das ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System mit einem 96-well-Block verwendet. Programmierung und Datenverarbeitung erfolgten mit der SDS-Software v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Ein Reaktionsansatz für die TaqMan PCR besteht aus folgenden Komponenten: Matrize (cDNA), Puffer, Primer, Sonde, Magnesium-Ionen, Nukleotiden (dNTPs), Polymerase. Applied Biosystems stellt bereits getestete Primer und Sonden in sog. TaqMan-Assays des gewünschten Gens zur Verfügung (Tab. 4.8a). Der TaqMan® Fast Universal PCR Master

Mix 2x beinhaltet u. a. thermostabile hot start DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs. Das Pipettierschema ist Tab. 4.8b zu entnehmen. Sämtliche Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Gesamtvolumen in einem Well betrug 20µl. Vor Einstellen der Reaktionsplatte in das RealTime PCR-Gerät wurde sie zentrifugiert. Die Reaktionszyklen sind in Tab. 4.8c dargestellt.

Für jede cDNA-Probe wurde dabei mindestens eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei jedem Ansatz lief ein Leerwert mit (gleicher Ansatz ohne cDNA).

Probes	Assay ID
qPCR human Reference Total RNA	750500
TaqMan Assay Wtx mouse	Mm01228902_m1
TaqMan Assay Axin2 mouse	Mm00443610_m1
TaqMan Assay Hprt mouse	Mm00446968_m1
TaqMan Assay beta 2 microglobulin mouse	Mm00437762_m1
TaqMan Assay Wtx human	Hs00403552_m1
TaqMan Assay Axin2 human	Hs00610344_m1
TaqMan Assay HPRT human	Hs99999909_m1
TaqMan Assay beta 2 microglobulin human	Hs99999907_m1
TaqMan Assay GAPDH human	Hs99999905_m1

Tab. 4.8a Auflistung verwendeter ReferenzRNA (Stratagene) sowie TaqMan Assays (Applied Biosystems)

Reagenz	Volumenmenge
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2x	10µl
TaqMan® Gene Expression Assay Mix 20x	1µl
· Forward PCR Primer (18µM)	
· Reverse PCR Primer (18µM)	
· TaqMan Sonde (5µM)	
RNase-freies H₂O	7µl
cDNA (22ng/µl)	2µl

Tab. 4.8b Standardpipettierprotokoll für TaqMan RealTime PCR

Vorgang	Zeiteinheit	Temperatur	Zyklen
Aktivierung Taq Polymerase	20s	95°C	
Denaturierung	1s	95°C	45x
Annealing/ Extension	20s	60°C	45x

Tab. 4.8c Reaktionszyklen der TaqMan RealTime PCR in ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System

Auswertung

Die PCR-Daten wurden durch die Sequence Detection Software v2.3 (SDS, Applied Biosystems) erfasst. Das ABI 7900 HT Fast real-time PCR System ermittelt automatisiert den C_T -Wert (cycle of threshold, Schwellenwert) aus dem optimalen Bereich der linearen Amplifikation als Maß für die cDNA-Menge mit signifikantem Fluoreszenz-Anstieg. Die statistische Analyse der ausgegebenen C_T -Werte wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 v14.x 2010 (Microsoft, USA) und GraphPad Prism v5 (GraphPad Software, CA) ausgeführt.

Die erhaltenen Daten wurden unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode ausgewertet, die eine relative Quantifizierung darstellt und keiner vorherigen absoluten Quantifizierung per Standardkurve bedarf [105, 106]. Hierbei wird eine 100%ige PCR-Effizienz vorausgesetzt. Unter Normalisierung mit einem unregulierten Referenzgen, in dieser Arbeit setzte sich *HPRT* als „best housekeeper“ durch, können die Transkripte unterschiedlicher Gruppierungen miteinander verglichen werden.

Die relative Expressionsregulation errechnet sich aus folgender Formelsammlung:

1. Normalisierung auf die endogene Kontrolle (*HPRT*)

$$\Delta C_T = C_T (\text{GOI}) - C_T (\text{HK})$$

ΔC_T - Differenz der C_T -Werte von reguliertem Gen (Gene of Interest, GOI) und unreguliertem Gen (Referenzgen, Housekeeper, HK)

2. Normalisierung auf die Kontrollgruppe

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Probe}) - \Delta C_T (\text{c})$$

$\Delta\Delta C_T$ - Differenz der ΔC_T -Werte von Probe und Kalibrator (Kontrollgruppe, c)

3. Entlogarithmieren unter Erhalt der relativen Genexpression (fold difference, mRNA ratio, R)

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ - $\Delta\Delta C_T$ wird als Potenz der Basis „2“ entlogarithmiert mit der Annahme einer Verdopplung des Produkts pro PCR-Zyklus

Entsprechend der gewünschten Ergebnispräsentation kann auch die Entlogarithmisierung von Probe und Kalibrator zunächst getrennt erfolgen und anschließend graphisch verglichen beziehungsweise per Quotient ins Verhältnis gesetzt werden [105, 106]. Innerhalb der Datenanalyse wurden bei Mehrfachmessungen Mittelwerte (arithmetisches Mittel, MW), Standardabweichung (standard deviation, SD), Standardfehler (standard error of the mean, SEM) sowie mit geeignetem Test der p -Wert kalkuliert. Der non-parametrische t -Test, auch Mann-Whitney-U-Test war überwiegend adäquat. Die Nullhypothese nach Signifikanztest wurde bei einem p -Wert < 0.05 zurückgewiesen. In den folgenden Abbildungen sind p -Werte wie folgt gekennzeichnet: nicht signifikant $p \geq 0.05$ (n.s.), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ sowie *** $p < 0.001$.

4.9 Mutationssuche mit Hilfe der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse

Prinzip

Die SSCP-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism, Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus) stellt ein Nachweisverfahren für DNA-Mutationen und Polymorphismen dar [108-110]. Zugrunde liegt eine sequenzspezifische Konformation von einzelsträngigen DNA-Fragmenten, die bei elektrophoretischer Auftrennung in einem nicht-denaturierenden Gel ein spezifisches Laufverhalten aufweisen (Abb. 4.9). Die Konformation bzw. die resultierende Migration im Polyacrylamid-Gel (PA) wird neben der Primärsequenz auch durch Temperatur, Polymervernetzungsgrad, Ionenstärke von Gel und Laufpuffer sowie Glycerol beeinflusst. Bereits minimale Sequenzaberrationen wie eine singuläre Basensubstitution können zu Konformationsänderung führen und unter optimierten Bedingungen in der SSCP detektiert werden. Bei einer Fragmentlänge von 150-300 bp wird eine Sensitivität von 70-90% erzielt [111-114]. In dieser Arbeit wurden alle PCR-Amplifikate der zu untersuchenden Proben unter mindestens zwei verschiedenen Bedingungen optimiert und anschließend ausgewertet, um maximale Sensitivität zu erreichen.

Bei den meisten Tumorproben stand keine konstitutionelle Kontroll-DNA des Patienten zur Verfügung. Zur Differenzierung von somatischer Mutation, Keimbahnmutation oder Polymorphismus bei detektierter Mutation wurde die Wildtyp-DNA von 100 Individuen ohne Erkrankung des ZNS oder Tumoranamnese verwendet. Die Visualisierung des eventuell veränderten Laufverhaltens (Shift) erfolgte durch den Farbstoff SYBRGold und wird in

Punkt 4.10 näher erläutert. Proben mit Konformationsänderung wurden verifizierend einer Sequenzierung unterzogen und in Position sowie Art der Mutation detailliert beschrieben.

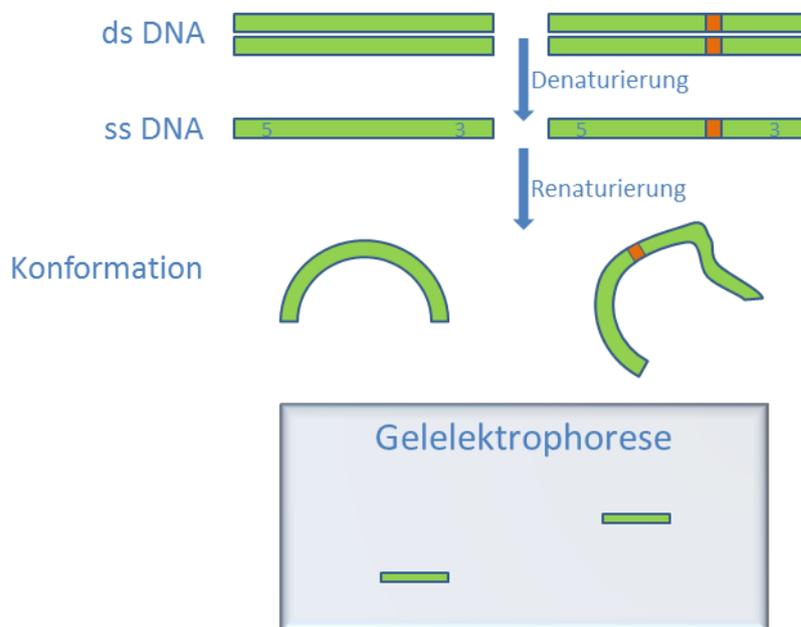


Abb. 4.9 schematische Darstellung des Prinzips der SSCP-Analyse

Durchführung

Für die SSCP-Mutationsanalyse wurden die Exone des *WTX*-Gens in 15 Fragmente mit adäquater Amplikongröße zerlegt und mittels PCR amplifiziert (s. Abschnitt 4.2 (PCR)/ Tab. 4.2c). Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden Polyacrylamidgele aus 40%iger Acrylamid-Lösung (AA), 2% N,N'-Methylen-bis-Acrylamid-Lösung (BAA), 10x TBE und teilweise Glycerol hergestellt. Das AA:BAA Verhältnis sowie der Glycerol-Einsatz differieren für die PCR-Fragmente und sind Tab. 4.9a sowie Tab. 4.9b zu entnehmen. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) katalysiert. Für jedes Gel wurden 20ml Polyacrylamid-Lösung mit 360µl einer 10%igen APS-Lösung sowie 20µl TEMED gemischt und in das Glasplattensystem Multigel-Long der Firma Biometra gegossen. Nach ca. 30 Min. war die Polymerisation der Gele abgeschlossen.

5µl des PCR-Produkts wurden 1:1 mit dem sog. LIS-Gelladepuffer (low ionic strength) gemischt. Dieser SSCP-Ladepuffer zeichnet sich durch eine besonders hohe Sensitivität aus

und besteht aus 0.1g/l Bromphenolblau, 0.1 g/l Xylencyanol, 100g/l Saccharose in 6ml sowie Aqua destillata [115]. Nach Mineralölüberschichtung wurden die Proben bei 95°C für 8 Min. denaturiert (Einzelstrang-Generierung) und anschließend sofort auf Eis gelagert, um eine Renaturierung zu verhindern. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE (tris-borate-EDTA; 89mM Tris-Base; 89mM boric acid, 2mM EDTA (pH=8.3); 5x TBE 200ml + 1,8l H₂O) verwendet. Das Proben-Ladepuffer-Gemisch wurde zur gelelektrophoretischen Auftrennung auf die nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gele bei 60V für 21-25 Stunden geladen.

Gel	conc _{AA} (%) / Vernetzung	5% Glycerol	resultierende Bezeichnung
1	10 / 01:29	-	10%(1:29, BAA:AA)
2	10 / 01:29	+	10%(1:29, BAA:AA), 5% Glycerol
3	10 / 01:49	-	10%(1:49, BAA:AA)
4	10 / 01:49	+	10%(1:49, BAA:AA), 5% Glycerol
5	12 / 01: 49	-	12%(1:49, BAA:AA)
6	12 / 01: 49	+	12%(1:49, BAA:AA), 5% Glycerol
7	14 / 01:99	-	14%(1:99, BAA:AA)
8	14 / 01:99	+	14%(1:99, BAA:AA), 5% Glycerol

Tab. 4.9a Varianz der Gelstocklösungen für die SSCP-Analyse

Fragment	SSCP-Gelbedingung	Amplikonlänge (bp)
1	10%(1:29, BAA:AA), 5% Glycerol	395
	10%(1:49, BAA:AA)	
	12%(1:49, BAA:AA), 5% Glycerol	
2	10%(1:49, BAA:AA)	313
	12%(1:49, BAA:AA), 5% Glycerol	
3	10%(1:49, BAA:AA)	327
	12%(1:49, BAA:AA), 5% Glycerol	
4.1	10%(1:29, BAA:AA), 5% Glycerol	281
	14%(1:99, BAA:AA), 5% Glycerol	
4.2	10%(1:49, BAA:AA)	233
	12%(1:49, BAA:AA), 5% Glycerol	
	14%(1:99, BAA:AA), 5% Glycerol	
5	10%(1:49, BAA:AA)	340
	10%(1:29, BAA:AA)	
	12%(1:49, BAA:AA)	
6	10%(1:29, BAA:AA), 5% Glycerol	399
	12%(1:49, BAA:AA)	
7	10%(1:29, BAA:AA)	381
	12%(1:49, BAA:AA)	

Fragment	SSCP-Gelbedingung	Amplikonlänge (bp)
8	10% (1:29, BAA:AA), 5% Glycerol	360
	12% (1:49, BAA:AA)	
9	10% (1:29, BAA:AA), 5% Glycerol	368
	12% (1:49, BAA:AA)	
10	12% (1:49, BAA:AA), 5% Glycerol	352
	14% (1:99, BAA:AA), 5% Glycerol	
11	10% (1:29, BAA:AA), 5% Glycerol	410
	12% (1:49, BAA:AA)	
12	10% (1:49, BAA:AA)	386
	12% (1:49, BAA:AA)	
13	10% (1:29, BAA:AA)	340
	14% (1:99, BAA:AA), 5% Glycerol	
14	10% (1:29, BAA:AA), 5% Glycerol	197
	10% (1:49, BAA:AA)	
	12% (1:49, BAA:AA)	
	12% (1:49, BAA:AA), 5% Glycerol	

Tab. 4.9b SSCP-Bedingungen der einzelnen WTX-Fragmente

Rezeptur Gelstocklösung –

Beispiel für ein 10%iges PA-Gel, Vernetzung 1:49, +/- 5% Glycerol

Acrylamid 40% (Merck)	49ml
Bisacrylamid 2% (N,N'-Methylene-bisacrylamid, Serva)	20ml
5x TBE (89mM Tris-Base; 89mM boric acid, 2mM EDTA)	20ml
aqua bidest.	ad 200ml
gegebenenfalls Glycerol 5% (Roth)	

je 20 ml Gellösung: 360µl APS 10%
 20µl TEMED

4.10 Färbung der Polyacrylamid-Gele zur SSCP-Analyse

Zur Visualisierung der einzelnen Bandenmuster aus der SSCP-Analyse wurden die PA-Gele mit SYBRGold® gefärbt. Initial wurden die 3 Färbemethoden Silber, SYBRGreen sowie SYBRGold in ihrer Sensitivität und Spezifität getestet. SYBRGold erlaubte mit einer Nachweisgrenze von ca. 40pg je Bande die bestmögliche Auswertung. Der fluoreszierende

Farbstoff interkaliert in die DNA-Fragmente. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel mit ca. 10ml 1x SYBRGold-Lösung (5µl SYBR®/DMSO-Stocklösung ad 50ml 1x TBE, pH 8) gleichmäßig benetzt und ca. 45 Min. inkubiert. Die Banden wurden mit Hilfe des G:Box UV-Transilluminators von Syngene detektiert.

4.11 Sequenzierung

Bei zweimalig positivem SSCP-Ergebnis eines Shifts wurde die zugehörige Probe zur nähereren Beschreibung der Nukleotidsequenz sequenziert. Die Sequenzierung wurde von LGC Genomics AGOWA Sequencing Service Berlin ausgeführt und erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. [116]. Vorbereitend wurde das im Laufmuster veränderte PCR-Amplifikat zunächst enzymatisch aufgereinigt, um Primer, Taq-Polymerase und Salze zu entfernen. Für 5µl PCR-Produkt wurden 1U Exonuclease I und 0,1U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Min. mit anschließender thermischer Inaktivierung bei 85°C für 15 Min. 2µl aufgereinigtes PCR-Produkt konnten nun zusammen mit jeweils 20pmol forward oder reverse Primer verschickt werden. Die von Agowa ermittelten Daten wurden mit der SeqMAN Lasergene Sequence Analysis Software v8.1 (DNA Star Inc., USA/ Germany) analysiert. Datenbanken wie ensembl oder BLAST search wurden in die Auswertung miteinbezogen [117, 118].

4.12 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Prinzip

Die in-situ-Hybridisierung ist eine 1969 erstmals beschriebene molekularbiologische Methodik, die eine Visualisierung bzw. Identifizierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen in Geweben, einzelnen Zellen oder auf Chromosomen ermöglicht [119, 120]. Direkt im biologischen Präparat, also „*in situ*“, wird die Zielsequenz mit Hilfe von einsträngigen sequenzspezifischen Nukleinsäure-Sonden unter Bildung eines Doppelstrang-Hybrids markiert. Nach Art der Signalgebung unterscheidet man die radioaktive Sondenmarkierung und die FISH, bei der Fluorochrome genutzt werden. In dieser Studie wird die indirekte

Detektion über Hapten-konjugierte Nukleotide und Fluorochrom-konjugierte Antikörper angewandt [121-123].

Die in-situ-Hybridisierung wurde zur Untersuchung der gewebs- und zellspezifischen Expression von *Wtx* während der Kleinhirnentwicklung eingesetzt. Auf mRNA-Ebene wurde *Wtx* bezüglich Lokalisation und Expressionsintensität in postnatalen murinen Kleinhirnschnitten analysiert. Dr. Maren Bradtmöller und Katrin Guse danke ich für ihre Unterstützung.

Sonden

Für den Nachweis der mRNA-Moleküle durch die in-situ-Hybridisierung wurden komplementäre RNA-Sonden generiert, die Digoxigenin (DIG)-markiert sind. Hierfür wurde das „DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7)“ (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet.

RNA-Polymerasen wie SP6 oder T7 transkribieren spezifisch die gewünschte Sequenz stromabwärts einer geeigneten Promotorregion. Zur Generierung von RNA-Sonden muss die Sondensequenz als cDNA in einen Plasmidvektor kloniert werden, der Schnittstellen für Restriktionsenzyme und Promotorstellen für die Sp6- oder T7-Polymerase vor bzw. hinter dem Fragment besitzt. Die RNA-Sonde des nicht-kodierenden Strangs („anti-sense“) dient zum Nachweis des Transkripts, während der kodierende Strang („sense“) als Kontrolle zur Einschätzung des unspezifischen Hintergrunds eingesetzt wird.

Zunächst wurde ein 321bp langes *mWtx*-Fragment (cDNA Bp 2473-2792; p5 Bl/6 Zerebellum), welches über EcoRI und SalI kompatible Enden verfügt, durch T4-Ligation in pCR2.1-TOPOK12 (Invitrogen) kloniert. Anschließend erfolgte eine erneute Ligation von pCR2.1-TOPOK12 *mWtx* und pSPT18 (Roche) nach vorherigem Verdau sowie Agarosegel-Extraktion. Minipräparationen, Restriktionsenzymverdau, T4-Ligation, Gelextraktion, Desphosphorylierung sowie die Erzeugung von Überhängen erfolgten nach Herstellerangaben. Dieses so erzeugte Konstrukt konnte linearisiert und aufgereinigt als plasmidale DNA für die *in-vitro*-Transkription eingesetzt werden.

Die Sonden dieser Arbeit wurden von Frau Dr. Maren Bradtmöller und Katrin Guse zur Verfügung gestellt.

Durchführung

Vorbereiten der Schnitte und Prähybridisierung

Die bei -80°C gelagerten 8µm dicken koronaren Kryostatschnitte des murinen Kleinhirns von C57Bl/6 Mäusen wurden zunächst ca. 1h bei RT (Raumtemperatur) aufgetaut und mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 5 Min. fixiert. Nach kurzem Spülen in 2x SSC und anschließendem DEPC-H₂O wurden die Präparate für 13 Min. in 0,1M Triethanolamin pH8 mit einer Endkonzentration von 0,25% Essigsäureanhydrid acetyliert. Die Dehydratisierung erfolgte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe. Zur Belegung unspezifischer Bindestellen wurde eine Prähybridisierung mit der Heringssperma ssDNA enthaltenden Hybridisierungslösung (Hyb-Mix) für 1h in einer Feuchtkammer durchgeführt (Tab. 4.12).

Hybridisierung und Detektion

Mit einer Konzentration von 0.5-3ng/µl wurde aus Sonden-RNA und Hyb-Mix ein Sonden-Mix hergestellt und dieser bei 90°C für 5 Min. zur Reduktion der Sekundärstrukturen denaturiert. Die getrockneten Proben wurden mit 150µl Sonden-Mix beschichtet, mit einem Deckglas abgedeckt und mit DPX luftblasenfrei versiegelt. Die Hybridisierung fand bei 55°C für 16h in einem Hybridisierungssofen statt. Am nächsten Tag wurden nach Entfernung des Deckgläschens mindestens zweimal 2x SSC für jeweils 10 Min. gewaschen. Die Inkubation in RNase-Puffer bei 37°C für 15 Min. dient dem Abbau nicht hybridisierter, einzelsträngiger RNA. Zuletzt folgen drei stringente Waschschrte mit in 2x SSC für 20 Min., in 1x SSC mit 2% H₂O₂ für 15 Min. sowie wiederholt in 1x SSC (Tab. 4.12).

Die Detektion der Sonde wurde mit dem TSA Cyanine Cy3 System von Perkin Elmer (TSA, Tyramide Signal Amplification) durchgeführt (Raap et al., 1995). Einem kurzen Waschen der hybridisierten Kryostatschnitte in TNT Puffer schloss sich die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen per TNB-Puffer für 30 Min. bei RT an. Nun konnten die Präparate mit anti-DIG-HRP (Roche), 1:1000 verdünnt in TNB-Puffer für 2h bei RT inkubiert und wiederholt in TNT-Puffer gewaschen werden. Die Signalamplifikation erfolgte mit 50-100µl Fluorophor-konjugiertem Tyramid, 1:50 verdünnt in „Fluorophore Amplification Working Solution“ für 30 Min. Abschließend wiederholtes Waschen in TNT-Puffer.

Als Gegenfärbung wurde die DAPI-Kernfärbung (4,6-Diaminidino-2-Phenylindol) gewählt. Mit Shandon Immu-Mount (Thermo Scientific) wurden die Objektträger feucht eingedeckelt. Zur Dokumentation wurde das Axio Observer Z1 Immuno-Fluoreszenz Mikroskop sowie die Axio Vision Imaging Software von Carl Zeiss benutzt.

Lösung	Bestandteil	Menge
Fixierungslösung 4% PFA in PBS pH 7,4	Paraformaldehyd	10g
	NaOH	1,1g
	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	6g
	DEPC-H ₂ O	250ml
20x SSC Stock pH 7,0	NaCl	175,3g
	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	88,2g
	DEPC	1ml
	MilliQ-H ₂ O/ dd H ₂ O	ad 1000ml
DEPC-H₂O	0.1% DEPC	
	dd H ₂ O	100ml
Acetylierungspuffer	0.1 M Triethanolamin pH 8	13,3ml
	HCl 37%	60 Tropfen
	dd H ₂ O	ad 1000ml
Hybridisierungslösung/ Hyb-Mix	20x SSC	10ml
	Formamid	25ml
	50x Denhardts Reagenz	1 ml
	50% Dextransulfat	10ml
	10 mg/ml ss Heringssperma-DNA	2,5ml
	10mg/ml Hefe-t-RNA	0,5ml
RNase-Puffer	50 mM NaCl	
	10 mM Tris/HCl pH8	
	1 mM EDTA pH 8,0	
	16 µg/ ml RNase A	
TNT-Waschpuffer pH 7,5 Perkin Elmer (TSA-System)	0.1 M TRIS-HCl, pH 7.5	
	0.15 M NaCl	
	0.05% Tween 20	
TNB – Blocking-Puffer pH7,5 Perkin Elmer (TSA-System)	0.1 M TRIS-HCl, pH 7.5	
	0.15 M NaCl	
	0.5% Blocking Reagenz	
1x SSC mit 2% H₂O₂	20x SSC Stock pH 7,0	10ml
	30% H ₂ O ₂	13,3ml
	dd H ₂ O	ad 200ml

Tab. 4.12: Bedarfslösungen der in-situ Hybridisierung

4.13 Zellkultur

Allgemeine Bedingungen

Für diese Arbeit wurden sieben verschiedene humane Tumor-Zelllinien in Kultur gehalten. Die Versorgung der Zellen erfolgte in sterilen Zell-Kultur-Flaschen, die eine Fläche von

25 cm² sowie 75 cm² umfassten. Alle Zelllinien wurden bei 37°C unter 5% CO₂ in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in einem Inkubator (HERA/ Heraeus, ThermoScientific) mit den in Tab. 4.13 aufgelisteten Medien kultiviert. Auf den Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet. In einem Intervall von zwei Tagen wurde das Nährmedium durch frisches, auf 37°C erwärmtes Nährmedium ersetzt.

DAOY/ R300/ UW228/ UW473	D283med/ HepG2/ HUH6
Dublecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4.5g/l), L-Glutamine	RPMI 1640, L-Glutamine, Phenol Red
10% Fetales Bovines Serum (FBS)	10% Fetales Bovines Serum (FBS)
	1mM Natrium-Pyruvat
Ø Antibiotika-Zugabe	Ø Antibiotika-Zugabe

Tab. 4.13 zellspezifische Nährmedien

Auftauen und Kryokonservierung

Die in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagerten Zelllinien wurden zur Kultivierung in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in 9ml des vorgewärmten Mediums überführt. Zur Entfernung des zytotoxischen DMSO (Dimethylsulfoxid) wurde die Suspension bei 1.000 rpm für 5 Min. abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen. Bereits nach 24h erfolgte der erste Mediumwechsel zur endgültigen DMSO-Beseitigung. Die Menge an Zellmedium wurde entsprechend der Kulturflaschengröße gewählt (2ml für kleine Flasche 25cm², 7ml für große Flasche 75cm²). Zur Kryokonservierung wurde das Nährmedium aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen mit erwärmtem PBS vorsichtig gewaschen. So konnten alte Mediumreste sowie Zelltrümmer entfernt werden. Die Inkubation mit 1-2ml 1x Trypsin/EDTA (Ethylenediaminetetraessigsäure) bei 37°C im Brutschrank löste die Zellen nach ca. 2-3 Min. ab, der definitive Zeitpunkt wurde lichtmikroskopisch bestimmt. Durch Hinzugabe einer ausreichenden Menge an Zellmedium, welches Trypsin-Inhibitoren beinhaltet, konnte die Enzymreaktion beendet werden. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1.000 rpm für 5 Min. abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Einfriermedium (Nährmedium mit 10% DMSO & 10% FBS) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde in einem mit Isopropanol befüllten Einfrierbehälter auf -80°C abgekühlt. So kann eine langsame und stetige Abkühlung von

ca. $-1^{\circ}\text{C}/\text{Min}$. erreicht werden. Nach einem Tag können die Proben in flüssigen Stickstoff zur langfristigen Aufbewahrung überführt werden.

Passagieren von Zellen

In der exponentiellen Wachstumsphase bei einer 60-80%igen Konfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen und eine optionale Subkultivierung. Hierfür wurde das Kulturmedium verworfen. Mit erwärmten PBS wurden die Zellen gewaschen und durch Zugabe von Trypsin gelöst. Nach kurzer Inkubation im Brutschrank kann die 1x Trypsin/EDTA-Wirkung mit Hilfe von Nährmedium aufgehoben werden. Die Zellen resuspendieren durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und zurückbleibende Zellen innerhalb der Kulturflasche können mit aufgenommen werden. Per Zentrifugation bei 1.000 rpm für 5 Min. entsteht ein Zellpellet, welches unter Verwerfen des Überstands in frischem Zellmedium resuspendiert werden kann. Zur Subkultivierung werden die Zellen in Kulturflaschen der gewünschten Größe überführt. Alternativ kann eine Kryokonservierung erfolgen.

4.14 Stimulation mit Wnt3a

Bei den uns verfügbaren Medulloblastom-Zelllinien liegt ein inaktivierter kanonischer Wnt-Signalweg vor. Das Protein Wnt3a fungiert als Ligand und führt über eine Akkumulation von β -Catenin zur *TCF*-abhängigen Transkription [55, 124, 125]. Mit Hilfe dieses Funktionsassays kann die Expression spezifischer Zielgene im Zustand des inaktivierten sowie aktivierten Wnt-Signalwegs untersucht werden. Um ein mögliches Confounding (confounding variable, Störfaktor) zu minimieren, wurden mit DAOY, UW473 sowie R300 drei verschiedene MB-Zelllinien getestet. Der Versuch startete bei einer Konfluenz von 60% und wurde in 6well-Platten (6er Lochplatte) mit 2ml Kulturmedium/well durchgeführt. Als Medium wurde DMEM mit hohem Glucose-Anteil und Glutamin, hier aber ohne Zugabe von FBS/FCS, verwendet. Das Protein Wnt3a stand in lyophilisierter Form zur Verfügung (R&D systems, Minneapolis, USA) und wurde in PBS mit einer Konzentration von $50\text{ng}/\mu\text{l}$ gelöst. Die Stimulation des Wnt-Signalwegs erfolgte mit 100ng Wnt3a bei einer Expositionszeit von 24h bzw. 48h. Die Menge der Proteinzugabe wurde optimiert und die Zeiträume der Zelllinie entsprechend angepasst. Medium und gegebenenfalls Protein wurden jeweils nach 24h

erneuert. Sowohl Negativ-Kontrolle als auch Wnt3a-behandelte Zellen erfuhren gleiche Kulturbedingungen. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion mit Trizol (vgl. 4.4) sowie die quantitative Real-Time PCR (vgl. 4.8) zur Analyse der exprimierten Gentranskripte.

4.15 Transfektion

Prinzip

Die Transfektion bezeichnet den nicht-viralen Transfer von genetischer Information bzw. Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Neben physikalischen Techniken wie Elektroporation stellt auch der liposomale Gentransfer, die Lipofektion eine erprobte Methode zur Überwindung der Zellmembran dar. Hierbei wird die Wechselwirkung der anionischen Nukleinsäuren (hydrophil, Phosphatreste) und der kationischen amphipatischen Lipid-Moleküle der Transfektionsreagenz unter Bildung des sog. Lipoplex (Liposomen-DNA-Komplex) genutzt [126, 127]. Diese mizell-ähnlichen Komplexe ermöglichen nun per Fusion bzw. endozytischer Aufnahme die Inkorporation der Fremd-DNA in die Zelle [126, 128, 129]. Die temporäre Einschleusung der DNA mit Hilfe von Vektoren (Plasmide) in eukaryontische Zellen bewirkt eine hohe episomale Kopienzahl und somit eine starke Expression der auf den Plasmiden kodierten Gene. Limitierend ist jedoch der Abbau der Fremd-DNA durch zelluläre Nukleasen, sodass bereits nach wenigen Tagen die Expression der auf transfizierten DNA kodierten Gene stark abnimmt. Diese als transiente Transfektion bezeichnete Methode wird in dieser Arbeit für den Gentransfer von *dnTCF4 ΔN31* in HepG2-Zellen eingesetzt. HepG2 entstammt einem hepatozellulären Karzinom und verfügt über einen aktivierten Wnt-Signalweg [91-93]. Die hierbei vorliegende *TCF-4*-abhängige Transkription kann mit Hilfe von dominant-negativem *TCF-4*, bei dem N-terminal 31 Aminosäuren (AS) fehlen, verhindert werden [130-132].

Durchführung

Zur funktionellen Untersuchung stand die kodierende Region des *dnTCF4 ΔN31* in einem pcDNA3.1 HisB Vektor zur Verfügung (Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn). Als Negativ-Kontrolle wurde bei allen Versuchen mit dem Leerplasmid (mock) pGL3-Basic reporter (Promega) transfiziert (Tab. 4.15). Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) mit einer Ratio von 1:2 verwendet. Die zu

transfizierenden Zellen wurden in Antibiotika-freiem Medium in 6well-Platten so ausgesät, dass nach 18-24h Inkubation eine initiale Konfluenz von etwa 80% bestand. Die Transfektion erfolgte in Antibiotika- und Serum-freiem Medium. Hierzu wurden zunächst die Zellen mit RPMI 1640 ohne FCS/ FBS mehrmals gewaschen und anschließend der Transfektionsmix mit frischem Medium hinzugegeben. Das DNA-Lipofectamine-Gemisch wird zuvor in zwei separaten Reaktionsgefäßen vorbereitet und nach guter Vermischung für 30 Min. bei RT inkubiert. Pro Kavität liegt folgende Zusammensetzung zugrunde:

Plasmid-Ansatz: 1.25ml RPMI 1640, L-Glutamine, Phenol Red
 5µg DNA
 5µl PLUS™ Reagent

Lipofectamine-Ansatz: 1.25ml Basalmedium
 10µl LIPOFECTAMINE™ LTX Reagent

Innerhalb dieses Zeitraums können sich die DNA-Lipidkomplexe formieren. Der Transfektionsmix konnte nun auf die HepG2-Zellen gegeben werden und die Zellen bei 37°C sowie 5% CO₂ für 4h inkubieren. Der Transfektionsansatz wird abgenommen und mit 2ml RPMI 1640, 10% FBS pro Vertiefung ersetzt. 24h post Transfektion erfolgt die Expressionsanalyse mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR nach vorheriger RNA-Extraktion der entsprechenden Zellen sowie reverser Transkription in cDNA (vgl. 4.6 bis 4.8). Neben dem Gene of Interest (GOI) *WTX* analysierten wir auch die Expression von *AXIN2*, einem bekannten Zielgen des Wnt-Signalwegs und daher geeignet als Effizienzkontrolle der Transfektion [53, 133].

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Restriktions-enzym	Literatur
pcDNA3.1 HisB dn Tcf4	dn Tcf4 in pcDNA3 Expressionsvektor	Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Bonn/ Invitrogen	BamHI	[131, 132, 134]
pGL3-Basic	Luciferase Reporterplasmid	Promega		

Tab. 4.15 verwendete Transkriptionsvektoren

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis von somatischen *WTX*-Mutationen im Medulloblastom

In etwa 15% der Medulloblastome sind durch eine Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionswegs gekennzeichnet [7-10]. Ursache einer solchen Aktivierung sind Mutationen in Genen, die für Zielproteine des Wnt-Signalwegs kodieren. Bislang sind Mutationen insbesondere in *β-CATENIN* sowie seltener in *APC*, *AXIN1* sowie *AXIN2* (*CONDUCTIN*) beschrieben [16, 17, 61-65]. *Wtx* als Tumorsuppressor und Teil des β -Catenin-Degradierungskomplexes stellt einen vielversprechenden Kandidaten zum weiteren Verständnis des Wnt-Medulloblastoms dar. Mutationen in *WTX* selbst sind bisher im Wilms Tumor, der Osteopathia striata sowie vereinzelt bei der akuten myeloischen Leukämie und im kolorektalen Karzinom gefunden worden [40, 66, 70-73].

In dieser Arbeit soll zunächst nachgewiesen werden, ob Medulloblastome Mutationen im *WTX*-Gen aufweisen, die ursächlich für eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs sein könnten. Mit Hilfe der SSCP-Analyse wurden 67 Medulloblastome auf *WTX*-Mutationen untersucht.

Im Untersuchungskollektiv konnten insgesamt 5 Mutationen via SSCP-Methode und anschließender Sequenzierung in verschiedenen Medulloblastomen nachgewiesen werden.

3 dieser 5 Mutationen sind somatische Mutationen, da diese Veränderungen in 100 Kontrollproben (DNA aus Blut von 100 Individuen ohne Erkrankung des ZNS oder Karzinomanamnese) nicht detektiert werden konnten.

Eine zusammenfassende Übersicht des Mutationsscreenings ist, unterteilt nach somatischen sowie stummen Mutationen, in Tab. 5.1a bzw. Tab. 5.1b zu finden.

Probe	Geschlecht/ Alter (J)	Histo	Exon/ cDNA	Codon	Mutation (Sequenz)	Wnt ↑	<i>CTNNB1</i> - Mutation
E6	f/ 13	klassisch	2/ 85	29	GCC (Ala) → ACC (Thr) heterozygot	Expression Axin2↑	nein
G8	f/ 3,1	klassisch	2/ 2876	959	CCT (Pro) → CTT (Leu) heterozygot	nukleäre Akkumulation β -Catenin	nein
A10	f/ 11	klassisch	2/ 1680	560	CGG (Arg) → CAG (Gln) homozygot	-	nein

Tab. 5.1a Somatische *WTX*-Mutationen innerhalb des Medulloblastomkollektivs

Probe cMB E6, die Biopsie eines 13jährigen Kindes mit klassischem Medulloblastom (cMB), zeigt eine somatische Mutation in Fragment 2 (Abb. 5.1a). Die extrahierte DNA wurde nach Amplifikation des spezifischen *WTX*-Segments sequenziert und weist hier einen heterozygoten Basenaustausch GCC → ACC im Codon 29 auf. Hieraus resultiert an Position c.85 ein Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin (Tab. 5.1a).

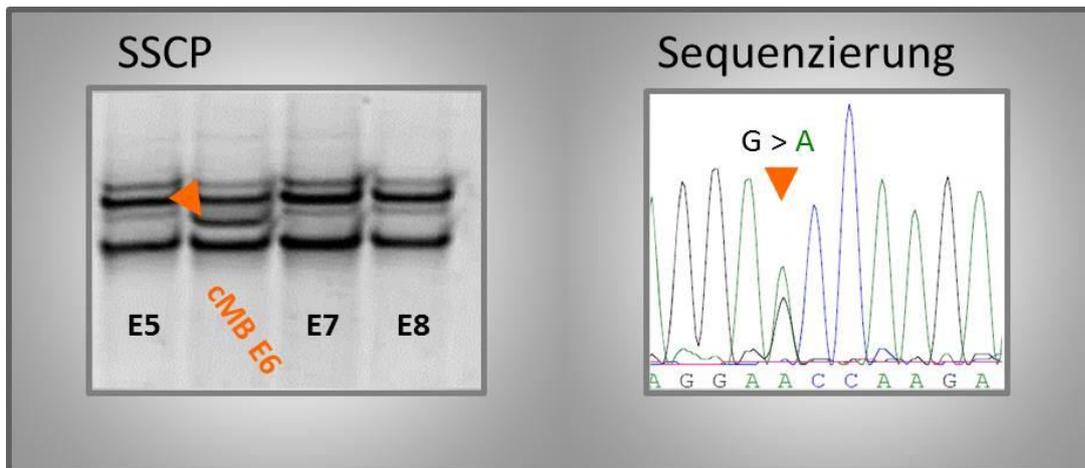


Abb. 5.1a *WTX*-Mutation in Probe cMB E6;
links Bandenshift im SSCP-Gel nach SYBRGold-Färbung;
rechts Chromatogramm der heterozygot mutierten Sequenz GCC → ACC

Eine weitere somatische Mutation wurde in Fragment 8 von Biopsie cMB A10 detektiert (Abb. 5.1b). Die Sequenzierung der extrahierten DNA ergab eine homozygote Punktmutation CGG → CAG an Position c.1680 mit der Folge eines Aminosäureaustauschs von Arginin zu Glutamin (Tab. 5.1a).

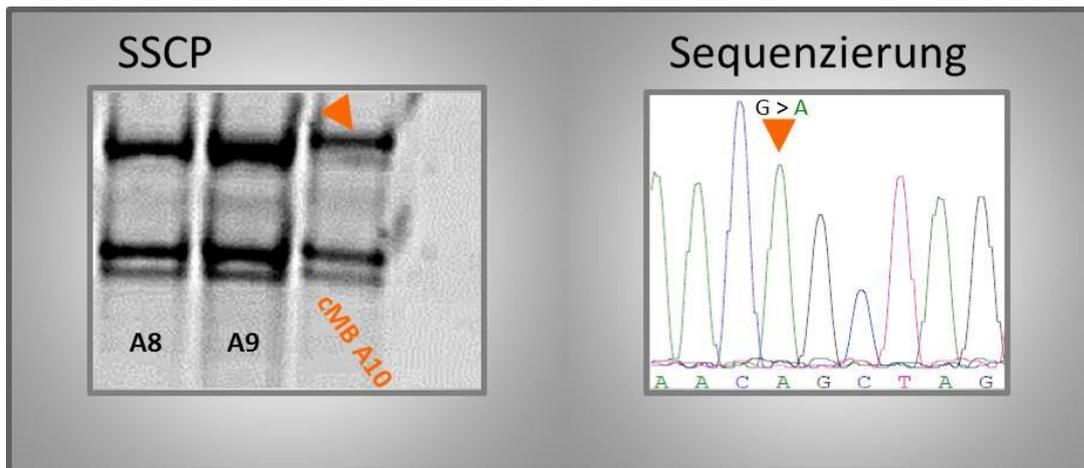


Abb. 5.1b *WTX*-Mutation in Probe cMB A10; links Bandenshift im SSCP-Gel nach SYBRGold-Färbung; rechts bestätigende homozygot mutierte Sequenz CGG → CAG im Chromatogramm

Die dritte somatische Mutation bildete sich in der SSCP-Analyse im Fragment 12 der Probe cMB G8 ab (Abb. 5.1c). Die Punktmutation CCT → CTT ist heterozygot an Position c.2876 und tauscht Prolin gegen Leucin aus (Tab. 5.1a). Die Patientin ist ein 3jähriges Mädchen mit klassischem Medulloblastom.

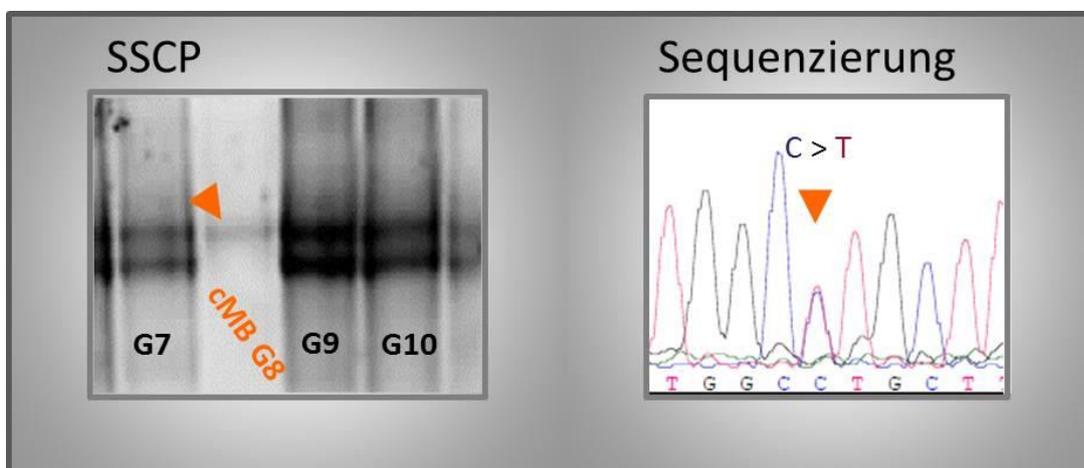


Abb. 5.1c *WTX*-Mutation in Probe cMB G8; links Bandenshift im SSCP-Gel nach SYBRGold-Färbung; rechts heterozygot mutierte Sequenz CCT → CTT im Chromatogramm

Weiterhin konnten zwei SNPs (single nucleotide polymorphism; SNP) in Fragment 2 von Probe dMB A4 sowie Probe cMB A6 nachgewiesen werden (Abb. 5.1d), die keinen Aminosäureaustausch bedingen (stumme Mutation). Beide Punktmutationen befinden sich im Codon 45 und kodieren Serin. Die Probe A4 stammt von einem desmoplastischen MB (dMB) einer 17jährigen Frau und beinhaltet eine heterozygote Mutation TCC → TCT. Probe A6, ein klassisches MB eines 12jährigen Patienten, zeigt den Basenaustausch beide Allele betreffend (Tab. 5.1b).

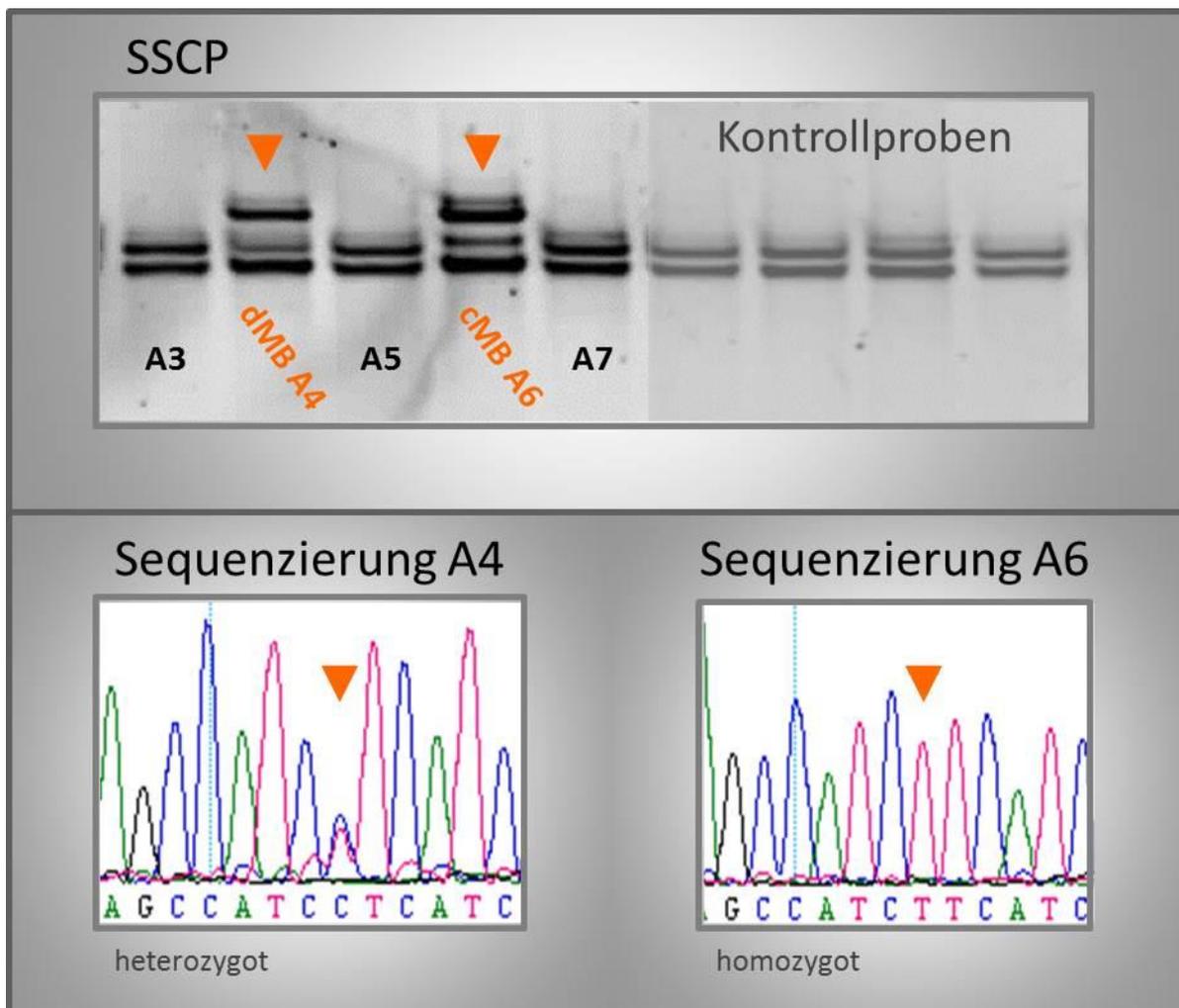


Abb. 5.1d Polymorphismen des *WTX*-Gens innerhalb des Tumorkollektivs;
 oben Bandenshift im SSCP-Gel nach SYBRGold-Färbung;
 unten Sequenzen des mutierten Bereichs von Probe A4 sowie A6

Bei diesen stummen Alterationen handelt es sich um einen bereits bekannten Polymorphismus rs 34504794, der mit einer Allelfrequenz von 0.028 bzw. 0.011 in der Normalbevölkerung

auftritt [135]. Die Allelhäufigkeit in diesem Patientenkollektiv unterscheidet sich unter Verwendung des zweiseitigen Chi²-Tests nicht signifikant.

Probe	Geschlecht/ Alter (J)	Histologie	Exon/ cDNA Position	Codon	Mutation (Sequenz)	refSNP
A4	f/ 17	desmo- plastisch	2/ 135	45 (Serin)	TCC (S) → TCT (S) heterozygot	rs 34504794
A6	m/ 12	klassisch	2/ 135	45 (Serin)	TCC (S) → TCT (S) homozygot	rs 34504794

Tab. 5.1b Polymorphismen des *WTX*-Gens innerhalb des Tumorkollektivs

5.2 Expressionsanalyse von *WTX* in Medulloblastomen - Expressionsunterschiede zwischen Tumor und Kontrollgewebe

Die verminderte Expression eines Tumorsuppressorgens wie *WTX* kann ursächlich für die Entstehung von Tumoren sein. Zum Nachweis einer möglichen Regulation von *WTX* in Medulloblastomen und dem Einfluss einer solchen *WTX*- Regulation auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs in Medulloblastomen wurde eine Expressionsanalyse von *WTX* in 43 humanen MB-Proben mittels quantitativer TaqMan Real-Time PCR durchgeführt.

RNA aus nicht-neoplastischem Kleinhirngewebe verschiedener Altersgruppen diente als Kontrolle. Bewusst wurde die Kontroll-RNA in einem breiten Altersspektrum angelegt und im Weiteren differenziert beurteilt, um die Expression von *WTX* im Kleinhirngewebe unterschiedlichen Alters bestimmen und mit der Expression im Tumorgewebe vergleichen zu können. Stellenweise wurde eine Zuordnung in die Gruppen „fetal“ und „adult“ vorgenommen, sie ist der Tab. 4.1a zu entnehmen. Mittels Real-Time PCR konnte zunächst gezeigt werden, dass *WTX* in Medulloblastomen exprimiert wird. Definiert man die analysierte Tumorkohorte als homogene Gruppe, so variiert die Expression des *WTX*-Transkripts innerhalb dieser erheblich (Abb. 5.2a).

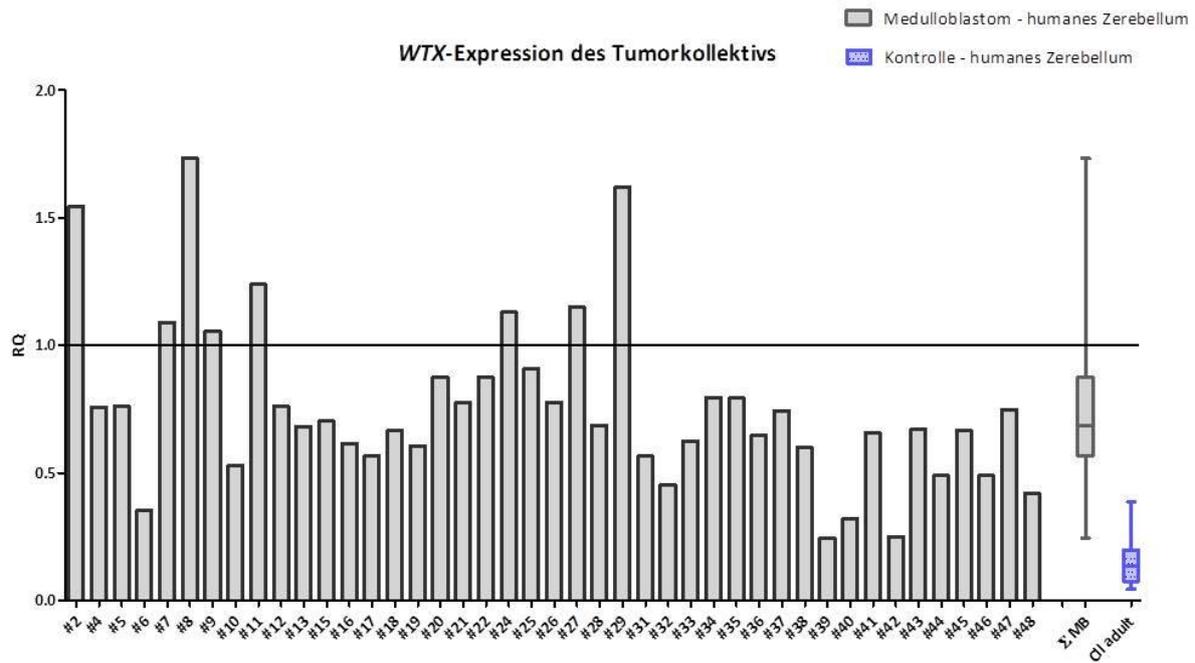


Abb. 5.2a Übersicht über die Expression des *WTX*-Transkripts in Medulloblastomen; RQ-Berechnung bezieht sich auf *WTX*-Expression in fetalem Kontrollgewebe; rechtsseitig die zerebellären Kontrollen der adulten Proben (CII adult)

Beim Medulloblastom handelt es sich um einen embryonalen Tumor, das tumorigene Ereignis kann bereits während der Embryogenese auftreten. Vor diesem Hintergrund möglicher Aktivitätsunterschiede des Wnt-Signalwegs wurde eine Kontrollgruppe gewählt, die nicht nur adultes bzw. postnatales, sondern auch fetales Gewebe berücksichtigt.

Die Alterskorrelation bestätigt die gewählte Zuordnung „fetal“ sowie „adult“. Alter und *WTX*-Transkript korrelieren gegenläufig (Korrelationsfaktor nach Spearman $r=-0,6667$; $p=0,0415^*$, Abb. 5.2b). Die fetalen Gewebeproben werden durch die Altersangabe <0 Jahre im Diagramm dargestellt. Hervorzuheben sind die extrem geringen Expressionswerte von *WTX* bereits ab dem dreijährigen Probanden. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür stellt die Abhängigkeit der Wnt-Signalaktivität vom Stadium der embryonalen Kleinhirnentwicklung dar.

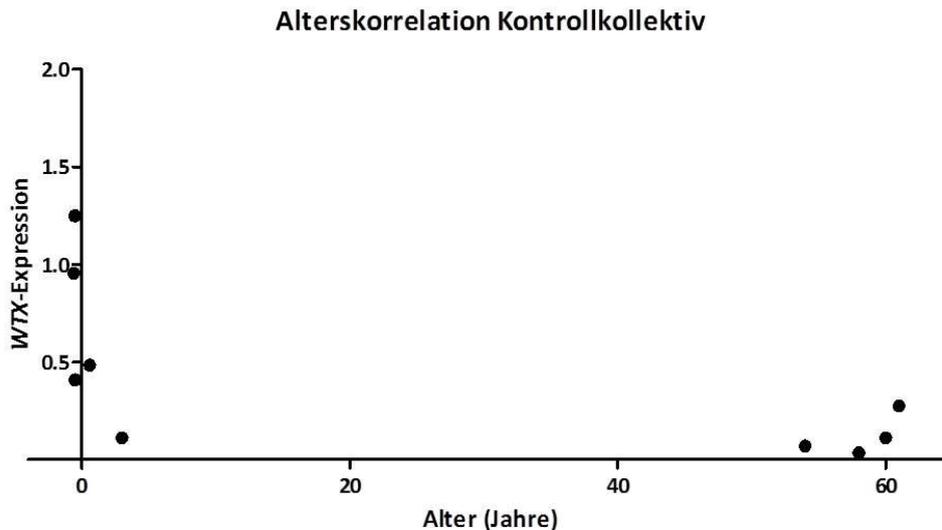


Abb. 5.2b Alterskorrelation der *WTX*-Expression im zerebellären Kontrollkollektiv

Nach der separaten Analyse des Kontrollgewebes konnten die einzelnen Gruppen in Bezug zueinander gesetzt und miteinander verrechnet werden. Die Gruppe der 43 MB zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Expression von *WTX* in der fetalen Kontrollgruppe (Abb. 5.2c). Korreliert man die *WTX*-Expression im Tumor mit adultem Kleinhirngewebe, zeichnet sich eine starke Überexpression im Tumorgewebe ab. Der non-parametrische Mann-Whitney-Test spiegelt einen p -Wert $<0,0001^{***}$ zwischen *WTX*-Expression Medulloblastombiopsie und adulte gesunde Probanden wider. Interessanterweise zeigen einige Medulloblastom-Proben ähnlich hohe Expressionswerte von *WTX* wie fetales Kleinhirngewebe der Kontrollgruppe.

Die Hinweise der Signalweg-abhängigen sowie pathogenetisch beeinflussenden Regulation des *WTX*-Transkripts sollten sich in einer Untersuchung zur Zielgenregulation des Wnt-Signals bestätigen. Hierzu wurde die Genexpressionsanalyse auf *AXIN2* in einer bewusst gewählten Gruppe von 12 Tumor-Samples und Kontrollproben erweitert. Die Expression von *AXIN2*, einem bekannten Marker der Aktivierung des Wnt-Signalwegs [53, 133], unterstreicht die Beobachtungen der *WTX*-Expression und zeigt vergleichbare Trends. *WTX* und *AXIN2* sind in der fetalen Kontrollgruppe stark exprimiert, während das adulte Zerebellum nur noch eine schwache Expression aufzeigt.

Dies deutet auf eine wesentliche Rolle des *WTX*-Gens und folglich des Wnt-Signalwegs in der zerebellären Entwicklung.

Aus diesen Ergebnissen folgte fortan die Korrelation der *WTX*-Genexpression in MB mit der fetalen Kontrollgruppe, um die angenommene Signalweg-Aktivierung abzubilden. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass eine $\Delta\Delta CT=1$ einen angeschalteten Wnt-Signalweg darstellt (s. auch Abb. 5.2a).

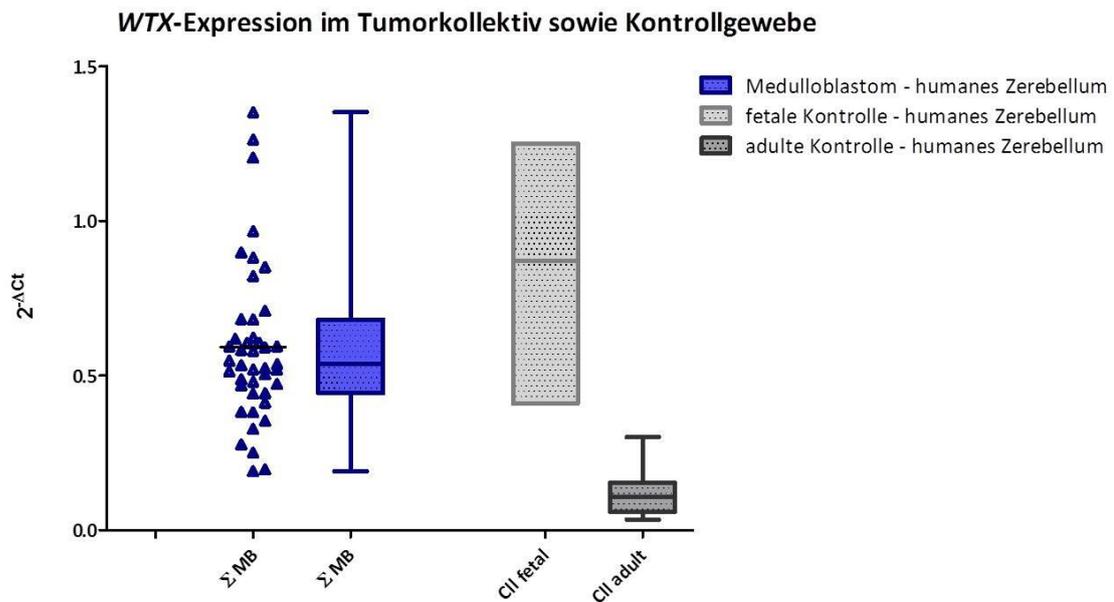


Abb. 5.2c Übersicht über die Expression des *WTX*-Transkripts im Tumorkollektiv sowie in adultem und fetalem Kontrollgewebe

Dennoch ist der Tumor tatsächlich heterogen in seiner Pathogenese und zumindest die histopathologische Entität sowie der Wnt-Subtyp sollten evaluiert werden, um einen möglichen Einfluss bzw. Confounding auszuschließen. Eine Subklassifikation in den im Wnt-aberrierten MB häufig vorkommenden klassischen Typ sowie die verbleibenden histologischen Medulloblastomtypen ergab keine signifikanten Unterschiede. Da auch Medulloblastome der SHH-Gruppe sowie Typ3 und 4 mitunter den histologisch klassischen Typ aufweisen, wäre eine Unterscheidung in der Transkriptexpression nicht zu erwarten.

5.3 Bedeutung der detektierten *WTX*-Mutationen sowie Varianzen des *WTX*-Transkripts für die Wnt-Signaltransduktion in Medulloblastomen

In 3 von 67 Medulloblastomen (4,5%) konnten somatische Punktmutationen im *WTX*-Gen nachgewiesen werden (Tab. 5.1a). Zur Einordnung der funktionellen Relevanz dieser Mutationen für eine mögliche Signalwegaktivierung wurde eine β -Catenin-Immunhistochemie durchgeführt, da eine nukleäre β -Catenin Akkumulation eine Wnt-Aktivierung belegt. Darüber hinaus wurde eine Expressionsanalyse des direkten Wnt-Zielgens *AXIN2* durchgeführt, ebenfalls als Ausdruck einer Überaktivierung des Wnt-Signalwegs.

Von der Probe cMB E6 mit Basenaustausch in Codon 29 Ala>Thr konnte keine Immunhistochemie durchgeführt werden, da kein entsprechendes Paraffinmaterial verfügbar war. Alternativ wurde die Expression von *AXIN2* bestimmt. Die Expression von *AXIN2* mRNA ist stark erhöht im Vergleich zu humanen zerebellären Kontrollen, dies deutet auf eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs in der Tumorprobe hin (Tab. 5.3).

Anders stellte es sich bei der *WTX*-Mutation an Position c.1680 in Biopsie cMB A10 dar. Hier konnte keine Überexpression von *AXIN2* festgestellt werden.

cMB G8 wies eine somatische Mutation von *WTX* in Codon 959, Pro \rightarrow Leu auf. Die Immunhistochemie für β -Catenin zeigt eine β -Catenin-Akkumulation im Nukleus und belegt somit die Aktivierung des Wnt-Signalwegs in dieser Tumorprobe (Abb. 5.3).

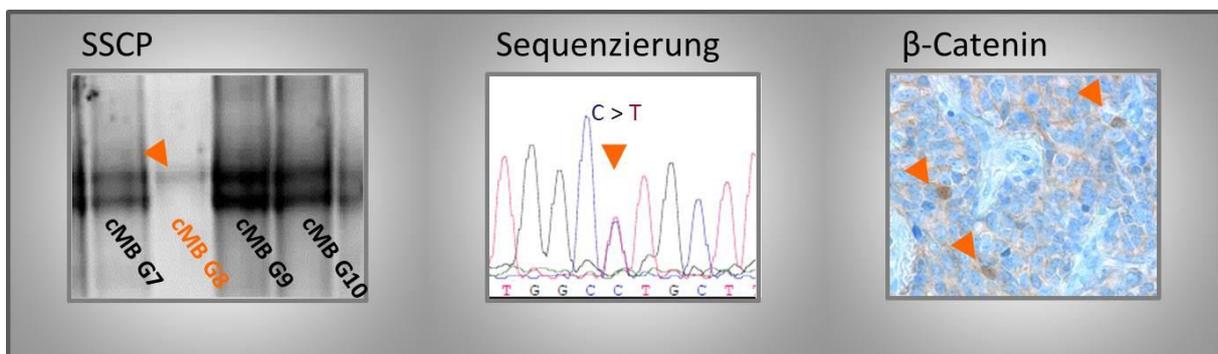


Abb. 5.3 *WTX*-Mutation in Probe cMB G8; links verändertes Laufverhalten der Tumorprobe im SSCP-Gel; mittig Nachweis der Mutation CCT > CTT mittels Sequenzierung; rechts Tumorprobe cMB G8 weist eine nukleäre β -Catenin Akkumulation (Immunhistochemie) als Ausdruck einer Wnt-Aktivierung auf

Somit konnte in 2 von 3 Medulloblastomen mit *WTX*-Mutation eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs nachgewiesen werden.

Als in der aktuellen Wissenschaft häufigste Ursache für Wnt-Medulloblastome wird die β -*CATENIN*-Mutation benannt. Um eine Mutation im β -*CATENIN*-Gen als Ursache einer pathologischen Wnt-Aktivierung in diesen Tumorproben auszuschließen, wurde zusätzlich ein Mutationsscreening der HotSpot-Region von β -*CATENIN* durchgeführt. Mit Hilfe der SSCP- und Sequenzierungsanalyse konnten allerdings in den Medulloblastomen mit *WTX*-Mutationen keine β -*CATENIN*-Mutationen detektiert werden. Dies unterstreicht die funktionelle Relevanz der *WTX*-Mutation.

In der Kohorte des Mutationsscreenings konnte in zwei Fällen (dMB C7 sowie cMB D9) eine Mutation im β -*CATENIN*-Gen und konsekutiver Wnt-Transduktion identifiziert werden, die *WTX*-Expression ist vergleichbar einer Wnt-Aktivierung (Tab. 5.3). In der Probe cMB D9 wird die Wnt-Aktivität zusätzlich durch die deutlich erhöhte *AXIN2*-Expression unterstrichen (Tab. 5.3).

Probe		<i>WTX</i>		β - <i>CATENIN</i>	<i>AXIN2</i>
		Gen-sequenz	mRNA Regulation (RQ)	Gen/Protein	mRNA Regulation (RQ)
dMB A4	#26	SNP	0,776		
cMB A6	#5	SNP	0,762		
cMB E6	#15	Mutation	0,702		↑ (4,75)
cMB G8	#90	Mutation		nukleäre Akkumulation	
cMB A10	#44	Mutation	0,489		↘ (0,280)
cMB D9	#22	-	0,876	Mutation	↑ (6,343)
dMB C7	#34	-	0,79	Mutation	
cMB D10	#6	-	0,353		↑ (4,574)

Tab. 5.3 Übersicht über die Veränderungen von Gensequenz und Expression von *WTX*, β -*CATENIN* und *AXIN2*

Eine Expression von *AXIN2* kann durch diverse Komponenten des Signalwegs reguliert werden. Innerhalb der Pathogenese vom Medulloblastom können zudem eine Vielzahl von Aberrationen auf unterschiedlichsten Ebenen die Zielgenexpression beeinflussen. Demnach zieht eine Hochregulation von *AXIN2* nicht zwangsläufig eine starke Transkriptdetektion des *WTX*-Gens nach sich, selbst wenn eine Abhängigkeit besteht. In der Gruppe der 12 Proben konnte eine *AXIN2*-Hochregulation in drei Medulloblastom-Patienten festgestellt werden. Eine detaillierte Beschreibung ist Tab. 5.3 zu entnehmen.

Die vorbenannte Probe cMB D9 ist zudem β -*CATENIN*-mutiert und zeigt eine verstärkte Expression von *WTX* mRNA. Ebenso überexprimiert ist *AXIN2* in cMB D10, allerdings ist

hier ein vermindertes *WTX*-Transkript quantifiziert worden. Außerdem hat die in Punkt 5.1 bereits beschriebene *WTX*-Mutation der Probe cMB E6 eine starke *AXIN2*-Expression und somit eine erkennbare Wnt-Aktivierung. Die *WTX*-Expression scheint nur leicht erhöht.

5.4 *mWtx*-Expression in der postnatalen Entwicklung des murinen Kleinhirns - deutliche Hochregulation von *mWtx* im frühen postnatalen Stadium

Der hochkonservierte Wnt-Signalweg agiert im Rahmen der Zelldifferenzierung, Proliferation und Zellkommunikation nicht nur im fetalen, sondern auch im adulten Gewebe [24]. Zur näheren Untersuchung der Rolle von *Wtx* innerhalb der Kleinhirnentwicklung mit Fokus einer möglichen Entwicklungsphasen-abhängigen Komponente wurde eine Real-Time PCR Expressionsanalyse von *Wtx* und dem bereits beschriebenen Wnt-Zielgen *Axin2* in murinen Kleinhirngeweben unterschiedlichen postnatalen Alters durchgeführt. Hierfür wurde murines Kleinhirngewebe der postnatalen Phase p3 bis p13 (p=postnataler Tag) sowie von adulten C57Bl/6 Mäusen verwendet. Die gezielte entwicklungsabhängige Analyse sollte unter Bildung von drei Subgruppen und statistisch haltbarer Aussagekraft erfolgen: p3 bis p9 bilden die frühe postnatale Gruppe, p10-13 die späte postnatale und p>60 die adulte Altersgruppe.

Das *mWtx*-Transkript ist in den ersten neun postnatalen Tagen mehr als 2fach erhöht verglichen mit der *mWtx*-Expression im adulten murinen Kleinhirn (RQ(p3-9)=2.288).

Die spät postnatalen Proben zeigen mit einer 1.8fachen *mWtx*-Expression zwar noch eine deutliche Hochregulation von *mWtx*, deuten aber bereits auf den negativen Trend der Genregulation hin. Das *mWtx*-Transkript nimmt mit zunehmendem Alter ab.

mAxin2 unterstreicht diesen Trend mit signifikanten Expressionsunterschieden, wenn auch mit einer - verglichen mit murinem *Wtx* - nicht so starken Hochregulation in früh- sowie spätpostnataler Phase (RQ(p3-9)=1,882; RQ(p10-13)=1,609).

mWtx-Expression in postnatalem murinen Zerebellum

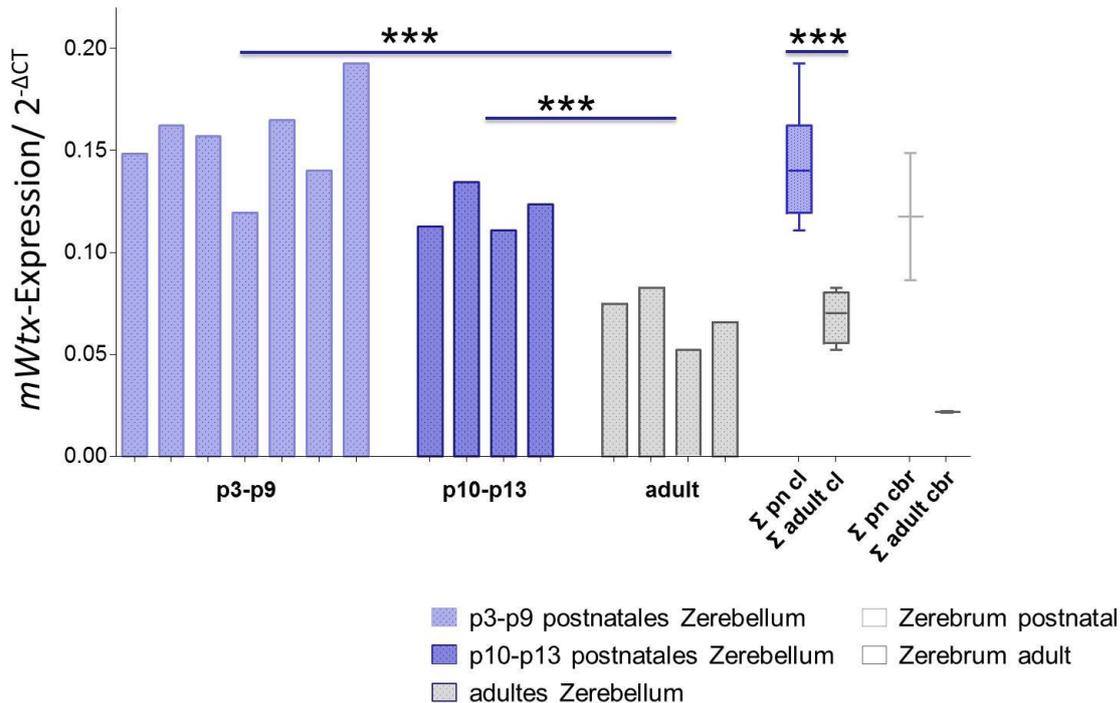


Abb. 5.4a postnatale Regulation von murinem *Wtx* in Abhängigkeit der Kleinhirngenesse; p=postnataler Tag, cl – Zerebellum, cbr- Zerebrum

Diese absoluten gruppenspezifischen Werte sollten anschließend aufgeschlüsselt werden, um spezifisch die *Wtx*-Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kleinhirnentwicklung zu veranschaulichen. Hierbei wurden die RQ-Werte der Entwicklungsuntergruppen separat bzw. unabhängig voneinander aufgeführt (Abb. 5.4a). Neben dem signifikanten Unterschied der Genexpression zwischen beiden postnatalen Gruppen und der adulten spiegelt die Zeitachse auch einen klaren Trend der „down“-Regulation von murinen *Wtx*-Transkripten bei fortschreitender Kleinhirnentwicklung wider. Obwohl *mWtx* in der gesamten postnatalen Phase hochreguliert ist, gibt es auch einen signifikanten Unterschied zwischen früher und später postnataler Phase ($p=0,0121$). In Abbildung 5.4b wird die lineare Regression dargestellt.

Stichproben von zerebralem Mausgewebe zeigten ebenso unterschiedliche Expressionsmuster von *mWtx* sowie *mAxin2* in den einzelnen Entwicklungsstadien (Daten hier nicht weiter aufgeführt).

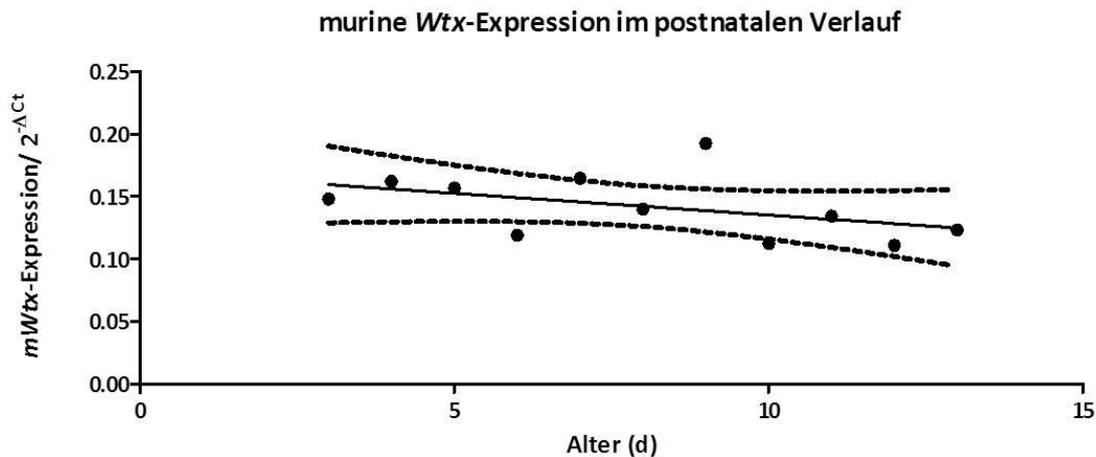


Abb. 5.4b Alterskorrelation der *Wtx*-Expression im murinen Kleinhirn während der postnatalen Entwicklungsphase

5.5 *mWtx*-Aktivität während der murinen Kleinhirngnese - *mWtx*-Expression zeigt sich stark erhöht im frühen postnatalen Stadium in EGL, IGL sowie der Purkinjzellschicht

Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung soll die in 5.4 beschriebene, Kleinhirnentwicklungsstadien-abhängige *Wtx*-Expression bestätigt und darüber hinaus die zellspezifische Lokalisierung der *Wtx*-Aktivität im murinen Kleinhirngewebe untersucht werden. Die mRNA von *Wtx* wurde bezüglich Lokalisation und Expressionsintensität in murinen Kleinhirnschnitten unterschiedlicher postnataler Stadien analysiert. Abb. 5.5b zeigt repräsentativ die zerebellären Sagittalschnitte in p7 bis p100 für *mWtx* sowie HE- und DAPI-Färbung.

Die HE-Färbung sowie die DAPI-Gegenfärbung illustrieren den früh postnatal, noch vierschichtig aufgebauten Cortex des Kleinhirns mit einer deutlich erkennbaren äußeren Körnerzellschicht (siehe auch hierzu beispielhaft HE-Färbung des Zerebellum an p7, Abb. 5.5a). Im Verlauf der postnatalen Genese des Kleinhirns ist der Übergang in die spätere Dreischichtung zu erkennen. p100 stellt die adulte Kontrolle dar. Hier ist die äußere Körnerzellschicht bereits komplett verschwunden. Im adulten Zerebellum wurde keine *mWtx*-Expression detektiert.

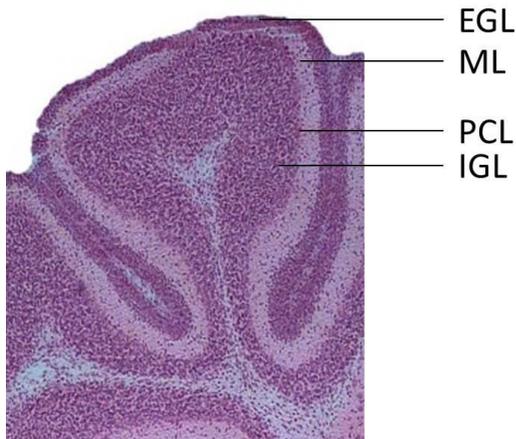


Abb. 5.5a sagittaler Querschnitt von murinem Zerebellum an p7 mit einer für das frühe postnatale Alter noch gut zu erkennenden äußeren Körnerzellschicht; EGL – External Granular Cell Layer (äußere Körnerzellschicht), ML- Molecular Cell Layer (molekulare Zellschicht), PCL – Purkinje Cell Layer (Purkinjezellschicht), IGL – Internal Granular Cell Layer (innere Körnerzellschicht)

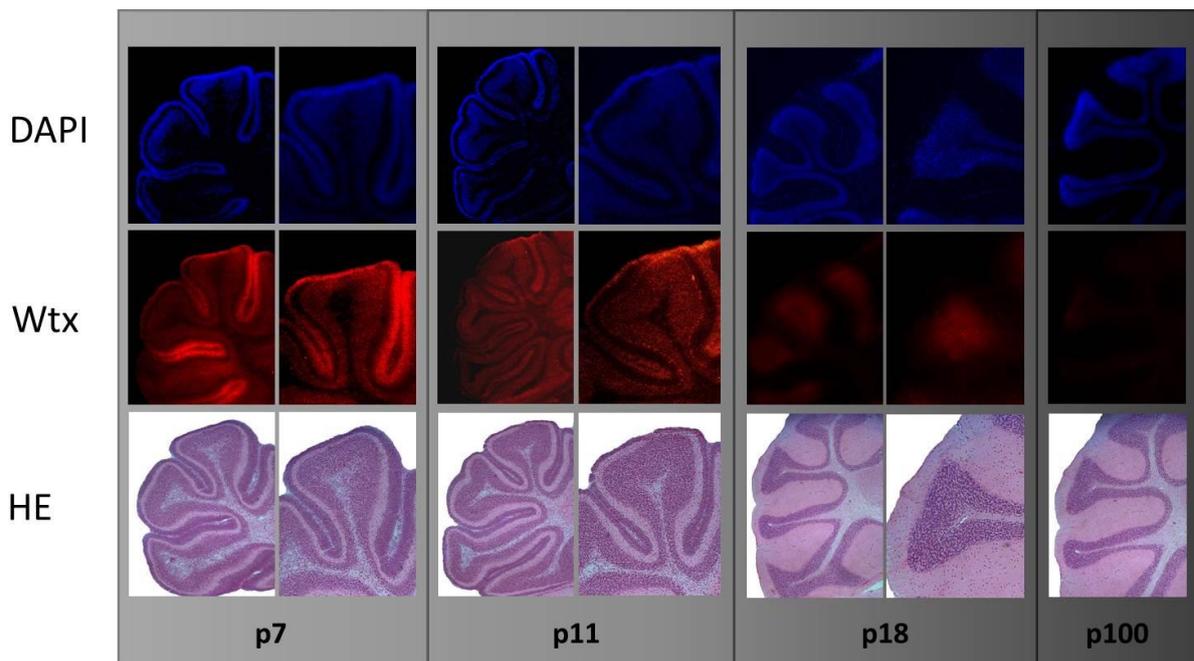


Abb. 5.5b Raum-Zeit-abhängige Detektion von murinem *Wtx* innerhalb der Kleinhirnentwicklung (postnatal Tag 7 bis 100); starkes *mWtx*-Signal in der früh postnatal ausgebildeten EGL sowie IGL und Purkinjezellschicht, kein *mWtx*-Transkript im adulten Kleinhirn. Zerebelläre Sagittalschnitte nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von *mWtx* sowie H&E-Färbung und DAPI-Gegenfärbung.

p7 lässt ein starkes Signal des *Wtx*-Transkripts erkennen, es wird mit zunehmender Kleinhirndifferenzierung sukzessiv geringer bis an Tag 100 keine *Wtx*-Expression mehr nachweisbar ist. Dies bekräftigt die Resultate der semiquantitativen TaqMan Real-Time PCR Expressionsanalyse einer früh postnatal starken *Wtx*-Expression im murinen Kleinhirn, die in der späten postnatalen Phase abnimmt und im adulten Zerebellum kaum noch detektierbar ist. Die äußere Körnerzellschicht bildet ein sehr starkes Signal des *Wtx*-Transkripts in p7, einem Stadium der maximalen Proliferation der granulären Vorläuferzellen, ab und ist kongruent mit der Rückbildung der EGL weiterhin stark, aber leicht reduziert in p11 und nicht mehr vorhanden in p18 und p100. Außerdem zeigt die IGL in p7 und p11 eine hohe *Wtx*-Expression. In der vergrößerten p11-Ansicht kann sehr gut die Purkinjzellschicht mit sehr intensivem *Wtx*-Signal differenziert werden. Die molekulare Zellschicht spiegelt kaum eine Aktivität von *Wtx* mRNA wider.

Als Komponente des Wnt-Signalwegs deutet die *Wtx*-Signalstärke in EGL, IGL sowie Purkinjzellen in p7, leicht reduziert in p18 auf die zentrale Funktion des Wnt-Signalwegs in der postnatalen Entwicklung des murinen Kleinhirns hin.

5.6 Tumorzelllinien mit aktivierter Wnt-Transduktion zeigen eine Überexpression von *WTX*

Die erhöhte Expression von *WTX* und des Wnt-Zielgens *AXIN2* im fetalen humanen Kleinhirngewebe sowie die *WTX*-Überexpression in Medulloblastomen mit β -*CATENIN*-Mutationen und konsekutiver Wnt-Signalaktivierung deuten auf eine zentrale Funktion des *WTX*-Gens innerhalb des Wnt-Signalwegs hin. Diese Hypothese sollte durch funktionelle Expressionsanalysen an humanen Tumorzelllinien mit und ohne konstitutive Wnt-Aktivierung gestützt werden. Hierfür wurde eine ergänzende RT PCR Analyse des *WTX*-Transkripts in verschiedenen Wnt-inaktiven Medulloblastom- (D283med, DAOY, UW228, UW473) sowie Wnt-aktiven HCC/Hepatoblastom-Zelllinien (HepG2, HUH6) durchgeführt. Als direktes Zielgen der *TCF/LEF*-vermittelten Transkription wurde das bekannte *AXIN2* als Marker der aktivierten Wnt-Signalkaskade benutzt. Abb. 5.6 zeigt die relative Transkriptexpression von *WTX* und *AXIN2* in Wnt-aktiven sowie Wnt-inaktiven humanen Tumorzellen.

Wie erwartet zeigt *AXIN2* in beiden Zelllinien HepG2 und HUH6 mit konstitutiv aktivem Wnt-Signalweg eine sehr hohe Expression, während es in den MB-Zellen ohne Wnt-

Aktivierung nicht vermehrt exprimiert ist. Analog hierzu verhält sich die Expression von *WTX* in den untersuchten Zelllinien. Die Medulloblastom-Zellen ohne Wnt-Aktivierung zeigen eine geringe *WTX*-Transkription, während die Wnt-aktiven Hepatoblastom-Zellen signifikant erhöhte *WTX*-Transkripte aufweisen ($p < 0,005$). Trotz der heterogenen Expression innerhalb der jeweiligen Zelllinien –z.B. DAOY und D283med–, ist der geringste Expressionsunterschied zwischen Wnt-inaktiver und Wnt-aktiver Zelllinie eine 4fach Erhöhung von *WTX*. Das Zielgen *AXIN2* zeigt dennoch eine stärkere Transkriptregulation in Abhängigkeit der Wnt-Signaltransduktion.

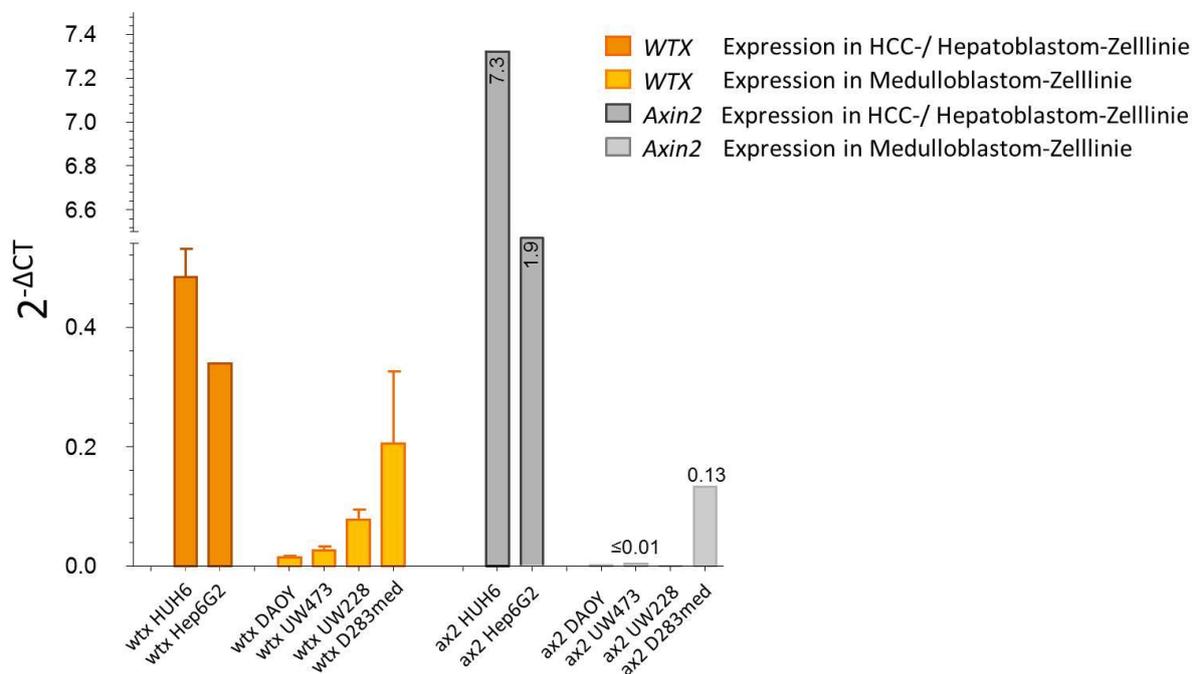


Abb. 5.6 Wnt-aktivierte Tumorzelllinien (HUH6 und HepG2) zeigen eine starke Überexpression von *WTX* und *AXIN2* im Gegensatz zu Tumorzelllinien ohne endogen aktivierten Wnt-Signalweg

5.7 Aktivierung der Wnt-Signalkaskade in Medulloblastomzellen führt zu keinem signifikanten Expressionsunterschied des *WTX*-Transkripts

Die *in-vitro* Analysen an humanen Tumorzelllinien zeigten, dass *WTX* in Tumorzellen mit aktiviertem Wnt-Signalweg verstärkt exprimiert wird. Um nachzuweisen, ob *WTX* wie *AXIN2* ein direktes Zielgen des Wnt-Signalwegs ist, wurde der Wnt-Signalweg in endogen Wnt-

inaktiven Medulloblastomzellen mit Hilfe des Liganden Wnt3a aktiviert und die Expression von *WTX* bestimmt. Hierbei führt das Protein Wnt3a als Ligand und Aktivator von Wnt über die Akkumulation von β -Catenin zur *TCF*-abhängigen Transkription. Die Medulloblastomzelllinien DAOY sowie R300 wurden für 24h bzw. 48h unter gleichen Bedingungen mit Wnt3a behandelt und anschließend die Expression von *WTX* sowie *AXIN2* als interne Kontrolle gemessen. Die Wnt-stimulierten Tumorzellen wiesen sowohl nach 24h als auch nach 48h im Gegensatz zur Hochregulation von *AXIN2* keine signifikant erhöhte *WTX*-Expression auf (Abb. 5.7).

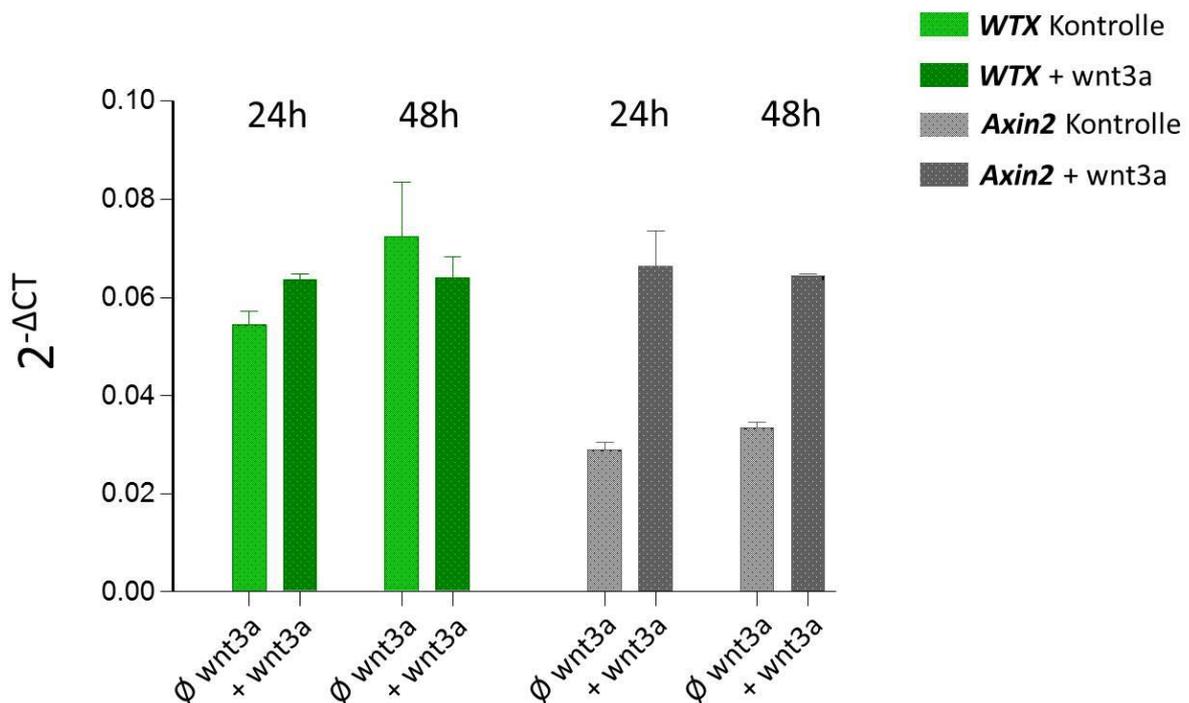


Abb. 5.7 Expression von *WTX* und *AXIN2* in Wnt3a-stimulierten MB-Zellen; keine Regulation des *WTX*-Transkripts trotz Wnt-Stimulation

5.8 Keine Regulation des *WTX*-Transkripts nach Inhibition der Wnt-Signalkaskade durch dominant-negatives *TCF-4* in Zellen des hepatozellulären Karzinoms

Der Wnt-Signalweg sollte durch transiente Transfektion humaner HepG2-Zellen mit konstitutiver Wnt-Aktivität inhibiert und anschließend eine mögliche Regulation der *WTX*-Expression untersucht werden [91, 92]. Die Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pGL3-Basic reporter oder mit dominant negativem *TCF-4* Δ N31 in einem pcDNA3.1 HisB Vektor sowie Lipofectamine 2000 transfiziert. Dominant negatives *TCF-4* kann durch das N-

terminale Fehlen von 31 AS nicht mit β -*CATENIN* interagieren und so die *TCF-4*-abhängige Transkription des aktiven Wnt-Signalwegs unterbinden [131, 134, 136]. Nach 48h Transfektion wurden laut Standardprotokoll die Expressionslevel der extrahierten RNA mit qRT PCR ermittelt. Wie Abb. 5.8 zeigt, ist das Transkript des bekannten Wnt-Zielgens *AXIN2* nach Transfektion stark vermindert. Im Vergleich zur Transfektion mit Leervektor, reduziert sich die *AXIN2*-Expression bei transfiziertem dn *TCF-4* um circa das dreifache. Dies impliziert einen eindeutigen signifikanten Effekt der β -*CATENIN*/ *TCF*-abhängigen Transkription von *AXIN2*.

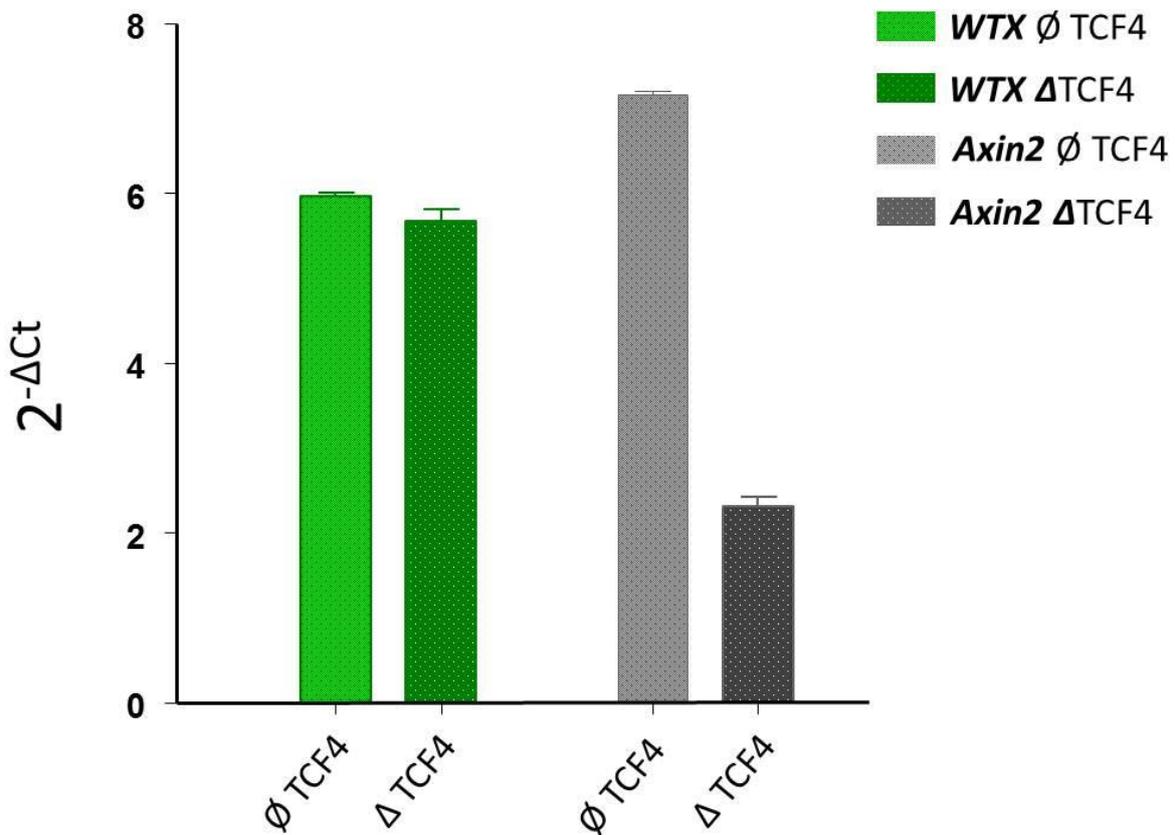


Abb. 5.8 mRNA-Expression von *WTX* und *AXIN2* in HepG2 Zellen mit aktiviertem Wnt-Signalweg sowie nach Transfektion mit dominant negativem *TCF4*, t=48h; keine Regulation des *WTX*-Transkripts durch Wnt-Inaktivierung

Hingegen lässt *WTX* in unserem Versuch keine Expressionsunterschiede zwischen Leervektor und dominant negativem *TCF-4*-Vektor erkennen. So scheint das *WTX*-Transkript unabhängig von einer transkriptionellen Aberration der Wnt-Kaskade durch dn *TCF-4*.

6 Diskussion

6.1 Mutationsanalyse des Wilms Tumor Suppressor Gens *WTX* in Medulloblastomen

Das Medulloblastom ist ein hochmaligner embryonaler Hirntumor des Kindesalters, der sich sowohl morphologisch als auch durch sein molekulares Profil in unterschiedliche Gruppen subtypisieren lässt. Neben der in der WHO-Klassifikation für Hirntumore aufgeführten histopathologischen Einteilung in eine klassische, desmoplastische, extensiv-noduläre und großzellig/anaplastische Variante haben sich mittels genomweiter Mutations-, Expressions- sowie epigenomweiter Methylierungsanalysen vier molekulare Medulloblastomsubtypen (Shh-, Wnt-, Gruppe 3-, Gruppe 4-Medulloblastome) herauskristallisiert [8, 9, 11, 137-141].

Im Fokus dieser Arbeit steht die Gruppe der Wnt-Medulloblastome, die durch eine Aktivierung des Wnt-Entwicklungskontrollsignalwegs gekennzeichnet sind. Eine wesentliche diagnostische Grundlage zur Identifizierung der Wnt-Medulloblastome ist die Akkumulation des β -Catenin-Proteins innerhalb der Tumorzellkerne. β -Catenin fungiert als Schlüsselprotein der Wnt-Signaltransduktion und als Marker für eine pathologische Wnt-Aktivierung in der Tumorzelle. Gegenwärtig werden für die Einordnung „Medulloblastom der Wnt-Subgruppe“ unter anderem auch die Immunohistochemie von DKK1, ein Mutationsscreening von *CTNNB1* (β -*CATENIN*), die Monosomie 6 sowie Genexpressionssignaturen verwendet [7, 9, 10, 20]. Der aktuelle Konsensus deklariert jedoch keine dieser Methoden als eindeutigen Goldstandard [11]. Etwa 10-20% der (sporadischen) Medulloblastome sind durch eine Wnt-Signalwegsaktivierung gekennzeichnet [16, 64]. Bisher wurden als Ursache der Wnt-Signalaktivierung Mutationen des Protoonkogens *CTNNB1* sowie Gene, die für Elemente des β -Catenin-Degradationskomplexes wie *AXIN1*, *AXIN2* und *APC* kodieren, identifiziert [16-18, 61-65, 142]. Gleichwohl ist in vielen Wnt-Medulloblastomen der Mechanismus der Wnt-Aberration immer noch ungeklärt.

Das Tumorsuppressorgen *WTX*, das für ein Gerüstprotein und Interaktionspartner des zentralen β -Catenin-Degradationskomplexes kodiert, ist ein weiterer potentieller Kandidat, der an der Entstehung des Medulloblastoms beteiligt sein könnte [39, 67, 69]. Aus diesem Grund sollte zunächst ein Mutationsscreening klären, ob somatische *WTX*-Mutationen in Medulloblastomen nachweisbar sind und ob diese Mutationen eine funktionelle Relevanz in der Aktivierung des Wnt-Signalwegs haben.

Unter Verwendung der SSCP- sowie anschließender Sequenzierungsanalyse wurden insgesamt 67 sporadisch entstandene Medulloblastome untersucht. Insgesamt konnten in fünf verschiedenen Tumoren Mutationen detektiert werden, zwei davon stellen einen bereits beschriebenen Polymorphismus rs 34504794 dar. Somatische Mutationen des *WTX*-Gens konnten in drei verschiedenen Medulloblastomproben identifiziert werden. Die homozygote Punktmutation Arg560Gln aus Tumorprobe A10/#44 befindet sich in der β -*CATENIN*-Bindungsregion (Position c.1680) des *WTX*-Gens. Da Material zur Immunhistochemie nicht verfügbar war, wurde eine *AXIN2*-Expressionsanalyse der Probe durchgeführt, in der keine veränderte *AXIN2*-Expression zu erkennen war. Hingegen konnte die funktionelle Relevanz der somatischen Mutation Ala29Thr in E6/#15 durch *AXIN2*-Überexpression entsprechend einer Wnt-Aktivierung bestätigt werden. Die Mutation befindet sich in der N-terminalen Phospholipid-Bindungsdomäne von *WTX*. Diese Region ist eine zentrale Domäne für die Aktivierung der Wnt-Transduktion und Phosphorylierung von LRP6 [67]. Die dritte somatische Mutation Pro959Leu aus der Tumorprobe G8 ist in der Prolin-reichen Region sowie der β -*CATENIN*-Bindungsregion lokalisiert. Immunhistochemisch liegt eine nukleäre β -Catenin-Akkumulation vor. Diese stellt aktuell den diagnostischen Goldstandard einer Wnt-Aktivierung dar und belegt die funktionelle Relevanz der Mutation.

Erstmals wurde *Wtx* 2007 im Rahmen einer Studie zum genetischen Hintergrund des Wilms Tumor, einem embryonalen mesenchymalen Tumor der Niere beschrieben [40]. In 7-29% der Wilms Tumoren findet man inaktivierende somatische Mutationen des Tumorsuppressors *WTX* [70, 71, 143]. Zumeist ist das gesamte *WTX*-Gen deletiert, ein Drittel der *WTX*-aberrierten Tumoren weisen trunkierende Mutationen oder selten Punktmutationen auf. Spezifisch für die trunkierenden Mutationen scheint die β -*CATENIN*-Bindungsregion: über eine nicht stattfindende Degradierung und somit Stabilisierung des β -Catenins kommt es zur Wnt-Signalaktivierung. Trunkierende Mutationen bzw. Deletionen des gesamten *WTX*-Gens konnten in den 67 untersuchten Medulloblastomen durch mögliche Generierung der einzelnen Gen-Fragmente mittels PCR und Laufverhalten im SSCP-Gel ausgeschlossen werden.

Interessanterweise sind für eine Subgruppierung des Wilms Tumors die Mutationen von *WTX* funktionell irrelevant – die Daten deuten darauf hin, dass Differenzierungsstatus bzw. Entwicklungsstadium der Niere und funktionelle Auswirkung einer *WTX*-Mutation korrelieren [144, 145]. Keimbahnmutationen des *WTX* Gens verursachen die seltene Erkrankung Osteopathia striata congenita mit kranialer Sklerose (OSCS) [66]. Die aktivierte Wnt-Kaskade führt über eine Knochendysplasie zu Hyperostosen mit Makrozephalie,

kranialer Sklerose und verschiedenen anderen angeborenen Anomalien. Jenkins et al. postulieren die OSCS als mögliche monogenetische Erkrankung durch die Genaberration des *WTX* Tumorsuppressors. Die Mutationen umfassen Deletionen und trunkierende Mutationen wie Punktmutationen im β -*CATENIN*-bindenden Bereich des Gens. In 2-5% des kolorektalen Karzinoms wurden *WTX*-Mutationen gefunden, die der N-terminalen Phospholipid-Bindungsaktivität oder β -*CATENIN*-bindenden Region zugeordnet werden können [73, 146]. Vereinzelt ist bei der akuten myeloischen Leukämie (Punktmutation) sowie beim Hepatoblastom und embryonalen Rhabdomyosarkom (Deletion) eine *WTX*-Genalteration beschrieben worden [72, 147].

Die innerhalb der Medulloblastomkohorte aberrierten *WTX*-Sequenzen wurden abgeglichen mit den bisher verzeichneten *WTX*-Mutationen aus Projekten zu genannten Tumorerkrankungen. Die somatische Mutation Ala29Thr ist bereits in der Literatur zum Wilms Tumor beschrieben, hier könnte es sich um eine HotSpot-Mutation handeln [144, 148]. Arg560Gln sowie Pro959Leu sind bis dato in keiner Studie oder Mutationsdatenbank erwähnt. Um eine mögliche Überlappung mit einer häufig beschriebenen Wnt-Aberration, der β -*CATENIN*-Mutation auszuschließen, wurde die HotSpot-Region von β -*CATENIN* auf Mutationen untersucht. Hierbei ließ sich keine β -*CATENIN*-Mutation in den *WTX*-mutierten Tumorproben nachweisen.

Die Mutationsrate der hier untersuchten Medulloblastomkohorte beträgt 4,5%. In den letzten Jahren fanden Exom- und Genom-weite Sequenzierungsstudien der 2. bzw. 3. Generation an Medulloblastomen statt. In den dort untersuchten Medulloblastomen zeigten sich keine *WTX*-Mutationen [139, 141]. Die gescreenten Tumorkollektive waren jedoch wesentlich kleiner (max. 22 MBs), sodass gegebenenfalls Mutationen mit einer niedrigen Häufigkeit nicht identifiziert werden konnten. Darüber hinaus basiert die Methodik zur Analyse von Genom- oder Exom-weiten Mutationen auf einer anderen Technologie gegenüber der hier verwendeten SSCP-Analyse mit anschließender Sangersequenzierung. Letztere sind im Wesentlichen auf kleine Fragmentbereiche ausgelegt, besitzen in diesen aber eine sehr genaue Detektionsfrequenz, sodass möglicherweise Mutationen über das NGS (next generation sequencing) nicht erfasst worden sind. Desweiteren konzentriert sich die vorliegende Arbeit primär auf den Mutationsnachweis im Exon-Bereich, sodass Mutationen im Intron nicht ausgeschlossen werden können. Gleichwohl sind weitere Untersuchungen zur Aufklärung einer passenger bzw. driver mutation sowie der Epigenetik ausstehend.

Neben den bereits bekannten Mutationen von *CTNNB1*, *SUFU*, *AXIN*, *AXIN2* sowie *APC*, konnte hier erstmalig eine somatische Aberration des Tumorsuppressorgens *WTX* mit funktioneller Relevanz für die Wnt-Signaltransduktion innerhalb des Medulloblastoms identifiziert werden. Zwei Mutationen befinden sich in der β -*CATENIN*-bindenden Region und sind somit für die Degradierung des β -*CATENIN* von zentraler Bedeutung, beide sind bisher nicht beschrieben. Die dritte Mutation liegt in der Phospholipid-Bindungsdomäne und beeinflusst die initiale Signalaktivierung der Wnt-Kaskade. Für zwei somatische Mutationen konnte die Wnt-Aktivierung in der jeweiligen Medulloblastomprobe nachgewiesen werden. Dies weist auf eine mögliche Relevanz der *WTX*-Mutationen für die Pathogenese des Medulloblastoms hin. Eine Alteration bzw. Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *WTX* manifestiert sich in anderen primitiven Tumoren, die durch gewebsspezifische undifferenzierte Vorläuferzellen charakterisiert sind [147].

6.2 *WTX*-Expression im Kleinhirn und im Medulloblastom

WTX als Tumorsuppressorgen wurde in den letzten Jahren zunehmend eine Schlüsselposition in der Wnt-Kaskade eingeräumt. Eine Expressionsanalyse in 45 humanen MB-Biopsien mittels quantitativer TaqMan Real-Time PCR sollte klären, inwieweit die Expression von *WTX* Einfluss auf die Tumorigenese der Wnt-abhängigen Medulloblastome hat. Die Untersuchungen wurden mit der Hypothese einer verminderten Expression bzw. Downregulation des Tumorsuppressorgens *WTX* in Medulloblastomen begonnen.

Die Expression von *WTX* innerhalb der Medulloblastome fiel stark heterogen aus (Abb. 5.2a). Eine mögliche Erklärung wäre der heterogene Ursprung des Medulloblastoms, besteht die Kohorte doch aus Subgruppen verschiedenen molekularen Hintergrunds. Signifikanzen in Altersabhängigkeit, Geschlecht und Histopathologie konnten jedoch ausgeschlossen werden. Innerhalb des Kontrollgewebes ließ sich jedoch interessanterweise eine signifikante Überexpression von *WTX* in den fetalen Kleinhirngewebsproben verglichen mit adultem Kleinhirn nachweisen ($p < 0.05$). Die *WTX*-Expression korreliert gegenläufig mit dem Alter des gesunden zerebellären Gewebes (Abb. 5.2b). In der Verrechnung von MB und Kontrollgewebe gibt es keine Expressionsunterschiede zwischen Medulloblastom und fetalem Kleinhirn, jedoch eine signifikant verminderte Expression von *WTX* in der adulten Kontrollgruppe (Abb. 5.2c). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Regulation des *WTX*-

Transkripts abhängig von dem jeweiligen Stadium der Kleinhirngnese ist. Ein herunterregulierter Wnt-Signalweg nach Beendigung der Kleinhirnentwicklung mit ca. 18 Monaten könnte dies erklären. Für die Kleinhirnentwicklung wird dem Wnt-Signalweg aktuell eine große Bedeutung zugeschrieben, die mit zunehmender Erforschung der Wnt-Proteine verstanden wird [25, 86, 149-154]. Der Hinweis einer Signalweg-abhängigen *WTX*-Expression sollte durch *AXIN2* als direktes Zielgen des Wnt-Signalwegs und Marker für dessen Aktivitätszustand hinterfragt werden. *AXIN2* korreliert in seinem Expressionsverhalten mit *WTX* und ist im fetalen Kleinhirngewebe signifikant überexprimiert im Vergleich zu den adulten Proben. Somit ist die starke *WTX*-Expression im sich entwickelnden Kleinhirn als Ausdruck einer Hochregulation in Gewebe mit Wnt-Signalaktivierung zu werten.

Gleichsam konnte eine Expressionsstudie der murinen Embryonalentwicklung eine hohe Entwicklungsstadien-abhängige Regulation des Tumorsuppressors *Wtx* in verschiedenen Organsystemen aufzeigen [155]. So bestätigt das Zeit- und Gewebs-spezifische *Wtx*-Expressionsmuster der murinen Niere, dass *Wtx* aktiv in den Vorläuferzellpopulationen ist, aus denen der Wilms Tumor stammt. Moisan und Rivera et al. widmeten sich der Bedeutung von *Wtx* in kindlichen Tumoren wie dem Wilms Tumor aber auch der OSCS und beschreiben übereinstimmend eine Entwicklungsstadien-abhängige Funktion von *Wtx*. Die Inaktivierung von *Wtx* in Stadien mesenchymaler Progenitorzellen wirkte sich in skelettalen Defekten aus, hingegen zeigten sich reife Osteoblasten unbeeinflusst [144, 145].

Als Kontrolle für die Medulloblastom-Biopsien diente im Folgenden das fetale Zerebellum mit aktiviertem Wnt-Signalweg. Das Mutationscreening deckte β -*CATENIN*-Mutationen von zwei Proben auf – beide ergaben eine Expression von *WTX* vergleichbar einer Wnt-Aktivierung. Die *AXIN2* mRNA einer der Samples wurde ebenso durch quantitative RealTimePCR ausgewertet und bestätigte die Wnt-Aktivierung.

6.3 Expressionsunterschiede des *WTX*-Gens in Tumorzelllinien unterschiedlicher Wnt-Aktivitätszustände

Eine Expressionsanalyse an humanen Wnt-inaktiven und Wnt-aktiven Zelllinien sollte die Hypothese der zentralen Funktion von *Wtx* im Signalweg überprüfen: Wird *WTX* durch die Wnt-Aktivität reguliert und agiert es – vergleichbar *AXIN2* – sogar als direktes Zielgen der Wnt-Signalkaskade?

AXIN2, direktes Zielgen der *TCF/LEF*-vermittelten Transkription in der Wnt-Kaskade, ist in den Hepatoblastomzelllinien mit konstitutiv aktivem Wnt-Signal stark hochreguliert, in allen Wnt-inaktiven Medulloblastomzelllinien jedoch kaum noch zu detektieren (Abb. 5.6).

Gleichgerichtet verhält sich die Regulation des *WTX*-Transkripts: starke Expression in den Zelllinien mit Wnt-Aktivierung und mindestens 4fach verminderte Expression in Zellen ohne Wnt-Aktivierung ($p < 0.005$). Somit ist die Expression von *WTX* Ausdruck eines aktivierten bzw. inaktiven Signalwegs im Medulloblastom und Hepatoblastom.

Funktionale Zellkulturassays an humanen Tumorzelllinien sollten über eine direkte Aktivitätsänderung des Wnt-Signalwegs die Funktion von *Wtx* näher definieren bzw. eine mögliche Zielgenfunktion des *WTX*-Gens beleuchten. Nach Stimulation Wnt-inaktiver Medulloblastomzellen mit dem Liganden Wnt3a, der β -*CATENIN* vermittelt zur *TCF*-abhängigen Transkription führt, wurde die Expression von *WTX* und dem bereits bekannten Zielgen *AXIN2* analysiert. *AXIN2* unterliegt einer eindeutigen Regulation nach Wnt3a-Behandlung. Diese ist jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt als die innerhalb dieser Arbeit ermittelte *AXIN2*-Hochregulation in Wnt-aktiven Zellen. Das *WTX*-Transkript verhält sich von der Wnt3a-Stimulation der MB-Zellen unbeeinflusst. Keine *WTX*- und schwache *AXIN2*-Regulation sind womöglich Ausdruck eines nur eingeschränkt aktivierten Wnt-Signals durch Wnt3a-Zellstimulation. Weiterhin weisen die Ergebnisse darauf hin, dass *WTX* kein direktes Zielgen zu sein scheint. Es gibt jedoch einige Studien, die den abhängig vom induzierenden Liganden und dem gleichzeitigen Auftreten mehrerer Gene (cross-linking) variablen Ablauf eines Signalwegs beschreiben [34, 156]. So kann zunächst sicher davon ausgegangen werden, dass die *WTX* Aktivität nicht ausschließlich von der Wnt3a-Präsenz abhängig ist.

Als weitere Möglichkeit der Aberration der Wnt-Kaskade wurde die transiente Transfektion mit dominant negativem *TCF-4* $\Delta N31$ von Wnt-aktiven humanen Hepatoblastomzellen genutzt und das Wnt-Signal inaktiviert. *AXIN2*, bereits häufig durch seine *TCF*-abhängige Transkription beschrieben, ist nach Transfektion mit dn *TCF-4* signifikant downreguliert und spiegelt den inaktivierten Wnt-Zustand wider. Das *WTX*-Transkript hingegen wird durch die transiente Transfektion nicht reguliert. *WTX* verhält sich unabhängig von einer transkriptionellen Aberration der Wnt-Kaskade durch dn *TCF-4*.

Der Tumorsuppressor *Wtx* charakterisiert den Aktivitätszustand des Wnt-Signals in humanem Kleinhirngewebe sowie Tumorzellen von Medulloblastom und Hepatoblastom. Die funktionellen Assays einer *TCF-4*-vermittelten Aberration der Wnt-Kaskade zeigen keine

Regulierbarkeit von *Wtx* und deuten somit darauf hin, dass *WTX* kein direktes Zielgen der *TCF-4* vermittelten Wnt-Signaltransduktion ist.

Für die klinische Diagnostik des Medulloblastoms könnten diese Erkenntnisse künftig von Nutzen sein. Da *WTX* den Aktivitätszustand des Wnt-Signals ausdrückt, wäre das Grundprinzip eines neuen Biomarkers zur Darstellung der Wnt-Aktivität erfüllt.

6.4 Die Regulation von *Wtx* im murinen Kleinhirn während der postnatalen Entwicklung

Der heterogene molekulare Hintergrund onkogener Signalwege wie Wnt oder Shh im Medulloblastom deutet auf unterschiedliche Ursprungszellen sowie verschiedene Zeitpunkte der Tumorentstehung innerhalb der neuronalen Entwicklung hin. Erkenntnisse über diese Entwicklungskontrollsignalwege innerhalb der physiologischen Kleinhirnentwicklung erscheinen von großer Bedeutung für das Verständnis der MB-Tumorigenese. Die Rolle der Wnt-Kaskade in der Embryogenese des Zerebellums wurde erstmals über die Expression von *WNT-1* in Vorläufern der Körnerzellen sowie der postnatalen Ausbildung axonaler Vernetzungen durch *Wnt7a* beschrieben [25, 86].

Eine Wnt-Aktivierung in gesundem fetalem Kleinhirn und auch in humanen Zellen des Medullo- und HCCs bzw. Hepatoblastoms führt zu einer verstärkten Expression von *WTX*.

Zur stadienspezifischen Untersuchung der Bedeutung von *Wtx* sowie der Wnt-Signalkaskade im postnatalen Zerebellum wurde eine Expressionsanalyse an Kleinhirngewebe von C57Bl/6 Mäusen durchgeführt. Die humane Kleinhirnentwicklung ist erst mit etwa 18 Monaten abgeschlossen, die murine um den 15. postnatalen Tag. *mWtx* ist im gesamten untersuchten fetalen Zeitraum von p3- p13 im Kleinhirn signifikant hochreguliert und zeigt zudem einen klaren abnehmenden Trend mit Fortschreiten der Kleinhirnentwicklung. *mAxin2* spiegelt die Expression von *mWtx* wider. Die Wnt-Kaskade scheint bis zum postnatalen Tag 13 im murinen Zerebellum hochreguliert. Die starke Regulation weist auf eine zentrale Rolle von *mWtx* in der postnatalen Kleinhirnentwicklung hin.

Eine in-situ-Hybridisierung von murinem Kleinhirn im postnatalen Stadium diene der Bestätigung einer eindeutigen Regulation des Tumorsuppressorgens *mWtx* in der Kleinhirnentwicklung und sollte die zelltypspezifische Lokalisierung von *Wtx* ermöglichen.

Wie erwartet zeigt das murine Zerebellum an p7 eine hohe *mWtx*-Aktivität, welche zunehmend abnimmt und im adulten Kleinhirn nur noch sehr schwach zu detektieren ist.

Die äußere Körnerzellschicht bildet ein sehr starkes Signal des *Wtx*-Transkripts in p7, einem Stadium der maximalen Proliferation granulärer Vorläuferzellen. Kongruent mit der Rückbildung der EGL ist die *mWtx*-Expression weiterhin hochreguliert, auch wenn leicht reduziert in p11 und kaum noch zu erkennen in p18 und p100. Hohe *mWtx*-Aktivität zeigt ebenso die IGL in p7 und p11. Die Purkinje-Zellschicht kann in p11 mit sehr intensivem *Wtx*-Signal gut differenziert werden. In der molekularen Zellschicht hingegen wurde kaum *mWtx*-Aktivität vorgefunden.

Die bekannte Schlüsselrolle der Wnt-Kaskade in der Kleinhirnentwicklung sowie die Indikatorrolle von *Wtx* als Wnt-Aktivitätszustand erlaubt das detektierte *Wtx*-Signal als Ausdruck der Wnt-Aktivität zu deuten. Die differenzierte Beobachtung von *mWtx* in EGL, IGL und PurkinjeZellschicht (PCL) postnatal bestätigt die hochregulierte Wnt-Signalkaskade in granulären Zellen aus der rhombischen Lippe sowie in aus der ventrikulären Zone stammende Purkinje-Zellen. In der zerebellären Entwicklung stellt p5-p10 das Stadium der höchsten Proliferation dar [150, 157] und passt zu der hohen Expression des Wnt-Signals, das der Kontrolle von Zellproliferation dient. Die Wanderung der granulären Zellen aus der externen Zellschicht in die interne sollte bis p21 abgeschlossen sein. Diese Migration könnte das zunehmende *mWtx*-Signal von p7-p11 in der IGL erklären. Selvadurai et al. folgerten aus ihren Daten, dass die Proliferationsregulierung granularer Zellen vorwiegend durch die SHH-Kaskade erfolgt, während Wnt nur die frühe Spezifizierung und Migration der granulären Vorläuferzellen in die EGL veranlasst und später prädominant in Purkinjezellen sowie Bergmannglia vorzufinden ist [158, 159]. Auch Salinas et al. konnten durch hohe Wnt-3 Aktivität die dominante Rolle von Wnt in Purkinjezellen nachweisen, wobei hierbei mit agrulären Mausmodellen gearbeitet wurde [153]. Die FISH-Daten bestätigen durch eine klare Signalerhöhung in der Purkinjezellschicht die wesentliche Bedeutung von *Wtx* bzw. der Wnt-Kaskade für die Purkinjezellen. Dennoch lässt sich durch die hohe *Wtx*-Expression in EGL und IGL bis p11 die bezeichnende Involvierung von Wnt in Proliferation bzw. Differenzierung granularer Zellen der rhombischen Lippe nicht bestreiten. Während Forscher um Selvadurai und Dahmane den Sonic Hedgehog Signalweg als maßgebenden Regulator der Proliferation granularer Zellen erklärten, konnte in anderen Studien der zerebellären Genese eine erhöhte Expression von Wnt-1 in granulären Zellen, rhombischer Lippe sowie Isthmus gezeigt werden [13, 83, 158, 160, 161].

Die erhöhte Aktivität von *Wtx* in Zellen ventrikulären und rhombischen Ursprungs im postnatalen Zerebellum könnte auf eine Interaktion von Purkinjezellen und granulären Zellen

bzw. eine vermittelnde Funktion der Wnt-Kaskade deuten. Gibson et al. postulierten den dorsalen Hirnstamm als pathologischen Ausgangspunkt Wnt-aberrierter Medulloblastome [19]. Die aufgezeigte Wnt-Aktivität in Zelllinien ventrikulärer Herkunft bzw. der oberen rhombischen Lippe in dieser Arbeit wie auch in Arbeiten von Selvadurai et al. kann einen zusätzlichen Pathomechanismus nahelegen und muss weiter geklärt werden [158, 159].

Im murinen Kleinhirn unterliegt das *Wtx*-Transkript einer Dynamik, die durch das Stadium der zerebellären Entwicklung sowie durch den Zelltyp bestimmt wird.

7 Literaturverzeichnis

1. Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvet, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues, The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007 Aug;114(2):97-109. Epub 2007 Jul 6.
2. <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkkr>. 2011
3. Rutkowski, S., Medulloblastom im Kindes- und Jugendalter, S1 Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. 2012, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie.
4. Korinthenberg, R.W.-M., M; Rutkowski, S; Weckesser, M, Leitsymptome und Diagnostik der Hirntumoren im Kindes- und Jugendalter, S1 Leitlinie der Gesellschaft für Neuropädiatrie sowie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie. 2010, Gesellschaft für Neuropädiatrie, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie.
5. Packer, K.G., Tumors of the Pediatric Central Nervous System. 2nd edition ed. 2013.
6. Avery, A.S., MD; Stone, JF, The Genetics and Molecular Biology of Neural Tumors. 2008.
7. Kool, M., J. Koster, J. Bunt, N.E. Hasselt, A. Lakeman, P. van Sluis, D. Troost, N.S.-v. Meeteren, H.N. Caron, J. Cloos, A. MrÅjiÄ, B. Ylstra, W. Grajkowska, W. Hartmann, T. Pietsch, D. Ellison, S.C. Clifford, and R. Versteeg, Integrated Genomics Identifies Five Medulloblastoma Subtypes with Distinct Genetic Profiles, Pathway Signatures and Clinicopathological Features. *PLoS One*, 2008. 3(8): p. e3088.
8. Thompson, M.C., C. Fuller, T.L. Hogg, J. Dalton, D. Finkelstein, C.C. Lau, M. Chintagumpala, A. Adesina, D.M. Ashley, S.J. Kellie, M.D. Taylor, T. Curran, A. Gajjar, and R.J. Gilbertson, Genomics Identifies Medulloblastoma Subgroups That Are Enriched for Specific Genetic Alterations. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. 24(12): p. 1924-1931.
9. Northcott, P.A., A. Korshunov, H. Witt, T. Hielscher, C.G. Eberhart, S. Mack, E. Bouffet, S.C. Clifford, C.E. Hawkins, P. French, J.T. Rutka, S. Pfister, and M.D. Taylor, Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*, 2011. 29(11): p. 1408-14.
10. Clifford, S.C., M.E. Lusher, J.C. Lindsey, J.A. Langdon, R.J. Gilbertson, D. Straughton, and D.W. Ellison, Wnt/Wingless Pathway Activation and Chromosome 6 Loss Characterise a Distinct Molecular Sub-Group of Medulloblastomas Associated with a Favourable Prognosis. *Cell Cycle*, 2006. 5(22): p. 2666-2670.
11. Taylor, M., P. Northcott, A. Korshunov, M. Remke, Y.-J. Cho, S. Clifford, C. Eberhart, D. Parsons, S. Rutkowski, A. Gajjar, D. Ellison, P. Lichter, R. Gilbertson, S. Pomeroy, M. Kool, and S. Pfister, Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathologica*, 2012. 123(4): p. 465-472.
12. Pietsch, T., M.D. Taylor, and J.T. Rutka, Molecular pathogenesis of childhood brain tumors. *J Neurooncol*, 2004. 70(2): p. 203-15.
13. Wechsler-Reya, R.J. and M.P. Scott, Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 1999. 22(1): p. 103-14.

14. Buhren, J., A.H. Christoph, R. Buslei, S. Albrecht, O.D. Wiestler, and T. Pietsch, Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000. 59(3): p. 229-40.
15. Yokota, N., J. Aruga, S. Takai, K. Yamada, M. Hamazaki, T. Iwase, H. Sugimura, and K. Mikoshiba, Predominant expression of human *zic* in cerebellar granule cell lineage and medulloblastoma. *Cancer Res*, 1996. 56(2): p. 377-83.
16. Eberhart, C.G., T. Tihan, and P.C. Burger, Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000. 59(4): p. 333-7.
17. Baeza, N., J. Masuoka, P. Kleihues, and H. Ohgaki, AXIN1 mutations but not deletions in cerebellar medulloblastomas. *Oncogene*, 2003. 22(4): p. 632-6.
18. Koch, A., A. Hrychyk, W. Hartmann, A. Waha, T. Mikeska, U. Schuller, N. Sorensen, F. Berthold, C.G. Goodyer, O.D. Wiestler, W. Birchmeier, J. Behrens, and T. Pietsch, Mutations of the Wnt antagonist AXIN2 (Conductin) result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas. *Int J Cancer*, 2007. 121(2): p. 284-91.
19. Gibson, P., Y. Tong, G. Robinson, M.C. Thompson, D.S. Curre, C. Eden, T.A. Kranenburg, T. Hogg, H. Poppleton, J. Martin, D. Finkelstein, S. Pounds, A. Weiss, Z. Patay, M. Scoggins, R. Ogg, Y. Pei, Z.-J. Yang, S. Brun, Y. Lee, F. Zindy, J.C. Lindsey, M.M. Taketo, F.A. Boop, R.A. Sanford, A. Gajjar, S.C. Clifford, M.F. Roussel, P.J. McKinnon, D.H. Gutmann, D.W. Ellison, R. Wechsler-Reya, and R.J. Gilbertson, Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*, 2010. 468(7327): p. 1095-1099.
20. Ellison, D.W., O.E. Onilude, J.C. Lindsey, M.E. Lusher, C.L. Weston, R.E. Taylor, A.D. Pearson, and S.C. Clifford, beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol*, 2005. 23(31): p. 7951-7.
21. Ellison, D., J. Dalton, M. Kocak, S. Nicholson, C. Fraga, G. Neale, A. Kenney, D. Brat, A. Perry, W. Yong, R. Taylor, S. Bailey, S. Clifford, and R. Gilbertson, Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathologica*, 2011: p. 1-16.
22. Sharma, R.P. and V.L. Chopra, Effect of the wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 1976. 48(2): p. 461-465.
23. Nusse, R., A. van Ooyen, D. Cox, Y.K. Fung, and H. Varmus, Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (*int-1*) on mouse chromosome 15. *Nature*, 1984. 307(5947): p. 131-6.
24. Clevers, H., Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006. 127(3): p. 469-80.
25. McMahon, A.P. and A. Bradley, The Wnt-1 (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 1990. 62(6): p. 1073-85.

26. Brakeman, J.S., S.H. Gu, X.B. Wang, G. Dolin, and J.M. Baraban, Neuronal localization of the Adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Neuroscience*, 1999. 91(2): p. 661-72.
27. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol*, 2000. 10(3): p. 392-9.
28. Yu, X. and R.C. Malenka, Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci*, 2003. 6(11): p. 1169-77.
29. Lie, D.C., S.A. Colamarino, H.J. Song, L. Desire, H. Mira, A. Consiglio, E.S. Lein, S. Jessberger, H. Lansford, A.R. Dearie, and F.H. Gage, Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 2005. 437(7063): p. 1370-5.
30. Logan, C.Y. and R. Nusse, THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004. 20(1): p. 781-810.
31. Nusse, R. <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>.
32. Bhanot, P., M. Brink, C.H. Samos, J.C. Hsieh, Y. Wang, J.P. Macke, D. Andrew, J. Nathans, and R. Nusse, A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, 1996. 382(6588): p. 225-30.
33. Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J.P. Saint-Jeannet, and X. He, LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*, 2000. 407(6803): p. 530-5.
34. Mikels, A.J. and R. Nusse, Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -Catenin-TCF Signaling Depending on Receptor Context. *PLoS Biol*, 2006. 4(4): p. e115.
35. Habas, R. and X. He, Cell signaling: moving to a Wnt-Rap. *Curr Biol*, 2007. 17(12): p. R474-7.
36. Behrens, J., B.A. Jerchow, M. Wurtele, J. Grimm, C. Asbrand, R. Wirtz, M. Kuhl, D. Wedlich, and W. Birchmeier, Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, 1998. 280(5363): p. 596-9.
37. Hart, M.J., R. de los Santos, I.N. Albert, B. Rubinfeld, and P. Polakis, Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol*, 1998. 8(10): p. 573-81.
38. Itoh, K., V.E. Krupnik, and S.Y. Sokol, Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Curr Biol*, 1998. 8(10): p. 591-4.
39. Major, M.B., N.D. Camp, J.D. Berndt, X. Yi, S.J. Goldenberg, C. Hubbert, T.L. Biechele, A.-C. Gingras, N. Zheng, M.J. MacCoss, S. Angers, and R.T. Moon, Wilms Tumor Suppressor WTX Negatively Regulates WNT/ β -Catenin Signaling. *Science*, 2007. 316(5827): p. 1043-1046.
40. Rivera, M.N., W.J. Kim, J. Wells, D.R. Driscoll, B.W. Brannigan, M. Han, J.C. Kim, A.P. Feinberg, W.L. Gerald, S.O. Vargas, L. Chin, A.J. Iafrate, D.W. Bell, and D.A. Haber, An X Chromosome Gene, WTX, Is Commonly Inactivated in Wilms Tumor. *Science*, 2007. 315(5812): p. 642-645.

41. Aberle, H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, and R. Kemler, beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 1997. 16(13): p. 3797-804.
42. Orford, K., C. Crockett, J.P. Jensen, A.M. Weissman, and S.W. Byers, Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem*, 1997. 272(40): p. 24735-8.
43. Jiang, J. and G. Struhl, Regulation of the Hedgehog and Wntless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature*, 1998. 391(6666): p. 493-6.
44. Huang, H. and X. He, Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. 20(2): p. 119-25.
45. Lustig, B. and J. Behrens, The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003. 129(4): p. 199-221.
46. Behrens, J., J.P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, and W. Birchmeier, Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 1996. 382(6592): p. 638-42.
47. He, T.-C., A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.T. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler, Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science*, 1998. 281(5382): p. 1509-1512.
48. Tetsu, O. and F. McCormick, Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 1999. 398(6726): p. 422-6.
49. Mann, B., M. Gelos, A. Siedow, M.L. Hanski, A. Gratchev, M. Ilyas, W.F. Bodmer, M.P. Moyer, E.O. Riecken, H.J. Buhr, and C. Hanski, Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(4): p. 1603-8.
50. Crawford, H.C., B.M. Fingleton, L.A. Rudolph-Owen, K.J. Goss, B. Rubinfeld, P. Polakis, and L.M. Matrisian, The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, 1999. 18(18): p. 2883-91.
51. Kolligs, F.T., M.T. Nieman, I. Winer, G. Hu, D. Van Mater, Y. Feng, I.M. Smith, R. Wu, Y. Zhai, K.R. Cho, and E.R. Fearon, ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell*, 2002. 1(2): p. 145-55.
52. Lustig, B., B. Jerchow, M. Sachs, S. Weiler, T. Pietsch, U. Karsten, M. van de Wetering, H. Clevers, P.M. Schlag, W. Birchmeier, and J. Behrens, Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(4): p. 1184-93.
53. Jho, E.-h., T. Zhang, C. Domon, C.-K. Joo, J.-N. Freund, and F. Costantini, Wnt/beta-Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 2002. 22(4): p. 1172-1183.
54. Radtke, F. and H. Clevers, Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, 2005. 307(5717): p. 1904-9.
55. Polakis, P., Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 2000. 14(15): p. 1837-51.
56. Miller, J.R., A.M. Hocking, J.D. Brown, and R.T. Moon, Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*, 1999. 18(55): p. 7860-72.

57. Caricasole, A., A. Bakker, A. Copani, F. Nicoletti, G. Gaviraghi, and G.C. Terstappen, Two sides of the same coin: Wnt signaling in neurodegeneration and neuro-oncology. *Biosci Rep*, 2005. 25(5-6): p. 309-27.
58. Marino, S., Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med*, 2005. 11(1): p. 17-22.
59. Gordon, M.D. and R. Nusse, Wnt Signaling: Multiple Pathways, Multiple Receptors, and Multiple Transcription Factors. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(32): p. 22429-22433.
60. Taipale, J. and P.A. Beachy, The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 2001. 411(6835): p. 349-354.
61. Zurawel, R.H., S.A. Chiappa, C. Allen, and C. Raffel, Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res*, 1998. 58(5): p. 896-9.
62. Huang, H., B.M. Mahler-Araujo, A. Sankila, L. Chimelli, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol*, 2000. 156(2): p. 433-7.
63. Dahmen, R.P., A. Koch, D. Denkhaus, J.C. Tonn, N. Sorensen, F. Berthold, J. Behrens, W. Birchmeier, O.D. Wiestler, and T. Pietsch, Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res*, 2001. 61(19): p. 7039-43.
64. Koch, A., A. Waha, J.C. Tonn, N. Sorensen, F. Berthold, M. Wolter, J. Reifenberger, W. Hartmann, W. Friedl, G. Reifenberger, O.D. Wiestler, and T. Pietsch, Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer*, 2001. 93(3): p. 445-9.
65. Yokota, N., S. Nishizawa, S. Ohta, H. Date, H. Sugimura, H. Namba, and M. Maekawa, Role of Wnt pathway in medulloblastoma oncogenesis. *Int J Cancer*, 2002. 101(2): p. 198-201.
66. Jenkins, Z.A., M. van Kogelenberg, T. Morgan, A. Jeffs, R. Fukuzawa, E. Pearl, C. Thaller, A.V. Hing, M.E. Porteous, S. Garcia-Minaur, A. Bohring, D. Lacombe, F. Stewart, T. Fiskerstrand, L. Bindoff, S. Berland, L.C. Ades, M. Tchan, A. David, L.C. Wilson, R.C. Hennekam, D. Donnai, S. Mansour, V. Cormier-Daire, and S.P. Robertson, Germline mutations in WTX cause a sclerosing skeletal dysplasia but do not predispose to tumorigenesis. *Nat Genet*, 2009. 41(1): p. 95-100.
67. Tanneberger, K., A.S. Pfister, V. Kriz, V. Bryja, A. Schambony, and J.r. Behrens, Structural and Functional Characterization of the Wnt Inhibitor APC Membrane Recruitment 1 (Amer1). *Journal of Biological Chemistry*, 2011. 286(22): p. 19204-19214.
68. Rivera, M.N., W.J. Kim, J. Wells, A. Stone, A. Burger, E.J. Coffman, J. Zhang, and D.A. Haber, The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(20): p. 8338-8343.
69. Grohmann, A., K. Tanneberger, A. Alzner, J. Schneikert, and J. Behrens, AMER1 regulates the distribution of the tumor suppressor APC between microtubules and the plasma membrane. *J Cell Sci*, 2007. 120(Pt 21): p. 3738-47.

70. Ruteshouser, E.C., S.M. Robinson, and V. Huff, Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008. 47(6): p. 461-70.
71. Perotti, D., B. Gamba, M. Sardella, F. Spreafico, M. Terenziani, P. Collini, A. Pession, M. Nantron, F. Fossati-Bellani, and P. Radice, Functional inactivation of the WTX gene is not a frequent event in Wilms' tumors. *Oncogene*, 2008. 27(33): p. 4625-32.
72. Owen, C., P. Virappane, M. Alikian, I. Stasevich, K. Summers, D. Lillington, D. Bonnet, A. Burnett, K. Mills, T.A. Lister, and J. Fitzgibbon, WTX is rarely mutated in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 2008. 93(6): p. 947-948.
73. Yoo, N.J., S. Kim, and S.H. Lee, Mutational analysis of WTX gene in Wnt/ beta-catenin pathway in gastric, colorectal, and hepatocellular carcinomas. *Dig Dis Sci*, 2009. 54(5): p. 1011-4.
74. Martinez, S. and R.M. Alvarado-Mallart, Rostral Cerebellum Originates from the Caudal Portion of the So-Called 'Mesencephalic' Vesicle: A Study Using Chick/Quail Chimeras. *Eur J Neurosci*, 1989. 1(6): p. 549-560.
75. Hallonet, M. and R.M. Alvarado-Mallart, The chick/quail chimeric system: a model for early cerebellar development. *Perspect Dev Neurobiol*, 1997. 5(1): p. 17-31.
76. Sidman, R.L. and P. Rakic, Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res*, 1973. 62(1): p. 1-35.
77. Sotelo, C., Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol*, 2004. 72(5): p. 295-339.
78. Wingate, R.J., The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. 11(1): p. 82-8.
79. Yamada, K., M. Fukaya, T. Shibata, H. Kurihara, K. Tanaka, Y. Inoue, and M. Watanabe, Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *J Comp Neurol*, 2000. 418(1): p. 106-20.
80. Goldowitz, D. and K. Hamre, The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci*, 1998. 21(9): p. 375-82.
81. Ryder, E.F. and C.L. Cepko, Migration patterns of clonally related granule cells and their progenitors in the developing chick cerebellum. *Neuron*, 1994. 12(5): p. 1011-28.
82. Voogd, J. and M. Glickstein, The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*, 1998. 21(9): p. 370-5.
83. Nichols, D.H. and L.L. Bruce, Migratory routes and fates of cells transcribing the Wnt-1 gene in the murine hindbrain. *Dev Dyn*, 2006. 235(2): p. 285-300.
84. Thomas, K.R. and M.R. Capecchi, Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature*, 1990. 346(6287): p. 847-50.
85. Salinas, P.C., C. Fletcher, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and R. Nusse, Maintenance of Wnt-3 expression in Purkinje cells of the mouse cerebellum depends on interactions with granule cells. *Development*, 1994. 120(5): p. 1277-1286.
86. Lucas, F.R. and P.C. Salinas, WNT-7a induces axonal remodeling and increases synapsin I levels in cerebellar neurons. *Dev Biol*, 1997. 192(1): p. 31-44.

87. Hall, A.C., F.R. Lucas, and P.C. Salinas, Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*, 2000. 100(5): p. 525-35.
88. Friedman, H.S., P.C. Burger, S.H. Bigner, J.Q. Trojanowski, C.J. Wikstrand, E.C. Halperin, and D.D. Bigner, Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 *Med. J Neuropathol Exp Neurol*. 1985 Nov;44(6):592-605.
89. Jacobsen, P.F., D.J. Jenkyn, and J.M. Papadimitriou, Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985 Sep;44(5):472-85., 1985.
90. Keles, G.E., M.S. Berger, J. Srinivasan, D.D. Kolstoe, M.S. Bobola, and J.R. Silber, Establishment and characterization of four human medulloblastoma-derived cell lines. *Oncol Res*. 1995;7(10-11):493-503.
91. Aden, D.P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov, and B.B. Knowles, Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. 1979 Dec 6;282(5739):615-6.
92. Sassa, S., O. Sugita, R.A. Galbraith, and A. Kappas, Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1987. 143(1): p. 52-57.
93. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science*. 1980 Jul 25;209(4455):497-9.
94. Doi, I., Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. *Gann*, 1976. 67(1): p. 1-10.
95. Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology*. 1992;24:476-80.
96. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. 1992;24:17-27.
97. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988. 239(4839): p. 487-491.
98. Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak, and P.M. Williams, Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):986-94.
99. Holland, P.M., R.D. Abramson, R. Watson, and D.H. Gelfand, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
100. Lee, L.G., C.R. Connell, and W. Bloch, Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 1993 Aug 11;21(16):3761-6.

101. Cardullo, R.A., S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, and D.E. Wolf, Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(23): p. 8790-4.
102. Lie, Y.S. and C.J. Petropoulos, Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998. 9(1): p. 43-48.
103. Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson, Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 1993. 11(9): p. 1026-30.
104. Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 2000. 25(2): p. 169-93.
105. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-408.
106. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protocols*, 2008. 3(6): p. 1101-1108.
107. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.
108. Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya, Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989. 86(8): p. 2766-2770.
109. Hayashi, K., PCR-SSCP: a method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl.* 1992 Jun;9(3):73-9.
110. Hayashi, K., [PCR-SSCP--rapid and easy detection of DNA-sequence changes]. *Hum Cell.* 1992 Jun;5(2):180-4.
111. Glavac, D. and M. Dean, Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat.* 1993;2(5):404-14.
112. Grompe, M., The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet.* 1993 Oct;5(2):111-7.
113. Hayashi, K. and D.W. Yandell, How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat.* 1993;2(5):338-46.
114. Kukita, Y., T. Tahira, S.S. Sommer, and K. Hayashi, SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat.* 1997;10(5):400-7.
115. Bitenc, D. and J. Marc, Optimization of Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis for Screening for the Estrogen Receptor- β Gene Polymorphism P325P. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2001. 39(7): p. 612-614.
116. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977. 74(12): p. 5463-5467.
117. ensembl Datenbank. [cited; Available from: <http://www.ensembl.org/index.html>

118. blast Datenbank.
119. Das, N.K. and M. Alfert, Binding of labeled ribonucleic acid to basic proteins, a major difficulty in ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in fixed cells in situ. *J Histochem Cytochem*, 1969. 17(6): p. 418-22.
120. Levsky, J.M. and R.H. Singer, Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, 2003. 116(14): p. 2833-2838.
121. Holtke, H.J. and C. Kessler, Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection. *Nucleic Acids Res*, 1990. 18(19): p. 5843-51.
122. Langer, P.R., A.A. Waldrop, and D.C. Ward, Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(11): p. 6633-7.
123. Rudkin, G.T. and B.D. Stollar, High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature*, 1977. 265(5593): p. 472-3.
124. Gazit, A., A. Yaniv, A. Bafico, T. Pramila, M. Igarashi, J. Kitajewski, and S.A. Aaronson, Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response. *Oncogene*, 1999. 18(44): p. 5959-66.
125. Kishida, M., S. Koyama, S. Kishida, K. Matsubara, S. Nakashima, K. Higano, R. Takada, S. Takada, and A. Kikuchi, Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin. *Oncogene*, 1999. 18(4): p. 979-85.
126. Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(21): p. 7413-7.
127. Glover, D.J., H.J. Lipps, and D.A. Jans, Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet*, 2005. 6(4): p. 299-310.
128. Gershon, H., R. Ghirlando, S.B. Guttman, and A. Minsky, Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry*, 1993. 32(28): p. 7143-51.
129. Zabner, J., A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger, and M.J. Welsh, Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*, 1995. 270(32): p. 18997-9007.
130. Korinek, V., N. Barker, P. Moerer, E. van Donselaar, G. Huls, P.J. Peters, and H. Clevers, Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet*, 1998. 19(4): p. 379-383.
131. Korinek, V., N. Barker, K. Willert, M. Molenaar, J. Roose, G. Wagenaar, M. Markman, W. Lamers, O. Destree, and H. Clevers, Two Members of the Tcf Family Implicated in Wnt/ β -Catenin Signaling during Embryogenesis in the Mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 1998. 18(3): p. 1248-1256.
132. Clevers, H. and M. Van de Wetering, TCF/LEF factors earn their wings. *Trends in Genetics*, 1997. 13(12): p. 485-489.
133. Yan, D., M. Wiesmann, M. Rohan, V. Chan, A.B. Jefferson, L. Guo, D. Sakamoto, R.H. Caothien, J.H. Fuller, C. Reinhard, P.D. Garcia, F.M. Randazzo, J. Escobedo, W.J. Fantl, and L.T. Williams, Elevated expression of axin2 and hnkd mRNA

- provides evidence that Wnt/ β -catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. 98(26): p. 14973-14978.
134. Korinek, V., N. Barker, P.J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and H. Clevers, Constitutive Transcriptional Activation by a β -Catenin-Tcf Complex in APC Colon Carcinoma. *Science*, 1997. 275(5307): p. 1784-1787.
 135. NCBI Datenbank dbSNP.
 136. van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A.-P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema, and H. Clevers, The β -Catenin/TCF-4 Complex Imposes a Crypt Progenitor Phenotype on Colorectal Cancer Cells. *Cell*, 2002. 111(2): p. 241-250.
 137. Cho, Y.J., A. Tsherniak, P. Tamayo, S. Santagata, A. Ligon, H. Greulich, R. Berhoukim, V. Amani, L. Goumnerova, C.G. Eberhart, C.C. Lau, J.M. Olson, R.J. Gilbertson, A. Gajjar, O. Delattre, M. Kool, K. Ligon, M. Meyerson, J.P. Mesirov, and S.L. Pomeroy, Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol*, 2011. 29(11): p. 1424-30.
 138. Dubuc, A., A. Morrissy, N. Kloosterhof, P. Northcott, E. Yu, D. Shih, J. Peacock, W. Grajkowska, T. van Meter, C. Eberhart, S. Pfister, M. Marra, W. Weiss, S. Scherer, J. Rutka, P. French, and M. Taylor, Subgroup-specific alternative splicing in medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*, 2012. 123(4): p. 485-499.
 139. Jones, D.T., N. Jager, M. Kool, T. Zichner, B. Hutter, M. Sultan, Y.J. Cho, T.J. Pugh, V. Hovestadt, A.M. Stutz, T. Rausch, H.J. Warnatz, M. Ryzhova, S. Bender, D. Sturm, S. Pleier, H. Cin, E. Pfaff, L. Sieber, A. Wittmann, M. Remke, H. Witt, S. Hutter, T. Tzaridis, J. Weischenfeldt, B. Raeder, M. Avci, V. Amstislavskiy, M. Zapatka, U.D. Weber, Q. Wang, B. Lasitschka, C.C. Bartholomae, M. Schmidt, C. von Kalle, V. Ast, C. Lawerenz, J. Eils, R. Kabbe, V. Benes, P. van Sluis, J. Koster, R. Volckmann, D. Shih, M.J. Betts, R.B. Russell, S. Coco, G.P. Tonini, U. Schuller, V. Hans, N. Graf, Y.J. Kim, C. Monoranu, W. Roggendorf, A. Unterberg, C. Herold-Mende, T. Milde, A.E. Kulozik, A. von Deimling, O. Witt, E. Maass, J. Rossler, M. Ebinger, M.U. Schuhmann, M.C. Fruhwald, M. Hasselblatt, N. Jabado, S. Rutkowski, A.O. von Bueren, D. Williamson, S.C. Clifford, M.G. McCabe, V.P. Collins, S. Wolf, S. Wiemann, H. Lehrach, B. Brors, W. Scheurlen, J. Felsberg, G. Reifenberger, P.A. Northcott, M.D. Taylor, M. Meyerson, S.L. Pomeroy, M.L. Yaspo, J.O. Korbel, A. Korshunov, R. Eils, S.M. Pfister, and P. Lichter, Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*, 2012. 488(7409): p. 100-5.
 140. Ryan, S.L., E.C. Schwalbe, M. Cole, Y. Lu, M.E. Lusher, H. Megahed, K. O'Toole, S.L. Nicholson, L. Bognar, M. Garami, P. Hauser, A. Korshunov, S.M. Pfister, D. Williamson, R.E. Taylor, D.W. Ellison, S. Bailey, and S.C. Clifford, MYC family amplification and clinical risk-factors interact to predict an extremely poor prognosis in childhood medulloblastoma. *Acta Neuropathol*, 2012. 123(4): p. 501-13.
 141. Parsons, D.W., M. Li, X. Zhang, S. Jones, R.J. Leary, J.C. Lin, S.M. Boca, H. Carter, J. Samayoa, C. Bettgowda, G.L. Gallia, G.I. Jallo, Z.A. Binder, Y. Nikolsky, J. Hartigan, D.R. Smith, D.S. Gerhard, D.W. Fults, S. Vandenberg, M.S. Berger, S.K.

- Marie, S.M. Shinjo, C. Clara, P.C. Phillips, J.E. Minturn, J.A. Biegel, A.R. Judkins, A.C. Resnick, P.B. Storm, T. Curran, Y. He, B.A. Rasheed, H.S. Friedman, S.T. Keir, R. McLendon, P.A. Northcott, M.D. Taylor, P.C. Burger, G.J. Riggins, R. Karchin, G. Parmigiani, D.D. Bigner, H. Yan, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, and V.E. Velculescu, The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science*. 2011 Jan 28;331(6016):435-9. Epub 2010 Dec 16.
142. Taylor, M.D., L. Liu, C. Raffel, C.C. Hui, T.G. Mainprize, X. Zhang, R. Agatep, S. Chiappa, L. Gao, A. Lowrance, A. Hao, A.M. Goldstein, T. Stavrou, S.W. Scherer, W.T. Dura, B. Wainwright, J.A. Squire, J.T. Rutka, and D. Hogg, Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*, 2002. 31(3): p. 306-10.
143. Wegert, J., S. Wittmann, I. Leuschner, E. Geissinger, N. Graf, and M. Gessler, *WTX* inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2009. 48(12): p. 1102-1111.
144. Fukuzawa, R., M.R. Anaka, R.J. Weeks, I.M. Morison, and A.E. Reeve, Canonical *WNT* signalling determines lineage specificity in Wilms tumour. *Oncogene*, 2009. 28(8): p. 1063-1075.
145. Moisan, A., M.N. Rivera, S. Lotinun, S. Akhavanfard, E.J. Coffman, E.B. Cook, S. Stoykova, S. Mukherjee, J.A. Schoonmaker, A. Burger, W.J. Kim, H.M. Kronenberg, R. Baron, D.A. Haber, and N. Bardeesy, The *WTX* tumor suppressor regulates mesenchymal progenitor cell fate specification. *Dev Cell*, 2012. 20(5): p. 583-96.
146. Scheel, S.K., M. Porzner, S. Pfeiffer, S. Ormanns, T. Kirchner, and A. Jung, Mutations in the *WTX* - gene are found in some high-grade microsatellite instable (MSI-H) colorectal cancers. *BMC Cancer*, 2009. 10: p. 413-413.
147. Akhavanfard, S., S.O. Vargas, M. Han, M. Nitta, C.B. Chang, L.P. Le, L. Fazlollahi, Q. Nguyen, Y. Ma, A. Cosper, D. Dias-Santagata, J.Y. Han, K. Bergethon, D.R. Borger, L.W. Ellisen, S.L. Pomeroy, D.A. Haber, A.J. Iafrate, and M.N. Rivera, Inactivation of the tumor suppressor *WTX* in a subset of pediatric tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014. 53(1): p. 67-77.
148. Haruta, M., Y. Arai, N. Watanabe, Y. Fujiwara, S. Honda, J. Ohshima, F. Kasai, H. Nakadate, H. Horie, H. Okita, J. Hata, M. Fukuzawa, and Y. Kaneko, Different incidences of epigenetic but not genetic abnormalities between Wilms tumors in Japanese and Caucasian children. *Cancer Sci*, 2012. 103(6): p. 1129-35.
149. Selvadurai, H.J. and J.O. Mason, *Wnt/β-catenin* Signalling Is Active in a Highly Dynamic Pattern during Development of the Mouse Cerebellum. *PLoS One*, 2011. 6(8): p. e23012.
150. Wang, V.Y. and H.Y. Zoghbi, Genetic regulation of cerebellar development. *Nat Rev Neurosci*, 2001. 2(7): p. 484-91.
151. Meyers, E.N., M. Lewandoski, and G.R. Martin, An *Fgf8* mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet*, 1998. 18(2): p. 136-41.
152. Wurst, W., A.B. Auerbach, and A.L. Joyner, Multiple developmental defects in *Engrailed-1* mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development*, 1994. 120(7): p. 2065-75.

153. Salinas, P.C., C. Fletcher, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and R. Nusse, Maintenance of Wnt-3 expression in Purkinje cells of the mouse cerebellum depends on interactions with granule cells. *Development*, 1994. 120(5): p. 1277-86.
154. Schuller, U. and D.H. Rowitch, Beta-catenin function is required for cerebellar morphogenesis. *Brain Res*, 2007. 1140: p. 161-9.
155. Comai, G., A. Boutet, Y. Neirijnck, and A. Schedl, Expression patterns of the Wtx/Amer gene family during mouse embryonic development. *Dev Dyn*, 2010. 239(6): p. 1867-78.
156. van Amerongen, R., A. Mikels, and R. Nusse, Alternative Wnt Signaling Is Initiated by Distinct Receptors. *Sci. Signal.*, 2008. 1(35): p. re9-.
157. Sillitoe, R.V. and A.L. Joyner, Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. 23: p. 549-77.
158. Selvadurai, H.J. and J.O. Mason, Activation of Wnt/beta-catenin signalling affects differentiation of cells arising from the cerebellar ventricular zone. *PLoS One*, 2012. 7(8): p. e42572.
159. Selvadurai, H.J. and J.O. Mason, Wnt/beta-catenin signalling is active in a highly dynamic pattern during development of the mouse cerebellum. *PLoS One*, 2011. 6(8): p. e23012.
160. Dahmane, N. and A. Ruiz i Altaba, Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development*, 1999. 126(14): p. 3089-100.
161. Fischer, T., J. Guimera, W. Wurst, and N. Prakash, Distinct but redundant expression of the Frizzled Wnt receptor genes at signaling centers of the developing mouse brain. *Neuroscience*, 2007. 147(3): p. 693-711.

8 Abkürzungen

AA	Acrylamid-Lösung
Amer1	APC membrane recrutement 1
APC	Adenomatosis polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
BAA	2 % N,N'-Methylen-bis-Acrylamid-Lösung
bp	Basenpaar
β-TrCP	β-Transducin repeat Containing Protein
cDNA	komplementäre DNA
CGH	komparative genomische Hybridisierung
CKI	Casein Kinase I
CI/CII	Zerebellum/ Kleinhirn
Cbr	Zerebrum/ Großhirn
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
Dvl	Dishevelled (Dsh in Drosophila)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid/ Ethylenediaminetetraessigsäure
EGL	äußere Körnerzellschicht
Erw.	Erwachsene
FAM123B	family with sequence similarity 123B
FBS	Fetales Bovines Serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer/ Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GABA	γ-Aminobutyric acid/ γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GOI	gene of interest
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GSK3β	Glycogen-Synthase Kinase 3β

HCC	hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT	Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase
IGL	innere Körnerzellschicht
LCA	large cell/ anaplastic medulloblastoma
LEF/TCF	lymphoid enhancer factor/ T-cell factor
LIS	“low ionic strength” Gelladepuffer
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein/ LDL-Rezeptor-verwandten Proteinen
MB	Medulloblastom; cMB - klassische Histologie; dMB - desmoplastische Histologie
MB Mx	metastasiertes Medulloblastom
ME	Medulloepithelium
ML	molecular layer/ molekulare Zellschicht
mRNA	Messenger RNA/ Boten-RNA
Mx	Metastasen
NGS	next generation sequencing
OSCS	Osteopathia striata congenita mit kranialer Sklerose
PA	Polyacrylamid (-Gel)
PBS	Phosphate-buffered saline/ Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCL	Purkinje Cell Layer/ Purkinjezellschicht
PCP-Signal	noncanonical planar cell polarity Signalweg
PCR	polymerase chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
PNET	primitiv neuroektodermaler Tumor
PtdIns	N-terminale Phospholipid-Bindungsaktivität
REA-Motive	repeated arginine-glutamic acid-alanine
rhombic lips	rhombische Lippen
RNA	Ribonucleic acid/ Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
Scaffold	Gerüstprotein
sFRPs	soluble Frizzled-related proteins

SHH	sonic hedgehog (SHH)
SNP	single nucleotide polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism/ Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus
Stratum	Stratum ganglionare – Purkinjzellschicht; Stratum granulosum – Körnerzellschicht; Stratum moleculare - Molekularschicht
SUFU	Suppressor of Fused Gens
TBE	tris-borate-EDTA
TEMED	N,N,N´N´-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	transforming growth factor β
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wnt	Wingless (WNT), <i>wingless type MMTV integration site</i>
WTX	Wilms Tumor Gen auf dem X-Chromosom
ZNS	zentrales Nervensystem

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kristin Wenzl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung des Wnt/Wingless Tumorsuppressorgens *WTX* im Medulloblastom und im Kleinhirn“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

CURRICULUM VITAE

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Vortrag „Characterization of the Wnt/Wingless Tumor Suppressor Gene WTX in medulloblastoma and cerebellar tissue” auf dem 56th Annual Meeting of the German Society for Neuropathology and Neuroanatomy (DGNN), Tübingen in 2011

Poster “Molecular genetic analysis of the WTX gene in medulloblastoma and cerebellar tissue”, Kongress Brain Tumor des Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin in 2011

Poster “Molecular genetic analysis of the WTX gene in medulloblastoma”, Annual Meeting der American Association for Cancer Research (AACR), USA in 2011

Poster “Molecular genetic analysis of the WTX gene in medulloblastoma”, Kongress 2nd Cancer Day des Charité Comprehensive Cancer Center (CCCC) sowie des Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC), Berlin in 2010

Publikation, in Vorbereitung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denen danken, die mit konstruktiver Kritik und wichtigen Hinweisen zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Für die Möglichkeit meine Arbeit am Institut für Neuropathologie an der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchzuführen, möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Frank Heppner bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Arend Koch für die Überlassung dieses äußerst interessanten Dissertationsthemas mit wissenschaftlicher Betreuung, seinen unermüdlichen Anregungen und inhaltlichen Diskussionen sowie seine Begeisterungsfähigkeit.

Frau Katrin Guse, Dr. Maren Bradtmöller und Claire Gehlhaar danke ich für die gute Kooperation und die selbstlosen Hilfestellungen bei der Durchführung der Analysen.

Für die Unterstützung bei der Zusammenstellung des Tumormaterials danke ich

Frau Dr. rer. nat. Gabriele Röhn, Zentrum für Neurochirurgie, Uniklinik Köln sowie

Herrn PD Dr. med. Ulrich Schüller, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Meinen Kollegen aus dem Institut für Neuropathologie möchte ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern und Theresa, deren Verständnis und Unterstützung unerschöpflicher Kraftquellen sind.