

Aus dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Guido Reifenberger

**Molekulare und funktionelle Untersuchungen zur Rolle von
Genen der Bone Morphogenetic Protein (*BMP*)-Familie in der
Pathogenese des Medulloblastoms**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Frank Grünheck

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Reifenberger

Korreferent: Prof. Dr. Borkhardt

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.1	Mechanismen der Tumorentstehung.....	1
1.2	Der Einfluss von DNA-Methylierung auf die Genexpression	2
1.3	Morphogene und ihre Rolle bei der Entwicklung	3
1.4	Bone Morphogenetic Proteine (BMP).....	4
1.5	Der BMP-Signalweg	5
1.6	Tumoren des zentralen Nervensystems.....	7
1.6.1	Einteilung und Gradierung primärer ZNS-Tumoren.....	7
1.7	Das Medulloblastom.....	7
1.8	Molekulargenetische Veränderungen im Medulloblastomen	9
1.9	Histogenese der Medulloblastome	10
1.10	Die Rolle von „bone morphogenetic“ Proteinen bei der Entstehung von Medulloblastomen	11
1.11	Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit	11
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Murine Tumor- und Referenzgewebeproben.....	13
2.1.2	Humane Tumor- und Referenzgewebeproben	14
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.4	Antikörper	18
2.1.5	Oligonukleotid-Primer.....	18
2.2	Methoden	21
2.2.1	Molekulargenetische Untersuchungsmethoden.....	21
2.2.1.1	Nukleinsäureaufreinigung.....	21
2.2.1.1.1	CsCl-Gradientenultrazentrifugation	21
2.2.1.1.2	RNA-Extraktion aus Zellen mittels Trizol	22
2.2.1.2	Synthese von cDNA aus mRNA.....	23
2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.1.4	Expressionsanalysen mittels semi-quantitativer Real Time-PCR (RT- PCR)	25
2.2.1.4.1	Auswertung der RT-PCR.....	26

2.2.1.5	Natriumbisulfit-Modifikation genomischer DNA	27
2.2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.2.1.7	Aufreinigung von PCR-Produkten zur Sequenzierung	29
2.2.1.8	DNA-Sequenzierung	29
2.2.2	Zellkulturexperimente	31
2.2.2.1	Kultivierung muriner und humaner Medulloblastomzelllinien.....	31
2.2.2.2	Verwendung von rekombinantem BMB in Zellkulturversuchen	32
2.2.2.3	Bestimmung der Zellvitalität mittels CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.....	32
2.2.2.4	Ermittlung der Proliferationsrate von kultivierten Medulloblastomzellen	33
2.2.2.5	Apoptose-Assay zur Bestimmung der Caspase-3/-7-Aktivität in kultivierten Zellen (APO-ONE).....	33
2.2.2.6	Ansatzmodus zu den funktionellen Zellkulturtests (CellTiter-Glo®, BrdU und APO-ONE).....	34
2.2.2.7	Behandlung von Zellkulturen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A	35
2.2.2.8	Analyse der Koloniebildung von humanen und murinen Medulloblastomzelllinien nach BMP-Gabe	36
2.2.2.9	Immunohistochemische Färbung von Gewebeschnitten	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Veränderungen der mRNA-Expression von <i>BMP2</i> , <i>BMP4</i> und <i>BMP6</i> in Medulloblastomen	38
3.2	Veränderungen der BMP2 und BMP4 Proteinexpression in humanen Medulloblastomen.....	40
3.3	Expression der BMP-Rezeptorgene <i>BMPR1A</i> und <i>BMPR2</i> auf mRNA-Ebene in Medulloblastomen.....	42
3.4	mRNA-Expressionsanalyse der BMP-regulierten Zielgene <i>ID4</i> und <i>MATH1</i> in Medulloblastomen	44
3.5	<i>PTCH1</i> , <i>GLI1</i> und <i>GLI2</i> mRNA-Expression in murinen und humanen Medulloblastomen	46
3.6	Veränderungen der <i>EZH2</i> mRNA-Expression in murinen Medulloblastomen	48

3.7	Expression von <i>BMP2</i> , <i>BMP4</i> und <i>BMP6</i> mRNA nach DNA-Demethylierung und Inhibierung der Histondeacetylierung in Medulloblastomzellen	49
3.8	Analyse des BMP-Rezeptorstatus in Medulloblastomzelllinien	54
3.9	Promotor-Methylierungsanalysen von <i>BMP2</i> , <i>BMP4</i> und <i>BMP6</i> in murinen und humanen Medulloblastomen.....	55
3.9.1	Ergebnisse der Methylierungsanalysen an murinen Tumoren.....	55
3.9.2	Ergebnisse der Methylierungsanalysen an humanen Tumoren.....	61
3.10	Funktionelle Analysen an Medulloblastomzellen nach Gabe von rekombinantem BMP	64
4	Diskussion	68
4.1	Die potentielle Rolle neurogener BMPs bei der Entwicklung des Medulloblastoms	70
4.2	Auswirkungen eines deregulierten BMP-Signalwegs auf die Medulloblastomgenese	72
4.3	Regulierung der BMP-Expression in Medulloblastomen durch Promotor- Hypermethylierung und Histondeacetylierung	74
4.4	Rekombinantes BMP: Ein Therapie-Ansatz für das Medulloblastom ?	75
5	Literatur	78
6	Tabellarische Aufstellung der relativen Expressionswerte einzelner Tumore	89
7	Danksagung	91
8	Tabellarischer Lebenslauf	92
9	Zusammenfassung (Abstract)	94

1.1 Mechanismen der Tumorentstehung

Tumoren entstehen aus körpereigenen Zellen, deren zelluläre Wachstumskontrolle, Differenzierung und Apoptosemechanismen nicht mehr funktionieren. Verschiedene Signalwege in der Zelle dienen hierbei der Regulation und Aufrechterhaltung oben genannter zellulären Mechanismen. Sind in transformierten Zellen diese Signalwege gestört oder unterbrochen, können signalwegspezifische biochemische Reaktionen nicht mehr regelrecht ablaufen und dazu führen, dass die Transkription bestimmter Gene entweder zum Erliegen kommt oder andere Gene unkontrolliert überexprimiert werden. Mutationen im Genom einer Zelle können auch indirekt zu Funktionsstörungen von Signalwegen führen. Die Ursachen dieser Mutationen sind meistens multifaktorieller Genese. So kann durch Mutation eines Gens ein Protein innerhalb einer Signalwegkaskade so verändert sein oder ganz verloren gehen, dass die Kaskade unterbrochen wird.

Gene, die im besonderen Maße durch Mutationen zur Krebsentstehung führen, sind die sogenannten Tumorsuppressorgene und die Protoonkogene. Inaktivierende Mutationen von Tumorsuppressorgenen sowie aktivierende Mutationen von Protoonkogenen fördern Zellwachstum und Proliferation, hemmen Zelldifferenzierung und Apoptose (Weinberg 1994). Eine einzelne Veränderung eines Zellzyklussteuernden Gens führt dabei jedoch in den meisten Fällen nicht zur Entstehung einer malignen Zelle, da dieser Reparatur- und Schutzmechanismen zur Verfügung stehen. Die Zelle entartet meist erst, wenn mehrere Genmutationen stattgefunden haben (Peltomäki 2012, Renan 1993). Maligne transformierte Zellen können sich dann ungehindert vermehren, gesundes Gewebe verdrängen und dessen Funktion beeinträchtigen.

1.2 Der Einfluss von DNA-Methylierung auf die Genexpression

Epigenetische Modifikationen der DNA, wie z.B. die DNA-Methylierung, können die Expression von Genen verändern und dadurch Auswirkungen auf den Prozess der Tumorentstehung und Tumorprogression haben. Gene werden in ihrer transkriptionellen Aktivität und Funktion nicht nur durch Mutationen verändert, sie können auch durch Methylierung von Cytosinen in CpG-reichen DNA-Abschnitten, die häufig dem Transkriptionsstartpunkt vorangehen oder diesen umgeben, transkriptionell inaktiviert werden. Diese sogenannten 5'-CpG-Inseln mit einer hohen Anzahl von CpG-Dinukleotiden finden sich zumeist in regulatorischen Bereichen von Genen und sind mit etwa der Hälfte aller menschlichen Gene assoziiert (Antequera und Bird 1993, Huimin et al. 2012). Grundlage der regulatorischen Funktion dieser CpG-reichen Regionen ist die Modifizierung der Base Cytosin zu 5-Methylcytosin durch Anlagerung einer Methylgruppe an das C5 Atom des Cytosins. Verantwortliche Enzyme hierfür sind die DNA-Methyltransferasen Dnmt-1, Dnmt-3a und Dnmt-3b. Dabei gibt es zwei Arten der Methylierung: Die Erhaltungsmethylierung, welche nach einer Zellteilung das Methylierungsmuster des Elternstranges mittels der Dnmt1 Methyltransferase auf den Tochterstrang überträgt, und die *de-novo*-Methylierung. Mit Hilfe der *de-novo*-Methylierung kann die Zelle ihr Expressionsmuster verändern, indem sie durch die Methylierung von CpG-Dinukleotiden und die anschließende Verlinkung der methylierten CpGs über MeCP2 mit dem Sin3/Histondeacetylase-Corepressor-Komplex eine morphologische Veränderung der Chromatinstruktur bewirkt. Dazu dienen ihr die DNA-Methyltransferasen Dnmt-3a und Dnmt-3b (Leird und Jaenisch 1996, Jones und Baylin 2002, Johnson et al. 2012). Die Hypermethylierung einer Promotorregion führt hierbei zu einer reduzierten, die Promotor-Demethylierung zu einer gesteigerten Expression des nachfolgenden Gens.

In Tumoren kann somit die DNA-Methylierung über die Reduktion der Expression von Tumorsuppressor-Genen oder die Hypomethylierung von Protoonkogenen zur Tumorentstehung beitragen (Robertson und Wollfe 2000, Jones 2002, Wang et al. 2012). So führt eine Hypermethylierung der Promotorregion des humanen Retinoblastom-Tumorsuppressorgens zum gehäufteten Auftreten von Retinoblastomen (Ohtani-Fujita et al. 1993). Beispiele für eine Hypomethylierung sind das Proto-

Onkogen *RAF* beim Leberzellkarzinom (Rao et al. 1989) und das B-Zell Leukämie Onkogen 2 (*BCL2*) bei der chronischen lymphatischen Leukämie des Menschen (Hanada et al. 1993).

1.3 Morphogene und ihre Rolle bei der Entwicklung

Morphogene sind Signalmoleküle, die eine wichtige Rolle bei der Ontogenese von Lebewesen spielen (Fogarty et al. 2005). Dabei steuern sie die Differenzierung von Zellen und die Bildung von Geweben. Um ein Molekül als Morphogen bezeichnen zu können, gelten definierte Eigenschaften. Es muss während der Entwicklung zu bestimmten Zeitpunkten an klar umschriebenen Orten gebildet und sezerniert werden, um zwischen Entstehungs- und Wirkorten einen Konzentrationsgradienten aufzubauen (Gurdon und Bourilotte 2001). Der Effekt des Signalmoleküls auf Zellen an einer bestimmten Position des Konzentrationsgradienten hängt dabei direkt von seiner Konzentration an dieser Stelle ab. Eine hohe Konzentration an Morphogen induziert andere Gene als eine niedrige. Moleküle die zu den Morphogenen gezählt werden, sind unter anderem Proteine der Hedgehog (HH), Wingless (WNT) und „Bone morphogenetic protein“ (BMP) Familien. Letztere sind Mitglieder der TGF-beta Superfamilie. Diese drei Molekülgruppen spielen auch eine entscheidende Rolle für die regelrechte Entwicklung des zentralen Nervensystems. Eines der am besten erforschten Morphogene ist Hedgehog (HH), welches erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde und eine Rolle bei der Segmentbildung während der Embryogenese der Fruchtfliege spielt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980).

Als Korrelat dazu wurde in Vertebraten das Hedgehog-Homolog Sonic Hedgehog (SHH) beschrieben (Echelard et al. 1993), welches eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Neuralrohrs im Menschen spielt (Yanado et al. 1993). Dabei scheint es nicht verwunderlich, dass es bei einer gestörten Expression oder Mutation dieser Moleküle zu Krebs kommen kann. Studien zu erbten Tumorsyndromen, wie etwa dem Gorlin-Goltz-Syndrom oder dem Turcot-Syndrom, haben Störungen der SHH- bzw. WNT-Signalwege mit der Entwicklung von Medulloblastomen bei Kindern in Beziehung gebracht (Hamilton et al. 1995). Mitglieder der BMP-Familie und ihre nachgeschalteten Signalkaskaden regulieren Zellwachstum und Differenzierung in

Stamm- und Vorläuferzellen, und sind somit ebenfalls relevant bei der Krebsentstehung. So konnte in einer Arbeit von Taniguchi und Mitarbeitern (2008) gezeigt werden, dass eine verminderte Expression von BMP6 mit einer adulten Form der T-Zell Leukämie in Verbindung steht.

1.4 Bone Morphogenetic Proteine (BMP)

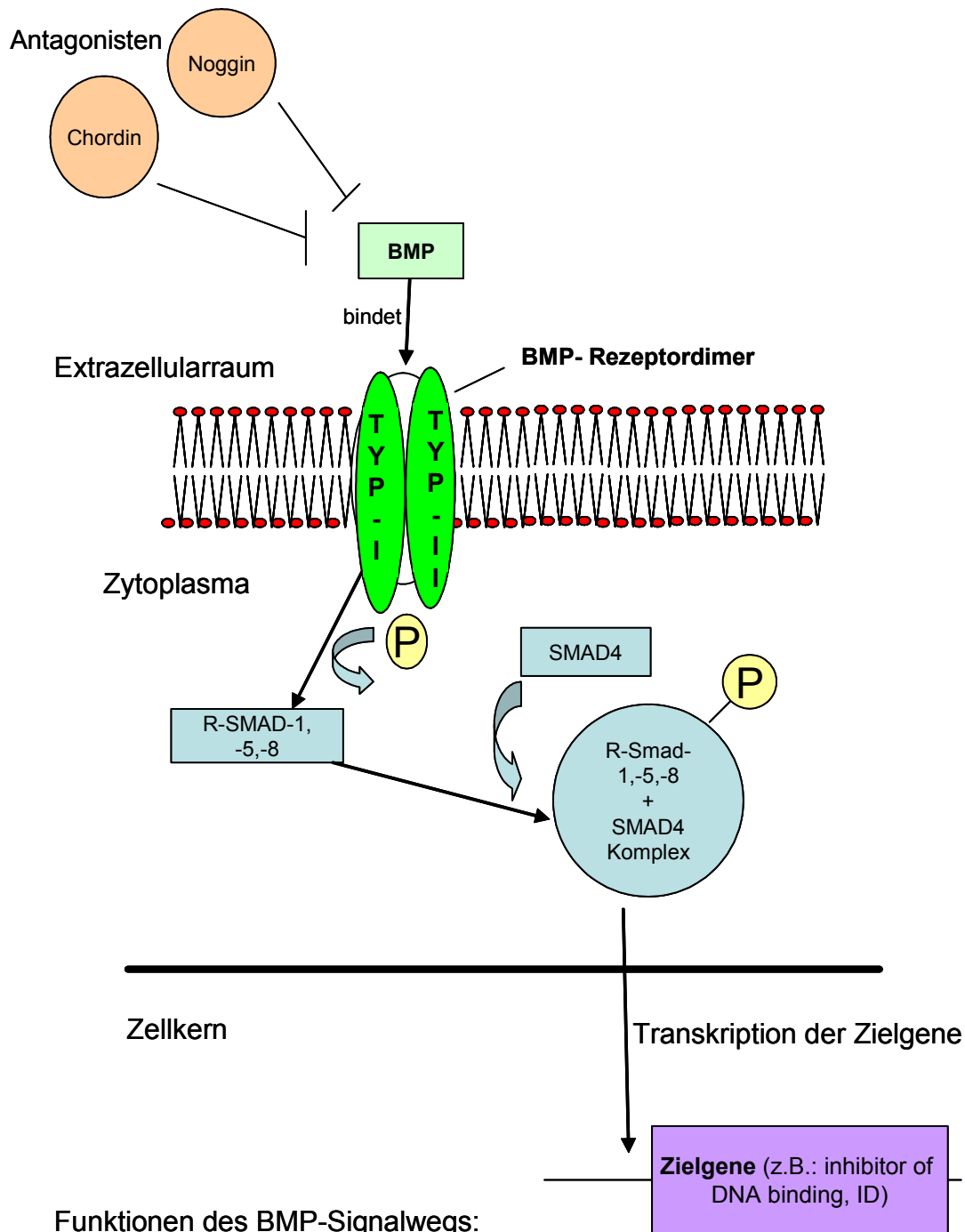
Bone Morphogenetic Protein (BMP) Moleküle sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 15 bis 30 kDa, die der TGF-beta Superfamilie angehören (Rosen et al. 1989, Celeste et al. 1990). Beim Menschen sind mittlerweile mehr als 20 BMP-Mitglieder bekannt (Kawabata et al. 1998, Hruska et al. 2005). Entsprechend der Homologie ihrer Aminosäuresequenz werden sie in drei Untergruppen unterteilt. BMP2 und BMP4 bilden die Untergruppe mit der größten Homologie, während BMP6 gemeinsam mit BMP5 und BMP7 in einer Gruppe mit geringerer Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zusammengefasst werden (Ebendal et al. 1998). Ihre Wirkung entfalten BMP über Transmembranrezeptoren an der Zelloberfläche und eine nachgeschaltete intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die letztendlich über einen aktivierten Komplex aus Transkriptionsfaktoren die Expression von Zielgenen reguliert. Es werden zwei isoforme Rezeptorgruppen (Typ I und Typ II), die eine Serin/Threonin Kinase Aktivität besitzen, unterschieden. Derzeit sind je drei Rezeptoren der Typ I und der Typ II Gruppe bekannt. Der Activin-Typ-I-Rezeptor (ACVR-1) und die BMP-Rezeptoren (BMPRs) 1A und 2A gehören der Typ I-Gruppe an. Die Typ II-Rezeptorgruppe umfasst die Rezeptoren BMPR2, ACVR-2A und ACVR-2B (Fogarty et al. 2005).

Die Bezeichnung „Bone Morphogenetic Protein“ prägte bereits Urist (1965) für die Proteinfraction der entkalkten Knochenmatrix, die er für die ektope Knochenbildung im Rattenmuskel verantwortlich machte. Jedoch konnte erst 1981 von Sampath und Reddi reproduziert werden, dass wirklich der von der Knochengrundsubstanz abgetrennte Proteinanteil den Ausschlag für die Knocheninduktion gibt. Die Wirkung der BMPs ist jedoch nicht auf das Knochengewebe beschränkt, auch die Neurogenese wird durch BMPs reguliert. Sie wirken in der Embryogenese auf die Strukturierung der dreiblättrigen Keimscheibe entlang der dorsoventralen Achse ein (Graff et al. 1997, Dale et al 1992) und spielen eine Rolle bei der neuronalen und

glialen Differenzierung (Kalyani et al. 1998, Wine-Lee et al. 2004). Hierbei konnte gezeigt werden, dass BMPs in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung die Neurogenese und neuronale Differenzierung fördern, jedoch in späteren Entwicklungsstadien die Neuro- und Oligodendrogenese hemmen, dafür aber die Bildung von Astroglia anregen (Li et al. 1998).

1.5 Der BMP-Signalweg

BMPs binden an BMP-Rezeptordimere, bestehend aus jeweils einem Typ-I und einem Typ-II Rezeptor mit inhärenter Serin/Threonin-Kinase-Aktivität. Dabei haben die verschiedenen BMPs unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen Rezeptortypen. Die Moleküle BMP2 und BMP4 binden stärker an die Rezeptoruntertypen BMPR1A und BMPR2A als BMP6. Der Typ-II Rezeptor phosphoryliert nach Ligandenbindung den Typ-I Rezeptor, der wiederum sekundäre Botenstoffe der SMAD-Familie (Rezeptor-aktivierte SMADs; R-SMAD-1,-5 und -8) phosphoryliert, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Diese bilden nach Aktivierung einen Komplex mit SMAD4 (Liu et al. 1997), wandern in den Zellkern und steuern dort die Transkription BMP-abhängiger Zielgene (Yingling et al. 1997, Dennler et al. 1998). Dieser Signalweg unterliegt einer strengen Regulation und kann durch die beiden Antagonisten Chordin und Noggin gehemmt werden (Balesman und Van Hul 2002) (Abb.1).



Funktionen des BMP-Signalwegs:

- 1) Osteoblastendifferenzierung
- 2) Neurogenese
- 3) Spezifizierung des ventralen Mesoderm

Abbildung 1: Schematische Darstellung des BMP-Signalwegs (modifiziert nach Anderson und Darshan 2008)

1.6 Tumoren des zentralen Nervensystems

1.6.1 Einteilung und Gradierung primärer ZNS-Tumoren

Zu den Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS), die nur etwa 2% aller Tumoren des Menschen ausmachen, werden alle gut- und bösartigen Neoplasien gerechnet, die vom Gehirn, den Hirnhäuten und dem Rückenmark ausgehen. Die Klassifikation von primären ZNS-Tumoren sowie deren Gradeinteilung richtet sich nach den internationalen Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO). Dabei unterteilt der Neuropathologe die Tumoren zusätzlich zu seiner Artdiagnose in folgende WHO-Grade (Kleihues et al. 2007):

Tabelle 1: WHO-Grade von Tumoren des zentralen Nervensystems.

WHO-Grad I	langsam wachsend, gutartig, durch Operation heilbar
WHO-Grad II	langsam wachsend, Tendenz zu Rezidiven und maligner Progression
WHO-Grad III	schnell wachsend, malignes Verhalten
WHO-Grad IV	extrem bösartig, schnell wachsend, schlechte Prognose

1.7 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Hirntumor des Kindes- und Jugendalters. In diesem Alter stellen die primären Tumoren des zentralen Nervensystems nach den akuten Leukämien die zweithäufigste Tumorentität dar. Das Medulloblastom ist ein embryonaler Hirntumor, der durch invasives und rasches Wachstum gekennzeichnet ist und gemäß der WHO-Klassifikation in die Gruppe der WHO-Grad IV Tumoren eingeordnet wird. In den meisten Fällen hat das Medulloblastom seinen Ursprung im Kleinhirnwurm oder dem Dach des 4. Ventrikels. Tritt das Medulloblastom jedoch im höheren Lebensalter auf, so steigt die Anzahl der Patienten, in denen es auch in den cerebellären Hemisphären lokalisiert ist (Giangaspero et al. 2007).

Der Altersgipfel der Manifestation eines Medulloblastom liegt um das 5. Lebensjahr. Nur selten treten Medulloblastome nach dem 20. Lebensjahr auf (McNeil et al. 2002). Die 5-Jahre Überlebensrate liegt mit postoperativer Bestrahlung und Chemotherapie bei ca. 87% (Packer et al. 2012).

Die Klinik des Medulloblastoms wird durch Hirndrucksymptome, cerebelläre Syndrome und Störungen der Okulomotorik bestimmt. Auch kann es zu einer begleitenden Hirnstammsymptomatik kommen. Als nicht-invasive diagnostische Verfahren wird insbesondere die kranielle und spinale MR-Bildgebung eingesetzt. Mittels Liquorentnahme kann eine liquorgene Aussaat von Tumorzellen nachgewiesen werden. Aufgrund seiner hohen Malignität (WHO-Grad IV) wird das Medulloblastom primär kombiniert behandelt, d.h. operativ reseziert, um eventuelle Hirndrucksymptome zu lindern und den Tumor möglichst in toto zu entfernen, gefolgt von einer kraniospinalen Strahlentherapie und einer Chemotherapie, z.B. eine intrathekale Gabe von Methotrexat (MTX) (Rutkowski et al. 2005). Bei Kindern unter 3 Jahren wird wenn möglich aufgrund des sich noch entwickelnden Gehirns auf eine Strahlentherapie verzichtet (Grill et al. 2005).

Makroskopisch zeigt das Medulloblastom häufig eine feinkörnige, graue Schnittfläche. Histologisch werden verschiedene Subgruppen unterteilt, wobei zwei Hauptgruppen dominieren (Giangaspero et al. 2007):

1. - das klassische Medulloblastom, das als undifferenzierter und zellreicher Tumor imponiert und häufig neuroblastische Pseudorosetten (Homer-Wright-Rosetten) ausbildet.
2. - das desmoplastische Medulloblastom, welches zellarme Bereiche („pale islands“) aufweist, die von dicht gepackten, hochgradig mitotischen Zellarealen mit Retikulinfaserbildung umgeben werden.

Als weitere, seltenere Subtypen des Medulloblastoms werden noch das anaplastische, das großzellige und das Medulloblastom mit extensiver Nodularität beschrieben (Giangaspero et al 2007).

1.8 Molekulargenetische Veränderungen im Medulloblastomen

Die mit 30-45 % häufigste chromosomale Anomalie in Medulloblastomen betrifft das Chromosom 17 in Form eines sogenannten Isochroms 17q, bei dem einerseits der Verlust eines noch nicht identifizierten Tumorsuppressor-Gens auf dem deletierten Chromosomenarm 17p oder andererseits der Gewinn eines putativen Onkogens auf 17q eine Rolle bei der Tumorgenese spielen (McCabe et al. 2009, Bigner et al 1988). In insgesamt 10-20 % der sporadisch auftretenden Medulloblastome sind Mutationen in Genen für Mitglieder des SHH-Signalwegs zu verzeichnen (Rubin und Rowitch 2002); 10-18 % entfallen auf somatische Mutationen des *PTCH1*-Gens, das den Rezeptor und Inhibitor des SHH-Signalwegs kodiert. Seltener von Mutationen betroffen sind andere Komponenten des SHH-Signalwegs, *SHH* selbst, *SMOH* und *SUFUH* in jeweils 1-2 % der Fälle (Reifenberger et al. 1998, Taylor et al. 2002). Es zeigt sich hierbei ein Zusammenhang zwischen Mutationen in Komponenten des SHH-Signalwegs und der desmoplastischen Medulloblastom-Variante (Pietsch et al. 1997). Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens, das in gesunden Zellen für den Zellzyklus-Arrest bei Auftreten von genomischen Schäden zuständig ist, sind in Medulloblastomen selten. So fanden Adesina und Mitarbeiter (1994) in nur 5-10 % der Fälle eine direkte Veränderung des *TP53*-Gens. Häufiger sind Deletionen der Tumorsuppressor-Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* (Frank et al. 2004). Des Weiteren wurden Mutationen in Komponenten des WNT-Signalwegs in Medulloblastomen nachgewiesen, beispielsweise Mutationen der Tumorsuppressorgene *APC* und β -*Catenin* (Zurawel et al. 1998), Verluste von Chromosom 6, sowie Mutationen bzw. Deletionen des *AXIN1* Tumorsuppressor-Gens auf Chromosom 16 korrelieren ebenfalls mit einer Aktivierung des WNT-Signalwegs (Thompson et al. 2006, Dahmen et al. 2001).

In neueren Arbeiten werden Medulloblastome in vier molekulare Untergruppen eingeteilt. Gruppe A Medulloblastome weisen insbesondere eine Mutation des WNT Signalwegs auf. Gruppe B Medulloblastome eine Mutation im SHH Signalweg, Gruppe C/D Medulloblastome zeigen sich immunhistochemisch positiv für NPR3 und weisen eine gesteigerte Expression von MYC auf. In Gruppe 4

Medulloblastomen findet sich zu 66% das Isochromosom 17q und die Expression von MYC ist runterreguliert (Taylor et al. 2012, Kool et al. 2012).

1.9 Histogenese der Medulloblastome

Die Histogenese des Medulloblastom ist letztlich noch nicht sicher geklärt. Derzeit werden zwei wesentliche Hypothesen diskutiert. Die eine Hypothese schlägt vor, dass sich die Zellen des Medulloblastoms aus Vorläuferzellen der externen Körnerzellschicht (external granular layer, EGL) ableiten, da sie wie die Vorläuferzellen der EGL körnerzellspezifische Transkriptionsfaktoren exprimieren, wie zum Beispiel das Zinkfingerprotein (*ZIC1*) (Yokota et al. 1996, Miyata et al. 1998), Mitglieder der NeuroD-Familie und das Atonal homolog 1 (*ATOH1*) (Ben-Arie et al. 1997, Rostomily et al. 1997).

Die zweite Hypothese hingegen geht davon aus, dass Medulloblastome nicht nur von einem Ursprungszelltyp abstammen. Dabei soll sich das klassische Medulloblastom von Zellen des Velum medullare oder der ventrikulären Matrix ableiten und nur das desmoplastische Medulloblastom aus Vorläuferzellen der externen Körnerzellschicht entstehen.

Hierbei beziehen sich die Vertreter der zweiten Hypothese darauf, dass im klassischen Medulloblastom Calbindin-D exprimiert wird, welches auch in den Zellen der ventrikulären Matrix präsent ist, nicht aber in den Zellen der EGL (Katsetos et al. 1995). Weiterhin zeigen sich Expressionsunterschiede in anderen Signalwegen. Das klassische Medulloblastom exprimiert *OTX2* und zeigt zum Teil eine Aktivierung des WNT-Signalwegs, während das desmoplastische Medulloblastom durch eine *OTX1* Expression und einen aktivierten SHH-Signalweg gekennzeichnet ist (Thompson et al 2006, de Haas et al 2006, Bühren et al 2000, Pietsch et al. 1997).

1.10 Die Rolle von „bone morphogenetic“ Proteinen bei der Entstehung von Medulloblastomen

Viele *in vitro* und *in vivo* Studien schreiben den BMPs eine signifikante Tumorwachstum- und Metastasierungsfördernde Rolle zu. Iantosca und Mitarbeiter (1999) fanden für die Medulloblastomzelllinie DAOY nach Gabe von rekombinantem BMP2 und BMP4 eine verminderte Apoptoserate, gemessen als erhöhte Zellzahl ohne Zunahme der Proliferation. Ebenso ist *BMP2* in humanen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen deutlich überexprimiert im Vergleich zu gutartigen Lungentumoren und normalem Lungengewebe (Langenfeld et al. 2003). *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* Expression wird in metastasierten Sarkomen gefunden (Guo et al. 1999) und die *BMP6* Expression korreliert positiv mit osteoblastischen Veränderungen beim metastasierten Prostatakarzinom (Paez-Pereda et al. 2003). Es gibt aber auch vergleichbare Studien, die implizieren, dass BMPs auch negative Effekte auf die Tumorprogression haben. Hallahan und Kollegen zeigten 2003, dass rekombinantes BMP2 in primären Medulloblastomen und Medulloblastomzellen *in vitro* einen pro-apoptotischen Effekt auf die malignen Zellen hat. Weitergehend scheint BMP2 die SHH-induzierte Proliferation der Medulloblastom-Ursprungszellen zu supprimieren (Rios et al. 2004). Auch wurde in einer Arbeit von Zhao und Mitarbeitern (2008) gezeigt, dass BMP2 und BMP4 über Degradation von MATH1 die Proliferation von murinen Medulloblastomzelllinien hemmen.

1.11 Fragestellung und Zielsetzung der eigenen Arbeit

Das Medulloblastom nimmt als neoplastische Erkrankung des Kinder- und Jugendalters mit einigen wenigen anderen Krebserkrankungen eine Sonderstellung unter den soliden Tumoren, die sonst eher eine Erkrankung des höheren Alters sind, ein. Da seine Entstehung als eine fortbestehende Proliferation und/oder mangelnde Ausdifferenzierung und Wanderung externer Körnerzellvorläufer bzw. periventrikulärer Matrixzellen verstanden wird und BMPs eine nicht unbedeutende Rolle bei der neuronalen Differenzierung in der Embryonalentwicklung spielen, sollte zunächst das Expressionsniveau der im Kleinhirn exprimierten BMP-Familienmitglieder *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* in Medulloblastomen bestimmt werden.

Hinzu kam die Beobachtung, dass die Expression von *Bmp4* in murinen *Ptch1*^{+/-} Medulloblastomen signifikant gegenüber postpartalem Kleinhirn erniedrigt ist und *BMP6* in zahlreichen anderen Tumorarten, u.a. in pleuralen Mesotheliomen, adulten T-Zell-Leukämien und Brustkrebs, eine aberrante Expression zeigt.

Neben insgesamt 12 murinen Medulloblastomen sollten auch 9 klassische und 11 desmoplastische humane Medulloblastome hinsichtlich möglicher Tumor-assoziiierter BMP-Veränderungen auf transkriptioneller und epigenetischer Ebene hin untersucht werden. Zusätzlich zu dem Expressionsstatus von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* galt es auch, die Expression von BMP-Rezeptorgenen und die Expression ausgewählter Zielgene dieses Signalweges (*ID4*, *MATH1*) zu bestimmen. Um mögliche Wechselwirkungen zwischen dem BMP- und dem SHH-Signalweg in Medulloblastomen sowie Unterschiede zwischen den klassischen und desmoplastischen humanen Medulloblastomen aufzuzeigen zu können, sollte auch der Aktivierungszustand des SHH-Signalweges anhand der *PTCH1*, *GLI1* und *GLI2* Expression bestimmt werden.

Neben der Untersuchung einer möglichen Relevanz von erniedrigter *BMP2*, *BMP4* und/oder *BMP6* mRNA Expression bei der Medulloblastomentstehung, sollte eine experimentelle Therapie durch Reaktivierung des BMP-Signalweges über die Gabe rekombinanter BMPs in Medulloblastomzellen *in vitro* getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Murine Tumor- und Referenzgewebeproben

Das Kollektiv der murinen Gewebeproben bestand aus jeweils 6 Medulloblastomen der Genotypen *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{+/+} und *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{-/-} sowie 10 Kleinhirnproben unterschiedlich alter Tiere der Genotypen *Ptch1*^{+/+}/*Nos2*^{+/+}, *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{+/+} und *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{-/-} (Haag et al. 2012). Aus den murinen Medulloblastomen 4M95 und 3M282 wurden am Institut für Neuropathologie Zelllinien generiert, die ebenfalls für die funktionellen und molekulargenetischen Untersuchungen verwendet wurden und im Folgenden zusätzlich das Kürzel ZK tragen. Die Genotypen der murinen Gewebe- und Zellkulturproben werden mit den in Tabelle 2 angegebenen M-Nummern abgekürzt. Weitere Angaben zu Tumorgehalt und Alter der Tiere, aus denen Tumor- und Kleinhirngewebeproben stammen, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 2 : Abkürzungen für die unterschiedlichen Genotypen der verwendeten Mausproben.

Abkürzung	Genotyp
1M	<i>PTCH1</i> ^{+/+} ; <i>NOS2</i> ^{+/+}
2M	<i>PTCH1</i> ^{+/-} ; <i>NOS2</i> ^{+/+}
3M	<i>PTCH1</i> ^{+/+} ; <i>NOS2</i> ^{+/-}
4M	<i>PTCH1</i> ^{+/-} ; <i>NOS2</i> ^{-/-}

Tabelle 3 : Ausgewählte Angaben zu den untersuchten murinen Kleinhirn- und Medulloblastomproben.

Tier-Nummer	Genotyp	Tumorgehalt	Art	Alter bei Entnahme der Probe
2M1034	2M	30%	Gewebe	6 Monate
2M223	2M	70%	Gewebe	8 Monate
2M224	2M	50%	Gewebe	7 Monate
2M227	2M	>60%	Gewebe	4 Monate
2M679	2M	90%	Gewebe	8 Monate
2M758	2M	90%	Gewebe	5 Monate
4M164	4M	>90%	Gewebe	9 Monate
4M321	4M	>90%	Gewebe	9 Monate
4M457	4M	>90%	Gewebe	6 Monate
4M626	4M	90%	Gewebe	7 Monate
4M620	4M	90%	Gewebe	4 Monate
4M208	4M	>70%	Gewebe	7 Monate
1M5	1M	0%	Gewebe	5-6 Wochen
1M4	1M	0%	Gewebe	5-6 Wochen
1M80	1M	0%	Gewebe	1 Jahr
1M82	1M	0%	Gewebe	1 Jahr
2M9	2M	0%	Gewebe	9 Tage
2M127	2M	0%	Gewebe	1 Jahr
2M131	4M	0%	Gewebe	1 Jahr
4M9	4M	0%	Gewebe	9 Tage
4M268	4M	0%	Gewebe	1 Jahr
4M319	4M	0%	Gewebe	1 Jahr
3M282 ZK	3M	100%	Zelllinie	ca. 1Jahr
4M95 ZK	4M	100%	Zelllinie	ca. 1Jahr

Als Referenzgewebe zur Normalisierung der Expressionswerte der TaqMan-PCR-Analysen diente „Mouse Universal Reference Total RNA“ (BD Bioscience), welche ein RNA-Gemisch aus fünf unterschiedlichen Mausgeweben des Mäusestamms C57/BL6 darstellt.

2.1.2 Humane Tumor- und Referenzgewebesproben

Die in dieser Arbeit untersuchte Serie von humanen Medulloblastomproben bestand aus 11 klassischen Medulloblastomen (MB) und 9 desmoplastischen Medulloblastomen (dpMB). Die Tumoren wurden histologisch gemäß der WHO-Klassifikation (Gangaspero et al. 2007) eingestuft. Für die RNA- und DNA-Extraktion wurden ausschließlich Gewebeproben verwendet, bei denen mikroskopisch ein Tumorzellgehalt von über 80 % nachgewiesen wurde. Daten zu Geschlecht und Alter der Tumorpatienten sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 : Ausgewählte Angaben zu den untersuchten humanen Medulloblastomproben.

Case No.:	Diagnose	WHO-Grading	Geschlecht	Alter in Jahren
MB9	klassisches Medulloblastom	IV	männlich	8
MB15	klassisches Medulloblastom	IV	männlich	37
MB17	klassisches Medulloblastom	IV	männlich	5
MB18	klassisches Medulloblastom	IV	weiblich	7
MB19	klassisches Medulloblastom	IV	männlich	11
MB20	klassisches Medulloblastom	IV	männlich	10
MB21	klassisches Medulloblastom	IV	weiblich	4
MB22	klassisches Medulloblastom	IV	männlich	1
MB23	klassisches Medulloblastom	IV	männlich	7
MB24	klassisches Medulloblastom	IV	weiblich	8
MB25	klassisches Medulloblastom	IV	männlich	5
dpMB10	desmoplastisches Medulloblastom	IV	männlich	11
dpMB11	desmoplastisches Medulloblastom	IV	weiblich	33
dpMB13	desmoplastisches Medulloblastom	IV	männlich	12
dpMB14	desmoplastisches Medulloblastom	IV	männlich	26
dpMB16	desmoplastisches Medulloblastom	IV	männlich	20
dpMB19	desmoplastisches Medulloblastom	IV	weiblich	23
dpMB20	desmoplastisches Medulloblastom	IV	männlich	44
dpMB21	desmoplastisches Medulloblastom	IV	weiblich	2
dpMB22	desmoplastisches Medulloblastom	IV	männlich	4

Als Referenz-cDNA zur Normalisierung der in den humanen Gewebeproben erzielten Expressionswerte diente aus universeller humaner Referenz-RNA (ein RNA-Gemisch aus 10 verschiedenen humanen Zelllinien der Fa. Stratagene) synthetisierte cDNA. Als Normalgewebekontrollen dienten RNAs aus adultem und fetalem Kleinhirngewebe („human adult normal tissue:cerebellum“ und „human fetal normal tissue:cerebellum“; Fa. BioChain), sowie zur Bisulfit-Sequenzierung genomische DNA aus humanem fetalen und adulten Gehirn („human adult brain“ und „fetal brain“ der Firma BioCat). Zu funktionellen und/oder molekulargenetischen Analysen wurden die Zelllinien DAOY sowie D458Med eingesetzt.

Für die Bestimmung der Proteinexpression in humanen Medulloblastomen mittels immunohistochemischen Nachweises dienten als Positivkontrollen die Kontrollschnitte von folgenden Geweben:

Tabelle 5: Ausgewählte Angaben zu den als Referenzgewebe untersuchten fetalen und postpartalen Kleinhirngewebeproben.

Gewebeschnitt Nr.	Gewebeart	Geschlecht d. Spenders	SSW
KH1	Kleinhirn mit äußerer Körnerzellschicht	männlich	35 + 6 SSW
KH2	Kleinhirn mit äußerer Körnerzellschicht	männlich	26 + 2 SSW
KH3	Kleinhirn mit äußerer Körnerzellschicht (Autolyse)	männlich	39 SSW
KH4	Kleinhirn mit äußerer Körnerzellschicht	weiblich	normaler Partus

SSW = Schwangerschaftswoche

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Die nachfolgende Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die in der eigenen Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagentien, Kits und sonstiges Verbrauchsmaterial, mit Angaben zu den zugehörigen Lieferanten bzw. Herstellern.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien.

Substanz / Verbrauchsmaterial	Firma; Land	Bestell-Nr.:
Total RNA human adult normal tissue, cerebellum left	Biocat GmbH; DE	R1234040-10-BC
Total RNA human adult normal tissue, cerebellum right	Biocat GmbH; DE	R1234041-10-BC
Total RNA human fetal normal tissue, cerebellum	Biocat GmbH; DE	R1244039-50 BC
Genomic DNA human fetal brain	Biocat GmbH; DE	D1244035-BC
Genomic DNA human adult brain	Biocat GmbH; DE	D1234035-BC
mouse universal reference total RNA	BD Bioscience Clontech; DE	636657
human universal reference total RNA	Stratagene; NL	740000
BMP2 recombinant human	Invitrogen	PHC7141
BMP4 recombinant human	Invitrogen	PHC9534
BMP6 recombinant huma	MBL International Corp.; DE	JM49911-10
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies Europe; NL	4337450
RNAse freies Wasser	Life Technologies Europe; NL	AM9937
TagMan Mastermix 5ml	Life Technologies Europe; NL	4369016
4ell culture slides	BD Bioscience; DE	REF 354104
Hot Start Taq DNA Polymerase	BioBudget Tech. GmbH; DE	80-66010100
dNTP-Set	BioBudget Tech. GmbH; DE	80-85011000
my-budget universal Agarose 500g	BioBudget Tech. GmbH; DE	10-35-1020
my-budget 8er Strips caps gewölbt	BioBudget Tech. GmbH; DE	30-SP-0075
96well PCR Platten	BioBudget Tech. GmbH; DE	30-SP-9600
100bp DNA-Leiter	BioBudget Tech. GmbH; DE	30-SP-0605L

Substanz / Verbrauchsmaterial	Firma; Land	Bestell-Nr.:
TrueStart Taq DNA Polymerase (5U/μl)	Fermentas GmbH, DE	EP0612
Jetquick PCR Purification Kit	Wollerau, CH	410250
Random Hexamere pd(N)6	Gene Link Bioscience; USA	26-4000-03
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen; DE	P36935
Trizol	Invitrogen; DE	15596018
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen; DE	18064014
SYBR Green qPCR-Kit	Invitrogen; DE	11733046
modified IMEM	Invitrogen; DE	A1048901
L-Glutamine 200mM 100x	Invitrogen; DE	25030024
DMEM	Invitrogen; DE	41965062
D-PBS (Dulbecco's Phosphate buffered Saline)	Invitrogen; DE	14190169
Parafilm 2511	UKD Düsseldorf	2511
PP-Röhrchen 50ml/ 15ml steril	Nunc; DE	334940 (50ml)/ 366060 (15ml)
Tissue culture dishes (versch. Größen)	Nunc; DE	Barcode
Trypsin/EDTA	PAA; DE	L11004
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA; DE	P11010
Fötales Bovines Serum, Tetrazyklin neg., EU approved	PAA; DE	A15109
Wizard DNA Clean-up System	Promega; DE	A7280
APO-One Homogenous Caspase-3/-7 Assay	Promega; DE	G7790
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche; DE	11647229001
Guanidinthiocyanat	Roth; DE	0017.2
Agar-Agar, Kobe I	Roth; DE	52102
Cäsiumchlorid	Roth; DE	86272
Rotiphoese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30% (29:1)	Roth; DE	A1242
DEPC water	Roth; DE	T1433
Trichostain A	Sigma; DE	T85521MG
RNAse Zap	Sigma; DE	R2020-6x250ML
Natriumdodecylsulfat-Lösung (10% SDS Lösung)	Sigma; DE	71736-100ML
5-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA)	Sigma; DE	A36565MG
Acrylamid-Lösung	Sigma; DE	1697-500ml
MTT cell culture tested	Sigma; DE	M5655-1G
N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma; DE	T22500-100ML
Ethidiumbromide aqueous solution, 10mg	Sigma; DE	E1510-10ML
Ammoniumpersulfate molecular biology	Sigma; DE	A9164-100G
Blue dextran Mol. WT. 2,000,000	Sigma; DE	D5751-1G
Bromphenolblue, Xylene cyanol Dye	Sigma; DE	B3269-5ML
Dimethylsulfoxid	Sigma; DE	D5879-500ML
96-well Platten für StepOne	Starlab; DE	E1403-7700
10μl Spitzen mit Filter	Starlab; DE	Barcode
200μl Spitzen mit Filter	Starlab; DE	Barcode
Gewebekulturflaschen 75 cm2	VWR; DE	3913146
Cryo-Röhrchen, 1,8 ml mit Innengewinde	VWR; DE	4796841
Sterelisationsindikatorband 19mm	VWR; DE	4810095
Zellschaber 25cm, Klinge 17mm, einzeln steril	VWR; DE	SARS831830
Ethanol absolut zur Analyse	VWR; DE	1009832511
Harnstoff	VWR; DE	8187101000
Multiwellschale, 12 well	VWR; DE	7342156
Formamid	VWR; DE	1096841000
Essigsäure 96%	VWR; DE	1000582500
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5ml	VWR; DE	0030120.86
Thermometer	VWR; DE	6200862

2.1.4 Antikörper

Die nachfolgende Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die in der eigenen Arbeit verwendeten Antikörper.

Tabelle 7: Übersicht über die in den eigenen Untersuchungen verwendeten Antikörper.

Antikörper	Firma	Bestell-Nr.	Klon
Anti-BMP2 polyklonaler Antikörper	ABD Serotec	AHP1728	
Anti-BMP4 (N16) polyklonaler Antikörper	Santa Cruz	sc6896	
Anti-Synaptophysin monoklonaler Antikörper	DakoCytomation	M0776	SY38
Anti-Nestin monoklonaler Antikörper	Chemicon Intl.	AB5922	rat-401
Anti-NeuN monoklonaler Antikörper	Millipore	MAB377	A60

2.1.5 Oligonukleotid-Primer

Die nachfolgende Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die in der eigenen Arbeit für die Untersuchungen mittels „real-time“-PCR verwendeten PCR-Primer.

Tabelle 8: Übersicht über die in den eigenen Untersuchungen für Real time-PCR-Analysenverwendeten PCR-Primer.

Name	Sequenz	Gen Bank Annotation	Konzentration
human-ARF1-F	GACCACGATCCTCTACAAGC	NM_001024226	300nM
human-ARF1-R3	TCCCACACAGTGAAGCTGATG		300nM
human-BMP-2-F	TTTCCATGTGGACGCTCTTT	NM_001200	300nM
human-BMP-2-R	AACTCGAACTCGCTCAGGAC		300nM
human-BMP-4-F	AGGAGGAGGAGGAAGAGCAG	NM_001202	300nM
human-BMP-4-R	CACCTCATCTCTGCGGATGC		300nM
human-BMP-6-F2	CTCAACCGCAAGAGCCTTCT	NM_001718	300nM
human-BMP-6-R2	ACTCTTTGTGGTGTGCGCTGA		300nM
human-BMP-7-F	GAGTGTGCCTTCCCTCTGAA	NM_001719	300nM
human-BMP-7-R	AGGATGACGTTGGAGCTGTC		300nM
human-BmpR1a-F	GGTGACAGTACACAGGAAAC	NM_004329	300nM
human-BmpR1a-R	GATTTTCATCCCAGTGCCATG		300nM
human-BmpR2-F	GGAGACGAGAGGCTCACTGC	NM_001204	300nM
human-BmpR2-R	CACAGAATGAGCCAGACGGC		300nM
human-ATOH1-F	CATCTGCACGGCACGCGC	NM_005172	300nM
human-ATOH1-R	TTGCTGCTGCTGGCACCGC		300nM

Name	Sequenz	Gen Bank Annotation	Konzentration
human-EZH2-F	GATCAGGATGGTACTTTTCATTGAAG	NM_004456	300nM
human-EZH2-R	AGGGCATTACCAACTCCAC		300nM
human-Id4-TaqF	CTGCTGAGGCAGCCACCAC	NM_001546	300nM
human-Id4-TaqR	GCTGTCGCCCTGCTTGTTCA		300nM
human-Gli1-TaqF	GCCACACAAGTGCACGTTTG	NM_005269	600nM
human-Gli1-TaqR	GGTGCGTCTTCAGGTTTTCG		600nM
human-Gli2-TaqF	ACGTTTCGAGGGCTGCTCG	NM_005270	600nM
human-Gli2-TaqR	GTCCGAGGCGTTGGAGAAG		600nM
human-PTCH-TaqF	GCCAGCGGCTACTTACTCATG	NM_001083605	600nM
human-PTCH-TaqR	GCCACTGACAGTGCAACCAG		600nM
mouse-MRPL32-5F	ACTACCATGGCCGGTGCGTC	NM_029271	600nM
mouse-MRPL32-5R	ATGGATGGTCTCTGGACGGC		100nM
mouse-BMP-2-F	ACGGA CTGCGGTCTCCTAA	NM_001200	300nM
mouse-BMP-2-R	GTCTCTGCTTCAGGCCAAAC		300nM
mouse-BMP-4-F	AGGAGGAGGAGGAAGAGCAG	NM_001202	300nM
mouse-BMP-4-R	CACCTCATTCTCTGGGATGC		300nM
mouse-BMP-6-F	GAAGGTTGGCTGGAATTTGA	NM_013107	300nM
mouse-BMP-6-R	ACCTCGCTCACCTGAAGAA		300nM
mouse-BMP-7-F	TCCAGGGAAAGCATAATTCG	NM_007557	300nM
mouse-BMP-7-R	GTGGTATCGAGGGTGGAAGA		300nM
mouse-Gli1-F	GACCATGCGCAGACACACGG	NM_010296	600nM
mouse-Gli1-R	CTGGTGCGACCGAAGGTGCG		600nM
mouse-Gli2-F	AGTGTGGAGGCCAGTAGCAC	NM_001081125	450nM
mouse-Gli2-R	TCGCTGCTGCAGGATGAC		150nM
mouse-PTCH1-F	GGCAGCTAATCTCGAGACCA	NM_008957	600nM
mouse-PTCH1-R	GCCTCTTCTCCTATCTTCTGACG		300nM
mouse-BmpR1aF	TAGGTCAAAGCTGTTCCGAG	NM_009758	300nM
mouse-BmpR1aR	CTGTCTCACTGGTGTAAGTG		300nM
mouse-BmpR2-F	GGAGCACGTGTTATGGTCTG	NM_007561	300nM
mouse-BmpR2-R	GTTCCATTCTGAATTGAGGGTG		300nM
mouse-Id4-TaqF	CCCTGCTTTGCTGAGACAGC	NM_031166.2	300nM
mouse-Id4-TaqR	GTCACCCTGCTTGTTACGG		300nM
mouse-EHZ2-F	GGAGGATACAGCCTGTGCAC	NM_007971	300nM
mouse-EHZ2-R	CCGAGGCGACTGCATTACAGG		300nM
mouse-MATH1-F	ACTGCAGTCCAATCTGGGT	NM_005172	300nM
mouse-MATH1-R	ATGAAATCAACAGAGGCTTG		300nM

Die nachfolgende Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die in der eigenen Arbeit verwendeten PCR-Primer für die Untersuchungen zur Natriumbisulfit-Sequenzierung von CpG-Inseln.

Tabelle 9: Übersicht über die in den eigenen Untersuchungen für Natriumbisulfitsequenzierungen verwendeten PCR-Primer.

Name	Sequenz	Amplikonlänge	Gen Bank Annotation	Konzentration
human-BMP2-bisu-TS-1F	gcggccgcTTTTTTTGTAGAGTAGGGAG	199	NM_001200	300nM
human-BMP2-bisu-TS-1R	CCTACCGACTCCCTCC			300nM
human-BMP2-bisu-TS-2F	gcggccgcGGAGGGAGTCGGTAGG	244		300nM
human-BMP2-bisu-TS-2R	CGATCCCCGATAATCCACT			300nM
human-BMP2-bisu-R2	CAATCCCCAATAATCCACT			300nM
human-BMP2-bisu-hell-F	gcggccgcGAGtAttTAAtGtAGGAGAT	251		300nM
human-BMP2-bisu-hell-R	CATCACTCTACCTTACTCCA			300nM
human-BMP2-bisu-rot-F	gcggccgcAGTGGATtAtCGGGGAt	194		300nM
human-BMP2-bisu-rot-R	ATCTCCTACAATAAACTACTC			300nM
human-BMP2-bisu-blau-F	gcggccgcTGGAGTAAGGtAGAGTGATG	314		300nM
human-BMP2-bisu-blau-R	ATTCAAAAAATCCCCAACCA			300nM
human-BMP4-bisu-TS-F	gcggccgcTTATGGGTATTTTTGGAAGGTA	233	NM_001202	300nM
human-BMP4-bisu-TS-R	CCCTTTCTAAAAATAAAACCC			300nM
human-BMP6-bisu-blau-F	gcggccgcAGGtTGtAGTGtAGtCGG	291	NM_001718	300nM
human-BMP6-bisu-blau-R	CTTCCCTTCCTAACCCCTCA			300nM
human-BMP6-bisu-hell-F	gcggccgcTGAGGGtTAGGAAGGGGAAG	219		300nM
human-BMP6-bisu-hell-R	ACACAACAACCCCCACCAACC			300nM
human-BMP6-bisu-rot-F	gcggccgcGGTGGTGGGGGtTGtTGtGt	207		300nM
human-BMP6-bisu-rot-R	CAAATCTCCTTCTACATCTCC			300nM
human-BMP6-bisu-TS-F	gcggccgcGGGAtTGtTtACGtAAGGG	242		300nM
human-BMP6-bisu-TS-R	CCGAACACTACACTACAACCTA			300nM
mouse-BMP2-bisu-5F	gcggccgcggGAAAAGTAATAGAAGTTTAGTTG	286	NM_001200	300nM
mouse-BMP2-bisu-5R	AAAATTTAAATACCTAACCC			300nM
mouse-BMP2-bisu-yellow-F	gcggccgcGGTTGGAATTTTAGATTGTG	202		300nM
mouse-BMP2-bisu-yellow-R	CCAAATATCTTTTATAACAACC			300nM
mouse-BMP2-bisu-pink-F	gcggccgcTTAGAGTTAGTTGAGGGAT	225		300nM
mouse-BMP2-bisu-pink-R	AACTAAACAAAACACTACTAT			300nM
mouse-BMP2-bisu-blue-F	gcggccgcTTGGGTTTATTTAAGATATAG	284		300nM
mouse-BMP2-bisu-blue-R	TCCACTCCACTCCACCAAT			300nM
mouse-BMP4-bisu-green-F	gcggccgcAGAGGTTAAATAATGTTTTAG	265	NM_001202	300nM
mouse-BMP4-bisu-green-R	CCCTCTACCTTAAATAACAC			300nM
mouse-BMP4-bisu-blue-F	gcggccgcGATTATTTTAAGATGTTTGGTTTG	335		300nM
mouse-BMP4-bisu-blue-R	ATCTCTACACCCAAAACAACAA			300nM
mouse-BMP4-bisu-hell-F	gcggccgcTTGTTGTTTTGGGTGTAGAGAT	283		300nM
mouse-BMP4-bisu-hell-R	ACCGCCAAAAACACAAAAATTATC			300nM
mouse-BMP4-bisu-TS-F	gcggccgcGGAAGGTATAGGGATTAGTTGG	225		300nM
mouse-BMP4-bisu-TS-R	CCTCCCCTTCTAAAAATAAAACC			300nM
mouse-BMP4-CpG25-F	gcggccgcTtttAGAtTGGAGtCGGTAAAG			300nM
mouse-BMP4-CpG25-R	CCATACTAATTTAAATACCTAAACCGAAAA			300nM
mouse-BMP6-bisu-lila-F	gcggccgcAGAGGAAAGTTAGATCGTGGT	306	NM_013107	300nM
mouse-BMP6-bisu-lila-R	CTACCCTAAACCCTCAAAAA			300nM
mouse-BMP6-bisu-green-F	gcggccgcTTTTTGAGGGTTTAGGGTAG	225		300nM
mouse-BMP6-bisu-green-R	CCTTATCTCTCATAATCATC			300nM
mouse-BMP6-bisu-blue-F	gcggccgcGATGATTATGAGAGATAAGG	205		300nM
mouse-BMP6-bisu-blue-R	CACCACCAACACAACCACTA			300nM

2.2 Methoden

2.2.1 Molekulargenetische Untersuchungsmethoden

2.2.1.1 Nukleinsäureaufreinigung

2.2.1.1.1 CsCl-Gradientenultrazentrifugation

Nukleinsäuren und Proteine, die empfindlich sind gegenüber Scherkräften und Verunreinigungen mit z. B. Nukleasen bzw. Proteasen, können mittels der Cäsiumchlorid(CsCl)-Dichtegradientenzentrifugation, die 1957 von Meselson und Mitarbeitern entwickelt wurde, isoliert werden. Der Vorteil der CsCl-Gradientenzentrifugation liegt darin, dass neben der RNA auch die DNA und Proteine ein- und derselben Tumor- bzw. Normalgewebeprobe auf Grund unterschiedlicher Dichte separiert werden können und somit weiteren Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Die Gewebeproben der isolierten Hirntumoren und der Normalgehirne wurden hierzu je in 6 ml GITC-Lösung (4M Guanidinisothiocyanat in 25 mM Na-Citrat pH 7,0; 0,8% 2-Mercaptoethanol) in 50 ml Falcon-Röhrchen mittels Ultra-Turrax T25 (Janke und Kunkel IKA Labortechnik) und Polytron-Messern homogenisiert und der Zelldebris für 15 min bei 2500 rpm und Raumtemperatur in einer Hettich Rotina 46 R Zentrifuge (Ausschwingrotor; 1300 g) abzentrifugiert. Die Überstände wurden auf jeweils 4 ml sterile CsCl-Lösung (5,7 M CsCl in 25 mM NaAc, pH 5,0) in SW41.1 Polyallomer-Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 16 h bei 32000 rpm und 15 °C in einer Beckman L8-M Ultrazentrifuge (SW41 TI Ausschwingrotor; 175273 g) abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation befindet sich in den oberen 2 ml die Proteinfraction. In der darunterliegenden Interphase (ca. 5 ml) folgt die DNA, während die RNA am Boden des Zentrifugenröhrchens pelletiert.

Die Proteine und die DNA wurden bis zur weiteren Verwertung getrennt bei -80 °C und -20°C gelagert. Um eine Verunreinigung durch CsCl-Lösung zu verhindern, wurde das RNA-Pellet nach Abgießen des CsCl-Überstandes umgekehrt stehend für 30 min in den Kühlschrank zum Trocknen gestellt und nachfolgend in 200 µl RNAsin-Mix (90 µl RNAsin (40 U/µl), 193,5 µl DTT und 6,916 ml DEPC-Wasser) resuspendiert. Die anschließende Fällung der RNA erfolgte mit 20 µl 3M Natriumacetat, pH 5,2 und 500 µl eiskaltem 95%-igen Ethanol für 30 min bei -80 °C. Präzipitiert wurde die RNA für 20 min bei 14000 rpm und 4°C in einer Hettich EBA 12

R Kühlzentrifuge, danach mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-100 µl RNAsin-Mix resuspendiert.

Die DNA-haltige Interphase wurde mit 350 µl 7,5 M Ammoniumacetat versetzt und für 2 h bei 37° C auf niedriger Stufe geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung mit dem 2,5-fachem Volumen an 95 %-igem Ethanol versetzt, 30 min bei -80 °C gelagert und für 20 min bei 2500 rpm und 4°C in einer Hettich Rotina 46 R Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das DNA-Pellet in 5 ml Proteinase K-Puffer resuspendiert, mit 100 µl Proteinase K-Stammlösung (20 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 55 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion störende Proteinkontaminationen entfernt, die aufgereinigte wässrige DNA-haltige Phase erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und mit 200 µl 5M NaCl und 12,5 ml 95 % Ethanol versetzt und für 2 h bei -20°C gelagert. Abschließend wurde die präzipitierte DNA für 20 min bei 4°C und 4000 rpm pelletiert, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100-200 µl TE-Puffer (100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Die Quantifizierung der aufgereinigten Nukleinsäuren erfolgte spektralphotometrisch mit dem Nanodrop ND-100 der Firma PeqLab. Hierzu wurden 2 µl der Nukleinsäure-Lösung auf das Applikationsfenster des Nanodrop ND-100 aufgebracht und analysiert. Die Qualität der aufgereinigten DNA und RNA wurde zusätzlich mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.1.1.2 RNA-Extraktion aus Zellen mittels Trizol

Auf Zellkulturschalen (90mm Durchmesser) der Firma Nunc ausgesäte Zellen wurden mit 1 ml Trizol (Invitrogen) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von der Kulturschalenoberfläche gelöst, durch die entstehenden Scherkräfte und die proteindenaturierende Wirkung des im Trizol enthaltenen Guanidinisothiocyanat lysiert und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Zelllösung für 30 s gevortext und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Nach einer folgenden 15-minütigen Phasentrennung bei 14000 rpm und 4°C wurde die RNA aus der wässrigen Phase mit 500 µl Isopropanol für 30 min bei -80°C gefällt, anschließend 30 min bei 4°C und 14000 rpm pelletiert und 2x mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl RNAsin-Mix resuspendiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.1.2 Synthese von cDNA aus mRNA

Mittels des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA Polymerase, ist es möglich zuvor isolierte mRNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Die so synthetisierte cDNA kann später als Matrix in einer PCR für Gen-Expressionsanalysen genutzt werden. Hexamer-Primer dienen der reversen Transkriptase als Startpunkt der cDNA Synthese an der mRNA Vorlage. Diese Oligonukleotide zufälliger Sequenz binden an komplementäre Sequenzen der mRNA. An die freien 3'OH-Gruppen dieser Primer hängt dann die Reverse Transkriptase zur mRNA-Sequenz komplementäre dNTP's an und setzt den cDNA-Strang entsprechend der mRNA-Matrix komplementär fort.

Es wurden 3 µg RNA, die in einem Gesamtvolumen von 27,2 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser gelöst waren, zur Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 22,8 µl des folgenden cDNA-Synthese-Reaktionsgemisches:

0,1 M DTT	0,4 µl
RNAsin	1,0 µl
BSA (1 mg/ml)	4,9 µl
dNTP-Gemisch (25 µM je Nukleotid)	2,5 µl
pd(N) ₆ (1,5 mg/ml)	3,0 µl
5x H-RT- Puffer	10,0 µl
Superskript II -	1,0 µl
Reverse Transkriptase (200 U/ml)	
Gesamtvolumen	22,8 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 42°C inkubiert und die reverse Transkriptase durch 10-minütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde durch PCR-Amplifikation des ubiquitär exprimierten *β2-Mikroglobulin* Gens überprüft. Von den cDNAs wurden für die Gen-Expressionsanalysen Gebrauchslösungen mit einer Verdünnung von 1:25 in Aqua dest. für semi-quantitative Real-Time (RT)-PCRs hergestellt.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese von Mullis 1983 erstmals veröffentlichte Methode ist heute eine der am meisten benutzten Standardmethoden der Molekularbiologie. Die Reaktion besteht aus drei sich zyklisch wiederholenden Schritten, die der exponentiellen Vervielfältigung durch Primer definierter Abschnitte von Nukleinsäuren dient. Die drei sich dabei zyklisch wiederholenden Schritte sind:

- 1) Denaturierung
- 2) Primerhybridisierung
- 3) Elongation

Im Folgenden werden die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze und der Programmablauf einer Polymerasekettenreaktion aufgeführt:

Matrizen-Nukleinsäure	20-100ng
10x PCR-Puffer	2,5 µl
2mM dNTP Gemisch	2,5 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	15 µl
Hot Start Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	01 µl
Aqua dest.	ad 25 µl

Je nach Bedarf wurden dem Reaktionsmix verschiedene Zusätze wie 5% DMSO, 5% Formamid oder 20% Faktor Q (Qiagen) hinzugefügt, um die Sensitivität und die Spezifität der Reaktion zu erhöhen. Nach einer initialen Denaturierungsphase von 15 min, die bei Hot-Start Taq-Polymerasen auch deren Aktivierung dient, erfolgte die Amplifikation der Nukleinsäuren-Matrize in einem Thermozykler der Fa. Biometra für 40-45 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

40-45 Zyklen	95 ⁰ C	15 min	Initiale Denaturierung (Hot-StarTaq)
	95 ⁰ C	20 s	Denaturierung
	55-63 ⁰ C	30 s	Primer-Anlagerung
	72 ⁰ C	30 s	Elongation
	72 ⁰ C	10 min	Abschließende Elongation

Nachdem die entsprechende Zyklenzahl durchlaufen war, wurden die entstandenen Doppelstränge 10 min bei 72 °C vervollständigt und die PCR-Produkte bei 4°C gelagert. Die durch die PCR-Reaktion erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt und analysiert. Für die jeweiligen Oligonukleotidprimer wurden die PCR-Bedingungen bezüglich der Primerhybridisierungstemperatur und der Anzahl der Reaktionszyklen ausgetestet.

2.2.1.4 Expressionsanalysen mittels semi-quantitativer Real Time-PCR (RT-PCR)

Die Real Time-PCR ist eine Methode der Vervielfältigung von Nukleinsäuren, die dem Prinzip der herkömmlichen PCR entspricht, jedoch eine kontinuierliche quantitative Bestimmung des PCR-Produktes durch Interkalieren des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green (Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG, Invitrogen) in die doppelsträngige DNA ermöglicht. Die Produktbestimmung erfolgt hierbei durch Fluoreszenzintensitätsmessungen zum Ende eines jeden Zyklus der PCR, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge des amplifizierten Produktes zunimmt.

Um Konzentrationsschwankungen der eingesetzten cDNA-Menge zwischen den einzelnen Proben auszugleichen, wurde die gemessene Fluoreszenzintensität des Zielgens in Relation zu der eines konstitutiv exprimierten Referenzgens gesetzt. Bei den Expressionsanalysen an humanen Tumor- und Normalgewebeproben diente ADP-Ribolysierungsfaktor 1 (*ARF1*) als Referenzgen, für die murinen Untersuchungsgewebe mitochondriales ribosomales Protein L32 (*MRLP32*). Der angestrebte Vergleich von Expressionswerten aus unabhängigen Versuchsansätzen wurde über die Normalisierung aller Expressionswerte auf die Expressionswerte einer universellen RNA-Mischung, getrennt nach humanen und murinen Proben, sichergestellt. Jede untersuchte Gewebeprobe wurde in einem doppelten Ansatz

gemessen. Als humane, nicht neoplastische Gewebekontrollen dienten käuflich erworbene RNAs aus fetalem und adultem Kleinhirn, während im murinem System die jeweilige mittlere Expression aus 10 tumorfreien Kleinhirnproben als Normalgewebeskontrolle herangezogen wurde.

Zu Beginn der Expressionsanalysen wurde von jedem Zielgen eine Primermatrix erstellt, durch die das optimale Konzentrationsverhältnis von Vorwärts- und Rückwärtsprimer für die Genexpressionsanalysen ermittelt wurde. Jeweils 50 µM, 300 µM oder 900 µM Vorwärtsprimer wurde in Kombination mit je 50 µM, 300 µM oder 900 µM Rückwärtsprimer in Parallelansätzen von insgesamt 25 µl mit 12,5 µl Master-Reaktionsmix und verdünnter cDNA eingesetzt. Die Primerkonzentrationsverhältnisse, die in der Dissoziationskurve nur einen Peak bei der errechneten Schmelztemperatur zeigten und den niedrigsten Fluoreszenzschwellenwert (Ct-Wert) aufwiesen, wurden für die anschließende Untersuchung der Proben verwendet. Diese PCR-Reaktionen fanden in 96-well Reaktionsplatten mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl bei konstanter cDNA-Menge und 12,5 µl Master-Reaktionsmix nach folgendem PCR-Programm statt.

40 Zyklen	95°C	10 min	Aktivierung der Hot Start Taq
	95° C	15 s	Denaturierung des DNA- Doppelstrang
	60° C	60 s	Anlagern der Primer und DNA-Synthese

Die exakten Primersequenzen der untersuchten Gene und die genutzten Konzentrationsverhältnisse zwischen Vorwärtsprimer und Rückwärtsprimer befinden sich im Materialteil unter 2.1.5.

2.2.1.4.1 Auswertung der RT-PCR

Zur Quantifizierung des PCR-Produktes mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes SYBR® Green wird der CT-Wert (Fluoreszenzschwellenwert; Cycle Treshold) festgelegt. Dieser Wert gibt denjenigen PCR-Zyklus an, zu dessen Zeitpunkt die Basisfluoreszenz des Farbstoffes, welche schon zu Beginn des Experimentes der Fluoreszenzfarbstoff selbst hervorruft, signifikant überschritten wird. Zum Zeitpunkt der CT-Wert Festlegung befindet sich die PCR-Reaktion in einer exponentiellen und somit quantifizierbaren Phase. Die Phase davor ist nicht quantifizierbar, da zu

diesem Zeitpunkt die Templatmenge zu gering ist und die Wahrscheinlichkeit eines optimalen Reaktionsablaufes somit gering ist. Die Phase danach ist durch den eintretenden Substratverbrauch und durch nachlassende Enzymaktivität für eine Quantifizierung ebenfalls nicht geeignet. Das aus den Fluoreszenzintensitäten gewonnene Diagramm zeigt die relative Zunahme an PCR-Produkt logarithmisch gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Zur Auswertung werden aus den in doppelten Ansätzen gewonnenen CT-Werten für Ziel- und Referenzgen jeweils der Mittelwert gebildet. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Differenz der Mittelwerte von Ziel- und Referenzgen (ΔCT). Der ΔCT -Wert der humanen bzw. murinen Normalisierungskontrolle wird von den ΔCT -Werten der Tumorproben subtrahiert ($\Delta\Delta CT$ -Wert). Um eine übersichtlichere Darstellung zu erlangen, werden die $\Delta\Delta CT$ -Werte invers zur Basis 2 potenziert ($2^{-\Delta\Delta CT}$), so dass Werte > 1 einer stärkeren und Werte < 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zur universellen Kontrolle entsprechen. Werte $< 0,5$ wurden als Hinweis auf eine deutlich Herunterregulation, d.h. eine relevanten mRNA-Expressionverminderung des jeweiligen Gens gewertet.

2.2.1.5 Natriumbisulfit-Modifikation genomischer DNA

Diese DNA-Modifikation dient dem Auffinden von 5-Methylcytosin und besteht in der Desaminierung von Cytosin zu Uracil durch Behandlung mit Natriumbisulfit (NaHSO_3). Cytosin reagiert mit seiner 5,6-Doppelbindung leicht mit dem Bisulfit-Ion zu Cytosinsulphonat, welches anschließend durch hydrolytische Desaminierung in Uracilsulphonat umgewandelt wird. Unter alkalischen Bedingungen wird die Sulfongruppe abgespalten und es entsteht Uracil. 5-Methylcytosin hingegen reagiert nur sehr selten mit dem Bisulfit-Ion, wird nicht hydrolytisch desaminiert und bleibt als 5-Methylcytosin erhalten. Bei der anschließenden Polymerase-Kettenreaktion wird für das anstelle von Cytosin eingeführte Uracil ein Adenin in den komplementären DNA-Strang eingebaut, während 5-Methylcytosin im Gegenstrang ein Guanin erhält. Nach Sequenzierung mit dem Rückwärtsprimer detektiert man an Stellen von Cytosin dann Adenin und von 5-Methylcytosin dann Guanin, und kann so zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen unterscheiden.

10 µl der DNA-Arbeitslösung (100 ng/µl) wurden nach Zugabe von 1,5 µl 10 N NaOH und 38,5 µl *Aqua dest.* für 15 min bei 37 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Bisulfitbehandlung durch Zugabe von 30 µl 10 mM Hydrochinon und 520 µl 3 M Natriumbisulfit (beides frisch angesetzt). Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht für 16 h bei 55 °C inkubiert. Für die darauf folgende Aufreinigung der bisulfitbehandelten DNA wurde das Wizard® DNA Clean-Up System des Herstellers Promega verwendet. Nach Elution der DNA mit 50 µl *Aqua dest.* erfolgte die Desulphonierung durch Zugabe von 1,5 µl 10 N NaOH und 15-minütiger Inkubation bei 37 °C. Danach wurde die modifizierte DNA mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Vol. 96 % Ethanol für 30 min bei -20 °C gefällt und anschließend 30 min bei 4°C mit 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl *Aqua dest.* aufgenommen.

2.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese wurde die Spezifität von Polymerase-Kettenreaktionen ebenso wie die Qualität aufgereinigter DNA und RNA überprüft. Dazu wurden 2 %ige Agarose-Gele in 1x TAE Puffer verwendet.

Der 10xTAE- Puffer enthielt folgende Zusammensetzung:

Tris(hydroxymethyl-)aminomethan	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht. Je 100 ml der Agarose-Puffer-Lösung wurden mit 2 µl Ethidiumbromid-Lösung (1mg/ml) versetzt und zum Aushärten in einen Gelträger mit Probenstaschenkämmen gegossen. Nach dem Aushärten des Geles wurden die zuvor vorbereiteten PCR-Produkte zusammen mit einem 6x BFB-Ladepuffer (30 % Glycerol, 0,25 % Bromphenol- Blau, 0,25 % Xylene-Cyanol FF in *Aqua dest.*) in die dafür vorgesehenen Probenstaschen geladen. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde zusätzlich eine 100 bp DNA-Leiter

in eine der Probentaschen geladen. Die anschließende Elektrophorese fand in 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von $1,8 \text{ V/cm}^2$ für 20 min statt und das Ergebnis wurde mittels des GelDoc 1000 Systems der Fa. Biorad dokumentiert.

2.2.1.7 Aufreinigung von PCR-Produkten zur Sequenzierung

Um PCR-Produkte ohne Störsignale sequenzieren zu können, müssen vor dem Auftragen des PCR-Produktes auf das Sequenziergel überschüssige Nukleotide und Primer aus der Probe entfernt werden. Dies erfolgte durch Säulenaufreinigung des PCR-Produktes mit dem „Jet Quick PCR Purification Spin Kit“ (Firma Genomed) gemäß den Herstellerangaben.

2.2.1.8 DNA-Sequenzierung

Das in dieser Arbeit benutzte „Big Dye-Terminator v1.1 Cycle“ Sequenzierungskit der Fa. Applied Biosystems beruht auf einer Weiterentwicklung der von Sanger 1977 etablierten Sequenzierungsmethode (Sanger et al. 1977), durch die es möglich wurde, die exakte Basenabfolge in einem DNA-Strang durch ein Kettenabbruchverfahren festzustellen. Hierzu synthetisiert eine DNA-Polymerase zu einer DNA-Matrize den komplementären Strang. Die DNA-Polymerase benötigt dazu einen Primer (Oligonukleotid), der nach Anlagerung an einen komplementären Teil der DNA-Matrize mit seinem freien 3'-OH Ende der Polymerase als Start der Kettenverlängerung durch Einbau von Desoxynukleotiden dient. In dem dafür benötigten Reaktionsgemisch befinden sich neben dNTP's auch fluoreszenzmarkierte ddNTP's (Didesoxynukleotide). Durch Einbau dieser fluoreszenzmarkierten ddNTP's, die im Vergleich zu den dNTP's auch am 3'-C Atom der Ribose keine OH-Gruppe tragen, kommt es zur Termination der Kettenverlängerung. Diese Termination folgt dem Zufallsprinzip in annähernd gleichem Maße an allen Stellen des neu-synthetisierten DNA-Stranges. Jedes der vier verschiedenen ddNTP's ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dies ermöglicht bei der darauf folgenden Auftrennung im Polyacrylamidgel einem an

einen Computer angeschlossenen Laserscanner die Reihenfolge der Basen zu detektieren und somit das Sequenzmuster der DNA-Matrize wiederzugeben.

Die durch eine PCR amplifizierte und zu sequenzierende DNA-Matrize wurde mittels dem unter 2.2.1.7 erwähnten „Jet Quick PCR Purification Spin Kit“ (Firma Genomed) aufgereinigt. Die anschließend folgende Sequenzierreaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt.

Aufgereinigtes PCR-Produkt	5-7,5 µl
Primer Oligonukleotid (10 pmol/µl)	0,5 µl
BigDye® Terminator v.1.1 Cycle	
Sequenzierungs-Mix (Applied Biosystems)	2,0 µl
Aqua dest.	ad 10 µl

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen:

25 Zyklen	— {	96°C	10 s	Denaturierung
		50°C	5 s	Primer-Anlagerung
		60°C	4 min	Primer-Verlängerung

Um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte ddNTP's aus der Reaktion zu entfernen, wurde die Sequenzreaktion nach Zugabe von 1 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 25 µl 95 % Ethanol für 30 min bei 14000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 2 x mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA-Pellets wurden für 10 min bei 37°C getrocknet und in 4 µl Ladungspuffer [Formamid: 0,5 M EDTA pH 8,0; 5:1, 50mg/ml Blue Dextran (Sigma)] aufgenommen.

Anschließend wurden jeweils 2 µl der Sequenzreaktion auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel folgender Zusammensetzung geladen:

30 % Acrylamid/ Bis-Acrylamid 29:1, 3,3 % (Biorad)	8,4 ml
Harnstoff	21 g
10 X TBE	6 ml
Aqua dest	20 ml
10 % APS	350 µl
TEMED	30 µl

Die Sequenzierung erfolgte mit einem ABI PRISM® 377–Sequenziergerät der Firma Applied Biosystems bei 48 Watt und 50°C Geltemperatur. Zur Auswertung der Methylierungsanalysen wurden die erhaltenen Sequenzen mit der entsprechenden CpG Insel des zu untersuchenden Gens verglichen, dessen Basensequenz der Genombibliothek der NCBI Blast–Internet Homepage (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) entnommen wurde.

2.2.2 Zellkulturexperimente

2.2.2.1 Kultivierung muriner und humaner Medulloblastomzelllinien

Die murinen Zelllinien 4M95 und 3M282 wurden in einem Kulturmedium bestehend aus Modified IMEM (Gibco), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen) und 10 % Hitze-inaktiviertem (30 min bei 56°C) fetalem Rinderserum (FBS; PAA) (IMEM+) bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zur Passagierung der Zellen wurden diese einmalig mit 10 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-EDTA (1x) pro 75 cm² Kulturschale bedeckt. Nach 2 min Einwirkzeit bei 37 °C lösten sich die Zellen vom Boden der Kultivierungsflasche und der Abdauprozess durch das Trypsin konnte durch Zugabe von 5 ml IMEM+ geblockt werden. Die Zellsuspension wurde dann auf frische Kulturflaschen verteilt oder durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm pelletiert, in je 1 ml Einfriermedium/Einfriereröhrchen (90 % IMEM+; 10 % DMSO) resuspendiert und schrittweise auf -80 °C abgekühlt. Die endgültige Lagerung der eingefrorenen Zellen erfolgte dann in flüssigem Stickstoff. Zur Rekultivierung der Zellen wurden diese

schnellstmöglich aufgetaut, um die Einwirkzeit des bei Raumtemperatur zytotoxischen DMSO auf die Zellen möglichst kurz zu halten. Mit frischem IMEM+ versetzt wurden sie dann in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche verbracht und bei 37°C und 5 % CO₂- Atmosphäre erneut kultiviert.

Die Kultivierung der humanen Medulloblastomzelllinie DAOY erfolgte in MEM alpha+ bestehend aus MEM alpha (Gibco), 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % Hitze-inaktiviertem FBS, die der humanen Medulloblastomzelllinie D458 in improved IMEM, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % Hitze-inaktiviertem FBS bei 37°C und 5% CO₂ – Atmosphäre. Alle weiteren Arbeiten wurden entsprechend den Kultivierungsmethoden der murinen Medulloblastomzelllinien durchgeführt (s.o.).

2.2.2.2 Verwendung von rekombinantem BMB in Zellkulturversuchen

Die in den funktionellen Tests verwendeten rekombinanten „BMPs wurden in steriler 20 mM Essigsäurelösung nach Protokoll des Herstellers in einer Konzentration von 0,1 µg/µl gelöst und in den Tests mit einer Konzentration von 100 ng/ml Kulturmedium verwendet. Den Kontrollgruppen wurde die jeweilige Menge an 20 mM Essigsäure zugesetzt, um für eine potentielle Wirkung der Essigsäure auf die Zellen zu kontrollieren.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellvitalität mittels CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

Der CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay der Firma Promega basiert auf einer Luziferasereaktion, anhand derer man Proliferationsmessungen in Zellkulturen durchführen kann. Hierbei wird der ATP-Gehalt metabolisch aktiver Zellen in der Luziferasereaktion, die mittels eines Luminometers gemessen wird, als Maß für die Zahl lebender Zellen bestimmt. Das CellTiter-Glo® Reagenz wird direkt, ohne vorherige Waschschrte, zu den Zellen ins Medium pipettiert, für 10 min inkubiert und das Signal anschließend gemessen. Während der Inkubationszeit werden die Zellen lysiert und endogene ATPasen inhibiert. Der lineare Messbereich des Assays liegt

zwischen 5 und 50.000 Zellen. Die Einzelnen Pipetierschritte wurden nach dem von der Herstellerfirma vorgegebenen Protokoll durchgeführt.

2.2.2.4 Ermittlung der Proliferationsrate von kultivierten Medulloblastomzellen

Der Bromdesoxy-Uridin (BrdU) Proliferationstest (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetrics); Roche) wird genutzt, um die Proliferationsrate kultivierter Zellen zu messen. Hierzu wird Bromdesoxy-Uridin (BrdU) dem Zellkulturmedium (10 µl BrdU / 100 µl Zellkulturmedium zugegeben, das die zu testenden Zellen während der S-Phase des Zellzyklus als „falschen“ DNA-Baustein anstelle von Thymidin in die neu gebildete DNA einbauen. Nach 24 h Einwirkzeit wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 150 µl FixDenat pro well fixiert, wobei auch die DNA denaturiert. Der nach diesem Arbeitsschritt zugegebene Peroxidase-gekoppelte Antikörper gegen BrdU (100 µl/well Anti-BrdU-POD Arbeitslösung 1:100) bindet während einer 90-minütigen Inkubationszeit das eingebaute BrdU. Das daraufhin zugesetzte Substrat der Peroxidase (100 µl/well) wird für 30 min proportional zu dem eingebauten BrdU durch die Peroxidase in ein farbiges Produkt umgesetzt, dessen Extinktion bei 370 nm gegen eine Referenz-Absorptionswellenlänge von 492 nm gemessen wurde. Die Extinktion bildet ein direktes Maß für die proliferative Aktivität der Zellen.

2.2.2.5 Apoptose-Assay zur Bestimmung der Caspase-3/-7-Aktivität in kultivierten Zellen (APO-ONE)

Mittels des APO-ONE Homogeneous Caspase-3/-7 Assays (Promega) kann die Aktivität von Caspase- 3 und -7 *in vitro* bestimmt werden. Caspasen (Cystein-Aspartat spezifische Proteasen) sind Proteasen, die spezifisch Peptidbindungen C-terminal von Aspartat spalten und so Enzyme der Apoptose („Programmierter Zelltod“) induzieren (Nicholson und Thornberry 1997). Der APO-ONE Homogeneous Caspase-3/-7 Assay verwendet zur Detektierung aktivierter Caspase-3 und Caspase-7 das fluoreszenzmarkiertes Substrat Rhodamine 110 bis(N-CBZ-L-aspartyl-L-valyl-aspartic acid amide), welches nach Spaltung durch in Zellen gebildeter Caspasen

eine messbare Fluoreszenz bei 499 nm_{Ex} / 521 nm_{Em} freigibt. Die über 24 h bzw. 48 h mit Bmps behandelten Zellen wurden mit dem gleichen Volumen an Substrat/Puffergemisch (1/100) zu Kulturmedium versetzt, 2 h bei RT im Dunkeln bei ca. 100 Schwingungen/Minute inkubiert und die Fluoreszenz bei 499 nm_{Ex} / 521 nm_{Em} in einem Safire™ Plattenlesegerät (Fa. Tecan) gemessen. Das Fluoreszenzsignal ist dabei direkt proportional zur Menge aktivierter Caspasen.

2.2.2.6 Ansatzmodus zu den funktionellen Zellkulturtests (CellTiter-Glo®, BrdU und APO-ONE)

Die Ansätze der funktionellen Zellkulturtests CellTiter-Glo®, BrdU und APO-One wurden in 96-well Zellkulturplatten (Fa.Nunc) durchgeführt, wobei je Testreihe zwei 96-well Platten für je eine Messung nach 48 h und 72 h angesetzt wurden und pro Testsubstanz (BMP2, BMP4 und BMP6) je zwei Wiederholungen durchgeführt wurden.

Die ausgesäte Zellzahl betrug je well 2500 Zellen/100 µl Zellkulturmedium. Nach einer 24-stündigen Anwuchsphase wurden für den CellTiter-Glo® und den BrdU-Test je 6 wells pro verwendeter Zelllinie (DAOY, 4M95 und 3M282), für den Apo-One Test je 3 wells mit frischem Zellkulturmedium und 100 ng/ml des entsprechenden rekombinanten BMPs und je 6 bzw. 3 wells pro Zelllinie mit frischem Zellkulturmedium und 20 mM Essigsäure als Kontrollansatz versetzt (Abb. 2) Alle weiteren 24 h erfolgte ein Wechsel von Test- und Kontrollmedium.

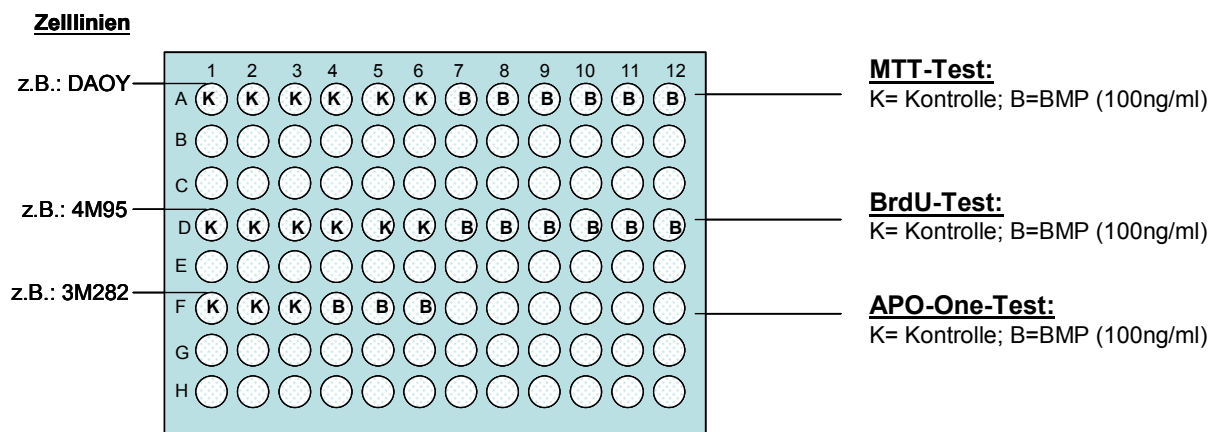


Abbildung 2: Beispiel einer CellTiter-Glo®, BrdU oder APO-ONE Zellkultur-Testplatte.

2.2.2.7 Behandlung von Zellkulturen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin und Trichostatin A

Um einen Hinweis auf den Einfluss von DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung auf die Expression der Gene *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* zu erhalten, wurden die Zelllinien DAOY, 3M282 und 4 M95 mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA) behandelt. 5-Aza-dC dient hierbei als Cytidin-Analogon, das während der Replikation der Zellen in deren DNA eingebaut wird und mit der DNA-Cytosin-C5-Methyltransferase 1 (Dnmt1) eine kovalente Bindung eingeht. Aufgrund dieser Bindung wird das Enzym Dnmt1 gehemmt und kann die Methylierung des Tochterstranges nicht mehr vornehmen. Der neu-synthetisierte DNA-Strang bleibt unmethyliert. Trichostatin A inhibiert Histon-Deacetylasen und beeinflusst darüber die Chromatinstruktur der DNA, die ausschlaggebend dafür ist, ob und in welchem Maße die Genexpression stattfindet.

Die jeweiligen Zellen wurden nach Trypsinierung mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen pro Zellkulturschale (9cm Durchmesser) ausgesät und parallel verschiedenen Behandlungen unterzogen.

A+T1 Behandlung:	Anzucht der Zellen für 24 h. Danach Behandlung der Zellen für 24 h mit 500 nM 5-Aza-dC (1mM Stammlösung in PBS) und 1 μ M TSA (3 mM Stammlsg. in DMSO).
A+T2 Behandlung:	Anzucht der Zellen für 24 h. Dann Behandlung der Zellen für 24 h mit 500 nM 5-Aza-dC und 1 μ M TSA. Danach Mediumwechsel und Behandlung mit 1 μ M 5-Aza-dC und 1 μ M TSA. Inkubation für weitere 24 h.
TSA Behandlung 1:	Anzucht der Zellen für 24 h. Danach Behandlung der Zellen für 24 h mit 1 μ M TSA.
TSA Behandlung 2:	Anzucht der Zellen für 24 h. Danach Behandlung der Zellen für 48 h mit 1 μ M TSA (Mediumwechsel nach 24 h mit frischem TSA).

Kontrolle: Täglicher Mediumwechsel ohne Wirksubstanzen (3 Tage)

Die Isolation der mRNA aus den Zellen erfolgte mittels Trizol wie unter 2.2.1.1.2 beschrieben. Die Quantifizierung der isolierten RNA wurde mittels des Nanodrop ND100 Systems durchgeführt, die Qualität der RNA mit einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.2.8 Analyse der Koloniebildung von humanen und murinen Medulloblastomzelllinien nach BMP-Gabe

Mit dem „colony forming assay“ wurde überprüft, ob BMPs in der Lage sind, die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten in den Medulloblastom-Zelllinien DAOY und 3M282 zu reduzieren oder deren Wachstum ganz zu unterdrücken. Hierzu wurden 3 % Agar in PBS 1:5 mit 45 °C warmem Kulturmedium verdünnt und 3 ml dieses Medium-Agars in jede Vertiefung einer 6-well-Kultivierungsschale ausgegossen. In 800 – 1000 µl Topagar, bestehend aus 3 % Agar in PBS, 1:10 mit 45°C warmem Kulturmedium verdünnt, wurden dann je 10 – 20.000 Zellen einer Zelllinie auf dem Medium-Agar ausplattiert. Zellbewegungen können aufgrund des viskösen Mediums nur noch eingeschränkt stattfinden, was einzelnen Zellen, die ankerungsunabhängig wachsen können, die Möglichkeit bietet, Zellkolonien zu bilden, die dann nach 2-wöchiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂-Atmosphäre makroskopisch zu sehen sind. Die Sichtbarkeit der einzelnen Kolonien wird durch Zugabe von je 50 µl MTT auf 450 µl Kulturmedium und anschließender Inkubation für 1 h bei 37 °C verbessert, so dass man die einzelnen Kolonien auszählen konnte.

2.2.2.9 Immunohistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Paraffinschnitte der zu untersuchenden Gewebeproben wurden 2x für 15 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Nach der Alkoholreihe wurden die Gewebsschnitte für 20 min in Citratpuffer in einen Dampfgerar gestellt. Danach folgte ein Waschschrir für 5 min in A. dest. und ein 10 minütiger H₂O₂-Block, der anschließend mit PBST (10 min) gestoppt wurde.

Vor der immunohistochemischen Färbung der Gewebsschnitte wurden diese mit einer Lösung aus 2 %igem Normalserum und 2 %igem bovines Serum-Albumin (BSA) in PBST für 60 min bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Nach den 60 min wurde die Blocklösung von den Gewebsschnitten abgenommen und der 1. Antikörper verdünnt in frischem PBST mit 2 % BSA und 2 % Normalserum auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte 3x für 5 min in PBST gewaschen. Es folgte die 60 minütige Inkubation des 2. Antikörpers bei RT, der vorher frisch in PBST mit 2 % BSA und 2 % Normalserum angesetzt wurde. Danach wurde der 2. Antikörper 3x für 5 min mit PBST abgewaschen. Darauf wurden die Gewebsschnitte 15 min in ABC-Lösung (1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B in 2,5ml PBST) inkubiert und darauf 5x mit PBST gewaschen. Es folgte eine 3 min Inkubation mit Diaminobenzidin (DAB) (1,5 ml Substrat + 30 µl DAB), die mit VE-Wasser nach 3 min gestoppt wurde. Danach wurden die Gewebsschnitte in Hämalun gegengefärbt und nach Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol mit Deckgläsern in DePeX eingedeckelt.

3 Ergebnisse

3.1 Veränderungen der mRNA-Expression von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* in Medulloblastomen

Die drei „Bone Morphogenetic Protein“ Gene *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* wurden auf Veränderungen ihrer mRNA Expression in murinen und humanen Medulloblastomen hin untersucht. Alle drei Gene zeigten eine signifikant erniedrigte mRNA Expression in allen murinen Medulloblastomen, die von *Ptch1*^{+/-} Mäusen mit und ohne zusätzlichem *Nos2* Knock out stammten (Abb. 3).

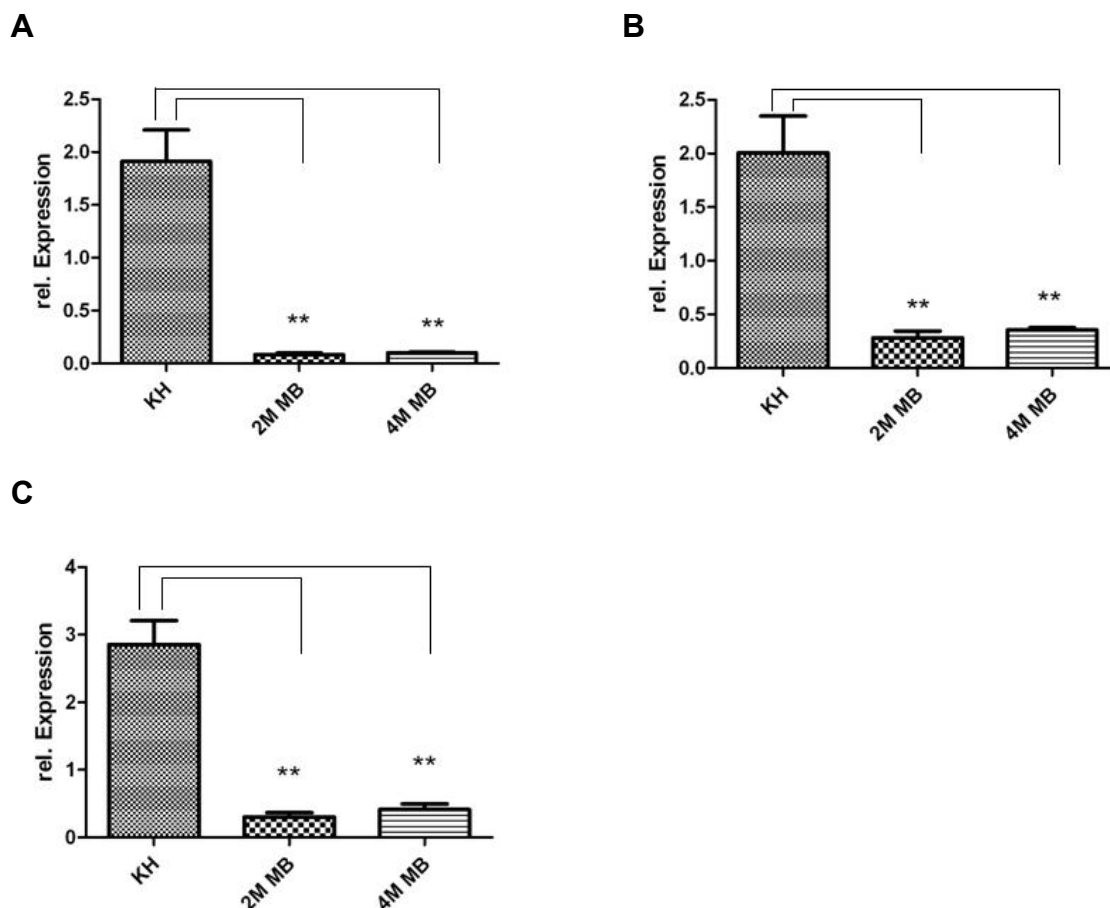


Abbildung 3: Expression von *Bmp2* (A), *Bmp4* (B) und *Bmp6* (C) auf mRNA-Ebene in murinen Medulloblastomen. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte und die Standardabweichung in jeweils sechs Medulloblastomen aus Mäusen des Genotyps *Ptch1*^{+/-}; *Nos2*^{+/-} (2M), sechs Medulloblastomen aus Mäusen des Genotyps *Ptch1*^{+/-}; *Nos2*^{-/-} (4M) und 10 murinen Kleinhirnen (KH) aus Wildtypmäusen sowie 2M- und 4M-Mäusen. Da die Kleinhirnkontrollen weder Genotyp- noch altersabhängige Bmp mRNA-Expressionsunterschiede aufwiesen, wurden sie als eine Kontrollgruppe (KH) zusammengefasst. Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine murine Universalkontrolle.

** : Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,01$) zwischen Tumor- und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test).

Die humanen Medulloblastome zeigten folgende Ergebnisse für die mRNA-Expression der untersuchten BMPs. Die mRNA-Expression von *BMP2* war, bezogen auf das fetale Kleinhirngewebe (fcb), in den klassischen und desmoplastischen Medulloblastomen signifikant erniedrigt. Die mRNA-Expression von *BMP4* war in der klassischen Variante des Medulloblastoms signifikant erniedrigt, in der desmoplastischen Variante war die Expression von *BMP4* zwar erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Für *BMP6* zeigten sich ebenfalls in beiden Varianten des Medulloblastoms (klassisch und desmoplastisch) eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression, bezogen auf das fetale Kleinhirngewebe (fcb). Die mRNA-Expressionsniveaus von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* in den Medulloblastomen unterschieden sich nicht von denen in adulten Kleinhirngewebeproben (acb) (Abb. 4). Die relativen Expressionswerte der einzelnen Tumoren sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

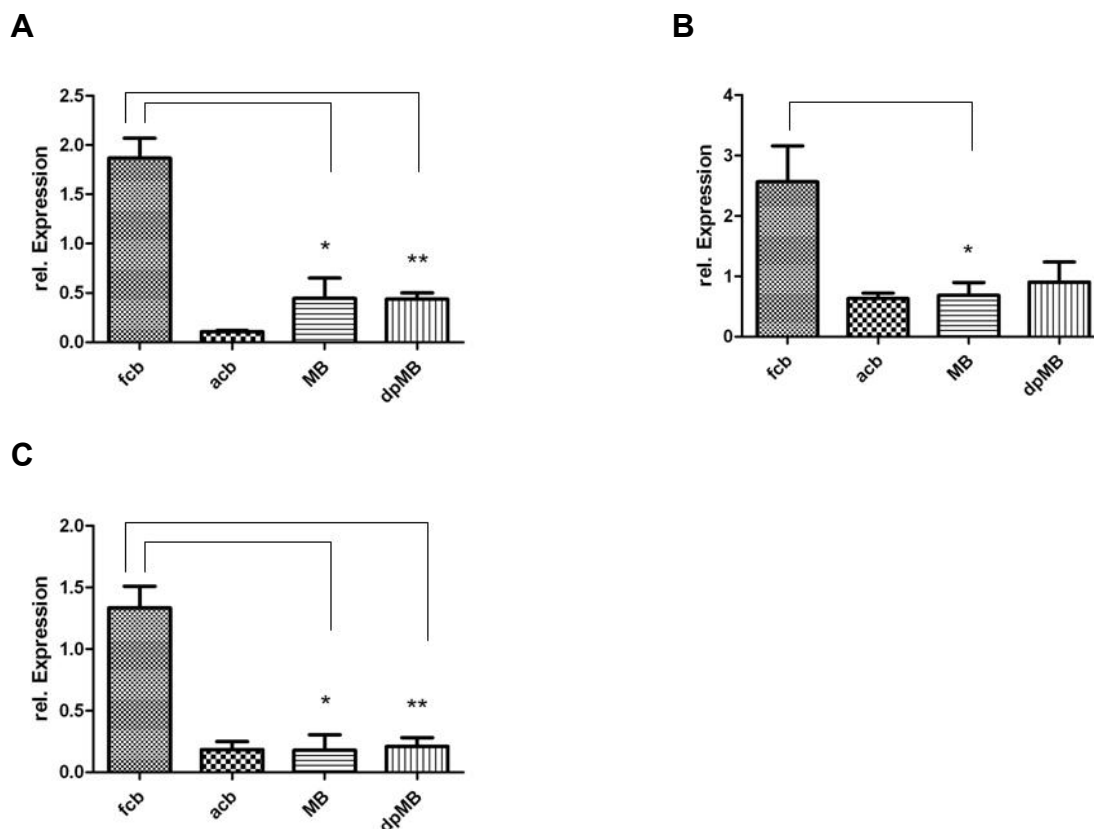


Abbildung 4: Expression von *BMP2* (A), *BMP4* (B) und *BMP6* (C) auf mRNA-Ebene in humanen Medulloblastomen. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte und deren Standardabweichungen in fetalem Kleinhirngewebe (fcb), adultem Kleinhirngewebe (acb), 11 klassischen Medulloblastomen (MB) und 9 desmoplastischen Medulloblastomen (dpMB). Die Normalisierung der rel. Expressionswerte erfolgte gegen eine humane Universalkontrolle.

** : Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,01$) zwischen fetalem Kleinhirngewebe und den entsprechenden Medulloblastomgruppen (Mann-Whitney Test).

* : Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,05$) zwischen fetalem Kleinhirngewebe und der entsprechenden Medulloblastomgruppe. (Mann-Whitney Test).

3.2 Veränderungen der BMP2 und BMP4 Proteinexpression in humanen Medulloblastomen

Um zu überprüfen, ob die in einzelnen Tumoren deutlich messbare *BMP2* und *BMP4* mRNA-Expression auch als entsprechend erhöhte Proteinexpression immunhistochemisch nachweisbar ist, wurden die entsprechenden Medulloblastome und einige Tumoren mit reduzierter *BMP2* oder *BMP4* Expression mit Antikörpern gegen BMP2 und BMP4 inkubiert. Als Positivkontrolle diente fetales und postpartales Kleinhirngewebe.

Alle getesteten Tumoren mit einer relativen *BMP2* oder *BMP4* mRNA-Expression größer als 0,7 relativ zum Housekeeping-Gen *ARF1* in der humanen Universalkontrolle zeigten eine positive Farbreaktion nach Inkubation mit dem entsprechenden BMP-Antikörper (Abb. 5). Die Tumorzellen der Medulloblastome mit erniedrigter *BMP2* oder *BMP4* mRNA-Expression färbten sich nicht an. Ebenfalls positiv für BMP2 und BMP4 waren die externe Körnerzellschicht (EGL), der Plexus choroideus sowie einige Zellen des Nucleus dentatus und des Marklagers. Von besonderem Interesse war der Nachweis von BMP2 und BMP4 in der externen Körnerzellschicht (EGL) der fetalen und postpartalen humanen Kleinhirne, denn die Zellen der EGL werden als Ursprungszellen des Medulloblastoms diskutiert und stellen im Gesunden somit eine geeignete Normalgewebekontrolle dar. Mit dem Alter und Differenzierungsgrad der Körnerzellen nimmt die BMP-Expression physiologisch ab, da die Wirkung des Morphogens BMP im reifen und postmitotischen Hirngewebe nicht mehr in dem Maße benötigt wird wie in fetalem und sich differenzierenden Hirngewebe.

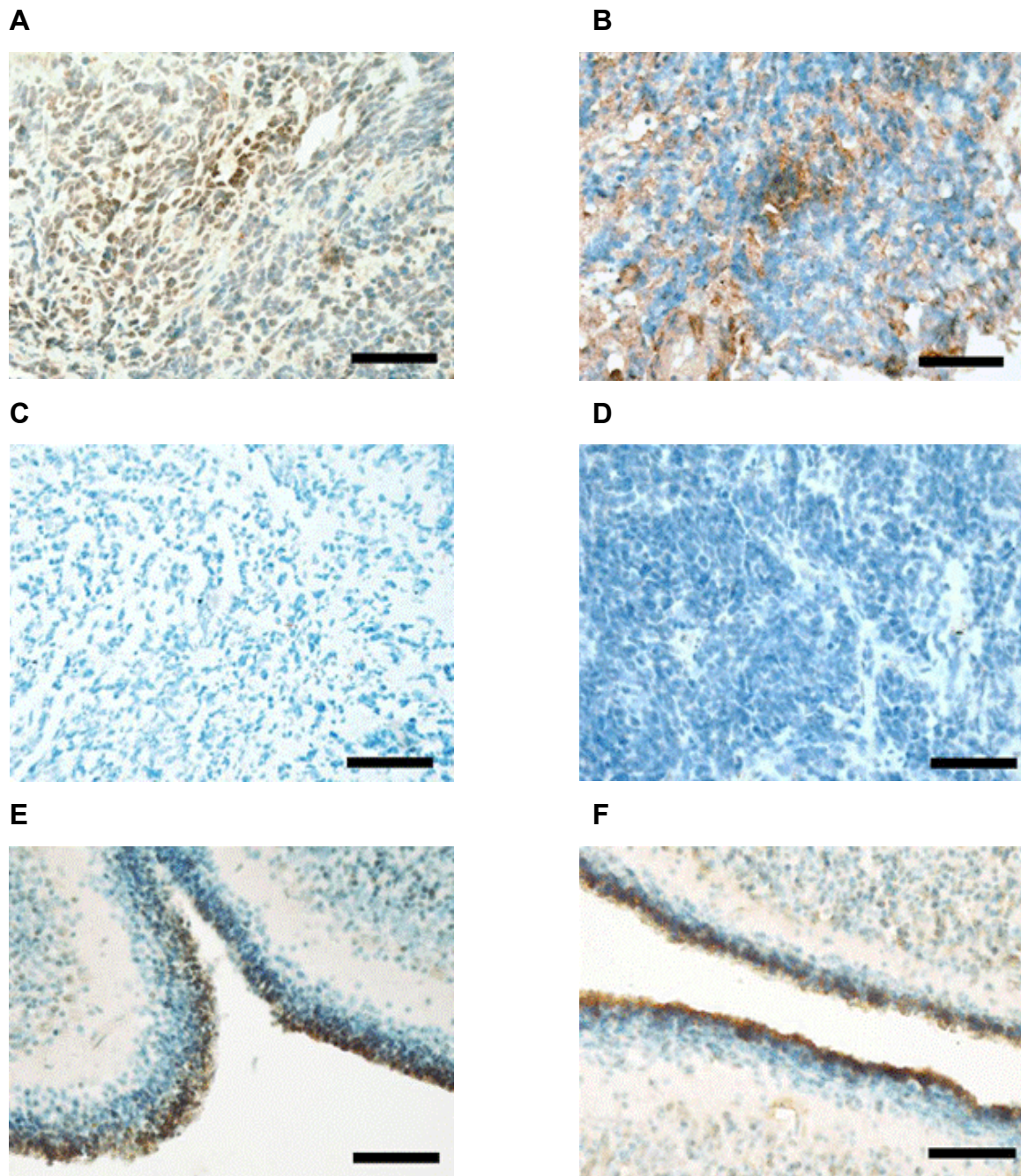


Abbildung 5: Proteinexpression von BMP2 und BMP4 in Gewebeschnitten von humanen Medulloblastomen (A-D) und normalem Kleinhirngewebe (E-F). Gut zu erkennen ist das braun gefärbte Zytoplasma der Tumorzellen in A (MB17, rel. mRNA-Expression von *BMP2*: 2,4) und B (MB20, rel. mRNA-Expression von *BMP4*: 2,2). Die Stärke der BMP-Proteinexpression korreliert in allen vier Fällen mit den relativen mRNA-Expressionswerten aus den RT-PCR-Analysen. Die in C (MB23, rel. mRNA-Expression von *BMP2*: 0,08) und D (MB17, rel. mRNA-Expression von *BMP4*: 0,16) abgebildeten Tumoren zeigten bei einer deutlich erniedrigten rel. mRNA-Expression auch keine immunhistochemisch nachweisbare Proteinexpression. In den Bildern E und F sieht man die deutlich braun gefärbten Zellen der externen Körnerzellschicht (EGL) eines fetalen (F) und eines postpartalen Kleinhirns (E). Größenbalken (schwarz).

3.3 Expression der BMP-Rezeptorgene *BMPR1A* und *BMPR2* auf mRNA-Ebene in Medulloblastomen

In den Expressionsanalysen zu den BMP-Rezeptoren *BMPR1A* und *BMPR2* wurde untersucht, ob die verminderte mRNA-Expression von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* mit einer ebenfalls reduzierten Rezeptorexpression einhergeht oder ob es möglicherweise zu einer kompensatorischen Hochregulierung der Expression der Rezeptoren kommt. Insbesondere BMP2 und BMP4 binden mit hoher Affinität an die beiden Rezeptoren BMPR1A und BMPR2. Abbildung 6 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse zur *Bmpr* mRNA-Expression in den untersuchten murinen Medulloblastomen. *Bmpr1A* zeigte im Vergleich zu normalem Kleinhirngewebe keine signifikant veränderte mRNA-Expression in den Tumoren, *Bmpr2* hingegen wies signifikant erniedrigte Expressionslevel in den Tumoren beider Genotypen, d.h. *Ptch1*^{+/-} *Nos2*^{+/+} (2M) und *Ptch1*^{+/-} *Nos2*^{-/-} (4M) auf.

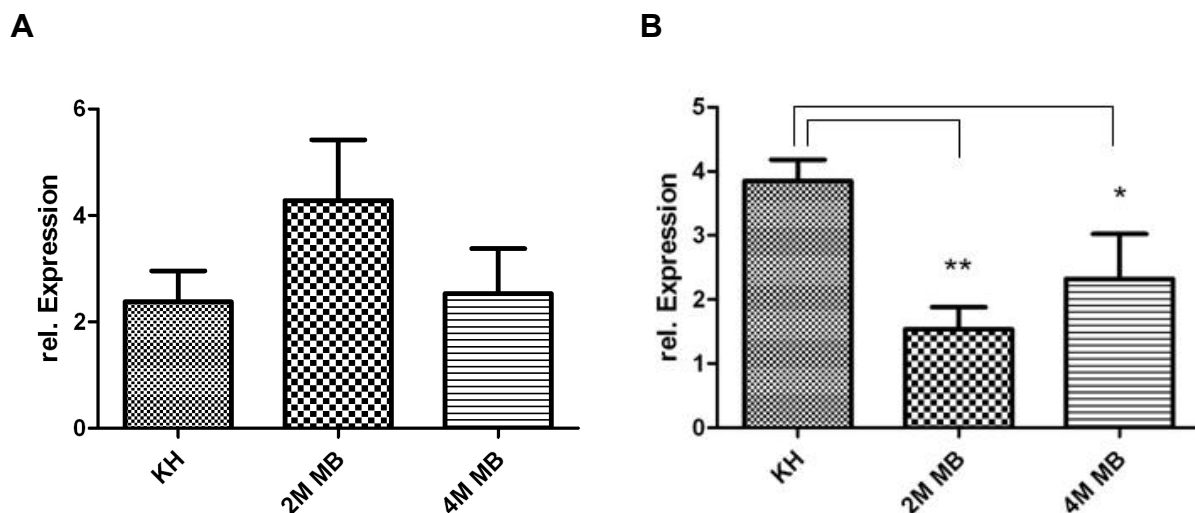


Abbildung 6: *Bmpr1A* (A) und *Bmpr2* mRNA-Expression (B) in murinen Medulloblastomen und normalen Kleinhirngewebsproben. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte und die Standardabweichung in sechs Medulloblastomen aus Mäusen des Genotyps *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{+/+} (2M) sechs Medulloblastomen aus Mäusen des Genotyps *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{-/-} (4M) und 10 murinen Kleinhirnen (KH) aus Wildtypmäusen sowie 2M und 4M Mäusen. Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine murine Universalkontrolle.

** : Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,01$) zwischen Tumor- und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test);

* : Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,05$) zwischen Tumor- und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test).

Die Untersuchung der BMPR-Expression in den humanen Medulloblastomen lieferte einen Unterschied in der mRNA-Expression zwischen fetalem Kleinhirngewebe und der Gruppe der desmoplastischen Medulloblastome, bei denen die Expression von *BMPR1A* signifikant gegenüber der fetalen Kontrolle erhöht war. Die klassischen Medulloblastome zeigten keine signifikante Veränderung in der Expression von *BMPR1A* im Vergleich zu den Normalgewebekontrollen. Die Expression von BMPR2 zeigte weder bei der klassischen noch der desmoplastischen Variante einen signifikanten Expressionsunterschied zur fetalen Kleinhirnkontrolle. Hier wiesen die einzelnen Medulloblastomproben ein breit gestreutes Verteilungsmuster der Expressionswerte auf. Die relativen Expressionswerte der einzelnen Tumoren sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

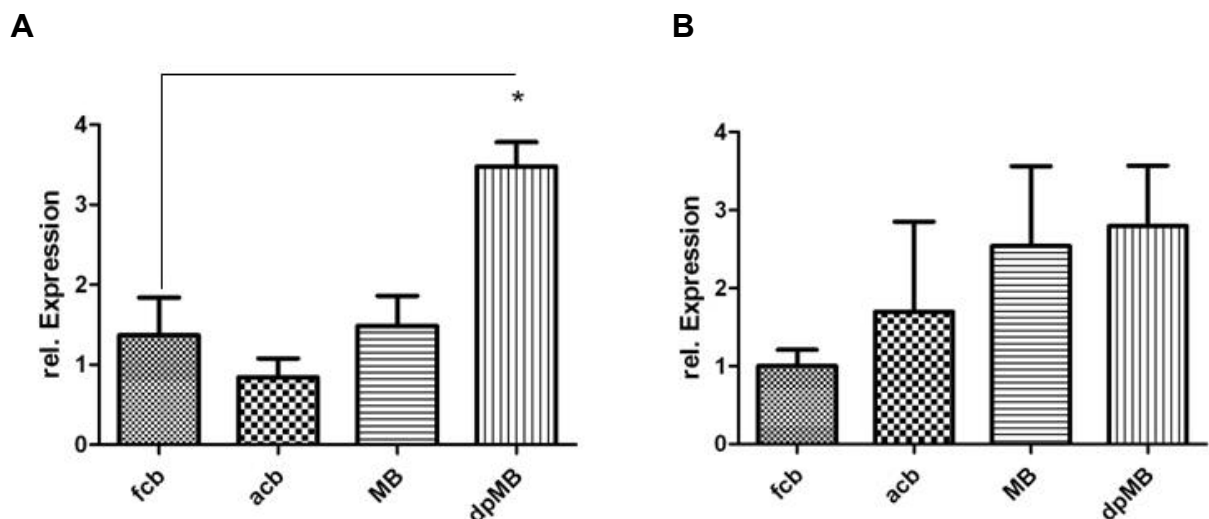


Abbildung 7: *BMPR1A* (A) und *BMPR2* (B) mRNA-Expression in humanen Medulloblastomen. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte und die Standardabweichungen in fetalem Kleinhirngewebe (fcb), adultem Kleinhirngewebe (acb), 11 klassischen Medulloblastomen (MB) und 9 desmoplastischen Medulloblastomen (dpMB). Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine humane Universalkontrolle.

*: Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,05$) zwischen fetalem Kleinhirngewebe und der entsprechenden Medulloblastomgruppe (Mann-Whitney Test).

3.4 mRNA-Expressionsanalyse der BMP-regulierten Zielgene *ID4* und *MATH1* in Medulloblastomen

Um die Auswirkung der signifikant erniedrigten Expression von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* in den murinen und humanen Medulloblastomen auf Zielmoleküle des BMP-Signalweges zu überprüfen wurde die Expression von *ID4* (inhibitor of DNA binding 4) und *MATH1* auf mRNA-Ebene untersucht. Während *ID4* ein wichtiges Zielgen des BMP-Signalweges darstellt (Samanta und Kessler 2004), wird *MATH1* bekanntermaßen auf posttranskriptionellem Wege durch BMP herunterreguliert (Zaoh et al. 2008). Ob Medulloblastome entsprechend der erniedrigten BMP-Expression auch ein erhöhtes *MATH1* mRNA-Expressionslevel zeigen, wurde mittels semiquantitativer RT-PCR überprüft. Die Expressionsanalysen in murinen Medulloblastomen zeigten, dass *Id4* in beiden Medulloblastomgruppen relativ zu normalem Kleinhirngewebe signifikant niedriger exprimiert wurde (Abb. 8).

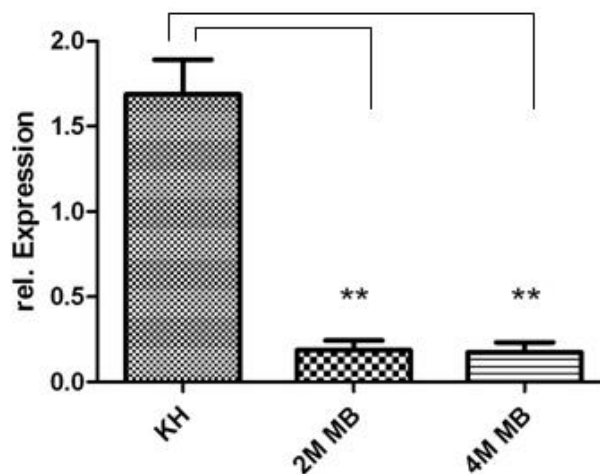


Abbildung 8: *Id4* (inhibitor of DNA binding 4) mRNA-Expression in murinen Medulloblastomen und normalem Kleinhirngewebe. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte und die Standardabweichung in sechs Medulloblastomen des Genotyps *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{+/-} (2M), sechs Medulloblastomen aus Mäusen des Genotyps *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{-/-} (4M) und 10 murinen Kleinhirnen (KH). Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine murine Universalkontrolle.

** : Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,01$) zwischen Tumor- und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test).

Entsprechend der in den Medulloblastomen erniedrigten mRNA-Expression von *Bmp2*, *Bmp4* und *Bmp6* zeigte *Math1* in beiden Medulloblastomgruppen eine signifikant um mehr als hundertfach gesteigerte Expression gegenüber den Kleinhirnnormalgewebeskontrollen (Abb. 9).

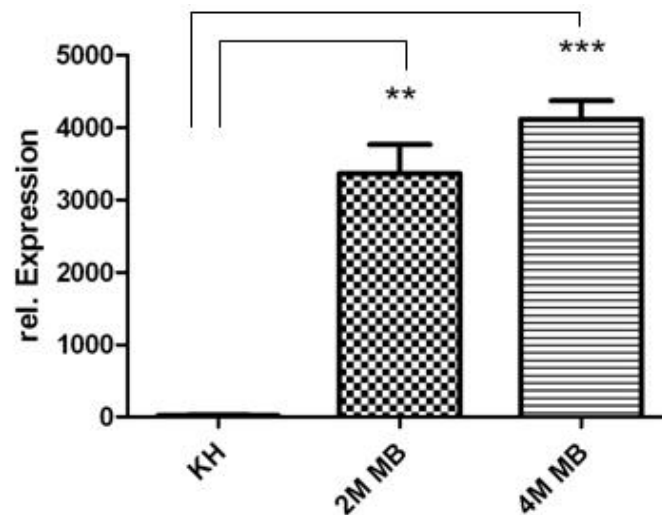


Abbildung 9: *Math1* mRNA-Expression in murinen *Ptch*^{+/-} Medulloblastomen. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte und die Standardabweichung in sechs Medulloblastomen des Genotyps *Pch1*^{+/-}/*Nos2*^{+/-} (2M), sechs Medulloblastomen aus Mäusen des Genotyps *Ptch1*^{+/-}/*Nos2*^{-/-} (4M) und 10 murinen Kleinhirnen (KH). Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine murine Universalkontrolle.

***: Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,001$) zwischen Tumor und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test).

** : Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,01$) zwischen Tumor- und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test).

Auch in den humanen Medulloblastomen wurde die Expression von *ID4*- und *MATH1*-mRNA mittels RT-PCR untersucht. Im Gegensatz zu den murinen Medulloblastomen zeigten die humanen Tumoren keine signifikant veränderte *ID4* und *MATH1* mRNA-Expression im Vergleich zu fetalem und adultem Kleinhirngewebe. Lediglich in den desmoplastischen Tumoren war *MATH1*, mit Ausnahme von dpMB10, stärker exprimiert als in den Kleinhirnkontrollen. Die relativen Expressionswerte der einzelnen Tumoren sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

3.5 ***PTCH1*, *GLI1* und *GLI2* mRNA-Expression in murinen und humanen Medulloblastomen**

In weiteren Untersuchungen wurde die Expression von Komponenten des SHH-Signalweges, d.h. des Rezeptors *PTCH1* und der beiden Transkriptionsfaktoren *GLI1* und *GLI2* analysiert, da zum einen die untersuchten murinen Medulloblastome aus dem *Ptch1*^{+/-} Knockout-Modell (Goodrich et al. 1997) stammten und zum anderen ein negativer „Feedback-Loop“ von BMPs auf die Transkription und folglich auch auf die Expression von Shh-Zielgenen beschrieben wurde (Bastida et al. 2009). Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass in den beiden murinen Medulloblastomgruppen die *Gli1* mRNA-Expression signifikant gegenüber der Expression der Normalgewebeskontrolle gesteigert war, was auf einen aktivierten Shh-Signalweg hindeutet. Die *Gli2* mRNA-Expression war hingegen nur in 5/11 Tumoren deutlich und in 3 weiteren Tumoren mäßig erhöht, während das *Ptch1* mRNA-Expressionsniveau der Tumoren im Mittel keinen Unterschied zu dem der Normalgewebeskontrollen aufwies (Abbildung 10). Die relativen Expressionswerte in den einzelnen Tumoren sind in Tabelle 12 und 13 zusammengefasst.

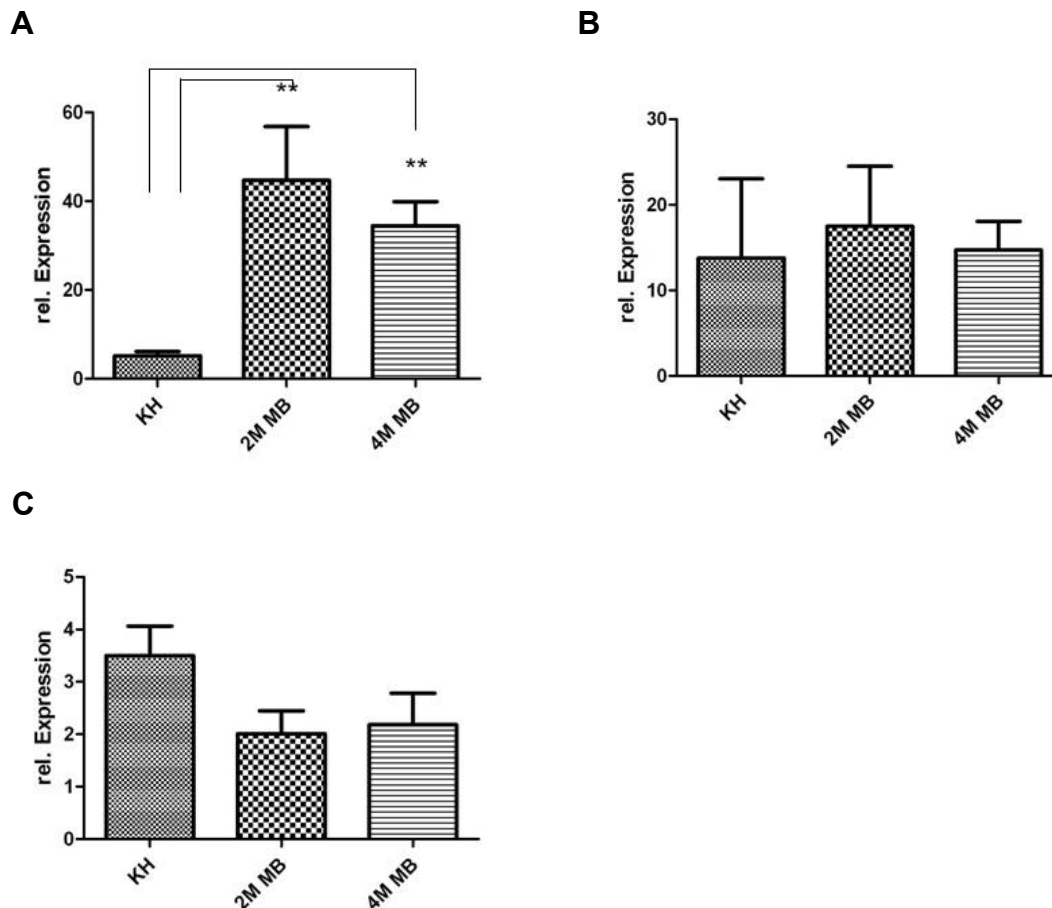


Abbildung 10: *Gli1* (A), *Gli2* (B) und *Ptch1* (C) Expression in murinen Medulloblastomen und Kleinhirngewebsproben. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte inkl. Standardabweichung der *Gli1*, *Gli2* und *Ptch1* mRNA-Expression in der Kontrollgruppe (KH) und den Medulloblastomen der Genotypen 2M und 4M. Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine murine Universalkontrolle.

** : Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,01$) zwischen Tumor- und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test).

Die Expressionslevel von *PTCH1*, *GLI1* und *GLI2* waren in den untersuchten humanen Medulloblastomen sehr heterogen. Insbesondere für die Medulloblastome der desmoplastischen Variante wurde über eine häufige Aktivierung des SHH-Signalweges berichtet (Kool et al. 2008). In der eigenen Serie wiesen jedoch nur 3/9 desmoplastische (33%) und 1/11 klassische Medulloblastome (9%) eine *GLI1* Überexpression auf. Für *GLI2* fanden sich in zwei weiteren desmoplastischen Medulloblastomen erhöhte mRNA-Expressionswerte. Die klassischen Medulloblastome zeigten im Vergleich zu fetalem Kleinhirngewebe in einem Fall eine erhöhte, in 3/11 Fällen eine erniedrigte und in 7/11 Fällen eine unveränderte *GLI2* mRNA-Expression. Die *PTCH1* mRNA-Expression war mit Ausnahme von 3 Tumoren (2 klassische und 1 desmoplastisches Medulloblastom) unabhängig vom

histologischen Typ gegenüber der Normalgewebekontrolle erhöht. Die relativen Expressionswerte der einzelnen Tumoren sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

3.6 Veränderungen der *EZH2* mRNA-Expression in murinen Medulloblastomen

EZH2 interagiert neben seiner Histon-Lysin-N-Methyltransferase-Funktion auch direkt mit DNA-Methyltransferasen und wird zur DNA-Methylierung von EZH2-Zielpromotoren benötigt (Viré et al. 2006). Eine erhöhte *EZH2* mRNA- und Protein-Expression könnte somit ein Hinweis auf ein gesteigertes Maß an Promotormethylierung möglicherweise auch für die BMP-Gene sein. In den untersuchten murinen Medulloblastomproben war die *Ezh2* mRNA-Expression im Vergleich zu der *Ezh2* mRNA-Expression in der Kleinhirnkontrollgruppe signifikant erhöht (Abbildung 11).

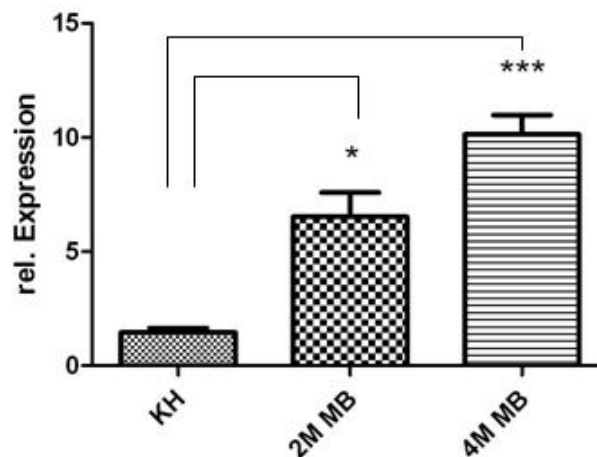


Abbildung 11: *EZH2* mRNA-Expression in murinen *Ptch1*^{+/+} Medulloblastomen und Kleinhirngewebsproben. Dargestellt sind die mittleren Expressionswerte und die Standardabweichung in sechs Medulloblastomen des Genotyps *Ptch1*^{+/+}/*Nos2*^{+/+} (2M) sechs Medulloblastomen aus Mäusen des Genotyps *Ptch1*^{+/+}/*Nos2*^{-/-} (4M) und 10 murinen Kleinhirnen (KH). Die Normalisierung der Expressionswerte der Einzelwerte erfolgte gegen eine murine Universalkontrolle.

***: Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,001$) zwischen Tumor- und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test).

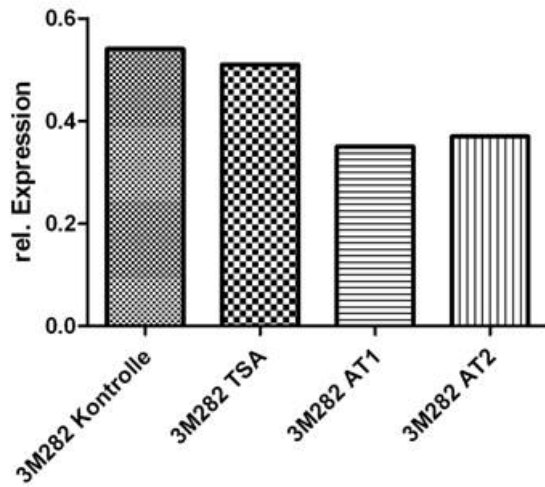
*: Signifikanter Expressionsunterschied ($P < 0,05$) zwischen Tumor und Kontrollgruppe (Dunn's Multiple Comparison Test).

Obwohl in den humanen Tumoren keine erhöhte *EZH2* mRNA-Expression zu detektieren war, wurde sowohl in den murinen als auch in den humanen Tumoren mittels Bisulfit-Sequenzierung der Methylierungsstatus der Promotorbereiche der Gene *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* überprüft.

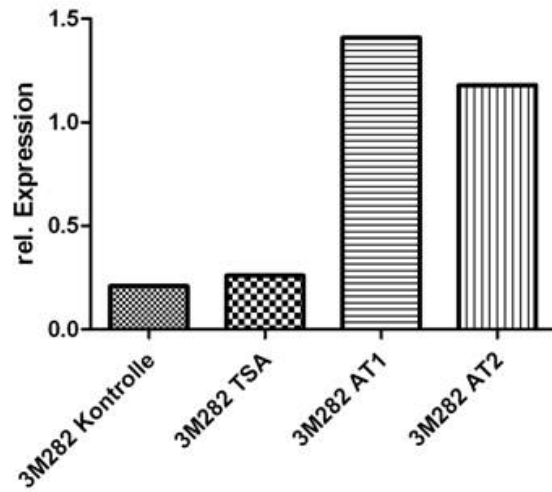
3.7 Expression von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* mRNA nach DNA-Demethylierung und Inhibierung der Histondeacetylierung in Medulloblastomzellen

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob eine Promotormethylierung die verminderte Expression von BMPs in Medulloblastomen verursacht, wurden die murinen Medulloblastomzelllinien 4M95 und 3M282 sowie die humane Medulloblastomzelllinie DAOY mit 5'-Aza-Desoxycytidin (5'-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA) behandelt. Die beiden Substanzen bewirken eine kombinierte Demethylierung und Inhibierung der Deacetylierung von DNA. Nach Behandlung der Zellen wurde die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese für RT-PCR-Analysen eingesetzt. Abbildung 12 zeigt die veränderte Expression von *Bmp2* und *Bmp4* nach 5'-Aza-dC /TSA Behandlung in den Zelllinien 3M282 und 4M95. In der Zelllinie 3M282 stieg die *Bmp4* mRNA-Expression nach 5'-Aza-dC/TSA Behandlung an, während die *Bmp2* mRNA-Expression leicht abfiel (Abb. 12A) In der Zelllinie 4M95 hingegen zeigte sich für *Bmp2* ein Expressionsanstieg und für *Bmp4* ein deutlicher Rückgang der Expression nach kombinierter 5'-Aza-dC/TSA Behandlung (Abb. 12B). Die ausschließliche Behandlung der Zelllinien mit TSA konnte in den beiden murinen Zelllinien keine verstärkte Expression von *Bmp2* und *Bmp4* bewirken, was darauf hindeutet, dass in den murinen Zelllinien eher eine DNA-Methylierung als eine Deacetylierung als Silencing-Mechanismus für *Bmp2* und *Bmp4* eine Rolle spielt. Für *Bmp6* konnte in allen murinen Zelllinien weder über die alleinige Inhibition der Deacetylierung noch über die kombinierte Demethylierung/Inhibierung der Deacetylierung ein Expressionsanstieg nachgewiesen werden.

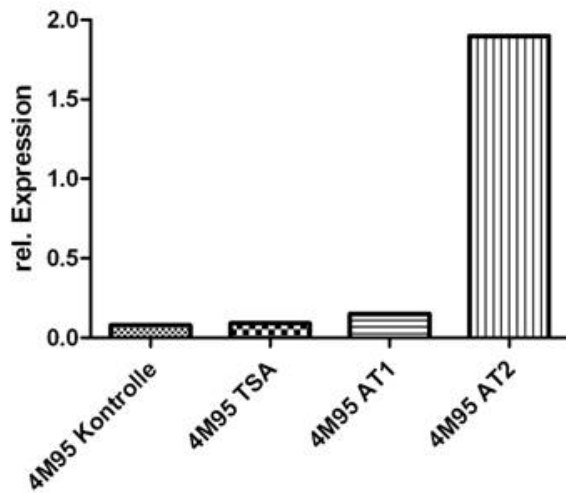
A1



A2



B1



B2

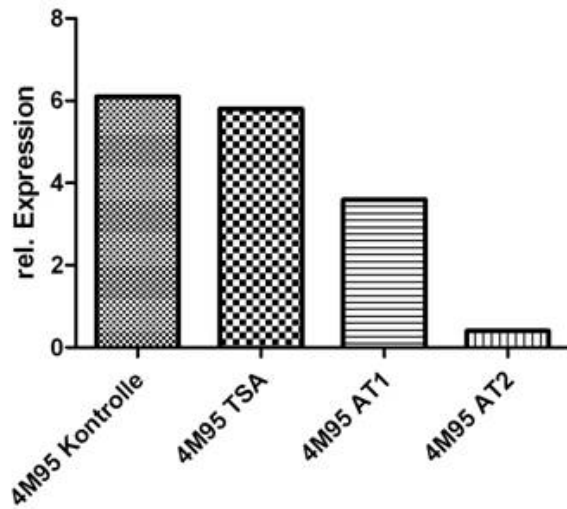


Abbildung 12: *BMP2* (A1 und B1) und *BMP4* (A2 und B2) mRNA-Expression ohne Behandlung (Kontrolle), mit alleiniger TSA-Behandlung (TSA) und nach 5'-Aza-dC/TSA-Behandlung (AT1: 24 h Behandlung; AT2: 48 h Behandlung) der murinen Zelllinien 3M282 (A) und 4M95 (B). Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine murine Universalkontrolle.

Die humanen Medulloblastom-Zelllinien verhielten sich im Hinblick auf die Expression der BMP-Gene nach kombinierter 5'Aza-dC/TSA und alleiniger TSA-Behandlung, wie auch schon für die murinen Zelllinien gezeigt, individuell unterschiedlich, Wobei DAOY-Zellen generell eine höhere Expression von BMP2, BMP4 und BMP6 mRNA nach Behandlung zeigten (Abb. 13 und 14).

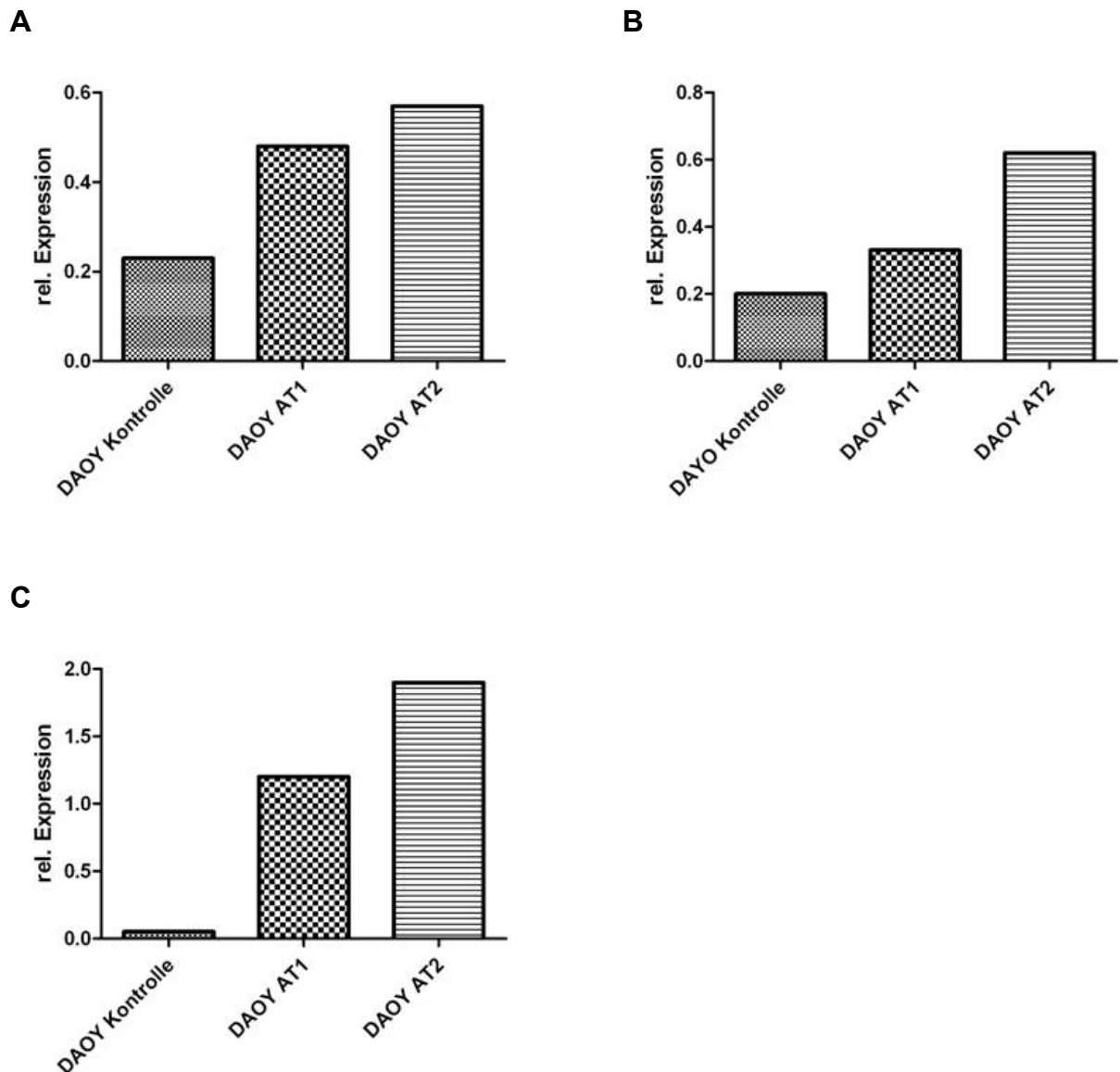
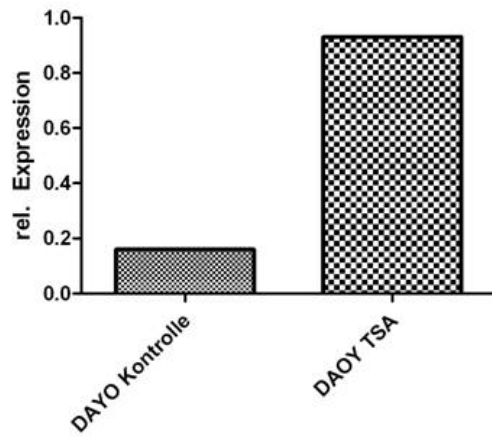
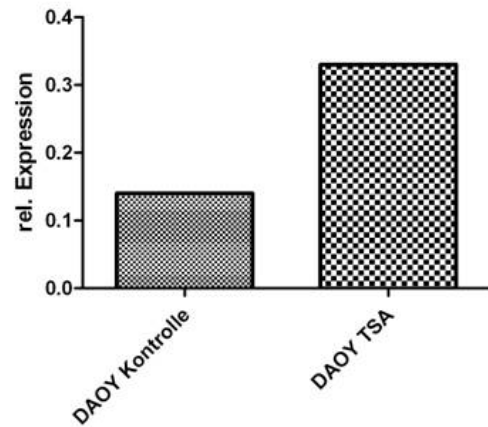


Abbildung 13: BMP2 (A), BMP4 (B) und BMP6 (C) mRNA-Expression ohne Behandlung (Kontrolle) und nach 5'-Aza-dC/TSA-Behandlung (AT1: 24 h Behandlung; AT2: 48 h Behandlung) der humanen MB-Zelllinien DAOY. Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine humane Universalkontrolle.

A



B



C

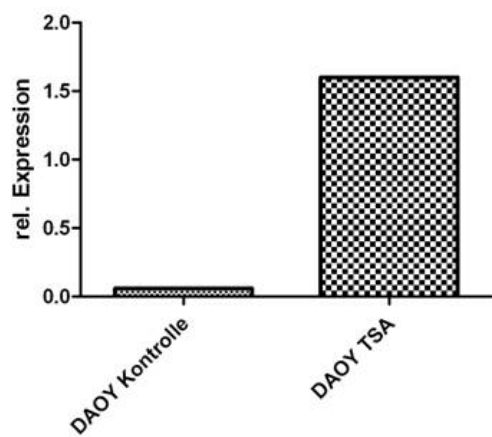


Abbildung 14: *BMP2* (A), *BMP4* (B) und *BMP6* (C) mRNA-Expression nach 48 h TSA-Behandlung und ohne Behandlung (Kontrolle) der humanen Medulloblastomzelllinie DAOY. Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine humane Universalkontrolle.

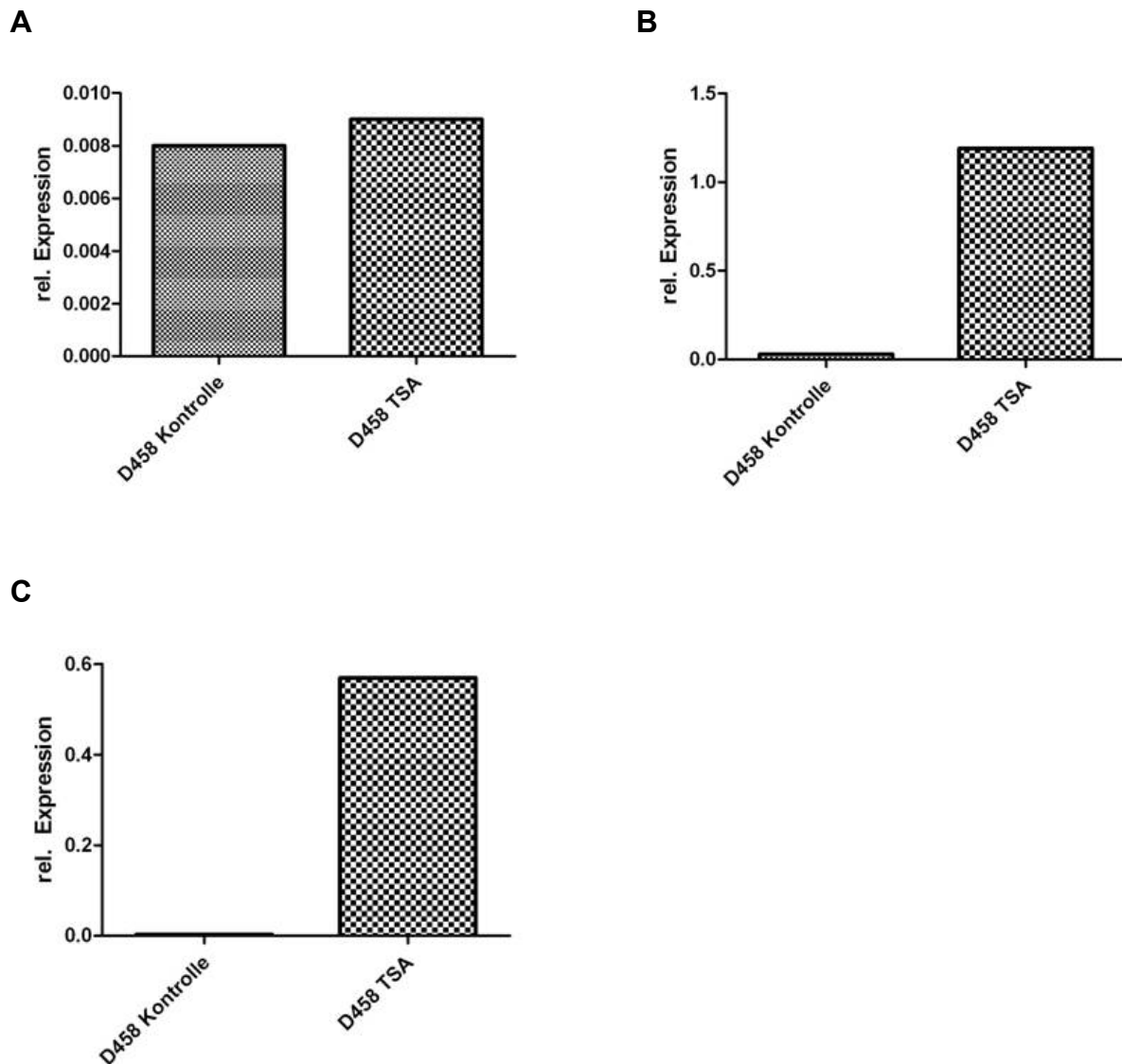


Abbildung 15: *BMP2* (A), *BMP4* (B) und *BMP6* (C) mRNA-Expression ohne (Kontrolle) und nach 48 h TSA-Behandlung der humanen Medulloblastomzelllinie D458. Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine humane Universalkontrolle.

In der Zelllinie DAOY ergab sich für alle untersuchten BMP-Gene, auch für *BMP6*, eine deutlich gesteigerte Expression, sowohl nach kombinierter 5'-Aza-dC/TSA-Behandlung (Abb.13) als auch nach alleiniger TSA-Behandlung (Abb. 14). Im Unterschied dazu fand sich in der Zelllinie D458, die ausschließlich mit TSA behandelt wurde, nur für *BMP4* und *BMP6* eine deutlich gesteigerte Expression nach der Behandlung (Abb. 15). Da die humanen Zelllinien im Unterschied zu den murinen Zelllinien beim Vergleich kombinierte 5'-Aza-dC/TSA versus alleiniger TSA-Behandlung die BMP-Gene in ähnlicher Größenordnung hochregulierten, scheint in

humanen Medulloblastomen eher eine verstärkte Histondeacetylierung als eine DNA-Methylierung ursächlich für die erniedrigte Expression von BMP4 und BMP6 zu sein.

3.8 Analyse des BMP-Rezeptorstatus in Medulloblastomzelllinien

Um zu überprüfen, ob eine Behandlung von Medulloblastomzellen mit rekombinanten BMP2, BMP4 oder BMP6 funktionelle Veränderungen *in vitro* hervorrufen kann, wurde zunächst die mRNA-Expression der BMP-Rezeptorgene *BMPR1A* und *BMPR2* mittels qRT-PCR analysiert. Die murinen Medulloblastomzelllinien zeigten, verglichen mit dem Mittelwert der Normalgewebeskontrollen, eine vergleichbare Expression von *Bmpr1A* und eine reduzierte Expression von *Bmpr2* (Abb. 16).

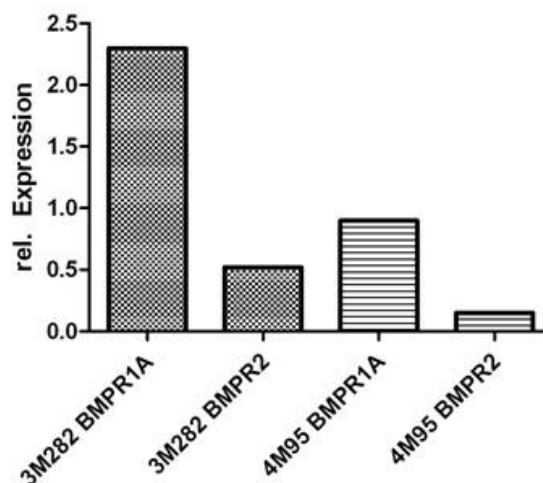


Abbildung 16: mRNA-Expression von *BMPR1A* und *BMPR2* in den murinen Zelllinien 3M282 und 4M95 in Relation zur Expression in normalem murinen Kleinhirngewebe. Es zeigt sich, dass die Expression der beiden Rezeptoren in der Zelllinie 3M282 dem Expressionslevel in Kleinhirngewebe entspricht bzw. erhöht ist, während in der Zelllinie 4M95 die Expression des *BMPR2* erniedrigt ist.

In der humanen Zelllinie DAOY war die Expression des Rezeptors *BMPR1A* gegenüber der fetalen und adulten Kontrolle erniedrigt (< 0,5 rel. Expression). Die Expression dieses Gens in der Zelllinie D458 entsprach dagegen in etwa derjenigen in den Normalgewebeskontrollen (Abb. 17). Die Expression von *BMPR2* war in beiden untersuchten Zelllinien im Vergleich zur den Normalgewebeskontrollen reduziert.

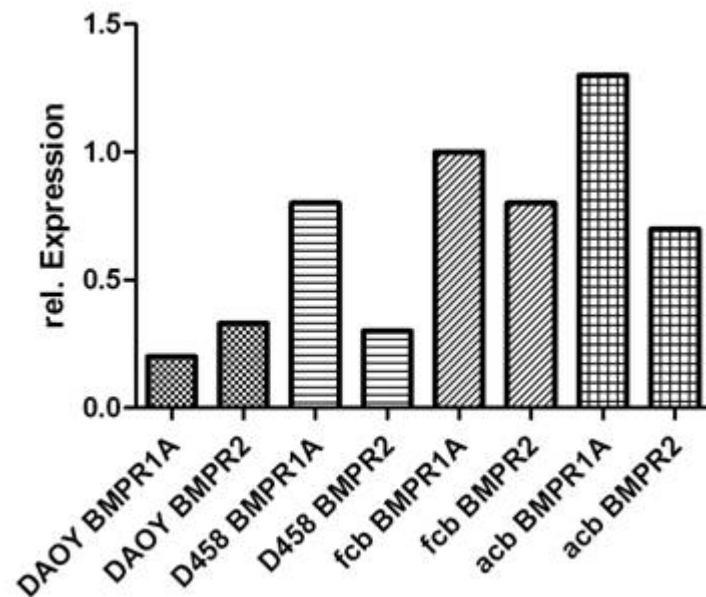


Abbildung 17: Expression der BMP-Rezeptorgene *BMPR1A* und *BMPR2* in den humanen Zelllinien DAOY und D458 sowie in adultem (acb) und fetalem (fcb) Kleinhirngewebe. Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte gegen eine normale humane Referenzprobe. DAOY zeigt für *BMPR1A* verminderte Expressionslevel gegenüber dem Kontrollgewebe. Die Expression von *BMPR2* ist in beiden Zelllinien gegenüber den Kontrollgeweben reduziert.

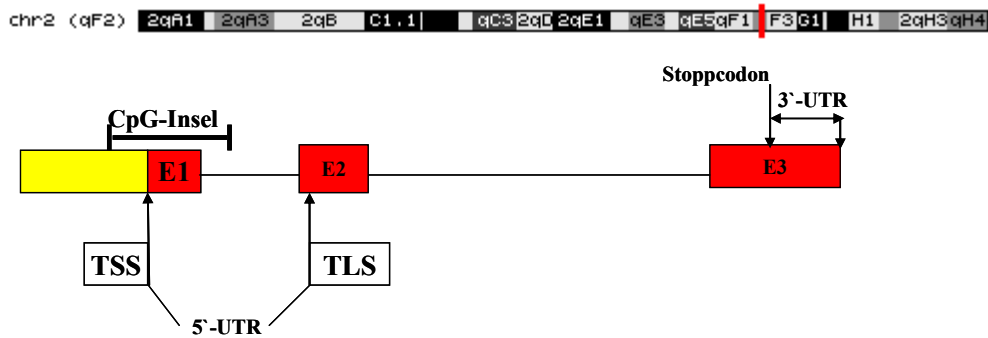
3.9 Promotor-Methylierungsanalysen von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* in murinen und humanen Medulloblastomen

3.9.1 Ergebnisse der Methylierungsanalysen an murinen Tumoren

In den murinen Medulloblastomen korrelierte die verminderte Expression von *Bmp2*, *Bmp4* und *Bmp6* positiv mit einer erhöhten *Ezh2* mRNA-Expression. Außerdem zeigte sich eine verstärkte Expression dieser Gene in Medulloblastomzellen nach Behandlung mit 5'-Aza-Desoxycytidin (5'-Aza-dC) und Trichostatin A (TSA). Aufgrund dieser Befunde könnte eine Promotormethylierung einen möglichen Mechanismus der verminderten Expression dieser Gene in den *Ptch*^{+/-}-Medulloblastomen darstellen. Von insgesamt 7 unterschiedlich alten Kleinhirnkontrollgeweben, 9 Medulloblastomen und 3 Zelllinien wurde der Methylierungsstatus der Promotorbereiche von *Bmp2*, *Bmp4* und *Bmp6* ermittelt. *Bmp2* und *Bmp6* besitzen jeweils eine 5'-CpG-Insel, die den Transkriptionsstartpunkt

einschließt, *Bmp4* weist zwei CpG-reiche Regionen, beide hinter dem Transkriptionsstartpunkt gelegen, auf (Abb. 18). Im Fall von *Bmp4* wurde zusätzlich zu den 2 annotierten CpG-Bereichen die Region um den Transkriptionsstartpunkt analysiert.

A



Legende



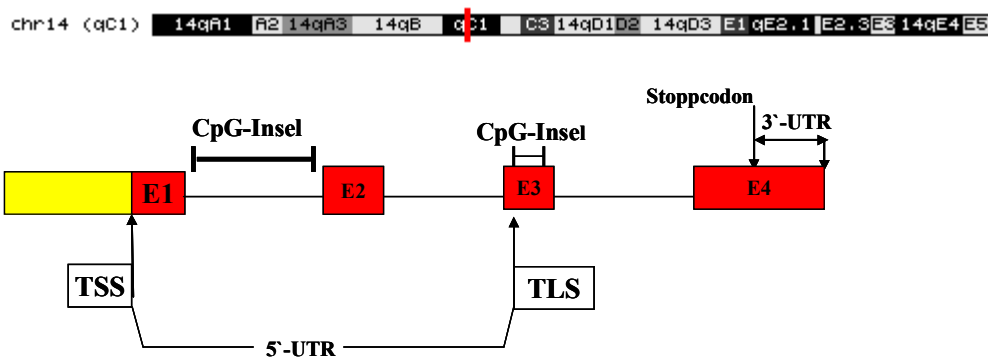
= Promotorbereich

= BMP2 Exone

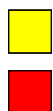
TSS = Erstes Nukleotid des ersten Exons markiert Transkriptionsstart (TSS)

TLS = Sequenz des Startcodon ATG markiert Translationsstart (TLS)

B



Legende



= Promotorbereich

= BMP4 Exone

TSS = Erstes Nukleotid des ersten Exons markiert Transkriptionsstart (TSS)

TLS = Sequenz des Startcodon ATG markiert Translationsstart (TLS)

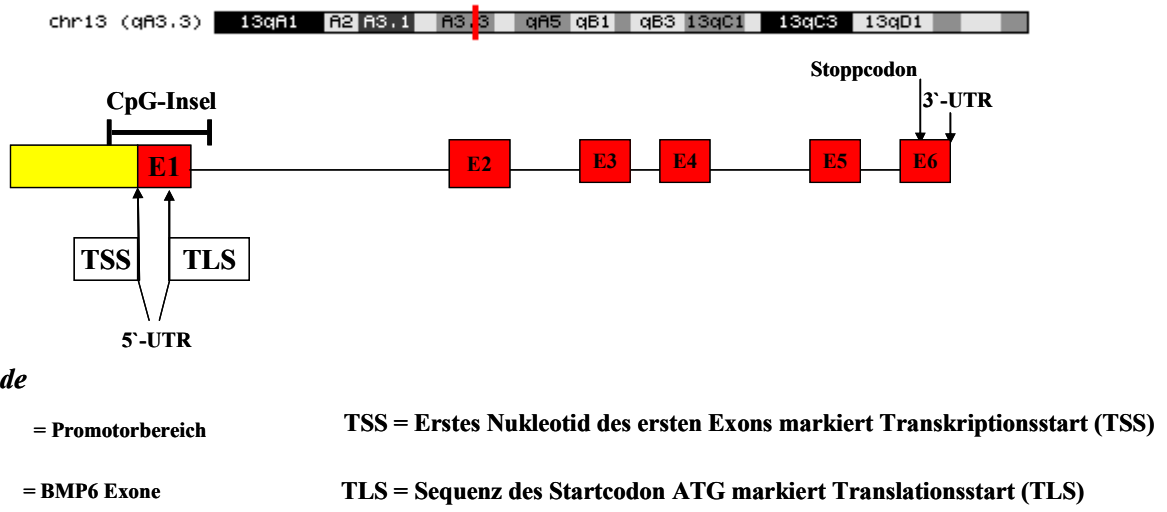
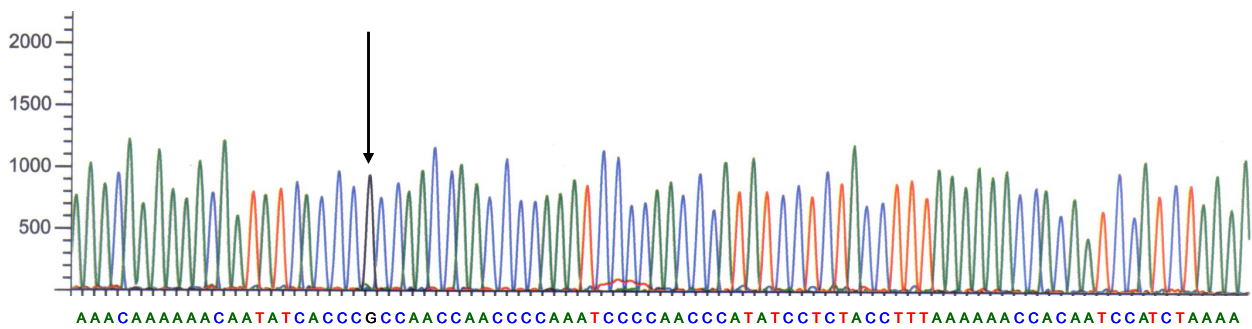
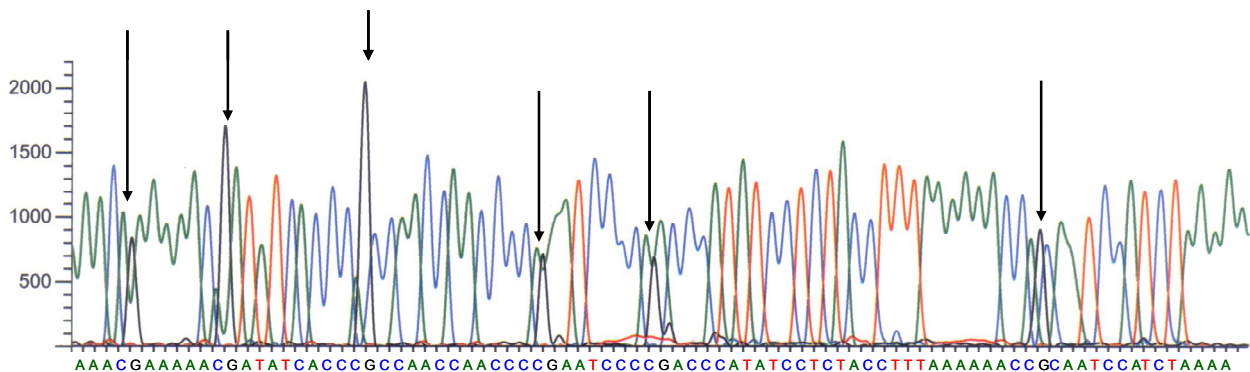
C

Abbildung 18: Schematische Darstellung der murinen *Bmp2*-, *Bmp4*- und *Bmp6*-Gene in ihren jeweiligen chromosomalen Lokalisationen. **A:** *Bmp2* (NM_007553); Größe der assoziierten CpG-Insel: 1522bp /158 CpG-Dinukleotide.. **B:** *Bmp4* (NM_007554); Größe der assoziierten CpG-Inseln: CpG-Insel 1: 1811bp/123 CpG-Dinukleotide; CpG-Insel 2: 282bp/25 CpG-Dinukleotide. **C:** *Bmp6* (NM_007556); Größe der assoziierten CpG-Insel: 1693bp/157 CpG-Dinukleotide. Dargestellt ist die genomische Struktur der einzelnen Gene sowie ihre jeweilige chromosomale Position. Der gelbe Kasten stellt jeweils die Promotorregion dar. Die roten Kästen stehen für die Exons, schmale Linien kennzeichnen die Introns. Weiterhin sind die 5'-UTR und die 3'-UTR sowie der Transkriptionsstart (TSS) und Translationsstart (TLS) angezeigt. Die ungefähre Lage der analysierten CpG Inseln ist schematisch dargestellt.

1M 82 (Kontrolle) *BMP2*



4M 321 (MB) *BMP2*



2M 223 (Zellkultur) *BMP2*

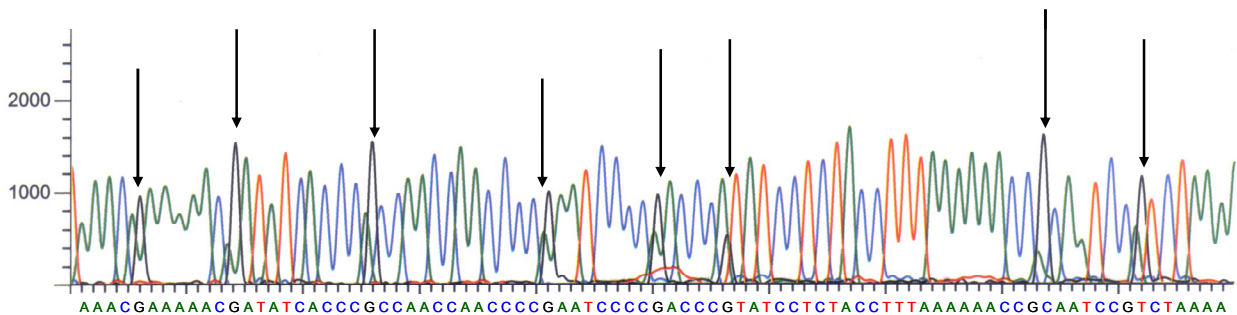


Abbildung 19: Beispielhafte Ausschnitte aus den Sequenzierungen von Teilen der der *Bmp2*-assoziierten CpG-Insel nach Natriumbisulfitkonversion der DNA in den folgenden 3 Proben: 1M82 (normales Kleinhirngewebe), 4M321 (Medulloblastom) und 2M223 (Medulloblastomzelllinie). Die mit Pfeilen markierten „G’s“ entsprechen methylierten „C’s“, da die Sequenz des Gegenstranges abgebildet ist.

Für *Bmp2* ergab sich an den CpG-Dinukleotiden 5-19 der CpG-Insel in den untersuchten Medulloblastomen und insbesondere in den Medulloblastomzelllinien eine deutlich stärkere Methylierung als in den Normalgewebeskontrollen. In Abbildung 19 ist dieser Befund exemplarisch an 3 Fällen und in Abbildung 20 in der Übersicht über alle untersuchten Gewebe- und Zellkulturproben dargestellt. Auch für *Bmp4* und *Bmp6* fand sich an einigen CpG-Dinukleotiden eine Methylierung, die in den

Normalgewebsskontrollen nicht nachweisbar war. Die ausgeprägtesten Methylierungen fanden sich für alle drei untersuchten Bmp-Gene in den Medulloblastomzelllinien.

BMP6 (murin)

		CpG- Dinukleotide																											
Proben	rel. Expression BMP6	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	55	56	57		
268 KH	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
127 KH	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
131 KH	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
80 KH	5,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
82 KH	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
4M9 KH	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2M9 KH	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
223 ZK	n.d	2	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0		
208 ZK	n.d	1	1	1	2	2	2	1	3	0	2	0	2	2	1	1	3	2	1	2	3	3	3	3	2	2	2		
105 ZK	n.d	2	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0		
224 MB	0,43	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0		
227 MB	0,33	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
679 MB	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
164 MB	0,41	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
208MB	0,49	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
620 MB	0,35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
321 MB	0,31	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
758 MB	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
626 MB	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0	0		

BMP6 (murin) cont.

		restliche CpG- Dinukleotide der CpG- Insel																																
Proben	rel. Expression BMP6	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
268 KH	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
127 KH	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
131 KH	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80 KH	5,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82 KH	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4MB KH	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2MB KH	1,6	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
223 ZK	nd	0	0	0	0	0	2	2	2	3	0	0	0	0	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
208 ZK	nd	2	2	1	2	2	3	2	2	3	3	2	2	2	0	1	2	0	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0
105 ZK	nd	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	0	2	0	2	1	1	2	3	2	3	3	2	3	3	2	2	1	1	1	2	2	2	2
224 MB	0,43	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
227 MB	0,33	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
679 MB	0,33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
164 MB	0,41	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
208MB	0,49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
620 MB	0,35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
321 MB	0,31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
758 MB	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
626 MB	0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

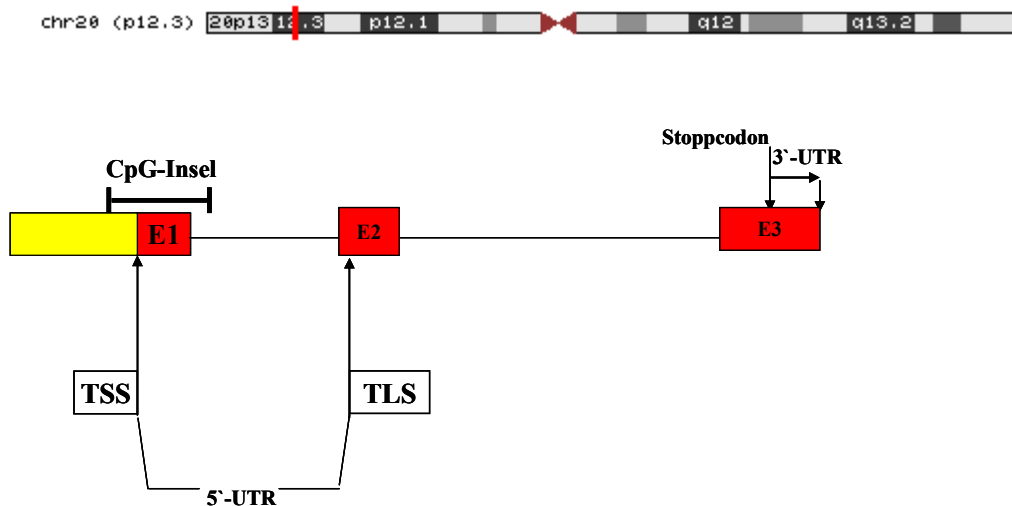
Abbildung 20: Methylierungsmuster in den untersuchten Anteilen der 5'-CpG-Inseln von *Bmp2*, *Bmp4* und *Bmp6* in 9 murinen Medulloblastomen, 3 Medulloblastomzelllinien und 7 nicht-neoplastischen Kleinhirngeweben. Der Methylierungsstatus an jedem CpG-Dinukleotid wurde entsprechend der folgenden Skalierung bewertet: 0, nicht methyliert (weißer Hintergrund); 1, schwach methyliert (hellgrauer Hintergrund; Intensität des methylierten Signals niedriger als 1/3 des unmethylierten Signals); 2, mäßig methyliert (dunkelgrauer Hintergrund; Intensität des methylierten Signals zwischen 1/3 und 2/3 des unmethylierten Signals); 3, stark methyliert (schwarzer Hintergrund; Intensität des methylierten Signals höher als 2/3 des unmethylierten Signals). Die vor dem Transkriptionsstartpunkt liegenden CpG-Dinukleotide sind durch ein negatives Vorzeichen gekennzeichnet (n.d.: Untersuchung nicht durchgeführt).

3.9.2 Ergebnisse der Methylierungsanalysen an humanen Tumoren

Obwohl für die humanen Medulloblastome keine erhöhte *EZH2*-Expression und kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Demethylierungsbehandlung und Expression der untersuchten *BMP*-Gene in der Zellkultur gefunden wurde, erfolgte an 10 humanen Medulloblastomen eine Methylierungsanalyse der jeweils assoziierten 5'-CpG-reichen Regionen. Fünf Medulloblastome der klassischen Variante (MB9, MB15, MB16, MB17 und MB18) und fünf Medulloblastome der desmoplastischen Variante (dpMB10, dpMB11, dpMB13, dpMB14 und dpMB19) sowie genomische DNA aus adultem und fetalem humanen Gehirngewebsproben wurden mit Natriumbisulfit behandelt, die 5'-CpG-reichen Regionen von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die genomische Struktur der einzelnen *BMP*-Gene und die Lage der untersuchten CpG-Inseln ist in Abbildung 21 dargestellt.

A

Struktur und Position von *BMP2* auf Chromosom 20 (NM_001200):



Legende

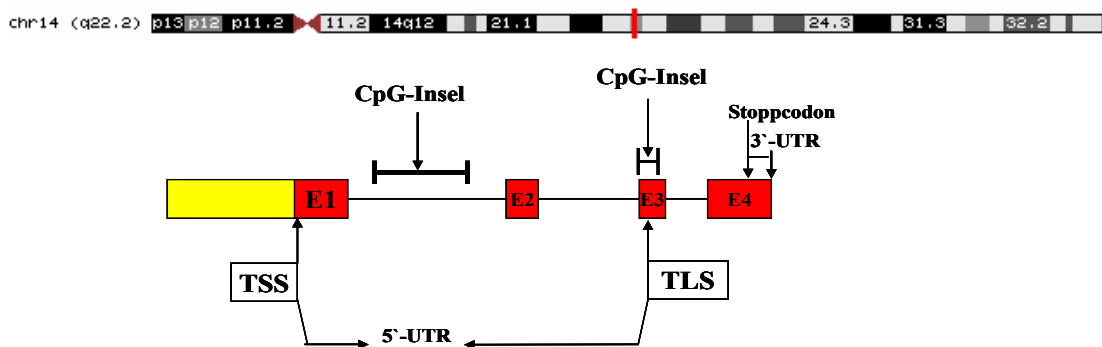
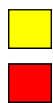


= Promotor

= BMP2 Exone

TSS = Erstes Nukleotid des ersten Exons markiert Transkriptionsstart (TSS)

TLS = Sequenz des Startcodon ATG markiert Translationsstart (TLS)

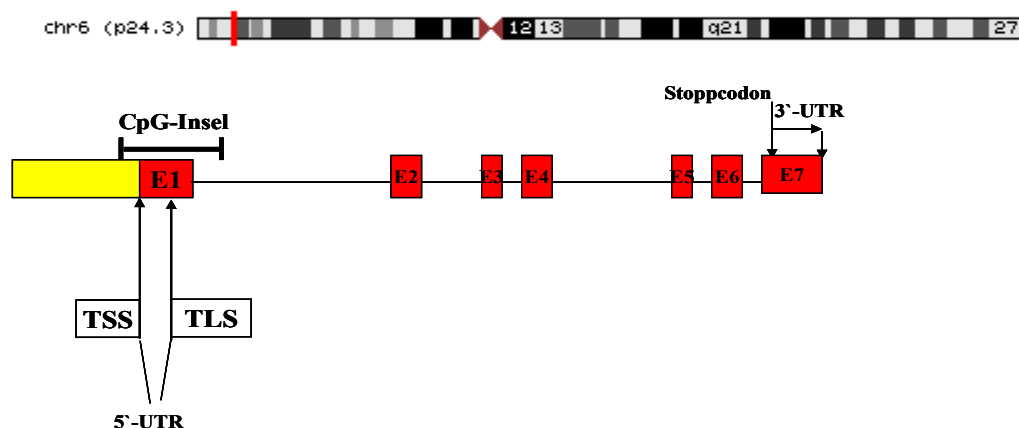
B**Struktur und Position von *BMP4* auf Chromosom 14 (NM_130850):****Legende**

= Promotor

= BMP4 Exone

TSS = Erstes Nukleotid des ersten Exons markiert Transkriptionsstart (TSS)

TLS = Sequenz des Startcodon ATG markiert Translationsstart (TLS)

C**Struktur und Position von *BMP6* auf Chromosom 6 (NM_001718)****Legende**

= Promotor

= BMP6 Exone

TSS = Erstes Nukleotid des ersten Exons markiert Transkriptionsstart (TSS)

TLS = Sequenz des Startcodon ATG markiert Translationsstart (TLS)

Abbildung 21: Genomische Struktur und chromosomale Lokalisation der drein untersuchten Gene. **A:** *BMP2* (NM_001200); Größe der assoziierten CpG Insel: 1494 bp / 169 CpG-Dinukleotide. **B:** *BMP4* (NM_130850); Größe der assoziierten CpG Insel 1: 2774 bp / 221 CpG-Dinukleotide; Größe der assoziierten CpG Insel 2: 204 bp / 20 CpG-Dinukleotide. **C:** *BMP6* (NM_001718); Größe der assoziierten CpG Insel: 2066 bp / 210 CpG-Dinukleotide. Gelbe Kästen stellen die jeweilige Promotorregion dar, rote Kästen repräsentieren die Exons, die über schmale Linien (Introns) miteinander verbunden sind. Weiterhin sind die 5'-UTR und die 3'-UTR sowie der Transkriptionsstart (TSS) und Translationsstart (TLS) angezeigt. Die ungefähre Lage der analysierten CpG-Inseln ist schematisch dargestellt.

Mit Ausnahme der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) von *BMP4* wiesen in den humanen Tumoren und der Zelllinie DAOY sowie in den Normalgewebekontrollen keine der untersuchten und in Abbildung 21 schematisch dargestellten CpG-reichen Regionen eine Methylierung auf. Dahingegen zeigten zwei klassische Medulloblastome (MB16 und MB18) sowie drei desmoplastische Medulloblastome (dpMB11, 14 und 19) für *BMP4* eine deutlich stärkere Methylierung als die adulte und fetale Normalgehirnkontrolle (Abbildung 22). In dpMB13 passte die nachweisbare *BMP4* mRNA-Expression zu der fehlenden Methylierung in dieser Region, während dpMB10 eine verminderte mRNA-Expression bei fehlender Methylierung aufwies (Abbildung 22).

BMP4 (human)

		einzelne CpG-Dinukleotide vor dem Transkriptionsstart																		Transkriptionsstartpunkt
Proben	rel. Expression BMP4	-24	-23	-22	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	0
MB9	0,18	1	0	0	0	0	2	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
MB15	0,16	1	1	1	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MB16	0,07	3	2	2	3	2	2	3	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
MB17	0,16	2	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MB18	0,05	3	2	3	2	2	3	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
dpMB10	0,46	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
dpMB11	1	3	3	3	2	2	3	3	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
dpMB13	2,3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
dpMB14	0,56	3	3	3	3	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
dpMB19	0,14	3	3	3	3	2	3	3	2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	
adult brain control	n.g.	2	0	2	1	1	2	3	2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	
fetal brain control	n.g.	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

Abbildung 22: Methylierung einzelner CpG-Dinukleotide vor dem Transkriptionsstartpunkt in der CpG-Insel 1 von *BMP4* in 10 Medulloblastomen und 2 nicht-neoplastischen Hirngeweben. Der Methylierungsstatus an jeder CpG-Stelle wurde entsprechend der folgenden Skalierung bewertet: 0, nicht methyliert (weißer Hintergrund); 1, schwach methyliert (hellgrauer Hintergrund; Intensität des methylierten Signals niedriger als 1/3 des unmethylierten Signals); 2, mäßig methyliert (dunkelgrauer Hintergrund; Intensität des methylierten Signals zwischen 1/3 und 2/3 des unmethylierten Signals); 3, stark methyliert (schwarzer Hintergrund; Intensität des methylierten Signals höher als 2/3 des unmethylierten Signals). Die vor dem Transkriptionsstartpunkt liegenden CpG-Dinukleotide sind durch ein negatives Vorzeichen gekennzeichnet (n.g.; nicht gemessen).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass eine Promotormethylierung von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* nicht die Hauptursache für die erniedrigte Expression dieser Gene in humanen Medulloblastomen ist und stattdessen andere Mechanismen, beispielsweise Veränderungen der Histonacetylierung eine Rolle spielen.

3.10 Funktionelle Analysen an Medulloblastomzellen nach Gabe von rekombinantem BMP

Um eine potentiell inhibitorische Wirkung von BMPs auf das Wachstumsverhalten von murinen und humanen Medulloblastomzellen zu überprüfen, wurden Medulloblastomzellen der Linien 3M283, 4M95 und DAOY mit rekombinantem BMP2 oder BMP6 behandelt. Nach 72 h Behandlung erfolgte die Messung der Zellvitalität, der Proliferation und der Apoptoserate (Caspase 3/7-Aktivität) der behandelten Medulloblastomzellen.

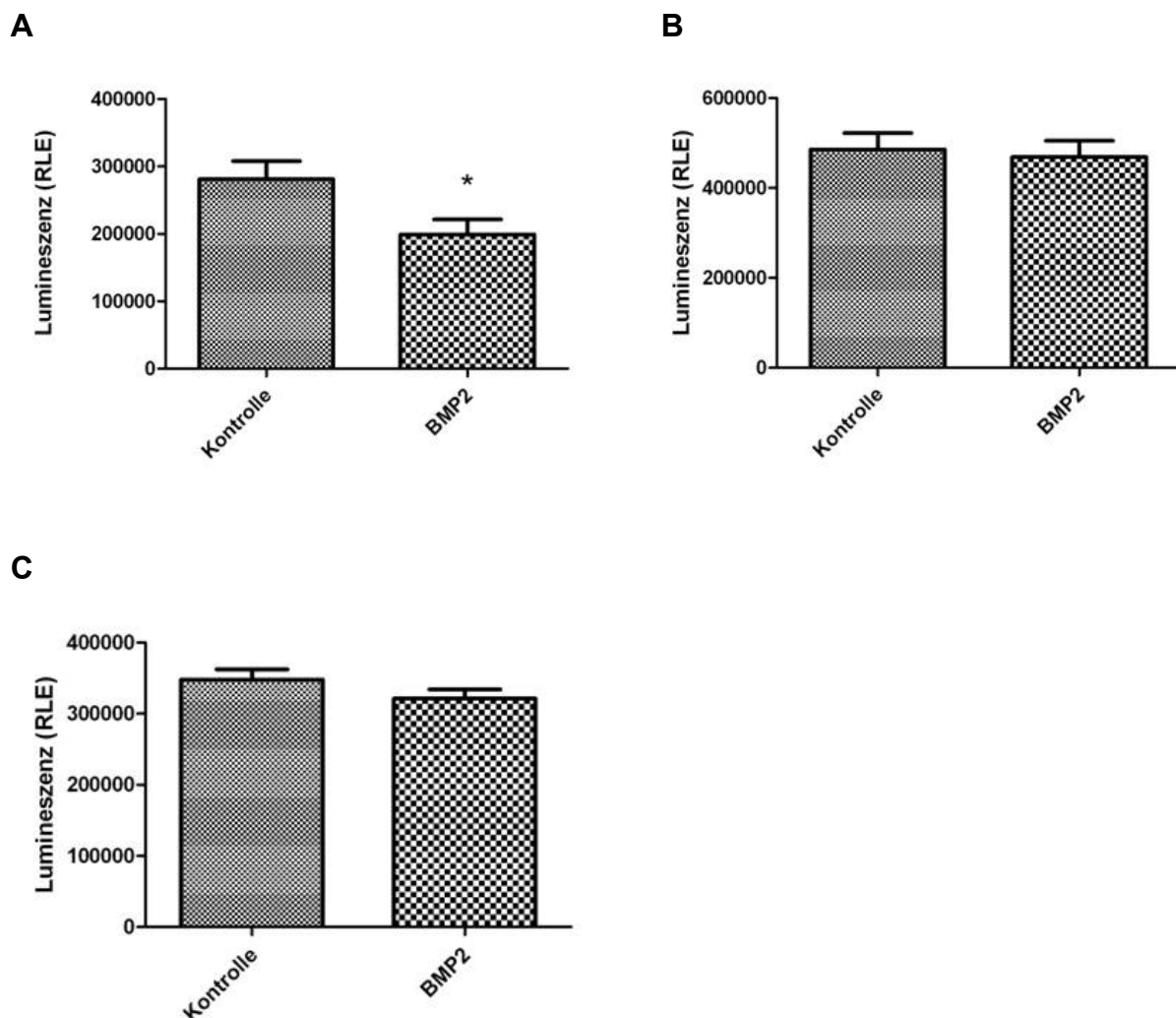


Abbildung 23: Vitalität von Zellen der Medulloblastomzelllinien 4M95 (A), 3M282 (B) und DAOY (C) nach Gabe von rekombinantem BMP2 (100ng/ml) für 72 h. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 3 Versuchsansätzen (jeder á 5 Messwerte) und deren Standardabweichung.

*: Signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zwischen der Vitalität von Zellen ohne und 72 h nach Behandlung mit rekombinantem BMP2 (Wilcoxon matched pairs test).

Die Zelllinie 4M95 reagiert auf die Behandlung mit rekombinantem BMP2 (100ng/ml) mit einer signifikant erniedrigten Zellvitalität, gemessen an der ATP-Menge metabolisch aktiver Zellen (Abb. 23). Die Zelllinie 3M282 demonstriert in einem von 3 Versuchsansätzen nach Gabe von rekombinantem BMP2 eine signifikante Vitalitätsabnahme. In den beiden anderen Ansätzen konnte keine signifikante Veränderung der Vitalität beobachtet werden, woraus sich im Ganzen keine signifikante Erniedrigung der Zellvitalität für die Zelllinie 3M282 ergab. Die Zelllinie DAOY reagierte in keinem von drei Versuchsansätzen mit einer signifikanten Erniedrigung der Zellvitalität auf das rekombinante BMP2. Tendenziell konnte in den Einzelmessungen aber eine Abnahme der Zellvitalität beobachtet werden (Abb. 23 C). Für BMP4 wurde die luminometrische Zellvitalitätsmessung nicht durchgeführt, da BMP2 und BMP4 dieselben Rezeptor-Subtypen binden und von einem vergleichbaren Effekt ausgegangen werden kann. Die Behandlung mit BMP6 führte in keiner der Zelllinien zu signifikanten Zellvitalitätsveränderungen.

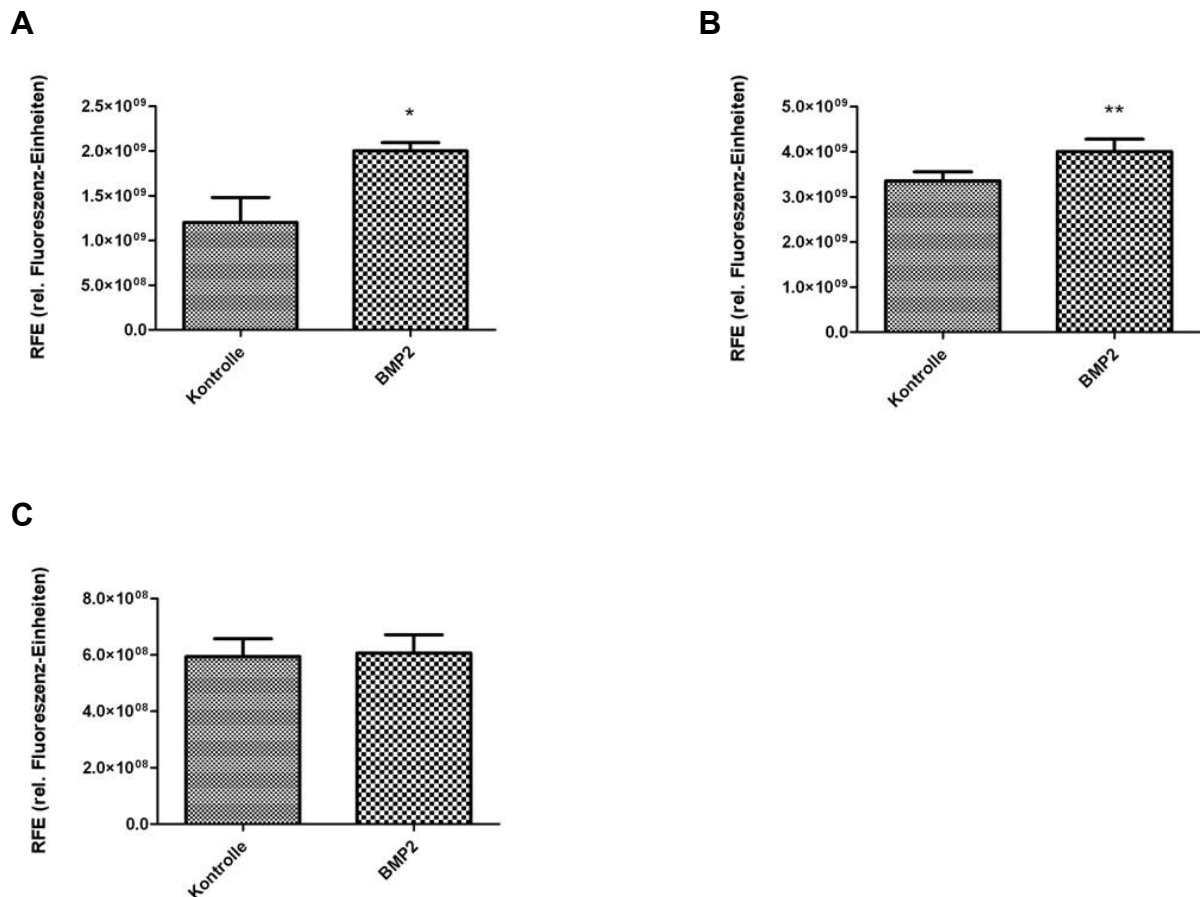


Abbildung 24: Apoptotische Aktivität von Zellen der Medulloblastomzelllinien 4M95 (A), 3M282 (B) und DAOY (C) nach Gabe von rekombinantem BMP2 (100ng/ml). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Caspase 3/7-Aktivitätsmessungen aus 3 Versuchsansätzen (jeder á 5 Messwerte) und deren Standardabweichung.

*: Signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Apoptoserate von Zellen ohne und 72 h nach Behandlung mit rekombinantem BMP2 (Wilcoxon matched pairs test).

** : Signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen der Apoptoserate von Zellen ohne und 72 h nach Behandlung mit rekombinantem BMP2 (Wilcoxon matched pairs test)

Die Messungen der apoptotischen Aktivität ohne und nach Behandlung mit rekombinantem BMP wurden für alle drei Zelllinien (4M95, 3M282 und DAOY) mit BMP2 und BMP6 jeweils dreimal durchgeführt. Hierbei zeigte sich für 4M95 und 3M282 eine signifikante Steigerung der apoptotischen Aktivität (Zunahme der Caspase 3/7-Aktivität) nach Behandlung mit rekombinantem BMP2 (Abb. 24). Die humane Zelllinie reagierte mit keiner signifikanten Veränderung auf die Gabe von rekombinantem BMP2. Auf die Gabe von rekombinantem BMP6 reagierte keine der drei Zelllinien mit einer Veränderung der Caspase 3/7-Aktivität. Auch konnte die Gabe

von rekombinanten BMP2 und BMP6 in keiner der getesteten Zelllinien eine signifikante Veränderung der Proliferation im BrdU-Test bewirken.

Nur Zellen der Linien 3M282 und DAOY sind in der Lage Kolonien in Soft-Agar zu bilden, weshalb an diesen beiden Zelllinien getestet wurde, ob die Gabe von rekombinantem BMP die Anzahl der Kolonie-bildende Einheiten (CFUs) senken kann. Die murine Zelllinie 3M282 zeigte bei der Behandlung mit rekombinantem BMP2 und BMP4 eine reduzierte Anzahl von Kolonien (Abb. 25 A), die Behandlung mit BMP6 wirkte sich hingegen nicht auf die Koloniebildungsfähigkeit der Zelllinie 3M282 aus. Es konnte keine Wirkung von rekombinantem BMP2 und BMP6 auf die Koloniebildung der Zelllinie DAOY beobachtet werden (Abb. 25 B), die BMP4 Behandlung wurde wegen der mit BMP2 vergleichbaren Reaktionsweise nicht mehr durchgeführt.

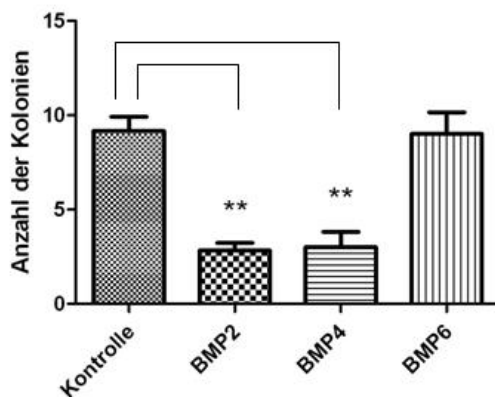
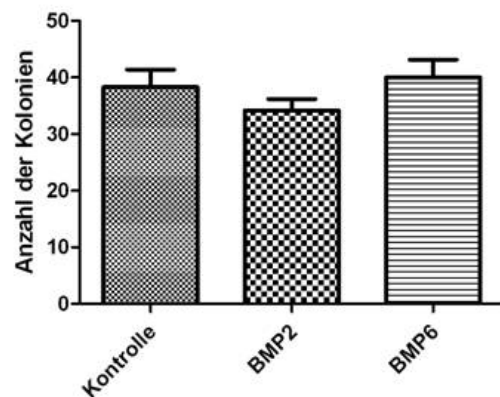
A**B**

Abbildung 25: Analyse der Koloniebildung von Zellen der murinen Medulloblastomzelllinie 3M282 (A) und der humanen Medulloblastomzelllinie DAOY (B) nach Gabe von rekombinanten BMPs. Dargestellt ist die mittlere Anzahl gezählter Kolonien mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchsdurchführungen. Die murine Zelllinie 3M282 (A) reagierte mit einer verminderten Koloniezahl auf die Gabe von rekombinanten BMP2 und BMP4. Die Gabe von BMP6 bewirkte keine Reduzierung der Koloniezahl. Die DAOY-Zelllinie zeigte keine verminderte Koloniebildung nach Gabe von BMP2 oder BMP6.

** : Signifikanter Unterschied ($P < 0,01$) zwischen der Koloniezahl ohne und mit Behandlung der Zelllinien mit rekombinantem BMP (Dunn's Multiple Comparison Test).

4 Diskussion

Medulloblastome sind primitive neuroektodermale Tumoren des Kleinhirns, die invasiv wachsen und meist im Kindes- und jungem Erwachsenenalter auftreten (Giangaspero et al. 2007). Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden Medulloblastome in die Gruppe der WHO-Grad IV Tumoren eingeordnet (Giangaspero et al. 2007). Zu den Behandlungsmodalitäten zählen die operative Entfernung des Tumors sowie die Strahlen- und die Chemotherapie. Die Heilungsrate hat in den letzten Jahren zwar zugenommen, die Prognose für etwa 50 % der Patienten ist aber weiterhin schlecht und Patienten, die überleben, leiden nicht selten an vielen Nebeneffekten der aggressiven Therapie. Die Patienten können hinsichtlich des Schweregrads ihres Krankheitsverlaufs in zwei Risikogruppen eingeteilt werden. Patienten, älter als 3 Jahre, ohne Metastasen und mit totaler operativer Resektion des Medulloblastoms gehören zur Gruppe der Standard-Risiko-Patienten, während alle anderen Patienten der Hoch-Risiko-Patientengruppe zugeordnet werden (Giangaspero et al. 2007). Um die Therapie des Medulloblastoms für den Patienten individueller gestalten zu können, verbesserte Heilungsraten und eine erhöhte Lebensqualität zu erzielen, fokussieren sich neuere Forschungsarbeiten auf die molekulare Klassifizierung dieses sehr heterogenen Tumors (Kool et al. 2012, Northcott et al. 2011, Taylor et al. 2012) und die Entwicklung subgruppenspezifischer Therapieansätze (Northcott et al. 2012, Sengupta et al. 2012). Diese Arbeiten zeigen, dass sich Medulloblastome nicht nur histologisch und nach Risikofaktoren in verschiedene Gruppen einteilen lassen, sondern auch unterschiedliche chromosomale Aberrationen und Genexpressionsprofile aufweisen. Insgesamt sprechen aktuelle Daten für vier molekulare Subtypen, die sich durch Störungen in verschiedenen Signalwegen bzw. der differentiellen Expression bestimmter Gene (neuronale Differenzierung, Photorezeptoren) voneinander abgrenzen. Die Tumoren der ersten molekularen Subtypklasse entsprechen zu 97% histologisch dem klassischen Medulloblastom und sind molekular durch eine Aktivierung des WNT-Signalwegs charakterisiert. Tumoren der zweiten Subtypklasse zeigen einen aktivierten SHH-Signalweg, treten insbesondere im Erwachsenen- und im Säuglingsalter gehäuft auf. Im Erwachsenenalter zeigen sie mehrheitlich (89-100 %) eine desmoplastische

Histologie, im Säuglingsalter hingegen nur zu 25 % (Kool et al. 2012). Medulloblastome der dritten Gruppe (Gruppe C) unterscheiden sich von denen der anderen Gruppen durch die vorhandene Expression neuronaler Differenzierungsgene, während Vertreter der vierten Gruppe (Gruppe D) verstärkt Photorezeptorgene exprimieren. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Vertreter des WNT- und SHH-Subtyps auch unterschiedliche Ursprungszellen haben. Medulloblastome des WNT-Subtyps entwickeln sich aus Zellen der unteren rhombischen Lippe und des embryonalen dorsalen Hirnstamms (Gibson et al. 2010), während Medulloblastome mit aberrant aktiviertem SHH-Signalweg aus Vorläuferzellen von cerebellären und cochleären Körnerzellen entstehen (Yang et al. 2008, Grammel et al. 2012).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Morphogene wie SHH, WNT und BMP bei der Entstehung des Medulloblastoms eine zentrale Rolle spielen (Pietsch et al. 1997, Johnson et al. 1996, Gorlin RJ 1995, Hamilton et al. 1995, Huang et al. 2000, Eberhart et al. 2000, Hallahan et al. 2003, Rios et al. 2004, Alvarez-Rodriguez et al. 2007). Interaktionspartner der beteiligten Signalwege können sich gegenseitig beeinflussen (Attisano und Labbe 2004). Bastida und Mitarbeiter zeigten 2009, dass aktives BMP durch Interaktion mit dem FGF- und WNT-Signalweg die Expression von *SHH* negativ reguliert, was die Proliferation SHH-suszeptibler Zellen reduziert.

In den eigenen Untersuchungen wurde in 20 humanen Medulloblastomen (11 klassische und 9 desmoplastische Tumoren) und 2 Normalgewebekontrollen, sowie in 12 murinen Medulloblastomen und 10 murinen Kleinhirnkontrollen die Expression der Gene für BMP2, BMP4 und BMP6 analysiert. Bei einer differentiellen BMP-Expression sollten die möglichen Regulationsmechanismen, die zu einer veränderten Genexpression im Vergleich zum Normalgewebe führten, analysiert und die funktionelle Bedeutung von BMPs in Medulloblastomzellen durch die Gabe von rekombinanten BMPs untersucht werden. Die Ergebnisse können zum Verständnis der Rolle von BMPs bei der Entstehung des Medulloblastoms beitragen.

4.1 Die potentielle Rolle neurogener BMPs bei der Entwicklung des Medulloblastoms

BMPs spielen in verschiedenen Stadien der Entwicklung des Nervensystems und anderer Organe eine wichtige Rolle (Hogan 1996, Chen et al. 2004) und die Deregulation des gleichnamigen Signalweges steht mit der Entstehung von Krebs in Zusammenhang (Kelleher et al. 2006). In Studien zu vererbaren Tumorleiden, wie etwa dem Juvenilen-Polyposis-Syndrom, wurde gezeigt, dass Komponenten des BMP-Signalweges, wie etwa der BMPRII-Rezeptor und das Signaltransduktionsprotein SMAD4, als Tumorsuppressoren fungieren (Waite und Eng 2003). Aber auch BMPs als Liganden des BMP-Signalwegs spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Tumorerkrankungen, wie etwa bei Brustkrebs, Prostatakrebs, Lungenkrebs, Darmkrebs sowie Hirntumoren (Feeley et al. 2005; Langenfeld et al. 2006; Piccirillo et al. 2006; Kodach et al. 2008; Ye et al. 2007; Alarmo und Kallioniemi 2010). Es ist bekannt, dass Mitglieder der TGF-beta-Superfamilie, zu der auch die BMPs gehören, proliferationshemmend und differenzierend auf Krebszellen wirken können (Lombardo et al. 2011, Shirai et al. 2011, Zhao et al. 2008). So zeigten Piccirillo und Mitarbeiter (2006) am Beispiel von stammzellartigen, sog. Tumor-initiierenden Zellen des Glioblastoms, dass BMP4 die Proliferation dieser Zellen reduziert, die Expression neuronaler Differenzierungsmarker steigert und ihre Koloniebildungsfähigkeit einschränkt. Im Leberzellkarzinom hingegen fördert BMP 4 die Zellproliferation und Migration und somit die Tumorprogression (Chiu et al. 2012, Maegdefrau et al. 2009). BMPs können demnach in verschiedenen Tumorzellen unterschiedliche Wirkungen hervorrufen, wobei der stammzellartige Charakter der Zellen dabei eine nicht unerhebliche Rolle spielt. Alarmo und Mitarbeiter zeigten 2009, dass BMP7 in 2 von 8 Brustkrebs-Zelllinien Wachstum-stimulierend, in 4 Wachstum-inhibierend und in 2 Zelllinien überhaupt nicht auf das Zellwachstum wirkte. Auch kann sich ein in frühen Tumorstadien wachstumshemmender Einfluss eines BMPs im Verlauf der weiteren Tumorprogression wachstumsfördernd, pro-angiogen und immunsuppressiv auswirken (Jennings und Pietenpol 1998). Ketolainen und Kollegen (2010) zeigten in 9 Brustkrebs-Zelllinien nach BMP4-Gabe eine dramatische Wachstumssuppression bei gleichzeitiger Stimulation der Migration und Invasion in einigen dieser Zelllinien.

In der eigenen Arbeit wurde zunächst die Expression von *BMP2*, *BMP4* und *BMP6* auf Transkriptebeine in humanen und murinen Medulloblastomen sowie normalen Kleinhirngewebskontrollen untersucht. In den murinen Medulloblastomen war die Expression der genannten BMPs gegenüber der Expression in den Kleinhirnkontrollgeweben signifikant erniedrigt. Die Beurteilung der BMP-Expressionsdaten für die humanen Medulloblastomproben gestaltete sich aufgrund der Heterogenität der untersuchten Medulloblastome und der eingeschränkten Verfügbarkeit humaner Normalgewebekontrollen nicht so einfach wie im Mausmodell. Im Vergleich zu fetalem humanem Kleinhirngewebe war die Expression von *BMP2*-mRNA in der klassischen und desmoplastischen Medulloblastomvarianten signifikant erniedrigt. Die Expression von *BMP4* war nur in der klassischen Variante signifikant erniedrigt, jedoch zeigten auch die desmoplastischen Tumorproben eine Tendenz zu einer erniedrigten Expression von *BMP4*. *BMP6* war ebenfalls in beiden Varianten des Medulloblastoms (klassisch und desmoplastisch) signifikant gegenüber der fetalen Kleinhirngewebskontrolle erniedrigt. Im Vergleich zu adultem humanen Kleinhirnkontrollgewebe, das selbst nur eine sehr geringe Expression der analysierten BMPs zeigte, waren die untersuchten drei BMP-Gene in den Medulloblastomen ähnlich stark oder sogar etwas stärker exprimiert. Die abnehmende Expression der drei BMP-Gene mit Ausreifung des Kleinhirns verdeutlicht die Funktion der BMPs in der Entwicklung. Da es sich beim Medulloblastom um einen embryonalen Tumor handelt und zumindest ein Teil der Medulloblastome aus neuronalen Vorläuferzellen der äußeren Körnerzellschicht entsteht, könnte der Nachweis einer verminderten Expression im Verhältnis zu fetalem Kleinhirn pathogenetisch durchaus von Bedeutung sein.

Da neben zwei käuflichen Kleinhirnkontrollproben keine RNA aus fetalen oder postpartalen humanen Kleinhirnen zur Verfügung stand, wurde das Ausmaß der BMP2- und BMP4-Proteinexpression zusätzlich an Paraffinschnitten von fetalen und postpartalen humanen Kleinhirnproben sowie exemplarisch an einigen Medulloblastomen immunhistochemisch bestimmt. Die externe Körnerzellschicht (EGL) der fetalen und postpartalen Kleinhirnkontrollschnitte zeigte ebenso wie die Medulloblastome mit normaler bis erhöhter BMP2- bzw. BMP4-mRNA-Expression im immunhistochemischen Nachweis eine Proteinexpression von BMP2 und BMP4. Dies lieferte den Nachweis, dass in der EGL des fetalen und postnatalen Kleinhirns BMP2 und BMP4 physiologisch exprimiert werden. In den meisten der untersuchten

humanen Medulloblastome war die Expression von BMP2 und BMP4 jedoch erniedrigt. Dies könnte die These bestätigen, dass die beiden BMPs im Unterschied zu neuronalen Vorläuferzellen des Kleinhirns, auf die sie als differenzierungsfördernde Morphogene wirken, in den Medulloblastomzellen zu niedrig exprimiert werden oder komplett fehlen. Den Tumorzellen fehlt somit die Fähigkeit zu differenzieren und sie verweilen in einem teilungsfähigen Stadium, in dem sie unter Einfluss von SHH weiter proliferieren.

4.2 Auswirkungen eines deregulierten BMP-Signalwegs auf die Medulloblastomgenese

Die mRNA-Expressionsanalyse der BMP-Rezeptorgene *BMPR1A* und *BMPR2* ergab für die murinen Medulloblastome verglichen mit dem Kontrollgewebe keine aberrante Expression. In den humanen desmoplastischen Medulloblastomen war die *BMPR1A* mRNA-Expression gegenüber der fetalen Kleinhirnkontrolle signifikant erhöht, was für eine kompensatorische Hochregulierung des Rezeptors bei verminderter Verfügbarkeit von Liganden sprechen könnte. In drei von insgesamt 19 Fällen war die mRNA für mindestens einen der beiden Rezeptoren vermindert exprimiert, was ein Hinweis darauf sein kann, dass auch eine gestörte Expression von BMP-Rezeptoren an der Tumorzelloberfläche zu einer das Tumorstadium fördernden Störung der Signaltransduktion über den BMP-Signalweg führen kann. Lee und Mitarbeiter konnten bereits 2008 an Glioblastom-initiierenden Zellen nachweisen, dass in diesen Zellen die Expression des BMPR1B-Rezeptors durch Hypermethylierung des entsprechenden Genpromotors herunterreguliert ist und diese Zellen daher nicht differenzieren. Durch transgene Expression von BMPR1B oder Demethylierungsbehandlung des zugehörigen Promotors konnte die Expression dieses BMP-Rezeptors wieder gesteigert werden, die Zellen differenzierten und verloren ihren Tumorzellcharakter.

Id4, ein Zielgen des BMP-Signalwegs, wies in den untersuchten murinen Medulloblastomen, konkordant zur verminderten mRNA-Expression von *Bmp2*, *Bmp4* und *Bmp6* in diesen Tumoren, ein signifikant erniedrigtes Expressionslevel auf. Andere Arbeiten haben bereits berichtet, dass *ID4* für das exakte „timing“ der

Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen wichtig ist (Yun et al. 2004; Bedford et al. 2005). Eine Erniedrigung der Expression von *ID4* zu einem wichtigen Zeitpunkt der Neurogenese könnte so die Entstehung von Medulloblastomen begünstigen. In den humanen Medulloblastomen fand sich in den eigenen Untersuchungen allerdings keine konsistent verminderte *ID4* mRNA-Expression. Auch in anderen Krebsarten, wie dem Prostata- oder dem Mammakarzinom, spielt *ID4* als potentieller Tumorsuppressor eine Rolle (Carey et al. 2009, Noetzel et al. 2008).

Math1, ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Histogenese neuronaler Progenitorzellen, wird normalerweise posttranskriptionell von BMPs herunterreguliert, indem BMPs die proteasomale Degradierung von Math1 triggern (Zaoh et al. 2008). BMPs könnten somit während der Kleinhirnentwicklung als Gegenspieler von Math1 eine Differenzierung der neuronalen Progenitorzellen in der äußeren Körnerzellschicht des Kleinhirns fördern. In den murinen Medulloblastomen korrelierte entsprechend die erniedrigte Expression von Bmp2, Bmp4 und Bmp6 mit einer signifikant gesteigerten Expression von Math1. In den humanen Medulloblastomen zeigte sich jedoch mit einer Ausnahme (dpMB10) nur bei den Fällen der desmoplastischen Variante eine gesteigerte mRNA-Expression von *MATH1* gegenüber den normalen Kleinhirngewebskontrollen.

Alle murinen Medulloblastome und drei desmoplastische humane Medulloblastome zeigten Überexpression von *GLI1* mRNA als Hinweis auf eine Aktivierung des SHH-Signalweges. Sechs weitere humane Medulloblastome (dpMB10, dpMB11, dpMB13, dpMB14, dpMB16, dpMB20), die histologisch als desmoplastischer Subtyp diagnostiziert wurden, wiesen keine verstärkte Expression von *GLI1* mRNA auf, was eigentlich nicht zu desmoplastischen Medulloblastomen bzw. einer Einstufung in die SHH-Gruppe der Medulloblastome nach Kool et al. (2008) passt. Auch das *MATH1* mRNA-Expressionslevel war in diesen Tumoren nicht wesentlich erhöht. In der Literatur findet man widersprüchliche Aussagen zu einem möglichen Zusammenhang zwischen Aktivierung des SHH-Signalweges und *MATH1*-Expression. Flora und Mitarbeiter demonstrierten 2009, dass *MATH1* an eine *GLI2* Enhancer-Region bindet und für die notwendige konstitutive Aktivierung des SHH-Signalwegs in Medulloblastomen notwendig ist. Ayrault und Mitarbeiter (2010) gelang es hingegen nicht, durch eine *MATH1*-Induktion eine gesteigerte *GLI2*-Expression in

primären neuronalen Körnerzellvorläufern zu erzielen. Sie schlugen vor, dass *MATH1*, über die Regulation neuronaler Differenzierungsgene, die präneoplastischen neuronalen Vorläuferzellen in einem SHH-responsiven Zustand hält und so mit *GLI1* bei der Entstehung des Medulloblastoms kooperiert, aber Komponenten des SHH-Signalwegs nicht direkt beeinflusst.

Anhand der vorangegangenen Diskussion von Expressionsdaten einzelner Gene wie *MATH1* und *GLI1* wird deutlich, dass die genetische Heterogenität, selbst der histologisch als Medulloblastom der desmoplastischen Variante eingeordneten Tumoren einen Vergleich der humanen Medulloblastome untereinander und insbesondere mit den murinen Medulloblastomen aus dem *Ptch1*^{+/-}-Mausmodell erschwert.

4.3 Regulierung der BMP-Expression in Medulloblastomen durch Promotor-Hypermethylierung und Histondeacetylierung

Die eigenen Zellkulturexperimente ergaben, dass nach kombinierter Demethylierungsbehandlung und Inhibition der Deacetylierung die mRNA-Expression von *Bmp2* und *Bmp4*, nicht jedoch von *Bmp6*, in murinen Medulloblastomzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen der gleichen Linie im Mittel um den Faktor 9 für *Bmp2* und um den Faktor 23 für *Bmp4* anstieg. Dieser Befund spricht für eine Regulierung der *BMP2*- und *BMP4*-Transkription durch Methylierung der zugehörigen Genpromotoren und/oder Kondensation der Chromatinstruktur über eine verminderte Histonacetylierung. Auch wiesen die murinen Medulloblastome eine gesteigerte Expression der Methyltransferase Ezh2 auf. Ezh2 ist Teil des Polycomb-repressiv-Complex-2 (PRC2) und deutet mit seiner verstärkten Expression auf eine global erhöhte „Gene-silencing“-Aktivität in diesen Tumoren hin (Viré et al. 2006). Die Sequenzierung Natriumbisulfit-konvertierter DNA ergab für die murinen Tumoren eine verstärkte Methylierung der dem Transkriptionsstartpunkt von *Bmp2* vorgelagerten CpG-Insel, während für *Bmp4* nur unmittelbar vor dem

Transkriptionsstartpunkt eine Methylierung zu beobachten war. Für *Bmp6* konnte keine Methylierung im Promotorbereich detektiert werden.

In den humanen Tumoren waren nur einige CpG Dinukleotide vor dem Transkriptionsstartpunkt von *BMP4*, nicht jedoch in den ausgewiesenen CpG Inseln (<http://genome.ucsc.edu/>) stärker methyliert als in humaner Kontroll-DNA aus adulten Kleinhirne. Auch in Hypophysenadenomen konnte eine reduzierte BMP4-Expression nicht mit Veränderungen des Methylierungsstatus innerhalb der ausgewiesenen CpG Insel assoziiert werden (Yacqub-Usman et al. 2012). Die Promotorbereiche von *BMP2* und *BMP6* waren sowohl in der Kontroll-DNA als auch in den humanen Medulloblastomen nicht methyliert, so dass ein anderer Regulationsmechanismus für die erniedrigte Expression der zugehörigen Gene verantwortlich sein muss. Eine Möglichkeit wäre die Histonacetylierung, wofür der Expressionsanstieg dieser Gene auf mRNA-Ebene nach alleiniger TSA-Behandlung spricht, oder eine Regulation über aberrant exprimierte Transkriptionsfaktoren bzw. microRNAs.

Im Gegensatz zu den Medulloblastomen, die in den eigenen Analysen keine Hypermethylierung des *BMP6*-Promotors zeigten, wurde jedoch für andere Krebsarten, wie der adulten T-Zell-Leukämie, bestimmten malignen Lymphomen, extramedullären Plasmozytomen und Brustkrebs eine Methylierung des *BMP6*-Promotors berichtet (Daibata et al. 2007; Zhang et al. 2007; Hashida et al. 2012; Taniquchi et al. 2008).

4.4 Rekombinantes BMP: Ein Therapie-Ansatz für das Medulloblastom ?

Es zeigte sich, dass die Gabe von rekombinantem BMP2 die Vitalität der untersuchten Medulloblastomzellen beeinflusste, jedoch waren die Ergebnisse nicht für alle untersuchten Zelllinien gleich. Für die murine Zelllinie 4M95 konnte die Vitalität der Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz nach Gabe von rekombinantem BMP2 signifikant reduziert werden. Für die murine Zelllinie 3M282 und die humane Zelllinie DAOY zeigte sich keine signifikante Reduzierung der Vitalität unter Behandlung mit rekombinantem BMP2. In einem weiteren spezifischen funktionellen Test, der die Apoptose in Zellkulturen misst, konnte durch Gabe von rekombinantem

BMP2 die Apoptoserate in den murinen Zelllinien 4M95 und 3M282 signifikant gesteigert werden. Für die humane Zelllinie DAOY zeigte sich keine signifikante Veränderung der Apoptoserate in den Zellen. In einem Test zur Proliferationsbestimmung konnten für keine der drei untersuchten Zelllinien eine signifikante Veränderung unter Behandlung mit rekombinantem BMP erzielt werden. Die Gabe von rekombinantem BMP6 zeigte in keiner der genannten Zelllinien und in keinem der durchgeführten funktionellen Tests eine signifikante Beeinflussung der Zellen. An Zelllinien unterschiedlicher anderer Tumorarten zeigte die Gabe rekombinanter BMPs variable Effekte. Langenfeld und Mitarbeiter (2006) behandelten Lungenkrebszellen der Zelllinie A549 mit rekombinantem BMP2 und fanden danach eine gesteigerte Proliferation der Tumorzellen, während Wen und Mitarbeiter (2004) bei Zellen des Magenkarzinoms über eine verringerte Proliferation nach BMP2-Gabe berichteten. In primären Medulloblastomen und Medulloblastomzellen *in vitro* wiesen Hallahan und Kollegen (2003) einen pro-apoptotischen Effekt von BMP2 auf die malignen Zellen nach, ein Befund der in der eigenen Arbeit in den murinen Zelllinien 4M95 und 3M282 verifiziert werden konnte. Auf die humane Zelllinie DAOY hatte die Gabe von rekombinanten BMPs in der eigenen Arbeit keinen signifikanten Einfluss. Ein Grund hierfür könnte die verminderte Expression des BMPRII-Rezeptorsubtyps in der Zelllinie DAOY sein, an den BMP2 mit hoher Affinität bindet (siehe Abb. 17, S. 57). Desweiteren wurde die Wirkung von rekombinanten BMPs auf die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen der Linien 3M282 und DAOY untersucht. Sowohl rekombinantes BMP2 als auch rekombinantes BMP4 waren in der Lage, die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten der murinen Zelllinien 3M282 signifikant, nicht jedoch in der humanen Zelllinie DAOY, gegenüber der Kontrolle zu senken. Die Gabe von rekombinantem BMP6 hatte bei keiner der untersuchten Zelllinien eine signifikante Veränderung der Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten zur Folge. Schon Piccirillo und Mitarbeiter (2006) zeigten am Beispiel von stammzellartigen Tumor-initiierenden Zellen des Glioblastoms, dass BMP4 nicht nur die Proliferation dieser Zellen reduziert, sondern auch ihre Koloniebildungsfähigkeit einschränkt.

Zusammenfassend gibt es Hinweise für einen möglichen Ansatz zur Therapie von Medulloblastomen mittels Gabe von rekombinantem BMP. Hierzu müsste jedoch die Wirkung der rekombinanten BMPs auf die verschiedenen molekularen Subtypen der

Medulloblastome genauer untersucht und präklinisch in „*in vivo*“ Modellen untersucht werden. Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft ist die genaue Funktion der BMPs bei der Entstehung und möglichen Therapie von Medulloblastomen noch nicht eindeutig geklärt, da sie je nach Zelltyp und Transformationsgrad verschiedene Wirkungen zeigen (Langenfeld et al. 2003; Zhao et al. 2008). Auch scheint der Zeitpunkt der Gabe von rekombinanten BMPs zur Behandlung von Tumorzellen wichtig zu sein. Ähnlich wie das TGF- β - paradoxon (Tian and Schiemann 2009, Smith et al. 2012) scheint zumindest auch BMP4 in frühen Tumorstadien Wachstums-inhibierend, jedoch während der weiteren Tumorprogression fördernd auf Zellinvasion und Migration zu wirken (Ketolainen et al. 2010). Auch stellt die Zellkultur als „*in vitro*“ Modell eines soliden Tumors nur ein unzureichendes, dem eigentlichen Tumor im Patienten nur in Teilen vergleichbares Untersuchungssystem dar. Zum einen müssen neue funktionelle Testmethoden an Zellkulturen etabliert werden, zum anderen braucht man andere Modellsysteme, wie unpassagierte primäre Zellkulturen von Tumoren oder geeignete Mausmodelle, die die Tumorsituation *in vivo* besser widerspiegeln.

5 Literatur

Adesina AM, Nalbantoglu J, Cavenee WK. p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma. *Cancer Res.* 1994; 54: 5649-5651.

Alarmo EL, Kallioniemi A. Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumourigenesis? *Endocr Relat Cancer.* 2010; 17: 123-139.

Alarmo EL, Pärssinen J, Ketolainen JM, Savinainen K, Karhu R, Kallioniemi A. BMP7 influences proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2009; 275: 35-43.

Alvarez-Rodriguez R, Barzi M, Berenguer J, Pons S. Bone morphogenetic protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc. *J Biol Chem.* 2007; 282: 37170-37180.

Anderson GJ, Darshan D. Small-molecule dissection of BMP-signaling. *Nature Chemical Biology* 2008; 15: 16.

Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 11995-11999.

Attisano L, Labbé E. TGF-beta and Wnt pathway cross-talk. *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23: 53-61.

Ayrault O, Zhao H, Zindy F, Qu C, Sherr CJ, Roussel MF. Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells. *Cancer Res.* 2010; 70: 5618-5627.

Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol.* 2002; 250: 231-250.

Bastida MF, Sheth R, Ros MA. A BMP-Shh negative-feedback loop restricts Shh expression during limb development. *Development.* 2009; 136: 3779-3789.

Bedford L, Walker R, Kondo T, van Crüchten I, King ER, Sablitzky F. ID4 is required for the correct timing of neuronal differentiation. *Dev Biol.* 2005; 280: 386-395.

Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY. Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature.* 1997; 390: 169-72.

Bigner SH, Mark J, Friedman HS, Biegel JA, Bigner DD. Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988; 30: 91-101.

Bühren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S, Wiestler OD, Pietsch T. 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: 229-240.

Cantley LC, Auger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell.* 1991; 64: 281-302.

Carey JP, Asirvatham JA, Galm O, Ghogomu TA, Ghandhary J. Inhibitor of differentiation 4 (Id4) is a potential tumor suppressor in prostate cancer. *BMC Cancer.* 2009; 9: 173

Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 9843-9847.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004; 22: 233-241.

Chiu CY, Kuo KK, Kuo TL, Lee KT, Cheng KH. The activation of MEK/ERK signaling pathway by bone morphogenetic protein 4 to increase hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. *Mol Cancer Res.* 2012; 10: 415-427.

Dahmen RP, Koch A, Denkhaus D, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD, Pietsch T. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res.* 2001; 61: 7039-7043.

Daibata M, Nemoto Y, Bandobashi K, Kotani N, Kuroda M, Tsuchiya M, Okuda H, Takakuwa T, Imai S, Shuin T, Taguchi H. Promoter hypermethylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in malignant lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 3528-3535.

Dale, L., Howes, G., Price, B. M. J., and Smith, J. C.. Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development.* 1992; 115: 573-585.

de Haas T, Oussoren E, Grajkowska W, Perek-Polnik M, Popovic M, Zdravec-Zaletel L, Perera M, Corte G, Wirths O, van Sluis P, Pietsch T, Troost D, Baas F, Versteeg R, Kool M. OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2006; 65: 176-186.

Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 1998; 17: 3091-3100.

Ebendal T, H Bengtsson, S Soderstrom. Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain. *J Neurosci Res.* 1998; 51: 139-146.

Eberhart CG, Tihan T, Burger PC. Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; 59: 333-337.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993; 75: 1417-1430.

Feeley BT, Gamradt SC, Hsu WK, Liu N, Krenek L, Robbins P, Huard J, Lieberman JR. Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer. *J Bone Miner Res*. 2005; 20: 2189-2199.

Flora A, Klisch TJ, Schuster G, Zoghbi HY. Deletion of ATOH1 disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastomas. *Science*. 2009; 326: 1424-1427.

Fogarty MP, Kessler JD, Wechsler-Reya RJ. Morphing into cancer: the role of developmental signaling pathways in brain tumor formation. *J Neurobiol*. 2005; 64: 458-475.

Frank AJ, Hernan R, Hollander A, Lindsey JC, Lusher ME, Fuller CE, Clifford SC, Gilbertson RJ. The TP53-ARF tumor suppressor pathway is frequently disrupted in large/cell anaplastic medulloblastoma. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004; 121: 137-140.

Giangaspero F, Wellek S, Masuoka J, Gessi M, Kleihues P, Ohgaki H. Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. *Acta Neuropathol*. 2006; 112: 5-12

Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currie DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkenstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang ZJ, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Taketo MM, Boop FA, Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, McKinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R, Gilbertson RJ. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*. 2010; 468: 1095-1099.

Goodrich LV, Milenković L, Higgins KM, Scott MP. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 1997; 277: 1109-1113.

Gorlin RJ. Nevroid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin*. 1995; 13: 113-125.

Graf JM, Thies RS, Song JJ, Celesta AJ, Melton DA. Studies with a *Xenopus* BMP receptor suggest that ventral mesoderminducing signals override dorsal signals in vivo. *Cell*. 1994; 79: 169-179.

Grammel D, Warmuth-Metz M, von Bueren AO, Kool M, Pietsch T, Kretzschmar HA, Rowitch DH, Rutkowski S, Pfister SM, Schüller U. Sonic hedgehog-associated medulloblastoma arising from the cochlear nuclei of the brainstem. *Acta Neuropathol*. 2012; 123: 601-614.

Grill J, Sainte-Rose C, Jouvett A, Genlet JC, Lejars O, Frappaz D, Doz T, Rialland X, Pichon F, Bertozzi AI, Chastagner P, Couanet D, Habrand JL, Raquin MA, Le Deley MC, Kalifa C. Treatment of medulloblastoma with postoperative chemotherapy alone: an STOP prospective trial in young children. *Lancet Oncol*. 2005; 6: 573-580.

Guo S, Brush J, Teraoka H, Goddard A, Wilson SW, Mullins MC, Rosenthal A. Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein soulless/Phox2a. *Neuron*. 1999; 24: 555-566.

Gurdon JB, Bourillot PY. Morphogen gradient interpretation. *Nature*. 2001; 413: 797-803.

Haag D, Zipper P, Westrich V, Karra D, Pflieger K, Toedt G, Blond F, Delhomme N, Hahn M, Reifenberger J, Reifenberger G, Lichter P. Nos2 inactivation promotes the development of medulloblastoma in Ptch1(+/-) mice by deregulation of Gap43-dependent granule cell precursor migration. *PLoS Genet*. 2012; 8: e1002572

Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RA, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nat Med*. 2003; 9: 1033-1038.

Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*. 1995; 332: 839-847.

Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1993; 82: 1820-1828.

Hashida Y, Nemoto Y, Imaih M, Murahami M, Taniguchi A, Komatsu N, Yokoyama A, Daibata M. Promoter methylation of the bone morphogenetic protein 6 gene in multiple myeloma. *Oncol Rep*. 2012; 27: 825-830.

Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*. 1996; 10: 1580-1594.

Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol*. 2000; 156: 433-437.

Huimin L, Dan C, Jing Z. Analysis of intron sequence features associated with transcriptional regulation in human genes. *PLoS One*. 2012; 7: e46784.

Iantosca MR, McPherson CE, Ho SY, Maxwell GD. Bone morphogenetic proteins-2 and -4 attenuate apoptosis in a cerebellar primitive neuroectodermal tumor cell line. *J Neurosci Res*. 1999; 56: 248-258.

Jennings MT, Pietenpol JA. The role of transforming growth factor beta in glioma progression. *J Neurooncol*. 1998; 36: 123-140.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 415-428.

Jones PA. DNA methylation and cancer. *Encyclopedia of cancer* (sec. edition) 2002; pp 89-95.

Johnson AA, Akman K, Calimport SR, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhaes JP. The role of DNA methylation in aging, rejuvenation and age related diseases. *Rejuvenation Res.* 2012; 15: 483- 494.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH et al. Human homologues of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science.* 1996; 272: 1668-1671.

Kalyani AJ, Piper D, Mujtaba T, Lucero MT, Rao MS. Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J Neurosci.* 1998; 18: 7856 –7868.

Katsetos CD, Herman MM, Krishna L, Vender JR, Viores SA, Agamanolis DP, Schiffer D, Burger PC, Urich H. Calbindin-D28k in subsets of medulloblastomas and in the human medulloblastoma cell line D283 Med. Arch Pathol Lab Med. 1995; 119: 734-743.

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 49-61.

Keith A. Hruska, Suresh Mathew, Georges Saab. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Calcification. *Circulation Research.* 2005; 97: 105.

Kelleher FC, Fennelly D, Rafferty M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta Oncol.* 2006; 45: 375-388.

Ketolainen JM, Alarmo EL, Tuominen VJ, Kallioniemi A. Parallel inhibition of cell growth and induction of cell migration and invasion in breast cancer cells by bone morphogenetic protein 4. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 124: 377-386.

Kleihues P, Louis DN, Wiestler OD, Burger PC, Scheithauer BW. WHO grading of tumours of the central nervous system. *In* Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Eds.) WHO classification of tumours of the central nervous system. IARC, Lyon, 2007, pp 10-11.

Kodach LL, Bleuming SA, Musler AR, Peppelenbosch MP, Hommes DW, van den Brink GR, van Noesel CJ, Offerhaus GJ, Hardwick JC. The bone morphogenetic protein pathway is active in human colon adenomas and inactivated in colorectal cancer. *Cancer.* 2008; 112: 300-306.

Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Msić A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One.* 2008; 3: e3088.

Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, Cho YJ, Koster J, Schouten-van Meeteren A, van Vuurden D, Clifford SC, Pietsch T, von Bueren AO, Rutkowski S, McCabe M, Collins VP, Bäcklund ML, Haberler C, Bourdeaut F, Delattre O, Doz F, Ellison DW, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international

meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 2012; 123: 473-484

Laird CD, Pleasant ND, Clark AD, Sneed JL, Hassan KM, Manley NC, Vary JC Jr, Morgan T, Hansen RS, Stöger R. Hairpin-bisulfite PCR: assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 204-209.

Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet*. 1996; 30: 441-464.

Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis*. 2003; 24: 1445-1454.

Langenfeld EM, Kong Y, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein 2 stimulation of tumor growth involves the activation of SMAD-1/-5. *Oncogene*. 2006; 25: 685-692.

Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, Kotliarova S, Kotliarov Y, Walling J, Ahn S, Kim M, Totonchy M, Cusack T, Ene C, Ma H, Su Q, Zenklusen JC, Zhang W, Maric D, Fine HA. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell*. 2008; 13: 69-80.

Liu F, Poupponnot C, Massagué J. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev*. 1997; 11: 3157-3167.

Li W, Cogswell CA, LoTurco JJ. Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J. Neurosci*. 1998; 18: 8853-8862.

Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P, Todaro M, Iovino F, Ricci-Vitiani L, Gulotta G, Dieli F, de Maria M, Stassi G. Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. *Gastroenterology* 2011; 140: 297-309.

Giangaspero F, Eberhart CG, Haapasalo H, Pietsch T, Wiestler OD, Ellison DW. Medulloblastoma. In Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Eds.) WHO classification of tumours of the central nervous system. IARC, Lyon, 2007, pp132-146.

Maegdefrau U, Amann T, Winklmann A, Braig S, Schubert T, Weiss TS, Schardt K, Warnecke C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *J Pathol* 2009; 218: 520-529.

McCabe MG, Ichimura K, Pearson DM, Liu L, Clifford SC, Ellison DW, Collins VP. Novel mechanisms of gene disruption at the medulloblastoma isodiscentric 17q11 breakpoint. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009; 48: 121-131.

McNeil DE, Cote TR, Clegg L, Rorke LB. Incidence and trends in pediatric malignancies medulloblastoma/ primitive neuroectodermal tumor: a SEER update. *Surveillance Epidemiology and End Results. Med Pediatr Oncol.* 2002; 39: 190.

Mekki-Dauriac S, Agius E, Kan P, Cochard P. Bone morphogenetic proteins negatively control oligodendrocyte precursor specification in the chick spinal cord. *Development.* 2002; 129: 5117-5130.

Michiels EM, Oussoren E, Van Groenigen M, Pauws E, Bossuyt PM, Voûte PA, Baas F. Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain. *Physiol Genomics.* 1999; 1: 83-91.

Miyata H, Ikawa E, Ohama E. Medulloblastoma in an adult suggestive of external granule cells as its origin: a histological and immunohistochemical study. *Brain Tumor Pathol.* 1998; 15: 31-35.

Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin.* 1990; 48: 579-582.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22: 299-306

Noetzel E, Veeck J, Niederacher D, Galm O, Horn F, Hartmann A, Knüdel R, Dahl E. Promoter methylation-associated loss of ID4 expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8: 154.

Northcott PA, Hielscher T, Dubuc A, Mack S, Shih D, Remke M, Al-Halabi H, Albrecht S, Jabado N, Eberhart CG, Grajkowska W, Weiss WA, Clifford SC, Bouffet E, Rutka JT, Korshunov A, Pfister S, Taylor MD. Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathol.* 2011; 122: 231-240.

Northcott PA, Kurshunov A, Pfister SM, Taylor MD. The clinical implications of medulloblastoma subgroups. *Nat Rev Neurol.* 2012; 8: 340-351.

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980; 287: 795-801.

Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene.* 1993; 8: 1063-1067.

Packer RJ, Zhou T, Holmes E, Vezina G, Gajjar A. Survival and secondary tumors in children with medulloblastoma receiving radiotherapy and adjuvant chemotherapy: results of children's oncology group trial A9961. *Neuro Oncol.* 2012 October 25. [Epub ahead of print]

Paez-Pereda M, Giacomini D, Refojo D, Nagashima AC, Hopfner U, Grubler Y, Chervin A, Goldberg V, Goya R, Hentges ST, Low MJ, Holsboer F, Stalla GK, Arzt E. Involvement of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) in pituitary prolactinoma

pathogenesis through a Smad/estrogen receptor crosstalk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 1034-1039.

Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res*. 2012; 318: 299-310.

Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumor-initiating cells. *Nature* 2006; 444: 761-765.

Piccirillo SG, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2006; 5: 59-81

Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sörensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res*. 1997; 57: 2085-2088.

Rao PM, Antony A, Rajalakshmi S, Sarma DS. Studies on hypomethylation of liver DNA during early stages of chemical carcinogenesis in rat liver. *Carcinogenesis*. 1989; 10: 933-937.

Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, Reifenberger G. Missense mutations in *SMO* in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*. 1998; 58: 1798-1803.

Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*. 1993; 7: 139-146.

Rios I, Alvarez-Rodríguez R, Martí E, Pons S. Bmp2 antagonizes sonic hedgehog-mediated proliferation of cerebellar granule neurones through Smad5 signalling. *Development*. 2004; 131: 3159-3168.

Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet*. 2000; 1: 11-19.

Rosen V, Wozney JM, Wang EA, Cordes P, Celeste A, McQuaid D, Kurtzberg L. Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone. *Connect Tissue Res*. 1989; 20: 313-319.

Rostomily RC, Bermingham-McDonogh O, Berger MS, Tapscott SJ, Reh TA, Olson JM. Expression of neurogenic basic helix-loop-helix genes in primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res*. 1997; 57: 3526-3531.

Rubin JB, Rowitch DH. Medulloblastoma: a problem of developmental biology. *Cancer Cell*. 2002; 2: 7-8.

Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, Ottensmeier H, Warmuth-Metz M, Soerensen N, Graf N, Emser A, Pietsch T, Wolff JE, Kortmann RD, Kuehl J. Treatment of early

childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *N Engl J Med.* 2005; 352: 978-986.

Samanta J, Kessler JA. Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development.* 2004; 131: 4131-4142.

Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78: 7599-7603.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74: 5463-5467.

Sengupta R A, Dubuc A, Ward S, Yang, L.,Northcott, P.,Woerner, B. M.,Kroll, K.,Luo, J.,Taylor, M. D.,Wechsler-Reya, R. J.,Rubin, J. B. CXCR4 activation defines a new subgroup of Sonic hedgehog-driven medulloblastoma. *Cancer Res.* 2012; 72: 122-132.

Shirai YT, Ehata S, Yashiro M, Yanagihara K, Hirakawa K, Miyazono K. Bone morphogenetic protein-2 and -4 play tumor suppressive roles in human diffuse-type gastric carcinoma. *Am J Pathol.* 2011; 179: 2920-2930.

Smith AL, Robin TP, Ford HL. Molecular Pathways: Targeting the TGF-beta Pathway for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2012; 18: 4514-4521

Taniguchi A, Nemoto Y, Yokoyama A, Kotani N, Imai S, Shuin T, Daibata M. Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in association with adult T-cell leukemia. *Int J Cancer.* 2008; 123: 1824-1831.

Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet.* 2002; 31: 306-310.

Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012; 123: 465-472.

Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A, Gilbertson RJ. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 1924-1931.

Tian M. and Schiemann WP. The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol.* 2009; 5: 259-271.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150: 893-899.

Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*. 2006; 439: 871-874.

Wang X, Zhao J, Huang J, Tang H, Yu S, Chen Y. The regulatory roles of miRNA and methylation on oncogene and tumor suppressor gene expression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 425: 51-57

Waite KA, Eng C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet*. 2003; 4: 763-773.

Weinberg RA. Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA Cancer J Clin*. 1994; 44: 160-170.

Wen XZ, Miyake S, Akiyama Y, Yuasa Y. BMP-2 modulates the proliferation and differentiation of normal and cancerous gastric cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 316: 100-106.

Wine-Lee L, Ahn KJ, Richardson RD, Mishina Y, Lyons KM, Crenshaw EB 3rd. Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development*. 2004; 131: 5393-5403.

Yacqub-Usma K, Duong CV, Clayton RN, Farrell WE. Epigenomic Silencing of the BMP-4 Gene in Pituitary Adenomas: A Potential Target for Epidrug-Induced Re-expression. *Endocrinology*. 2012; 153: 3603-3612

Yamada T, Pfaff SL, Edlund T, Jessell TM. Control of cell pattern in the neural tube: motor neuron induction by diffusible factors from notochord and floor plate. *Cell*. 1993; 73: 673-686.

Yang Z-J, Ellis T, Markant SL, Read T-A, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schüller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ, Wechsler-Reya RJ. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell*. 2008; 14: 135-145.

Ye L, Lewis-Russell JM, Kyanaston HG, Jiang WG. Bone morphogenetic proteins and their receptor signaling in prostate cancer. *Histol Histopathol*. 2007; 22: 1129-1147.

Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, Wang XF. Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol*. 1997; 17: 7019-7028.

Yokota N, Aruga J, Takai S, Yamada K, Hamazaki M, Iwase T, Sugimura H, Mikoshiba K. Predominant expression of human zic in cerebellar granule cell lineage and medulloblastoma. *Cancer Res*. 1996; 56: 377-383.

Yun K, Mantani A, Garel S, Rubenstein J, Israel MA. ID4 regulates neural progenitor proliferation and differentiation in vivo. *Development*. 2004; 131: 5441-5448.

Zeltzer PM, Boyett JM, Finlay JL, Albright AL, Rorke LB, Milstein JM, Allen JC, Stevens KR, Stanley P, Li H, Wisoff JH, Geyer JR, McGuire-Cullen P, Stehbens JA, Shurin SB, Packer RJ. Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 832-845.

Zhang M, Wang Q, Yuan W, Yang S, Wang X, Yan JD, Du J, Yin J, Gao SY, Sun BC, Zhu TH. Epigenetic regulation of bone morphogenetic protein-6 gene expression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 105: 91-97.

Zhao H, Ayrault O, Zindy F, Kim JH, Roussel MF. Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development. *Genes Dev.* 2008; 22: 722-727.

Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res.* 1998; 58: 896-899.

6 Tabellarische Aufstellung der relativen Expressionswerte einzelner Tumore

Tabelle 12: Übersicht über die einzelnen relativen Expressionswerte in den murinen Proben

murine Proben	Tumorgehalt in der Probe	BMPR1A	BMPR2	GLI1	GLI2	PTCH1	BMP2	BMP4	BMP6	ID4	EZH2	MATH1
2M57 K	Zellkultur	1,08	0,2	n.g.	n.g.	n.g.	0,11	47	0	0,01	0,43	n.g.
2M57 AT1	Zellkultur	0,5	0,1	n.g.	n.g.	n.g.	0,15	1,5	0	0,01	0,28	n.g.
2M57 AT2	Zellkultur	1,4	0,15	n.g.	n.g.	n.g.	0,13	7,3	0	0,01	0,33	n.g.
2M223 K	Zellkultur	1,7	0,32	n.g.	n.g.	n.g.	0,17	24	0	0,03	0,39	n.g.
2M223 AT1	Zellkultur	0,5	0,08	n.g.	n.g.	n.g.	0,08	4	0	0,01	0,18	n.g.
2M223 AT2	Zellkultur	0,4	0,76	n.g.	n.g.	n.g.	0,12	4,5	0	0,01	0,22	n.g.
3M282 Kont	Zellkultur	2,3	0,52	n.g.	n.g.	n.g.	0,54	0,2	0	0,002	1,7	n.g.
3M282 AT1	Zellkultur	2,8	1,49	n.g.	n.g.	n.g.	0,35	1,4	0	0,02	1,5	n.g.
3M282 AT2	Zellkultur	0,53	0,55	n.g.	n.g.	n.g.	0,37	1,8	0	0,01	1	n.g.
4M208 K	Zellkultur	1,2	0,14	n.g.	n.g.	n.g.	0,17	0,27	0	0,02	0,85	n.g.
4M208 AT1	Zellkultur	0,4	0,33	n.g.	n.g.	n.g.	0,1	0,43	0	0,02	0,26	n.g.
4M208 AT2	Zellkultur	0,3	0,14	n.g.	n.g.	n.g.	0,2	0,46	0	0,03	0,33	n.g.
4M95 K	Zellkultur	0,9	0,15	n.g.	n.g.	n.g.	0,08	6,1	0	0,007	0,48	n.g.
4M95 AT1	Zellkultur	0,2	0,19	n.g.	n.g.	n.g.	0,15	3,6	0	0,01	0,35	n.g.
4M95 AT2	Zellkultur	0,2	0,33	n.g.	n.g.	n.g.	1,9	0,4	0	0,03	0,12	n.g.
2M1034	30%	2,3	0,9	13,45	1,4	1,3	0,04	0,09	0,16	0,04	5,8	3011
4M208	>70%	0	5,7	37,3	6,5	1,79	0,1	0,41	0,79	0,45	9	3706
2M223	70%	9,3	2,1	69,5	41,8	3,36	0,12	0,42	0,48	0,3	9,3	4791
2M224	50%	2,9	1,5	14,04	4,7	1,5	0,12	0,39	0,43	0,28	4,5	1782
2M227	>60%	5,4	1,5	70,2	27,3	3,4	0,05	0,18	0,33	0,36	6,9	3642
2M679	90%	4,1	2,81	74,4	28,2	1,49	0,07	0,44	0,33	0,1	9,6	3665
2M758	90%	1,7	0,4	26,63	1,5	1,01	0,11	0,18	0,07	0,03	3	3285
4M164	>90%	4,6	1,4	48,9	27,86	1,75	0,1	0,38	0,41	0,13	13,9	4954
4M321	>90%	0	2,1	22,3	10,8	5,13	0,1	0,32	0,31	0,11	10,7	4401
4M457	>90%	3,7	1,8	39,6	10,15	1,89	0,12	0,37	0,22	0,07	9,9	4603
4M626	90%	4,2	0,9	14,45	11,29	1,15	0,11	0,27	0,4	0,2	9,5	3592
4M620	90%	2,7	2,03	44,37	21,66	1,37	0,08	0,38	0,35	0,09	7,8	3444
kh5	0% (Kontrolle)	2,8	3,1	4,42	1,43	3,95	0,77	1,9	2,38	1,1	1,1	5,5
kh4	0% (Kontrolle)	0	4,3	2,18	6,23	2,66	1,63	2	2,1	1,6	1	5,3
1M80	0% (Kontrolle)	4,1	4,77	2,46	1,86	3,17	2,55	2,61	5,2	1,4	1,4	7,6
1M82	0% (Kontrolle)	0	4,8	8	96,4	6	3,57	0,9	2,7	1,8	1	2,4
2M9	0% (Kontrolle)	3,5	5,9	1,51	0,24	1,05	1	3,5	1,6	1,4	1,3	39
2M127	0% (Kontrolle)	4,3	2,8	10,94	10,68	5,16	1,05	1,25	2,81	3,3	2,9	1,8
2M131	0% (Kontrolle)	4,6	3,1	6,48	6,22	5,27	2,3	1,37	2,24	2	1,6	7,2
4M9	0% (Kontrolle)	1,9	3,4	3,41	0,62	1,05	1,68	4,12	2,22	1,7	1,8	113
4M268	0% (Kontrolle)	2,6	2,6	5,1	6,5	2	1,5	1,33	2,85	0,97	0,9	1,1
4M319	0% (Kontrolle)	0	3,7	7,1	7,7	4,68	3,09	1,09	4,45	1,6	1,6	1

n.g.: nicht gemessen

Tabelle 13: Übersicht über die einzelnen relativen Expressionswerte in den humanen Proben

humane Proben	Tumoridentität	BMPR1A	BMPR2	GLI1	GLI2	PTCH1	BMP2	BMP4	BMP6	ID4	EZH2	MATH1
MB9	klassisches Medulloblastom	1,29	1,01	0	0,02	0,22	0,09	0,18	0	2,8	2,2	1
MB17	klassisches Medulloblastom	0,1	0,7	0,65	0,6	1,6	2,4	0,16	0,05	1,5	2,21	1,4
MB18	klassisches Medulloblastom	0,5	0,07	0,02	2,3	3,9	0,12	0,05	0,06	n.d.	4,24	1
MB19	klassisches Medulloblastom	1,26	0,06	1,8	5,9	2,5	0,16	1,7	0,07	0,6	0,63	0,65
MB20	klassisches Medulloblastom	1,3	2,1	0,06	1	28,5	n.d.	2,2	0,1	2,3	2,12	1,5
MB21	klassisches Medulloblastom	4,3	3,1	106,4	82,6	24,6	0,3	0,5	0	4,43	n.g.	12,7
MB22	klassisches Medulloblastom	1,6	2,5	0,5	2,4	15,2	0,8	0,5	0	6,1	n.g.	3,9
MB23	klassisches Medulloblastom	1,6	6,3	0,5	2,3	26,9	0,08	1	0	8,7	n.g.	4,7
MB24	klassisches Medulloblastom	1,4	11,1	0,08	5,7	42,6	0,3	0,9	0	17	n.g.	7
MB25	klassisches Medulloblastom	0	0	0,04	1,9	6,9	0,35	0,18	0,3	3,4	2,8	0,61
MB15	klassisches Medulloblastom	3	1	0,01	0,02	0,25	0,3	0,16	1,4	n.g.	n.g.	n.g.
dpMB16	desmopl. Medulloblastom	3,75	1	2,89	2,9	3,25	0,49	0,07	0,02	2,6	1,5	6
dpMB19	desmopl. Medulloblastom	3,3	3,4	64,1	86,7	2,8	0,24	0,14	0,3	1,3	1,3	12
dpMB10	desmopl. Medulloblastom	2,5	0,57	0,03	0,03	0,11	0,2	0,46	0,3	1,9	1,8	0,5
dpMB13	desmopl. Medulloblastom	2,99	0,99	1,11	15,24	6,23	0,7	2,3	0,4	5,1	4,7	18,5
dpMB14	desmopl. Medulloblastom	4,5	0,9	5,21	4,72	8,4	0,59	0,56	0,6	2	1,68	16,5
dpMB20	desmopl. Medulloblastom	1,86	4,6	0	0	23,6	0,4	2,9	0	4,5	n.g.	8,5
dpMB21	desmopl. Medulloblastom	4,3	6,8	504,4	22,6	41,7	0,7	0,3	0	3,1	n.g.	9,7
dpMB22	desmopl. Medulloblastom	4,5	5,4	80,3	81,2	18,5	0,2	0,4	0	4,6	n.g.	9,3
dpMB11	desmopl. Medulloblastoma	3,6	1,5	2,44	7,86	4,52	0,4	1	0,26	n.g.	n.g.	n.g.
DAOY	Zellkultur	0,2	0,03	n.g.	n.g.	n.g.	0,23	0,2	0,05	n.g.	n.g.	n.g.
DAOY AT1	Zellkultur	0,67	0,09	n.g.	n.g.	n.g.	0,48	0,33	1,2	n.g.	n.g.	n.g.
DAOY AT2	Zellkultur	0,36	0,01	n.g.	n.g.	n.g.	0,57	0,62	1,98	n.g.	n.g.	n.g.
D283	Zellkultur	0,31	0,02	n.g.	n.g.	n.g.	0,03	0,05	0,006	n.g.	n.g.	n.g.
D283 AT1	Zellkultur	0,19	0,16	n.g.	n.g.	n.g.	0,05	0,13	0,49	n.g.	n.g.	n.g.
D283 AT2	Zellkultur	0	0	n.g.	n.g.	n.g.	0,3	0,22	0,66	n.g.	n.g.	n.g.
acb1	Kontrolle	1,3	0,7	2,4	1	1,5	0,09	0,6	0,3	1,75	1,2	1,7
acb2	Kontrolle	0,7	4	n.g.	n.g.	n.g.	0,1	0,8	0,1	n.g.	n.g.	n.g.
acb3	Kontrolle	0,6	0,4	n.g.	n.g.	n.g.	0,1	0,5	0,07	n.g.	n.g.	n.g.
fcB1	Kontrolle	1	0,6	5,3	6,2	1,4	2,2	1,7	1,6	4,2	1,15	1,9
fcB2	Kontrolle	0,8	0,002	n.g.	n.g.	n.g.	1,5	3,7	1,4	n.g.	n.g.	n.g.
fcB3	Kontrolle	2,2	0,4	n.g.	n.g.	n.g.	1,9	2,3	1	n.g.	n.g.	n.g.

n.g.: nicht gemessen

acb: adulte Kleinhirnkontrolle

fcB: fetale Kleinhirnkontrolle

7 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger, danke ich für die Ermöglichung der hier vorliegenden Arbeit, für das damit entgegengebrachte Vertrauen und die kompetente Betreuung.

Insbesondere möchte ich Frau Dipl.-Biologin Petra Zipper meinen herzlichen Dank aussprechen, die mir jederzeit mit unermüdlichem Einsatz und bewundernswerter Ausdauer für Fragen und Probleme jeglicher Art zur Hilfe stand. Ihr verdanke ich den reibungslosen Ablauf der Laborarbeiten. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht denken können.

Ferner möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern, insbesondere der AG Reifenberger (hier vor allem bei Frau Dr. rer. nat. Marietta Wolter, Frau Dr. rer. nat. Daniela Karra, Frau Dipl.-Biologin Franziska Liesenberg und Frau Dipl.-Humanbiologin Natalie Schmidt) bedanken, die mir bei jedem noch so kleinen oder auch großen Problem immer freundlich und fachlich kompetent weitergeholfen haben.

Ich werde sehr gern an die Zeit im Institut für Neuropathologie zurückdenken.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie. Meinen Eltern Ursula und Rainer Grünheck möchte ich insbesondere dafür danken, dass sie mir nach meiner Ausbildung zum biologisch-technischen Assistenten auch noch meinen Traum vom Studium der Medizin ermöglicht haben.

Meinem Bruder Thorsten Grünheck und meinen Großeltern Sophia und Kurt Weyerstarß dank ich dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.

Last but definitely not least möchte ich meinen für mich so wichtigen Freunden danken, die immer für mich da sind, hoffentlich auch immer sein werden, an mich glauben und mich so nehmen wie ich bin.

8 Tabellarischer Lebenslauf

Perönliche Daten

Name	Frank Grünheck
Geburtsdatum	15.05.1981
Geburtsort	Bonn
Eltern	Rainer Grünheck - Dipl. Ing. Maschinenbau Ursula Grünheck geb. Weyerstraß - Industriekauffrau
Bruder	Thorsten Grünheck – Dipl. Bankbetriebswirt

Schulbildung

1987 – 1991	Katholische Grundschule Mechernich
1991 – 2000	Gymnasium Am Turmhof Mechernich

Ausbildung

2000 – 2002	Rheinische Akademie e.V. Köln Ausbildung zum biologisch technischen Assistenten (BTA)
-------------	--

Zivildienst

2002 – 2003	Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln
-------------	---

Arbeitsstellen

07/03 – 12/04	Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln
01/05 – 08/05	Institut für Biochemie der Universität zu Köln

Medizinstudium

2005 – 2011 Studium der Humanmedizin an der HHU Düsseldorf

Abschluss des Medizinstudiums an der HHU Düsseldorf

Arbeitsstelle:

2012 - Assistenzarzt in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie
und Angiologie der Universitätsklinik Düsseldorf

Promotion

2008 - 2011 „Molekulare und funktionelle Untersuchungen zur Rolle
von Genen der „Bone Morphogenetic Protein“ (*BMP*)-
Familie in der Pathogenese des Medulloblastoms“

Doktorvater: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger;
Institut für Neuropathologie, HHU Düsseldorf

Publikationen

Wartenberg M, Budde P, De Mareés M, Grünheck F, Tsang SY, Huang Y, Chen ZY, Hescheler J, Sauer H. Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation cultures of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional chinese medicine. Lab Invest. 2003 Jan;83(1):87-98.

Wartenberg M, Wolf S, Budde P, Grünheck F, Acker H, Hescheler J, Wartenberg G, Sauer H. The antimalaria agent artemisinin exerts antiangiogenic effects in mouse embryonic stem cell-derived embryoid bodies. Lab Invest. 2003 Nov;83(11):1647-55.

Sauer H, Neukirchen W, Rahimi G, Grünheck F, Hescheler J, Wartenberg M. Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells. Exp Cell Res. 2004 Apr 1;294(2):313-24.

Wartenberg M, Hoffmann E, Schwindt H, Grünheck F, Petros J, Arnold JR, Hescheler J, Sauer H. Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. FEBS Lett. 2005 Aug 15;579(20):4541-4549.

9 Zusammenfassung (Abstract)

Das Medulloblastom, ein embryonaler Tumor des zentralen Nervensystems, ist der häufigste maligne Hirntumor des Kindes- und Jugendalters. Es ist durch sein rasches und invasives Wachstum extrem bösartig und nimmt als neoplastische Erkrankung des sich noch entwickelnden Gehirns eine Sonderstellung unter den soliden Tumoren ein. Die Entstehung eines Teils der Medulloblastome wird heute als eine fortbestehende Proliferation und/oder mangelnde Ausdifferenzierung und Wanderung externer Körnerzellvorläufer verstanden werden und „Bone Morphogenetic“ Proteine (BMPs) spielen eine nicht unbedeutende Rolle bei der neuronalen Differenzierung in der Embryonalentwicklung. Viele *in vitro* und *in vivo* Studien schreiben den BMPs eine fördernde Wirkung auf das Tumorstadium und die Metastasierung zu, hingegen sprechen andere Studien eher für wachstumshemmende Effekte. In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsniveau der im Kleinhirn exprimierten BMPs 2, 4 und 6 in humanen Medulloblastomen und in experimentellen Medulloblastomen des *Ptch1*^{+/-} Mausmodells untersucht. Die Maustumoren zeigten für alle drei untersuchten BMPs eine erniedrigte Expression gegenüber der Normalgewebekontrolle. In den humanen Medulloblastomen war die BMP-Expression in der Mehrzahl der Tumoren gegenüber unreifen Kleinhirngewebe erniedrigt, jedoch nur selten im Vergleich zu adultem Kleinhirngewebe. Um zu bestätigen, dass BMPs während der Neurogenese des Kleinhirns physiologisch exprimiert werden, wurde die BMP-Expression einiger Medulloblastome und gesunder fetaler und postpartaler Kleinhirne mit noch erhaltener Schicht externer Körnerzellvorläufer mittels Immunhistochemie bestimmt. Immunhistochemisch konnte bestätigt werden, dass Zellen der äußeren Körnerzellschicht (EGL) BMP2 und BMP4 exprimieren, humane Medulloblastome jedoch nur in Ausnahmefällen. Die gesteigerte Methylierung der dem Transkriptionsstartpunkt von murinem *Bmp2* und *Bmp4* sowie humanem *BMP4* vorgelagerter CG-reichen Regionen legt eine epigenetische Regulation der Expression dieser Gene in Medulloblastomen nahe. Die Behandlung von murinen und humanen Medulloblastomzelllinien mit rekombinanten BMPs ergab für die murine Zelllinie 3M282 eine signifikant reduzierte Klonogenität nach Gabe von BMP2 und BMP4. In der murinen Zelllinie 4M95 konnte durch rekombinantes BMP2 die Vitalität der Zellen signifikant reduziert werden. Die apoptotische Aktivität konnte durch rekombinantes BMP2 in den murinen Zelllinien 4M95 und 3M282 signifikant gesteigert werden. Die Proliferation der Zellen war von der BMP-Gabe unbeeinflusst. Zusammengefasst legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe, dass die fehlende Expression von BMP2, BMP4 und BMP6 in einer sensiblen Entwicklungsphase des Kleinhirns zu der Entstehung von Medulloblastomen beitragen könnte. Im Gegenschluss dazu könnte die Beeinflussung der Expression dieser BMPs in der Zukunft einen möglichen neuen Therapieansatz zur Behandlung des Medulloblastoms darstellen.