

# Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung im PTCH<sup>+/-</sup> Mausmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Petra Zipper**  
aus Oberkassel (Siegkreis)

Düsseldorf, April 2014

aus dem Institut für Neuropathologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Guido Reifenberger

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 12.06.2014

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Haag D\*, Zipper P\*, Westrich V, Karra D, Pfleger 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.* 8(3):e1002572, 2012. \* gemeinsame Erstautorschaft.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung .....	1
1.2	Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg .....	2
1.2.1	Relevanz des Shh-Signalweges für die Krebsentstehung .....	4
1.3	Photokarzinogenese .....	6
1.4	Die Rolle der induzierbaren NO-Synthase (Nos2) bei der Karzinogenese .....	8
1.5	Das Basalzellkarzinom .....	11
1.5.1	Ätiologie und Risikofaktoren .....	11
1.5.2	Histologie .....	12
1.5.3	Molekulare Pathogenese des Basalzellkarzinoms .....	12
1.5.4	Mausmodelle für das Basalzellkarzinom .....	14
1.6	Das Medulloblastom .....	15
1.6.1	Epidemiologie .....	15
1.6.2	Histologische Klassifikation und Histogenese der Medulloblastome .....	16
1.6.3	Molekulare Pathogenese des Medulloblastoms .....	17
1.7	Zielsetzung der Arbeit .....	19
2	Material und Methoden .....	20
2.1	Material .....	20
2.1.1	Mäusestämme .....	20
2.1.2	Normalgewebekontrollen .....	20
2.1.3	Antikörper .....	20
2.1.4	Tumorproben .....	20
2.1.5	Zelllinien .....	22
2.1.6	Chemikalien und Reagenzien .....	22
2.1.7	Oligonukleotide .....	24
2.2	Methoden .....	27
2.2.1	Tierexperimente .....	27
2.2.1.1	Haltungsbedingungen .....	27
2.2.1.2	Kreuzungsschema zur Generierung von <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen .....	27
2.2.1.3	UVB-Bestrahlungsexperimente .....	28
2.2.1.3.1	Lichttreppe zur Bestimmung der minimalen Erythemdosis .....	28
2.2.1.3.2	Applikation einer UVB – Einzeldosis .....	28
2.2.1.3.3	Schema der chronischen UVB-Bestrahlung und Biopsieentnahme .....	29
2.2.2	Präparation von Kleinhirnen neurologisch auffälliger Mäuse .....	30
2.2.3	Molekulargenetische Untersuchungsmethoden .....	31
2.2.3.1	Methoden der Nukleinsäureaufreinigung .....	31
2.2.3.1.1	CsCl-Gradientenzentrifugation .....	31
2.2.3.1.2	RNA-Extraktion aus Haut und Tumorgewebe mittels Trizol .....	33
2.2.3.1.3	DNA-Extraktion zur Mausschwanz-Genotypisierung .....	33
2.2.3.1.4	DNA-Isolierung aus mikrodissezierten Paraffingewebeschnitten .....	33
2.2.3.1.5	Aufreinigung von PCR-Produkten zur Sequenzierung .....	34
2.2.3.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	34
2.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	34
2.2.3.4	Polyacrylamid(PAA)-Gelelektrophorese .....	35
2.2.3.5	Amplifikation von DNA-Fragmenten (Polmerase-Ketten-Reaktion) .....	35
2.2.3.5.1	PCR zur Genotypisierung von Mausschwanz-DNA .....	36
2.2.3.5.2	Genomische Duplex-PCR .....	36

2.2.3.5.3	Real-time Reverse Transkription (RT)-PCR .....	37
2.2.3.5.4	Analyse von hemizygoten Verlusten genomischen Materials .....	38
2.2.3.6	Sequenzierung.....	39
2.2.3.7	cDNA-Synthese .....	39
2.2.3.8	Bisulfitsequenzierung der <i>Ptch1</i> -CpG Insel .....	40
2.2.3.9	Einzelstrang-Konformation-Polymorphismus (SSCP) - Analyse .....	40
2.2.3.10	Globale Expressionsanalyse muriner Tumor- und Normalgewebsproben .....	41
2.2.4	Zellkulturexperimente.....	42
2.2.4.1	Anlage von Zellkulturen aus murinen Medulloblastomen .....	42
2.2.4.2	Kultivierung und Pflege muriner Medulloblastomzelllinien.....	43
2.2.4.3	Nos2 Inhibierung und funktionelle Analysen nach „Knockdown“ von <i>Gap43</i> .....	43
2.2.5	Immunhistologische Methoden .....	44
2.2.5.1	Immunhistochemische Untersuchungen.....	44
2.2.5.2	Immunfluoreszenz-Doppelfärbung.....	45
3	Ergebnisse .....	46
3.1	Inzidenz UVB-induzierter basaloider Zellproliferationen und BCC-artiger Hauttumoren.....	46
3.2	Histologie UVB-induzierter Hauttumoren in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Mäusen .....	51
3.3	Molekulargenetische Analysen an UVB induzierten epithelialen Hauttumoren in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Mäusen .....	54
3.3.1	Expressionsanalyse von Shh- Zielgenen in muriner Haut nach akuter UVB- Bestrahlung .....	54
3.3.2	Expressionsanalyse von Shh-Zielgenen in chronisch UVB-exponierter Haut und UVB-induzierten epithelialen Tumoren .....	56
3.3.3	Genetische und epigenetische Veränderungen des <i>Ptch1</i> Gens .....	59
3.3.3.1	Deletionsanalyse des Wildtyp- <i>Ptch1</i> -Allels .....	59
3.3.3.2	Methylierungsanalyse der proximalen CpG-Insel vor dem <i>Ptch1</i> Gen.....	60
3.3.3.3	Mutationsanalyse des <i>Ptch1</i> Tumorsuppressorgens .....	63
3.3.3.4	Veränderungen der <i>Tp53</i> und <i>Cdkn2A</i> Tumorsuppressorgene.....	65
3.3.4	Globale Expressionsanalyse epithelialer Hauttumoren in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Mäusen.....	66
3.4	Quantifizierung CD3-positiver T-Zellen in epithelialen Hauttumoren vom <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Genotyp .....	70
3.5	Inzidenz spontaner Medulloblastome in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Mäusen .....	71
3.6	Histologische Analyse muriner <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Medulloblastome.....	73
3.7	Expressionsanalyse von murinen <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup> und <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> Medulloblastomen.....	74
3.8	Molekulargenetische Veränderungen in murinen <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Medulloblastomen .....	76
3.9	Globale Expressionsprofile von murinen <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Medulloblastomen.....	78
3.10	Konsequenzen von Nos Inhibition und <i>Gap43</i> „Knockdown“ <i>in vitro</i> .....	81
3.11	Quantifizierung proliferierender GCPs an P9-Kleinhirnen unterschiedlichen Genotyps.....	83
4	Diskussion .....	86
4.1	Einfluß der UVB-Exposition auf die Basalzellkarzinogenese im <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Mausmodell.....	87
4.2	Molekulargenetische Veränderungen der murinen <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Hauttumoren .....	89
4.3	Einfluss der <i>Nos2</i> Defizienz auf die Basalzellkarzinogenese im <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Mausmodell.....	91
4.4	Molekulargenetische Veränderungen der murinen <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Medulloblastome .....	94

4.5	Erhöhte Medulloblastom Inzidenz im <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> -Mausmodell.....	96
5	Zusammenfassung.....	102
6	Summary.....	104
7	Literaturverzeichnis.....	106
8	Anhang.....	129
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	129
8.2	Tabellen.....	132
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	154
8.4	Tabellenverzeichnis.....	155
8.5	Danksagung.....	156

# 1 Einleitung

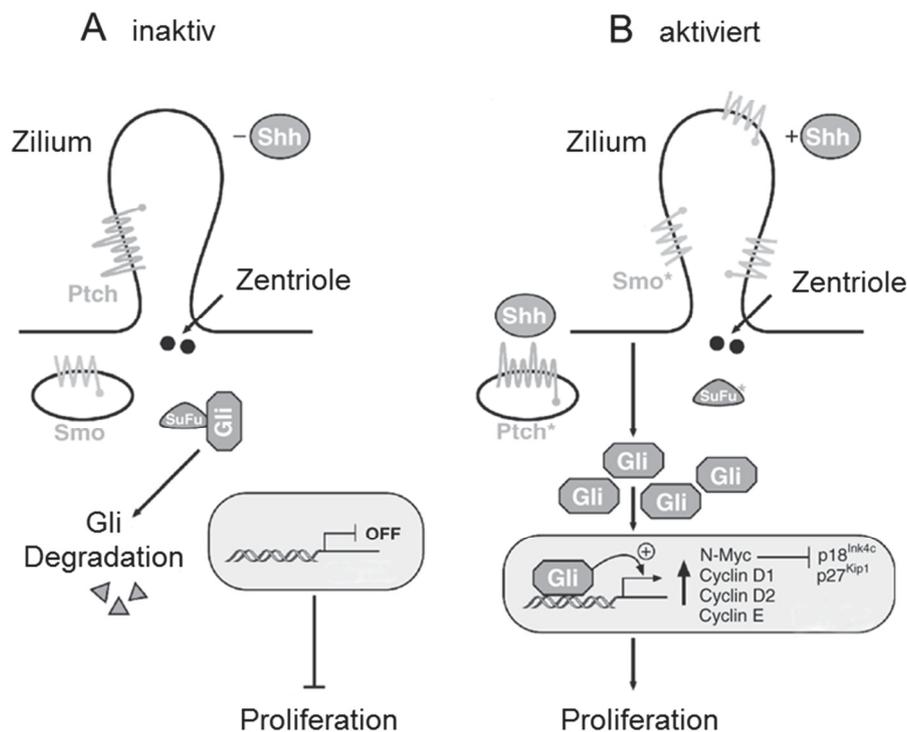
## 1.1 Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung

Krebs ist eine Erkrankung von Zellen, deren Funktion und Wachstum außer Kontrolle geraten ist. Diese Zellen haben ihre ursprüngliche Bestimmung verloren, proliferieren unkontrolliert, wandern in umgebendes Gewebe ein und zerstören es. Der Tumor erscheint als Resultat einer Deregulierung verschiedenster Signalwege, die u.a. an der Regulation von Zellzykluskontrolle, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind. Signalwege sind Kaskaden biochemischer Reaktionen, die letztendlich zur Aktivierung oder Inaktivierung zellulärer Prozesse führen, meistens indem sie die Transkription bestimmter Gene initiieren oder terminieren. Eine permanente Störung in einem Signalweg kann aus der Schädigung eines Gens, das für ein Protein in einem Signalweg kodiert, resultieren. Führt der Schaden zu einer Veränderung des genetischen Codes, z.B. einer Punktmutation oder dem kompletten Verlust eines Gens, kann das veränderte Protein oder seine komplette Abwesenheit die Signalübertragung in einem oder mehreren Signalwegen einer Zelle unterbrechen. Diese genetische Veränderung wird an die Tochterzellen weitergegeben und der entsprechende Defekt so propagiert. Es gibt zwei Arten von Genen, bei denen die oben beschriebenen Veränderungen in direktem Zusammenhang mit der Krebsentstehung zu sehen sind: Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene. Erstere kodieren für Proteine, die durch einen dominanten Funktionsgewinn zur Initiierung der Tumorgenese führen, während die Genprodukte von Tumorsuppressorgenen durch rezessiven Funktionsverlust das Tumorwachstum ermöglichen. Auf Grund von Redundanz und Adaptation ist die Mutation in einem einzelnen Proto-Onkogen oder Tumorsuppressorgen meistens nicht ausreichend, um das Vollbild eines malignen Tumors zu verursachen. Es ist vielmehr so, dass die Kombination aus Aktivierung eines oder mehrerer onkogener und Inaktivierung eines oder mehrerer tumorsupprimierender Signalwege benötigt werden, um die Entstehung und nachfolgende maligne Progression einer Krebserkrankung zu bewirken.

## 1.2 Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg

Der Hedgehog-Signalweg wurde bei einem großangelegten Mutationsscreening in der Fruchtfliege *Drosophila* entdeckt. Ziel dabei war es, Gene zu finden, die für die Ausbildung der Segmentanzahl und Polarität in *Drosophila* bedeutsam sind (Musterbildung des frühen Embryos) (Nusslein-Volhard & Wieschaus 1980). Die Charakterisierung der Hedgehog-Mutante, die ihren Namen auf Grund von stachelförmigen epidermalen Auswüchsen in Larvalsegmenten erhielt, führte zur Klonierung des Hedgehog (Hh) Gens. Der posttranslational modifizierte Hh-Ligand besitzt die Fähigkeit, mit dem Transmembranrezeptorprotein Patched (Ptc), das mit 12 Transmembrandomänen in die Plasmamembran integriert ist, zu interagieren. In Abwesenheit von Hh inhibiert Ptc die Funktion von Smoothed (Smo), einem aus 7 Transmembrandomänen bestehenden G-Protein-gekoppelte Rezeptorproteins, welches ein Homolog der Frizzled-Proteinfamilie des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges ist. Bindet jedoch der Hh-Ligand an den Ptc-Smo-Rezeptorkomplex wird Smo über eine Phosphorylierung aktiviert (Ogden et al. 2004; Ruel et al. 2003) und übermittelt dem Mikrotubuli-assoziierten Komplex („Hedgehog signaling complex“, Hsc) aus Costal-2, der Serin/Threonin-Kinase Fused (Fu), dem Suppressor of Fused (SuFu) und dem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Cubitus interruptus (Ci) ein mitogenes Signal. Ci ist in *Drosophila* das zentrale Effektormolekül des Hh-Signalweges und initiiert die Transkription von Zielgenen wie Wingless, Decapentaplegic und Ptc selbst. In Säugern gibt es drei Mitglieder der „hedgehog“ Genfamilie, die alle drei für sekretierte Proteine kodieren: Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh) und Indian hedgehog (Ihh) (Ingham & McMahon, 2001). Das in Bezug auf die Expression am weitesten verbreitete der drei Morphogene ist Shh, welches als einziges im zentralen Nervensystem exprimiert wird und maßgeblich an der Entwicklung des Gehirns, des Rückenmarks, des Axialskeletts und der Extremitäten beteiligt ist. Auch bei der Entwicklung des Gastrointestinaltrakts und der Haarfollikelmorphogenese trägt Shh in nicht unerheblichem Maße zu einer kontrollierten Musterbildung dieser Organe bei. Nach abgeschlossener Embryonalentwicklung wird der Hh-Signalweg in den reifen Organen normalerweise herunterreguliert und es bleiben nur wenige Hh-sensible Zellen übrig. Dennoch behält das adulte Gewebe die Fähigkeit, auf Hh-Signale zu antworten und verletztes oder seneszenztes Gewebe zu regenerieren. Weiterhin existieren in Vertebraten mehrere Isoformen eines verwandten Patched-2-Moleküls (Ptch2), die jedoch

nicht in der Lage sind die aktivierte Form von Smo (Smo-M2) zu inhibieren (Rahnama et al. 2004) und ein Hh interacting protein (Hip), das alle drei Hh-Proteine über eine extrazelluläre Domäne bindet und inaktiviert (Chuang & McMahon 1999). Hip ist ebenso wie Ptch1 selbst ein negativer Regulator des Hh-Signalweges. Costal-2 wurde bislang nur im Hh Signalweg von *Drosophila* identifiziert. Für den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Ci existieren dagegen in Vertebraten die drei Homologe Gli1, Gli2 und Gli3. Im Ruhezustand befindet sich Ptch1 in den Zilien, während Smo im Zytoplasma lokalisiert ist (Abbildung 1).



**Abbildung 1. Schematische Darstellung des Shh-Signalweges in primären Zilien.**

(A) In Abwesenheit von Shh ist Ptch an der Basis der Zilienmembran integriert, während Smo im Zytoplasma lokalisiert ist. Der Signalweg ist abgeschaltet. (B) In Anwesenheit von Shh wird Smo in die Zilienmembran transloziert, Ptch im Zytoplasma degradiert und die Transkription der Gli-Transkriptionsfaktoren und ihrer nachgeschalteten Zielgene gesteigert (aus Roussel & Hatten 2011). \*, in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen identifizierte Mutationen.

Nach Aktivierung des Hh Signalweges durch Bindung eines Hh Liganden wird Smo aus dem Zytoplasma in das Zilium integriert und Ptch1 im Zytoplasma degradiert (Wen et al. 2010). Aktiviertes Smo induziert Gli1 und Gli2, die transkriptionell hauptsächlich als Aktivatoren fungieren, und inhibiert den transkriptionellen Repressor Gli3 (Wechsler-Reya & Scott 2001). Die Gli Proteine werden aus ihrer Assoziation mit dem Zytoskelett freigesetzt,

zytoplasmatisch modifiziert und in den Kern transloziert, wo sie die Transkription von Zielgenen aktivieren.

Der Hh-Signalweg ist mit zahlreichen Signalwegen eng verknüpft, unter anderem den Wnt/ $\beta$ -Catenin, TGF- $\beta$ /BMP, Notch und FGF Signalwegen. Es gibt viele Beispiele für Interaktionen dieser Signalwege im Rahmen zentraler Prozesse der Embryonalentwicklung und bei der Gewebehomeostase im Erwachsenenalter. Eine positive wechselseitige Beeinflussung zwischen dem Hh- und dem Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg findet man während der Entwicklung von Haarfollikeln in der embryonalen Haut, wo ektodermale Wnt-Signale die Bildung früher Haarknospen vermitteln und die Shh-Expression in der Haarplakode induzieren (Andl et al. 2002; Suzuki et al. 2009). Wie Smo besitzen auch die Wnt-Rezeptoren der Frizzled-Proteinfamilie Ähnlichkeit mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bei denen die Bindung eines Liganden die Phosphorylierungs-abhängige Proteolyse von nachgeschalteten Effektoren ( $\beta$ -Catenin oder Gli) inhibiert und dadurch die Transkription von Zielgenen aktiviert (Kalderon 2002). Die in beiden Signalwegen an den Phosphorylierungsreaktionen beteiligte Proteinkinase Gsk3 $\beta$  reguliert Sufu-abhängig die Prozessierung von Gli3 in ihre Repressorform (Kise et al. 2009). Sufu wiederum steuert den Export von  $\beta$ -Catenin aus dem Kern und unterdrückt dadurch die Tcf/Lef-vermittelte Transkription des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges (Meng et al. 2001; Tayler et al. 2004). Die Interaktion des Hh-Signalweges mit dem TGF- $\beta$ /BMP- und dem FGF-Signalweg spielt besonders bei der Kleinhirnentwicklung und dabei insbesondere der Differenzierung der Körnerzellvorläufer eine bedeutende Rolle (Zhu et al. 1999). Bmp2 antagonisiert die Shh-vermittelte Proliferation der Körnerzellvorläufer, indem es den Repressor Tiegl aktiviert, der wiederum das Hh Zielgen N-Myc inhibiert (Alvarez-Rodriguez 2007). Einen entsprechenden Effekt zeigt auch Fgf2, das einer Gli-Induktion und damit einer erhöhten Shh-Zielgenexpression entgegenwirkt (Fogarty et al. 2007).

### **1.2.1 Relevanz des Shh-Signalweges für die Krebsentstehung**

Der Hh-Signalweg reguliert eine Vielzahl biologischer Prozesse (z.B. Proliferation, Differenzierung und Musterbildung) während der Embryonalentwicklung von Metazoen. Im Erwachsenenalter ist dieser Signalweg u.a. bei der Erhaltung von Stammzellen sowie der Reparatur und Regeneration von Geweben involviert. Andererseits ist ein aktivierter Hh-Signalweg an der Ausbildung verschiedenster Krebsarten des Menschen beteiligt, bei denen

er auf unterschiedliche Art und Weise und in variierendem Ausmaß transformierten Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft und deren Überlebensfähigkeit unterstützt. Besonders eng verknüpft ist der Hh-Signalweg mit der Ätiologie von Basalzellkarzinomen (BCC) (Bale & Yu 2001; Lupi 2007) und der Shh-Gruppe von Medulloblastomen (Kool et al. 2012; Northcott et al. 2011; Taylor et al. 2012), auf die in den Kapiteln 1.5.3. und 1.6.3. ausführlich eingegangen wird. Es gibt aber zunehmend Hinweise dafür, dass auch andere Tumoren, z.B. Pankreas-, Prostata- und Mammakarzinome, von einem aktivierten Hh-Signalweg abhängig sind. Intraepitheliale Neoplasien und duktales Adenokarzinome des Pankreas sowie Prostatakarzinome zeigen eine im Vergleich zu ihrem nicht-neoplastischen Ursprungsgewebe deutlich erhöhte Expression von Shh und Ihh (Berman et al. 2003; Thayer et al. 2003). In Prostatakarzinomen wurde zusätzlich eine erhöhte Expression von Gli1, Ptch1 und Hip1 gefunden (Karhadkar et al. 2004; Sheng et al. 2004). Die Bedeutung des Hh-Signalweges für die Entstehung des Mammakarzinoms ist umstritten, da sie von einigen Studien befürwortet, von anderen hingegen widerlegt wird (Reifenberger et al. 2001; Vorechovsky et al. 1999; Xie et al. 2003). Es besteht Konsens darin, dass bei Mammakarzinomen, die eine veränderte Expression von Komponenten des Hh-Signalweges zeigen, am häufigsten die Expression von Ptch1 erniedrigt und die von Smo erhöht ist (Kubo et al. 2004; Moraes et al. 2007). Eine ursächliche onkogene Mutation in Genen des Hh-Signalweges konnte beim Mammakarzinom bis heute aber nicht detektiert werden. Teglund und Toftgard diskutieren drei unterschiedliche Signaltransduktionsmodelle, die erklären wie der Hh Signalweg an der Krebsentstehung beteiligt sein könnte (Teglund & Toftgard 2010). Bei Typ I, der Liganden-unabhängigen Signalweiterleitung wird der Signalweg intrinsisch durch „loss-of-function“ Mutationen in Negativ-Regulatoren wie beispielsweise Ptch1 und Sufu oder durch „gain-of-function“ Mutationen in aktivierenden Komponenten wie z. B. Smo aktiviert. Das Liganden-abhängige, autokrine Typ II-Signaltransduktionsmodell geht von einer Zell-autonomen Hh-Signalwegaktivierung aus, wobei die Tumorzellen selbst den Hh-Liganden produzieren. Beim parakrinen Typ III Modell produzieren die Tumorzellen den Hh-Liganden, der den Hh-Signalweg in den benachbarten Stromazellen aktiviert. Daraufhin produzieren die Stromazellen einen Faktor X, der durch einen parakrinen Feedback-Mechanismus die Tumorzellen anregt, weiterhin Hh-Liganden zu produzieren und somit die Tumorprogression zu fördern. In einem reversen parakrinen Modell tauschen Tumor- und Stromazellen ihre Rollen.

### 1.3 Photokarzinogenese

Das Risiko an einem Basalzellkarzinom der Haut ("Basal Cell Carcinoma" = BCC) zu erkranken hängt von genetischen Faktoren, dem individuellen Hauttyp und der Exposition gegenüber exogenen Noxen ab. Der wichtigste exogene Faktor ist die UV-Strahlung. Sie schädigt die DNA, indem sie genomische Veränderungen hervorruft, die von Punktmutationen über einzelsträngige DNA-Brüche bis hin zu Verlusten oder Translokationen ganzer Chromosomen bzw. Chromosomenarmen reichen. Im Gegensatz zu ionisierender Strahlung führt UV-Strahlung hauptsächlich zur Anregung von Valenzelektronen in Molekülen mit konjugierten Doppelbindungssystemen, die dadurch in der Lage sind, mit anderen Molekülen, z.B. durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu reagieren. Die hochenergetische kurzwellige UVB-Strahlung mit einer Wellenlänge von 280-315 nm wirkt dabei stärker genotoxisch als die langwelligere UVA-Strahlung. Sie stellt eine direkte Bedrohung für die Stabilität organischer Moleküle wie der DNA, die in allen ihren Basen aromatische Ringe trägt, dar. Die direkte Absorption eines UVB-Photons führt bevorzugt an zwei aufeinander folgenden Pyrimidin-Basen zu Cyclobutanpyrimidin-Dimeren und Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukten, die bei ausbleibender Reparatur in UV-typischen C → T bzw. CC → TT- Transitionsmutationen resultieren (Perdiz et al. 2000; Ravanat et al. 2001). In Folge können die gebildeten Pyrimidin-Dimere andere genetische Veränderungen, wie beispielsweise einen Allelverlust durch eine gestörte DNA-Replikation, verursachen. Ein über p53 Akkumulation und p21<sup>WAF1</sup> Induktion ausgelöster kurzzeitiger Zellzyklusarrest gewährt den Zellen Zeit, entweder die geschädigte DNA zu reparieren, bevor sie fortfahren, fehlerhafte DNA zu replizieren, oder die Zellen mit irreparablen DNA-Schädigungen zu eliminieren. Auch p16<sup>INK4A</sup> akkumuliert in Folge von UVB-Strahlung und bewirkt einen Wachstumsstopp (Ahmed et al. 1999; Chazal et al. 2002; Pavey et al. 1999). Längerwellige UVA-Strahlung führt der Zelle indirekt Schaden zu, indem sogenannte endogene Photosensitizer (z.B. Porphyrine) die UV-Strahlung absorbieren und in Folgereaktionen Radikale bilden. Die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies, radikalische Zwischenstufen des Photosensitizers oder auch Photoadditionsprodukte mit essentiellen Zellbestandteilen rufen in den Zellen irreparable Schäden (DNA-Strangbrüche, oxidative Veränderungen von DNA-Basen, Aminosäuren, Proteinen, Fettsäuren u.a.) hervor, die letztendlich zur Hemmung des Zellwachstums oder zum Zelltod führen (de Gruijl 2002).

UV-Strahlung kann neben genetischen Veränderungen auch über veränderte Expressionsprofile Einfluss auf die Entstehung von Krebs nehmen. Sie wirkt dann im klassischen Sinne als Tumorpromotor und ähnelt dem Effekt von Phorbolestern und Mitogenen. Einige der Gene, die am schnellsten durch kurzweilige UV-Strahlung induziert werden, sind gleichermaßen Mitogen-regulierte Gene wie *FOS* und *JUN*. Das *c-JUN* Protoonkogen ist tatsächlich eins der am stärksten UV-responsiven Gene, die bisher identifiziert wurden (Holbrook et al. 1991; Herrlich et al. 1992). Die *c-JUN* Expression ist essentiell für die UV-bestrahlten Zellen, um dem durch p53-Akkumulation ausgelösten Wachstumsstopp zu entkommen und wieder in den Zellzyklus einzutreten (Kovary & Bravo 1991; Schreiber et al. 1999). Ebenso scheint die UV-bedingte transkriptionelle Aktivierung von *c-JUN* zu einer Repression der *Ptch1*-Expression in humanen epidermalen Keratinozyten und humaner Haut *in vitro* zu führen. Dies führt ebenso wie die p21<sup>WAF1</sup> Induktion zu einem kurzzeitigen Wachstumsstopp (Brellier et al. 2005). Zwei weitere Signalwege, die nach UVB-Bestrahlung in humanen Keratinozytenkulturen die Keratinozytenproliferation supprimieren und ihre Differenzierung stimulieren, sind der funktionell aktivierte Bmp/Smad-Signalweg und die inhibierte Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaltransduktionskaskade (Ehrhardt et al. 2003). *In vivo* wurde bislang kein Nachweis über eine UVB-bedingte Modulation des Shh-Signalweges sowie des Bmp/Smad- und des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges erbracht. Ein weiterer Mechanismus, über den UVB-Strahlung einen die Tumorentwicklung fördernden Effekt ausübt, ist ihre Fähigkeit, die Prostaglandinsynthese zu induzieren. Reguliert wird dieser Prozess über die Prostaglandin H-Synthase, auch bekannt als Cyclooxygenase. Neben der konstitutiv exprimierten *COX1* ist die *COX2* ein durch Stimulantien, wie Tumorpromotoren,  $\text{IL-1}\beta$ , Endotoxine u.a., schnell mit verstärkter Expression reagierendes Gen. Die gesteigerte Produktion an freier Arachnidonsäure und von Prostaglandinen könnte auf Grund deren Funktion als Oxidantien die Bildung freier Radikale fördern und zur Entstehung von reaktiven Oxygenspezies (ROS) beitragen. Einen akuten Anstieg der Cox2 Proteinmenge konnten Buckman und Mitarbeiter (1998) in Plattenepithelkarzinomen (SCC) ebenso wie in UVB-bestrahlten humanen Keratinozyten beobachten (Buckman et al. 1998).

## 1.4 Die Rolle der induzierbaren NO-Synthase (Nos2) bei der Karzinogenese

Stickstoffmonoxid (NO) wird in Zellen durch Desaminierung der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin freigesetzt. Diese Reaktion katalysieren die Mitglieder der NO-Synthase (Nos)-Proteinfamilie, die aus 3 Isoformen, der neuronalen Nos (nNos, Nos1) Typ I, der endothelialen Nos (eNos, Nos3) Typ III und der induzierbaren Nos (iNos, Nos2) Typ II besteht (Nathan 1992). Die beiden erstgenannten Enzyme werden konstitutiv exprimiert, hauptsächlich posttranslational reguliert und spielen eine Rolle bei der Neuro- und Angiogenese (Moncada et al. 1997; Nathan & Xie 1994). Die Calcium-unabhängig induzierbare Nos2 kann NO in nanomolaren Mengen synthetisieren und ist primär verantwortlich für die erhöhte NO-Produktion während inflammatorischer und anderer pathologischer Prozesse (Hussain et al. 2004).

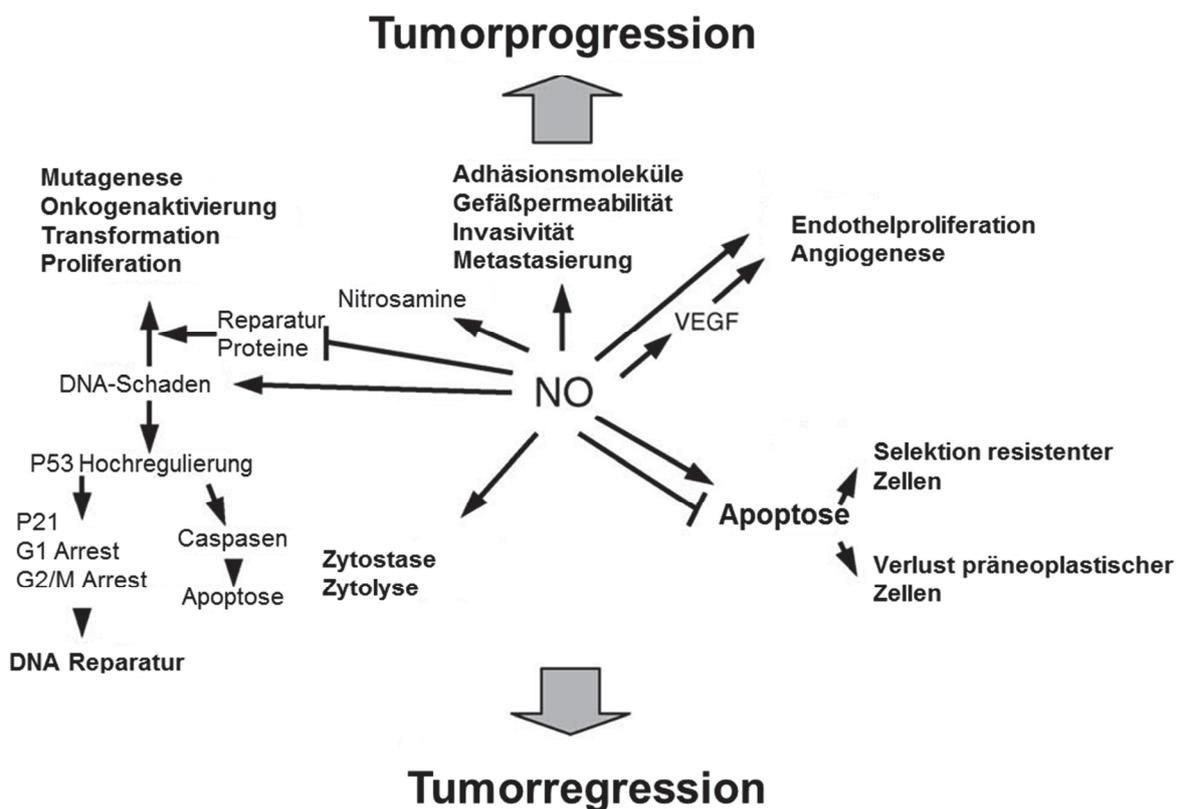
Das von der Nos2 synthetisierte NO spielt bei zahlreichen physiologischen Prozessen (z. B. Blutdruckregulation, Wundheilung, Abwehrmechanismen) sowie pathologischen Prozessen (z. B. Entzündung, Infektion, Stoffwechselerkrankungen) eine bedeutende Rolle. Nos2 ist aber auch diejenige NO-Synthase-Isoform, die am häufigsten mit malignen Erkrankungen assoziiert ist; einerseits mit tumorigenen Eigenschaften, andererseits mit potentiell zytotoxischem Effekt auf die Tumorzellen. Tumorigen wirken NO und/oder reaktive Stickstoffverbindungen, indem sie Sulfhydrylgruppen oxidieren, mit Aminen und Membranlipiden reagieren und dabei Nitrosamine bilden, die hochgradig kanzerogen wirken (Radi et al. 1991; Selkirk et al. 1980). Die Nitrosierung von Nukleinsäurebasen durch die entstandenen Nitrosamine führt zur Desaminierung der betroffenen Basen, Cytosin konvergiert zu Uracil, Guanin zu Xanthin, Methylcytosin zu Thymin und Adenin zu Hypoxanthin (Merchant et al. 1996). Reaktive Stickstoffspezies verursachen DNA-Brüche, insbesondere Einzelstrangbrüche, was dazu führt, dass die Schäden an der DNA vorzugsweise während der Replikation und Transkription auftreten (Moochhala & Rajnakova 1999). Diese DNA-Schäden, ebenso wie UV-/ionisierende Strahlung, genotoxische Substanzen und Hypoxie aktivieren das Tumorsuppressorprotein p53, der seinerseits die p21-Expression anschaltet, die zu einem Zellzyklus-Arrest beim Übergang von der G<sub>1</sub> in die S-Phase führt (Prives & Hall 1999). Sind die DNA-Reparaturenzyme während dieser Zellteilungspause nicht in der Lage, die Schäden an der DNA zu reparieren, wird in der betroffenen Zelle die Apoptose eingeleitet und zusätzlich die Expression positiver Zellzyklusregulatoren (c-Myc)

und anti-apoptotischer Proteine (Bcl2) durch p53 supprimiert. Zellen mit mutiertem *TP53*-Tumorsuppressorgen, was auf 50 % aller malignen Tumore zutrifft (Cadwell & Zambetti 2001), zeigen hingegen ein beschleunigtes Zellwachstum und die Anhäufung weiterer DNA-Schäden. *TP53*-Mutationen werden durch NO vermittelte DNA-Schäden begünstigt. Gleichmaßen reprimiert Wildtyp-p53 die induzierbare NO-Synthase, um die Zelle vor pathologischen NO-Konzentrationen zu schützen. Es gibt auch Evidenzen für einen Zusammenhang zwischen NO, seinen Derivaten und *TP53*-Mutationen. Interessanterweise korreliert die Nos2-Aktivität in Kolontumoren, ebenso wie in Magen-, Hirn- und Brusttumoren, positiv mit der G:C → A:T Transitionsrate in *TP53*, während die globale Mutationsrate bei erhöhter Nos2-Aktivität eher abnimmt (Ellie et al. 1995; Thomsen et al. 1995). Neben dem direkten mutagenen Einfluss auf die DNA degradieren reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies (rNOS) Zinkfingerdomänen in entsprechenden Proteinen, wodurch unter anderem DNA-Reparaturenzyme, Transkriptionsfaktoren und die poly(ADP-Ribose) Polymerase, ein wichtiger Mediator zwischen DNA-Reparatur und Apoptose, zerstört werden (Laval & Wink 1994; Sidorkina et al. 2004; Wink & Laval 1994).

Neben seinen mutagenen Effekten verstärkt NO indirekt die Permeabilität der Gefäße (Folkman 1990) und stimuliert die Angiogenese, indem es die Expression von VEGF induziert (Chin et al. 1997; Frank et al. 1999) und die von Angiostatin und Thrombospondin 1 supprimiert (Andrade et al. 1992; Vamvakas & Schmidt 1997). In niedrigen Konzentrationen kann endogenes oder exogenes NO auch als intrazellulärer „second messenger“ fungieren, um z.B. die Expression von Il-8, einem indirekten Angiogenesefaktor, zu induzieren (Andrew et al. 1995; Xiong et al. 2001). NO interferiert zudem mit Matrixmetalloproteinasen, Enzymen, die an der Degradation der Basalmembran von Blutgefäßen beteiligt sind (Ray & Stetler-Stevenson 1994).

Neben den zuvor beschriebenen tumorigenen Eigenschaften kann NO auch anti-tumorale Effekte entfalten (Abbildung 2). So inhibiert NO aus Makrophagen die Zellatmung von Zielzellen (Stuehr und Nathan 1989) und NO aus Kupffer-Zellen, natürlichen Killerzellen und Endothelzellen hat zytostatische und/oder zytotoxische Effekte auf Tumorzellen (Fukumura et al. 1996; Jiang et al. 1992; Li et al. 1991; Xiao et al. 1995). In physiologischen Konzentrationen inhibiert NO die Apoptose, indem es die Transkription von anti-apoptotischen Genen reguliert und posttranslational die pro-apoptotischen wirkenden Caspasen hemmt (Choi et al. 2008). In hohen pathophysiologischen Konzentrationen dagegen

bewirkt NO über verschiedene Signaltransduktionswege eine Aktivierung des Apoptoseprogramms. Die Apoptose wird über die Freisetzung von Cytochrom C und einer daraus resultierenden Aktivierung der Caspasen (Chung et al. 2001) sowie über die sogenannten stress-aktivierten Kinasen p38 und c-Jun N-terminale Kinase vermittelt (Jun et al. 1999).



**Abbildung 2. Duale Effekte von NO in der Karzinogenese.**

Zusammenfassende Übersicht vielseitiger möglicher Effekte von NO in der Tumorbiologie. In der Hauptsache nimmt NO Einfluss auf die Gefäßpermeabilität, die Apoptose, Zellteilungs- und Zellreparaturprozesse. Alle diese Prozesse sind abhängig von der NO-Konzentration im Tumor, des Zelltyps, des genetischen Hintergrundes und der Interaktion mit anderen freien Radikalen (aus Lechner et al. 2005).

In humanen Keratinozyten induziert UVB-Strahlung die Produktion von NO (Chang et al. 2003; Sasaki et al. 2000), welches *in vivo* als Mediator der Entzündungsreaktion in UVB-exponierter Haut agiert (Lee et al. 2000). In Zusammenhang mit der Kleinhirnentwicklung beobachteten Sato und Mitarbeiter, dass Nos2 initial in den frühen Körnerzellvorläufern exprimiert wird, während Nos1 vor dem postnatalen Tag 7 kaum nachweisbar ist (Sato et al. 2008). Die Nos1 Expression steigt hingegen während der Körnerzelldifferentenzierung sukzessive an und macht während der Entwicklung der inneren Körnerzellschicht den

Hauptanteil an der NO-Signalgebung aus (Jesko et al. 2003). Im Erwachsenenalter bremst NO die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen während der Neurogenese (Packer et al. 2003). Ciani und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ein NO-Entzug die Proliferation von Körnerzellvorläufern verstärkt (Ciani et al. 2006).

Die erste *Nos2* Knockout-Maus wurde 1995 generiert, um die Bedeutung der *Nos2* bei inflammatorischen Erkrankungen einschließlich des septischen Schocks zu verstehen (Laubach et al. 1995). Mutante Mäuse zeigten eine signifikant stärkere zelluläre Immunantwort vom TH1-Typ und höhere Level an T-Zellproliferation nach *Leishmania major* Infektion (Wei et al. 1995). Die Tiere wiesen eine reduzierte unspezifische Immunantwort gegenüber Carragen auf und waren resistent gegenüber Lipopolysaccharid-induzierter Mortalität. Seitdem wurde die Rolle der *Nos2* in Zusammenhang mit zahlreichen anderen Pathologien, darunter u.a. einer durch Sepsis bedingten Hypotension, Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts und der Tumorentstehung untersucht (vgl. Mashimo & Goyal 1999).

## 1.5 Das Basalzellkarzinom

### 1.5.1 Ätiologie und Risikofaktoren

Basalzellkarzinome (BCC) machen mit einer Inzidenz von 85 Patienten auf 100000 Einwohner pro Jahr (Stand: 2006) und einer jährlichen Zunahme von 3-8 % den häufigsten Tumor des Menschen in vielen Ländern weltweit aus (Lomas et al. 2012). Es wird geschätzt, dass das Lebenszeitrisiko an einem BCC zu erkranken, für ein 1994 geborenes Kind zwischen 28 und 33 % liegt (Miller & Weinstock 1994). Zunehmend leiden auch jüngere Menschen an diesem Tumor (De Vries et al. 2005). Obwohl die Mortalitätsrate von BCC niedrig ist, verursacht ihre Therapie enorme Kosten für das Gesundheitssystem (Roewert-Huber et al. 2007). In Australien beispielsweise betragen die Kosten für Diagnostik und Therapie der nicht-melanomatösen Hauttumoren in den Jahren 2000-2001 9 % der insgesamt durch Krebs verursachten Kosten (Staples et al. 2006). Bekannte Riskofaktoren für die Entstehung eines BCC sind UV- und ionisierende Strahlung, ein supprimiertes Immunsystem oder eine genetische Prädisposition (Kwasniak & Garcia-Zuazaga 2011).

### 1.5.2 Histologie

Basalzellkarzinome sind für gewöhnlich gut differenzierte epitheliale Tumoren mit follikulärer Differenzierung, deren Tumorzellen histologisch den Basalzellen der Epidermis ähneln. Anhand ihres Wachstumsverhaltens lassen sich die BCC in zwei Untergruppen einteilen, die indolente und die aggressive Variante. Die häufigere indolente Variante umfasst die (mikro)nodulären und oberflächlichen BCC mit jeweils (21)15 % und 17 % der Fälle (Sexton et al. 1990). Im Gegensatz zu den (mikro)nodulären BCC, die in der Dermis liegen und aus Nestern basaloider Zellen zusammengesetzt sind, werden die oberflächlichen BCC durch zahlreiche kleine Tumornester bestimmt, die breitbasig an der Unterseite der Epidermis anhaften. Die aggressive Varianten, zu denen die metatypischen, morpheaformen, sklerosierenden und infiltrativ wachsenden BCC gehören, kommen deutlich seltener vor, jedoch verursacht die lokale Gewebeerstörung durch ihre Invasion in tiefere Hautschichten eine signifikante Morbidität (Crowson 2006). BCC entstehen bevorzugt in der Anagen-Phase des Haarzyklus (Grachtchouk et al. 2011; Mancuso et al. 2006), während der die Zellen der äußeren Haarwurzelscheide besonders anfällig für eine onkogene Transformation sind und einen ausgedehnten Pool an potentiellen Tumovorläuferzellen liefern (Kasper et al. 2011). Eine andere generell von den BCC zu unterscheidende epitheliale Neoplasie mit follikulärer Differenzierung ist das Trichoblastom, ein Tumor des Talgdrüsen-Nävus, der sich histologisch und hinsichtlich seines Zytokeratin-Expressionsprofils nicht von den nodulären BCC und den follikulären Keimzellen des fetalen Haarfollikels unterscheidet (Schirren et al. 1997).

### 1.5.3 Molekulare Pathogenese des Basalzellkarzinoms

Basalzellkarzinome zeichnen sich durch eine unkontrollierte Aktivierung des Shh-Signalweges aus. Die häufigste Ursache für die Aktivierung dieses Signalweges sind Mutationen des *PTCH1*-Tumorsuppressorgens, die in über 60% der sporadischen Basalzellkarzinomen auftreten (Reifenberger et al. 2005). Meist ist der Verlust eines Allels (loss of heterozygosity, LOH) mit einer UV-induzierten Mutation im anderen Allel kombiniert (Gailani et al. 1996). *PTCH1*-Mutationen wurden als erstes in BCC des nävösen Basalzellkarzinomsyndroms (NBCCS), auch Gorlin-Goltz Syndrom genannt, entdeckt. Patienten mit NBCCS tragen Keimbahnmutationen des Shh-Rezeptorgens *PTCH1*, was mit dem Auftreten multipler BCC bereits im frühen Erwachsenenalter verknüpft ist. Es findet sich

auch eine Assoziation mit Neoplasien innerer Organe. In bis zu 20% der Fälle treten Medulloblastome (MB) des Kleinhirns, seltener Ovarialkarzinome, Fibro- und Rhabdomyosarkome auf (Gorlin 1995; Hahn et al. 1996; Johnson et al. 1996). Ebenfalls mit dem Syndrom assoziiert wurde ein breites Spektrum von Entwicklungsdefekten wie Makrozephalie, muskulo-skelettäre Malformationen der Wirbelsäule und der Rippen, odontogene Kieferzysten, Augenveränderungen (Blindheit, kongenitale Katarakt, Strabismus) und neurologische Veränderungen, wie Verkalkungen der Falx cerebri und ein kongenitaler Hydrozephalus (Gorlin 1987). Zahlenmäßig gefolgt werden die *PTCH1* Mutationen in BCC von Mutationen des Onkogens *SMOH* (Reifenberger et al. 1998; Xie et al. 1998) und des Tumorsuppressorgens *SUFU* (Reifenberger et al. 2005). Mutationen in *SUFU* werden jedoch eher mit einem gesteigerten Risiko für Medulloblastome in Zusammenhang gebracht. Ektopie Expression von Gli1 oder Gli2 in der Haut von *Xenopus*-Kaulquappen oder von Mäusen führte zur Tumorbildung (Dahmane et al. 1997; Grachtchouk et al. 2000; Nilsson et al. 2000), was nahelegt, dass auch die Komponenten des Hh-Signalweges, die am Ende der Kaskade stehen, in der Lage sind, Tumorwachstum zu initiieren. Die bei aktiviertem Hh-Signalweg vermehrte Gli1-Expression verstärkt u.a. die Expression von *Pdgfr- $\alpha$* , was wiederum den gleichnamigen Signalweg aktiviert (Xie et al. 2001). Der *Pdgfr- $\alpha$* -Signalweg ist mit dem Ras/Erk-Signalweg verschaltet, über den die Zellproliferation angeregt wird (McCormick 1994; Treisman 1995). Die Gli2-Expression in der Haut von Mäusen wird anders als die von Gli1 auch über den Notch-Signalweg, der Differenzierung und Proliferation reguliert, gesteuert. Inaktivierung des *Notch1* Gens in der Epidermis von Mäusen induziert eine konstitutive Gli2-Expression und verursacht die Bildung von BCC-artigen Tumoren (Nicolas et al. 2003). Die Notch-abhängige Transformation ist mit der Aktivierung von  $\beta$ -Catenin und Lef1, zwei Signalgebern des aktiven Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges gekoppelt. Die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges spielt in bestimmten histologischen BCC-Subtypen, frühen Stadien superfizieller BCC, Pilomatrixomen und infiltrativen BCC, nicht jedoch in nodulären BCC, eine Rolle (Doglioni et al. 2003; El-Bahrawy et al. 2003). Yang und Mitarbeiter zeigten an M2SMO-Mäusen, dass sowohl ein aktivierter Wnt/ $\beta$ -Catenin- als auch ein aktivierter Hh-Signalweg zur Entstehung von BCC in diesem experimentellen Modell notwendig sind (Yang et al. 2008). Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53* finden sich in 40 % der Fälle sporadischer BCC (Reifenberger et al. 2005) und korrelierten mit einem aggressiveren Wachstumsverhalten (Ansarin et al. 2006; Auepemkiate et al. 2002; Bolshakov et al. 2003).

In vereinzelt Fällen wurden in BCC auch ein aktivierter Ras-Signalweg (Campbell et al. 1993; Lieu et al. 1991; Pierceall et al. 1991; von der Schroeff et al. 1990) und seltene Nonsense-Mutationen in dem Gen, das für das GTPase-aktivierende Protein (GAP) kodiert, gefunden (Friedman et al. 1993). Letztendlich kooperiert auch ein aktivierter EGFR-Signalweg mit dem Hh-Signalweg um Gene (z.B. *JUN*, *SOX9* und *FGF19*) zu induzieren, die den BCC-Phänotyp bestimmen (Eberl et al. 2012). Darüber hinaus wird das Wachstum und die Progression humaner BCC deutlich von der Mikroumgebung des Tumors beeinflusst. So verstärken z. B. Tumor-assoziierte Makrophagen das invasive Wachstumsverhalten und die Angiogenese von BCC (Tjiu et al. 2009) und Tumorstromazellen produzieren große Mengen an Gremlin1, das die Differenzierungs-fördernden Faktoren Bmp2 und Bmp4 antagonisiert (Sneddon et al. 2006). Aktuelle Analysen von BCC mit Hilfe Exom-weiter Sequenzierungen zeigen eine sehr hohe Zahl von mehreren Hunderten von mutierten Genen in sporadischen BCC, darunter überwiegend sog. Bystander-Mutationen, wobei insbesondere UVB-assoziierte Transitionsmutationen vorherrschen, was die wichtige Rolle der UVB-Exposition für die Tumorentstehung unterstreicht (Jayaraman et al. 2014). Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass zahlreiche Faktoren die Suszeptibilität und den Phänotyp von BCC beeinflussen, wobei ein deregulierter Shh-Signalweg jedoch die bedeutendste Rolle für ihre Entstehung einnimmt (Epstein 2008).

#### 1.5.4 Mausmodelle für das Basalzellkarzinom

Mausmodelle bringen einen großen Nutzen für die Krebsforschung, denn sie gestatten es, die Entstehung von Tumoren im Kontext des gesamten Organismus zu untersuchen. Das ideale Tiermodell sollte die Analyse oder Modulation der molekularen Ereignisse, die mit der Tumorentstehung oder Progression im Menschen assoziiert sind, ermöglichen. Zusätzlich sollte das ideale Tiermodell die präklinische Evaluation von Krebstherapien *in vivo* erlauben, die die Entstehung von Tumoren verhindern, das Tumorwachstum inhibieren oder die Regression bereits bestehender Tumore induzieren können. Bezogen auf das Studium der Basalzellkarzinom-Entstehung in Mäusen fehlten bislang Modelle, die auf Applikation mutagener Chemikalien oder UV-Exposition zur Tumorentstehung beruhen (Bogovski 1994). Genetisch veränderte Mausmodelle für das BCC lieferten hingegen die Möglichkeit die molekularen Mechanismen der BCC-Entstehung sowie die Identifizierung ihrer Ursprungszellen zu erforschen. Gemäß einem obligat aktivierten Shh-Signalweg in humanen

BCC tragen alle gängigen Mausmodelle Mutationen in unterschiedlichen Komponenten des Hh-Signalweges. In Abhängigkeit von dem modifizierten Gen und der anvisierten Zielzelle entstehen unterschiedliche Hauttumor-Subtypen, die von gutartigen follikulären Hamartomen/Trichoepitheliomen bis zu nodulären oder invasiven BCC reichen (Grachtchouk et al. 2000; Grachtchouk et al. 2003; Hutchin et al. 2005; Mancuso et al. 2004; Nilsson et al. 2000; Oro et al. 1997; Sheng et al. 2002). Diese experimentellen Tumoren reflektieren die Variationsbreite Shh-abhängiger BCC-artiger Tumoren beim Menschen. Arbeiten von Grachtchouk und Mitarbeitern zeigten, dass das Level der Shh-Signalwegaktivierung hinter *Ptch1* und nicht das modifizierte Zielgen entscheidend für die Ausprägung des Tumorsubtyps ist (Grachtchouk et al. 2000; Grachtchouk et al. 2003). Da die meisten humanen BCC durch *PTCHI*-Mutationen verursacht werden und das Stroma in der unmittelbaren Umgebung des Tumors eine bedeutende Rolle bei ihrer Initiation und Progression spielt, sind immunkompetente *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäuse das Modell, das der Situation beim Menschen am nächsten kommt. Konventionelle *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäuse haben jedoch den Nachteil, dass sie repetitiv mit UVB über einen längeren Zeitraum bestrahlt oder ionisierender Strahlung ausgesetzt werden müssen, um BCC-artige Tumoren zu entwickeln (Aszterbaum et al. 1999; Herbert et al. 2001; So et al. 2004). Der Zeitpunkt und die Lokalisation der Tumorentstehung ist unter diesen Bedingungen variabel, ebenso wie die molekularen Entstehungsmechanismen, die mit der Art der eingesetzten Strahlung variieren (Aszterbaum et al. 1999; Mancuso et al. 2004). Um in präklinischen Studien neue Therapiestrategien bei spezifischen BCC-Subtypen auszutesten, greift man daher eher auf konditionale *Ptch1* Knockout-Mäuse zurück. Hierzu existieren derzeit fünf verschiedene Stämme, die zu einem definierten Zeitpunkt Vorläuferläsionen bzw. voll ausgeprägte Tumore in einem vorgegebenen Zelltyp entwickeln (Nitzki et al. 2012). Bislang wurde jedoch erst ein Stamm in präklinischen Studien zur gezielten Therapie von BCC genutzt (Uhmann et al. 2011).

## 1.6 Das Medulloblastom

### 1.6.1 Epidemiologie

Das Medulloblastom (MB) ist ein primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET) des zentralen Nervensystems, der im Kleinhirn lokalisiert ist und den häufigsten bösartigen Hirntumor im Kindes- und Jugendalter darstellt. Es wächst vom Kleinhirn aus unkontrolliert in das

umgebende Gewebe des Hirnstamms oder in den 4.Ventrikel der hinteren Schädelgrube. Klinisch auffällig werden die Patienten neben dem durch die Liquorabflussstörung verursachten intrakraniellen Überdruck durch Rumpfataxie und Störungen der Bewegungskoordination. Drei Viertel der Medulloblastome entstehen im Kleinhirnwurm, während mit zunehmendem Alter der Patienten der Anteil der Tumoren in den Kleinhirnhemisphären steigt (Giangaspero et al. 2007). Die 5-Jahresüberlebensrate wird bei postoperativer Bestrahlung und Chemotherapie mit 87 % angegeben (Packer et al. 2012). Obwohl die Überlebensrate für Standardrisiko-Medulloblastompatienten bei 70 % liegt (Ellison et al. 2011), leiden Patienten, die überleben, häufig an neurologischen Entwicklungsstörungen und kognitiven Nebeneffekten der aggressiven Therapie (Mulhern et al. 2004). Anhand von molekulargenetischen Profilen konnten letztendlich vier unterschiedliche Medulloblastom-Subtypen charakterisiert werden, von denen einer durch eine aberrante Aktivierung des Shh-Signalweges gekennzeichnet ist und der Standardrisikogruppe angehört (Kool et al. 2008; Northcott et al. 2011).

### **1.6.2 Histologische Klassifikation und Histogenese der Medulloblastome**

Histologisch unterteilt man die Medulloblastome in zwei Hauptgruppen - die klassische und die desmoplastische Variante (Giangaspero et al. 2007). Der desmoplastische Typ besitzt eine weitere Untergruppe: Das MB mit extensiver Nodularität und fortgeschrittener neuronaler Differenzierung. Weiterhin existiert noch die großzellige anaplastische MB-Variante, die starke Anaplasie-Zeichen aufweist und mit nur 4% aller MB die kleinste, aber aggressivste MB-Tumorgruppe darstellt.

Mikroskopisch stellt sich das klassische Medulloblastom als zellreicher Tumor aus dicht gepackten Tumorzellnestern mit rundlich-ovalen bis karottenförmigen Zellkernen und einem relativ schmalen Zytoplasmasaum dar. In etwas weniger als der Hälfte der Fälle ordnen sich die Tumorzellen in typischen Formationen, die als neuroblastische Rosetten bezeichnet werden, an. Mitosen sind ebenso wie Apoptosen häufig. Der desmoplastische Medulloblastom-Typ, auch als noduläres MB bezeichnet, weist zellarme, knotenförmige und Retikulinfaser-freie Zonen auf („pale islands“), die umgeben sind von dicht gepackten hochgradig proliferativen Zellen mit irregulären hyperchromatischen Zellkernen, die in ein dichtes interzelluläres Retikulinfasernetzwerk eingebettet sind.

Der histologisch desmoplastische MB-Typ entspricht meist dem molekulargenetischen Hh-Typ und scheint sich von den Körnerzellvorläufern (Granule Cell Precursors, GCPs) der externen Körnerzellschicht (EGL) abzuleiten (Schüller et al. 2008). Die EGL ist eine transiente Keimzone an der subpialen Kleinhirnoberfläche, deren Zellen gegen Ende der embryonalen Hirnentwicklung tangential von der rautenförmigen Lippe des Hinterhirns abgewandert sind, um die aufkommende Kleinhirnrinde zu bilden (Millen 2008). Perinatal expandiert die externe Körnerzellschicht dramatisch. Unreife Körnerzellvorläufer der äußersten Regionen proliferieren unter dem mitotischen Einfluss von Shh, das von Geburt an von den Purkinje Zellen des Kleinhirns produziert wird und an die Ptch-Rezeptoren (Ptch1 und Ptch2) der GCPs bindet (Wechsler-Reya & Scott 1999). Über die nachfolgende Aktivierung der Gli-Transkriptionsfaktoren startet ein zeitlich determiniertes Genexpressionsmuster, das einen Proliferationsschub und die massive Ausdehnung der GCP-Population innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen bewirkt. Insbesondere die direkten Gli-Zielgene N-Myc (Kenney et al. 2003; Lee et al. 2010) und die D-Typ-Zykline (Pogoriler et al. 2006) sind entscheidend für das Wachstum und die neoplastische Transformation der GCPs (Kessler et al. 2009). Nach mehreren Zellteilungsrunden ziehen sich die GCPs aus den tieferen Regionen der EGL aus dem Zellzyklus zurück, bewegen sich von der externen zur internen Körnerzellschicht durch die Molekularzellschicht auf die Shh-produzierenden Purkinje-Zellen zu und differenzieren zu Zellen der inneren Körnerzellschicht (ten Donkelaar et al. 2003; Vandenberg et al. 1987). Die genauen Mechanismen, die die GCP-Proliferation abbremsen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Das offensichtlichste Konzept beschreibt ein Gradienten-basiertes Modell, wobei ein externes Signal mit zunehmender Distanz zu der äußeren EGL die GCP-Differenzierung auslöst (Choi et al. 2005). Letztendlich verschwindet in Mäusen die EGL ungefähr 3 Wochen nach Geburt, beim Menschen innerhalb der ersten beiden Lebensjahre.

### 1.6.3 Molekulare Pathogenese des Medulloblastoms

Die häufigste zytogenetische Veränderung in klassischen Medulloblastomen ist das Isochromosom 17q [i(17)q], das bei 30-45 % der Patienten gefunden wird (Bigner et al. 1988; Griffin et al. 1988). Das Tumorsuppressorgen *TP53*, das auf der Chromosomenbande 17p13 lokalisiert ist, spielt in Medulloblastomen im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer Tumore nur eine untergeordnete Rolle. In nur 5-10 % der Medulloblastome konnten Veränderungen des

Gens nachgewiesen werden (Adesina et al. 1994). Trotzdem scheint der p53-Signalweg in bis zu 21% der Fälle durch Deletion der Tumorsuppressorgene *CDKN2A* (*p16<sup>INK4A</sup>*) und *CDKN2B* (*p14<sup>ARF</sup>*) betroffen zu sein (Frank et al. 2004). Mittels Genom- und Transkriptomanalysen wurden in den letzten Jahren vier unterschiedliche molekulare Medulloblastomvarianten identifiziert: Die als Wnt, Shh, Gruppe 3 (Phototransduktion und Glutamat Signaltransduktion) und Gruppe 4 (Semaphorin, cAMP, G-Protein-gekoppelte Rezeptor und  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion) Medulloblastome bezeichnet werden (Ellison et al. 2011; Jones et al. 2012; Kool et al. 2012; Northcott et al. 2011). Die Wnt-Subgruppe zeichnet sich durch einen aktivierten Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg infolge von  $\beta$ -Catenin Mutationen aus. Dieser Zusammenhang und auch die Verbindung zwischen einem Verlust von Chromosom 6 und einer Aktivierung des Wnt-Signalweges wurden bereits 2006 von Thompson und Clifford beschrieben (Clifford et al. 2006; Thompson et al. 2006). Ein weiteres Charakteristikum dieser Gruppe ist die Expression von Mitgliedern des TGF $\beta$ -Signalweges (z.B. *Bmp4*, *Smad3*, *TGFBI*) (Northcott et al. 2011). Medulloblastome der Shh-Gruppe zeigen einen aktivierten Shh-Signalweg, wofür am häufigsten *PTCH1*-Mutationen verantwortlich sind (Raffel et al. 1997; Wolter et al. 1997). Weitere Komponenten des Shh-Signalweges, in denen Mutationen nachgewiesen wurden, sind *SMOH* und *SUFU* (Reifenberger et al. 1998; Taylor et al. 2002). Es zeigte sich dabei ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Shh-Signalweges und dem desmoplastischen Medulloblastom-Subtyp (Pietsch et al. 1997). Medulloblastome der Gruppen 3 und 4 fallen durch hohe Expressionslevel der Onkogene *OTX2* und *FOXP1* auf, während Gruppe 3 Tumoren häufig eine Amplifikation und erhöhte Expression des *MYC* Proto-Onkogens zeigen (Northcott et al. 2011). Genomische Amplifikationen der Gene *MYC* und *NMYC* treten mit 4-17 % besonders in der aggressiven großzelligen/anaplastischen Medulloblastomvariante auf, sind mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert (Aldosari et al. 2002; Eberhart et al. 2004). Außerdem findet man in Medulloblastomen der Wnt- und Shh-Gruppe eine Anreicherung von Genen, die an der Regulation des axonalen Wachstums beteiligt sind, in Gruppe 3 und 4 sind hingegen Signalwege, die an der neuronalen Entwicklung sowie der Photorezeptordifferenzierung (in Gruppe 4) mitwirken, überrepräsentiert (Northcott et al. 2011).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Shh-abhängigen Tumorigenese von Basalzellkarzinomen der Haut und Medulloblastomen des Kleinhirns. Die beiden Tumorentitäten stellen jede für sich den häufigsten Tumor ihrer Kategorie, weißhäutige Erwachsene weltweit und bösartige ZNS-Tumoren im Kindes- und Jugendalter, dar. Zum Studium molekulargenetischer Veränderungen in BCC und MB, die Ansatzpunkte für eine gezielte Therapie dieser Tumoren liefern könnten, wurde das konstitutive *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell ausgewählt, in dem spontan mit einer Rate von ca 14 % Medulloblastome entstehen (Goodrich et al. 1997). Zur Induktion BCC-artiger Hauttumoren wurden die Tiere über mehrere Monate mit UVB-Licht bestrahlt und die resultierenden Tumoren, ebenso wie die spontan aufgetretenen Medulloblastome molekulargenetisch analysiert. Der Schwerpunkt der gezielten molekulargenetischen Untersuchungen wurde auf das *Ptch1* Gen und die bekannten Tumorsuppressorgene *Tp53*, *Cdkn2A* und *Cdkn2B* sowie eine gezielte Expressionsanalyse ausgewählter Shh-Zielgene ausgerichtet. Ziel war es ebenfalls, neue Tumor-relevante Kandidatengene mittels einer Mikroarray-basierten globalen Expressionsanalyse zu finden. Weiterhin sollte geklärt werden, welchen Einfluss das Fehlen der induzierbaren NO-Synthase (*Nos2*) auf die Basalzellkarzinogenese und die Entstehung von Medulloblastomen hat. Hierzu standen *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse zur Verfügung, die mit den *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen gekreuzt wurden. In beiden Tumorentitäten sollte im Vergleich der Genotypen *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> zu *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> die Inzidenz, das histologische Erscheinungsbild und die molekulargenetischen Veränderungen bestimmt werden. Da aufgrund der vielfältigen Effekte der *Nos2* in der Tumorbilogie mit einem Unterschied bei der Tumorinitiation und/oder Tumorprogression zwischen den beiden Genotypen zu rechnen war, sollte der Mechanismus über den der NO-Mangel in die Genese und das Wachstum von BCC bzw. MB im Mausmodell eingreift, geklärt werden. Hierdurch sollte u.a. auch der Frage nachgegangen werden, ob die gleichen oder unterschiedliche molekulare Mechanismen zur Entstehung von einerseits Medulloblastomen und andererseits BCC führen und welche Rolle die *Nos2*-Defizienz in beiden Tumorentitäten spielt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mäusestämme

Mäuse vom Stamm C57BL/6J (B6); 129 P2-Nos2tm1Lau/J (Laubach et al. 1995) und C57BL/6J (B6); 129 P2-Ptch1tm1Mps/Ptch+ (Goodrich et al.1997) wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und zur Erhaltungszucht und Züchtung des Genotyps *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/-</sup> mit Mäusen des Stamms C57BL/6J, Nachzucht der TVA Düsseldorf, gekreuzt.

#### 2.1.2 Normalgewebekontrollen

Als Referenz zur Normalisierung von unterschiedlichen semiquantitativen RT-PCR-Analysen aus Haut- und Hauttumorgewebe diente Mouse Universal Reference Total RNA (BD Biosciences). Die Expression von Genen aus unterschiedlich alten Kleinhirnen und Medulloblastomen wurde gegen RNA aus C57BL/6J Gesamtgehirn (Stratagene, La Jolla, CA) und die Gewebe- und Tumorproben, die auf den "Mikroarrays" hybridisiert wurden, gegen Maus Universal Referenz RNA (Stratagene, La Jolla, CA) abgeglichen.

#### 2.1.3 Antikörper

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die in der Arbeit für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten Antikörper und deren Bezugsquellen.

**Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Antikörper.**

Antikörper	Wirt	Klonalität	Firma	Bestell-Nr.	Klon
anti-CD3	Kaninchen	polyklonal	Dako, Glostrup, DK	A0452	
anti-Gap43	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	G9264	GAP-7b10
anti-Ki-67	Kaninchen	monoklonal	Novocastra, Wetzlar, D	Ki67-MM1-L-CE	NCL-L
anti-NeuN	Maus	monoklonal	Merck, Millipore, Darmstadt, D	MAB377	A60
anti-Nos2	Maus	monoklonal	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA	N9657	NOS-IN

#### 2.1.4 Tumorproben

Die während des chronischen UVB-Bestrahlungsexperiments gewonnenen Hauttumoren und die Kleinhirntumoren, die das Untersuchungsmaterial für histologische,

immunhistochemische und molekulargenetische Untersuchungen bildeten, wurden zur besseren Übersicht durchnummeriert und mit den Abkürzungen MB (Medulloblastom), BCC<sup>TB</sup> (Basalzellkarzinom-ähnlicher Tumor mit Trichoblastom-artiger Differenzierung), BCC<sup>KT</sup> (Basalzellkarzinom-ähnlicher Tumor mit Keratinisierung) und SCC (Plattenepithelkarzinom) für die jeweiligen histologischen Subtypen versehen (Tabelle 2).

**Tabelle 2. Tumorproben für die molekulargenetischen Untersuchungen.\***

Tumor	Genotyp	Material	Tumor	Genotyp	Material
MB1	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 1	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo
MB2	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 2	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo
MB3	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 3	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo
MB4	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 4	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo
MB5	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 5	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo
MB6	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 6	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo
MB7	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 7	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo
MB8	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 8	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB9	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 9	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB10	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 10	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB11	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 11	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB12	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 12	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB13	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 13	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB14	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 14	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB15	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 15	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB16	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 16	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB17	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 17	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB18	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 18	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB19	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 19	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB20	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 20	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
MB21	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 21	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
BCC <sup>KT</sup> 1	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 22	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
BCC <sup>KT</sup> 2	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 23	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
BCC <sup>KT</sup> 3	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 24	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo
BCC <sup>KT</sup> 4	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 25	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	P
BCC <sup>KT</sup> 5	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 26	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	P
BCC <sup>KT</sup> 6	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 27	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	P
BCC <sup>KT</sup> 7	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 28	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	P
SCC1	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 29	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	P
SCC2	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	BCC <sup>TB</sup> 30	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	P
SCC3	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo			
SCC4	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo			
SCC5	Ptch1 <sup>+/+</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo			
SCC6	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/-</sup>	Kryo			

\* Kryo, tiefgefroren asserviertes Gewebe; P, Formalin-fixierten und in Paraffin eingebettetes Gewebe

### 2.1.5 Zelllinien

Von insgesamt 10 murinen Medulloblastomen der Genotypen *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>, *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/-</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> wurden Zellkulturen angelegt. Drei dieser Zelllinien ließen sich nach anfänglichem Wachstum nicht weiter passagieren oder wuchsen nach Lagerung in Flüssigstickstoff nicht mehr an. Die übrigen 7 Zelllinien, mit dem Kürzel MBZK für Medulloblastomzellkultur und der Nummer ihres Ursprungstumors bezeichnet, waren Grundlage für weiterführende molekulargenetische Untersuchungen. Für die funktionellen Analysen wurden die murine neuronale Vorläuferzelllinie c17.2 und die humane Medulloblastomzelllinie D458 (Prof. D. Bigner, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina) verwendet.

### 2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

Die gängigen Chemikalien zum Ansetzen von Pufferlösungen und Nährmedien, sowie Alkohole und Säuren wurden von den Firmen Merck, VWR Prolabo, Sigma und Roth bezogen. In der nachfolgenden Tabelle 3 sind spezielle Chemikalien und Reagenzien für die Molekularbiologie mit Herstellernachweis gesondert aufgeführt.

Tabelle 3. Chemikalien und Reagenzien.

Substanz	Firma
100 bp-DNA Leiter	PeqLab
1x PBS	Gibco
Acrylamid Solution	Fluka
Acrylamid/Bisacrylamid Solution 29:1, 3,3%	Biorad
Agarose	Biobudget
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Bisacrylamid Solution	Sigma
Blue Dextran	Sigma
Bromphenol-Blau	Sigma
BSA, 1mg/ml	Sigma
Cesium Chlorid (CsCl)	Fluka
Diethylpyrocarbonat	Roth
DMSO	Sigma
DTT 0,1 M	Invitrogen
Ethidiumbromid	Sigma
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Formamid	Sigma
Guanidinisoithiocyanat	Fluka
Harnstoff	Serva
IMEM Kulturmedium	Gibco
Ketamin	Pfizer Pharma
Nahtmaterial	Johnson & Johnson
Nucleotide, dNTPs	Sigma
Pd(N) <sub>6</sub> Random Hexamer- Primer	Amersham
Proteinase K	Sigma
RNasin	Promega
Rompun	Bayer Leverkusen
Roti-Phenol	Roth
Silbernitrat	Merck
Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Invitrogen
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Invitrogen
TRIZOL Reagent	Invitrogen
Xylene Cyanole FF	Sigma

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die nachfolgenden Tabellen geben Übersichten über die Primersequenzen, die für qRT-PCR, Duplex-PCR und Genotypisierung (Tabelle 4) und für die *Ptch1* Methylierungs- und Mutationsanalyse (Tabelle 5) verwendet wurden. Tabelle 6 fasst die Primersequenzen sowie die PCR- und Gelelektrophoresebedingungen für die zur *Tp53* Mutationsanalyse verwendeten SSCP/Heteroduplex-Analyse zusammen.

**Tabelle 4. Primersequenzen für qRT-PCR, Duplex-PCR und Genotypisierung.**

Primer	Sequenz	Lokalisation	Amplikonlänge	Annotation	Konzentration	PCR Bedingungen
<i>NMYC</i> F	cgggagaggataccttgagcg	Exon2	150 bp	NM_008709	450 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>NMYC</i> R	tcttgggacgca cagtgatc	Exon3			150 nM	
<i>HIP1</i> F	gctgcctgcagagtgacagc	Exon2	109 bp	NM_020259	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>HIP1</i> R	ggagcaccattgatctctccc	Exon3			100 nM	
<i>NOS2</i> F	gttcaggagctcgggtgaag	Exon11	490 bp	NM_010927	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>NOS2</i> R	ggtagtagtagaatggagat	Exon12			600 nM	
<i>GLI1</i> F	gaccatgagcagacacacgg	Exon8	109 bp	NM_010296	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>GLI1</i> R	cggtgacgaccgaggtgag	Exon9			600 nM	
<i>GLI2</i> F	agtgtggaggccagtagcac	Exon12	122 bp	NM_001081125	450 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>GLI2</i> R	tcgctgctcaggatgac	Exon13			150 nM	
<i>Vwf</i> F	caggtagagatctgcctgc	Exon3	196 bp	NM_011708	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>Vwf</i> R	ggaaacgttctgagctccc	Exon4			600 nM	
<i>Cckar</i> F	gtgccgtgtgcaagactacc	Exon2	164 bp	NM_009827	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>Cckar</i> R	agggtgacgagtagccttc	Exon3			600 nM	
<i>Skint9</i> F	cctggattctcatgtcattcc	Exon2	155 bp	NM_177864	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>Skint9</i> R	catgtcatctcagcaggtgg	Exon3			600 nM	
<i>Gdpd3</i> F	gacacttgaggaccgaggg	Exon9	134 bp	NM_024228	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>Gdpd3</i> R	gtccaagtagtgtctcaggg	Exon10			600 nM	
<i>Tet2</i> F	ctgcagagcctcaagcaacc	Exon3	163 bp	NM_001040400	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>Tet2</i> R	acatcaggaccagctcctag	Exon4			600 nM	
<i>Cox2</i> F	ggccagcacttccccaatca	Exon5	101 bp	NM_011198	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>Cox2</i> R	ggatacacctctccaccaatg	Exon7			600 nM	
<i>Ppm1D</i> F	aaggttcctcgcctgtcac	Exon2	102 bp	NM_016910	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>Ppm1D</i> R	aaccacactggcagttgtcc	Exon3			900 nM	
<i>p21</i> F	gagtcaggcagatccac	Exon1	110 bp	NM_007669	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>p21</i> R	gacacggcacaacttgctc	Exon2			900 nM	
<i>Bmi1</i> F	caagatggccgcttgctc	Exon1	160 bp	NM_007552	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>Bmi1</i> R	tgatcttgattctggttctgatgc	Exon2			600 nM	
<i>MrpL32</i> F	actacatggccggtgctgc	Exon1	132 bp	NM_029271	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>MrpL32</i> R	atggaaggctctggaaggc	Exon2			100 nM	
<i>PTCH1</i> Ex2-F	ggcagcta atctcgagacca	Exon2	102 bp	NM_008957	600 nM	real-time, 60°C, 40x
<i>PTCH1</i> Ex3-R	gcctctctccta tctctgacg	Exon3			100 nM	
<i>P19<sup>ARF</sup></i> F	gacccggaatcctggac	Exon1	84 bp	NM_001040654	150 nM	duplex, 58°C, 34x
<i>P19<sup>ARF</sup></i> R	cggatgcacagaagcagcg	Intron1			300 nM	
<i>P16<sup>INK4A</sup></i> F	ggcactgtggaagccgg	Exon1	94 bp	NM_009877	150 nM	duplex, 58°C, 32x
<i>P16<sup>INK4A</sup></i> R	ccgactgcagatgggac	Intron1			300 nM	
<i>PTCH1</i> Ex2-F	ggcagcta atctcgagacca	Exon2	155 bp	NM_008957	150 nM	duplex, 60°C, 32x
<i>PTCH1</i> INT2-R	ggcttctgttggtacaagg	Intron2			150 nM	
<i>NMYC</i> DF	cggagaggataccttgagc	Exon1	142 bp	NM_008709	300 nM	duplex, 58°C, 32x
<i>NMYC</i> DR	ggaggctggtgaacagaag	Intron1			150 nM	
<i>Nkx2.2</i> DF	cgacagcagcga caacc	Exon1	121 bp	NM_029271	150 nM	
<i>Nkx2.2</i> DR						
<i>NOS2</i> Ex12F	ccccaaactctcctctcttc	Exon12	150 bp	NT_039520	150 nM	PCR, 62°C, 35x, Hot-Star
<i>NOS2</i> Ex12R	gggacacagcacagacagag	Exon12			150 nM	
<i>NOS2</i> Ex11F	gcatactgacctccatc	Exon11	500 bp		150 nM	PCR, 60°C, 35x
<i>NEO</i> R3	gagcagccgattgtctgtg	Exon1		U43611	150 nM	
<i>E. coli</i> LACZ F	cggaaagctggctggagtg	Exon1	210 bp	L08936	150 nM	PCR, 63°C, 35x
<i>E. coli</i> LACZ R	gcgtctggcctctctgtag	Exon1			150 nM	

Tabelle 5. Primersequenzen für die *Ptch1* Methylierungs- und Mutationsanalyse.

Primer	Sequenz	Lokalisation	Amplikonlänge	Annotation	Konzentration	PCR Bedingungen
<i>PTCH1</i> BIS1F	gcgccgcttattgagtaaggagttgtg	CpG-Insel	110 bp	NM_008957	150 nM	PCR, 53°C, 35x
<i>PTCH1</i> BIS1R	ctaaaccattctaccccc	CpG-Insel			150 nM	
<i>PTCH1</i> BIS 2F	gcgccgctgggggtagaagggttag	CpG-Insel	156 bp		150 nM	PCR, 51°C, 35x
<i>PTCH1</i> BIS 2R	ctactactactaataactacta	CpG-Insel			150 nM	
<i>PTCH1</i> BIS 3F	gcgccgctagtagtattagtagtag	CpG-Insel	181 bp		150 nM	PCR, 51°C, 35x
<i>PTCH1</i> BIS 3R	atcccaaatcccccca	CpG-Insel			150 nM	
<i>PTCH1</i> BIS 4F	gcgccgctgggggggattggggat	CpG-Insel	148 bp		150 nM	PCR, 53°C, 35x
<i>PTCH1</i> BIS 4R	ctacaaaactcaaacct	CpG-Insel			150 nM	
<i>PTCH1</i> BIS 5F	gcgccgctgggttgaattttgtag	CpG-Insel	209 bp		150 nM	PCR, 53°C, 35x
<i>PTCH1</i> BIS 5R	acctaactacccaaaacc	CpG-Insel			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex1 F	ctaactgagcgcgccttcg	Exon1	291 bp	NM_008957	150 nM	PCR, 62°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex3 R	gccttctcctacttctgacg	Exon3			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex 2 F	actatctgcaaccggcccag	Exon2	376 bp		150 nM	PCR, 60°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex 6 R	ttgtccaccgtaaggaggc	Exon6			150 nM	
<i>PTCH1</i> Int3 F	cccaagtgagacaaacagagt	Intron3	284 bp		150 nM	PCR, 59°C, 35x
<i>PTCH1</i> Int4 F	acctgtcaggtgacacagg	Intron4			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex 3 F	ggtggacgagtgatgagaga	Exon3	515 bp		150 nM	PCR, 60°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex 9 R	gggcgacattgtagaac	Exon9			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex 5 F	tccgggacagcatacctcct	Exon5	533 bp		150 nM	PCR, 60°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex 12 R	atgcccagatgaagaaggcg	Exon12			150 nM	
<i>PTCH1</i> Int8 F	atgcttctgggactcac	Intron8	188 bp		150 nM	PCR, 57°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex8 R	ctgcccgtctcattccag	Exon8			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex9 F	ggttcatcaaatgtgtcgccc	Exon9	325 bp		150 nM	PCR, 59°C, 35x
<i>PTCH1</i> Int9 R	ccacatccaaaggcagaacc	Intron9			150 nM	
<i>PTCH1</i> Int8 F	caggatcatgtgacaggaggc	Intron8	425 bp		150 nM	PCR, 59°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex9 R	gggcgacattgtagaac	Exon9			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex12 F	ctcaagcgcaccggagcc	Exon12	164 bp		150 nM	PCR, 59°C, 35x
<i>PTCH1</i> Int12 R	agcaaggatgtgacagacc	Intron12			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex 12 F	ctcaagcgcaccggagcc	Exon12	512 bp		150 nM	PCR, 61°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex14 R	aggctcctgtagagctgg	Exon14			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex14 F	ccaggacaacctcagctgtc	Exon14	521 bp		150 nM	PCR, 60°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex16 R	ccagtcactgcaaatgcatcc	Exon16			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex15 F	gtgaagtagtcatgtggagg	Exon15	167 bp		150 nM	PCR, 60°C, 35x
<i>PTCH1</i> Int15 R	caacttcgacgggtgctcag	Intron15			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex15 F	cccaaatgtggctgactac	Exon15	506 bp		150 nM	PCR, 61°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex18 R	gtagctggacagctccaggc	Exon18			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex18 F	cggcctacgagacacctcag	Exon18	495 bp		150 nM	PCR, 61°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex20 R	tcggaccctgcaagcatcag	Exon20			150 nM	
<i>PTCH1</i> Int20 F2	ttgtggtgacttctcagcc	Intron20	160 bp		150 nM	PCR, 57°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex21 R	gtgagatggccaggagcg	Exon21			150 nM	
<i>PTCH1</i> Int20F1	gcttctgctgggttctcgag	Intron20	223 bp		150 nM	PCR, 61°C, 35x
<i>PTCH1</i> Int20 R	atccttgcgctctgaggac	Intron20			150 nM	
<i>PTCH1</i> Int20 R	aagtatccctgctatcctc	Intron20	489 bp	mit Ex20F	150 nM	PCR, 57°C, 35x
<i>PTCH1</i> Int22 F	tattccaagacacccaggc	Intron22	349 bp	mit Ex23R	150 nM	PCR, 57°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex20 F	ccgttctgacgggtgctgtg	Exon20	529 bp		150 nM	PCR, 61°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex23 R	tgctggccttgcctccag	Exon23			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex21 F	ccttcttggaccgtgtcctg	Exon21	485 bp		150 nM	PCR, 61°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex22 R	agtgggcagtcggtttaggc	Exon22			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex22 F	agtgaattggaagccacag	Exon22	464 bp		150 nM	PCR, 57°C, 35x
<i>PTCH1</i> Int22 R	catcatctcctcacatgtcc	Intron22			150 nM	
<i>PTCH1</i> Ex23 F	gacatcagcctccctgacc	Exon23	524 bp		150 nM	PCR, 61°C, 35x
<i>PTCH1</i> Ex23 RR	tcaattggagctgctcccc	Exon23			150 nM	

Ex, Exon

**Tabelle 6. Primersequenzen, PCR- und Gelelektrophoresebedingungen für die SSCP/Heteroduplex-Analyse zur *Tp53* Mutationsanalyse.**

Exon	Sequence	Amplikonlänge	T <sub>m</sub> -Wert	SSCP Bedingung 1	SSCP Bedingung 2
<i>Tp53</i> Ex 4.1F	gggtgtgggctggtaggctg	219 bp	62°C	10% 1 : 49 RT	10 % 1 : 99 RT
<i>Tp53</i> Ex 4.1R	ccatggagtggtggggcag				
<i>Tp53</i> Ex 4.2F	ctgcagcacaggaccctgtc	200 bp	62°C	10 % 1 : 29 4 °C	10 % 1 : 29 RT
<i>Tp53</i> Ex 4.2R	cacacgaaagacaactccccgg			2M Urea	
<i>Tp53</i> Ex 5F	ccgacctccgttctctcc	238 bp	62°C	12 % 1 : 29 RT	12 % 1 : 69 4°C
<i>Tp53</i> Ex 5R	ccacaggcgggttgagggc				
<i>Tp53</i> Ex 6F	ggcttctgacttattctgc	181 bp	56°C	10 % 1 : 29 4°C	10 % 1 : 49 RT
<i>Tp53</i> Ex 6R	caactgtcttaagacgcac			2M Urea	
<i>Tp53</i> Ex 7F	gctgcaggcacctgtagtg	200 bp	60°C	10 % 1 : 29 4°C	10 % 1 : 79 RT
<i>Tp53</i> Ex 7R	gctaacctaacctaccacgc			2M Urea	
<i>Tp53</i> Ex 8F	ctggctctttctgtcccg	210 bp	60°C	10 % 1 : 29 4°C	10 % 1 : 79 RT
<i>Tp53</i> Ex 8R	gggtgaagctcaacaggctc			2M Urea	
<i>Tp53</i> Ex 9F	caccttgctctctcttc	197 bp	58°C	10 % 1 : 29 4°C	10 % 1 : 99 RT
<i>Tp53</i> Ex 9R	cctggcaacctgctaataac			2M Urea	
<i>Tp53</i> Ex 10F	gtggtgtgtgacctgtcc	204 bp	60°C	10 % 1 : 29 4° C	12 % 1 : 29 RT
<i>Tp53</i> Ex 10R	gtctgggtagagcaccacag			2M Urea	

RT, Raumtemperatur

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierexperimente

#### 2.2.1.1 Haltungsbedingungen

Die Erhaltungszucht der Mäusestämme *Nos2* knockout Maus C57BL/6J; 129P2-Nos2tm1Lau/J (Laubach et al. 1995) und *Ptch1* knockout Maus C57BL/6J; 129P2-Ptch1tm1Mps/Ptch+ (Jackson Laboratory) (Goodrich et al.1997) erfolgte auf entstaubtem Weichholzgranulat bei einer Temperatur von  $22^{+/-2}^{\circ}\text{C}$  und  $55^{+/-5}\%$  relativer Luftfeuchte. Die Lichtstärke war bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus von 6.00-18.00 Uhr auf 320 Lux eingestellt. Als Trinkwasser stand ozonisiertes, mit HCl auf pH 2,6-3,0 angesäuertes Leitungswasser bereit und der Ernährung diente SSniff M-Zucht Futtergranulat der Größe 15 mm *ad libitum*. Auch die Zuchtpaare zur Kreuzung der obigen Mäusestämme und alle Versuchstiere wurden unter diesen Standardbedingungen gehalten.

#### 2.2.1.2 Kreuzungsschema zur Generierung von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen

Um mit *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> (C57BL/6J; 129P2-Ptch1tm1Mps/Ptch+) und *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> (C57BL/6J; 129P2-Nos2tm1Lau/J) Mäusen Tiere vom Genotyp *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> generieren zu können, wurden die beiden Stämme zunächst untereinander gekreuzt und der Nachwuchs mit dem Genotyp *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/-</sup> dann mit *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen zurückgekreuzt. Nach Erhalt der ersten Nachkommen des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyps wurden diese für weitere Nachzuchten des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyps mit *Nos2*<sup>-/-</sup> Tieren verpaart (Abbildung 3).

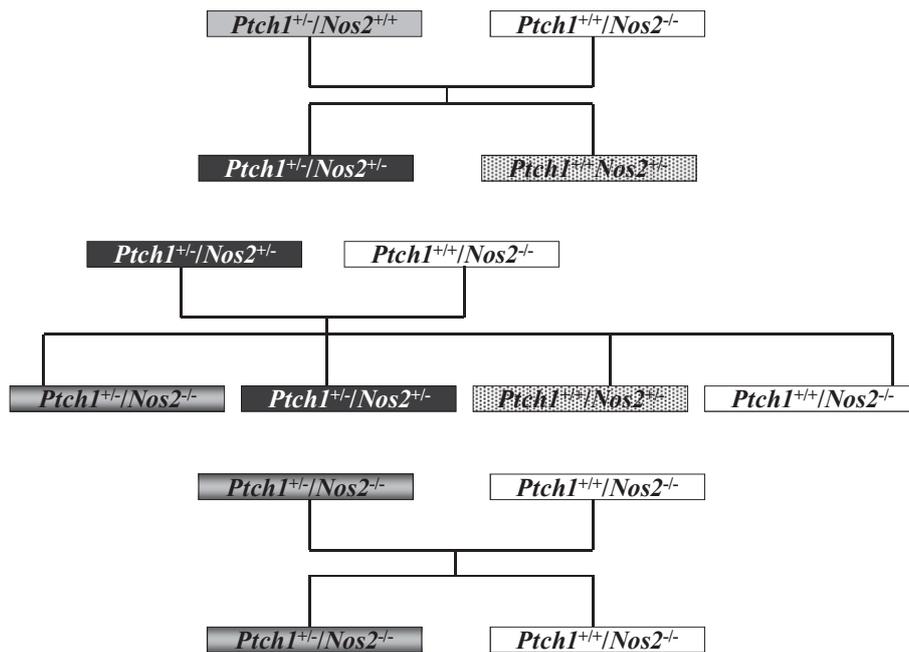


Abbildung 3. Kreuzungsschema zum Erhalt der Genotypen  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/-}$  und  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$ .

### 2.2.1.3 UVB–Bestrahlungsexperimente

#### 2.2.1.3.1 Lichttreppe zur Bestimmung der minimalen Erythemdosis

Alle UVB-Bestrahlungsexperimente wurden mit UV-Lampen mit Fluoreszenzglühlampen (280-320 nm; mit einem Maximum bei 313 nm TL 20W/12RS; Philips, Eindhoven, Niederlande) durchgeführt und die Lichtintensität mit einem UV-Meter (Waldmann, Villingen-Schwenningen, Deutschland) bestimmt. Alle Tierexperimente wurden von dem zuständigen Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen in Recklinghausen unter dem Aktenzeichen Az. 50.05-230-17/06 genehmigt. Mäusen vom Genotyp  $Ptch1^{+/+} Nos2^{-/-}$  und  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$  wurde auf dem Rücken ein 2 cm<sup>2</sup> großes Hautareal rasiert und dieses mit einer jeweils um 10 mJ/cm<sup>2</sup> ansteigenden UVB-Dosis, beginnend mit 40 mJ/cm<sup>2</sup> bis zu einer Maximaldosis von 120 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Nach 24 h und 48 h wurde das Ausmaß der Hautrötung im Bestrahlungsfenster bestimmt und die minimale Erythemdosis für die nachfolgenden Bestrahlungsexperimente festgelegt.

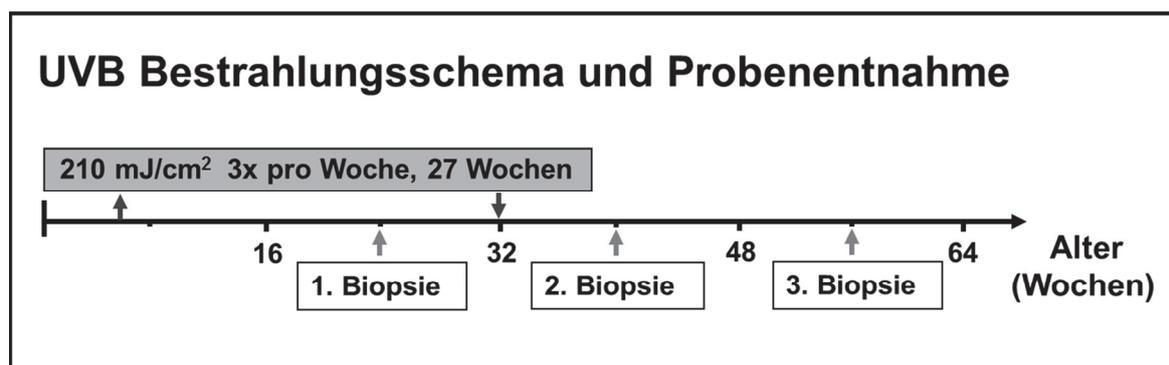
#### 2.2.1.3.2 Applikation einer UVB – Einzeldosis

15 Wildtyp-Mäusen und jeweils 15 Tieren der Genotypen  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$ ,  $Ptch1^{+/+} Nos2^{-/-}$ ,  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  wurde im Alter von 5-6 Wochen auf einer Fläche von 2 cm<sup>2</sup> am Rücken das

Fell abrasiert. Anschließend erhielten die Tiere eine UVB-Einzeldosis von  $210 \text{ mJ/cm}^2$ , die der 3-fachen minimalen Erythemdosis entspricht. Nach 8 h, 12 h und 24 h wurden 5 Tiere eines jeden Genotyps getötet und die rasierte UVB-bestrahlte Rückenhaut bis auf ein schmales, mindestens 1cm langes Hautstück für die histologische Begutachtung in flüssigem Stickstoff für molekularbiologische Analysen schockgefroren und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren gelagert.

### 2.2.1.3.3 Schema der chronischen UVB-Bestrahlung und Biopsieentnahme

124 Mäuse, gleichermaßen mit jeweils 41 Weibchen und 23 Männchen auf die Genotypen *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> verteilt, sowie 20 Wildtypmäuse und 25 *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse wurden ab einem Alter von 4-8 Wochen 3x wöchentlich (Mo, Mi und Fr) mit einer UVB-Einzeldosis von  $210 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlt. Den Tieren wurde vor der 1. Bestrahlung und nachfolgend jeweils 1x pro Woche die Rückenhaut in einem 2 x 2 cm großen Hautfenster rasiert. Dieses Behandlungsschema verlief im Erlebensfall der Maus über einen Zeitraum von 27 Wochen, woran sich ein Beobachtungszeitraum von weiteren 37 Wochen anschloss (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Verlaufsschema der chronischen UVB-Exposition zur Tumorinduktion.**

Dargestellt sind der Zeitverlauf der UVB-Exposition und das Alter der Versuchstiere bei Biopsieentnahme.

Die Versuchstierzahlen der *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse ergaben sich aus der Vorgabe jeweils 60 lebende Tiere nach 16 Wochen Bestrahlungsdauer und noch mindestens 30 Tiere nach 32 Wochen Versuchsdauer analysieren zu können. Viermal, nach jeweils 16 Wochen von dem Bestrahlungsbeginn ausgehend, wurde den Tieren ein ca. 10 x 5 mm großes Hautareal aus dem Bestrahlungsfenster der Rückenhaut entnommen, ein 1 mm breiter Streifen

davon zur histologischen Begutachtung in gepuffertem 4%igen Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die restlichen Gewebeproben wurden für molekulargenetische Untersuchungen unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurde darauf geachtet, bei späteren Biopsien kein Narbengewebe der vorherigen Biopsien zu entnehmen. Makroskopisch sichtbare Hauttumore wurden ab einer Größe von 5 mm Durchmesser und spätestens bei einem Durchmesser von 12 mm, im Idealfall zum Zeitpunkt der Biopsien, aus Tierschutzgesichtspunkten aber auch immer dann, wenn das Wohlbefinden des Versuchstiers durch den Tumor zu stark beeinträchtigt war, entfernt. Ebenso wie bei den Hautbiopsien wurde ein schmaler Streifen aus der Mitte des Tumors zur histologischen Begutachtung entfernt und das übrige Tumorgewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von jeder Haut- und Tumorbiopsie wurde ein repräsentatives Gewebestück in 4 % gepuffertem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und Schnitte zur histologischen Klassifikation und Auswerten von Hautläsionen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Anzahl an kleinen Hautläsionen ( $<0,01 \text{ mm}^2$ ), basaloide Zellproliferationen (BCPs) genannt, wurde über eine Länge von 10 mm pro Hautbiopsie ausgezählt. Unterschiede zwischen den Genotypen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und der Dunn's Korrektur auf multiples Testen mit der GraphPad Prism 5 Software (GraphPad, La Jolla, CA, USA) statistisch analysiert. Alle Gewebeentnahmen am lebenden Tier erfolgten in Allgemeinanästhesie, intraperitoneal injiziert mit 100 mg Ketanest/50 mg Rompun pro Kilogramm Körpergewicht. Das Auftreten von Tumoren und deren Wachstumsgeschwindigkeit wurde einmal wöchentlich protokolliert. Um einen möglichen Einfluss von Rasur und Biopsieentnahme auf die Tumorentstehung auszuschließen, beziehungsweise eine Aussage zur rein Genotypbedingten, nicht UVB-getriggerten, Tumorentstehung machen zu können, wurden jeweils 20 Tiere eines jeden der vier untersuchten Genotypen als Kontrolltiere über den gleichen Versuchszeitraum beobachtet, 1x wöchentlich rasiert und alle 16 Wochen biopsiert.

### **2.2.2 Präparation von Kleinhirnen neurologisch auffälliger Mäuse**

Diejenigen Mäuse, die makroskopisch einen Hydrozephalus zeigten oder innerhalb kürzester Zeit (2-3 Tage) abmagerten, einen ataktischen Gang, eine Kopfschiefelage und/oder Hinweise auf Gleichgewichtsstörungen aufwiesen, wurden durch Genickbruch getötet. Die Schädeldecke wurde eröffnet und bei Vorliegen eines makroskopisch eindeutig abgrenzbaren Medulloblastoms wurde dieses entweder vom gesunden Kleinhirngewebe abgetrennt und in

flüssigem Stickstoff für molekulargenetische Untersuchungen schockgefroren oder das komplette Kleinhirn in Tragant auf einem Korkscheibchen zur Erstellung von Gefrierschnitten für immunhistochemischen Untersuchung in Isopentan schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Konnte makroskopisch nicht eindeutig ein Medulloblastom nachgewiesen werden oder wenn es sich um ein junges Tier (3-6 Wochen alt) mit Hydrocephalus handelte, wurde das gesamte Gehirn 24-48 h in gepuffertem 4 %-igen Formalin fixiert, anschließend das Kleinhirn abgesetzt und in der Frontalebene halbiert. Das Großhirn wurde ebenfalls frontal in drei etwa gleichstarke Scheiben getrennt und gemeinsam mit den Kleinhirnhälften zur histologischen Begutachtung in Paraffin eingebettet.

## 2.2.3 Molekulargenetische Untersuchungsmethoden

### 2.2.3.1 Methoden der Nukleinsäureaufreinigung

#### 2.2.3.1.1 CsCl-Gradientenzentrifugation

Protein und Nukleinsäuregewinnung aus Hirntumoren und Normalhirngewebe erfolgte mit Hilfe der Ultrazentrifugation über einen Caesiumchloridgradienten. Diese Methode ist besonders dann gut geeignet, wenn man neben der RNA auch DNA und Proteine der gleichen Gewebeprobe untersuchen möchte, da sich auf Grund des während der Ultrazentrifugation entstehenden Dichtegradienten RNA, DNA, Proteine und Lipide in verschiedenen Schichten des Gradienten anreichern. Von jeder Gewebeprobe wurde vor dem Homogenisieren ein repräsentatives Stück in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anhand von histologischen mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Schnittpräparaten wurde der Tumorzellgehalt der Tumorproben bzw. das Fehlen von Tumorzellen in der Normalgewebeskontrolle überprüft.

Die Gewebeprobe wurden in 6 ml GITC-Lösung (4M Guanidinisothiocyanat in 25 mM Natriumzitat pH 7,0; 0,8 % 2-Mercaptoethanol) in 50 ml Falcon-Röhrchen mit Hilfe von Polytron-Messern mit dem Ultra-Turrax T25 (Janke und Kunkel IKA Labortechnik) 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 vorsichtig 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  $15^{\circ}\text{C}$  in einer Beckman L8-M Ultrazentrifuge (SW41 TI Ausschwingrotor; 175273 g)

zentrifugiert. Nach erfolgreicher Einstellung des Dichtegradienten entfernt man mit einem Wattestäbchen die aufliegende Fettschicht. In den oberen 2 ml befinden sich die Proteine, gefolgt von der DNA-haltigen Interphase (ca. 5 ml), der zu verwerfenden unteren CsCl-Phase und dem RNA-Pellet. Die Protein- und DNA-Fraktionen wurden bis zur weiteren Verarbeitung separat bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um das RNA-Pellet nicht mit CsCl-Resten zu kontaminieren, wurden die Zentrifugenröhrchen nach dem Abgießen des CsCl-Überstands umgekehrt stehend für 30 min in den Kühlschrank gestellt, der nun oben befindliche Teil des Zentrifugenröhrchens mit dem RNA-Pellet abgetrennt und das RNA-Pellet in 200  $\mu\text{l}$  RNasin-Mix resuspendiert. Die Fällung der RNA erfolgte mit 20  $\mu\text{l}$  3M Natriumazetat, pH 5,2, sowie 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem 95 %igen Ethanol für 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  und anschließender Pelletierung der RNA-Präzipitate für 20 min bei 14000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  in der Hettich EBA 12 R Kühlzentrifuge. Die mit 70 %igem Ethanol gewaschene und getrocknete RNA wurde in einem geeigneten Volumen (in der Regel 50-100  $\mu\text{l}$ ) RNasin-Mix (90  $\mu\text{l}$  RNasin (40U/ $\mu\text{l}$ ), 193,5  $\mu\text{l}$  DTT, 6,916 ml DEPC-Wasser) resuspendiert, spektralphotometrisch und per Agarose-Gelelektrophorese auf Konzentration und Integrität überprüft.

Die zuvor zurückgestellten DNA-haltigen Interphasen wurden jeweils mit 350  $\mu\text{l}$  7,5 M Ammoniumazetat versetzt, 2 h sanft bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt und nachfolgend mit dem 2,5-fachen Volumen 95 %igem Ethanol versetzt, 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und für 20 min bei 2500 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  in der Hettich Rotina 46 R Zentrifuge (Ausschwingrotor; 1300 g) zentrifugiert. Die gewaschenen und getrockneten DNA-Pellets wurden in 5 ml Proteinase K-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,8; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,5 % (w/v) SDS) resuspendiert, mit 100  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Stammlösung (20 mg/ml A.dest.) versetzt und über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  unter ständiger Bewegung inkubiert. Am Tag darauf erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Entfernung störender Proteinkontaminationen, wozu man die DNA-haltige Lösung zunächst mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, sie anschließend 20 min rotieren lässt und danach 15 min mit 2500 rpm bei RT zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere, wässrige DNA-haltige Phase wurde in ein sauberes 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit dem einfachen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) für 10 min gemischt und entsprechend dem 1.Extraktionsschritt zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase präzipitierte die DNA nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  5 M NaCl und 12,5 ml 95 % Ethanol nach 2-stündiger Lagerung bei

–20°C und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 4° C und 4000 rpm. Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100-200 µl A. dest. aufgenommen. Die Quantifizierung und Qualitätskontrolle erfolgte wie unter 2.2.3.2 beschrieben.

#### **2.2.3.1.2 RNA-Extraktion aus Haut und Tumorgewebe mittels Trizol**

In flüssigem Stickstoff schockgefrorene Haut- und Hauttumorgewebeproben wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit mit dem Dismembrator-U der Firma Braun und später mit dem Precellys 24 der Firma PeqLab homogenisiert. Unter Verwendung des Dismembrators-U wurden 50-100 mg Gewebe in 500 µl Trizol in einem Teflongefäß mit einer Stahlkugel von 1 cm Durchmesser in flüssigem Stickstoff bei 2000 rpm für 2 Minuten zerkleinert. Mit weiteren 500 µl Trizol wurden die zermahlene Hautreste nach dem Auftauen mit einer Pipette in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt, nach Zugabe von 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) (CI) 30 s gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 15-minütigen Phasentrennung bei 14000 rpm und 4°C wurde der Extraktionsschritt zur besseren Aufreinigung der RNA in dem halben Volumen Trizol/CI einmal wiederholt und die RNA anschließend mit 500 µl Isopropanol über Nacht bei –80°C gefällt. Die RNA wurde für 30 min bei 4°C und 14000 rpm pelletiert, 2x mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in 50 µl RNAsin-Mix resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert. Das Aufreinigungsprotokoll mit dem Precellys 24 unterscheidet sich insofern von der zuvor beschriebenen Anleitung, als dass die in N<sub>2</sub> schockgefrorenen Gewebeproben bei Raumtemperatur und mit ca. 1g Keramikkügelchen von 1,4 mm Durchmesser für 3x 30 s bei 6500 rpm mit jeweils 45 s Pause zwischen den einzelnen Intervallen zermahlen wurden. Eine Überführung der homogenisierten Proben in Eppendorf-Gefäße entfällt, da sich diese bereits in zentrifugierbaren Gefäßen befinden.

#### **2.2.3.1.3 DNA-Extraktion zur Mausschwanz-Genotypisierung**

Die Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen, Haut und Hauttumorgewebe zur Genotypisierung bzw. Mutations- und Methylierungsanalyse erfolgte mit dem „DNeasy Blood & Tissue Kit“ der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben.

#### **2.2.3.1.4 DNA-Isolierung aus mikrodisszierten Paraffingewebeschnitten**

An Hand von Hämatoxylin und Eosin gefärbten Paraffinschnittpräparaten zur Tumordiagnostik wurde das Tumorgewebe lokalisiert und aus 10 bis 15 aufeinanderfolgenden

10 µm Schnitten mikrodiseziert, entparaffiniert und nach einem leicht modifizierten DNA-Extraktionsprotokoll mit dem „DNeasy Blood & Tissue Kit“ der Firma Qiagen extrahiert.

#### **2.2.3.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten zur Sequenzierung**

Um das zu sequenzierende PCR-Produkt von überschüssigen Nukleotiden, Primern und Primerdimeren zu befreien, erfolgte in der Regel eine Säulenaufreinigung des PCR-Reaktionsansatzes mit dem „Jet Quick PCR Purification Spin Kit“ der Firma Genomed. In seltenen Fällen wurde der PCR-Reaktionsansatz zuvor noch über ein Agarose-Gel aufgetrennt und das gewünschte PCR-Produkt ebenfalls mit dem oben genannten Kit aus dem Gel eluiert und aufgereinigt.

#### **2.2.3.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Aufgereinigte Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden spektralphotometrisch mit dem Nanodrop ND-100 der Firma PeqLab quantifiziert, wozu die Applikation von jeweils 2 µl der unverdünnten Nukleinsäurelösung auf das Probenfenster ausreichte. Erst bei Konzentrationen von über 4 µg/µl musste eine Verdünnung hergestellt werden. Nach erfolgreicher Quantifizierung wurden jeweils 100 ng DNA bzw. 500 ng RNA einer Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese auf mögliche Degradation überprüft.

#### **2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurde die Qualität von aufgereinigten Nukleinsäuren (DNA und RNA), der Erfolg von Amplifikationsreaktionen vor einer anschließenden Sequenzierung oder SSCP-Analyse, sowie das Ergebnis einer Genotypisierung oder quantitativen PCR überprüft. Je nach gewünschter Porendichte wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer (242 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, ad 1000 ml A. dest.) aufgekocht, je 100 ml TAE-Agarose-Lösung mit 2 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) versetzt und zum Aushärten in einen Gelträger mit Kämmen für die Probenaschen gegossen. Während der Gelpolymerisierung erfolgte die Probenaufbereitung, indem die PCR-Produkte oder Nukleinsäuren mit einem entsprechenden Volumen 6 x BFB-Ladepuffer (30 % Glycerol, 0,25 % Bromphenol-Blau, 0,25 % Xylen-Cyanol FF in A. dest.) versetzt wurden. Die anschließende Elektrophorese fand in 1 x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 1,8 V/cm<sup>2</sup> für 20 min statt. Das in doppelsträngige Nukleinsäuren interkalierte Ethidiumbromid

lässt diese unter UV-Licht einer Wellenlänge von 302 nm rosa fluoreszieren und mit dem GelDoc 1000 System der Firma Biorad dokumentieren.

#### 2.2.3.4 Polyacrylamid(PAA)-Gelelektrophorese

PAA-Gele fanden in der vorliegenden Arbeit bei der Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (SSCP)-Analyse als native Gele und zur Auftrennung von Sequenzierreaktionen in denaturierender Form ihre Anwendung. Die Konzentration und der Vernetzungsgrad der eingesetzten PAA-Gele waren von der Verwendung abhängig und sind, ebenso wie die genauen Laufbedingungen, im Materialteil (2.1.7) aufgelistet. Die Polymerisierungsreaktion wurde mit 0,5 µl TEMED und 5 µl 10 % APS pro ml Gellösung gestartet und das ausgehärtete Gel frühestens nach ca. 1,5–2 h weiter verarbeitet. Im Falle der SSCP-Heteroduplex-Analyse erfolgte die Probenaufbereitung und Detektion der DNA-Fragmente mit Hilfe der unter 2.2.3.9 protokollierten Silberfärbung. Alle weiteren für das Sequenziergel spezifischen Angaben zur Probenaufbereitung und Detektion befinden sich in Kapitel 2.2.3.6.

#### 2.2.3.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten (Polmerase-Ketten-Reaktion)

Mit Hilfe der Taq-Polymerase wurden kurze Sequenzen von DNA oder cDNA (Template) mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) unter Zugabe von Nukleotiden *in vitro* amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen und deren spezifische PCR-Bedingungen befinden sich im Materialteil unter 2.1.6. Der PCR-Reaktionsmix setzte sich wie folgt zusammen:

10 x Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTPs (je 2 mM)	2,5 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1,5 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1,5 µl
Taq-Polymerase (10U/µl)	0,2 µl
Template-DNA	20 ng
ad 25 µl mit Aqua dest.	

Je nach Bedarf wurden dem Reaktionsmix verschiedene Zusätze wie 5 % DMSO, 5 % Formamid oder 20 % Faktor Q (Qiagen) zugefügt, um die Sensitivität und die Spezifität der

Reaktion zu erhöhen. Die Polymerase-Kettenreaktion fand in einem PCR-Gerät der Firma Biometra unter den folgenden Bedingungen statt:

	95°C	5 min bzw. 15 min	Denaturierung (Taq bzw. Hot-StarTaq)	
25-45 Zyklen	—	95°C	20 s	Denaturierung
		55-63°C	30 s	Primer-Anlagerung
		72°C	30 s	Primer-Verlängerung
		72°C	5 min	Primer-Verlängerung

Die durch die PCR-Reaktion erhaltenen PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt, analysiert und gegebenenfalls für SSCP-Analysen oder Sequenzierungen weiterverwendet.

#### 2.2.3.5.1 PCR zur Genotypisierung von Mausschwanz-DNA

*Ptch1*<sup>+/-</sup> Tiere wurden über die Amplifikation des integrierten *lacZ* Gens aus *E. coli* detektiert. Homozygoten *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen fehlte das Amplifikationsprodukt für Exon 12. Die heterozygoten *Nos2*<sup>+/-</sup> Tiere zeigen sowohl ein PCR-Produkt für *Nos2* Exon 12 als auch für das zur Herstellung des „Knockouts“ integrierte Neomycinphosphotransferase-Gen in Kombination mit *Nos2* Exon 11.

#### 2.2.3.5.2 Genomische Duplex-PCR

Bei der genomischen Duplex-PCR wurden Ziel-Nukleotidsequenz (z.B. *p19<sup>ARF</sup>* oder *Cdkn2A*) und Kontroll-Nukleotidsequenz (*Nkx2.2*) gemeinsam in einem Reaktionsansatz von der gleichen Template-DNA amplifiziert. Die Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass beim Nachweis einer Amplifikation das kleinere Fragment der Kontroll-Nukleotidsequenz entsprach, während bei der Untersuchung von Deletionen das größere Fragment die Kontroll-Nukleotidsequenz repräsentierte, um falsch positive Ergebnisse auf Grund von bevorzugter Amplifikation kleinerer Fragmente bzw. geringerer Amplifikation größerer Fragmente zu vermeiden. Das Verhältnis der beiden Oligonukleotidpaare zueinander variierte zwischen 1:1; 2:1 und 1:2, um sicherzustellen, dass die Banden beider PCR-Produkte in den Normalgewebeskontrollen bei der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese die gleiche Intensität aufwiesen. Die Wiederholungszahl der PCR-Zyklen wurde so eingestellt, dass sich die Reaktionskinetik im logarithmischen Amplifikationsbereich und noch nicht in der Sättigungsphase befand und belief sich je nach Qualität der eingesetzten DNA (Kryo- oder

Paraffin-Material) zwischen 25 und 32 Zyklen. Nach Auftrennung der PCR-Produkte in einem 2-3%igen Agarose-Gel wurden die Intensitäten der Banden der einzelnen Fragmente mit dem GelDoc 1000 System quantifiziert und die Gendosis der untersuchten Tumore wie folgt berechnet:

$$\text{Gendosis} = \frac{\text{Signalintensität Zielgen im Tumor/Signalintensität Referenzgen im Tumor}}{\text{Signalintensität Zielgen in Kontrolle/Signalintensität Referenzgen in Kontrolle}}$$

### 2.2.3.5.3 Real-time Reverse Transkription (RT)-PCR

Die Real-time RT-PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription von RNA) basiert auf einer PCR-Reaktion in Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoffs, der in die doppelsträngige DNA interkaliert und dessen Intensität am Ende eines jeden PCR-Zyklus gemessen wird. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Produktmenge und wird als sog. Rn-Wert (normalized reporter; Verhältnis von Reportersignal zu mittlerer Grundintensität der passiven Referenz) angegeben und als Ordinate graphisch gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen. Für die Auswertung wurde ein konstanter Rn-Wert von 0,1 festgelegt, der alle Kurven im logarithmischen Amplifikationsbereich schneidet und dessen zugehörige Zyklenzahl (Ct-Werte) von der Abszisse abgelesen. Die aus zwei bis drei Parallelansätzen ermittelten mittleren Ct-Werte eines ubiquitär exprimierten und nicht regulierten Referenzgens (*MrpL32*) (O'Reilly et al. 2000) wurden von den gemittelten Zyklenzahlen der Zielgene der jeweiligen Tumorproben bzw. der mit UVB bestrahlten Hautproben subtrahiert ( $\Delta$  Ct). In gleicher Weise wurde mit Proben aus Referenzgewebe (unbestrahlte Haut bzw. Kleinhirn von Kontrolltieren im gleichen Alter wie die UVB-bestrahlten bzw. Tumor tragenden Tiere) verfahren und der  $\Delta$ Ct-Wert des Referenzgewebes von dem  $\Delta$ Ct-Wert des zu untersuchenden Gewebes abgezogen ( $\Delta\Delta$ Ct-Wert) und invers zur Basis 2 potenziert ( $2^{-\Delta\Delta \text{ Ct}}$ ), so dass Werte  $>1$  einer gesteigerten und Werte  $<1$  einer verminderten Expression im Vergleich zum Referenzgewebe entsprechen. Um Expressionswerte von PCR-Reaktionen, die zu unterschiedlichen Zeiten mit unabhängig voneinander angesetzten Reaktionsmischen ermittelt wurden, miteinander vergleichen zu können, wurde pro 96-well-Platte eine universelle Maus C57Bl6/J cDNA mitgeführt. Eine weitere Qualitätskontrolle der PCR-Reaktionen bestand in der Erstellung von Dissoziationskurven des jeweiligen Amplikons, um die Bildung von Nebenprodukten oder die Amplifikation von DNA-Kontaminationen, die die Zyklenzahl beeinflussen, auszuschließen.

Vor Beginn der Genexpressionsanalyse mussten die optimalen Primerverhältnisse für die bei allen Experimenten gleichen PCR-Bedingungen von:

40 Zyklen	{	95°C	10 min
		95° C	15 s
		60° C	60 s

ausgetestet werden. Hierzu wurden 50, 300 und 900  $\mu$ M Vorwärtsprimer mit jeweils 50, 300 und 900  $\mu$ M Rückwärtsprimer in 2 Parallelansätzen von insgesamt 25  $\mu$ l mit 12,5  $\mu$ l Master-Reaktionsmix (Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG, Invitrogen) und verdünnter cDNA eingesetzt. Die Primerkonzentrationsverhältnisse, die in der Dissoziationskurve nur einen Peak bei der errechneten Schmelztemperatur zeigten und den niedrigsten Ct-Wert aufwiesen, wurden für die anschließende Untersuchung des Kollektivs verwendet. Auch diese PCR-Reaktionen fanden in einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l mit konstanter cDNA-Menge und 12,5  $\mu$ l Master-Reaktionsmix nach obigem PCR-Programm statt. Die exakten Primersequenzen der untersuchten Gene und die genutzten Konzentrationsverhältnisse Vorwärtsprimer zu Rückwärtsprimer befinden sich im Materialteil unter 2.1.6.

#### 2.2.3.5.4 Analyse von hemizygoten Verlusten genomischen Materials

Der mögliche Verlust des *Ptch1*-Wildtypallels in Hauttumoren oder Medulloblastomen von *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen wurde in einer Duplex-PCR mit den Primerpaaren *E. coli lacZ*-F/R und mPTCH Exon 2-F/m*Ptch1* Intron 2-R überprüft. Das erste Primerpaar amplifiziert einen Teil des *lacZ* Gens aus *E. coli*, welches Exon 1 und Exon 2 in dem mutierten *Ptch1*-Allel ersetzt, während das zweite Primerpaar homolog zu dem *Ptch1*-Wildtypallel im Bereich von Exon 2/Intron 2 liegt. Bei einer Retention des *Ptch1*-Wildtypallels in Tumoren der *Ptch1*<sup>+/-</sup> Tiere resultieren zwei PCR-Produkte, die im Agarose-Gel zwei Banden gleicher Intensität ergeben, während das Fehlen der Bande des einen oder anderen PCR-Produkts auf den hemizygoten Verlust genomischen Materials in der untersuchten Region schließen lässt. 20 ng Test-DNA wurde mit jeweils 15 pmol aller 4 Primer bei einer Primer-Anlagerungstemperatur von 60°C für 32 Zyklen amplifiziert und anschließend auf einem 2% igen Agarose-Gel analysiert.

### 2.2.3.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von aufgereinigten DNA-Fragmenten erfolgte mit dem ABI-Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Der 10 µl Reaktionsansatz, bestehend aus ca. 250 ng DNA, 5 pmol Primer und 2 µl Sequenzierreaktionsmix (Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) wurde in einem Trio-Thermoblock (Biometra) nach folgendem Programm inkubiert:

$$25 \text{ Zyklen} \left\{ \begin{array}{l} 96^\circ \text{ C } 10 \text{ s } \quad (\text{Denaturierung}) \\ 50^\circ \text{ C } 5 \text{ s } \quad (\text{Primer-Anlagerung}) \\ 60^\circ \text{ C } 4 \text{ min } (\text{Primer-Verlängerung}) \end{array} \right.$$

und das resultierende PCR-Produkt mittels 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH4,6 und 2,5 Vol. 96% Ethanol präzipitiert. Die Sequenzierreaktion von Bisulfit-behandelter DNA erfolgte bei einer Primer-Verlängerungstemperatur von 50°C anstatt 60°C. Die zweimal mit 70% Ethanol gewaschenen und luftgetrockneten DNAs wurden in 4 µl Ladungspuffer (4 ml Formamid, 1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 250 mg Blue Dextran) resuspendiert und über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (21 g Harnstoff, 8,4 ml PAA 29:1, 3,3%, 6 ml 10x TBE, 20 ml A. dest., 350 µl 10 % APS und 30 µl TEMED) aufgetrennt. Die durch den Laser angeregten fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide detektierte die CCD Sensor des ABI Prism 377 DNA Sequencer. Der Auswertung diente die ABI Prism Sequencing Analysis Software (Version 3.4.1).

### 2.2.3.7 cDNA-Synthese

Mit Hilfe der cDNA-Synthese wurde aufgereinigte, relativ instabile RNA in die stabilere „complementary“ DNA (cDNA) umgeschrieben, wobei die relativen Verhältnisse der RNAs zueinander erhalten bleiben und in einer anschließenden quantitativen PCR eine Aussage über die relative Expression verschiedener mRNAs möglich ist. 3 µg Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 27,2 µl DEPC-Wasser für 10 min bei 70° C denaturiert und auf Eis mit 22,8 µl cDNA-Synthese-Reaktionsmix ( 0,4 µl 0,1 M DTT, 1,0 µl RNAsin, 4,9 µl BSA (1mg/ml), 2,5 µl dNTP-Mix (25 mM für dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 3,0 µl pd(N)<sub>6</sub> (1,5 mg/ml), 10,0 µl 5x H-RT-Puffer und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl) versetzt. Die anschließende 60-minütige Inkubation bei 42° C reichte für eine suffiziente

Umschreibung der mRNA in cDNA aus. Nach Terminierung der Reaktion für 10 min bei 80°C wurde diese cDNA-Stocklösung zur weiteren Verwendung in semi-quantitativen PCR-Reaktionen 1:25 mit A. dest. verdünnt.

#### 2.2.3.8 Bisulfitsequenzierung der *Ptch1*-CpG Insel

Der Nutzen der Bisulfitbehandlung von DNA im Hinblick auf die Analyse des Promotormethylierungsstatus besteht darin, dass nicht methylierte Cytosine in Uracile umgewandelt werden, während methylierte Cytosine als solche erhalten bleiben. Die Bisulfitbehandlung erfolgte mit dem Methylation-Gold Kit der Firma Zymo Research nach den Herstellerangaben. Mit Hilfe von Primersequenzen, die so auf die bisulfitbehandelte DNA abgestimmt waren, dass in diesen keine CpG Dinukleotide lagen und mindestens zwei umgewandelte Cytosine am 3' Ende enthalten waren, wurden die ersten 700 Basen der *Ptch1* CpG-Insel in fünf überlappende Fragmente eingeteilt und diese mit 40 Zyklen bei einer Anlagerungstemperatur von 56°C unter Verwendung von Hot-Star-Taq (Qiagen) von ca. 300 ng bisulfitbehandelter Template-DNA amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und anschließend sequenziert.

#### 2.2.3.9 Einzelstrang-Konformation-Polymorphismus (SSCP) - Analyse

Zur Identifizierung von Mutationen und Polymorphismen wurde die SSCP-Heteroduplex-Analyse durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Tatsache, dass einzelsträngige DNA-Moleküle, die durch Denaturierung entstehen, sequenzabhängig unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden. Die Sekundärstruktur eines einzelsträngigen DNA-Fragments kann bereits durch Substitution einer Base verändert sein. Bei der Elektrophorese führen diese veränderten Sekundärstrukturen zu einem veränderten Laufverhalten im Vergleich zu der Wildtyp-Sequenz. Ein Teil der Einzelstränge renaturiert auch wieder und kann eine Duplexbande an der Farbmalerlauffront bilden. Zur Analyse von Mutationen innerhalb von Exon 5 bis einschließlich Exon 10 des Tumorsuppressorgens *Tp53* wurden 150-250 bp lange überlappende PCR-Fragmente amplifiziert, die die gesamte kodierende Region in dem angegebenen Bereich überspannten. Die Primersequenzen, PCR- und Elektrophoresebedingungen für die einzelnen Amplikons befinden sich im Materialteil unter 2.1.7. Für jedes zu analysierende DNA-Fragment wurden die Gelbedingungen vor Durchführung der SSCP-Analyse anhand weniger Proben ausgetestet und jeweils zwei in

Temperatur und Gelzusammensetzung unterschiedliche Bedingungen gewählt, die zu einer möglichst eindeutigen und scharfen Auftrennung der Einzelstrangbanden führten. Nach Überprüfung der Qualität der PCR-Produkte auf einem 2 % igen Agarose-Gel wurden ca. 100 ng eines jeden PCR-Produkts mit 6 µl SSCP-Ladepuffer (20 ml Formamid, 5 ml A. dest., 1 Spatelspitze Xylencyanol FF, 1 Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt, 10 min bei 95° C denaturiert und sofort auf das Polyacrylamidgel geladen. Die Gele wurden nach beendetem Lauf in 1x TBE-Puffer (108 g Tris(hydroxymethyl-)aminomethan, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, ad 1000 ml A. dest.) 10 min in 10 % igem Ethanol fixiert und die DNA-Banden anschließend nach folgendem Protokoll mit Silberionen gefärbt.

1-2 min	1% HNO <sub>3</sub>	(Ansäuerung)
1 x	Aqua dest.	(Waschen)
20 min	0,15 % AgNO <sub>3</sub>	(Ag <sup>+</sup> -Ionen komplexieren mit der DNA)
3 x	Aqua dest.	(Waschen)
2-5 min	285 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 0,02% Formaldehyd	(Ag <sup>+</sup> -Ionen fallen nach Reduktion mit alkalischem Formaldehyd aus)
2 min	10% Essigsäure	(Abstoppen der Reaktion)

Gel auf Whatman-Papier im Vakuumtrockner (Modell 583, BioRad) bei 80°C für 2 h trocknen. DNA-Fragmente, die in einer Wiederholungs-PCR und anschließender SSCP-Analyse verifiziert aberrante Bandenmuster zeigten, wurden sequenziert, um Art und Position der DNA-Veränderung zu identifizieren.

### 2.2.3.10 Globale Expressionsanalyse muriner Tumor- und Normalgewebeproben

Die globale Expressionsprofilierung muriner Normalgewebs- und Tumorproben erfolgte mit am DKFZ Heidelberg hergestellten Mikroarrays, die einen Set von 35.852 Oligomeren, die ca. 25.000 murine Gene repräsentieren, aufwiesen (Mouse Oligo Set Version 4.0; Operon, Köln, Deutschland). Die praktischen Arbeiten und die statistische Auswertung erfolgten in Kooperation mit Daniel Haag aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Lichter, Abteilung für Molekulare Genetik am DKFZ in Heidelberg. Die Integrität und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA der Tumor- und Hautproben, sowie die kommerzielle „universal reference RNA“ (Stratagene, La Jolla, CA) wurde vor der *in vitro* Transkription mit dem Bioanalyser

2100 (Agilent, Santa Clara, CA) überprüft und nur solche RNAs in die Hybridisierung eingesetzt, deren „RNA integrity number“ (RIN)  $\geq 7$  betrug. Die mRNAs der zu untersuchenden Tumor- und Normalgewebeproben wurden nach dem TACKLE Protokoll (Schlingermann et al. 2005) *in vitro* transkribiert und die cDNA in separaten Reaktionen mit Cyanin 3 und Cyanin 5 markiert. Jede Tumorprobe wurde so gegen eine universelle Referenz hybridisiert, wobei Tumor- und Referenz-RNA unterschiedliche Fluoreszenzlabel hatten, deren Orientierung in einem Farbwechselexperiment getauscht wurde. Der auf 23 h ausgedehnte Hybridisierungsprozess mit der anschließenden automatisierten Waschprozedur in einer Gene Tac Kammer (Genomic Solutions, Ann Arbor, Michigan, USA) erfolgte wie bei Schlingermann et al. (2005) beschrieben. Die Fluoreszenzsignale wurden mit dem 2 Farben-Scanner G25505B (Agilent, Santa Clara, CA) mit 5  $\mu\text{m}$  Auflösung ausgelesen, danach mit der GenePixPro 6.0 Software analysiert und in der Chip Yard Plattform, die den Varianz stabilisierten Normalisierungsalgorithmus (Huber et al. 2002) verwendet, weiter prozessiert (<http://dkfz.de/genetics/ChipYard/>). Die differenzielle Genexpression für unterschiedliche Gruppenvergleiche wurde unter Anwendung der Limma-Analyse (Smyth 2004) basierend auf einer „R“-gestützten Analogdatenverarbeitung ermittelt und biologischen Prozessen und Signalwegen mit Hilfe der Ingenuity Pathway Analysis Software ([www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) zugeordnet. Zu Genset Anreicherungsanalysen (GSEA) wurde die GSEA Software ([www.broadinstitute.org/gsea/](http://www.broadinstitute.org/gsea/)) verwendet (Mootha et al. 2003; Subramanian et al. 2005).

## 2.2.4 Zellkulturexperimente

### 2.2.4.1 Anlage von Zellkulturen aus murinen Medulloblastomen

Das Tumorgewebe von cerebellären Medulloblastomen der Maus wurden steril entnommen, in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert und mit wenig PBS versetzt zur weiteren Homogenisierung mehrmals durch eine Injektionskanüle gepresst. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in eine entsprechende Menge IMEM Kulturmedium gegeben, in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C und 5 % Kohlendioxidatmosphäre inkubiert. Nachdem sich ein Teil der Zellen nach 3-4 Tagen abgesetzt hatte und adhärent wuchs, erfolgten ein Mediumwechsel und die Passagierung der Zellen wie unter 2.2.4.2 beschrieben.

#### 2.2.4.2 Kultivierung und Pflege muriner Medulloblastomzelllinien

Die Zellen der nach 2.2.4.1 generierten primären murinen Medulloblastomzelllinien wurden in Modified Eagle Medium unter Zugabe von jeweils 1 % Penicillin und Streptomycin (PAA Laboratories), 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS; PAA Laboratories) (IMEM+) bei 37°C und 5 % Kohlendioxidatmosphäre kultiviert. Zur Passagierung wurden die einmalig mit 10 ml PBS gewaschenen Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA (Gibco BRL)/ 75 cm<sup>2</sup> Kulturschale 2 min bei 37°C vom Gefäßboden abgelöst und anschließend die Trypsinierung durch Zugabe von 5 ml IMEM+ gestoppt. Die Zellsuspension wurde entweder auf eine entsprechende Anzahl neuer Kulturschalen verteilt oder durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 rpm pelletiert, in Einfriermedium (90 % IMEM+, 10 % DMSO) resuspendiert und langsam auf –80°C runtergekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Rekultivierung der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurde der tiefgefrorenen Zellsuspension 1 ml auf 37°C vorgewärmtes IMEM+ - Medium zugesetzt und durch ständiges Auf- und Abpipettieren des flüssigen Mediums die gefrorenen Zellen schonend aufgetaut. Mit ausreichend frischem DMSO-freiem Medium versetzt, konnte die Kultivierung der Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre erneut aufgenommen werden.

#### 2.2.4.3 Nos2 Inhibierung und funktionelle Analysen nach „Knockdown“ von *Gap43*

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden von Daniel Haag am DKFZ in Heidelberg durchgeführt und sind der Veröffentlichung von Haag, Zipper und Mitarbeitern entnommen (Haag, Zipper et al. 2012). Die Hemmung der NO Synthesen wurde in c17.2 und D458 Zellen, jeweils mit einer Zelldichte von 2x10<sup>5</sup> und 4x10<sup>5</sup> Zellen pro well in 12-well Platten ausgesät, durchgeführt. Die Zellen wurden täglich entweder mit 1 mM L-NAME oder 1x PBS als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Für die „knockdown“ Experimente von *Gap43* wurden c17.2 Zellen in 12-well Platten bis zu einer 80 %igen Konfluenz angezogen und mit 2µg pLKO.1-puro Vektor, der entweder gegen *Gap43*, gegen GFP oder als Kontrolle gegen Nicht-Ziel-RNA gerichtete shRNA Konstrukte (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) enthielt, unter Verwendung von 9 µl FuGene HD Reagenz (Roche, Basel, Schweiz) transfiziert. Die Transfektion wurde zwei Mal, jeweils nach 8 Stunden, wiederholt und die Zellen für 24 h Selektionsbedingungen (1 µg/ml Puromycin) ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert, auf eine Zellzahl von 4x10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt und in die Einsätze von Costar

Transwell-Platten mit Polycarbonatmembran (8 µm Poren, Corning, USA) ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Zellernte für die Genexpressions- und Proteinanalyse oder es wurde 0,1 µg/µl rekombinantes SDF-1α (stromal cell-derived factor 1α) in das untere Kompartiment der Transwell-Platte für den Migrationsversuch appliziert. Nach 12-stündiger Inkubation wurden die Zellen am Boden der inserierten Membran Methanol fixiert, Hämatoxylin gefärbt und anschließend gezählt.

## 2.2.5 Immunhistologische Methoden

### 2.2.5.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Zur Entparaffinierung wurden Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Schnitte für 15 Minuten in Xylol gestellt, mit frischem Xylol gespült und nacheinander durch eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % und 50 %) bis zu vollentionisiertem (VE) Wasser geführt. Die Freilegung der Antigene erfolgte mittels Dako Target Retrieval Lösung (pH 6,0) (Dako, Glostrup, Dänemark) für 20 Minuten in einem Dampfgerät. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Schnitte 2x mit VE-Wasser gespült, 5 min in TBST (150 mM NaCl, 7,7 mM Tris-HCl, 0,01 % Tween 20) äquilibriert und anschließend die endogene Peroxidase 10 min mit Ultravision Hydrogen Peroxide Block (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) abgesättigt. Nach 1x 5 min Waschen mit TBST wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf den Gewebeschnitten für 5 min mit Ultravision Protein Block (Thermo Fisher Scientific) blockiert und nach Abgießen der Blockierungslösung mit dem Erstantikörper (1:200 bis 1:400 in Dako Real<sup>TM</sup> Antibody Diluent) über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Morgen folgten 3 Waschschrte von jeweils 3 min mit 1x TBST bei, 1h Inkubation mit dem Sekundäantikörper (1:500 verdünnt in Dako Real<sup>TM</sup> Antibody Diluent) bei RT, erneut 3 Waschschrte und 40 min Inkubation mit ABC-Lösung aus dem Vectastain ABC-Kit nach Herstellerangaben (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), ebenfalls bei RT. Nach 3 letzten Waschschrten mit TBST wurden die gebundenen Tertiäantikörper 2 min mit 2 % DAB (3,3'-Diaminobenzidin) in DAB Plus Substrate (Thermo Fisher Scientific) detektiert, die Zellkerne mit Hämatoxylin 3 min gegengefärbt und einige Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-96-100 % Ethanol; Xylol) entwässerten Schnitte wurden mit Eukitt

eingedeckelt, mit dem Leica DM5000 B Mikroskop analysiert und der Leica DFC480 Kamera fotografiert.

### **2.2.5.2 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung**

FFPE-Schnitte von postnatalen Kleinhirnen wurden wie unter 2.2.5.1 beschrieben vorbehandelt und mit dem Primärantikörper gegen NeuN (1:200) über Nacht bei 4°C unter Verwendung des Dako REAL Detektionssystem inkubiert. Die mit TBS gewaschenen und für Biotin/Streptavidin blockierten Schnitte wurden anschließend mit biotinyliertem anti-Maus Sekundärantikörper inkubiert und mit 20 ng/µl FITC-konjugiertem Streptavidin gefärbt. Mit dem 2. Primärantikörper gegen Ki-67 (1:1000) wurde entsprechend verfahren. In diesem Fall wurde biotinylierter anti-Kaninchen Sekundärantikörper eingesetzt und die Ki-67 positiven Zellen mit 20 ng/µl Cyanin5-konjugiertem Streptavidin sichtbar gemacht. Die doppelt markierten Schnitte wurden mit DAPI-haltigem VECTASHIELD Einbettmedium bedeckt und die markierten Zellen mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop manuell ausgezählt. Die Anzahl proliferierender zu nicht-proliferierender Zellen wurde gegen eine entsprechende Länge der EGL Kante normalisiert und die ermittelten Zellzahlen pro Individuum über 3 Schnitte mit jeweils 10-20 µm Abstand in der Z-Achse gemittelt.

## 3 Ergebnisse

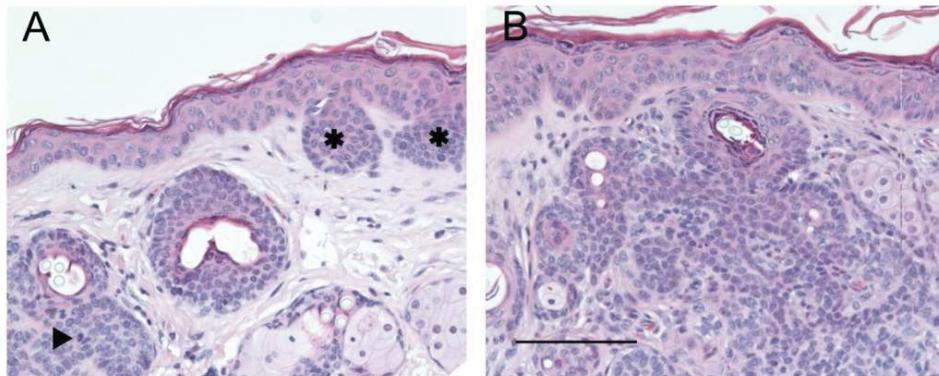
### 3.1 Inzidenz UVB-induzierter basaloider Zellproliferationen und BCC-artiger Hauttumoren

Aus der Literatur ist bekannt, dass *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäuse nur nach mehrmonatiger UVB-Bestrahlung BCC/Trichoblastom-artige Tumore (BCC<sup>TB</sup>) entwickeln (Aszterbaum et al. 1999). Um den Einfluss von *Nos2* auf die Entwicklung epithelialer Hauttumore in *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen zu untersuchen, wurden 64 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und 60 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse sowie jeweils 20 Wildtyp und *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tiere über eine Zeitspanne von 27 Wochen 3x wöchentlich mit einer UVB-Dosis von 210 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Insgesamt 80 Kontrolltiere, jeweils 20 pro untersuchten Genotyp, wurden mit Ausnahme der UVB-Bestrahlung gleichermaßen wie die chronisch UVB-exponierten Versuchstiere gehalten. Ein Großteil der Versuchstiere musste auf Grund der in den Tierschutzbedingungen festgelegten Abbruchkriterien vor Ablauf der 48-wöchigen Versuchsdauer getötet werden. Als Abbruchkriterien galten unbehandelbare entzündliche Prozesse, Symptome infolge von Kleinhirnkompensation oder Verlegung der Liquorabflusswege durch Hirntumoren sowie das Auftreten von Haut- bzw. Weichteiltumoren oder flächiger inoperabler Hauterosionen, die eine Größe von 2 cm<sup>2</sup> überschritten. Die verstorbenen oder getöteten Tiere der *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Bestrahlungstiergruppen verteilten sich folgendermaßen auf die gelisteten 6 Todesursachen (Tabelle 7).

**Tabelle 7. Zusammenfassende Übersicht der Anzahl aufgrund von Komplikationen vorzeitig aus dem chronischen UVB-Versuch genommener Versuchstiere.**

Todesursache	Anzahl der <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup> Tiere	Anzahl der <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> Tiere
1) Histologisch bestätigtes MB	9/64	18/60
2) Hydrozephalus ohne histologisches Korrelat für ein MB	0/64	1/60
3) Entzündliche Prozesse	1/64	4/60
4) Haut- und Bindegeweberkrankungen (flächige Hauterosionen, Hauttumore, Fibrosarkome)	40/64	21/60
5) Andere Tumore (Rhabdomyosarkome, Tumore ungeklärten Ursprungs)	4/64	2/60
6) Ungeklärte Todesursache (autolytische Tiere)	5/64	3/60
Nach beendeter Versuchsdauer von 48 Wochen symptomlose Versuchstiere	5/64	11/60

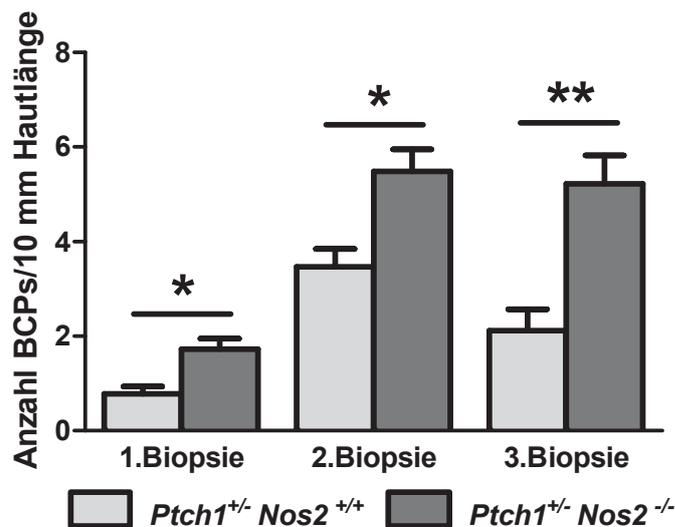
In der *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Versuchstiergruppe verstarben im Vergleich zu den *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>+/+</sup>* Versuchstieren doppelt so viele Mäuse (18 zu 9; 28% zu 14%;  $p = 0,0489$ , Fischer's Exakt Test) an einem sich später histologisch bestätigten Medulloblastom, aber nur halb so viele Tiere an Haut- und Bindegewebserkrankungen (40 zu 21; 33% zu 63%,  $p = 0,0025$ , Fischer's Exakt Test). Alle Wildtypiere und *Ptch1<sup>+/+</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Tiere überlebten die 48-wöchige Versuchsdauer ohne vorzeitigen Versuchsabbruch. Wegen der hohen unspezifischen Morbidität vor Erreichen eines Alters von 48 Wochen wurden zusätzliche Auswertekriterien festgelegt, um die einzelnen Versuchsgruppen auch vor dem Auftreten makroskopischer BCC<sup>TB</sup> besser miteinander vergleichen zu können. Neben der für alle Genotypen gleichermaßen beobachteten Epithelhypertrophie infolge chronischer UVB-Exposition wiesen die *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>+/+</sup>* Mäuse bereits in den frühen Biopsien zusätzliche histologische Veränderungen auf. Sie zeigten multiple, mikroskopisch kleine Epidermisausstülpungen bestehend aus basaloiden Zellen, die bis in die Dermis vorspringen oder vollständig in der Dermis liegen. Diese Zellauswüchse nahmen ihren Ursprung entweder von der interfollikulären Basalzellschicht oder vom Infundibulum der Haarfollikel (Abbildung 5). Vom Ursprung und Erscheinungsbild ähnelten die von der interfollikulären Epidermis ausgehenden Zellnester am ehesten den humanen superfiziellen Basalzellkarzinomen, während die Proliferate, die am Infundibulum der Haarfollikel entspringen eher der mikronodulären BCC Variante oder einem Trichoblastom entsprachen. Beide Arten von Zellproliferaten werden im Folgenden als basaloide Proliferationen (BCPs) bezeichnet.



**Abbildung 5. H&E gefärbte histologische Schnittpräparate früher basaloider Proliferationen.**

Exemplarisch abgebildet ist jeweils ein histologisches Schnittpräparat der 1. (A) und 2. Biopsie (B) vom *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp. In (A) sind 2 mikroskopische Epidermisausstülpungen der interfollikulären Basalzellschicht (\*) sowie basaloide Proliferate, die dem Infundibulum der Haarfollikel entspringen (▶), zu erkennen. Die gekennzeichneten Strukturen wurden als basaloide Proliferationen (BCPs) gezählt; (B) zeigt ein mikroskopisches BCC<sup>TB</sup>. Balken, 100 µm.

Zum Zeitpunkt der 1. Biopsie, 16 Wochen nach Beginn der UVB-Exposition, zeigten 39 % der *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> (24/62) und 68 % der *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse (41/60) mikroskopisch detektierbare BCPs. Keine der unbestrahlten Kontrollmäuse und keine der UVB-exponierten Wildtyp- und/oder *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tiere wies zu diesem Zeitpunkt Basalzellproliferationen auf. Mit zunehmender Dauer der chronisch-repetitiven UVB-Exposition stieg die durchschnittliche Anzahl an BCPs signifikant an, für den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Genotyp von 0,8 BCPs pro 10 mm Hautlänge zum Zeitpunkt der 1. Biopsie auf 3,5 BCPs zum Zeitpunkt der 2. Biopsie. Für den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp erhöhte sich die Anzahl der BCPs in diesem Zeitraum von 1,7 auf 5,5 (Abbildung 6). UVB-exponierte *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten zu allen analysierten Biopsiezeitpunkten signifikant mehr BCPs als die *Nos2* suffizienten *Ptch1*<sup>+/-</sup> Tiere (Abbildung 6). Das histologische Erscheinungsbild der BCPs unterschied sich nicht zwischen den beiden Mausgenotypen.



**Abbildung 6. *Nos2* Defizienz steigert die Inzidenz von UVB-induzierten Basalzellproliferationen (BCPs).**

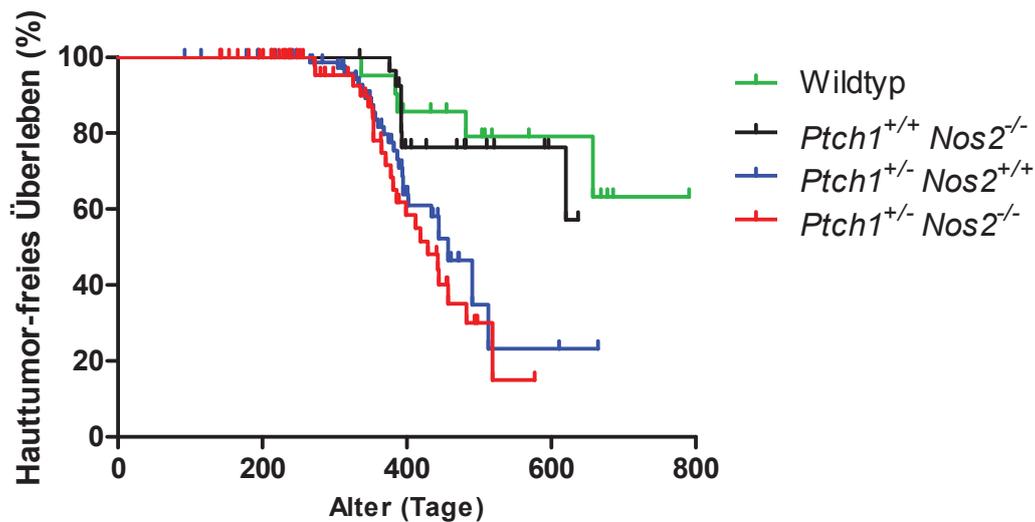
Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl mikroskopisch detektierbarer BCPs in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> versus *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen an sukzessive aufeinander folgenden Biopsiezeitpunkten (1.-3. Biopsie). Zu allen Biopsiezeitpunkten wiesen die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant höhere Anzahl an BCPs pro 10 mm Hautlänge als die *Nos2* suffizienten Mäuse auf (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ , Mann-Whitney U Test). Zusätzlich stieg die mittlere Anzahl an BCPs pro 10 mm Hautlänge in beiden *Ptch1*<sup>+/-</sup> Genotypen von der 1. zur 2. Biopsie signifikant an. Nach Ende der UVB-Exposition blieb die Anzahl an BCPs für den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp unverändert, für die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Tiere war sie sogar rückläufig. (Anzahl der untersuchten Hautbiopsien: 1. Biopsie: 62 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>/60 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse, 2. Biopsie: 50 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>/43 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse, 3. Biopsie: 22 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>/24 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse).

Die ersten makroskopischen Hauttumoren traten zum Zeitpunkt der 2. Biopsie auf: 1/20 Wildtyp, 2/20 *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup>, 2/50 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und 2/43 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen waren betroffen (Tabelle 8). Zum Zeitpunkt 48 Wochen nach Beginn der chronischen UVB-Exposition, d.h. dem Zeitpunkt der 3. Biopsie, trugen alle bestrahlten *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tiere makroskopisch sichtbare epitheliale Hauttumoren (22 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und 24 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse) (Tabelle 8).

Tabelle 8. Anzahl von Basalzellproliferationen sowie Anzahl und Größe epithelialer Tumoren.

Hauttumorfrequenz und Diagnose unter UVB						
Alter der Mäuse	22-26 Wochen			16 Wochen		
Dauer der UVB-Exposition	0 Wochen			16 Wochen		
Genotyp	WT/ <i>Ptch1</i> <sup>+/+</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	WT/ <i>Ptch1</i> <sup>+/+</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>
Anzahl Mäuse gesamt	20	20	20	20	62	60
Anzahl Mäuse mit BCPs	0	0	0	0	24	41
Mittlere Anzahl BCPs <sup>a</sup>	0	0	0	0	0.8	1.7
Mäuse mit BCC <sup>TB</sup>	0	0	0	0	0	0
Mittlere BCC <sup>TB</sup> Fläche (mm <sup>2</sup> )	0	0	0	0	0	0
Anzahl Mäuse mit BCC <sup>KT</sup>	0	0	0	0	0	0
Anzahl Mäuse mit SCC	0	0	0	0	0	0
Alter der Mäuse	39-43 Wochen			27 Wochen		
Dauer der UVB-Exposition	0 Wochen			27 Wochen		
Genotyp	WT/ <i>Ptch1</i> <sup>+/+</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	WT/ <i>Ptch1</i> <sup>+/+</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>
Anzahl Mäuse gesamt	20	20	20	20	50	43
Anzahl Mäuse mit BCPs	0	0	0	0	43	37
Mittlere Anzahl BCPs <sup>a</sup>	0	0	0	0	3.5	5.5
Mäuse mit BCC <sup>TB</sup>	0	0	0	0	0	1
Mittlere BCC <sup>TB</sup> Fläche (mm <sup>2</sup> )	0	0	0	0	0	53
Anzahl Mäuse mit BCC <sup>KT</sup>	0	0	0	0	0	0
Anzahl Mäuse mit SCC	0	0	0	1/2	2	1
Alter der Mäuse	56-60 Wochen			27 Wochen		
Dauer der UVB-Exposition	0 Wochen			27 Wochen		
Genotyp	WT/ <i>Ptch1</i> <sup>+/+</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	WT/ <i>Ptch1</i> <sup>+/+</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup>	<i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup>
Anzahl Mäuse gesamt	20	20	18	18/25	22	24
Anzahl Mäuse mit BCPs	0	2	1	0	15	21
Mittlere Anzahl BCPs <sup>a</sup>	0	0.1	0.06	0	2.1	5.2
Mäuse mit BCC <sup>TB</sup>	0	0	1	0	6	16
Mittlere BCC <sup>TB</sup> Fläche (mm <sup>2</sup> )	0	0	40	0	53	70
Anzahl Mäuse mit BCC <sup>KT</sup>	0	0	0	0	9	5
Anzahl Mäuse mit SCC	0	0	0	4/5	10	1
<sup>a</sup> pro 10 mm Hautlänge.						

Die *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren und den *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tieren eine signifikant niedrigere Wahrscheinlichkeit für Hauttumor-freies Überleben (Abbildung 7). Die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäuse überlebten mit durchschnittlich 457 Tagen geringfügig länger als die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tiere mit 429 Tagen.



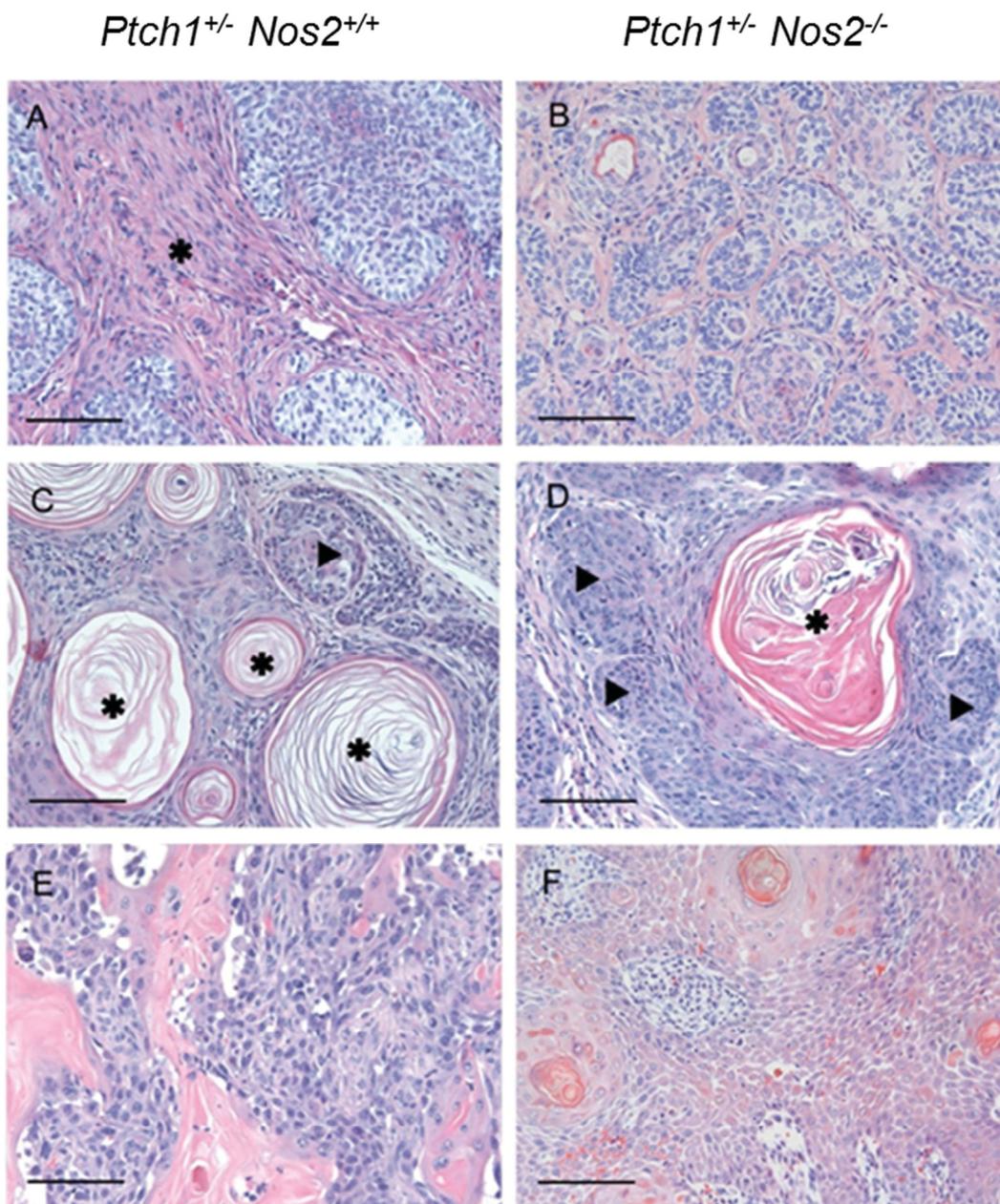
**Abbildung 7. *Ptch1*-Heterozygotie steigert die Inzidenz epithelialer Hauttumoren.**

Kaplan-Meier Analyse des Hauttumor-freien Überlebens von 21 Wildtyp Mäusen (grüne Linie), 30 *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen (schwarze Linie), 83 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen (blaue Linie) und 64 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen (rote Linie). Alle Mäuse wurden für 27 Wochen mit UVB-Licht exponiert. *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten eine auf das mehr als 2-fache gesteigerte Inzidenz an epithelialen Hauttumoren ( $p = 0,0005$ , Logrank Test) gegenüber den *Ptch1*<sup>+/+</sup> Mäusen. Senkrechte Striche repräsentieren zensierte Mäuse.

Neben epithelialen Hauttumoren traten auch vereinzelt Rhabdomyosarkome in *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen und Fibrosarkom-artige Spindelzelltumoren, unabhängig vom Genotyp, in allen UVB-exponierten Mäusen auf.

### 3.2 Histologie UVB-induzierter Hauttumoren in *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen

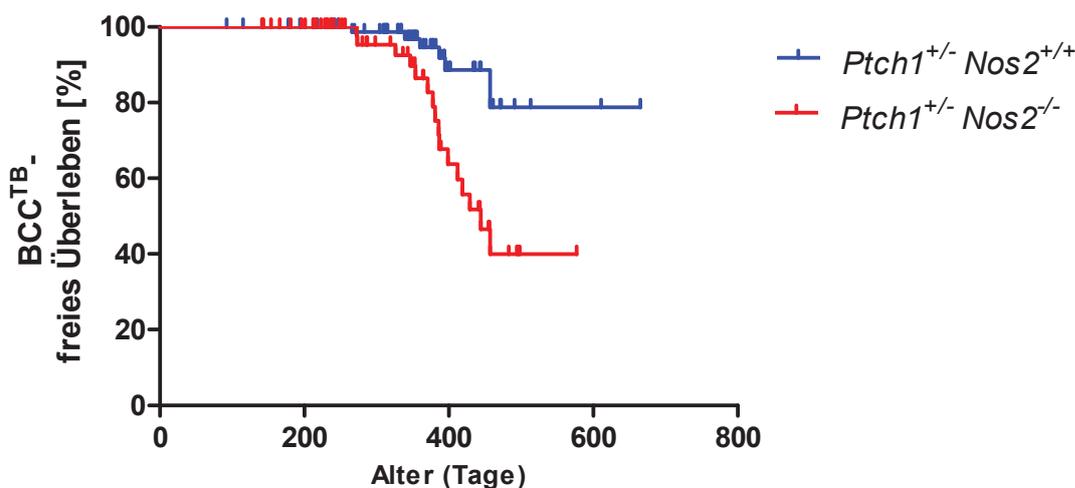
In histologischen Untersuchungen der UVB-induzierten epithelialen Hauttumore zeigten sich ausgeprägte Läsionen mit unterschiedlichem morphologischem Erscheinungsbild. Es konnten zwei histologische Subtypen BCC-artiger Tumoren unterschieden werden, ein Trichoblastom-artiger Tumorsubtyp, BCC<sup>TB</sup>, und ein keratotischer BCC-artiger Tumorsubtyp, BCC<sup>KT</sup>. BCC<sup>TB</sup> entsprachen soliden Tumoren aus gut umschriebenen Nestern basaloider Zellen mit großen Zellkernen, einem schmalen Zytoplasmasaum und relativ seltenen Mitosefiguren. Die Mehrheit der Tumorzellen war peripher palisadenartig angeordnet und wies keine Anzeichen einer terminalen Differenzierung oder Verhornung der Zellhülle auf (Abbildung 8A und 8B).



**Abbildung 8. Histologische Merkmale unterschiedlicher Subtypen UVB-induzierter epithelialer Hauttumoren in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> (A, C, E) und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> (B, D, F) Mäusen.**

(A, B) Trichoblastom-artige Basalzellkarzinome (BCC<sup>TB</sup>) waren signifikant häufiger in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen mit den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Tieren. In letzteren enthielten die BCC<sup>TB</sup> oftmals eine stärker ausgeprägte Stromakomponente (\*). (C, D) Keratotische BCC (BCC<sup>KT</sup>) überwogen zahlenmäßig in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen. Histologisch waren diese Läsionen durch Anteile mit basaloider Tumorzellendifferenzierung (▶) und Bereichen mit Keratinbildung (\*) gekennzeichnet. (E, F) Der Anteil an Plattenepithelkarzinomen (SCC) und ihr histologisches Erscheinungsbild waren in beiden Genotypen ähnlich. Balken, 100 µm.

BCC<sup>TB</sup> traten mehr als dreimal so häufig in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen verglichen mit *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Tieren auf [im Mittel 0,92 Tumore pro Maus (22 BCC<sup>TB</sup> in 24 Mäusen) versus 0,27 Tumoren pro Maus (6 BCC<sup>TB</sup> in 22 Mäusen)] und waren durchschnittlich um das 1,3-fache größer (mittlere Größe von 70 mm<sup>2</sup> verglichen mit 53 mm<sup>2</sup>). Die Kaplan-Meier-Statistik lässt ein signifikant höheres BCC<sup>TB</sup>-Risiko für die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu ihren *Nos2*-suffizienten Pendanten erkennen ( $p = 0,0011$ ) (Abbildung 9).



**Abbildung 9. *Nos2* Defizienz steigert die Inzidenz von BCC<sup>TB</sup> in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Kaplan-Meier Analyse der BCC<sup>TB</sup> Inzidenz in 83 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen (blaue Linie) versus 64 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen (rote Linie). *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine um das 2,5-fache gesteigerte BCC<sup>TB</sup> Inzidenz ( $p = 0,0011$ , Logrank Test) gegenüber *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen. Senkrechte Striche repräsentieren zensierte Mäuse.

Im Gegensatz zu den BCC<sup>TB</sup> enthalten die keratotischen BCC (BCC<sup>KT</sup>) zusätzlich zu Regionen mit basaloiden Zellnestern Areale mit Verhornung (Abbildung 8C und 8D). Anders als die typischen Plattenepithelzellkarzinome (Abbildung 8E und 8F), die zu einem geringen Anteil in Mäusen beider *Ptch1*<sup>+/-</sup> Genotypen auftraten, enthalten die BCC<sup>KT</sup> basaloide Tumorzellen. Sie zeigten eine geringere mitotische Aktivität, seltener dyskeratotische Keratinozyten und eine weniger stark ausgeprägte Akantholyse. BCC<sup>KT</sup> treten signifikant häufiger in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen auf (15/34 epithelialen Hauttumoren) im Vergleich zu den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tieren (7/41 epithelialen Hauttumoren) ( $p = 0,0125$ , Fischer's Exakt-Test). UVB-exponierte Wildtypiere und *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelten nur Plattenepithelzellkarzinome und Fibrosarkome, während nur eine von 18 unbestrahlten *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Kontrollmäusen ein BCC<sup>TB</sup> aufwies (Tabelle 8).

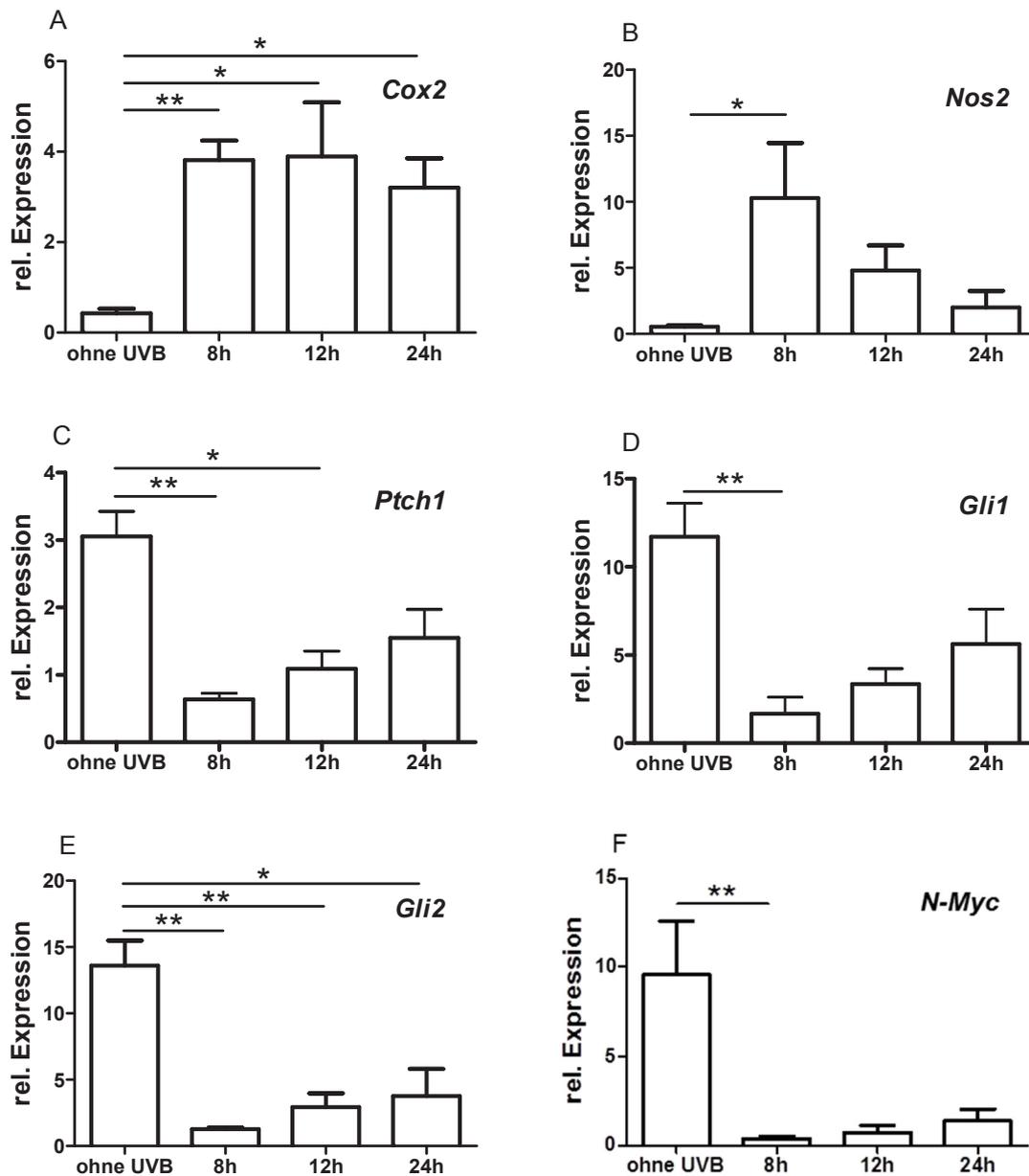
### 3.3 Molekulargenetische Analysen an UVB induzierten epithelialen Hauttumoren in *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen

#### 3.3.1 Expressionsanalyse von Shh- Zielgenen in muriner Haut nach akuter UVB-Bestrahlung

UVB-Exposition führt in humanen Keratinozyten und humaner Haut *in vitro* zu einer Repression der *Ptch1* mRNA-Expression (Brellier et al. 2005), während die *Nos2* Proteinexpression unter UVB in humanen Keratinozyten ansteigt (Chang et al. 2003). Es sollte untersucht werden, ob die *in vitro*, an humanen Keratinozyten gewonnenen Ergebnisse, den *in vivo* Verhältnissen im *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell entsprechen. Ein Anstieg der *Cox2* mRNA Expression wurde als Positivkontrolle für eine erfolgreiche UVB-Exposition gewertet (Buckman et al. 1998).

Jeweils 15 Tiere eines Genotyps wurden auf rasierter Rückenhaul mit einer UVB Einzeldosis von 210 mJ/cm<sup>2</sup>, entsprechend der 3-fachen minimalen Erythemdosis, bestrahlt. Zu definierten Zeitpunkten, jeweils 8 h, 12 h und 24 h nach erfolgter UVB-Exposition wurden 5 Tiere getötet, die Rückenhaul entnommen und aus der extrahierten RNA Expressionsprofile für die Gene *Cox2*, *Nos2*, *Ptch1*, *Gli1/2* und *N-Myc* mittels quantitativer RT-PCR erstellt.

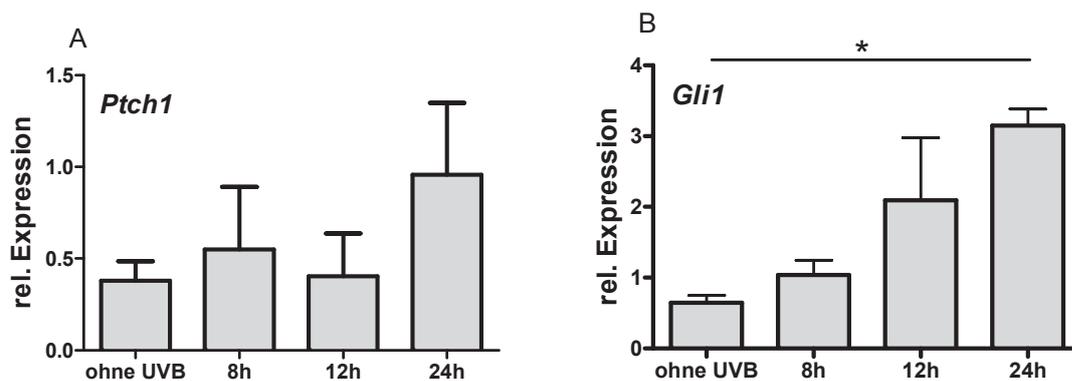
Das relative *Cox2* mRNA Expressionsniveau in muriner Rückenhaul stieg erwartungsgemäß nach einmaliger UVB-Exposition zu allen gemessenen Zeitpunkten (8h, 12h, 24h) in den Tieren der untersuchten Genotypen (*Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>, *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>, *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup>) signifikant an (exemplarisch am Wildtyp in Abbildung 10A dargestellt). Auch für *Nos2* wurde kurzzeitig, nach 8 h, in der Wildtyp-Haut ein signifikanter Expressionsanstieg festgestellt (Abbildung 10B). Die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Tiere zeigten zwar auch einen *Nos2* Expressionsanstieg, der sich jedoch statistisch als nicht signifikant erwies. Wildtyp-Rückenhaul reagierte auf die einmalige UVB-Exposition mit einer prompten Expressionsabnahme der Shh-Zielgene *Ptch1*, *Gli1/2* und *N-Myc* (Abbildung 10C- F). Bereits 12 h nach UVB-Exposition stieg das Expressionslevel der genannten Gene jedoch wieder an.



**Abbildung 10. Expression der Gene *Cox2* (A), *Nos2* (B), *Ptch1* (C), *Gli1/2* (D, E) und *N-Myc* (F) in rasierter Rückenhaul von Wildtyp-Mäusen.**

*Cox2* und *Nos2* zeigten einen signifikanten Expressionsanstieg nach einmaliger UVB-Exposition, während die Hh-Zielgene *Gli1*, *Gli2*, *Hip1* und *N-Myc* in ihrem Expressionslevel signifikant abfielen. Dargestellt sind die mRNA-Expressionslevel (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 5) zu 3 Zeitpunkten (8 h, 12h, 24h) nach einmaliger UVB Exposition mit 210 mJ/cm<sup>2</sup> und ohne UVB-Exposition (ohne UVB). Alle Daten basieren auf qRT-PCR Ergebnissen, berechnet relativ zu dem Referenzgen *MrpL32* und normalisiert auf Maus-Universalreferenz-RNA. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet (\*, p<0,05; \*\*, p<0,01, Mann-Whitney U Test).

In den *Ptch1*<sup>+/-</sup> Tieren, die durch den heterozygoten *Ptch1* Knockout per se schon eine gegenüber dem Wildtyp auf die Hälfte reduzierte Expression des *Ptch1* Wildtypallels aufwiesen, kam es nach einmaliger UVB Exposition zu keiner weiteren *Ptch1* Expressionserniedrigung (Abbildung 11A). Lediglich die mittlere *Gli1* Expression stieg nach 24 h in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Tieren signifikant an (Abbildung 11B).



**Abbildung 11. Expression der Shh Zielgene *Ptch1* (A) und *Gli1* (B) in rasierter Rückenhaut von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen.**

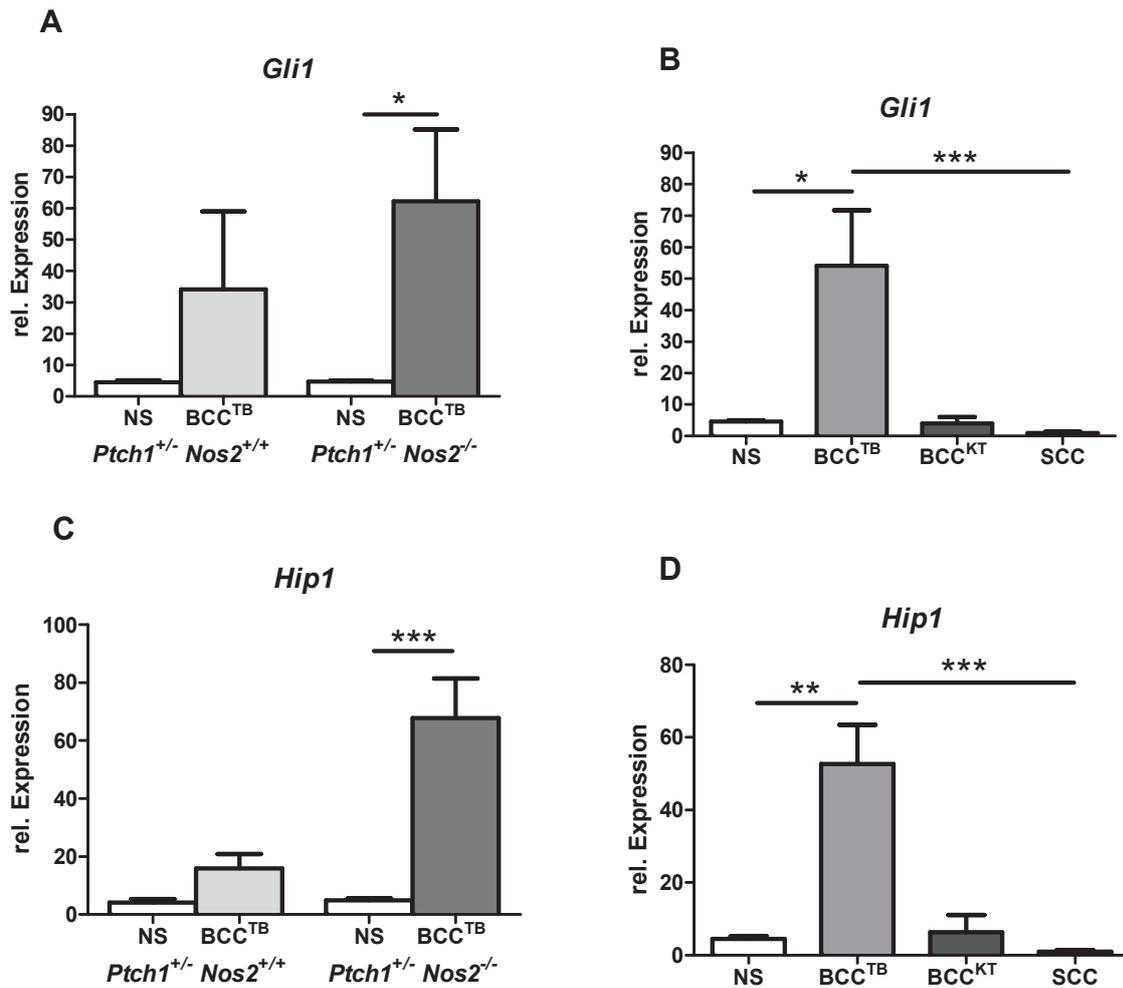
*Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäuse wiesen 24 h nach einmaliger UVB-Exposition eine signifikant erhöhte *Gli1* mRNA Expression auf, das *Ptch1* mRNA Expressionsniveau hingegen war nicht signifikant verändert. Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel (Mittelwerte mit Standardabweichung, n = 5) zu 3 Zeitpunkten (8 h, 12h, 24h) nach einmaliger UVB-Exposition mit 210 mJ/cm<sup>2</sup> und ohne UVB-Exposition (ohne UVB). Alle Daten basieren auf qRT-PCR Ergebnissen, berechnet relativ zu dem Referenzgen *MrpL32* und normalisiert auf Maus-Universalreferenz-RNA. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet (\*, p<0,05, Mann-Whitney U Test).

### 3.3.2 Expressionsanalyse von Shh-Zielgenen in chronisch UVB-exponierter Haut und UVB-induzierten epithelialen Tumoren

Die Quantifizierung des *Gli1* Transkriptlevels ist ein molekularer diagnostischer Marker bei Basalzellkarzinomen und anderen Neoplasien aus basaloiden Zellen (Hatta et al. 2005). Um die histologische Klassifizierung der murinen epithelialen Tumoren des *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodells auf molekularer Ebene zu untermauern, wurde das Transkriptlevel einiger ausgewählter Gene des Shh-Signalwegs (*Ptch1*, *Gli1/2* und *Hip1*) an 37 murinen Hauttumoren (24 BCC<sup>TB</sup>, 7 BCC<sup>KT</sup>, 6 SCC) und 10 nicht-neoplastischen Hautproben mit semi-quantitativer real-time RT-PCR untersucht. Alle BCC<sup>TB</sup>, unabhängig vom Genotyp, wiesen im Vergleich zu normaler Haut und SCC ein signifikant gesteigertes Expressionsniveau für *Gli1* und *Hip1* auf (Abbildung 12). Nach dem Aufsplitten der zahlenmäßig größten Tumorgruppe der BCC<sup>TB</sup> gemäß Genotyp (*Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> BCC<sup>TB</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup>) war in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> die Expression dieser Gene signifikant erhöht. Die BCC<sup>TB</sup> des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>

Genotyps zeigten ebenfalls eine höhere mittlere Expression als die nicht-neoplastischen Hautproben, jedoch erreichte der Unterschied auf Grund der kleinen Fallzahl nicht das Signifikanzniveau (rechte Spalte von Abbildung 12). Alle Hauttumoren in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen, unabhängig vom histologischen Subtyp, wiesen ein verglichen mit normaler nicht UVB-exponierter Haut signifikant gesteigertes *Nos2* mRNA Expressionslevel auf. Die *Ptch1* mRNA Expression war in der Mehrheit der BCC<sup>TB</sup> reduziert (14/24), jedoch in 7 Fällen erhöht, von denen 4 eine *Ptch1* Mutation aufwiesen (siehe 3.3.3.3).

Zusammengefasst zeigten alle epithelialen Tumoren der histologischen Klassifizierung BCC<sup>TB</sup> deutlich erhöhte Expressionswerte für die untersuchten Gene des Shh-Signalweges, sowohl gegenüber nicht-neoplastischem Normalgewebe als auch gegenüber den SCC. Die BCC<sup>KT</sup>, die histologisch eine Mischgruppe aus Basalzellproliferationen und SCC-Anteilen darstellen, entsprechen nach dem Expressionsmuster der Shh-Zielgene eher den SCC.



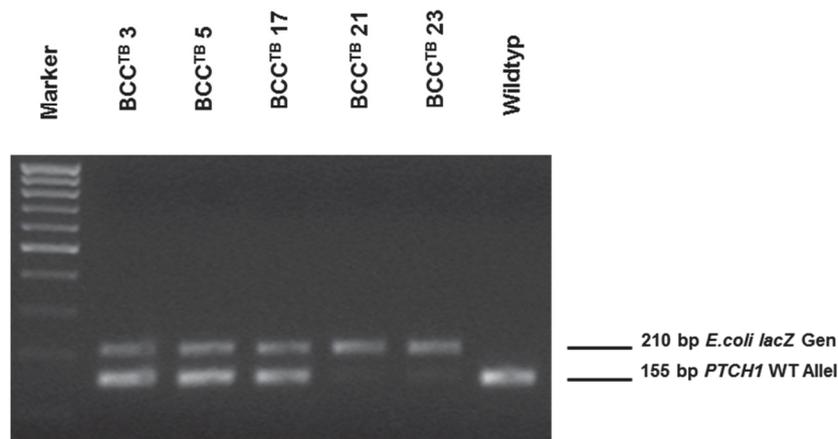
**Abbildung 12. Expression ausgewählter Shh-Zielgene in UVB-induzierten epithelialen Hauttumoren entsprechend des Genotyps ( $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$  versus  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$ ) und der Histologie.**

(A, C) Die Expression von *Gli1* und *Hip1* Transkripten ist in BCC<sup>TB</sup> der Genotypen  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$  und  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  relativ zu Haut (NS) des entsprechenden Genotyps hochreguliert, mit einer signifikant gesteigerten Expression in den  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  BCC<sup>TB</sup>. Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel (Mittelwerte mit Standardabweichung) von 7 BCC<sup>TB</sup> des  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$  Genotyps, 17 BCC<sup>TB</sup> des  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  Genotyps und von jeweils 5 Hautproben (NS) des zugehörigen Genotyps. (B, D) Vergleicht man die *Gli1* und *Hip1* Expression Genotyp-unabhängig zwischen den unterschiedlichen histologischen Subtypen UVB-induzierter epithelialer Hauttumoren, zeigten nur die BCC<sup>TB</sup> eine signifikant erhöhte *Gli1* und *Hip1* mRNA Expression gegenüber Haut und den SCC. Dargestellt sind die mRNA Expressionswerte (Mittelwerte mit Standardabweichung) von 24 BCC<sup>TB</sup>, 7 BCC<sup>KT</sup>, 6 SCC und 10 Hautproben. Alle Daten basieren auf qRT-PCR Ergebnissen, berechnet relativ zu dem Referenzgen *MrpL32* und normalisiert auf Maus-Universalreferenz RNA. Signifikante Expressionsunterschiede sind wie folgt gekennzeichnet (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ , Mann-Whitney U bzw. ANOVA Test).

### 3.3.3 Genetische und epigenetische Veränderungen des *Ptch1* Gens

#### 3.3.3.1 Deletionsanalyse des Wildtyp-*Ptch1*-Allels

Ein deregulierter Shh-Signalweg ist normalerweise neben einer erhöhten Expression der Effektormoleküle Gli1 und Gli2 auch durch eine erhöhte *Ptch1* Expression charakterisiert. In den hier untersuchten Hauttumoren fand sich zwar eine erhöhte *Gli1/2* Expression, aber die mittlere Expression von *Ptch1* war mit der gleich-altriger normaler Haut vergleichbar. Aufgrund dieser Beobachtung sollte der Fragestellung nachgegangen werden, wie es trotz „normaler“ *Ptch1* Expression zu einem scheinbaren Mangel an funktionsfähigem Ptch1-Protein kommt, in dessen Folge der Shh-Signalweg angeschaltet wird. Mittels Duplex-PCR wurden 14 BCC<sup>TB</sup> mit reduzierter *Ptch1* mRNA Expression auf einen möglichen Verlust des *Ptch1* Wildtyp-Allels hin untersucht. Dabei wurden die 2 verwendeten Primerpaare so gewählt, dass eines die möglicherweise deletierte Zielsequenz (Exon 2/Intron 2) von *Ptch1* abdeckt und das 2. Primerpaar ein 210 bp großes Fragment des *E. coli lacZ* Gens auf dem gentechnisch manipulierten *Ptch1* Allel abgreift. Das *E. coli lacZ* Gen ersetzt Exon 1/2 des *Ptch1* Gens auf dem inaktivierten *Ptch1* Allel. Mit dieser Methode konnte in 3 der 14 untersuchten Hauttumoren das Fehlen des WT-*Ptch1* PCR-Produkts nachgewiesen werden (Abbildung 13).

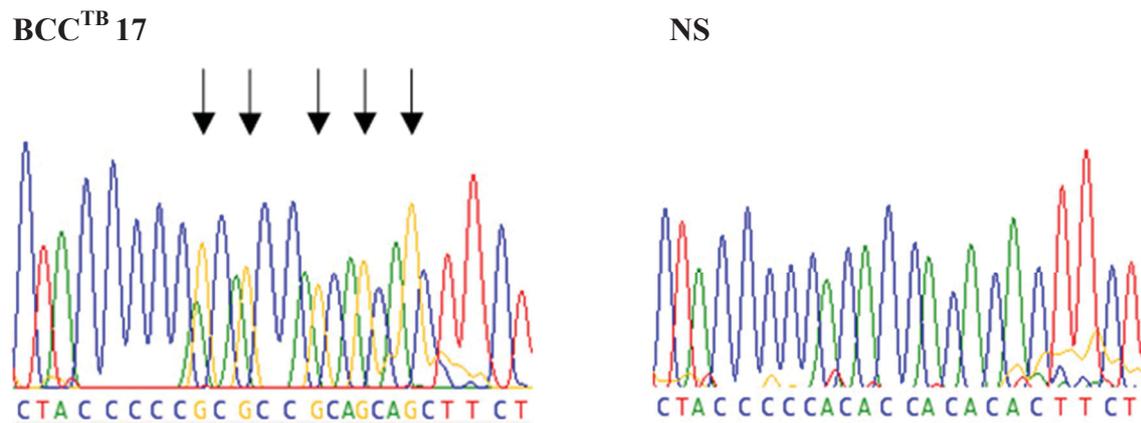


**Abbildung 13. Deletion des Wildtyp-*Ptch1* Allels in *Ptch1*<sup>+/-</sup> BCC<sup>TB</sup>.**

Exemplarische Darstellung des Ergebnisses der genomischen Duplex-PCR-Analyse des *Ptch1* Gens von 5 *Ptch1*<sup>+/-</sup> BCC<sup>TB</sup>. In Wildtyp-DNA (Spur 7) sieht man ein PCR-Fragment mit einer Größe von 155 bp (Exon 2/Intron 2). In den *Ptch1*<sup>+/-</sup> Genotypen (Spur 2-6) erwartet man neben der Wildtyp-Bande ein zusätzliches 210 bp großes Fragment des amplifizierten *lacZ* Gens aus *E. coli*, das die Exone 1 und 2 des gentechnisch veränderten *Ptch1*-Allels ersetzt. BCC<sup>TB</sup> 21 und BCC<sup>TB</sup> 23 vom *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp fehlt die untere Wildtyp-*Ptch1* Bande, was einer biallelischen *Ptch1* Inaktivierung gleich kommt.

### 3.3.3.2 Methylierungsanalyse der proximalen CpG-Insel vor dem *Ptch1* Gen

Neben dem Verlust eines Allels kann auch die Hypermethylierung der *Ptch1* Promotorregion zu einer verminderten Expression dieses Tumorsuppressorgens führen. Daher wurden in 19 BCC<sup>TB</sup> und 3 BCC<sup>KT</sup> (14 Tumore mit einer *Ptch1* mRNA-Expression von < 0,5 und 8 Tumore mit einer *Ptch1* mRNA-Expression von > 0,5 relativ zu normalem Hautgewebe) die DNA mit Natriumbisulfit behandelt und die letzten 705 bp der *Ptch1* CpG-Insel (UCSC Genome Browser, Juli 2007 Assembly) in 5 größtenteils überlappenden Fragmenten mittels PCR amplifiziert. Die untersuchten 99 letzten CpGs der insgesamt 226 CpGs umfassenden Insel umgeben den unmittelbaren Bereich um den Transkriptionsstartpunkt, der mit dem Translationsstartpunkt bei Nukleotid 63666828 (Chr13qB3; UCSC Genome Browser, Juli 2007 (NCBI37/mm9) zusammen fällt. Zudem ist in dem analysierten Bereich der Prozentsatz an CpG-Dinukleotiden mit 14% deutlich höher als mit 6 % im restlichen Abschnitt der Insel. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte die Sequenzierung der Fragmente. Als unmethylierte Kontrollen wurden 5 Proben junger, unbestrahlter Haut mitgeführt. Zwölf der untersuchten Tumoren zeigten eine Methylierung, 8 Tumoren davon bevorzugt an zwei Bereichen mit den Nukleotidfolgen GCGCGCGCC Nukleotid 63565955 bis 63565960 und GCGCGCGGCGCGG Nukleotid 63566112 bis 63566122 (Abbildung 14). Dies sind die einzigen zwei Basenabfolgen in dem untersuchten DNA-Abschnitt, in denen mindestens 3 CpGs aufeinander folgen. Zusammengefasst zeigen 9/14 BCC<sup>TB</sup> und BCC<sup>KT</sup> (79 %) mit verminderter WT-*Ptch1* mRNA Expression eine Methylierung der 5' CpG Insel von *Ptch1*, während nur 3/8 BCC<sup>TB</sup> und BCC<sup>KT</sup> (38 %) mit einer WT-*Ptch1* mRNA Expression > 0,5 eine entsprechende Methylierung aufwiesen.



**Abbildung 14. Elektropherogramme von Sequenzanalysen des *Ptch1* Promotors nach Natriumbisulfitkonversion.**

Exemplarisch dargestellt sind die Elektropherogramme eines Sequenzausschnitts von Nukleotid 63566105 bis 63566127 (UCSC Genome Browser, Juli 2007 (NCBI37/mm9)) für BCC<sup>TB</sup> 17 mit einer reduzierten Expression des *Ptch1* Wildtypallels (links) und von einer nicht-neoplastischen Hautgewebsprobe (NS) (rechts). Die mit Pfeilen markierten, die „A“s überlagernden „G“s im Tumor entsprechen methylierten „C“s, da die Sequenz des Gegenstrangs abgebildet ist.



### 3.3.3.3 Mutationsanalyse des *Ptch1* Tumorsuppressorgens

In der Regel führt bei aktiviertem Hh-Signalweg die erhöhte *Ptch1* Expression über eine negative Rückkopplung zu einer Aktivitätsminderung bis Deaktivierung des Hh-Signalweges. Bei fehlerhaftem *Ptch1* Protein funktioniert dieser Regelkreis nicht mehr und die erhöhte Expression der Gli-Zielgene lässt die betroffenen Zellen weiterhin proliferieren. In Tumoren mit erhöhter *Ptch1* mRNA Expression scheint somit ein mutagenes Ereignis im *Ptch1* Gen als Ursache für das Transformationsereignis wahrscheinlich, weshalb 12 BCC<sup>TB</sup> mit normaler bis erhöhter *Ptch1* mRNA Expression auf Mutationen im gleichnamigen Gen untersucht wurden. Bei der geringen Fallzahl und der großen Anzahl von 4317 Nukleotiden, verteilt auf 23 Exone, wurde die *Ptch1* cDNA direkt ab Nukleotid + 124 in 10 Fragmente von jeweils 500–600 bp zerlegt und sequenziert. Insgesamt 7/12 BCC<sup>TB</sup>, davon 4 BCC<sup>TB</sup> mit erhöhter *Ptch1* Expression wiesen *Ptch1* Mutationen auf. Unter den detektierten Varianten befanden sich 6 Einzelbasenaustausche, einschließlich 3 UVB-typischer C→T Transitionen, und eine Einzelbasendeletion (Tabelle 9). Bei 2 der 6 Basensubstitutionen handelte es sich um „Nonsense“-Mutationen, die in einem trunkeierten *Ptch1* Protein resultierten. Zwei weitere Veränderungen waren „Missense“-Mutationen und die letzten 2 Mutationen veränderten Splice-Donorstellen dahingehend, dass in beiden Fällen 2 Exone in der mRNA verloren gingen. Der Einzelbasenverlust in BCC<sup>TB</sup> 11 führte durch eine Verschiebung des Leserasters („Frameshift“) zur Generierung eines vorzeitigen Stop-Codons und damit durch vorzeitigen Kettenabbruch ebenfalls zu einem verkürzten Protein.

Tabelle 9. Genetische Veränderungen in den untersuchten epithelialen Hauttumoren.

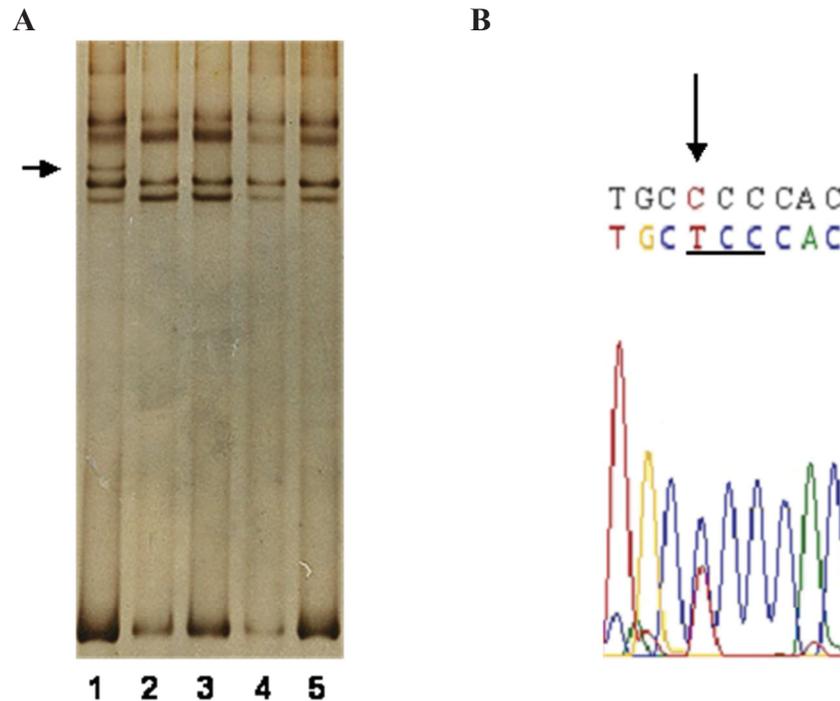
Tumor	Genotyp	Material	del <i>CDKN2A</i>	del <i>p19<sup>ARF</sup></i>	mut <i>TP53</i>	del <i>PTCH1</i>	mut <i>PTCH1</i>
BCC <sup>TB</sup> 1	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	IVS20-33G>A
BCC <sup>TB</sup> 2	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	-
BCC <sup>TB</sup> 3	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	c.3213T>C
BCC <sup>TB</sup> 4	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	-
BCC <sup>TB</sup> 5	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 6	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	IVS8-1G>A
BCC <sup>TB</sup> 7	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	c.796C>T: R266C*	+	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 8	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 9	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 10	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	-
BCC <sup>TB</sup> 11	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	c.526C>T: H176Y*	-	c.1057delA
BCC <sup>TB</sup> 12	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	+	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 13	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 14	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	-
BCC <sup>TB</sup> 15	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 16	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	+	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 17	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 18	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	c.520C>T: P174L*	+	-
BCC <sup>TB</sup> 19	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	c.2302C>T: P768S*
BCC <sup>TB</sup> 20	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	c.522C>T	-	c.2770C>T: Q924X*
BCC <sup>TB</sup> 21	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	c.1945C>T: Q649X*
BCC <sup>TB</sup> 22	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 23	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	+	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 24	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 25	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	+	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 26	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 27	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	P	-	-	c.923C>T: S308F*	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 28	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	P	-	-	c.812C>T: P271F*	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 29	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	P	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 30	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	P	-	-	c.796C>T: R266C*	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 31	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	P	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>TB</sup> 32	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	P	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>KT</sup> 1	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>KT</sup> 2	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>KT</sup> 3	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	c.521C>T: P174*	-	-
BCC <sup>KT</sup> 4	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	-	n.a.
BCC <sup>KT</sup> 5	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	c.1023delC	-	n.a.
BCC <sup>KT</sup> 6	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	c.811,812 CC>TT: P271F*	n.a.	n.a.
BCC <sup>KT</sup> 7	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	c.598C>T: P200S*	n.a.	n.a.
SCC1	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	n.a.	n.a.
SCC2	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	n.a.	n.a.
SCC3	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	n.a.	n.a.
SCC4	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	n.a.	n.a.
SCC5	Ptch1 <sup>+/+</sup> Nos2 <sup>+/+</sup>	Kryo	-	-	-	n.a.	n.a.
SCC6	Ptch1 <sup>+/-</sup> Nos2 <sup>-/-</sup>	Kryo	-	-	-	n.a.	n.a.

n.a., nicht analysiert; \* wahrscheinlich UV-induzierte Mutationen

### 3.3.3.4 Veränderungen der *Tp53* und *Cdkn2A* Tumorsuppressorgene

Um zu klären, ob neben Veränderungen in Genen des Hh-Signalweges auch andere bekannte Tumorsuppressorgene Alterationen in den UVB-induzierten murinen Hauttumoren aufweisen, wurden 52 Hauttumoren (32 BCC<sup>TB</sup>, 9 BCC<sup>KT</sup> und 11 SCC) auf Mutationen im Maus-Homolog des *TP53*-Tumorsuppressorgens (Abbildung 16) und auf Deletionen der Tumorsuppressorgene *Cdkn2A* und *p19<sup>ARF</sup>* hin untersucht, die in einer Vielzahl anderer Tumorarten, wie z.B. in akuter lymphoblastischer Leukämie (Zachariadis et al. 2012) und Glioblastomen (Rao et al. 2010) deletiert sind. Die Mutationsanalyse beschränkte sich auf die *Tp53* Exone 4 bis 10, in denen laut Ziegler und Mitarbeitern (1993) die Mutationshotspots für nicht-melanomatöse Hauttumoren beim Menschen liegen (Ziegler et al. 1993).

In 8 von 32 BCC<sup>TB</sup> (25 %) waren heterozygote, UVB-typische C→T Transitionen für *Tp53* nachweisbar, die in 6 Fällen zu einem Aminosäureaustausch führten (Tabelle 8, Abbildung 16). Von 9 BCC<sup>KT</sup> zeigten 3 Tumoren (22 %) UVB-typische C→T Transitionen und ein Tumor eine „C“ Deletion, die in einer „Frameshift“-Mutation resultierte. In den 11 untersuchten SCCs wurden keine *Tp53* Mutationen identifiziert und in keinem der Hauttumoren ließ sich eine homozygote Deletion von *Cdkn2A* oder *p19<sup>ARF</sup>* nachweisen.



**Abbildung 16. Beispiel für eine *Tp53* Mutationsanalyse mittels SSCP und Sequenzierung.**

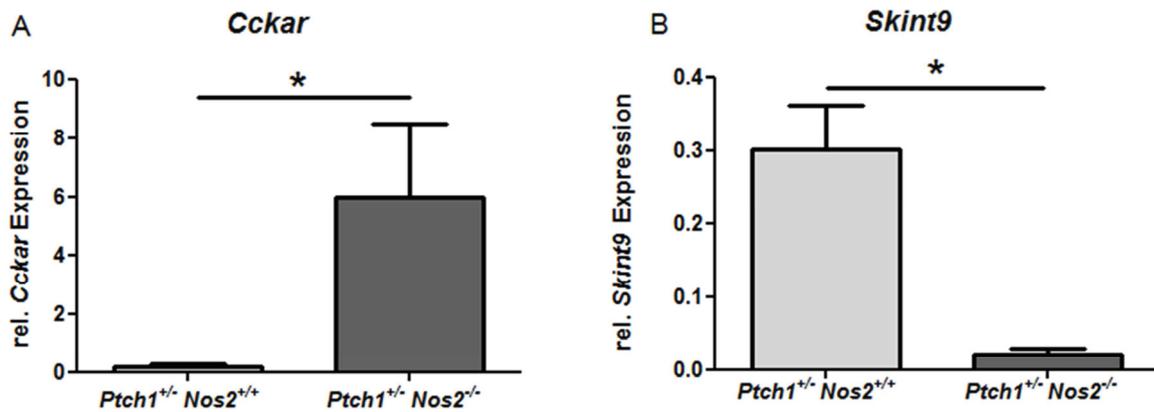
A) Exemplarische Darstellung eines SSCP-Gels von 5 Tumoren für das PCR-Fragment von Exon5 (1: BCC<sup>TB</sup> 18; 2: SCC 2; 3: SCC 3; BCC 21; SCC 1). Das Bandenmuster in Spur 1 (Pfeil) weicht von dem Bandenmuster der übrigen Tumore ab. B) Sequenzierung des Gegenstrangs von Tumor BCC<sup>TB</sup> 18. Man erkennt an der durch den Pfeil markierten Stelle in dem Elektropherogramm der Sequenzierung zwei sich überlagernde Peaks. Die Auswertung der Sequenzierung ergab einen Basenaustausch von C nach T, der zu einem Aminosäureaustausch von Prolin nach Serin führte.

### 3.3.4 Globale Expressionsanalyse epithelialer Hauttumoren in *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen

Um dem molekularen Pathomechanismus näher zu kommen, der zu einer erhöhten BCC<sup>TB</sup> Inzidenz in den *Nos2*-defizienten *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen führt, wurde eine globale Mikroarray-basierte Expressionsanalyse von 10 BCC<sup>TB</sup> (5/5 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> / *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup>), 3 BCC<sup>KT</sup> (1/2 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> / *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>KT</sup>) und 7 SCC (1/1/1/4 Wildtyp / *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> / *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> / *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup>) durchgeführt. Um dem Einfluss der UVB-Strahlung auf die Tumorigenese, den unterschiedlichen histologischen Subtypen und der *Nos2* Inaktivierung in der BCC-artigen Tumorgruppe Rechnung zu tragen, wurden folgende sechs Vergleichsanalysen an Hand der globalen Expressionsprofile durchgeführt: UVB-exponierte vs. unbestrahlte Wildtyp-Haut im Alter von 16 Wochen, BCC<sup>TB</sup> vs. SCC, BCC<sup>TB</sup> vs. BCC<sup>KT</sup>, BCC<sup>KT</sup> vs. SCC, alle *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Hauttumoren vs. alle *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Hauttumoren und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> BCC<sup>TB</sup> vs. *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup>. Der Vergleich gleichaltriger und

unbestrahlter Wildtyp-Haut identifizierte 40 differentiell exprimierte Gene, 34 mit einem Expressionsverhältnis (EV) > 2 und 6 zeigten ein EV > 0,5 (Tabelle S1 im Anhang). Mit jeweils drei betroffenen Genen stehen der „triggering receptor expressed on myeloid cells 1“ (Trem1) Signalweg, der über die gesteigerte Transkription inflammatorischer Zytokine eine proinflammatorische Antwort auslöst, der Chemokin Signalweg und die Vitamin D- und Retinoidrezeptor (Vdr/Rxr) Aktivierung an der Spitze der deregulierten Signalwege. Das am p53 Signalweg beteiligte „Phorbol-12-myristate-13-acetat-induced Protein1“ (Pmaip1) ist mit einem EV von 3 in den UVB exponierten Hautbiopsien überexprimiert. Eine UVB-bedingte Induktion der *Cox2* und der *Nos2* konnte in den Mikroarray-Analysen ebenso wenig wie eine signifikante Repression der Hh-Zielgene *Ptch1*, *Gli1*, *Gli2*, *Hip1* und *Mycn* gezeigt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den bereits beschriebenen Resultaten der „real-time“ RT-PCR. Insgesamt 30 Gene zeigten sich als differentiell exprimiert zwischen den BCC<sup>TB</sup> und SCC (Tabelle S2 im Anhang), unter anderem die bereits in der gezielten Expressionsanalyse ermittelten Gene *Gli1* und *Hip1*. Die BCC<sup>TB</sup> imponierten mit einer signifikanten Minderexpression von *Ddx3y* [DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, y-linked] und *Soat1* (sterol O-acyltransferase 1 gene) gegenüber den BCC<sup>KT</sup>. Es gab hingegen keine differentiell exprimierten Gene zwischen den histologischen Subtypen BCC<sup>KT</sup> und SCC, was nahe legt, dass es sich bei den BCC<sup>KT</sup> in der Tat um Plattenepithelzellkarzinome handelt, die zusätzlich basaloide Zellproliferate enthalten. Der Vergleich aller Hauttumoren zwischen den beiden Genotypen lieferte zwei differentiell exprimierte Gene: *Tet2* (tet oncogene family member 2 gene) und *Gdpd3* (glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 gene), beide signifikant unterrepräsentiert im *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp. Die Expressionsunterschiede für *Tet2* und *Gdpd3* ließen sich mittels qRT-PCR allerdings nicht validieren. Die vergleichende Analyse der *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> vs. *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> BCC<sup>TB</sup> ergab 46 differentiell exprimierte Gene (16 hochregulierte und 30 runterregulierte Gene), darunter auch wieder *Tet2* und *Gdpd3* die bereits beim Expressionsvergleich aller Hauttumoren zwischen den beiden *Ptch1*<sup>+/-</sup> Genotypen gefunden wurden (Tabelle S3 im Anhang). Auf Grund ihrer möglichen Funktion im Rahmen der durch einen NO-Mangel vermittelten Tumorprogression wurde *Vwf* (von Willebrand Faktor) und die beiden am stärksten differentiell exprimierten Gene *Cckar* (cholecystokinin A receptor gene) (EV von 7,64; p < 0,001) und *Skint9* (selection and upkeep of intraepithelial T cells gene 9) (EV von 0,09; p < 0,001) zur Validierung an einer etwas anders zusammengesetzten BCC<sup>TB</sup> Serie von

3 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> BCC<sup>TB</sup> und 6 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> mittels qRT-PCR ausgewählt. Eine differentielle Genexpression konnte nur für *Cckar* und *Skint9* bestätigt werden (Abbildung 17).

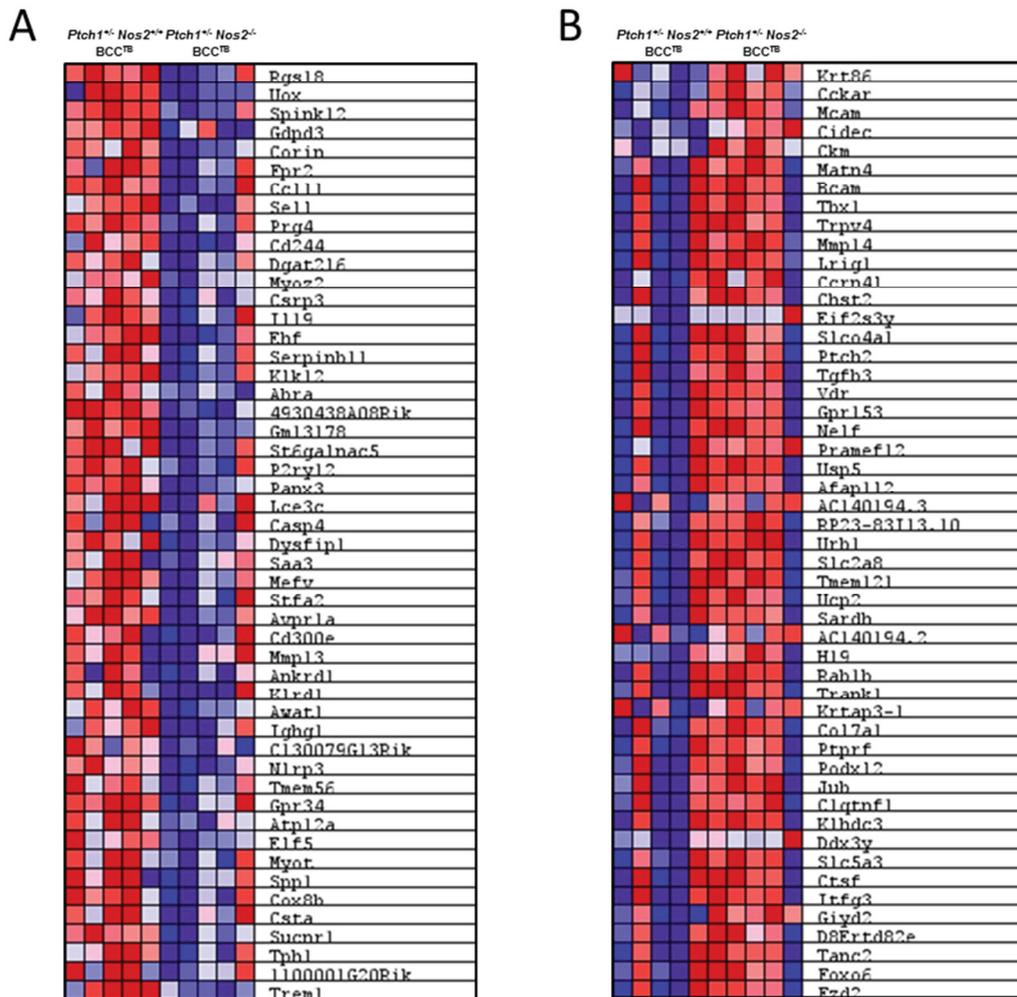


**Abbildung 17. Expression von *Cckar* und *Skint9* in UVB-induzierten BCC<sup>TB</sup> in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> versus *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

(A) Die Expression von *Cckar* Transkripten ist in den BCC<sup>TB</sup> des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyps relativ zu den BCC<sup>TB</sup> des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Genotyps hochreguliert. Umgekehrt verhält es sich mit der Expression von *Skint9* Transkripten. Diese ist in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> signifikant erniedrigt gegenüber der Expression in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> BCC<sup>TB</sup> (B). Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel (Mittelwerte mit Standardabweichung) von 3 BCC<sup>TB</sup> des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Genotyps und 6 BCC<sup>TB</sup> des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyps. Alle Daten basieren auf qRT-PCR Ergebnissen, berechnet relativ zu dem Referenzgen *MrpL32* und im Fall von *Cckar* normalisiert auf Maus Universelle RNA und für *Skint9* auf den Mittelwert von 3 nicht-neoplastischen Hautproben gleichen Genotyps im Alter von 16 Wochen. Signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet (\*,  $p < 0,05$ , Mann-Whitney U).

Während *Cckar* im gesamten Gastrointestinaltrakt und in sich davon ableitenden neoplastischen Geweben exprimiert wird (Baldwin & Schulkes 2007; Rai et al. 2011), scheint es in keinem Zusammenhang mit der Entstehung von Basalzellkarzinomen zu stehen. *Skint9* hingegen gehört zu einer Proteinfamilie mit immunglobulinartigen Domänen, die in Thymus und Haut der Maus exprimiert werden. Die Deletion oder Mutation von *Skint1*, dem Prototyp der *Skint* Genfamilie führt zu einem Verlust von  $V\gamma 5^+V\delta 1^+$  Zellen infolge fehlgeschlagener Selektion im Thymus.  $V\gamma 5^+V\delta 1^+$  Zellen machen mehr als 90 % der epidermalen T-Zellen aus und haben somit eine entscheidende Funktion bei der Infekt- und Tumorabwehr in der Haut (Boyden 2008). Basierend auf der Hypothese, dass die *Nos2* Defizienz über die Runterregulierung der *Skint9* Expression in die Selektion von  $\gamma\delta$ T-Zellen eingreift, wurden 4 Gensets: 1.  $\gamma\delta$ T-Zell spezifische Expression (Genset aus dem GSEA Katalog MSigDB 1.0); 2. Frühe transkriptionelle Antwort nach  $\gamma\delta$ T-Zell Aktivierung (Laird & Hayes 2009) und bevorzugte Expression in  $CD8^+$  oder  $CD8^-$   $\gamma\delta$ T-Zellen (Hedges et al. 2003) für eine „Gene set

enrichment analysis“ (GSEA) der *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> vs. *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> ausgewählt. Der GSEA-Vergleich der Gene aus dem Set „bevorzugte Expression in CD8<sup>+</sup>  $\gamma$ DT-Zellen zeigte, dass die gesteigerte Expression der Gene *Gnai*, *Sod1*, *Cxcr4*, *Actn1*, *Itga6*, *Trp53il3*, *Ctsd*, *Dbn1*, *Arhgef1*, *Adam10* und *Ucp2* signifikant mit dem Phänotyp der *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> korreliert. Abbildung 18 stellt jeweils diejenigen 50 Gene, die am stärksten mit den BCC<sup>TB</sup> der entsprechenden *Ptch1*<sup>+/-</sup> Genotypen korrelieren, dar.



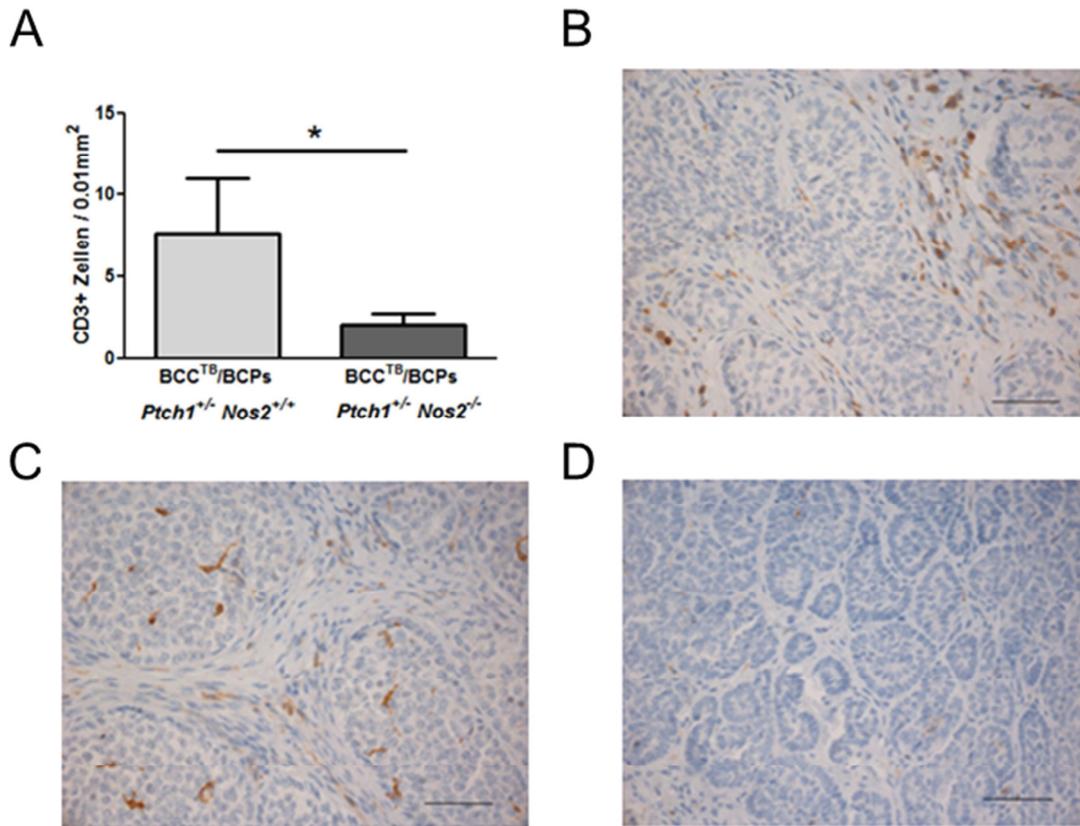
**Abbildung 18.** „Heat-maps“ der Expressionsdatensätze, die am stärksten mit den Phänotypen *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> korrelieren.

In (A) sind die 50 Gene, deren Expression am stärksten mit dem *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Phänotyp korreliert dargestellt; in (B) diejenigen deren Expression am ehesten mit dem *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Phänotyp korreliert. Rote Farbtöne repräsentieren eine von der schwachen bis zur starken Farbtintensität zunehmende Überexpression der jeweiligen Gene im entsprechenden Phänotyp, blaue Farbtöne eine sich mit zunehmender Farbtintensität verstärkende Minderexpression der jeweiligen Gene.

Nennenswert ist an dieser Stelle die erhöhte *Ptch2* Expression in den *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup>*, die auch in den *Nos2*-defizienten P9 Kleinhirnen gefunden wurde (vgl. Abbildung 24, Kapitel 3.9).

### 3.4 Quantifizierung CD3-positiver T-Zellen in epithelialen Hauttumoren vom *Ptch1<sup>+/-</sup>* Genotyp

Eine erniedrigte *Skint9* Expression in den *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Mäusen könnte über eine Beeinträchtigung der Selektion von  $V\gamma 5^+ V\delta 1^+$  Zellen im Thymus zu einem Mangel an epidermalen  $\gamma\delta$ T-Zellen führen (Boyden et al. 2008). Um dies zu überprüfen und in Ermangelung eines Paraffin-gängigen Antikörpers gegen den  $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor wurde die Anzahl CD3 positiver Lymphozyten, d.h aller T-Zellen, in 9 BCC<sup>TB</sup> von 9 Tieren (2/7 *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>+/+</sup>* / *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup>*) und von 28 BCPs (3/25 *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>+/+</sup>* / *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup> BCPs*) in 15 unterschiedlichen Mäusen bestimmt, pro Tier gemittelt und auf eine Fläche von 0,01 mm<sup>2</sup> normiert. Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung wurden die BCC<sup>TB</sup> und BCPs eines Genotyps zu einer Gruppe zusammengefasst. In der BCC<sup>TB</sup> / BCP-Gruppe vom *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>+/+</sup>* Genotyp liessen sich signifikant mehr CD3 positive Lymphozyten als in der *Nos2* defizienten Vergleichsgruppe nachweisen ( $p = 0,0264$ ) (Abbildung 19).

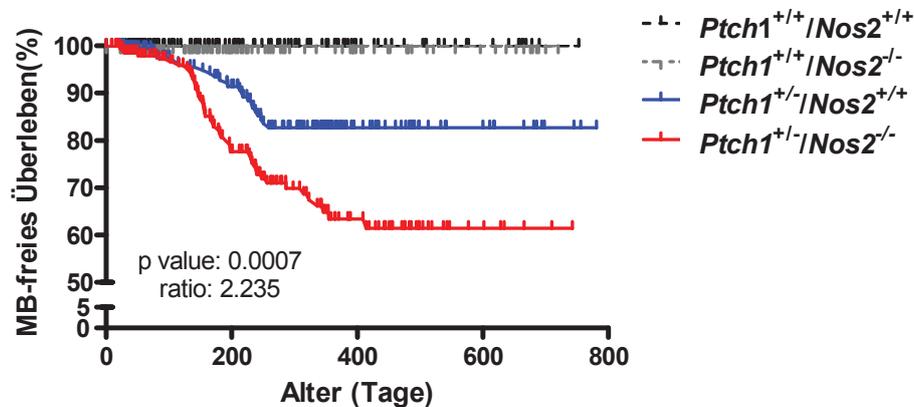


**Abbildung 19. Reduzierte Anzahl CD3-positiver T-Zellen in  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  BCC<sup>TB</sup>/BCPs.** (A) 5 BCC<sup>TB</sup>/BCPs (2/3) von 4 unterschiedlichen  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$  Mäusen zeigen gegenüber 32 BCC<sup>TB</sup>/BCPs (7/25) von 17 verschiedenen  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  Tieren signifikant mehr CD3 positive T-Zellen (\*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney U Test). (B-D) Repräsentative Ausschnitte aus zwei CD3-gefärbten  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$  (B,C) und einem  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  (D) BCC<sup>TB</sup>; (Balken = 50  $\mu$ m, Hämalaun-Gegenfärbung).

### 3.5 Inzidenz spontaner Medulloblastome in $Ptch1^{+/-}$ Mäusen

*Ptch1* haploinsuffiziente Mäuse entwickeln mit einer Inzidenz von 10-15 % spontan Medulloblastome (Goodrich et al.1997). Die Bedeutung einer putativen Tumorsuppressorfunktion der *Nos2* in murinen  $Ptch1^{+/-}$  Medulloblastomen wurde an  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  Tieren untersucht. Hierzu wurden 315  $Ptch1^{+/+} Nos2^{+/+}$ , 412  $Ptch1^{+/+} Nos2^{-/-}$ , 215  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$  und 221  $Ptch1^{+/-} Nos2^{-/-}$  Mäuse über einen Zeitraum von maximal 2 Jahren beobachtet und Kaplan-Meier-Kurven für Medulloblastom-freies Überleben erstellt (Abbildung 20). Als Zielereignis galt ein histologisch gesichertes Medulloblastom, während Tiere mit unklarer zerebraler oder anderer Todesursachen als zensiert in die Statistik eingingen. Insgesamt wurden 11 % der  $Ptch1^{+/-} Nos2^{+/+}$  Mäuse (24/215) und 21 % der  $Ptch1^{+/-}$

*Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse (47/221) auf Grund der Entwicklung eines zerebellären Medulloblastoms getötet. Keine der 315 Wildtyp und 412 *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse entwickelte ein Medulloblastom (Abbildung 20).



**Abbildung 20. *Nos2* Defizienz steigert die Inzidenz spontaner Medulloblastome in *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen.**

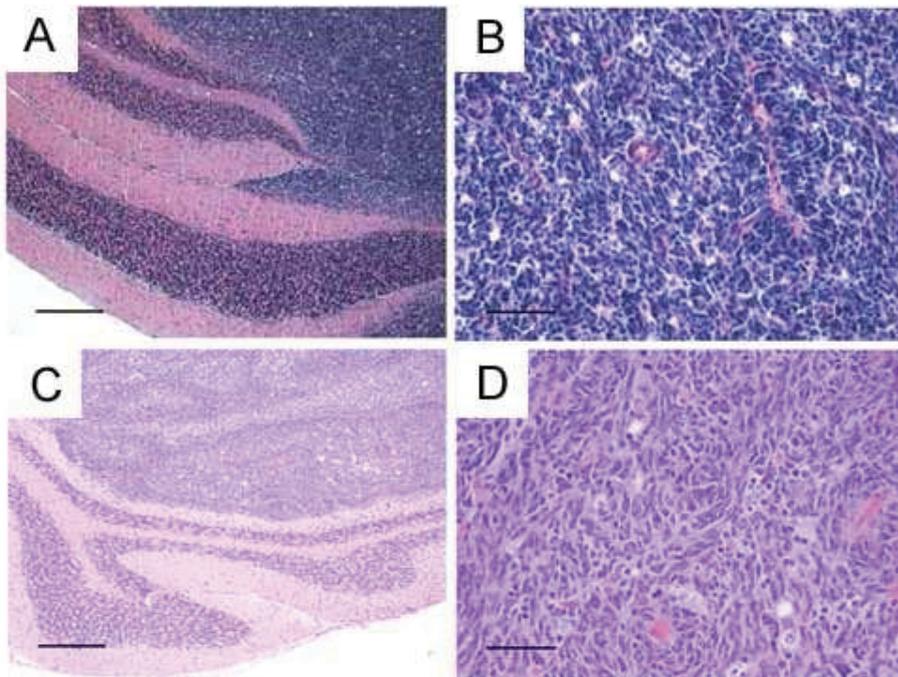
Kaplan-Meier Analyse der Inzidenz von Medulloblastomen in 215 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen (blaue Linie) versus 221 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen (rote Linie). *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen nahezu eine Verdopplung der Medulloblastom Inzidenz ( $p = 0,0007$ , Logrank Test). Bei keiner der 315 Wildtyp Mäuse (schwarze Linie) und der 412 *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse (graue Linie) trat ein Medulloblastom auf. Senkrechte Striche repräsentieren zensierte Mäuse.

Die allgemeine Sterblichkeit lag bei den „Knockout“-Tieren, unabhängig von den betroffenen Genen, etwas höher als beim Wildtyp. Die Wahrscheinlichkeit für ein *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tier an einem Medulloblastom zu sterben, war hingegen gegenüber den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Tieren mehr als 2-fach gesteigert. Im Median verstarben die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tiere im Alter von 170 Tagen etwas früher an einem Medulloblastom als die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Tiere mit 186 Tagen. Es hat auch den Anschein, als ob die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tiere nach dem Auftreten der ersten Anzeichen für ein Medulloblastom schneller verstarben (Stunden bis maximal 2 Tage nach Diagnosestellung) und ihre Tumoren zum Todeszeitpunkt größer waren als die Tumoren der Tiere vom *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Genotyp. Letztere überlebten bisweilen noch 3-4 Wochen nach Erscheinen der ersten neurologischen Auffälligkeiten. Aus Tierschutzaspekten und um frisches, nicht autolytisches Gefriermaterial zur RNA-Extraktion zu gewinnen, wurden die Medulloblastom-verdächtigen Tiere jedoch in 90% der Fälle vor Eintreten des Todes bzw. schwerer neurologischer Ausfallerscheinungen aus dem Versuch genommen. Um zu klären, ob es hinsichtlich der genetischen Veränderungen in den Tumoren messbare Unterschiede zwischen den beiden Genotypen geben könnte, wurden die Tumoren der beiden Genotypen

molekulargenetisch analysiert. Zusätzlich wurden Zellkulturen aus den Primärtumoren angelegt und ebenfalls molekulargenetisch charakterisiert.

### 3.6 Histologische Analyse muriner *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastome

Beim Menschen entspricht die Shh-abhängige Medulloblastom-Variante häufig, aber nicht ausschließlich, dem desmoplastischen Subtyp. Die Medulloblastome in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen hingegen ähneln im mikroskopischen Bild dem klassischen Subtyp (Goodrich et al.1997). Die Tumoren setzen sich aus dicht gepackten Zellen mit hyperchromatischen Kernen und schmalem Zytoplasma zusammen. Bei der mikroskopischen Analyse der Medulloblastome aus den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tieren zeigten sich im histologischen Bild keine offensichtlichen Unterschiede (Abbildung 21).



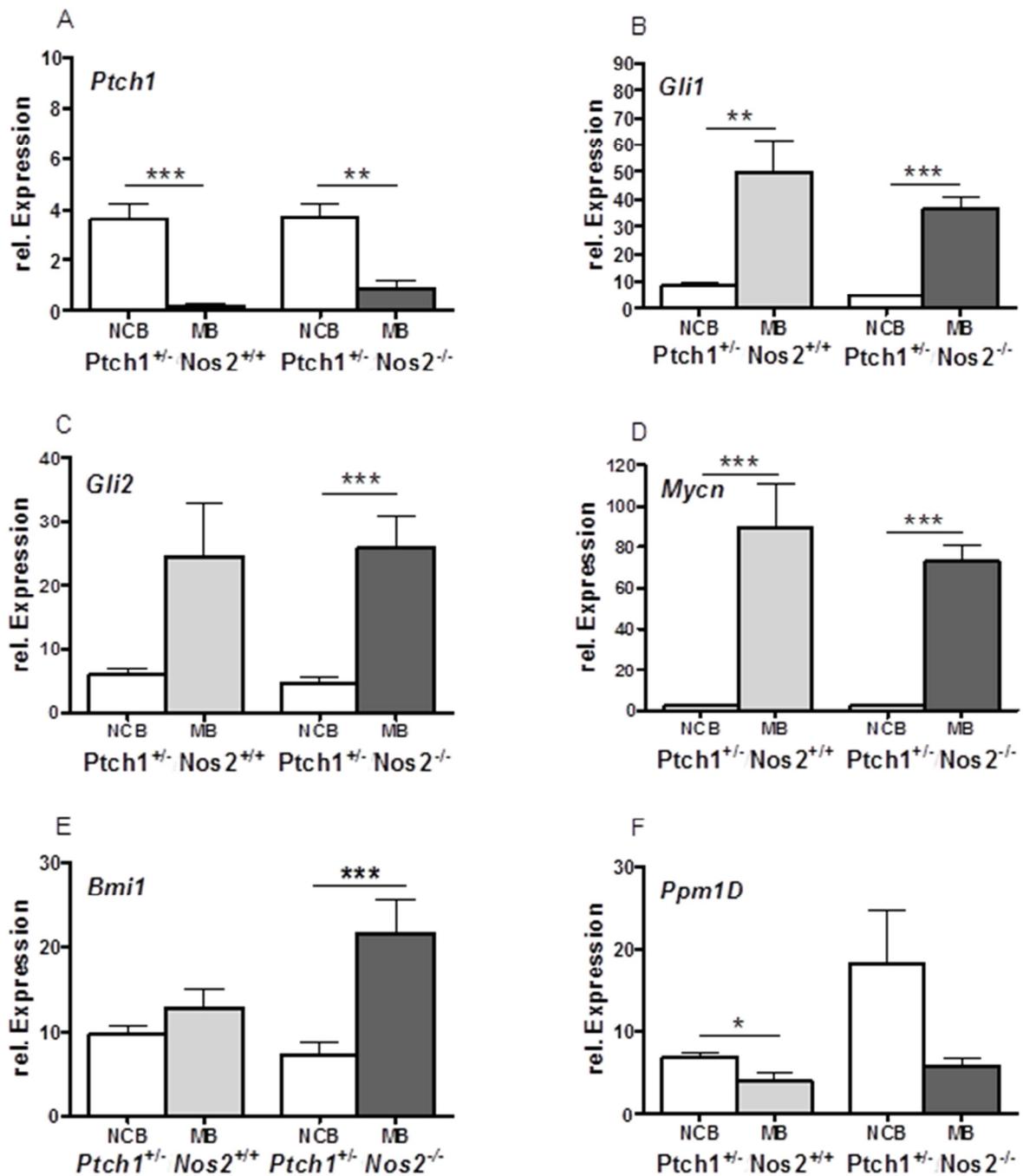
**Abbildung 21. Histologisches Erscheinungsbild der Medulloblastome von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Medulloblastome in beiden Genotypen (A-B, *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>; C-D, *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup>) sind zellreiche primitive neuroektodermale Tumore des Cerebellums, die histologisch dem klassischen Subtyp humaner Medulloblastome entsprechen. Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte zeigen das gut begrenzte Wachstum im cerebellären Kortex und die Zellmorphologie betreffend keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Genotypen (A und C, Balken = 500 µm; B und D, Balken = 50 µm).

### 3.7 Expressionsanalyse von murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastomen

Um die molekularen Grundlagen der Entstehung von Medulloblastomen im *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell zu beleuchten, wurde das Transkriptlevel der Shh-Zielgene *Ptch1* (Wildtyp Allel), *Gli1/2*, *Hip1* und *N-Myc*, sowie weiterer Gene (*Cdkn1a*, *Ppm1d*, *Tbx2*, *Bmi1*), die laut Literatur im Zusammenhang mit der Medulloblastomentstehung als potentielle Kandidatengene gelten, ermittelt. Während *Cdkn1a* als Tumorsuppressorgen diskutiert wird (Mendoza-Rodrigues & Cerbon 2001), besitzen die Ser/Thr Phosphatase *Ppm1d* und die embryonalen Transkriptionsfaktoren *Tbx2* und *Bmi1* onkogenes Potential (Bilican und Goding 2006; Castellino et al. 2008; Leung et al. 2004).

Das Untersuchungskollektiv bestand aus 10 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und 12 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastomen sowie jeweils 12 nicht-neoplastischer Kleinhirngewebeprobe des entsprechenden Genotyps. Normales Kleinhirn von *Ptch1*<sup>+/-</sup> Heterozygoten wies ein gegenüber dem Wildtyp auf die Hälfte reduziertes *Ptch1* mRNA Expressionslevel auf. Medulloblastome der *Ptch1*<sup>+/-</sup> Heterozygoten zeigten im Mittel ein signifikant erniedrigtes *Ptch1* mRNA Expressionsniveau im Vergleich zu dem nicht-neoplastischen Kleinhirnreferenzgewebe des entsprechenden Genotyps (Abbildung 22 A).



**Abbildung 22. Expression Medulloblastom-relevanter Kandidatengene in *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastomen.**

Dargestellt ist die mittlere relative mRNA Expression von *Ptch1*(WT-Allel) (A), *Gli1* (B), *Gli2* (C), *N-Myc* (D), *Bmi1* (E) und *Ppm1d* (F) in 10 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und 12 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastomen versus ihrer jeweiligen Kleinhirnreferenz (NCB, n = 12). \*: Signifikanter Expressionsunterschied zwischen Tumor-und entsprechenden Kontrollgruppe in Mann-Whitney-U Test (\*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001).

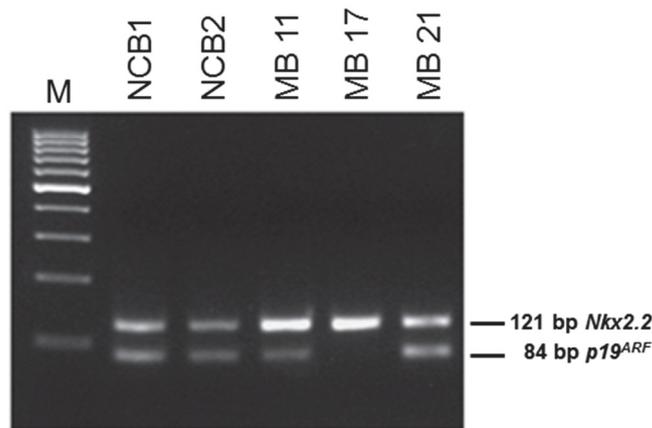
Die Shh-Zielgene *Gli1* und *N-Myc* waren in allen *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastomen signifikant überexprimiert (Abbildung 22 B, D), *Gli2* und *Bmi1* (Abbildung 22C, F) hingegen nur in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastomen. Das relative mRNA Expressionslevel von *Ppm1d* war in den Medulloblastomen erniedrigt (Abbildung 22F), erreichte jedoch nur für den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Genotyp das Signifikanzniveau. Die mittlere Expression der ebenfalls untersuchten Gene *Hip1*, *Cdkn1a*, *Tbx2* und *Nos2* zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor und Normalgewebe. Es ergab sich ebenfalls kein signifikanter Expressionsunterschied der analysierten Gene zwischen den Medulloblastomen der *Ptch1*<sup>+/-</sup> Heterozygoten und der *Nos2* defizienten *Ptch1*<sup>+/-</sup> Tiere, mit Ausnahme der fehlenden *Nos2* Expression in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen.

Aus sechs murinen Medulloblastomen (jeweils 2 der Genotypen *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>, *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/-</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup>) wurden Zelllinien generiert, die ebenfalls hinsichtlich der Expression der Shh-Zielgene *Ptch1* (Wildtyp Allel), *Gli1/2*, *Hip1* und *N-Myc* untersucht wurden. Die Expression des *Ptch1* Wildtyp-Allels war in allen sechs Zelllinien nahezu vollständig reprimiert (mittlere rel. *Ptch1* Expression = 0,06). Infolge der unzureichenden *Ptch1* mRNA Expression und einer dadurch fehlenden Suszeptibilität der Zellen gegenüber Shh, zeigten auch die anderen Shh-Zielgene *Gli1*, *Hip1* und *N-Myc* mit Ausnahme von *Gli2* eine erniedrigte relative Expression gegenüber Normalhirngewebe.

### 3.8 Molekulargenetische Veränderungen in murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastomen

Häufige molekulargenetische Veränderungen, die in zahlreichen verschiedenen Tumoren nachweisbar sind, sind Deletionen der Tumorsuppressorgene *Cdkn2A* und *p19*<sup>ARF</sup> (bzw. *p14*<sup>ARF</sup> in humanen Tumoren) sowie Mutationen von *TP53* (Cordon-Cardo 1995). In der desmoplastischen Variante humaner Medulloblastome findet man häufig *PTCH1* Mutationen (Zurawel et al. 2000), während Medulloblastome der Gruppe 3 und 4 (Northcott et al. 2011) in 7 % der Fälle *MYCN* Amplifikationen zeigen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden 22 murine Medulloblastome und sechs murine Medulloblastom-Zelllinien auf Veränderungen der oben genannten Gene hin untersucht. Zwei der primären Tumoren wiesen eine Deletion von *p19*<sup>ARF</sup> auf, 4M MB 68 zeigte eine heterozygote *p19*<sup>ARF</sup> Deletion, 4M MB 17 einen homozygoten Verlust (Abbildung 23).



**Abbildung 23. Duplex-PCR-Analyse des *Cdkn2A* (*p19<sup>ARF</sup>*) Gens in murinen Medulloblastomen.** *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastome zeigen in jeweils 5 % der Fälle eine hetero-, bzw. homozygote *Cdkn2A* (*p19<sup>ARF</sup>*) Deletion. Dargestellt ist normales Cerebellum (NCB1 und NCB2 mit isointensen Banden für *Nkx2.2* und *p19<sup>ARF</sup>*), MB 11 mit einer heterozygoten *p19<sup>ARF</sup>* Deletion (hypointense *p19<sup>ARF</sup>* Bande), MB 17 mit einer homozygoten *p19<sup>ARF</sup>* Deletion (fehlende *p19<sup>ARF</sup>* Bande) und MB 21 ohne *p19<sup>ARF</sup>* Deletion; M: Marker.

Keiner der Tumoren fiel durch eine *Tp53* Mutation oder *N-Myc* Amplifikation auf. Bei der Hälfte der untersuchten Medulloblastome lag eine biallelische Inaktivierung des *Ptch1* Tumorsuppressorgens vor, in 10/21 Fällen bedingt durch einen Verlust des *Ptch1* Wildtyp Allels und in einem Fall in Folge einer 34 Basenpaare umfassenden Deletion in Exon 9. Die 21 untersuchten *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastome zeigte für den in Kapitel 3.3.3.2 beschriebenen Abschnitt der 5'-CpG Insel von *Ptch1* keine Methylierung.

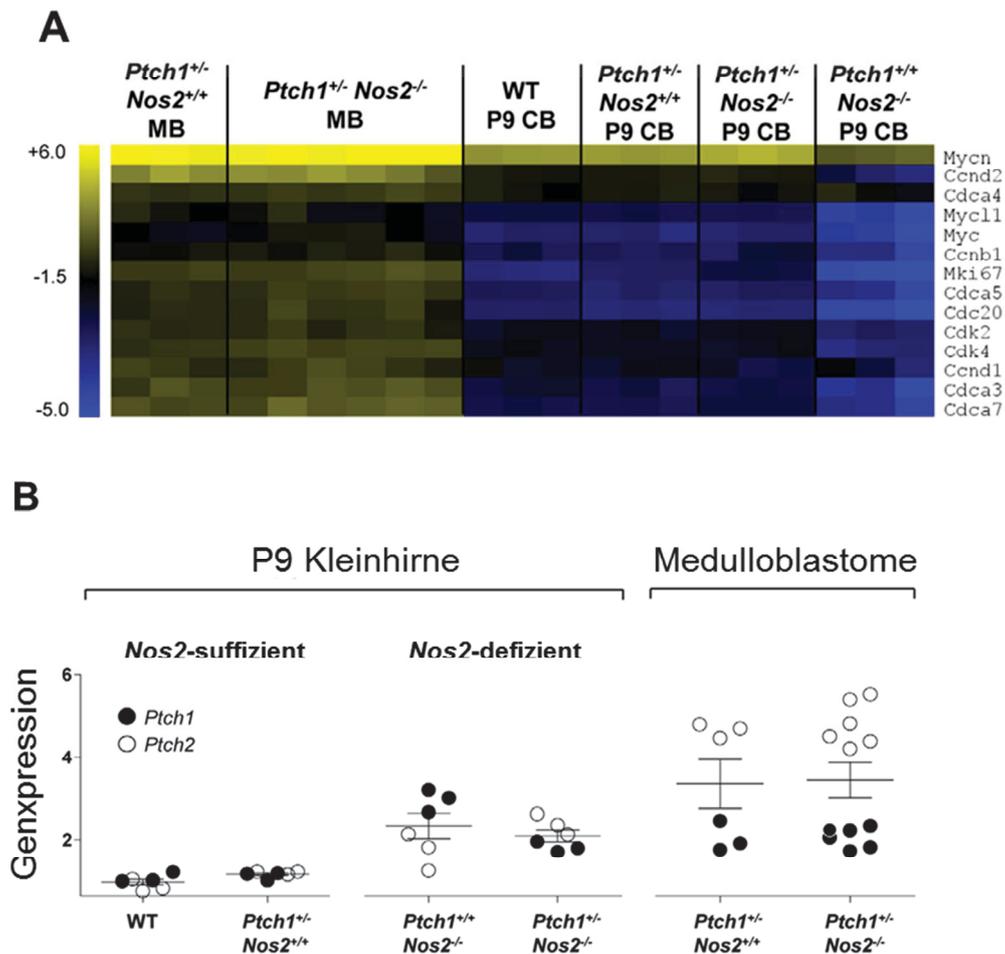
Vier der untersuchten Zelllinien zeigten eine homozygote *Cdkn2a* Deletion; zwei, MBZK 24 und MBZK 26, einen hemizygoten Verlust des genannten Gens. *Tp53* Mutationen stellten sich bei MBZK 24 (c.832G>A; p.D278N) und MBZK 26 (c.464G>C; p.R155P) dar. Das Wildtyp-*Ptch1* Allel war nur in zwei der untersuchten Zelllinien, MBZK 25 und MBZK 26, deletiert. Eine *N-Myc* Amplifikation war in den Zelllinien nicht detektierbar (Tabelle 10).

**Tabelle 10. Übersicht über die molekulargenetischen Veränderungen in den sechs untersuchten murinen Medulloblastomenzelllinien.**

Zelllinie	Passage	<i>Tp53</i> Mutation	<i>p19<sup>ARF</sup></i> Deletion	<i>Cdkn2A</i> Deletion	<i>Ptch1</i> Deletion	<i>Mycn</i> Amplifikation
MBZK 22	9	nein	homozygot	hemizygot	nein	nein
MBZK 23	25	nein	homozygot	homozygot	nein	nein
MBZK 24	4	p.D278N	hemizygot	homozygot	nein	nein
MBZK 25	5	nein	homozygot	homozygot	ja	nein
MBZK 26	17	p.R155P	hemizygot	nein	ja	nein
MBZK 27	5	nein	homozygot	homozygot	nein	nein

### 3.9 Globale Expressionsprofile von murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastomen

Auf der Suche nach den molekularen Pathomechanismen, die zu einer erhöhten Medulloblastomrate in den *Nos2* defizienten, *Ptch1* mutierten Mäusen beitragen, wurde eine Mikroarray-basierte globale Expressionsanalyse an 3 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und 6 *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastomen sowie jeweils 12 Kleinhirnnormalgewebeproben (3x Wildtyp, 3x *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup>, 3x *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und 3x *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp) im Alter von 9 Tagen, 6 Wochen und 1 Jahr durchgeführt. Diese Experimente wurden von Daniel Haag in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Lichter am DKFZ im Rahmen eines Kooperationsprojektes durchgeführt (vgl. Haag, Zipper et al. 2012). Der Expressionsvergleich zwischen den Medulloblastomen der *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotypen ergab 87 differentiell exprimierte Gene, wobei die große Mehrheit (87 %) der Gene ein niedrigeres Transkriptlevel in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastomen aufwies (Tabelle S4 im Anhang). Es zeigte sich kein Expressionsunterschied für die bekannten Zielgene eines aktivierten Shh-Signalwegs. Eine relevante Beteiligung der Krebs-assoziierten, durch *Nos2* beeinflussten Immunantwort einschließlich einer Beteiligung der Mikroglia an den Expressionsunterschieden konnte auf Grund fehlender Markerexpression ausgeschlossen werden. Ciani et al. (2004) zeigten, dass eine NO-Reduktion während der Körnerzelldifferenzierung in der frühen Kleinhirnentwicklung der Ratte zu einer gesteigerten Expression des Proliferations-assoziierten Protoonkogens *N-Myc* führte. Um diesen Befunden Rechnung zu tragen und die Kandidatengenliste weiter einzuengen, wurde ein direkter Vergleich zwischen den Genexpressionsprofilen der 9 Tage alten Kleinhirngewebeproben (P9) durchgeführt. Gegenüber den Wildtyp P9 Kleinhirngewebeproben zeigten die entsprechenden Proben des *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyps insgesamt 984 deregulierte Gene [755 davon mit erniedrigter Expression in den *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen (76,7 %)] (Tabelle S5 im Anhang), die des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyps jeweils nur 5 und 32 differenziell exprimierte Gene (Tabelle S6 und Tabelle S7 im Anhang). Die großen Abweichungen der postnatalen Genexpression der *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber der von den Wildtyp-Tieren schließt ein Set an minderexprimierten Genen ein, das solche Gene enthält, die essentiell sind für die Proliferation von Körnerzellvorläufern (z.B. *Ccnd1*, *Ccnd2* und *N-Myc*, Abbildung 24).



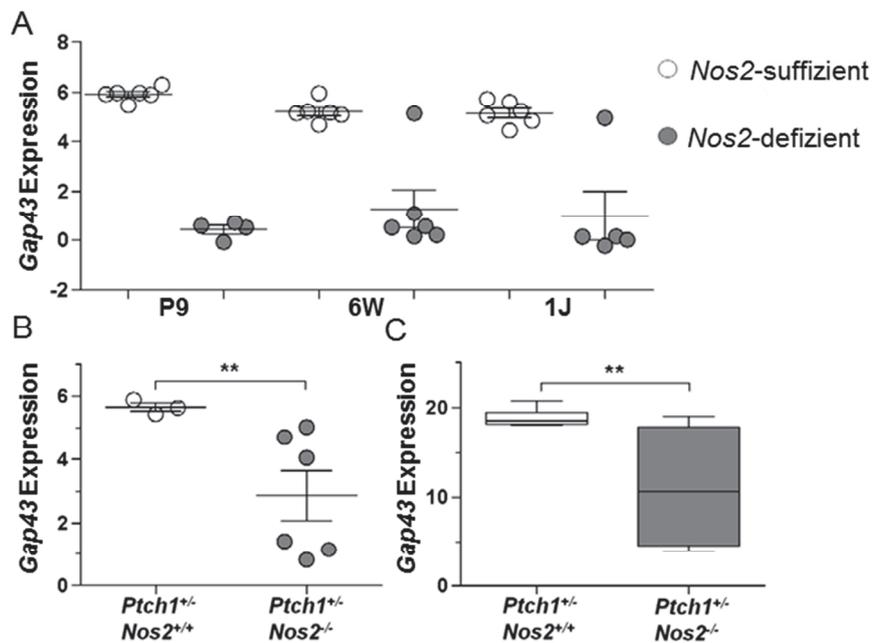
**Abbildung 24. Ergebnisse der Microarray-basierten Genexpressionsanalysen an murinen Kleinhirngewebs- und Medulloblastomproben unterschiedlicher Genotypen.**

(A) „Heat-map“ von Proliferations-assoziierten Genen, die in P9-Kleinhirnen des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyps eine erniedrigte Expression gegenüber Wildtyp-Mäusen zeigen. Die abgebildeten Proben beinhalten die P9-Kleinhirnproben aller Genotypen und alle Medulloblastom-Fälle. Zur besseren Visualisierung sind die Werte auf einen Gen-weisen Mittelwert normalisiert. (B) Die *Ptch1* Expression war in den P9-Kleinhirngewebeproben von *Nos2* defizienten Mäusen gesteigert, diejenige von *Ptch2* überragte die *Ptch1* Expression nur in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> P9-Kleinhirnen und Medulloblastomen. Die Expressionswerte sind als log<sub>2</sub>-Verhältnis der Probe gegenüber universeller Referenz-RNA (Stratagene) dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. CB: Kleinhirn, P9: postnataler Tag (modifiziert nach Haag, Zipper et al. 2012).

Da der Shh-Signalweg als Hauptregulator der neonatalen Zellproliferation in Körnerzellvorläufern der externen Körnerzellschicht gilt, erfolgte eine Analyse der 984 deregulierten Gene in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen im Hinblick auf die Anreicherung von Zielgenen der *Gli*-Transkriptionsfaktoren. Ein Vergleich dieser Liste mit kürzlich identifizierten *Gli*-Zielgenen (Lee et al. 2010) ergab eine signifikante Überrepräsentation *Gli*-regulierter Gene ( $p = 0,005$ , Chi-Quadrat Test). Die zusätzliche *Ptch1*-Inaktivierung im

*Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp hob die im *Nos2*-defizienten Kleinhirngewebe beobachtete verminderte Expression von *Gli*-Zielen und Proliferations-assoziierten Genen wieder auf. Die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> P9-Kleinhirne zeigten weder eine veränderte *Ptch1* noch *Ptch2* Expression gegenüber den Wildtyp-Kleinhirnen. Die *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> P9-Kleinhirne hingegen wiesen einen signifikanten Anstieg der Expression von *Ptch1* und einen geringeren Anstieg der Expression von *Ptch2* im Vergleich zum Wildtyp auf. Im *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp war die *Ptch2*-Expression stärker erhöht als die von *Ptch1*. Da *Ptch2* jedoch nicht in der Lage ist, Smoh zu inhibieren (Rahnama et al. 2004), kann es möglicherweise nicht den abschwächenden Effekt auf die *Gli*-Aktivität aufheben. Die Medulloblastome der beiden *Ptch1*<sup>+/-</sup> Genotypen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau der beiden *Ptch*-Rezeptoren, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die *Nos2*-Defizienz zu einer gesteigerten *Ptch1*-Expression in den Körnerzellvorläufern führt, die wiederum eine erniedrigte Expression mitotischer Gene und *Gli*-Zielgene ausschließlich im *Ptch1*-Wildtyp zur Folge hat.

Bis hierher konnte gezeigt werden, dass die *Nos2*-Inaktivierung der Zellproliferation im sich entwickelnden Kleinhirn entgegen wirkt und den *Shh*-Signalweg antagonisiert. Um nun genau solche *Nos2*-abhängigen Effekte, die die Entstehung von Medulloblastomen fördern, zu identifizieren, wurden Merkmale bestimmt, die den beiden *Nos2* defizienten Genotypen gemeinsam sind und im Tumorgewebe persistieren. Als Resultat dreier Vergleiche (*Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> versus Wildtyp P9-Kleinhirn, *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> versus *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> P9-Kleinhirn und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> versus *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> MB) stachen 2 Gene *Stmn1* (Stathmin 1) und *Gap43* (growth-associated protein 43) hervor, die scheinbar in Abhängigkeit von *Nos2* während der Kleinhirnentwicklung und Medulloblastompathogenese reguliert werden. Die Überexpression von *Stmn1* in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> MB konnte mit qRT-PCR nicht bestätigt werden, hingegen fand sich eine konsistent in allen *Nos2*-defizienten Kleinhirngewebeproben und Medulloblastomen reduzierte *Gap43*-Expression in einem umfangreicheren Probenet von jeweils 7 Tumoren pro Genotyp (Abbildung 25). Diese Ergebnisse zeigten eine Assoziation von verändertem *Gap43*-Transkriptlevel und *Nos2*-Status.



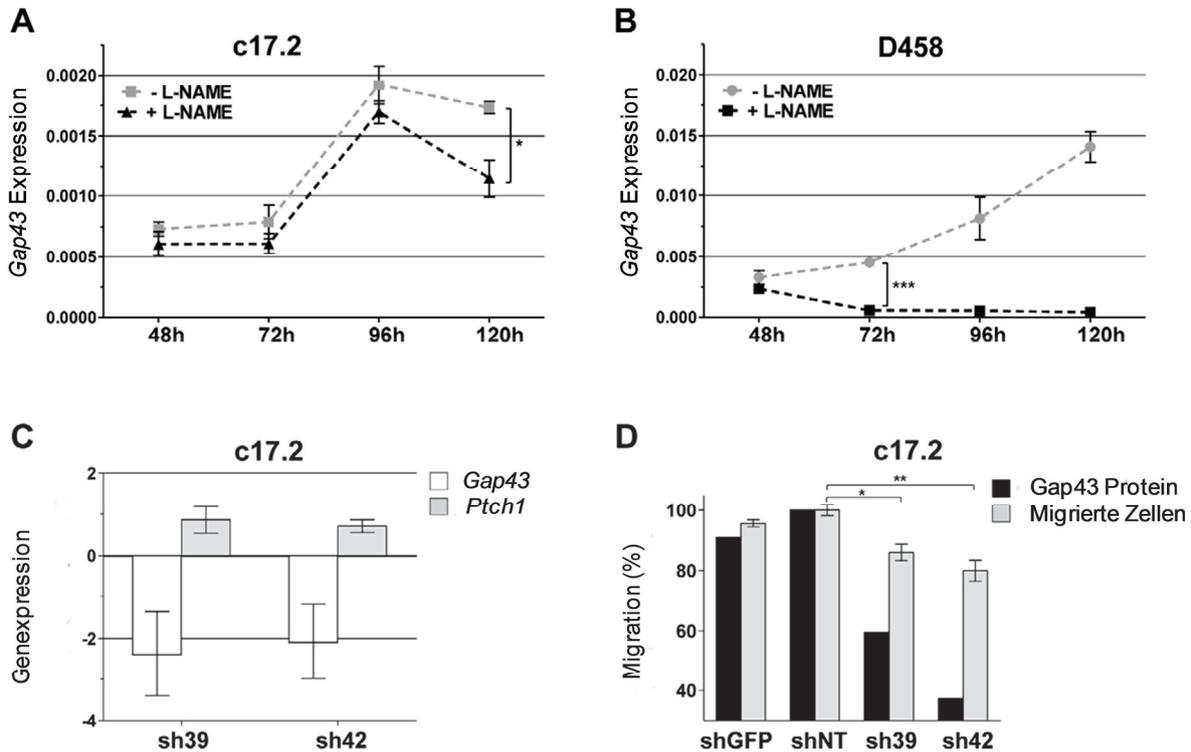
**Abbildung 25. Identifizierung des *Nos2*-regulierten Kandidatengens *Gap43*.**

(A) Während unterschiedlicher Stadien der Kleinhirnentwicklung zeigte sich die *Gap43*-Expression als *Nos2*-abhängig. *Nos2*-suffizient: Wildtyp und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup>, *Nos2*-defizient: *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup>. (B) *Gap43* war differentiell zwischen *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastomen exprimiert. Die Werte in (A) und (B) entstammen den Mikroarray-Daten und sind als log<sub>2</sub> Verhältnis der Probe gegen die universelle Referenz-RNA (Stratagene) dargestellt. (C) Die differentielle *Gap43*-Expression konnte an einem erweiterten Tumorsset (n = 7 pro Genotyp) mittels qRT-PCR bestätigt werden. Lineare Expressionswerte wurden gegen Haushaltsgene normalisiert. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Tumorguppen sind mit \* gekennzeichnet (\*\*, p<0,01; t-Test). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (Abbildung aus Haag, Zipper et al. 2012).

### 3.10 Konsequenzen von *Nos* Inhibition und *Gap43* „Knockdown“ *in vitro*

Die Assoziation von *Nos2* Inaktivierung und reduzierter *Gap43* Expression läßt eine genregulatorische Funktion der NO-Signalgebung vermuten. Um diese mögliche Verbindung *in vitro* zu untersuchen, wurden die murine neuronale Vorläuferzelllinie c17.2 und die humane MB Zelllinie D458 mit dem *Nos* Inhibitor L-NAME (*N*<sup>0</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle behandelt, um das NO-Level zu reduzieren. Die *Gap43* Expression wurde alle 24 h mit einer qRT-PCR bestimmt. In den c17.2 Zellen war die *Gap43* Transkripthäufigkeit generell sehr niedrig, sie stieg jedoch während der Dauer der Kultivierung stetig an. Nach L-NAME Behandlung reduzierte sich die *Gap43* Expression in diesen Zellen nach 120 h *Nos* Inhibition signifikant (Abbildung 26 A). D458 MB Zellen zeigten unter gleichen Behandlungsbedingungen bereits nach 72 h ein

signifikant erniedrigtes *Gap43* Transkriptlevel, das nach weiteren 24 bis 48 h noch stärker abfiel (Abbildung 26 B). Somit scheint die verminderte *Gap43* Expression eine direkte Konsequenz reduzierter NO Level in murinen neuronalen Vorläuferzellen und humanen MB Zellen zu sein und als Schlüsselmediator der in den *Nos2*-defizienten P9-Kleinhirnen und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastomen beobachteten Effekte, insbesondere der Hochregulation von funktionellem *Ptch1* in *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen zu fungieren. Mishra und Mitarbeiter berichteten, dass *Gap43* eine zentrale Rolle bei der Polarisierung sich entwickelnder GCPs und ihrer korrekten Orientierung zur IGL spielt (Mishra et al. 2008). Um diese Hypothesen zu testen wurde ein shRNA vermittelter „knockdown“ von *Gap43* in c17.2 Zellen durchgeführt. Dieser *Gap43* „knockdown“ hatte ein inverses Verhalten der *Ptch1* und *Gap43* Transkriptlevel zur Folge (Abbildung 26 C). Veränderungen des Migrationsverhaltens wurden mit der Boyden-Kammer und rekombinantem SDF-1 $\alpha$  (CXCL12) als chemischem Lockstoff untersucht. SDF-1 $\alpha$  soll an der gerichteten Wanderung embryonaler GCPs *in vivo* beteiligt sein (Zhu et al. 2002). Die Herabsetzung der *Gap43* Proteinmenge resultierte in einer 14 bzw. 20 %igen ( $p = 0,013$  bzw.  $0,007$ ) signifikanten Abnahme der Migration (Abbildung 26 D).



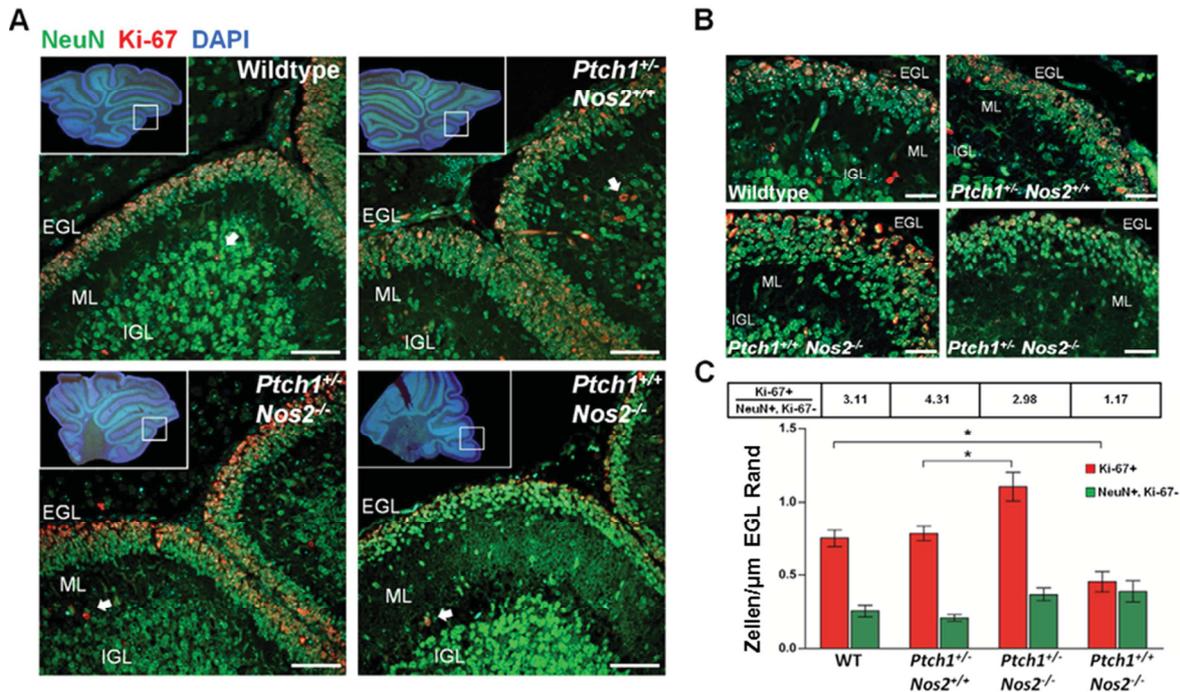
**Abbildung 26. Charakteristika und funktionelle Auswirkungen von *Gap43* Expression in der Zellkultur.**

(A-B) Reduzierte *Gap43* Expression bei inhibierten NO Synthesen. Die linearen *Gap43* Expressionswerte, die gegen einen Pool von Haushaltsgenen normalisiert wurden, stammen von qRT-PCR Messungen. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei Replikas. (A) In c17.2 Zellen war die *Gap43* Expression 120 h nach Behandlung mit L-NAME signifikant erniedrigt (\* $p = 0,0234$ ), in D458 Zellen (B) bereits nach 72 h (\*\* $p < 0,0001$ ). (C-D) Funktionelle Analysen wurden nach *Gap43* „knockdown“ in neuronalen Vorläuferzellen (c17.2) durchgeführt. (C) *Gap43* und *Ptch1* demonstrieren ein inverses Genexpressionsverhalten in der qRT-PCR nach Normalisierung gegen Nicht-Ziel Kontrollen. (D) Bei vermindertem *Gap43* Proteinlevel zeigen die Zellen eine reduzierte Migration. Der Prozentsatz migrierter Zellen wurde gegen eine Nicht-Ziel Kontrolle normalisiert. Die signifikant verminderte Migration in den „knockdown“ Proben ist mit Sternchen gekennzeichnet (\* $p = 0,013$ , \*\* $p = 0,007$ ). Sh39, sh42: anti-*Gap43* Ziel shRNA, shGFP: Kontrol shRNA gegen GFP, shNT: Nicht-Ziel Kontrol shRNA (Abbildung aus Haag, Zipper et al. 2012).

### 3.11 Quantifizierung proliferierender GCPs an P9-Kleinhirnen unterschiedlichen Genotyps

Die Transkriptom-Analysen zeigten, dass alle *Nos2*-defizienten Gewebeprouben (Kleinhirn unterschiedlichen Alters und Medulloblastome) eine erniedrigte *Gap43*-Expression aufwiesen. Zudem war der Anteil an Smoh-wirksamem *Ptch1* in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> P9-Kleinhirnen im Vergleich zu den *Ptch1* Wildtyp P9-Kleinhirnen geringer. Um die Auswirkungen dieser Expressionsunterschiede auf das Proliferations- bzw. Migrationsverhalten von Körnerzellvorläufern (GCP) der externen Körnerzellschicht *in situ*

zu analysieren, wurden von Daniel Haag am DKFZ in Heidelberg Schnitte von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten postnatalen Kleinhirnen (P9) mit dem Proliferationsmarker Ki-67 und dem neuronalen Marker NeuN, der post-mitotische Zellen markiert, gefärbt und als Immunfluoreszenz detektiert. Hierzu wurden jeweils 3 unterschiedliche Regionen von 3-4 Mausekleinhirnen pro Genotyp mit konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet. In Einklang mit den mRNA Expressionsdaten zeigte sich kein signifikanter Unterschied der mittleren Zellzahl zwischen den Wildtyp und *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>+/+</sup>* Mäusen. Im Gegensatz dazu konnte eine erhöhte Anzahl postmitotischer Körnerzellvorläufer (NeuN+, Ki-67-) in der externen Körnerzellschicht (EGL) von *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* und *Ptch1<sup>+/+</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Mäusen detektiert werden (Abbildung 27). Das Verhältnis von proliferierenden zu nicht-proliferierenden GCPs (Ki-67+/NeuN+, Ki-67-) war in den *Ptch1<sup>+/+</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* P9-Kleinhirnen deutlich geringer als in den drei anderen Genotypen. Dieser Befund spiegelt die in den Expressionsprofilen beobachtete verminderte Expression der mitotischen Gene in den *Ptch1<sup>+/+</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* P9-Kleinhirnen wieder. Hingegen wies die Gesamtmenge an proliferierenden GCPs pro EGL Ausschnitt in den *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Mäusen ein signifikantes Maximum auf. Dieser vergrößerte Pool an proliferierenden GCPs scheint die Suszeptibilität der *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Mäuse für eine neoplastische Transformation zu erhöhen und könnte dadurch die Entstehung von Medulloblastomen fördern.



### Abbildung 27. Proliferation und Akkumulation von GCPs im postnatalen Kleinhirn.

(A) Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung an FFPE-Schnitten von P9-Kleinhirnen mit NeuN (grün) und Ki-67 (rot) zeigt eine Anhäufung proliferierender GCPs in der äußeren Körnerzellschicht (EGL) von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Übersichtsaufnahmen (jeweils im linken oberen Bildteil) wurden mittels Weitfeld- und die Detailbilder mit konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie erstellt. Blau: DAPI-Kernfärbung. Weiße Pfeile kennzeichnen proliferierende Körnerzellen in der inneren Körnerzellschicht (IGL). (B) Die stärker vergrößerten Bilder der EGL und der Molekularschicht (ML) offenbaren veränderte Zellmorphologien, insbesondere bei den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen. (C) Zellzahlen von den Immunfluoreszenz-Bildern. Die Anzahl proliferierender (Ki-67+) und nicht-prolierender (Ki-67-) Zellen, normalisiert auf die Länge der EGL-Kante zeigt für die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikante Anreicherung proliferierender Zellen und entsprechend niedrige Zellzahlen für die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Tiere. Die Verhältnisse proliferierender zu nicht proliferierender Zellen (Ki-67+, Ki-67- NeuN+) sind für alle Genotypen angegeben. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet (\*,  $p < 0,05$ , T-Test). Balken = 50µm. EGL: äußere Körnerzellschicht, ML: Molekularzellschicht, IGL: innere Körnerzellschicht (Abbildung aus Haag, Zipper et al. 2012).

## 4 Diskussion

Die *Ptch1*<sup>+/-</sup> Maus (Goodrich et al.1997; Hahn et al. 1996) war das erste Mausmodell des nävöiden Basalzellkarzinom-Syndroms (Gorlin-Syndroms) und ist nach wie vor ein wichtiges Werkzeug zum Studium der Hedgehog (Hh)-abhängigen Tumorigenese *in vivo*. Es repräsentiert die Entwicklungsdefekte (muskulo-skelettäre Malformationen, neurologische Veränderungen, Augenveränderungen und odontogene Kieferzysten) sowie das spontan auftretende Tumorspektrum (Medulloblastome, Rhabdomyosarkome und Ovarialfibrome) des Gorlin-Syndroms (Corcoran & Scott 2001; Hahn et al. 1996, Hahn et al. 1999; Johnson et al. 1996). Patienten mit Gorlin-Syndrom zeigen hingegen im Unterschied zu den *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen bereits in jungen Jahren multiple Basalzellkarzinome. Durch chronische UVB-Exposition oder einmalige radioaktive Bestrahlung lassen sich jedoch auch in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen Basalzellkarzinome bzw. Basalzellkarzinom-ähnliche Tumoren induzieren (Aszterbaum et al. 1999), die den Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit lieferte. Seit der Erstbeschreibung von *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen (Goodrich et al.1997; Hahn et al. 1996) wurden noch mehrere weitere Mausstämme entwickelt, die durch konstitutive Aktivierung des Hh-Signalwegs entweder über eine K14-getriebene *Shh* Expression (Oro et al. 1997), eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren *Gli1* oder *Gli2* unter der Kontrolle des K5 Promotors (Grachtchouk et al. 2000; Nilsson et al. 2000; Sheng et al. 2002) oder die Expression einer onkogenen *Smo*-Mutante (K5 M2SMO Maus) (Xie et al. 1998) die Basalzellkarzinogenese der Haut modellieren. Die konstitutiven Mausmodelle haben jedoch den Nachteil, dass sie bereits vom Embryonalstadium an in allen Geweben oder den jeweiligem Zielgeweben einen aktivierten Shh-Signalweg zeigen und häufig innerhalb embryonaler oder früher postnataler Stadien letal sind. Basalzellkarzinome treten beim humanen Patienten auch sporadisch und in einem normalen zellulären Kontext auf. Mehr noch, der Gewebekontext kann signifikanten Einfluss auf die Tumorentwicklung und den resultierenden Tumorphänotyp haben (Jonkers et al. 2002), weshalb konditionale Knockout-Modelle die bessere, aber zu Beginn der Arbeit noch nicht zur Verfügung stehende Alternative darstellen. Mittlerweile gibt es die konditionale *Ptch1*<sup>lox/lox</sup> Knock-out-Maus (Zibat et al. 2009), die es ermöglicht, das *Ptch1* Gen in einer Zeit- und Dosis-abhängigen Art und Weise und in nur einem bestimmten Gewebetyp zu inaktivieren. Bislang ist nicht eindeutig geklärt, wie für viele andere Tumorsuppressorgene auch, ob mono- oder biallelische

Mutationen und/oder der Zeitpunkt des mutagenen Ereignis das Erscheinungsbild eines durch *Ptch1* Mutation induzierten Tumors bestimmt. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine monoallelische Mutation von *Ptch1* zur Entstehung eines Medulloblastom oder BCC<sup>TB</sup> prädisponiert, aber nicht in jedem dieser Tumoren eine biallelische Inaktivierung von *Ptch* nachweisbar war, obwohl insbesondere in den durch chronische UVB-Exposition induzierten BCC<sup>TB</sup> mehrheitlich eine Mutation, Deletion oder Promotormethylierung des zweiten Allels vorlag.

Der wesentliche innovative Aspekt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Stickstoffmonoxid (NO) bzw. des Fehlens der induzierbaren NO-Synthase (*Nos2*) auf die Entstehung von Medulloblastomen und UVB-induzierten Basalzellkarzinomen im *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell. Die hierzu generierten *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen unter gleichen Bedingungen zu definierten Zeitpunkten signifikant mehr Medulloblastome sowie frühe basaloide Proliferationen und makroskopisch sichtbare BCC<sup>TB</sup> als ihre *Nos2*-suffizienten Verwandten.

#### 4.1 Einfluß der UVB-Exposition auf die Basalzellkarzinogenese im *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell

Hochenergetische UVB-Strahlung wirkt primär genotoxisch. Sie kann jedoch auch zu Veränderungen auf transkriptioneller Ebene führen, indem die Expression UVB-responsiver Gene an- bzw. abgeschaltet und/oder Proteine chemisch modifiziert (z.B. phosphoryliert) werden. Daraus resultiert eine Aktivierung oder Hemmung spezifischer Zellfunktionen. Um den akuten Einfluss der UVB-Exposition auf die Basalzellkarzinogenese und die an dieser bekanntermaßen beteiligten Gene zu analysieren, wurden Wildtypmäuse und Tiere der beiden *Ptch1*<sup>+/-</sup> Genotypen (*Nos2*<sup>+/+</sup> oder *Nos2*<sup>-/-</sup>) einmalig mit 210 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt und die Expression der UVB-responsiven Gene *Cox2* und *Nos2* sowie der Shh-Zielgene *Ptch1*, *Gli1/2*, *Hip1* und *N-Myc* untersucht.

In der Wildtyp-Mäusehaut bewirkt die einmalige UVB-Dosis von 210 mJ/cm<sup>2</sup> eine Repression aller untersuchten Shh-Zielgene und einen Expressionsanstieg für *Cox2* und *Nos2*. Die vorliegende UVB-bedingte mRNA Induktion für *Cox2* bestätigt die Ergebnisse von Buckman und Mitarbeitern, die bereits 1998 in der Western-Blot-Analyse nach UVB-Bestrahlung einen sechsfachen Anstieg der *Cox2* Proteinmenge beobachteten (Buckman et al. 1998). Tripp und Mitarbeiter korrelieren die nach akuter UVB-Exposition gesteigerte *Cox2*

Expression mit einer gesteigerten Keratinozytenproliferation und verminderten Apoptose, vorwiegend in der basalen Zellschicht (Tripp et al. 2003). Die Gabe eines selektiven Cox2-Inhibitors steigerte die Apoptose in der proliferierenden Basalzellschicht. Demzufolge scheint die UVB-Exposition der Haut über eine forcierte Keratinozytenproliferation eine erhöhte Vulnerabilität der Keratinozyten gegenüber transformierenden Ereignissen zu bewirken.

Die Induktion einer NO-Produktion nach UVB-Exposition ist offensichtlich, auch dass eine gesteigerte Nos1 Expression für den NO-Anstieg verantwortlich ist. Uneinigkeit herrscht jedoch im Hinblick auf eine Beteiligung der Nos2. Chang und Mitarbeiter fanden eine nach UVB-Puls gesteigerte Nos2 Proteinexpression in murinen Keratinozyten (Chang et al. 2003), während bei Sasaki und Mitarbeitern die *Nos2* mRNA Expression 4-12 h nach UVB-Exposition supprimiert war (Sasaki et al. 2000).

Für *PTCH1* konnte bereits 2005 von Brellier und Mitarbeitern nach UVB-Exposition eine verringerte Expression *in vitro* an humaner Haut und an humanen Keratinozyten gezeigt werden (Brellier et al. 2005). Mechanistisch liegt der unterdrückten *Ptch1* Expression eine Aktivierung des onkogenen Ap-1 Signalwegs durch eine gesteigerte c-Jun Expression zu Grunde. Bislang war jedoch unklar, ob der Shh-Signalweg auch *in vivo* durch UVB aktiviert wird (Ehrhardt et al. 2003). Die vorliegenden Ergebnisse sprechen für einen kurzzeitigen, UVB getriggerten, zumindest teilweise über die Abschaltung des Shh-Signalweges weitergeleiteten Wachstumsstopp, der es den Zellen ermöglicht, fehlerhafte DNA zu reparieren und irreparabel geschädigte Zellen mittels eingeleiteter Apoptose zu eliminieren. Chronische UVB-Exposition war in den eigenen Experimenten in der Lage, in Tieren mit einer *Ptch1*-Haploinsuffizienz basaloide Hautveränderungen und Tumoren zu induzieren, die den Wildtyp-Tieren gänzlich fehlen. In den chronisch UVB-exponierten *Ptch1*<sup>+/-</sup> Hautproben fanden sich gegenüber der gleichaltrigen unbestrahlten Kontrollhaut signifikant mehr basaloide Proliferationen, sowie mehr und größere BCC<sup>TB</sup>. Die Anzahl und Größe der Hautveränderungen stieg signifikant mit kumulativer UVB-Dosis an. Einerseits könnten chronisch durch UVB aktivierte mitogene Signalwege zu einer gesteigerten Proliferation und ausbleibenden Differenzierung von Mitogen-responsiven epithelialen Stammzellen oder „transient amplifying cells“ führen, andererseits besteht die Möglichkeit, diese Strukturen als Folge einer klonalen Selektion UVB-geschädigter basaler Keratinozyten oder follikulärer Stammzellen zu sehen, die je nach Art und Menge der zusätzlich betroffenen Onko-/Tumorsuppressorgene den Tumorphänotyp prägen.

NO könnte einerseits durch S-Nitrosylierung redoxsensitiver Cysteinreste in der DNA-Bindungsdomäne c-Fos und c-Jun inhibieren oder andererseits durch S-Glutathionylierung eines Thiolrests von c-Jun die Bindung des Ap-1 Transkriptionsfaktors an TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat)-responsive Promotor-Elemente verhindern (Klatt et al. 1999; Nikitovic et al. 1998; Tabuchi et al. 1994). Die genannten TPA-responsiven Elemente befinden sich auch im *Ptch1*-Promotor und eine NO-bedingte Ap-1 Inhibierung könnte für die weniger starke Induktion der genannten Shh-Zielgene in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> Tieren im Vergleich zu den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen verantwortlich sein. Laut globalem Expressionsprofil waren jedoch weder die Shh-Zielgene *Ptch1*, *Gli1/2*, *Hip1* und *N-Myc*, noch die UV-responsiven Gene *Cox2* und *Nos2* signifikant differenziell exprimiert. Die chronische UVB-Strahlung scheint gemäß des globalen Expressionsprofils lediglich Einfluss auf die entzündliche und zellvermittelte Immunantwort zu nehmen.

## 4.2 Molekulargenetische Veränderungen der murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> Hauttumoren

Primäres Ziel der molekulargenetischen Untersuchungen war die Analyse der genetischen und epigenetischen Veränderungen des *Ptch1* Gens in UVB-induzierten Hauttumoren des *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodells. Die WT-*Ptch1* Expression war in allen BCC<sup>TB</sup> sehr heterogen. Neben Tumoren mit nahezu vollständig reprimierter Expression fanden sich Tumoren mit leicht erniedrigter, normaler und bisweilen sogar extrem erhöhter WT-*Ptch1* Expression. Dies spiegelt die unterschiedlichen molekularen Mechanismen, die zur Ausschaltung eines funktionsfähigen Ptch1 Proteins in den Tumoren führten, wider. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Aszterbaum und Mitarbeitern zeigten die BCC-artigen Tumoren in der vorliegenden Arbeit in nur 19% (anstatt 40%) der Fälle einen Verlust des WT-*Ptch1*-Allels (Aszterbaum et al. 1999). Eine Mutationsanalyse des *Ptch1* Gens wurde bislang noch nicht an murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> BCC<sup>TB</sup> durchgeführt. Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch in 7/12 (58 %) der untersuchten Fälle mit normaler bis erhöhter WT-*Ptch1* Expression eine Mutation, die zu einer derart veränderten Proteinstruktur führt, die mit großer Wahrscheinlichkeit einen Funktionsverlust des Ptch1 Proteins bewirkt. Es handelte sich hierbei um „Nonsense“-Mutationen, die in drei Fällen über die Generation eines Stop-Codons zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und somit verkürzten Ptch1 Protein führten, sowie zwei intronische Mutationen, die auf Grund von fehlerhaftem „Splicing“ den Verlust ganzer Exone zur Folge hatten. Die Mehrzahl dieser Mutationen (5/7)

liegt in den von Lindström und Mitarbeitern für humane *PTCH1* Mutationen postulierten „Hot Spot“-Regionen, die die beiden großen extrazellulären und die große intrazelluläre Proteinschleife von *Ptch1* betreffen (Lindström et al. 2006). Absolut identische Mutationen zu den in dieser Arbeit gefundenen Mutationen sind bislang jedoch nicht beschrieben (*PTCH* Mutation Database, [www.cybergene.se/cgi-bin/w3-mysql/ptchbase/index.html](http://www.cybergene.se/cgi-bin/w3-mysql/ptchbase/index.html)). In 55 % (12/22) der untersuchten murinen Hauttumore konnte im Gegensatz zu der Veröffentlichung von Cretnik und Mitarbeitern eine Methylierung innerhalb der ersten 45 CpGs der in der 5'-Region von *Ptch1* gelegenen CpG-Insel gezeigt werden (Cretnik et al. 2007). Allerdings sparten die zuvor genannten Autoren auf Grund von Amplifikations- und Sequenzierproblemen genau diese CpG-reiche Region in ihrer Untersuchung aus. Andere Tumoren, wie Ovarialfibrome und Mammakarzinome, zeigten sehrwohl eine Methylierung des humanen *PTCH1* Promotors (Cretnik et al. 2007; Wolf et al. 2007). Insgesamt konnte somit in 67 % der in der eigenen Arbeit analysierten BCC-artigen Hauttumoren eine biallelische *PTCH1* Inaktivierung nachgewiesen werden, die wie auch von Zibat und Mitarbeitern vorgeschlagen, in der Entstehung von BCC<sup>TB</sup> resultiert (Zibat et al. 2009).

In Abwesenheit oder bei Mangel an funktionsfähigem *Ptch1*-Protein wird, wie auch nach *Shh* Stimulation, die intrinsische Signalgebung nicht an *Smoh* weitergeleitet, was in einer gesteigerten Transkription von *Gli1* und anderer stromabwärts von *Gli1* gelegener Gene resultiert. Das *Gli1*-Transkriptlevel ist somit ein guter Indikator für einen aktivierten Hh-Signalweg und lässt eine molekulare Unterscheidung zwischen BCC<sup>TB</sup> auf der einen Seite, Plattenepithelzellarzinomen und Hautanhangstumoren auf der anderen Seite zu (Hatta et al. 2005). Die Expression der aktivierten *Smoh*-Mutante  $\Delta K5$  M2SMO in Mausepidermis führte zwar zur Ausbildung hyperproliferativer epithelialer Zellauswüchse und zur Entstehung benigner follikulärer Hamartome, jedoch war das Ausmaß der Aktivierung des Hh-Signalweges und der nachgeschalteten G1-Zykline Zyklin D1 und Zyklin D2 durch die Mutation zu gering, um die Entstehung von BCC zu initiieren (Grachtchouk et al. 2003). Neben der eingehenden Untersuchung von Veränderungen des *Ptch1* Gens und der Expressionsanalyse einiger Hh-Zielgene wurden in der eigenen Arbeit die UVB-indizierten Hauttumoren der Maua auch auf solche Gen- bzw. Chromosomenaberrationen hin untersucht, die bekanntermaßen an der Entstehung und Progression von Hauttumoren beteiligt sind. Für humane Plattenepithelkarzinome wird ein mehrstufiger Prozess der Krebsentwicklung beschrieben, an dessen Beginn Mutationen des *TP53* Gens stehen.

Anschließend folgen u.a. Veränderungen in den *RAS*, *MYC* und *CDKN2A* Genen. Kennzeichen der Basalzellkarzinome hingegen sind der Verlust der *PTCH1*-Heterozygotie und eine hohe Frequenz UVB-induzierter Mutationen des *PTCH1* Gens.

25% der UVB-induzierten murinen BCC<sup>TB</sup> (8/32) und 33 % der in dieser Arbeit untersuchten murinen BCC<sup>TB</sup> (3/9) wiesen UVB-typische Punktmutationen des *Tp53* Tumorsuppressorgens auf. Die für das untersuchte Tumorkollektiv ermittelten Mutationsraten liegen deutlich unter denen von Aszterbaum und Mitarbeitern, die für die BCC/Trichoblastom-artigen Tumore eine Mutationsrate von 40% ermittelten (Aszterbaum et al. 1999). Eine mögliche Erklärung liefert das deutlich kleinere Tumorkollektiv der Aszterbaum Arbeitsgruppe von nur fünf untersuchten Tumoren. Erwartungsgemäß wurden in den Basalzellkarzinomen der eigenen Serie keine *Cdkn2A* und *p19<sup>ARF</sup>* Deletionen gefunden. Die Plattenepithelzellkarzinome zeigten überraschenderweise auch keine derartigen Veränderungen, obwohl in 12% der sporadischen nicht-melanomatösen Hauttumoren *p16<sup>INK4A</sup>* Mutationen gefunden wurden (Soufir & Basset-Seguín 2001).

### 4.3 Einfluss der *Nos2* Defizienz auf die Basalzellkarzinogenese im *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell

Die Rolle der induzierbaren NO-Synthase (*Nos2*) im Rahmen der Tumorbilogie ist komplex und bislang nicht vollständig geklärt. Stickstoffmonoxid kann einerseits das Tumorwachstum fördern, andererseits aber auch zur Vernichtung von Tumorzellen führen (Lechner et al. 2005). Die Regulation der NO-Konzentration in der Mikroumgebung des Tumors entscheidet über das weitere Schicksal der Tumorzellen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der *Nos2* in der Epidermis von *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen bei chronischer UVB-Exposition zu einer signifikant erhöhten Anzahl von Basalzellproliferaten und BCC/Trichoblastom-artigen (BCC<sup>TB</sup>) Tumoren führte. Die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> zeigten eine signifikant erniedrigte *Skint9* Expression. *Skint9* gehört neben 10 weiteren murinen *Skint* Genen zu einer neuartigen Proteinfamilie mit Immunglobulin-artigen und Transmembran-Domänen, deren kodierende Gene Ähnlichkeiten zu Butyrophilin Genen zeigen und eine Schlüsselrolle bei epithelialen Immuninteraktionen spielen (Boyden et al. 2008). Boyden und Mitarbeiter berichteten, dass Mutationen in *Skint1* zu einem Fehlschlag der thymischen Selektion von V $\gamma$ 5<sup>+</sup>V $\delta$ 1<sup>+</sup> T-Zellen führten. Insgesamt 90 % aller epidermalen  $\gamma\delta$ T-Zellen, die wiederum 95 % aller epidermalen T-Zellen ausmachen, exprimieren den V $\gamma$ 5<sup>+</sup>V $\delta$ 1<sup>+</sup> T-

Zellrezeptor. Die Rolle der  $\gamma\delta$ T-Zellen konnte mit genetisch veränderten Mäusen, denen alle  $\gamma\delta$ T-Zellen fehlten, demonstriert werden. Diese Mäuse zeigten eine erhöhte Morbidität gegenüber Infekten mit Bakterien, Protozoen und Viren (King et al. 1999; Mombaerts et al. 1993; Selin et al. 2001). Die Entwicklung eines Immungedächtnisses (Wang et al. 2006), die Wundheilung (Jameson et al. 2002), autoimmune und allergische Entzündungsprozesse (Girardi et al. 2002; Peng et al. 1996; Shiohara et al. 1996) sowie die Abwehr epithelialer Malignome (Girardi et al. 2001) war ebenfalls beeinträchtigt. Girardi und Mitarbeiter untersuchten die Tumorentwicklung in  $\text{TCR}\delta^{-/-}$  Mäusen nach intradermaler Injektion von Zellen der Plattenepithelkarzinomzelllinie PDV. 60 % der  $\text{TCR}\delta^{-/-}$  Mäuse entwickelten einen Tumor, im Vergleich zu weniger als 20 % der Wildtyp-Kontrolltiere. Die Latenzzeit war jedoch nur geringfügig reduziert in den  $\text{TCR}\delta^{-/-}$  Mäusen, was zu der Schlussfolgerung führte, dass  $\gamma\delta$ T-Zellen die Anzahl der tumorigenen Ereignisse reduzierten, jedoch die Zeit bis zum Auftreten makroskopischer Tumoren nicht hinauszögerten (Girardi et al. 2001). Zheng und Mitarbeiter zeigten 2001, dass die Infusion von  $\gamma\delta$ T-Zellen immunkompetenter Spendermäuse in Nacktmäuse mit induzierten hypodermalen nasopharyngealen Tumoren zu einem Wachstumsarrest und einer Größenreduktion der induzierten Tumoren führte (Zheng et al. 2001). In Ermangelung eines paraffingängigen anti- $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor Antikörpers konnte zwar nicht direkt eine verminderte Anzahl von  $\gamma\delta$ T-Zellen in den  $\text{Ptch1}^{+/-} \text{Nos2}^{-/-} \text{BCC}^{\text{TB}}$  gezeigt werden, jedoch offenbarte sich eine signifikant erniedrigte Anzahl an CD3-positiven T-Zellen in Basalzellproliferaten und  $\text{BCC}^{\text{TB}}$  des  $\text{Ptch1}^{+/-} \text{Nos2}^{-/-}$  Genotyps gegenüber den  $\text{Ptch1}^{+/-} \text{Nos2}^{+/+}$  Tieren. Unter der Prämisse, dass es sich bei den CD3-positiven T-Zellen zu 94 % um  $\gamma\delta$ T-Zellen handelt, sollte das Ergebnis mit den CD3-positiven T-Zellen auch repräsentativ für die  $\gamma\delta$ T-Zellen sein. Somit könnte der NO-Mangel in den  $\text{Nos2}$  defizienten Mäusen über eine mechanistisch noch zu klärende mangelhafte Selektionierung von  $\gamma\delta$ T-Zellen oder Beeinträchtigung ihres epidermalen Tropismus zu der beobachteten erhöhten Inzidenz an Basalzellproliferaten und  $\text{BCC}^{\text{TB}}$  in den  $\text{Ptch1}^{+/-} \text{Nos2}^{-/-}$  Mäusen führen.

Neben  $\gamma\delta$ T-Zellen spielen auch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Tumorzellen (Balkwill & Mantovani 2001; Kelly et al. 1988). Diese infiltrieren solide Tumoren, akkumulieren dort (Murdoch et al. 2004) und können durch die Produktion zytotoxischer Mengen an NO mit Hilfe der  $\text{Nos2}$  Tumorzellen abtöten (Lee et al. 2002; Xie & Nathan 1994), entweder indem sie Apoptose initiieren (zytotoxischer Effekt) oder einen Zellzyklus-Arrest bewirken (zytostatischer Effekt). Perske und Mitarbeiter wiesen

2010 nach, dass hohe NO Konzentrationen, entweder in Form des injizierten NO-Donors NOC-18 oder durch *ex vivo* aktivierte Makrophagen, zu einer signifikanten Reduktion der Tumormasse von in BALB/c Mäusen mit Nierenzellkarzinomzellen (RENCA) induzierten Tumoren führte (Perske et al. 2010). In dem in der eigenen Arbeit vorgestellten *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Mausmodell könnte im Umkehrschluss zu den Ergebnissen von Perske und Mitarbeitern auch ein Mangel an aktivierten Makrophagen in den *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Mäusen zu einem verstärkten Wachstum intrarepithelialer Basalzellproliferate und somit zu einer höheren Anzahl größerer Tumoren führen. Der Mangel an Makrophagen in der Haut könnte durch eine verzögerte Wanderung derselbigen in Folge des NO-Defizits in den *Nos2<sup>-/-</sup>* Mäusen bedingt sein. Bereits 2009 konnten Zhou und Mitarbeiter zeigen, dass unter normoxischen Bedingungen das von der *Nos2* gebildete NO via Zytokin-Transduktion die Migration von Makrophagen fördert (Zhou et al. 2009). Die kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 leiten dabei die Makrophagenwanderung durch eine Modulation des Aktinzytoskeletts.

Bei der GSE-Analyse der Mikroarray-basierten Expressionsdaten wurde eine signifikante Korrelation der deutlich reduzierten Expression von "Uncoupling protein 2" (Ucp2) mit dem *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Phänotyp gefunden. Ucp2 ist ein Mitglied der mitochondrialen Anionen-Träger Familie und wird in Immunzellen, wie beispielsweise Makrophagen und T-Lymphozyten, exprimiert (Rousset et al. 2006). Ucp2 reguliert die ROS-Produktion während pathologischer Prozesse, wie z.B. bei Infektionen oder Atherosklerose, und schützt den Organismus dadurch vor oxidativem Stress (Blanc et al. 2003; Rousset et al. 2006). Ucp2 scheint ebenfalls eine zentrale Rolle bei der NO-Produktion zu spielen (Bai et al. 2005; Kizaki et al. 2002). Emre und Mitarbeiter postulierten 2007, dass eine kurzzeitige Abnahme der Ucp2 Expression während eines frühen Stadiums der Entzündungsreaktion zu einer gesteigerten ROS Produktion führt, welche wiederum den MAPK-Signalweg aktiviert und darüber zu einer gesteigerten *Nos2* Proteinexpression und verstärkten Entzündungsreaktion führt (Emre et al. 2007). Die fehlende *Nos2* Proteinexpression in den *Nos2<sup>-/-</sup>* Mäusen könnte bei einem frustanem Kompensationsversuch zu einer unverhältnismäßigen Absenkung der Ucp2 Expression führen, die jedoch keine gesteigerte *Nos2* Expression bewirken kann und damit auch zu keiner verstärkten Aktivierung des Immunsystems führt. Präneoplastische Zellen sowie Tumorzellen könnten sich somit mit höherer Wahrscheinlichkeit der körpereigenen Immunabwehr entziehen und unkontrolliert weiterwachsen. Auch dies wäre

ein möglicher Erklärungsansatz für die erhöhte Inzidenz an BCC<sup>TB</sup> in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen.

Bleibt nun noch die Frage zu klären, weshalb nicht auch die Inzidenz der anderen epithelialen Tumoren, wie SCC und BCC<sup>KT</sup>, von der *Nos2* Defizienz betroffen war. Hierbei könnte die NO-responsive microRNA *miR-146a*, die das *Numb* Gen als Ziel hat und darüber die Suppression des Hh-Signalwegs erleichtert, eine Rolle spielen. In *Nos2* defizienten Tieren ist die Nod2 Signaltransduktion über den NF-κB Signalweg abgeschwächt (Proell et al. 2008), infolgedessen bleibt ein Expressionsanstieg von *miR-146a* aus (Ghorpade et al. 2013). Demzufolge wird die Expression des *miR-146a* Zielgens *Numb* nicht reduziert und ein angeschalteter Hh-Signalweg bleibt aktiv (Hung et al. 2013). Da in SCC und BCC<sup>KT</sup> des *Ptch1*<sup>+/-</sup> Genotyps keine relevante Hh-Signalweg Aktivierung vorliegt, scheint die fehlende Abschaltung des Hh-Signalweges in diesem Fall irrelevant. In den *Ptch1*<sup>+/-</sup> BCC<sup>TB</sup> liegt jedoch sehr wohl eine konstitutive Aktivierung des Hh-Signalweges vor, so dass sich hier eine fehlende Abschaltung des Signalweges über die Achse Nod2 - miR-146a - Numb, letztendlich bedingt durch die *Nos2* Defizienz, sehr wohl förderlich auf das BCC<sup>TB</sup> Wachstum in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen auswirkt und den Unterschied in Anzahl und Größe der BCC<sup>TB</sup> zwischen den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen erklären könnte. Diese mechanistische Hypothese müsste allerdings noch experimentell validiert werden.

#### 4.4 Molekulargenetische Veränderungen der murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastome

Die vorherrschende molekulargenetische Veränderung in den in dieser Arbeit untersuchten murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastomen ist der Verlust des Wildtyp-*Ptch1*-Allels in 50% der Fälle. Ein weiteres Medulloblastom zeigt eine umschriebene Deletion des *Ptch1*-Gens. Wetmore und Mitarbeiter konnten hingegen keinen Verlust der Heterozygotie und auch keine *Ptch1* Mutation in murinen Medulloblastomen mit dem *Ptch1*<sup>+/-</sup> Hintergrund zeigen (Wetmore et al. 2000). Auch die Rhabdomyosarkome der *Ptch1*<sup>neo67/+</sup> Maus weisen keine den *Ptch1* Locus umfassenden Allelverluste auf (Calzada-Wack et al. 2002), hingegen war das Wildtyp-*Ptch1*-Allel in 40% der murinen BCC und Trichoblastom-artiger Tumoren deletiert (Aszterbaum et al. 1999). Humane Medulloblastome haben in ihrer Gesamtheit zu 8 - 21% Allelverluste auf 9q, die den *PTCHI* Genlocus überspannen (Raffel et al. 1997; Zakrzewska et al. 2004). Pugh und Mitarbeiter fanden mittels Exomsequenzierung in 8 % der

Medulloblastome aus der SSH-Gruppe Nonsens, Frameshift oder Splice-site Mutationen von *Ptch1* (Pugh et al. 2012). Einzelbasenaustausche, die zu einer veränderten *Ptch1* Proteinstruktur führen, konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht detektiert werden, ebenso wenig wie eine Methylierung der 5' CpG-Insel des *Ptch1* Promotors, die auf Grund erhöhter *Ptch1* Reexpression nach Behandlung von murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> Zellen mit demethylierenden Agenzien von Uhmann et al. (2005) postuliert wird. Eine Methylierung des *PTCH1* Promotors konnte jedoch auch für humane Medulloblastome nicht nachgewiesen werden (Pritchard und Olson 2008).

Die murinen Medulloblastome, sowohl des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> als auch des *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyps sind histologisch sehr einheitlich und entsprechen der klassischen Variante des humanen Medulloblastoms. Molekularbiologisch können sie der Shh-Gruppe des Medulloblastoms nach Kool und Mitarbeitern (2012) zugerechnet werden. Sie entsprechen somit nur einem von mittlerweile vier auf Grund von Transkriptomanalysen, genetischen Aberrationen, klinischen Daten und Risikostratifizierung ermittelten Subtypen humaner Medulloblastome (Ellison et al. 2011; Kool et al. 2012; Northcott et al. 2011). Die in dem Gesamtkollektiv aller humanen Medulloblastome gefundenen Veränderungen sind somit nicht gleichermaßen auf die murinen Tumore übertragbar. So zeigte auch keiner der murinen Primärtumoren eine *Tp53* Mutation und nur zwei Tumoren jeweils eine hetero- und eine homozygote *Cdkn2A* und *p19*<sup>ARF</sup> Deletion. Die sechs von den murinen MB abgeleiteten und passagierten Zelllinien hingegen häuften zahlreiche weitere Veränderungen (zwei *Tp53* Mutationen und alle sechs *Cdkn2A* Deletionen) an. Ob es sich hierbei um Veränderungen handelt, die bereits primär in den Ursprungstumoren in einem kleine Subklon von Tumorzellen vorhanden waren, handelte oder diese Veränderungen erst *in vitro* erworben wurden, ist dabei nicht klar.

Alle Medulloblastome, unabhängig von der zusätzlichen *Nos2* Defizienz, zeigen einen aktivierten Hh-Signalweg, vornehmlich erkennbar an der erhöhten *Gli1* Expression. Das Ausmaß der *Gli* Expression ließ jedoch keine wie von Ferretti und Mitarbeitern für humane Medulloblastome nach microRNA-Signatur aufgestellte Gruppeneinteilung in stark und schwach GLI-exprimierende Tumorsubtypen zu (Ferretti et al. 2008). Für die Hh-Zielgene *Hip1* und *Bmi1* zeigen die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Medulloblastome jedoch signifikant höhere Expressionswerte gegenüber den *Nos2* suffizienten Medulloblastomen, was bedeuten kann, dass diese Gene nicht ausschließlich über den Hh-Signalweg reguliert werden, sondern auch

in irgendeiner Form über partielle NO-Konzentrationsschwankungen beeinflussbar sein können.

#### 4.5 Erhöhte Medulloblastom Inzidenz im *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/-</sup> Mausmodell

Das *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell wurde intensivst studiert und hat viel zu unserem heutigen Verständnis der Hh-abhängigen Medulloblastomgenese im Zusammenhang mit der Kleinhirnentwicklung beigetragen. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten weisen der induzierbaren NO-Synthase und somit der NO-Signalgebung eine Rolle bei der Hh-abhängigen Medulloblastomentstehung zu, insofern, als dass sich die Medulloblastomrate in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen verdoppelte. In eigenen Untersuchungen starben 24/214 (11 %) der *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäuse an einem histologisch gesicherten Medulloblastom. Diese Medulloblastomrate ist im Vergleich zu den mit 14-20% in der Literatur vorgelegten Zahlenwerten verhältnismäßig niedrig. Die Differenz könnte zum einen durch unterschiedlich große Versuchstiergruppen der einzelnen Untersuchungen, zum anderen durch den vorzeitigen Verlust von zahlreichen Tieren mit Hydrocephalus in den ersten 3 Lebensmonaten bedingt sein. Nur in seltenen Fällen konnte zu diesem Zeitpunkt ein mikroskopischer Tumor nachgewiesen, jedoch in keinem der Fälle ausgeschlossen werden. Zahlreiche mikroskopische Schnittpräparate zeigten hingegen ektote Zellen an der Oberfläche des Kleinhirn, die bereits zuvor von mehreren Autoren in mehr als der Hälfte der 4-6 Wochen alten Kleinhirne gefunden und als Reste der externen Körnerzellschicht gedeutet wurden. Oliver und Mitarbeiter veröffentlichten 2005, dass es sich bei diesen vermeintlichen Resten der externen Körnerzellschicht um präneoplastische Zellen handelt, denen die Expression des Wildtyp-*Ptch1* Allels komplett fehlt (Oliver et al. 2005). Ihr Expressionsprofil ähnelt weitaus mehr dem von Tumorzellen als dem der Körnerzellvorläufer. Zahlreiche Gene, die an der Regulation der Zellmigration, des Zellüberlebens und der Differenzierung beteiligt sind, werden in den beiden Zelltypen differenziell exprimiert. Es scheint also eher die Frage von Bedeutung, welcher suppressive Mechanismus verhindert, dass nicht aus jeder präneoplastischen Zelle mit biallelischer *Ptch1* Inaktivierung ein Medulloblastom erwächst. Das Vorhandensein zusätzlicher Mutationen in anderen Tumorsuppressor/Onkogenen in einer Minderheit präneoplastischer Vorläuferzellen könnte diesen einen Selektionsvorteil im Hinblick auf die Tumorentwicklung verschaffen.

Die signifikant erhöhte Medulloblastominzidenz von 21 % in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu 11 % in den *Nos2* suffizienten *Ptch1*<sup>+/-</sup> Tieren deutet an, dass *Nos2* und somit auch NO in der Hh-abhängigen Medulloblastomgenese eine bedeutende Rolle spielt. Die Untersuchung Tumor-relevanter Änderungen in der postnatalen Kleinhirnentwicklung der *Ptch1*<sup>+/+</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte eine verminderte Proliferation von Körnerzellvorläufern im Vergleich zum Wildtyp. Die gleichzeitige Überexpression von *Ptch1* bei signifikanter Anreicherung von herunterregulierten *Gli1*-Zielgenen suggeriert, dass dieser Effekt eine Konsequenz verminderter Aktivität des Hh Signalweges ist. Tiere vom *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Genotyp mit begleitender heterozygoter *Ptch1* Inaktivierung wiesen keine verminderte Proliferation von Körnerzellvorläufern und eine eher erhöhte Expression von *Gli1*-Zielgenen und *Ptch2* auf. Da *Ptch2* weder eine Smo-regulierende Domäne (Rahnama et al. 2004) noch eine Funktion beim Zellzyklusarrest durch Blockade von Zyklin B1 (Barnes et al. 2001) besitzt, ist seine kompensatorische Überexpression nicht ausreichend, um die Induktion von Medulloblastomen zu verhindern. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnten Ciani und Mitarbeiter an kultivierten Körnerzellvorläufern zeigen, dass ein NO-Entzug, vermittelt durch ein erhöhtes *N-Myc* Expressionsniveau, zu einer gesteigerten Proliferation dieser Zellen führte (Ciani et al. 2004).

Eine erniedrigte *Gap43* Expression war der einzige Unterschied zwischen den *Nos2*-defizienten und *Nos2*-suffizienten postnatalen Kleinhirnen, unabhängig vom *Ptch1*-Status. Dieser Unterschied zeigte sich auch zwischen den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> und *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Medulloblastomen. In anderen Studien wurde bereits eine Verbindung zwischen dem *Gap43* Expressionsniveau und der NO-vermittelten Signalgebung hergestellt. Lopez-Jimenez und Mitarbeiter beobachteten 2009 nach Inhibierung der löslichen Guanylat-Zyklase Untereinheiten, den zentralen Elementen der cGMP-vermittelten NO-Signalgebung, eine erniedrigte *Gap43* Expression (Lopez-Jimenez et al. 2009). Auch die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die erniedrigte *Gap43* Expression eine Folge des NO-Mangels in neuronalen Vorläufer- und Medulloblastomzellen ist. Ursächlich für das erniedrigte *Gap43* Expressionsniveau könnte ein Überschuss an Auf1 (poly(U)-binding and degradation factor) Protein sein. Auf-Proteine binden AU-reiche Elemente der 3'UTR kodierender Transkripte und assoziieren mit Proteinen der ELAV-artigen Proteinfamilie um die Genexpression mittels mRNA Degradation zu kontrollieren. Tsai und Mitarbeiter berichteten, dass das *Gap43* mRNA Level während der neuronalen Differenzierung posttranskriptionell über Elemente in

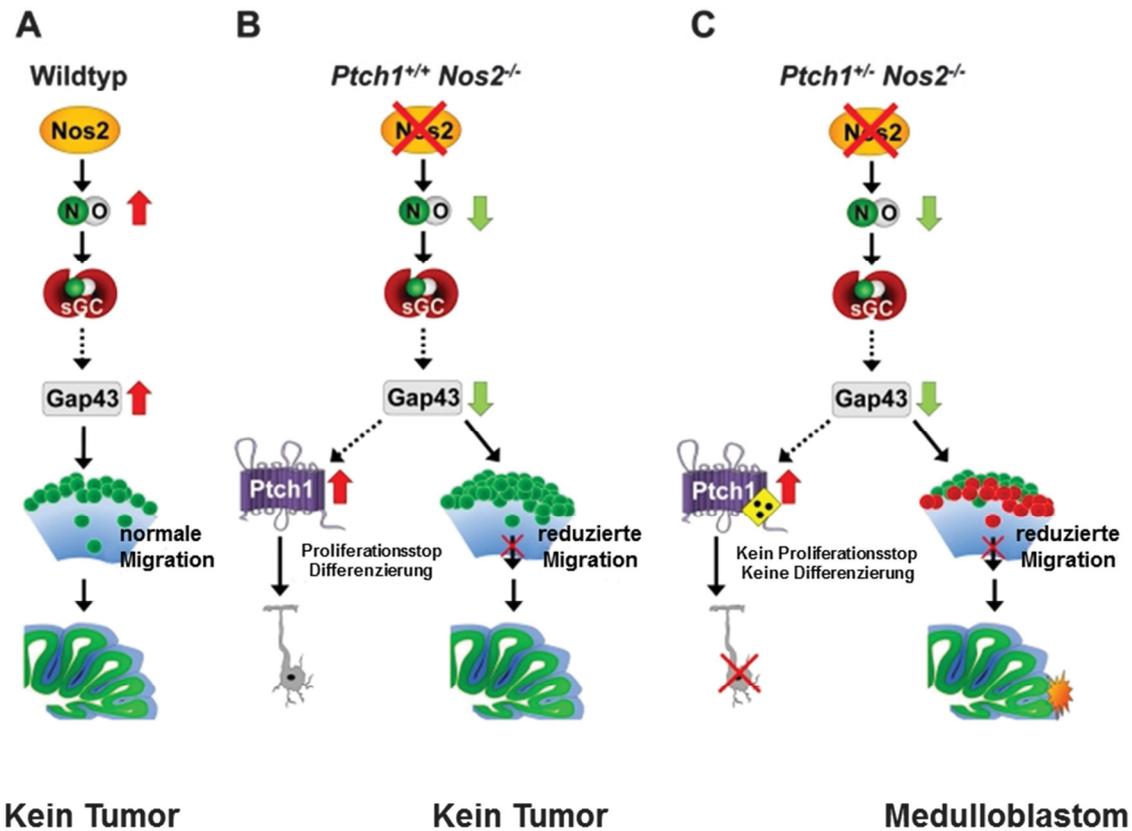
der 3'UTR reguliert wird. Induktion der *Nos2* hebt die Transkriptinstabilität von *Gap43* auf (Tsai et al. 1997). *Gap43* ist ein membranständiges Protein, das auf der zytoplasmatischen Seite neuronaler Zellausläufer in den axonalen Wachstumskegeln lokalisiert ist und das entsprechend externer Stimuli innere Zellumbauprozesse über die Dynamik des Zytoskeletts reguliert (Gorgels et al. 1989; Shen et al. 2002).

Die Wanderung der Körnerzellvorläufer wird durch eine Abfolge von tangentialen und radiären Bewegungen bestimmt, die durch die Ausbildung von Führungsausläufern kontrolliert wird (Chenotat 2010). Wenn reife Körnerzellvorläufer den Zellzyklus verlassen, bestimmt die Position des Zentrosoms die neuronale Polarität und damit die Stelle, an der der Axonwachstumskegel erscheint (Zmuda & Rivas 1998). Dadurch ist die strukturelle Orientierung der GCPs dahingehend vorgegeben, dass sie ihre Dendriten durch die Molekular- und Purkinjezellschicht hinablassen um die IGL zu besiedeln. In Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, dass die erniedrigte *Gap43* Expression in den *Nos2*-defizienten P9-Kleinhirnen wahrscheinlich die in den FFPE-Schnitten beobachtete Retention der GCPs in der EGL bewirkt, wurde in *Gap43*<sup>-/-</sup> Mäusen eine fehlerhafte GCP Migration beobachtet (Mishra et al. 2008). Der NO/cGMP Signalweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Migration der neuronalen Vorläuferzelllinie NT2 (Tegenge & Bicker 2009) und die Gabe von NO-Synthase-Inhibitoren führte zu einer substantiellen Reduktion der Proliferation und Migration von reifenden GCPs zur IGL in Kulturen von Schnitten neonataler Kleinhirne (Tanaka et al. 1994).

Die Erhöhung des *Ptch1* Levels bei reduzierter *Gap43* Expression passt zu den Daten von Shen und Mitarbeitern, die von einer Hochregulation der *Ptch1* Genexpression in den inneren EGL Regionen von *Gap43*<sup>-/-</sup> Mäusen berichten (Shen et al. 2008). Mehr noch, kultivierte *Gap43*-defiziente GCPs zeigten als Antwort auf die Applikation von rekombinantem Shh Protein eine verminderte Proliferation. Eine mögliche regulatorische Verbindung zwischen erniedrigter *Gap43* und erhöhter *Ptch1* Expression wurde in Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P) gefunden. Die Aktivierung der Hh Signalwegskomponente Smoh ist abhängig von dem PI4P Level, das sofort ansteigt, nachdem Shh an *Ptch1* bindet oder funktionales *Ptch1* fehlt. Eine unausgewogene Konversion des Vorläufermoleküls PI zu PI4P beeinflusst ebenfalls den Aktivitätszustand des Hh Signalweges (Yavari et al. 2010). Alternativ kann PI4P auch durch spezifische Dephosphorylierung von PI(4,5)P2 gebildet werden (Skwarek & Boulianne 2009). In diesem Kontext konnten Zakharov und Mosevitzky 2010 zeigen, dass

Gap43 oligomere Strukturen in der Plasmamembran bildet, die spezifisch PI(4,5)P<sub>2</sub> absondern (Zakharov & Mosevitzky 2010). Ähnliche Ergebnisse wurden bereits im Jahre 2000 von Laux und Mitarbeitern vorgestellt, in denen die Beteiligung von Gap43 an der Akkumulation von Plasmalemmaschichten berichtet wird, welche den Rückhalt von PI(4,5)P<sub>2</sub> fördern (Laux et al. 2000). Somit scheint Gap43, indem es die Bereitstellung von PI(4,5)P<sub>2</sub> und dessen Konversion zu PI4P moduliert, den Hh Signalweg über eine Smoh-Aktivierung direkt beeinflussen zu können. Es lässt sich jedoch nur schwer schlussfolgern wie effektiv sich die Gap43 vermittelte Modulation der Smoh Aktivität auf Hh Zielgene stromabwärts von Gli auswirkt. Weitere Studien mit Ausschöpfung und Anreicherung spezifischer Phosphatidylderivate und die selektive Ausschaltung von Hh Signalwegskomponenten sind notwendig, um die molekulare Natur dieser Signalachse weiter zu beleuchten. Die gesteigerte Akkumulation mitotischer Körnerzellen in der EGL von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen liefert den entscheidenden Hinweis auf die Ursache der MB Induktion. Im Gegensatz zu der klassischen Sichtweise der neonatalen EGL Organisation, bei der auf einen Proliferationsstopp eine radiäre Wanderung der Körnerzellen folgt, gibt es immer mehr Hinweise, dass der Wanderung der Körnerzellen kein Zellzyklusarrest vorausgehen muss. Stattdessen nimmt die Proliferation durch ein zeitlich koordiniertes Zusammenspiel von Genexpressionsmustern während der Wanderung ab (Argenti et al. 2005). Diese Daten stimmen gut mit den in Abbildung 27 dargestellten Ergebnissen überein, die zeigen, dass die Körnerzellen während der Wanderung zur IGL und selbst in der IGL vom Wildtyp weiter proliferieren. Die Regulation solcher Expressionsmuster und die Körnerzelltransition durch die Schichten des Cerebellums ist größtenteils von Shh Stimuli sowie Gradienten anderer löslicher Faktoren wie beispielsweise den BMPs abhängig (Blaess et al. 2004, Grimmer & Weiss 2008). Weitere Evidenz für ein Nischen-artiges Konzept lieferten Choi und Mitarbeiter mit *Bdnf*<sup>-/-</sup> Mäusen, die eine stark verzögerte Körnerzellwanderung zeigten (Choi et al. 2005). Die mitotische Aktivität reifender *Bdnf*<sup>-/-</sup> GCPs war signifikant erhöht, wenn sie in der EGL zurückgehalten wurden und nahm mit zunehmender Distanz zu den äußeren Regionen der EGL ab. Deshalb führt die Akkumulation von GCPs in der EGL in Kombination mit der Unempfindlichkeit gegenüber dem *Ptch1*-vermittelten Zellzyklusarrest in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen zu einem Wachstumsvorteil und steigert gegenüber den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen die Anzahl möglicher Zielzellen für eine onkogene Transformation (Abbildung 28 C). Die zusammengefassten Schlussfolgerungen der vorliegenden Daten sind in Abbildung 28 dargestellt. Eine

homozygote *Nos2* Deletion führt während der postnatalen Entwicklung des Kleinhirns zu einer Reduktion des basalen NO Levels in unreifen GCPs der EGL. Diese NO-Reduktion führt zu einer verminderten *Gap43* Expression, die in einer gesteigerten *Ptch1* Expression resultiert und die gerichtete Wanderung von reifenden GCPs beeinträchtigt. Demzufolge verlassen undifferenzierte Körnerzellvorläufer den Zellzyklus und werden in der EGL zurückgehalten (Abbildung 28 B). Die zusätzliche heterozygote *Ptch1* Mutation wirkt dem anti-proliferativen Stimulus der reduzierten *Gap43* Expression entgegen, was zu einer gesteigerten Fraktion sich kontinuierlich teilender Zellen in der EGL führt (Abbildung 28 C). Eine verzögerte Wanderung in Richtung IGL führt zu einem Entzug Wachstums-limitierender Signale, so dass die Expansion der GCP Population gefördert wird und eine Initiation von MB gehäuft in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> auftritt.



**Abbildung 28. Schematisch dargestellter hypothetischer Mechanismus, durch den die *Nos2* Defizienz in *Ptch1<sup>+/-</sup>* Mäusen die MB-Entstehung fördert.**

(A) Unter normalen Bedingungen steigert bzw. stabilisiert das von der *Nos2* gebildete NO in unreifen GCPs das *Gap43* Transkriptlevel und erlaubt die akurate Wanderung der GCPs zur IGL. (B) Inaktivierung der *Nos2* führt zu einer Reduktion der NO-Konzentration, wodurch das *Gap43* Transkriptlevel abnimmt. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der Zellpolarisierung und somit der gerichteten Migration der GCPs zur IGL. Die gleichzeitige Hochregulation von funktionalem *Ptch1* stoppt die Proliferation der GCPs und verhindert die Tumorentstehung. (C) Im *Ptch1<sup>+/-</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* Kleinhirn ist die Wanderung der GCPs ebenfalls durch ein erniedrigtes *Gap43* Level beeinträchtigt. Die Hochregulation eines mutierten, funktionsunfähigen *Ptch1* Proteins verhindert den Zellzyklusarrest, so dass sich proliferierende GCPs in der EGL anhäufen und verstärkt mutagenen und transformierenden Ereignissen ausgesetzt sind. NO: Stickstoffmonoxid, sGC: lösliche Guanylat-Zyklase (Abbildung aus Haag, Zipper et al. 2012).

## 5 Zusammenfassung

Die Aufklärung der molekularen Entstehungsmechanismen von Medulloblastomen des Kleinhirns und Basalzellkarzinomen der Haut ist von großem wissenschaftlichem und medizinischem Interesse. Medulloblastome sind die häufigsten bösartigen Hirntumoren bei Kindern, während Basalzellkarzinome die häufigste Krebserkrankung des Menschen überhaupt darstellt. Den Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen der Shh-Gruppe gemeinsam ist die konstitutive Aktivierung des Shh-Signalweges, hauptsächlich bedingt durch inaktivierende Mutationen des Rezeptorproteins *Ptch1*.

Das *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell zeigt ähnliche Entwicklungsdefekte und eine Tumorprädisposition wie das autosomal dominant erbliche Gorlin-Syndrom des Menschen. Im Gegensatz zu den Gorlin-Patienten bilden *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäuse allerdings erst nach chronischer UVB-Exposition Basalzellkarzinom- und Trichoblastom-artige Tumoren der Haut, die ebenso wie die spontan in diesem Mausmodell auftretenden Medulloblastome den Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit darstellten. UVB-Strahlung moduliert die Expression der induzierbaren NO-Synthase (*Nos2*) in Keratinozyten. Um eine mögliche Rolle der *Nos2* bei der UVB-induzierten Entstehung von Basalkarzinomen *in vivo* zu untersuchen, wurden *Ptch1* haploinsuffiziente Mäuse mit *Nos2* Knockout-Mäusen gekreuzt. *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse sind lebensfähig und fertil, zeigen aber eine signifikant höhere spontane Medulloblastomrate von 21 % gegenüber 11 % in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos*<sup>+/+</sup> Mäusen. Nach chronisch-repetitiver UVB-Exposition entwickelten die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant mehr frühe basaloide Proliferationen der Haut und auch häufiger größere Basalzellkarzinome mit Trichoblastom-artiger Differenzierung (BCC<sup>TB</sup>). Diese BCC<sup>TB</sup> unterschieden sich durch einen aktivierten Shh-Signalweg, gemessen an der Überexpression von *Gli*-Transkriptionsfaktoren, von Plattenepithelzellkarzinomen und keratinisierenden Basalzellkarzinom-artigen Tumoren der Haut. Insgesamt 69 % der untersuchten BCC<sup>TB</sup> Tumoren wiesen eine biallelische *Ptch1*-Inaktivierung infolge Verlustes des Wildtyp-*Ptch1*-Allels (23 %), inaktivierender *Ptch1* Mutationen (27 %) oder einer Methylierung des *Ptch1* Promotors (19 %) auf. Im globalen Expressionsprofil zeigten die *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> eine signifikant erniedrigte *Skint9* Expression gegenüber den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos*<sup>+/+</sup> Mäusen. Dazu passend zeigten sich in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> BCC<sup>TB</sup> Tumoren eine signifikant reduzierte Anzahl von intratumoral gelegenen CD3 positiven T-Lymphozyten. Insgesamt 10 von 21 untersuchten murinen Medulloblastome

wiesen unabhängig vom Genotyp der Tiere einen Verlust des Wildtyp *Ptch1*-Allels auf. *Ptch1* inaktivierende Punktmutationen und Promotormethylierung waren in den Medulloblastomen im Unterschied zu den Basalzellkarzinomen nicht nachweisbar. Medulloblastomzelllinien, die aus murinen *Ptch1*<sup>+/-</sup> Medulloblastomen etabliert wurden, zeigten zusätzlich *Cdkn2A*-Deletionen und *Tp53*-Mutationen. Mit Hilfe von Mikroarray-basierten Expressionsanalysen, Immunfluoreszenzfärbungen und funktionellen Analysen konnte gezeigt werden, dass es durch den Ausfall von *Nos2* zu einer deregulierten Expression von *Gap43* in Körnerzellvorläufern des Kleinhirns kommt, die zu einer verstärkten Retention von proliferationsaktiven Körnerzellvorläuferzellen in der äußeren Körnerzellschicht des Kleinhirns in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> Mäusen führt. Hierdurch wird der Pool an tumorsuszeptiblen Vorläuferzellen erhöht, was zu einer erhöhten Inzidenz spontaner Medulloblastome in den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> relativ zu den *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos*<sup>+/+</sup> Tieren führt. Zusammengefasst zeigen die eigenen Ergebnisse eine tumorfördernde Wirkung des Verlustes von *Nos2* im *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mausmodell, die in Abhängigkeit vom Tumortyp auf unterschiedlichen molekularen Mechanismen beruht: (i) Einerseits führt *Nos2* Defizienz im Kleinhirn durch einen differenzierungs- und migrationshemmenden Effekt auf Körnerzellvorläuferzellen zur Erhöhung der Medulloblastomrate, andererseits (ii) scheint für die Förderung der BCC<sup>TB</sup> Entstehung nach UVB Exposition eine Einschränkung des zellulären Immunsystems in der Haut durch den *Nos2* Verlust von Bedeutung zu sein.

## 6 Summary

The elucidation of the molecular mechanisms leading to medulloblastoma of the cerebellum (MB) and basal cell carcinomas (BCC) of the skin is of great scientific and medical interest. Medulloblastoma is the most common type of malignant brain tumor in children. Basal cell carcinoma is the most common of all cancers in humans. A common feature of BCC and MB of the SHH group is the constitutive activation of the Hh signalling pathway, mainly by mutational inactivation of the receptor protein *Ptch1*. The *Ptch1*<sup>+/-</sup> mouse model resembles the developmental defects and the spontaneous tumor spectrum of the human nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS), an autosomal dominant disorder characterized by multiple BCC and increased risk of medulloblastoma. In contrast to the human patients, *Ptch1*<sup>+/-</sup> mice develop BCC- and trichoblastoma-like tumors only after chronic ultraviolet B (UVB) irradiation. UVB irradiation has been reported to modulate the expression of inducible nitric oxid synthase (*Nos2*) in keratinocytes. To assess a possible role of *Nos2* in UVB-induced cancerogenesis *in vivo*, *Ptch1* haploinsufficient mice were crossed with *Nos2* knockout mice. *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> mice were viable and fertile but demonstrated a significantly higher rate of spontaneous medulloblastomas, with 21 % compared to 11 % of *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> mice. Following chronic repetitive UVB exposure, *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> mice showed a significantly higher incidence of early basaloid proliferations of the skin and larger BCC with trichoblastoma-like differentiation (BCC<sup>TB</sup>) when compared to *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> mice. All investigated murine BCC<sup>TB</sup> had an activated sonic hedgehog signaling pathway as determined by an overexpression of *Gli* transcription factors, a molecular characteristics that distinguished these tumors from squamous cell carcinoma (SCC) and keratinizing BCC-like tumors of the skin (BCC<sup>KT</sup>), which were also observed following chronic repetitive UVB exposure. A total of 75 % of the investigated BCC<sup>TB</sup> demonstrated a biallelic *Ptch1* inactivation, with 19 % of the tumors showing a loss of the wildtype *Ptch1* allele, 25 % inactivating *Ptch1* point mutations and an additional 31 % demonstrating methylation of the *Ptch1* promoter region. Microarray-based gene expression profiling revealed a significantly lower *Skint9* mRNA expression in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> animals in comparison to *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> mice. In line with this finding, a significantly lower number of intratumoral CD3 positive T lymphocytes were found in BCC<sup>TB</sup> from *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> as compared to *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> mice. Concerning medulloblastomas, 10 of 21 investigated tumors demonstrated a loss of the

wildtype *Ptch1* allele, a finding that was independent from the underlying genotype of the mice. In contrast to the skin tumors, none of the medulloblastomas carried an inactivating *Ptch1* point mutation or *Ptch1* promoter hypermethylation. Medulloblastoma cell lines derived from murine *Ptch1*<sup>+/-</sup> medulloblastomas showed additional *Cdkn2A* deletions and *Tp53* mutations. Microarray-based expression profiling, immunofluorescence staining and functional analyses revealed that deregulation of Gap43 expression in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> mice leads to retention and continued proliferation of granule precursor cells in the outer granular cell layer of the cerebellum, thereby likely leading to an increased pool of progenitor cells susceptible to tumorigenesis. Together with the sustained proliferation of these cells in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> mice, this alteration resulted in an increased medulloblastoma incidence in *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> mice relative to *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos*<sup>+/+</sup> mice. Taken together, the findings reported in this doctoral theses suggest that *Nos2* deficiency promotes Shh-dependent tumorigenesis in *Ptch1*<sup>+/-</sup> mice by two distinct tumor type-specific molecular mechanisms, namely (1) inhibition of proper differentiation and migration of granule cell progenitor cells in the cerebellum promoting medulloblastoma development, and (2) impaired immunosurveillance in the skin promoting development of cutaneous BCC<sup>TB</sup> tumors following UVB exposure.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Adesina, A. M., Nalbantoglu, J., & Cavenee, W. K. (1994). p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma. *Cancer Res*, 54(21), 5649-5651.
- [2] Ahmed, N. U., Ueda, M., & Ichihashi, M. (1999). Induced expression of p16 and p21 proteins in UVB-irradiated human epidermis and cultured keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 19(3), 175-181.
- [3] Aldosari, N., Bigner, S. H., Burger, P. C., Becker, L., Kepner, J. L., Friedman, H. S., & McLendon, R. E. (2002). MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group. *Arch Pathol Lab Med*, 126(5), 540-544. doi: 10.1043/0003-9985(2002)126<0540:mamoai>2.0.co;2
- [4] Alvarez-Rodriguez, R., Barzi, M., Berenguer, J., & Pons, S. (2007). Bone morphogenetic protein 2 opposes Shh-mediated proliferation in cerebellar granule cells through a TIEG-1-based regulation of Nmyc. *J Biol Chem*, 282(51), 37170-37180. doi: 10.1074/jbc.M705414200
- [5] Andl, T., Reddy, S. T., Gaddapara, T., & Millar, S. E. (2002). WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell*, 2(5), 643-653.
- [6] Andrade, S. P., Hart, I. R., & Piper, P. J. (1992). Inhibitors of nitric oxide synthase selectively reduce flow in tumor-associated neovasculature. *Br J Pharmacol*, 107(4), 1092-1095.
- [7] Andrew, P. J., Harant, H., & Lindley, I. J. (1995). Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun*, 214(3), 949-956. doi: 10.1006/bbrc.1995.2378
- [8] Ansarin, H., Daliri, M., & Soltani-Arabshahi, R. (2006). Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol*, 16(5), 543-547.
- [9] Argenti, B., Gallo, R., Di Marcotullio, L., Ferretti, E., Napolitano, M., Canterini, S., . . . Gulino, A. (2005). Hedgehog antagonist REN(KCTD11) regulates proliferation and apoptosis of developing granule cell progenitors. *J Neurosci*, 25(36), 8338-8346. doi: 10.1523/jneurosci.2438-05.2005
- [10] Aszterbaum, M., Epstein, J., Oro, A., Douglas, V., LeBoit, P. E., Scott, M. P., & Epstein, E. H., Jr. (1999). Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat Med*, 5(11), 1285-1291. doi: 10.1038/15242
- [11] Auepemkiate, S., Boonyaphiphat, P., & Thongsuksai, P. (2002). p53 expression

- related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma. *Histopathology*, 40(6), 568-573.
- [12] Bai, Y., Onuma, H., Bai, X., Medvedev, A. V., Misukonis, M., Weinberg, J. B., . . . Collins, S. (2005). Persistent nuclear factor-kappa B activation in Ucp2<sup>-/-</sup> mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production. *J Biol Chem*, 280(19), 19062-19069. doi: 10.1074/jbc.M500566200
- [13] Baldwin, G. S., & Shulkes, A. (2007). CCK receptors and cancer. *Curr Top Med Chem*, 7(12), 1232-1238.
- [14] Bale, A. E., & Yu, K. P. (2001). The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Hum Mol Genet*, 10(7), 757-762.
- [15] Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), 539-545. doi: 10.1016/s0140-6736(00)04046-0
- [16] Barnes, E. A., Kong, M., Ollendorff, V., & Donoghue, D. J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J*, 20(9), 2214-2223. doi: 10.1093/emboj/20.9.2214
- [17] Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M. R., Briggs, K., . . . Beachy, P. A. (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 425(6960), 846-851. doi: 10.1038/nature01972
- [18] Bigner, S. H., Mark, J., Friedman, H. S., Biegel, J. A., & Bigner, D. D. (1988). Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 30(1), 91-101.
- [19] Bilican, B., & Goding, C. R. (2006). Cell cycle regulation of the T-box transcription factor tbx2. *Exp Cell Res*, 312(12), 2358-2366. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.03.033
- [20] Blaess, S., Graus-Porta, D., Belvindrah, R., Radakovits, R., Pons, S., Littlewood-Evans, A., . . . Muller, U. (2004). Beta1-integrins are critical for cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci*, 24(13), 3402-3412. doi: 10.1523/jneurosci.5241-03.2004
- [21] Blanc, J., Alves-Guerra, M. C., Esposito, B., Rousset, S., Gourdy, P., Ricquier, D., . . . Mallat, Z. (2003). Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis. *Circulation*, 107(3), 388-390.
- [22] Bogovski, P. (1994). Tumours of the skin. *IARC Sci Publ*(111), 1-45.
- [23] Bolshakov, S., Walker, C. M., Strom, S. S., Selvan, M. S., Clayman, G. L., El-Naggar, A., . . . Ananthaswamy, H. N. (2003). p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*, 9(1), 228-234.

- [24] Boyden, L. M., Lewis, J. M., Barbee, S. D., Bas, A., Girardi, M., Hayday, A. C., . . . Lifton, R. P. (2008). Skint1, the prototype of a newly identified immunoglobulin superfamily gene cluster, positively selects epidermal gammadelta T cells. *Nat Genet*, *40*(5), 656-662. doi: 10.1038/ng.108
- [25] Brellier, F., Marionnet, C., Chevallier-Lagente, O., Toftgard, R., Mauviel, A., Sarasin, A., & Magnaldo, T. (2004). Ultraviolet irradiation represses PATCHED gene transcription in human epidermal keratinocytes through an activator protein-1-dependent process. *Cancer Res*, *64*(8), 2699-2704.
- [26] Buckman, S. Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., & Pentland, A. P. (1998). COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*, *19*(5), 723-729.
- [27] Cadwell, C., & Zambetti, G. P. (2001). The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*, *277*(1-2), 15-30.
- [28] Calzada-Wack, J., Schnitzbauer, U., Walch, A., Wurster, K. H., Kappler, R., Nathrath, M., & Hahn, H. (2002). Analysis of the PTCH coding region in human rhabdomyosarcoma. *Hum Mutat*, *20*(3), 233-234. doi: 10.1002/humu.9056
- [29] Campbell, C., Quinn, A. G., & Rees, J. L. (1993). Codon 12 Harvey-ras mutations are rare events in non-melanoma human skin cancer. *Br J Dermatol*, *128*(2), 111-114.
- [30] Castellino, R. C., De Bortoli, M., Lu, X., Moon, S. H., Nguyen, T. A., Shepard, M. A., . . . Kim, J. Y. (2008). Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D. *J Neurooncol*, *86*(3), 245-256. doi: 10.1007/s11060-007-9470-8
- [31] Chang, H. R., Tsao, D. A., Wang, S. R., & Yu, H. S. (2003). Expression of nitric oxide synthases in keratinocytes after UVB irradiation. *Arch Dermatol Res*, *295*(7), 293-296. doi: 10.1007/s00403-003-0433-4
- [32] Chazal, M., Marionnet, C., Michel, L., Mollier, K., Dazard, J. E., Della Valle, V., . . . Basset-Seguin, N. (2002). P16(INK4A) is implicated in both the immediate and adaptative response of human keratinocytes to UVB irradiation. *Oncogene*, *21*(17), 2652-2661. doi: 10.1038/sj.onc.1205349
- [33] Chedotal, A. (2010). Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends Neurosci*, *33*(4), 163-172. doi: 10.1016/j.tins.2010.01.004
- [34] Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., Tajiri, H., Yoshida, S., & Esumi, H. (1997). Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, *15*(4), 437-442. doi: 10.1038/sj.onc.1201201
- [35] Choi, K. S., Song, E. K., & Yim, C. Y. (2008). Cytokines secreted by IL-2-activated lymphocytes induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in macrophages.

- J Leukoc Biol*, 83(6), 1440-1450. doi: 10.1189/jlb.1007701
- [36] Choi, Y., Borghesani, P. R., Chan, J. A., & Segal, R. A. (2005). Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit. *J Neurosci*, 25(45), 10437-10445. doi: 10.1523/jneurosci.1559-05.2005
- [37] Chuang, P. T., & McMahon, A. P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*, 397(6720), 617-621. doi: 10.1038/17611
- [38] Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R., & Kim, Y. M. (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 282(5), 1075-1079. doi: 10.1006/bbrc.2001.4670
- [39] Ciani, E., Calvanese, V., Crochemore, C., Bartesaghi, R., & Contestabile, A. (2006). Proliferation of cerebellar precursor cells is negatively regulated by nitric oxide in newborn rat. *J Cell Sci*, 119(Pt 15), 3161-3170. doi: 10.1242/jcs.03042
- [40] Ciani, E., Severi, S., Contestabile, A., Bartesaghi, R., & Contestabile, A. (2004). Nitric oxide negatively regulates proliferation and promotes neuronal differentiation through N-Myc downregulation. *J Cell Sci*, 117(Pt 20), 4727-4737. doi: 10.1242/jcs.01348
- [41] Clifford, S. C., Lusher, M. E., Lindsey, J. C., Langdon, J. A., Gilbertson, R. J., Straughton, D., & Ellison, D. W. (2006). Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle*, 5(22), 2666-2670.
- [42] Corcoran, R. B., & Scott, M. P. (2001). A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome. *J Neurooncol*, 53(3), 307-318.
- [43] Cordon-Cardo, C. (1995). Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol*, 147(3), 545-560.
- [44] Cretnik, M., Musani, V., Oreskovic, S., Leovic, D., & Levanat, S. (2007). The Patched gene is epigenetically regulated in ovarian dermoids and fibromas, but not in basocellular carcinomas. *Int J Mol Med*, 19(6), 875-883.
- [45] Crowson, A. N. (2006). Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol*, 19 Suppl 2, S127-147. doi: 10.1038/modpathol.3800512
- [46] Dahmane, N., Lee, J., Robins, P., Heller, P., & Ruiz i Altaba, A. (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*, 389(6653), 876-881. doi: 10.1038/39918
- [47] de Gruijl, F. R. (2002). Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 15(5), 316-320. doi: 64535

- [48] de Vries, E., van de Poll-Franse, L. V., Louwman, W. J., de Gruijl, F. R., & Coebergh, J. W. (2005). Predictions of skin cancer incidence in the Netherlands up to 2015. *Br J Dermatol*, *152*(3), 481-488. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06386.x
- [49] Doglioni, C., Piccinin, S., Demontis, S., Cangi, M. G., Pecciarini, L., Chiarelli, C., . . . Maestro, R. (2003). Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol*, *163*(6), 2277-2287.
- [50] Eberhart, C. G., Kratz, J., Wang, Y., Summers, K., Stearns, D., Cohen, K., . . . Burger, P. C. (2004). Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia. *J Neuropathol Exp Neurol*, *63*(5), 441-449.
- [51] Eberl, M., Klingler, S., Mangelberger, D., Loipetzberger, A., Damhofer, H., Zoidl, K., . . . Aberger, F. (2012). Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO Mol Med*, *4*(3), 218-233. doi: 10.1002/emmm.201100201
- [52] Ehrhart, J. C., Gosselet, F. P., Culerrier, R. M., & Sarasin, A. (2003). UVB-induced mutations in human key gatekeeper genes governing signalling pathways and consequences for skin tumourigenesis. *Photochem Photobiol Sci*, *2*(8), 825-834.
- [53] El-Bahrawy, M., El-Masry, N., Alison, M., Poulson, R., & Fallowfield, M. (2003). Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, *148*(5), 964-970.
- [54] Ellie, E., Loiseau, H., Lafond, F., Arsaut, J., & Demotes-Mainard, J. (1995). Differential expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in human brain tumours. *Neuroreport*, *7*(1), 294-296.
- [55] Ellison, D. W., Dalton, J., Kocak, M., Nicholson, S. L., Fraga, C., Neale, G., . . . Gilbertson, R. J. (2011). Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol*, *121*(3), 381-396. doi: 10.1007/s00401-011-0800-8
- [56] Ellison, D. W., Kocak, M., Dalton, J., Megahed, H., Lusher, M. E., Ryan, S. L., . . . Clifford, S. C. (2011). Definition of disease-risk stratification groups in childhood medulloblastoma using combined clinical, pathologic, and molecular variables. *J Clin Oncol*, *29*(11), 1400-1407. doi: 10.1200/jco.2010.30.2810
- [57] Emre, Y., Hurtaud, C., Ricquier, D., Bouillaud, F., Hughes, J., & Criscuolo, F. (2007). Avian UCP: the killjoy in the evolution of the mitochondrial uncoupling proteins. *J Mol Evol*, *65*(4), 392-402. doi: 10.1007/s00239-007-9020-1
- [58] Epstein, E. H. (2008). Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*, *8*(10), 743-754. doi: 10.1038/nrc2503
- [59] Ferretti, E., De Smaele, E., Miele, E., Laneve, P., Po, A., Pelloni, M., . . . Gulino, A.

- (2008). Concerted microRNA control of Hedgehog signalling in cerebellar neuronal progenitor and tumour cells. *EMBO J*, 27(19), 2616-2627. doi: 10.1038/emboj.2008.172
- [60] Fogarty, M. P., Emmenegger, B. A., Grasdeder, L. L., Oliver, T. G., & Wechsler-Reya, R. J. (2007). Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(8), 2973-2978. doi: 10.1073/pnas.0605770104
- [61] Folkman, J. (1990). Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev*, 9(3), 171-174.
- [62] Frank, A. J., Hernan, R., Hollander, A., Lindsey, J. C., Lusher, M. E., Fuller, C. E., . . . Gilbertson, R. J. (2004). The TP53-ARF tumor suppressor pathway is frequently disrupted in large/cell anaplastic medulloblastoma. *Brain Res Mol Brain Res*, 121(1-2), 137-140. doi: 10.1016/j.molbrainres.2003.11.016
- [63] Frank, S., Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N., & Pfeilschifter, J. (1999). Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J*, 13(14), 2002-2014.
- [64] Friedman, E., Gejman, P. V., Martin, G. A., & McCormick, F. (1993). Nonsense mutations in the C-terminal SH2 region of the GTPase activating protein (GAP) gene in human tumours. *Nat Genet*, 5(3), 242-247. doi: 10.1038/ng1193-242
- [65] Fukumura, D., Yonei, Y., Kurose, I., Saito, H., Ohishi, T., Higuchi, H., . . . Ishi, H. (1996). Role in nitric oxide in Kupffer cell-mediated hepatoma cell cytotoxicity in vitro and ex vivo. *Hepatology*, 24(1), 141-149. doi: 10.1053/jhep.1996.v24.pm0008707254
- [66] Gailani, M. R., Leffell, D. J., Ziegler, A., Gross, E. G., Brash, D. E., & Bale, A. E. (1996). Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 88(6), 349-354.
- [67] Gailani, M. R., Stahle-Backdahl, M., Leffell, D. J., Glynn, M., Zaphiropoulos, P. G., Pressman, C., . . . Toftgard, R. (1996). The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet*, 14(1), 78-81. doi: 10.1038/ng0996-78
- [68] Ghorpade, D. S., Sinha, A. Y., Holla, S., Singh, V., & Balaji, K. N. (2013). NOD2-nitric oxide-responsive microRNA-146a activates Sonic hedgehog signaling to orchestrate inflammatory responses in murine model of inflammatory bowel disease. *J Biol Chem*, 288(46), 33037-33048. doi: 10.1074/jbc.M113.492496
- [69] Giangaspero, F., Eberhardt, C. G., Haapasalo, H., Pietsch, T., Wiestler, O. D., Ellison, D. W. Medulloblastoma. In Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee W. K. "WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System", IARC Press, 2007.

- [70] Girardi, M., Lewis, J., Glusac, E., Filler, R. B., Geng, L., Hayday, A. C., & Tigelaar, R. E. (2002). Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J Exp Med*, 195(7), 855-867.
- [71] Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., . . . Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*, 294(5542), 605-609. doi: 10.1126/science.1063916
- [72] Goodrich, L. V., Milenkovic, L., Higgins, K. M., & Scott, M. P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*, 277(5329), 1109-1113.
- [73] Gorgels, T. G., Van Lookeren Campagne, M., Oestreicher, A. B., Gribnau, A. A., & Gispen, W. H. (1989). B-50/GAP43 is localized at the cytoplasmic side of the plasma membrane in developing and adult rat pyramidal tract. *J Neurosci*, 9(11), 3861-3869.
- [74] Gorlin, R. J. (1987). Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine (Baltimore)*, 66(2), 98-113.
- [75] Gorlin, R. J. (1995). Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin*, 13(1), 113-125.
- [76] Grachtchouk, M., Mo, R., Yu, S., Zhang, X., Sasaki, H., Hui, C. C., & Dlugosz, A. A. (2000). Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. *Nat Genet*, 24(3), 216-217. doi: 10.1038/73417
- [77] Grachtchouk, M., Pero, J., Yang, S. H., Ermilov, A. N., Michael, L. E., Wang, A., . . . Dlugosz, A. A. (2011). Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *J Clin Invest*, 121(5), 1768-1781. doi: 10.1172/jci46307
- [78] Grachtchouk, V., Grachtchouk, M., Lowe, L., Johnson, T., Wei, L., Wang, A., . . . Dlugosz, A. A. (2003). The magnitude of hedgehog signaling activity defines skin tumor phenotype. *EMBO J*, 22(11), 2741-2751. doi: 10.1093/emboj/cdg271
- [79] Griffin, C. A., Hawkins, A. L., Packer, R. J., Rorke, L. B., & Emanuel, B. S. (1988). Chromosome abnormalities in pediatric brain tumors. *Cancer Res*, 48(1), 175-180.
- [80] Grimmer, M. R., & Weiss, W. A. (2008). BMPs oppose Math1 in cerebellar development and in medulloblastoma. *Genes Dev*, 22(6), 693-699. doi: 10.1101/gad.1657808
- [81] Haag, D., Zipper, P., Westrich, V., Karra, D., Pflieger, K., Toedt, G., . . . Lichter, P. (2012). Nos2 inactivation promotes the development of medulloblastoma in Ptch1(+/-) mice by deregulation of Gap43-dependent granule cell precursor migration. *PLoS Genet*, 8(3), e1002572. doi: 10.1371/journal.pgen.1002572

- [82] Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P. G., Gailani, M. R., Shanley, S., Chidambaram, A., . . . Bale, A. E. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85(6), 841-851.
- [83] Hahn, H., Wojnowski, L., Miller, G., & Zimmer, A. (1999). The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *J Mol Med (Berl)*, 77(6), 459-468.
- [84] Hatta, N., Hirano, T., Kimura, T., Hashimoto, K., Mehregan, D. R., Ansai, S., . . . Takata, M. (2005). Molecular diagnosis of basal cell carcinoma and other basaloid cell neoplasms of the skin by the quantification of Gli1 transcript levels. *J Cutan Pathol*, 32(2), 131-136. doi: 10.1111/j.0303-6987.2005.00264.x
- [85] Hedges, J. F., Cockrell, D., Jackiw, L., Meissner, N., & Jutila, M. A. (2003). Differential mRNA expression in circulating gammadelta T lymphocyte subsets defines unique tissue-specific functions. *J Leukoc Biol*, 73(2), 306-314.
- [86] Hedges, J. F., Graff, J. C., & Jutila, M. A. (2003). Transcriptional profiling of gamma delta T cells. *J Immunol*, 171(10), 4959-4964.
- [87] Herrlich, P., Ponta, H., & Rahmsdorf, H. J. (1992). DNA damage-induced gene expression: signal transduction and relation to growth factor signaling. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 119, 187-223.
- [88] Holbrook, N. J., & Fornace, A. J., Jr. (1991). Response to adversity: molecular control of gene activation following genotoxic stress. *New Biol*, 3(9), 825-833.
- [89] Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., & Vingron, M. (2002). Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*, 18 Suppl 1, S96-104.
- [90] Hung, P. S., Liu, C. J., Chou, C. S., Kao, S. Y., Yang, C. C., Chang, K. W., . . . Lin, S. C. (2013). miR-146a enhances the oncogenicity of oral carcinoma by concomitant targeting of the IRAK1, TRAF6 and NUMB genes. *PLoS One*, 8(11), e79926. doi: 10.1371/journal.pone.0079926
- [91] Hussain, S. P., Trivers, G. E., Hofseth, L. J., He, P., Shaikh, I., Mechanic, L. E., . . . Harris, C. C. (2004). Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis. *Cancer Res*, 64(19), 6849-6853. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-2201
- [92] Hutchin, M. E., Kariapper, M. S., Grachtchouk, M., Wang, A., Wei, L., Cummings, D., . . . Dlugosz, A. A. (2005). Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. *Genes Dev*, 19(2), 214-223. doi: 10.1101/gad.1258705
- [93] Ingham, P. W., & McMahon, A. P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 15(23), 3059-3087. doi:

10.1101/gad.938601

- [94] Jameson, J., Ugarte, K., Chen, N., Yachi, P., Fuchs, E., Boismenu, R., & Havran, W. L. (2002). A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science*, *296*(5568), 747-749. doi: 10.1126/science.1069639
- [95] Jayaraman, S. S., Rayhan, D. J., Hazany, S., & Kolodney, M. S. (2014). Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *J Invest Dermatol*, *134*(1), 213-220. doi: 10.1038/jid.2013.276
- [96] Jesko, H., Chalimoniuk, M., & Strosznajder, J. B. (2003). Activation of constitutive nitric oxide synthase(s) and absence of inducible isoform in aged rat brain. *Neurochem Int*, *42*(4), 315-322.
- [97] Jiang, H., Stewart, C. A., Fast, D. J., & Leu, R. W. (1992). Tumor target-derived soluble factor synergizes with IFN-gamma and IL-2 to activate macrophages for tumor necrosis factor and nitric oxide production to mediate cytotoxicity of the same target. *J Immunol*, *149*(6), 2137-2146.
- [98] Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., . . . Scott, M. P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*, *272*(5268), 1668-1671.
- [99] Jones, D. T., Jager, N., Kool, M., Zichner, T., Hutter, B., Sultan, M., . . . Lichter, P. (2012). Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature*, *488*(7409), 100-105. doi: 10.1038/nature11284
- [100] Jonkers, J., & Berns, A. (2002). Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer*, *2*(4), 251-265. doi: 10.1038/nrc777
- [101] Jun, C. D., Pae, H. O., Kwak, H. J., Yoo, J. C., Choi, B. M., Oh, C. D., . . . Chung, H. T. (1999). Modulation of nitric oxide-induced apoptotic death of HL-60 cells by protein kinase C and protein kinase A through mitogen-activated protein kinases and CPP32-like protease pathways. *Cell Immunol*, *194*(1), 36-46. doi: 10.1006/cimm.1999.1480
- [102] Kalderon, D. (2002). Similarities between the Hedgehog and Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol*, *12*(11), 523-531.
- [103] Karhadkar, S. S., Bova, G. S., Abdallah, N., Dhara, S., Gardner, D., Maitra, A., . . . Beachy, P. A. (2004). Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, *431*(7009), 707-712. doi: 10.1038/nature02962
- [104] Kasper, M., Jaks, V., Are, A., Bergstrom, A., Schwager, A., Svard, J., . . . Toftgard, R. (2011). Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(10), 4099-4104. doi: 10.1073/pnas.1014489108

- [105] Kelly, P. M., Davison, R. S., Bliss, E., & McGee, J. O. (1988). Macrophages in human breast disease: a quantitative immunohistochemical study. *Br J Cancer*, 57(2), 174-177.
- [106] Kenney, A. M., Cole, M. D., & Rowitch, D. H. (2003). Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development*, 130(1), 15-28.
- [107] Kessler, J. D., Hasegawa, H., Brun, S. N., Emmenegger, B. A., Yang, Z. J., Dutton, J. W., . . . Wechsler-Reya, R. J. (2009). N-myc alters the fate of preneoplastic cells in a mouse model of medulloblastoma. *Genes Dev*, 23(2), 157-170. doi: 10.1101/gad.1759909
- [108] King, D. P., Hyde, D. M., Jackson, K. A., Novosad, D. M., Ellis, T. N., Putney, L., . . . Ferrick, D. A. (1999). Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J Immunol*, 162(9), 5033-5036.
- [109] Kise, Y., Morinaka, A., Teglund, S., & Miki, H. (2009). Sufu recruits GSK3beta for efficient processing of Gli3. *Biochem Biophys Res Commun*, 387(3), 569-574. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.087
- [110] Kizaki, T., Suzuki, K., Hitomi, Y., Taniguchi, N., Saitoh, D., Watanabe, K., . . . Ohno, H. (2002). Uncoupling protein 2 plays an important role in nitric oxide production of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14), 9392-9397. doi: 10.1073/pnas.142206299
- [111] Klatt, P., Molina, E. P., & Lamas, S. (1999). Nitric oxide inhibits c-Jun DNA binding by specifically targeted S-glutathionylation. *J Biol Chem*, 274(22), 15857-15864.
- [112] Kool, M., Korshunov, A., Remke, M., Jones, D. T., Schlanstein, M., Northcott, P. A., . . . Pfister, S. M. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol*, 123(4), 473-484. doi: 10.1007/s00401-012-0958-8
- [113] Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N. E., Lakeman, A., van Sluis, P., . . . Versteeg, R. (2008). Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*, 3(8), e3088. doi: 10.1371/journal.pone.0003088
- [114] Kovary, K., & Bravo, R. (1991). The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 11(9), 4466-4472.
- [115] Kubo, M., Nakamura, M., Tasaki, A., Yamanaka, N., Nakashima, H., Nomura, M., . . . Katano, M. (2004). Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res*, 64(17), 6071-6074. doi: 10.1158/0008-5472.can-04-0416

- [116] Kwasniak, L. A., & Garcia-Zuazaga, J. (2011). Basal cell carcinoma: evidence-based medicine and review of treatment modalities. *Int J Dermatol*, 50(6), 645-658. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04826.x
- [117] Laird, R. M., & Hayes, S. M. (2009). Profiling of the early transcriptional response of murine gammadelta T cells following TCR stimulation. *Mol Immunol*, 46(11-12), 2429-2438. doi: 10.1016/j.molimm.2009.03.029
- [118] Laubach, V. E., Shesely, E. G., Smithies, O., & Sherman, P. A. (1995). Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(23), 10688-10692.
- [119] Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., & Caroni, P. (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol*, 149(7), 1455-1472.
- [120] Laval, F., & Wink, D. A. (1994). Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis*, 15(3), 443-447.
- [121] Lechner, M., Lirk, P., & Rieder, J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol*, 15(4), 277-289. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.04.004
- [122] Lee, E. Y., Ji, H., Ouyang, Z., Zhou, B., Ma, W., Vokes, S. A., . . . Scott, M. P. (2010). Hedgehog pathway-regulated gene networks in cerebellum development and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(21), 9736-9741. doi: 10.1073/pnas.1004602107
- [123] Lee, S. C., Lee, J. W., Jung, J. E., Lee, H. W., Chun, S. D., Kang, I. K., . . . Kim, Y. P. (2000). Protective role of nitric oxide-mediated inflammatory response against lipid peroxidation in ultraviolet B-irradiated skin. *Br J Dermatol*, 142(4), 653-659.
- [124] Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., . . . Marino, S. (2004). Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature*, 428(6980), 337-341. doi: 10.1038/nature02385
- [125] Li, L. M., Kilbourn, R. G., Adams, J., & Fidler, I. J. (1991). Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res*, 51(10), 2531-2535.
- [126] Lieu, F. M., Yamanishi, K., Konishi, K., Kishimoto, S., & Yasuno, H. (1991). Low incidence of Ha-ras oncogene mutations in human epidermal tumors. *Cancer Lett*, 59(3), 231-235.
- [127] Lindstrom, E., Shimokawa, T., Toftgard, R., & Zaphiropoulos, P. G. (2006). PTCH mutations: distribution and analyses. *Hum Mutat*, 27(3), 215-219. doi: 10.1002/humu.20296

- [128] Lomas, A., Leonardi-Bee, J., & Bath-Hextall, F. (2012). A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, *166*(5), 1069-1080. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10830.x
- [129] Lopez-Jimenez, M. E., Bartolome-Martin, D., Sanchez-Prieto, J., & Torres, M. (2009). Suppression of guanylyl cyclase (beta1 subunit) expression impairs neurite outgrowth and synapse maturation in cultured cerebellar granule cells. *Cell Death Differ*, *16*(9), 1266-1278. doi: 10.1038/cdd.2009.57
- [130] Lupi, O. (2007). Correlations between the Sonic Hedgehog pathway and basal cell carcinoma. *Int J Dermatol*, *46*(11), 1113-1117. doi: 10.1111/j.1365-4632.2007.03391.x
- [131] Mancuso, M., Leonardi, S., Tanori, M., Pasquali, E., Pierdomenico, M., Rebessi, S., . . . Saran, A. (2006). Hair cycle-dependent basal cell carcinoma tumorigenesis in Ptc1neo67/+ mice exposed to radiation. *Cancer Res*, *66*(13), 6606-6614. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3690
- [132] Mancuso, M., Pazzaglia, S., Tanori, M., Hahn, H., Merola, P., Rebessi, S., . . . Saran, A. (2004). Basal cell carcinoma and its development: insights from radiation-induced tumors in Ptch1-deficient mice. *Cancer Res*, *64*(3), 934-941.
- [133] Mashimo, H., & Goyal, R. K. (1999). Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice. *Am J Physiol*, *277*(4 Pt 1), G745-750.
- [134] McCormick, F. (1994). Activators and effectors of ras p21 proteins. *Curr Opin Genet Dev*, *4*(1), 71-76.
- [135] Mendoza-Rodriguez, C. A., & Cerbon, M. A. (2001). [Tumor suppressor gene p53: mechanisms of action in cell proliferation and death]. *Rev Invest Clin*, *53*(3), 266-273.
- [136] Meng, X., Poon, R., Zhang, X., Cheah, A., Ding, Q., Hui, C. C., & Alman, B. (2001). Suppressor of fused negatively regulates beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, *276*(43), 40113-40119. doi: 10.1074/jbc.M105317200
- [137] Merchant, K., Chen, H., Gonzalez, T. C., Keefer, L. K., & Shaw, B. R. (1996). Deamination of single-stranded DNA cytosine residues in aerobic nitric oxide solution at micromolar total NO exposures. *Chem Res Toxicol*, *9*(5), 891-896. doi: 10.1021/tx950102g
- [138] Millen, K. J., & Gleeson, J. G. (2008). Cerebellar development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, *18*(1), 12-19. doi: 10.1016/j.conb.2008.05.010
- [139] Miller, D. L., & Weinstock, M. A. (1994). Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol*, *30*(5 Pt 1), 774-778.
- [140] Mishra, R., Gupta, S. K., Meiri, K. F., Fong, M., Thostrup, P., Juncker, D., & Mani, S.

- (2008). GAP-43 is key to mitotic spindle control and centrosome-based polarization in neurons. *Cell Cycle*, 7(3), 348-357.
- [141] Mombaerts, P., Arnoldi, J., Russ, F., Tonegawa, S., & Kaufmann, S. H. (1993). Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature*, 365(6441), 53-56. doi: 10.1038/365053a0
- [142] Moncada, S., Higgs, A., & Furchgott, R. (1997). International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*, 49(2), 137-142.
- [143] Moomchala, S., & Rajnakova, A. (1999). Role of nitric oxide in cancer biology. *Free Radic Res*, 31(6), 671-679.
- [144] Mootha, V. K., Lepage, P., Miller, K., Bunkenborg, J., Reich, M., Hjerrild, M., . . . Lander, E. S. (2003). Identification of a gene causing human cytochrome c oxidase deficiency by integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(2), 605-610. doi: 10.1073/pnas.242716699
- [145] Moraes, R. C., Zhang, X., Harrington, N., Fung, J. Y., Wu, M. F., Hilsenbeck, S. G., . . . Lewis, M. T. (2007). Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia. *Development*, 134(6), 1231-1242. doi: 10.1242/dev.02797
- [146] Mulhern, R. K., & Butler, R. W. (2004). Neurocognitive sequelae of childhood cancers and their treatment. *Pediatr Rehabil*, 7(1), 1-14; discussion 15-16. doi: 10.1080/13638490310001655528
- [147] Murdoch, C., Giannoudis, A., & Lewis, C. E. (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*, 104(8), 2224-2234. doi: 10.1182/blood-2004-03-1109
- [148] Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6(12), 3051-3064.
- [149] Nathan, C., & Xie, Q. W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915-918.
- [150] Nicolas, M., Wolfer, A., Raj, K., Kummer, J. A., Mill, P., van Noort, M., . . . Radtke, F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*, 33(3), 416-421. doi: 10.1038/ng1099
- [151] Nikitovic, D., Holmgren, A., & Spyrou, G. (1998). Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Commun*, 242(1), 109-112. doi: 10.1006/bbrc.1997.7930
- [152] Nilsson, M., Unden, A. B., Krause, D., Malmqwist, U., Raza, K., Zaphiropoulos, P. G., & Toftgard, R. (2000). Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3438-3443. doi:

10.1073/pnas.050467397

- [153] Nitzki, F., Becker, M., Frommhold, A., Schulz-Schaeffer, W., & Hahn, H. (2012). Patched knockout mouse models of Basal cell carcinoma. *J Skin Cancer*, 2012, 907543. doi: 10.1155/2012/907543
- [154] Northcott, P. A., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C. G., Mack, S., . . . Taylor, M. D. (2011). Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol*, 29(11), 1408-1414. doi: 10.1200/jco.2009.27.4324
- [155] Nusslein-Volhard, C., & Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785), 795-801.
- [156] O'Reilly, M. A., Staversky, R. J., Watkins, R. H., Maniscalco, W. M., & Keng, P. C. (2000). p53-independent induction of GADD45 and GADD153 in mouse lungs exposed to hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278(3), L552-559.
- [157] Ogden, S. K., Ascano, M., Jr., Stegman, M. A., & Robbins, D. J. (2004). Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. *Biochem Pharmacol*, 67(5), 805-814.
- [158] Oliver, T. G., Read, T. A., Kessler, J. D., Mehmeti, A., Wells, J. F., Huynh, T. T., . . . Wechsler-Reya, R. J. (2005). Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Development*, 132(10), 2425-2439. doi: 10.1242/dev.01793
- [159] Oro, A. E., Higgins, K. M., Hu, Z., Bonifas, J. M., Epstein, E. H., Jr., & Scott, M. P. (1997). Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science*, 276(5313), 817-821.
- [160] Packer, M. A., Stasiv, Y., Benraiss, A., Chmielnicki, E., Grinberg, A., Westphal, H., . . . Enikolopov, G. (2003). Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16), 9566-9571. doi: 10.1073/pnas.1633579100
- [161] Pavey, S., Conroy, S., Russell, T., & Gabrielli, B. (1999). Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res*, 59(17), 4185-4189.
- [162] Peng, S. L., Madaio, M. P., Hayday, A. C., & Craft, J. (1996). Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells. *J Immunol*, 157(12), 5689-5698.
- [163] Perdiz, D., Grof, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E., & Sage, E. (2000). Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem*, 275(35), 26732-26742. doi: 10.1074/jbc.M001450200
- [164] Perske, C., Lahat, N., Sheffy Levin, S., Bitterman, H., Hemmerlein, B., & Rahat, M. A. (2010). Loss of inducible nitric oxide synthase expression in the mouse renal cell

- carcinoma cell line RENCA is mediated by microRNA miR-146a. *Am J Pathol*, 177(4), 2046-2054. doi: 10.2353/ajpath.2010.091111
- [165] Pierceall, W. E., Goldberg, L. H., Tainsky, M. A., Mukhopadhyay, T., & Ananthaswamy, H. N. (1991). Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol Carcinog*, 4(3), 196-202.
- [166] Pietsch, T., Waha, A., Koch, A., Kraus, J., Albrecht, S., Tonn, J., . . . Wicking, C. (1997). Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res*, 57(11), 2085-2088.
- [167] Pogoriler, J., Millen, K., Utset, M., & Du, W. (2006). Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation. *Development*, 133(19), 3929-3937. doi: 10.1242/dev.02556
- [168] Pritchard, J. I., & Olson, J. M. (2008). Methylation of PTCH1, the Patched-1 gene, in a panel of primary medulloblastomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 180(1), 47-50. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2007.09.008
- [169] Prives, C., & Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol*, 187(1), 112-126. doi: 10.1002/(sici)1096-9896(199901)187:1<112::aid-path250>3.0.co;2-3
- [170] Proell, M., Riedl, S. J., Fritz, J. H., Rojas, A. M., & Schwarzenbacher, R. (2008). The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. *PLoS One*, 3(4), e2119. doi: 10.1371/journal.pone.0002119
- [171] Pugh TJ, Weeraratne SD, Archer TC, Pomeranz Krummel DA, Auclair D, Bochicchio J, . . . Cho YJ. (2012). Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. *Nature*, 488(7409):106-10. doi: 10.1038/nature11329.
- [172] Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*, 266(7), 4244-4250.
- [173] Raffel, C., Jenkins, R. B., Frederick, L., Hebrink, D., Alderete, B., Fults, D. W., & James, C. D. (1997). Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res*, 57(5), 842-845.
- [174] Rahnema, F., Toftgard, R., & Zaphiropoulos, P. G. (2004). Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J*, 378(Pt 2), 325-334. doi: 10.1042/bj20031200
- [175] Rai, R., Tewari, M., Kumar, M., Singh, T. B., & Shukla, H. S. (2011). Expression profile of cholecystikinin type-A receptor in gallbladder cancer and gallstone disease. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 10(4), 408-414.
- [176] Rao, S. K., Edwards, J., Joshi, A. D., Siu, I. M., & Riggins, G. J. (2010). A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions. *J Neurooncol*, 96(2), 169-179.

doi: 10.1007/s11060-009-9959-4

- [177] Ravanat, J. L., Douki, T., & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*, 63(1-3), 88-102.
- [178] Ray, J. M., & Stetler-Stevenson, W. G. (1994). The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J*, 7(11), 2062-2072.
- [179] Reifemberger, J., Arnold, N., Kiechle, M., Reifemberger, G., & Hauschild, A. (2001). Coincident PTCH and BRCA1 germline mutations in a patient with nevoid basal cell carcinoma syndrome and familial breast cancer. *J Invest Dermatol*, 116(3), 472-474. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.01279-2.x
- [180] Reifemberger, J., Wolter, M., Knobbe, C. B., Kohler, B., Schonicke, A., Scharwachter, C., . . . Reifemberger, G. (2005). Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*, 152(1), 43-51. doi: 10.1111/j.1365-2133.2005.06353.x
- [181] Reifemberger, J., Wolter, M., Weber, R. G., Megahed, M., Ruzicka, T., Lichter, P., & Reifemberger, G. (1998). Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*, 58(9), 1798-1803.
- [182] Roewert-Huber, J., Lange-Asschenfeldt, B., Stockfleth, E., & Kerl, H. (2007). Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*, 157 Suppl 2, 47-51. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08273.x
- [183] Roussel, M. F., & Hatten, M. E. (2011). Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol*, 94, 235-282. doi: 10.1016/b978-0-12-380916-2.00008-5
- [184] Rousset, S., Emre, Y., Join-Lambert, O., Hurtaud, C., Ricquier, D., & Cassard-Doulcier, A. M. (2006). The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity. *Cytokine*, 35(3-4), 135-142. doi: 10.1016/j.cyto.2006.07.012
- [185] Ruel, L., Rodriguez, R., Gallet, A., Lavenant-Staccini, L., & Therond, P. P. (2003). Stability and association of Smoothed, Costal2 and Fused with Cubitus interruptus are regulated by Hedgehog. *Nat Cell Biol*, 5(10), 907-913. doi: 10.1038/ncb1052
- [186] Sasaki, M., Yamaoka, J., & Miyachi, Y. (2000). The effect of ultraviolet B irradiation on nitric oxide synthase expression in murine keratinocytes. *Exp Dermatol*, 9(6), 417-422.
- [187] Sato, K., Yokota, T., Ichioka, S., Shibata, M., & Takeda, S. (2008). Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression. *Acta Myol*, 27, 30-36.

- [188] Schirren, C. G., Rutten, A., Kaudewitz, P., Diaz, C., McClain, S., & Burgdorf, W. H. (1997). Trichoblastoma and basal cell carcinoma are neoplasms with follicular differentiation sharing the same profile of cytokeratin intermediate filaments. *Am J Dermatopathol*, 19(4), 341-350.
- [189] Schlingemann, J., Thuerigen, O., Ittrich, C., Toedt, G., Kramer, H., Hahn, M., & Lichter, P. (2005). Effective transcriptome amplification for expression profiling on sense-oriented oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res*, 33(3), e29. doi: 10.1093/nar/gni029
- [190] Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., . . . Wagner, E. F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*, 13(5), 607-619.
- [191] Schuller, U., Heine, V. M., Mao, J., Kho, A. T., Dillon, A. K., Han, Y. G., . . . Ligon, K. L. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell*, 14(2), 123-134. doi: 10.1016/j.ccr.2008.07.005
- [192] Selin, L. K., Santolucito, P. A., Pinto, A. K., Szomolanyi-Tsuda, E., & Welsh, R. M. (2001). Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells. *J Immunol*, 166(11), 6784-6794.
- [193] Selkirk, J. K. (1980). Chemical carcinogenesis: a brief overview of the mechanism of action of polycyclic hydrocarbons, aromatic amines, nitrosamines, and aflatoxins. *Carcinog Compr Surv*, 5, 1-31.
- [194] Sexton, M., Jones, D. B., & Maloney, M. E. (1990). Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J Am Acad Dermatol*, 23(6 Pt 1), 1118-1126.
- [195] Shen, Y., Mani, S., Donovan, S. L., Schwob, J. E., & Meiri, K. F. (2002). Growth-associated protein-43 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *J Neurosci*, 22(1), 239-247.
- [196] Shen, Y., Mishra, R., Mani, S., & Meiri, K. F. (2008). Both cell-autonomous and cell non-autonomous functions of GAP-43 are required for normal patterning of the cerebellum in vivo. *Cerebellum*, 7(3), 451-466. doi: 10.1007/s12311-008-0049-5
- [197] Sheng, H., Goich, S., Wang, A., Grachtchouk, M., Lowe, L., Mo, R., . . . Dlugosz, A. A. (2002). Dissecting the oncogenic potential of Gli2: deletion of an NH(2)-terminal fragment alters skin tumor phenotype. *Cancer Res*, 62(18), 5308-5316.
- [198] Sheng, T., Li, C., Zhang, X., Chi, S., He, N., Chen, K., . . . Xie, J. (2004). Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer*, 3, 29. doi: 10.1186/1476-4598-3-29
- [199] Shiohara, T., Moriya, N., Hayakawa, J., Itohara, S., & Ishikawa, H. (1996). Resistance

- to cutaneous graft-vs.-host disease is not induced in T cell receptor delta gene-mutant mice. *J Exp Med*, 183(4), 1483-1489.
- [200] Sidorkina, O., Espey, M. G., Miranda, K. M., Wink, D. A., & Laval, J. (2003). Inhibition of poly(ADP-RIBOSE) polymerase (PARP) by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. *Free Radic Biol Med*, 35(11), 1431-1438.
- [201] Skwarek, L. C., & Boulianne, G. L. (2009). Great expectations for PIP: phosphoinositides as regulators of signaling during development and disease. *Dev Cell*, 16(1), 12-20. doi: 10.1016/j.devcel.2008.12.006
- [202] Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3, Article3. doi: 10.2202/1544-6115.1027
- [203] Sneddon, J. B., Zhen, H. H., Montgomery, K., van de Rijn, M., Tward, A. D., West, R., . . . Brown, P. O. (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(40), 14842-14847. doi: 10.1073/pnas.0606857103
- [204] So, P. L., Lee, K., Hebert, J., Walker, P., Lu, Y., Hwang, J., . . . Epstein, E. H., Jr. (2004). Topical tazarotene chemoprevention reduces Basal cell carcinoma number and size in Ptch1<sup>+/-</sup> mice exposed to ultraviolet or ionizing radiation. *Cancer Res*, 64(13), 4385-4389. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-1927
- [205] Soufir, N., & Basset-Seguin, N. (2001). [The INK4a-ARF locus: role in the genetic predisposition to familial melanoma and in skin carcinogenesis]. *Bull Cancer*, 88(11), 1061-1067.
- [206] Staples, M. P., Elwood, M., Burton, R. C., Williams, J. L., Marks, R., & Giles, G. G. (2006). Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust*, 184(1), 6-10.
- [207] Stuehr, D. J., & Nathan, C. F. (1989). Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*, 169(5), 1543-1555.
- [208] Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., . . . Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43), 15545-15550. doi: 10.1073/pnas.0506580102
- [209] Suzuki, K., Yamaguchi, Y., Villacorte, M., Mihara, K., Akiyama, M., Shimizu, H., . . . Yamada, G. (2009). Embryonic hair follicle fate change by augmented beta-catenin through Shh and Bmp signaling. *Development*, 136(3), 367-372. doi: 10.1242/dev.021295

- [210] Tabuchi, A., Sano, K., Oh, E., Tsuchiya, T., & Tsuda, M. (1994). Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett*, *351*(1), 123-127.
- [211] Tanaka, M., Yoshida, S., Yano, M., & Hanaoka, F. (1994). Roles of endogenous nitric oxide in cerebellar cortical development in slice cultures. *Neuroreport*, *5*(16), 2049-2052.
- [212] Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C. C., Mainprize, T. G., Zhang, X., . . . Hogg, D. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*, *31*(3), 306-310. doi: 10.1038/ng916
- [213] Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y. J., Clifford, S. C., . . . Pfister, S. M. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol*, *123*(4), 465-472. doi: 10.1007/s00401-011-0922-z
- [214] Taylor, M. D., Zhang, X., Liu, L., Hui, C. C., Mainprize, T. G., Scherer, S. W., . . . Rutka, J. T. (2004). Failure of a medulloblastoma-derived mutant of SUFU to suppress WNT signaling. *Oncogene*, *23*(26), 4577-4583. doi: 10.1038/sj.onc.1207605
- [215] Tegenge, M. A., & Bicker, G. (2009). Nitric oxide and cGMP signal transduction positively regulates the motility of human neuronal precursor (NT2) cells. *J Neurochem*, *110*(6), 1828-1841. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06279.x
- [216] Teglund, S., & Toftgard, R. (2010). Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, *1805*(2), 181-208. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.01.003
- [217] ten Donkelaar, H. J., Lammens, M., Wesseling, P., Thijssen, H. O., & Renier, W. O. (2003). Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J Neurol*, *250*(9), 1025-1036. doi: 10.1007/s00415-003-0199-9
- [218] Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., . . . Hebrok, M. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, *425*(6960), 851-856. doi: 10.1038/nature02009
- [219] Thompson, M. C., Fuller, C., Hogg, T. L., Dalton, J., Finkelstein, D., Lau, C. C., . . . Gilbertson, R. J. (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol*, *24*(12), 1924-1931. doi: 10.1200/jco.2005.04.4974
- [220] Thomsen, L. L., Miles, D. W., Happerfield, L., Bobrow, L. G., Knowles, R. G., & Moncada, S. (1995). Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer*, *72*(1), 41-44.
- [221] Tjiu, J. W., Chen, J. S., Shun, C. T., Lin, S. J., Liao, Y. H., Chu, C. Y., . . . Jee, S. H. (2009). Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human

- basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *J Invest Dermatol*, 129(4), 1016-1025. doi: 10.1038/jid.2008.310
- [222] Treisman, R. (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J*, 14(20), 4905-4913.
- [223] Tripp, C. S., Blomme, E. A., Chinn, K. S., Hardy, M. M., LaCelle, P., & Pentland, A. P. (2003). Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. *J Invest Dermatol*, 121(4), 853-861. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12495.x
- [224] Tsai, K. C., Cansino, V. V., Kohn, D. T., Neve, R. L., & Perrone-Bizzozero, N. I. (1997). Post-transcriptional regulation of the GAP-43 gene by specific sequences in the 3' untranslated region of the mRNA. *J Neurosci*, 17(6), 1950-1958.
- [225] Uhmman, A., Ferch, U., Bauer, R., Tauber, S., Arziman, Z., Chen, C., . . . Hahn, H. (2005). A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing. *Int J Oncol*, 27(6), 1567-1575.
- [226] Uhmman, A., Niemann, H., Lammering, B., Henkel, C., Hess, I., Nitzki, F., . . . Hahn, H. (2011). Antitumoral effects of calcitriol in basal cell carcinomas involve inhibition of hedgehog signaling and induction of vitamin D receptor signaling and differentiation. *Mol Cancer Ther*, 10(11), 2179-2188. doi: 10.1158/1535-7163.mct-11-0422
- [227] Vamvakas, S., & Schmidt, H. H. (1997). Just say NO to cancer? *J Natl Cancer Inst*, 89(6), 406-407.
- [228] van der Schroeff, J. G., Evers, L. M., Boot, A. J., & Bos, J. L. (1990). Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin. *J Invest Dermatol*, 94(4), 423-425.
- [229] Vorechovsky, I., Benediktsson, K. P., & Toftgard, R. (1999). The patched/hedgehog/smoothened signalling pathway in human breast cancer: no evidence for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations. *Eur J Cancer*, 35(5), 711-713.
- [230] Wang, T., Gao, Y., Scully, E., Davis, C. T., Anderson, J. F., Welte, T., . . . Fikrig, E. (2006). Gamma delta T cells facilitate adaptive immunity against West Nile virus infection in mice. *J Immunol*, 177(3), 1825-1832.
- [231] Wechsler-Reya, R. J., & Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 22(1), 103-114.
- [232] Wechsler-Reya, R., & Scott, M. P. (2001). The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci*, 24, 385-428. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.385
- [233] Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., . . . Liew, F. Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase.

- Nature*, 375(6530), 408-411. doi: 10.1038/375408a0
- [234] Wen, X., Lai, C. K., Evangelista, M., Hongo, J. A., de Sauvage, F. J., & Scales, S. J. (2010). Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation. *Mol Cell Biol*, 30(8), 1910-1922. doi: 10.1128/mcb.01089-09
- [235] Wetmore, C., Eberhart, D. E., & Curran, T. (2000). The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched. *Cancer Res*, 60(8), 2239-2246.
- [236] Wink, D. A., & Laval, J. (1994). The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 15(10), 2125-2129.
- [237] Wolf, I., Bose, S., Desmond, J. C., Lin, B. T., Williamson, E. A., Karlan, B. Y., & Koeffler, H. P. (2007). Unmasking of epigenetically silenced genes reveals DNA promoter methylation and reduced expression of PTCH in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 105(2), 139-155. doi: 10.1007/s10549-006-9440-4
- [238] Wolter, M., Reifenberger, J., Sommer, C., Ruzicka, T., & Reifenberger, G. (1997). Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*, 57(13), 2581-2585.
- [239] Xiao, L., Eneroth, P. H., & Qureshi, G. A. (1995). Nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity. *Scand J Immunol*, 42(5), 505-511.
- [240] Xie, J., Aszterbaum, M., Zhang, X., Bonifas, J. M., Zachary, C., Epstein, E., & McCormick, F. (2001). A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16), 9255-9259. doi: 10.1073/pnas.151173398
- [241] Xie, J., Murone, M., Luoh, S. M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., . . . de Sauvage, F. J. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*, 391(6662), 90-92. doi: 10.1038/34201
- [242] Xie, K., & Abbruzzese, J. L. (2003). Developmental biology informs cancer: the emerging role of the hedgehog signaling pathway in upper gastrointestinal cancers. *Cancer Cell*, 4(4), 245-247.
- [243] Xie, Q., & Nathan, C. (1994). The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*, 56(5), 576-582.
- [244] Xiong, Q., Shi, Q., Le, X., Wang, B., & Xie, K. (2001). Regulation of interleukin-8 expression by nitric oxide in human pancreatic adenocarcinoma. *J Interferon Cytokine Res*, 21(7), 529-537. doi: 10.1089/10799900152434411
- [245] Yang, S. H., Andl, T., Grachtchouk, V., Wang, A., Liu, J., Syu, L. J., . . . Dlugosz, A.

- A. (2008). Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/beta3-catenin signaling. *Nat Genet*, 40(9), 1130-1135. doi: 10.1038/ng.192
- [246] Yavari, A., Nagaraj, R., Owusu-Ansah, E., Folick, A., Ngo, K., Hillman, T., . . . Banerjee, U. (2010). Role of lipid metabolism in smoothed derepression in hedgehog signaling. *Dev Cell*, 19(1), 54-65. doi: 10.1016/j.devcel.2010.06.007
- [247] Youssef, K. K., Van Keymeulen, A., Lapouge, G., Beck, B., Michaux, C., Achouri, Y., . . . Blanpain, C. (2010). Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol*, 12(3), 299-305. doi: 10.1038/ncb2031
- [248] Zachariadis, V., Schoumans, J., Barbany, G., Heyman, M., Forestier, E., Johansson, B., . . . Nordgren, A. (2012). Homozygous deletions of CDKN2A are present in all dic(9;20)(p13.2;q11.2)-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias and may be important for leukaemic transformation. *Br J Haematol*, 159(4), 488-491. doi: 10.1111/bjh.12051
- [249] Zakharov, V. V., & Mosevitsky, M. I. (2010). Oligomeric structure of brain abundant proteins GAP-43 and BASP1. *J Struct Biol*, 170(3), 470-483. doi: 10.1016/j.jsb.2010.01.010
- [250] Zakrzewska, M., Rieske, P., Debiec-Rychter, M., Zakrzewski, K., Polis, L., Fiks, T., & Liberski, P. P. (2004). Molecular abnormalities in pediatric embryonal brain tumors--analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 1, 5, 9, 10, 11, 16, 17 and 22. *Clin Neuropathol*, 23(5), 209-217.
- [251] Zheng, B. J., Chan, K. W., Im, S., Chua, D., Sham, J. S., Tin, P. C., . . . Ng, M. H. (2001). Anti-tumor effects of human peripheral gammadelta T cells in a mouse tumor model. *Int J Cancer*, 92(3), 421-425.
- [252] Zhou, J., Dehne, N., & Brune, B. (2009). Nitric oxide causes macrophage migration via the HIF-1-stimulated small GTPases Cdc42 and Rac1. *Free Radic Biol Med*, 47(6), 741-749. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.006
- [253] Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L., & Thomsen, G. H. (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400(6745), 687-693. doi: 10.1038/23293
- [254] Zhu, Y., Yu, T., Zhang, X. C., Nagasawa, T., Wu, J. Y., & Rao, Y. (2002). Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat Neurosci*, 5(8), 719-720. doi: 10.1038/nn881
- [255] Zibat, A., Uhmman, A., Nitzki, F., Wijgerde, M., Frommhold, A., Heller, T., . . . Hahn, H. (2009). Time-point and dosage of gene inactivation determine the tumor spectrum in conditional Ptch knockouts. *Carcinogenesis*, 30(6), 918-926. doi: 10.1093/carcin/bgp068

- [256] Ziegler, A., Leffell, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., . . . et al. (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(9), 4216-4220.
- [257] Zmuda, J. F., & Rivas, R. J. (1998). The Golgi apparatus and the centrosome are localized to the sites of newly emerging axons in cerebellar granule neurons in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton*, 41(1), 18-38. doi: 10.1002/(sici)1097-0169(1998)41:1<18::aid-cm2>3.0.co;2-b

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.dest.	Aqua destillata
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
BCC	Basalzellkarzinom
BFB	Bromphenolblau
Bp	Basenpaar
BCPs	Basalzellproliferationen
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
c.	cDNA
CCD	charge-coupled device
cDNA	Komplementäre DNA (copy DNA)
CGH	Komparative genomische Hybridisierung
Chr	Chromosom
CI	Chloroform Isoamylalkohol
cm <sup>2</sup>	Zentimeter
CsCl	Cäsiumchlorid
Ct	Zyklusschwellenwert (cycle threshold)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGL	external granular layer; externe Körnerzellschicht
ELAV	embryonic lethal abnormal visual
EV	Expressionsverhältnis
F	Forward
FCS	fötales Rinderserum
FFPE	Formalin-fixierte Paraffin eingebettete
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fr	Freitag
G	Guanin
GCP	granule cell progenitor; Körnerzellvorläufer
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GITC	Guanidinisoithiocyanat
GSEA	Gene set enrichment analysis

H	Stunde(n)
H&E	Hämatoxin und Eosin
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
H-RT	RNaseH minus reverse Transkriptase
IMEM	improved minimal essential Medium
IVS	intervening sequences
k.o.	knockout
L-NAME	N-Nitro-L-Arginin Methylester
M	molar
MB	Medulloblastom
µl	Microliter
Mi	Mittwoch
miR	Mikroribonukleinsäure
miRNA	Mikroribonukleinsäure
mJ	Millijoule
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
Mo	Montag
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumazetat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
NB	normales Gehirn (normal brain)
NBCCS	nevroid basal cell carcinoma syndrome
nm	nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NOC-18	Diethylenetriamine/nitric oxide adduct
NPI	Institut für Neuropathologie
NS	normale Haut (normal skin)
p.	protein
P9	post partum Tag 9
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pd(N) <sub>6</sub>	Polydesoxyhexanukleotid
pmol	Pikomol
R	Reverse
RIN	Ribonukleinsäure integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
rNOS	reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde(n)
SCC	Plattenepithelzellkarzinom
SSCP	single strand conformation polymorphism
T	Thymidin
TAcKLE	Target Amplification and cDNA Klenow Labelling for Expression Analysis
TCA	vorübergehend amplifizierende Zellen (transient amplifying cells)

TAE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Essigsäure, Ethylendiamintetraacetat
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin
TVA	Tierversuchsanlage
UVB	Ultraviolet B
V/cm <sup>2</sup>	Volt pro Quadratcentimeter
VE	vollentionisiert
Vol.	Volumen
vs.	versus
WT	Wildtyp

## 8.2 Tabellen

**Tabelle S1. Differenziell exprimierte Gene in Wildtyp-Haut im Alter von 22 Wochen mit UVB-Exposition vs. ohne UVB-Exposition.**

	EV	Symbol	Beschreibung	Ensemble ID	Oligo ID
1	4,516	Pla2g4f	Cytosolic phospholipase A2 zeta	ENSMUSG00000046971	M300017838
2	3,950	Klk6	kallikrein related-peptidase 6	ENSMUSG00000050063	M200001518
3	3,931	Cxcl10	C-X-C motif chemokine 10 Precursor	ENSMUSG00000034855	M200000311
4	3,630	Gbp1	Interferon-induced guanylate-binding protein 1	ENSMUSG00000028269	M200000089
5	3,396	Olah	S-acyl fatty acid synthase thioesterase, medium chain	ENSMUSG00000026645	M300005223
6	3,386	Hfe2	Hemojuvelin Precursor	ENSMUSG00000038403	M200016372
7	3,382	2300005B03Rik	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 2 Precursor	ENSMUSG00000075605	M300003400
8	3,370	Cxcl9	C-X-C motif chemokine 9 Precursor	ENSMUSG00000029417	M200000272
9	3,315	Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV	ENSMUSG00000059089	M300021278
10	3,072	Krt2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	ENSMUSG00000064201	M400008594
11	3,049	Pmaip1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	ENSMUSG00000024521	M200009479
12	3,018	Ilgp1	Interferon-inducible GTPase 1	ENSMUSG00000054072	M400004695
13	2,996	Ccl2	C-C motif chemokine 2 Precursor	ENSMUSG00000035385	M200000049
14	2,932	Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	ENSMUSG00000034459	M200002418
15	2,894	Dgat2l4	Acyl-CoA wax alcohol acyltransferase 2	ENSMUSG00000031220	M300007620
16	2,863	Zbp1	Z-DNA-binding protein 1	ENSMUSG00000027514	M300005673
17	2,834	Hnrn	Hornerin	ENSMUSG00000041991	M400002571
18	2,826	Apol7a	apolipoprotein L 7a	ENSMUSG00000010601	M400000177
19	2,722	Gbp2	Interferon-induced guanylate-binding protein 2	ENSMUSG00000028270	M200004765
20	2,634	Klra2	Killer cell lectin-like receptor 2	ENSMUSG00000030187	M300007061
21	2,628	Ccl5	C-C motif chemokine 5 Precursor	ENSMUSG00000035042	M400011211
22	2,626	Igtp	interferon gamma induced GTPase	ENSMUSG00000078853	M200000303
23	2,597	Lilrb4	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4 Precursor	ENSMUSG00000062593	M400005881
24	2,536	Slurp1	Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1 Precursor	ENSMUSG00000022596	M200005629
25	2,470	Olfir56	olfactory receptor 56	ENSMUSG00000048852	M400003473
26	2,413	Ccl7	C-C motif chemokine 7 Precursor	ENSMUSG00000035373	M200003414
27	2,385	Tmigd1	Transmembrane and immunoglobulin domain-containing protein 1 Precursor	ENSMUSG00000020839	M200005054
28	2,325	Cst6	cystatin E/M	ENSMUSG00000024846	M200007898
29	2,298	Casp1	Caspase-1 Precursor (CASP-1)	ENSMUSG00000025888	M200000383
30	2,289	Ccl5	C-C motif chemokine 5 Precursor	ENSMUSG00000035042	M300009668
31	2,209	Bglap-rs1	Osteocalcin-related protein Precursor (OC-X)(Nephrocalcin)	ENSMUSG00000074489	M400008030
32	2,187	Nupr1	Nuclear protein 1 (Protein p8)	ENSMUSG00000030717	M200003674
33	2,156	Apol7c	apolipoprotein L 7c	ENSMUSG00000044309	M400002882
34	2,022	Bglap1	bone gamma carboxyglutamate protein 1 isoform 1	ENSMUSG00000074483	M400008324
35	0,455	Il12rb2	Interleukin-12 receptor beta-2 chain Precursor	ENSMUSG00000018341	M200002198
36	0,416	Cdh17	Cadherin-17 Precursor	ENSMUSG00000028217	M400001068
37	0,364	Neb	Nebulin	ENSMUSG00000026950	M400010219
38	0,322	Slco4c1	Solute carrier organic anion transporter family member 4C1	ENSMUSG00000040693	M400002428
39	0,315	Il20ra	Interleukin-20 receptor alpha chain Precursor	ENSMUSG00000020007	M300001949
40	0,240	Sprr2e	Small proline-rich protein 2l	ENSMUSG00000042157	M400002587

EV, Expressionsverhältnis

Tabelle S2. Differenziell exprimierte Gene in BCC<sup>TB</sup> vs. SCC.

	EV	Symbol	Beschreibung	Ensemble ID	Oligo ID
1	7,748	Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1 Gene	ENSMUSG00000025407	M300004622
2	5,922	Hhip	Hedgehog-interacting protein Gene	ENSMUSG00000064325	M200008617
3	5,773	Scnn1g	sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma Gene	ENSMUSG00000000216	M400000010
4	4,421	RP23-295C20.2	RIKEN cDNA 9130206I24 gene (9130206I24Rik), non-coding RNA	ENSMUSG00000085399	M400018401
5	4,290	Kif7	kinesin family member 7 Gene	ENSMUSG00000050382	M400003678
6	3,982	Pfn2	profilin 2 Gene	ENSMUSG00000027805	M400001029
7	3,976	Sms	spermine synthase Gene	ENSMUSG00000071708	M200003660
8	3,550	Tspan11	tetraspanin 11 Gene	ENSMUSG00000030351	M200011768
9	3,077	Itih5	inter-alpha (globulin) inhibitor H5 Gene	ENSMUSG00000025780	M300004762
10	2,851	Scml2	sex comb on midleg-like 2 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000000037	M400000001
11	0,423	Wnt10a	wingless related MMTV integration site 10a Gene	ENSMUSG00000026167	M200002167
12	0,402	Ppm1l	protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like Gene	ENSMUSG00000027784	M400015671
13	0,398	Slc6a4	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 Gene	ENSMUSG00000020838	M200001498
14	0,381	Ero1l	ERO1-like (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000021831	M200013120
15	0,350	Ociad2	OCIA domain containing 2 Gene	ENSMUSG00000029153	M200008119
16	0,286	Acp5	acid phosphatase 5, tartrate resistant Gene	ENSMUSG00000001348	M200014477
17	0,264	Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 Gene	ENSMUSG00000047250	M300018104
18	0,262	Ggct	gamma-glutamyl cyclotransferase Gene	ENSMUSG00000002797	M200005512
19	0,244	Cnfn	cornifelin Gene	ENSMUSG00000063651	M400008357
20	0,243	Fam110c	family with sequence similarity 110, member C Gene	ENSMUSG00000036136	M200006326
21	0,241	P2ry1	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 1 Gene	ENSMUSG00000027765	M200001396
22	0,232	Hbegf	heparin-binding EGF-like growth factor Gene	ENSMUSG00000024486	M400000748
23	0,226	Klk9	kallikrein related-peptidase 9 Gene	ENSMUSG00000047884	M400003356
24	0,225	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 Gene	ENSMUSG00000028645	M300006210
25	0,216	Pla1a	phospholipase A1 member A Gene	ENSMUSG00000002847	M200004834
26	0,206	Gsto1	glutathione S-transferase omega 1 Gene	ENSMUSG00000025068	M200000102
27	0,196	Fam162a	family with sequence similarity 162, member A Gene	ENSMUSG00000003955	M200005353
28	0,158	Egln3	EGL nine homolog 3 (C. elegans) Gene	ENSMUSG00000035105	M200007373
29	0,140	Glyat	glycine-N-acyltransferase Gene	ENSMUSG00000063683	M300012287
30	0,058	Tslp	thymic stromal lymphopoietin Gene	ENSMUSG00000024379	M300004097

EV, Expressionsverhältnis

**Tabelle S3. Differenziell exprimierte Gene in BCC<sup>1B</sup> von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> vs. *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen.**

	EV	Symbol	Beschreibung	Ensemble ID	Oligo ID
1	7,647	Cckar	cholecystokinin A receptor Gene	ENSMUSG00000029193	M200001378
2	2,819	Bdh2	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2 Gene	ENSMUSG00000028167	M200014180
3	2,751	Zc4h2	zinc finger, C4H2 domain containing Gene	ENSMUSG00000035062	M300009676
4	2,691	I600029D21Rik	RIKEN cDNA I600029D21 gene Gene	ENSMUSG00000032068	M300008055
5	2,568	Bend5	BEN domain containing 5 Gene	ENSMUSG00000028545	M400001093
6	2,466	Vwf	Von Willebrand factor homolog Gene	ENSMUSG00000001930	M300000247
7	2,353	Pcdhb12	protocadherin beta 12 Gene	ENSMUSG00000004348	M200012768
8	2,318	Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6 Gene	ENSMUSG00000027078	M300005461
9	2,308	Brd3	bromodomain containing 3 Gene	ENSMUSG00000026918	M300005377
10	2,277	2610044015Rik	RIKEN cDNA 2610044015 gene Gene	ENSMUSG00000066057	M400006440
11	2,266	D0H4S114	DNA segment, human D4S114 Gene	ENSMUSG000000042834	M400011759
12	2,204	Impad1	inositol monophosphatase domain containing 1 Gene	ENSMUSG000000066324	M400012431
13	2,074	Ubxn2a	UBX domain protein 2A Gene	ENSMUSG00000020634	M200008309
14	2,033	Slc2a13	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13 Gene	ENSMUSG000000036298	M400015465
15	2,024	Slc4a7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7 Gene	ENSMUSG000000021733	M400000508
16	2,007	Aplnr	apelin receptor Gene	ENSMUSG000000044338	M300015362
17	0,489	Spag1	sperm associated antigen 1 Gene	ENSMUSG000000037617	M200015401
18	0,418	2310046A06Rik	RIKEN cDNA 2310046A06 gene Gene	ENSMUSG000000032355	M200007693
19	0,400	Nrg4	neuregulin 4 Gene	ENSMUSG000000032311	M300008183
20	0,339	Mc2r	melanocortin 2 receptor Gene	ENSMUSG000000045569	M200013623
21	0,326	Gml13178	predicted gene 13178 Gene	ENSMUSG000000041735	M400002536
22	0,287	Fbp2	fructose biphosphatase 2 Gene   null	ENSMUSG000000021456	M300002767
23	0,278	AC159257.2	cDNA sequence BC055004 (BC055004), mRNA	ENSMUSG000000047592	M300018437
24	0,272	Calcb	calcitonin-related polypeptide, beta Gene	ENSMUSG000000030666	M300007350
25	0,272	Myl1	myosin, light polypeptide 1 Gene	ENSMUSG000000061816	M300004881
26	0,258	Oas1f	2'-5' oligoadenylate synthetase 1F Gene	ENSMUSG000000053765	M300006761
27	0,211	Lcelm	late cornified envelope 1M Gene	ENSMUSG000000027912	M400011481
28	0,210	4930438A08Rik	RIKEN cDNA 4930438A08 gene Gene	ENSMUSG000000069873	M200015483
29	0,207	Panx3	pannexin 3 Gene	ENSMUSG000000011118	M300001125
30	0,196	Myh2	myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult Gene	ENSMUSG000000033196	M200007574
31	0,190	Cyp2j12	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 12, pseudogene Pseudogene	ENSMUSG000000081225	M400010328
32	0,164	Om1	orosomucoid 1 Gene	ENSMUSG000000039196	M300012021
33	0,157	Prg4	proteoglycan 4 (megakaryocyte stimulating factor, articular superficial zone protein) Gene	ENSMUSG000000006014	M200013230
34	0,149	Tmem56	transmembrane protein 56 Gene	ENSMUSG000000028132	M200012889
36	0,141	Aadac	arylacetamide deacetylase (esterase) Gene	ENSMUSG000000027761	M200004926
37	0,136	Myot	myotilin Gene	ENSMUSG000000024471	M200009483
38	0,127	Lce6a	late cornified envelope 6A Gene	ENSMUSG000000086848	M400015061
39	0,123	Serp1b1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 11 Gene	ENSMUSG000000026327	M200003108
40	0,120	Flg2	filaggrin family member 2 Gene	ENSMUSG000000049133	M400004754
41	0,119	Fpr1	formyl peptide receptor 1 Gene	ENSMUSG000000045551	M200014868
42	0,118	Csrp3	cysteine and glycine-rich protein 3 Gene	ENSMUSG000000030470	M200003487
43	0,118	Gdpd3	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 Gene	ENSMUSG000000030703	M200005744
44	0,113	Tet2	tet oncogene family member 2 Gene	ENSMUSG000000040943	M300012947
45	0,109	1100001G20Rik	RIKEN cDNA 1100001G20 gene Gene	ENSMUSG000000051748	M400003878
46	0,096	Abra	actin-binding Rho activating protein Gene	ENSMUSG000000042895	M300013987
47	0,095	Skint9	selection and upkeep of intraepithelial T cells 9 Gene	ENSMUSG000000049972	M400003627

EV, Expressionsverhältnis

**Tabelle S4. Differenziell exprimierte Gene in Medulloblastomen von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> vs. *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/+</sup> Mäusen.**

	EV	Symbol	Beschreibung	Ensembl ID	Oligo ID
1	5.661	Otx1*	orthodenticle homolog 1 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000005917	M300000735
2	4.308	Stmn1*   Dlgap1	stathmin 1 Gene   discs, large (Drosophila) homolog-associated	ENSMUSG00000028832	M300006321
3	2.595	Hmgcll1	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase-like 1	ENSMUSG00000007908	M300000940
4	2.473	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 Gene	ENSMUSG00000022425	M200005834
5	2.224	Tspan11	tetraspanin 11 Gene	ENSMUSG00000030351	M200011768
6	2.205	Slc25a3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 3 Gene	ENSMUSG00000061904	M300001917
7	2.141	Ehbp1	EH domain binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000042302	M300013624
8	2.078	S100a4	S100 calcium binding protein A4 Gene	ENSMUSG00000001020	M400011125
9	2.045	Mpp6	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily)	ENSMUSG00000038388	M300011535
10	2.027	Pdgfra*	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide Gene	ENSMUSG00000029231	M200001112
11	2.003	Entpd4*	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 Gene	ENSMUSG00000022066	M400011543
12	0.500	Uhrf1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 Gene	ENSMUSG00000001228	M400011084
13	0.500	Prom1	prominin 1 Gene	ENSMUSG00000029086	M300006480
14	0.499	Nrip1	nuclear receptor interacting protein 1 Gene	ENSMUSG00000048490	M200003989
15	0.497	Pde4dip	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin) Gene	ENSMUSG00000038170	M300011384
16	0.497	Elmod1	ELMO domain containing 1 Gene	ENSMUSG00000041986	M300013452
17	0.494	Ncoa1	nuclear receptor coactivator 1 Gene	ENSMUSG00000020647	M200000772
18	0.492	Klf6	Kruppel-like factor 6 Gene	ENSMUSG00000000078	M200012730
19	0.491	Rcor1	REST corepressor 1 Gene	ENSMUSG00000037896	M300011204
20	0.491	Gatad2b	GATA zinc finger domain containing 2B Gene	ENSMUSG00000042390	M200008514
21	0.491	Lnp	limb and neural patterns Gene	ENSMUSG00000009207	M400016181
22	0.490	Bptf	bromodomain PHD finger transcription factor Gene	ENSMUSG00000040481	M400000293
23	0.489	Epm2aip1	EPM2A (laforin) interacting protein 1 Gene	ENSMUSG00000046785	M200013191
24	0.489	Nav3	neuron navigator 3 Gene	ENSMUSG00000020181	M300002051
25	0.488	Ankrd12	ankyrin repeat domain 12 Gene	ENSMUSG00000034647	M400018310
26	0.487	Gpm6a	glycoprotein m6a Gene	ENSMUSG00000031517	M400001380
27	0.485	Sema3f	sema domain, immunoglobulin domain (I <sub>g</sub> ), short basic domain,	ENSMUSG00000034684	M300009480
28	0.484	Myod1	myogenic differentiation 1 Gene	ENSMUSG00000009471	M200000620
29	0.484	Fbxl4	F-box and leucine-rich repeat protein 4 Gene	ENSMUSG00000040410	M300012645
30	0.483	Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 2 Gene	ENSMUSG00000039809	M400008218
31	0.483	Baz1a	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A Gene	ENSMUSG00000035021	M300002514
32	0.483	Atp8a1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 8A, member 1 Gene	ENSMUSG00000037685	M400002040
33	0.482	Rbm27	RNA binding motif protein 27 Gene	ENSMUSG00000024491	M400009083
34	0.482	Nbea	neurobeachin Gene	ENSMUSG00000027799	M400016898
35	0.481	Upf2	UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast) Gene	ENSMUSG00000043241	M400002223
36	0.480	A230054D04Rik	RIKEN cDNA A230054D04 gene Gene	ENSMUSG00000061755	M300020931
37	0.477	Klf7	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous) Gene	ENSMUSG00000025959	M400019024
38	0.475	Nr2c2	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2 Gene	ENSMUSG00000005893	M400000114
39	0.474	AC166113.3	Protein FAM123A	ENSMUSG00000021986	M200010465
40	0.473	Lmo7	LIM domain only 7 Gene	ENSMUSG00000033060	M400001528
41	0.472	Dtna	dystrobrevin alpha Gene	ENSMUSG00000024302	M400009066
42	0.471	Samd4b	sterile alpha motif domain containing 4B Gene	ENSMUSG00000037513	M300010971
43	0.468	Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2 Gene	ENSMUSG00000039218	M300012031
44	0.467	Tef4	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box Gene	ENSMUSG00000053477	M400009098
45	0.466	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C Gene	ENSMUSG00000005583	M200004751
46	0.465	Sbno1	sno, strawberry notch homolog 1 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000038095	M400002098
47	0.461	Klf3	Kruppel-like factor 3 (basic) Gene	ENSMUSG00000029178	M200006166
48	0.459	Klf9	Kruppel-like factor 9 Gene	ENSMUSG00000033863	M300008987
49	0.458	Taok1	TAO kinase 1 Gene	ENSMUSG00000017291	M400002897
50	0.458	Glg1	golgi apparatus protein 1 Gene	ENSMUSG00000003316	M200000179
51	0.456	Slc4a7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7 Gene	ENSMUSG00000021733	M400000507
52	0.454	Lims1	LIM and senescent cell antigen-like domains 1 Gene	ENSMUSG00000019920	M300001896
53	0.450	Cplx2	complexin 2 Gene	ENSMUSG00000025867	M300004820
54	0.450	AC125535.4	Forkhead box protein N3 (Checkpoint suppressor 1)	ENSMUSG00000033713	M200015881
55	0.449	Pb1	polybromo 1 Gene	ENSMUSG00000042323	M400000524
56	0.449	Lmo7	LIM domain only 7	ENSMUSG00000033060	M400001529
57	0.447	Mgat5b	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B Gene	ENSMUSG00000043857	M400002805
58	0.444	Zfp334	zinc finger protein 334 Gene	ENSMUSG00000017667	M300001598
59	0.443	Prkce	protein kinase C, epsilon Gene	ENSMUSG00000045038	M200003128
60	0.441	Ncor1	nuclear receptor co-repressor 1 Gene	ENSMUSG00000018501	M300017976
61	0.438	Qk	quaking Gene	ENSMUSG00000062078	M300011191

62	0.437	Jarid1d	jumonji, AT rich interactive domain 1D (Rbp2 like) Gene	ENSMUSG00000056673	M400005588
63	0.433	Zfp292	zinc finger protein 292 Gene	ENSMUSG00000039967	M400002318
64	0.431	Pcdh9	protocadherin 9 Gene	ENSMUSG00000055421	M300018586
65	0.430	Serinc5	serine incorporator 5 Gene	ENSMUSG00000021703	M300002908
66	0.426	Pb1	polybromo 1 Gene	ENSMUSG00000042323	M300013631
67	0.422	Dlx2	distal-less homeobox 2 Gene	ENSMUSG00000023391	M200001491
68	0.421	Setbp1	SET binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000024548	M300004201
69	0.413	B230380D07Rik	RIKEN cDNA B230380D07 gene Gene	ENSMUSG00000042444	M300013696
70	0.408	Car8	carbonic anhydrase 8 Gene	ENSMUSG00000041261	M400002486
71	0.406	Sorl1	sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing Gene	ENSMUSG00000049313	M400003529
72	0.402	Nfib	nuclear factor I/B Gene	ENSMUSG00000008575	M300000971
73	0.384	Socs2	suppressor of cytokine signaling 2 Gene	ENSMUSG00000020027	M200001605
74	0.379	Nipbl	Nipped-B homolog (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000022141	M300003110
75	0.377	Ankrd11	ankyrin repeat domain 11 Gene	ENSMUSG00000035569	M400008512
76	0.375	Irs2	insulin receptor substrate 2 Gene	ENSMUSG00000038894	M400002204
77	0.372	Arid2	AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like) Gene	ENSMUSG00000033237	M400001539
78	0.370	4930583H14Rik	RIKEN cDNA 4930583H14 gene Gene	ENSMUSG00000037161	M200015098
79	0.368	Lox11	lysyl oxidase-like 1 Gene	ENSMUSG00000032334	M300008194
80	0.366	Zfp533	zinc finger protein 385B Gene	ENSMUSG00000027016	M300005438
81	0.365	Nrxn3	neurexin III Gene	ENSMUSG00000066392	M300016334
82	0.356	Pja2	praja 2, RING-H2 motif containing Gene	ENSMUSG00000024083	M200013713
83	0.350	Gcap14	granule cell antiserum positive 14 Gene	ENSMUSG00000058690	M400000513
84	0.338	Fscn1	fascin homolog 1, actin bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus) Gene	ENSMUSG00000029581	M200003231
85	0.135	Gap43*	growth associated protein 43 Gene	ENSMUSG00000047261	M300018113
86	0.133	Ddx3y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked Gene	ENSMUSG00000069045	M400001455
87	0.033	Eif2s3y	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked Gene	ENSMUSG00000069049	M400002945

\*Kandidatengene, die zur qRT-PCR Validierung ausgewählt wurden; EV, Expressionsverhältnis (Tabelle aus Haag, Zipper et al. 2012)

**Tabelle S5. Differenziell exprimierte Gene in P9 Kleinhirnen von *Ptch1<sup>+/+</sup> Nos2<sup>-/-</sup>* vs. Wildtyp Mäusen.**

	EV	Symbol	Beschreibung	Ensembl ID	Oligo ID
1	8.117	Crtam	cytotoxic and regulatory T cell molecule Gene	ENSMUSG00000032021	M200013961
2	5.772	Lgi4	leucine-rich repeat LGI family, member 4 Gene	ENSMUSG00000036560	M300010436
3	5.583	Mapk12	mitogen-activated protein kinase 12 Gene	ENSMUSG00000022610	M200008051
4	4.884	Atp2a3	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, ubiquitous Gene	ENSMUSG00000020788	M200002343
5	4.837	Inadl	InaD-like (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000061859	M300006158
6	4.405	Slc16a11	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 11 Gene	ENSMUSG00000040938	M400002459
7	4.402	D8Erd82e	Tyrosine-protein kinase Sgk223 (EC 2.7.10.2)(Sugen kinase 223)	ENSMUSG00000050271	M300020974
8	4.272	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3 Gene	ENSMUSG00000059146	M300014878
9	4.130	Ptpn22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid) Gene	ENSMUSG00000027843	M200000147
10	4.101	Itpr1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1 Gene	ENSMUSG00000030102	M300007005
11	4.101	Ppargc1b	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta Gene	ENSMUSG00000033871	M200007804
12	4.050	Dgkg	diacylglycerol kinase, gamma Gene	ENSMUSG00000022861	M400008992
13	4.047	App12	adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 2 Gene	ENSMUSG00000020263	M200006591
14	3.926	2610207I05Rik	RIKEN cDNA 2610207I05 gene Gene	ENSMUSG00000030655	M300007346
15	3.915	Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 Gene	ENSMUSG00000002489	M400000055
16	3.899	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial Gene	ENSMUSG00000029455	M200000997
17	3.888	Herc3	hect domain and RLD 3 Gene	ENSMUSG00000029804	M300006885
18	3.874	Asph	aspartate-beta-hydroxylase Gene	ENSMUSG00000028207	M300005995
19	3.856	Neurl	neuralized-like homolog (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000006435	M200008551
20	3.782	Cbx7	chromobox homolog 7 Gene	ENSMUSG00000053411	M300000077
21	3.782	Stmn1	stathmin 1 Gene	ENSMUSG00000028832	M300006321
22	3.758	Serpinb1a	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a Gene	ENSMUSG00000044734	M400009966

23	3.750	Adam1a	a disintegrin and metallopeptidase domain 1a Gene	ENSMUSG00000072647	M200000597
24	3.694	Megf11	multiple EGF-like-domains 11 Gene	ENSMUSG00000036466	M400009628
25	3.625	Acp12	acid phosphatase-like 2 Gene	ENSMUSG00000043587	M300014651
26	3.563	Prkcc	9 protein kinase C, gamma Gene	ENSMUSG00000078816	M400004409
27	3.560	Col27a1	collagen, type XXVII, alpha 1 Gene	ENSMUSG00000045672	M400012980
28	3.523	Aifm3	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 3 Gene	ENSMUSG00000022763	M300003488
29	3.468	Car15	carbonic anhydrase 15 Gene	ENSMUSG00000079715	M400000068
30	3.468	Myh14	myosin, heavy polypeptide 14 Gene	ENSMUSG00000030739	M300007397
31	3.373	Grm4	glutamate receptor, metabotropic 4 Gene	ENSMUSG00000063239	M400008164
32	3.354	Pip5k1b	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 beta Gene	ENSMUSG00000024867	M300004352
33	3.347	Syne1	synaptic nuclear envelope 1 Gene	ENSMUSG00000019769	M400000330
34	3.338	Rbm3	10 RNA binding motif protein 3 Gene	ENSMUSG00000031167	M400001343
35	3.301	Fat1	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000070047	M400001394
36	3.281	Als2	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) homolog (human) Gene	ENSMUSG00000026024	M400000884
37	3.247	Prelp	proline arginine-rich end leucine-rich repeat Gene	ENSMUSG00000041577	M300013232
38	3.245	Gpr171	G protein-coupled receptor 171 Gene	ENSMUSG00000050075	M300020786
39	3.207	A2m	alpha-2-macroglobulin Gene	ENSMUSG00000030111	M300007009
40	3.191	Dnase1l2	deoxyribonuclease 1-like 2 Gene	ENSMUSG00000024136	M200006279
41	3.180	Bcl6	B-cell leukemia/lymphoma 6 Gene	ENSMUSG00000022508	M200003401
42	3.117	Nptx1	neuronal pentraxin 1 Gene	ENSMUSG00000025582	M400000844
43	3.114	Abca2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2 Gene	ENSMUSG00000026944	M200000837
44	3.067	Fgf14	fibroblast growth factor 14 Gene	ENSMUSG00000025551	M400011615
45	3.065	Mll1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1 Gene	ENSMUSG00000002028	M200000897
46	3.038	Spsb2	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 2 Gene	ENSMUSG00000038451	M200000999
47	3.034	Pld5	phospholipase D family, member 5 Gene	ENSMUSG00000055214	M300019233
48	3.017	Col7a1	collagen, type VII, alpha 1 Gene	ENSMUSG00000025650	M400000848
49	2.983	Ptch1	patched homolog 1 Gene	ENSMUSG00000021466	M400014718
50	2.979	Rutbc2	small G protein signaling modulator 1 Gene	ENSMUSG00000042216	M300013570
51	2.977	Il20rb	interleukin 20 receptor beta Gene	ENSMUSG00000044244	M400002870
52	2.965	Snrk	SNF related kinase Gene	ENSMUSG00000038145	M200012902
53	2.963	Cgn11	cingulin-like 1 Gene	ENSMUSG00000032232	M300008140
54	2.961	Jup	junction plakoglobin Gene	ENSMUSG00000001552	M200004269
55	2.957	Clic6	chloride intracellular channel 6 Gene	ENSMUSG00000022949	M300003597
56	2.932	Camkk2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta Gene	ENSMUSG00000029471	M300006694
57	2.924	Sor11	sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing Gene	ENSMUSG00000049313	M400003529
58	2.908	Kcnt1	potassium channel, subfamily T, member 1 Gene	ENSMUSG00000058740	M300010355
59	2.900	Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 Gene	ENSMUSG00000020889	M200012251
60	2.892	Dao1	D-amino acid oxidase 1 Gene	ENSMUSG00000042096	M300013502
61	2.884	Ski	ski sarcoma viral oncogene homolog (avian) Gene	ENSMUSG00000029050	M400013207
62	2.860	Pcsk6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 Gene	ENSMUSG00000030513	M200007288
63	2.860	Rreb1	ras responsive element binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000039087	M300011936
64	2.844	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene Gene	ENSMUSG00000021250	M200002112
65	2.844	Lrrk2	leucine-rich repeat kinase 2 Gene	ENSMUSG00000036273	M200007951
66	2.826	2810051F02Rik	11 RIKEN cDNA 2810051F02 gene Gene	ENSMUSG00000064070	M400008537
67	2.813	Gabpb2	GA repeat binding protein, beta 2 Gene	ENSMUSG00000038766	M400019263
68	2.809	Ypel4	yippee-like 4 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000034059	M300009115
69	2.799	Dusp1	dual specificity phosphatase 1 Gene	ENSMUSG00000024190	M200000904
70	2.780	Adamts10	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 10 Gene	ENSMUSG00000024299	M200006425
71	2.780	Ndrp1	N-myc downstream regulated gene 1 Gene	ENSMUSG00000005125	M200001574
72	2.755	AC153915.5-201	Chloride channel protein, skeletal muscle (Chloride channel protein 1)(CIC-1)	ENSMUSG00000029862	M300006914
73	2.745	Usp2	ubiquitin specific peptidase 2 Gene	ENSMUSG00000032010	M200003187
74	2.738	Car4	carbonic anhydrase 4 Gene	ENSMUSG00000000805	M200000659
75	2.738	Slco4a1	solute carrier organic anion transporter family, member 4a1 Gene	ENSMUSG00000038963	M300011867
76	2.732	Ak311	adenylate kinase 3-like 1 Gene	ENSMUSG00000028527	M200013852
77	2.725	Tmem149	transmembrane protein 149 Gene	ENSMUSG00000036826	M200012954
78	2.723	Hispd2a	histidine acid phosphatase domain containing 2A Gene	ENSMUSG00000033526	M300008817
79	2.704	Kbtbd11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11 Gene	ENSMUSG00000055675	M400005258
80	2.696	Slc7a5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 Gene	ENSMUSG00000040010	M300012485
81	2.689	Cdc14b	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000033102	M300008590
82	2.689	Trak1	trafficking protein, kinesin binding 1 Gene	ENSMUSG00000032536	M400012281
83	2.672	Egr1	early growth response 1 Gene	ENSMUSG00000038418	M200012044

84	2.668	Foxo3	forkhead box O3 Gene	ENSMUSG00000048756	M400013007
85	2.657	Ets2	E26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain Gene	ENSMUSG00000022895	M200004369
86	2.654	Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 Gene	ENSMUSG00000023034	M200000038
87	2.654	Zbtb4	zinc finger and BTB domain containing 4 Gene	ENSMUSG00000018750	M400014882
88	2.626	Tardbp	12 TAR DNA binding protein Gene	ENSMUSG000000041459	M400013039
89	2.623	Mprip	myosin phosphatase Rho interacting protein Gene	ENSMUSG00000005417	M400018372
90	2.619	Ttc39b	tetratricopeptide repeat domain 39B Gene	ENSMUSG00000038172	M400013639
91	2.617	Golga4	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4 Gene	ENSMUSG00000038708	M400002181
92	2.603	Dock9	dedicator of cytokinesis 9 Gene	ENSMUSG00000025558	M200004905
93	2.603	Per3		ENSMUSG000000028957	M400013831
94	2.594	Snrp70	U1 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A Gene	ENSMUSG000000063511	M200009365
95	2.592	Tanc1	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1 Gene	ENSMUSG000000035168	M200005751
96	2.585	Ppfi1	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein, alpha 1 Gene	ENSMUSG000000037519	M300010975
97	2.578	Tyro3	TYRO3 protein tyrosine kinase 3 Gene	ENSMUSG000000027298	M200001103
98	2.556	2900092E17Rik	13 RIKEN cDNA 2900092E17 gene Gene	ENSMUSG000000030680	M200012040
99	2.539	RP23-163J20.1	Uncharacterized protein C20orf118 homolog	ENSMUSG000000074628	M400002079
100	2.535	9130011E15Rik	14 RIKEN cDNA 9130011E15 gene Gene	ENSMUSG000000039901	M300012429
101	2.533	Rasl11b	RAS-like, family 11, member B Gene	ENSMUSG000000049907	M200012063
102	2.518	Fat2	FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila) Gene	ENSMUSG000000055333	M400005130
103	2.516	Per1	period homolog 1 (Drosophila) Gene	ENSMUSG000000020893	M200002536
104	2.511	Tmem86b	transmembrane protein 86B Gene	ENSMUSG000000045282	M300016251
105	2.507	Odf2	outer dense fiber of sperm tails 2 Gene	ENSMUSG000000026790	M400008190
106	2.486	Ltbp3	latent transforming growth factor beta binding protein 3 Gene	ENSMUSG000000024940	M400010834
107	2.481	Socs7	suppressor of cytokine signaling 4 Gene	ENSMUSG000000038485	M400013219
108	2.467	Hipk1	homeodomain interacting protein kinase 1 Gene	ENSMUSG000000008730	M200003942
109	2.466	Opn3	opsin 3 Gene	ENSMUSG000000026525	M300005157
110	2.461	Rnfl23	ring finger protein 123 Gene	ENSMUSG000000041528	M200004426
111	2.452	Mars	methionine-tRNA synthetase Gene	ENSMUSG000000040354	M300012617
112	2.452	Trpv4	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 Gene	ENSMUSG000000014158	M200016100
113	2.447	Speg	SPEG complex locus Gene	ENSMUSG000000026207	M200000801
114	2.437	Ulk1	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans) Gene	ENSMUSG000000029512	M200007519
115	2.428	Atf7	activating transcription factor 7 Gene	ENSMUSG000000071584	M300017651
116	2.418	Centd2	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 1 Gene	ENSMUSG000000032812	M200013595
117	2.413	Bhlhb2	basic helix-loop-helix domain containing, class B2 Gene	ENSMUSG000000030103	M300007008
118	2.410	Caln1	calneuron 1 Gene	ENSMUSG000000060371	M300004590
119	2.400	Foxk1	forkhead box K1 Gene	ENSMUSG000000056493	M400017529
120	2.392	Rgl3	ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 3 Gene	ENSMUSG000000040146	M200008777
121	2.390	Lats2	large tumor suppressor 2 Gene	ENSMUSG000000021959	M400000530
122	2.373	Hnrmpm	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M Gene	ENSMUSG000000059208	M200009917
123	2.365	BC033915	Serine/threonine-protein kinase QSK (EC 2.7.11.1)(Salt-inducible kinase 3)(SIK-3)(SIK3)	ENSMUSG000000034135	M400011605
124	2.357	Zfyve26	zinc finger, FYVE domain containing 26 Gene	ENSMUSG000000066440	M200006048
125	2.351	Safb2	scaffold attachment factor B2 Gene	ENSMUSG000000042625	M300013793
126	2.347	Enpp2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 Gene	ENSMUSG000000022425	M200005834
127	2.339	Nab2	Ngfi-A binding protein 2 Gene	ENSMUSG000000025402	M400010850
128	2.336	AC155937.4-202	Putative uncharacterized proteinNfic protein ;	ENSMUSG000000079936	M300002080
129	2.336	BC030863	Uncharacterized protein KIAA0819	ENSMUSG000000051586	M300022206
130	2.326	Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1 Gene	ENSMUSG000000024030	M200003392
131	2.323	Dennd4b	DENN/MADD domain containing 4B Gene	ENSMUSG000000042404	M400002621
132	2.321	Svep1	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1 Gene	ENSMUSG000000028369	M200003816
133	2.320	AC159283.2	Putative uncharacterized protein	ENSMUSG000000079179	M200004959
134	2.309	Lnx2	ligand of numb-protein X 2 Gene	ENSMUSG000000016520	M200007585
135	2.307	Idua	iduronidase, alpha-L- Gene	ENSMUSG000000033540	M200001165
136	2.302	Abca7	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7 Gene	ENSMUSG000000035722	M200008508
137	2.302	Stat2	signal transducer and activator of transcription 2 Gene	ENSMUSG000000040033	M200004256
138	2.299	A230083H22Rik	BNIP2 motif-containing molecule at the C-terminal region 1	ENSMUSG000000039126	M300011972
139	2.294	Nrl	neural retina leucine zipper gene Gene	ENSMUSG000000040632	M300012774
140	2.285	1110012J17Rik	RIKEN cDNA 1110012J17 gene Gene	ENSMUSG000000052105	M400010146
141	2.269	Dnm1	dynamin 1 Gene	ENSMUSG000000026825	M300005308
142	2.267	Slfn10	schlafen 10 Gene	ENSMUSG000000072621	M300018375
143	2.264	Adamts4	ADAMTS-like 4 Gene	ENSMUSG000000015850	M200014222
144	2.261	Slc41a3	solute carrier family 41, member 3 Gene	ENSMUSG000000030089	M200007299
145	2.256	Itp3	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3 Gene	ENSMUSG000000042644	M200005377

146	2.256	Whsc111	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (human) Gene	ENSMUSG00000054823	M400015692
147	2.255	2210010N04Rik	RIKEN cDNA 2210010N04 gene Gene	ENSMUSG00000066621	M400013367
148	2.255	Ccdc45	coiled-coil domain containing 45 Gene	ENSMUSG00000018372	M300001661
149	2.255	Dusp16	dual specificity phosphatase 16 Gene	ENSMUSG00000030203	M400001236
150	2.255	Helz	helicase with zinc finger domain Gene	ENSMUSG00000020721	M400013967
151	2.247	Dlg1	discs, large homolog 1 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000022770	M300003491
152	2.247	Macf1	microtubule-actin crosslinking factor 1 Gene	ENSMUSG00000028649	M400001104
153	2.244	Dst	dystonin Gene	ENSMUSG00000026131	M400011820
154	2.241	Tnrc6c	trinucleotide repeat containing 6C Gene	ENSMUSG00000025571	M200008262
155	2.238	Ahcy12	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 2 Gene	ENSMUSG00000029772	M300006859
156	2.228	Nrxn3	neurexin III Gene	ENSMUSG00000066392	M300016334
157	2.225	St5	suppression of tumorigenicity 5 Gene	ENSMUSG00000031024	M200000392
158	2.219	Ptpn21	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21 Gene	ENSMUSG00000021009	M300002509
159	2.218	3110001A13Rik	family with sequence similarity 107, member B Gene	ENSMUSG00000026655	M200012921
160	2.207	Pqlc3	PQ loop repeat containing Gene	ENSMUSG00000045679	M300016615
161	2.198	Mtap4	microtubule-associated protein 4 Gene	ENSMUSG00000032479	M200003107
162	2.196	RP23-455B1.3	Likely ortholog of H. sapiens chromosome 9 open reading frame 5 (C9orf5)	ENSMUSG00000055296	M400016348
163	2.192	1190002N15Rik	RIKEN cDNA 1190002N15 gene Gene	ENSMUSG00000045414	M400013036
164	2.190	Cited2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 Gene	ENSMUSG00000039910	M300012438
165	2.187	Slc6a8	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 Gene	ENSMUSG00000019558	M200013579
166	2.181	Chn2	chimerin (chimaerin) 2 Gene	ENSMUSG00000004633	M300000581
167	2.180	Acrbp	proacrosin binding protein Gene	ENSMUSG00000072770	M200001579
168	2.178	Foxn3	forkhead box N3 Gene	ENSMUSG00000044661	M400002923
169	2.173	Car9	carbonic anhydrase 9 Gene	ENSMUSG00000028463	M200014286
170	2.169	Fbxo45	F-box protein 45 Gene	ENSMUSG00000035764	M400014371
171	2.167	Aox1	aldehyde oxidase 1 Gene	ENSMUSG00000063558	M200005350
172	2.163	Plekha5	pleckstrin homology domain containing, family A member 5 Gene	ENSMUSG00000030231	M300007090
173	2.157	Whrn	whirlin Gene	ENSMUSG00000039137	M300011980
174	2.154	Sipal13	signal-induced proliferation-associated 1 like 3 Gene	ENSMUSG00000030583	M200004625
175	2.151	Cit	citron Gene	ENSMUSG00000029516	M400016033
176	2.145	Mfsd4	major facilitator superfamily domain containing 4 Gene	ENSMUSG00000059149	M400008673
177	2.145	Spag1	sperm associated antigen 1 Gene	ENSMUSG00000037617	M200015401
178	2.144	Olfir453	olfactory receptor 453 Gene	ENSMUSG00000048504	M400003429
179	2.144	Trim67	tripartite motif-containing 62 Gene	ENSMUSG00000041000	M400002465
180	2.139	Pptc7	PTC7 protein phosphatase homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000038582	M300011640
181	2.135	Tpcn2	two pore segment channel 2 Gene	ENSMUSG00000048677	M300009917
182	2.133	Atp1a1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide Gene	ENSMUSG00000033161	M200013073
183	2.123	Aff1	AF4/FMR2 family, member 1 Gene	ENSMUSG00000029313	M400002694
184	2.123	Igf1r	insulin-like growth factor I receptor Gene	ENSMUSG00000005533	M400014887
185	2.118	Xkr6	X Kell blood group precursor related family member 6 homolog Gene	ENSMUSG00000035067	M300009679
186	2.117	Myo15	myosin XV Gene	ENSMUSG00000042678	M200016050
187	2.116	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1 Gene	ENSMUSG00000026875	M200003178
188	2.105	Usp28	ubiquitin specific peptidase 28 Gene	ENSMUSG00000032267	M300008156
189	2.104	Ift172	intraflagellar transport 172 homolog (Chlamydomonas) Gene	ENSMUSG00000038564	M300006519
190	2.104	Zmym1	zinc finger, MYM domain containing 1 Gene	ENSMUSG00000043872	M200015559
191	2.094	Ccdc120	coiled-coil domain containing 120 Gene	ENSMUSG00000031150	M300007582
192	2.094	Plekhf1	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1 Gene	ENSMUSG00000074170	M200007018
193	2.092	Eml3	echinoderm microtubule associated protein like 3 Gene	ENSMUSG00000071647	M200007041
194	2.092	Epb4.1	erythrocyte protein band 4.1 Gene	ENSMUSG00000028906	M200006797
195	2.091	Centg1	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2 Gene	ENSMUSG00000025422	M400000829
196	2.086	Gls2	glutaminase 2 (liver, mitochondrial) Gene	ENSMUSG00000044005	M400002835
197	2.086	Pde1c	phosphodiesterase 1C Gene	ENSMUSG00000004347	M300000548
198	2.082	Pou2f1	POU domain, class 2, transcription factor 1 Gene	ENSMUSG00000026565	M400009801
199	2.076	2810046L04Rik	RIKEN cDNA 2810046L04 gene Gene	ENSMUSG00000049504	M400012264
200	2.076	Tmem62	transmembrane protein 62 Gene	ENSMUSG00000054484	M400004826
201	2.071	D430015B01Rik	family with sequence similarity 13, member A Gene	ENSMUSG00000037709	M300011086
202	2.065	Dgkh	diacylglycerol kinase, eta Gene	ENSMUSG00000034731	M400001732
203	2.061	Pacsin3	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3 Gene	ENSMUSG00000027257	M200004608
204	2.059	Ece2	endothelin converting enzyme 2 Gene	ENSMUSG00000022842	M400011878
205	2.059	Olfir938	olfactory receptor 938 Gene	ENSMUSG00000048501	M400003428
206	2.059	Pom121	nuclear pore membrane protein 121 Gene	ENSMUSG00000053293	M400004416

207	2.058	Plagl2	pleiomorphic adenoma gene-like 2 Gene	ENSMUSG00000051413	M400011297
208	2.058	Rai16	family with sequence similarity 160, member B2 Gene	ENSMUSG00000022095	M300003088
209	2.056	Cpt1b	carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle Gene	ENSMUSG00000078937	M400000591
210	2.043	Cds1	CDP-diacylglycerol synthase 1 Gene	ENSMUSG00000029330	M200014600
211	2.042	Inpp5a	inositol polyphosphate-5-phosphatase A Gene	ENSMUSG00000025477	M300004653
212	2.041	Pan2	PAN2 polyA specific ribonuclease subunit homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000005682	M200007240
213	2.032	D330001F17Rik	RIKEN cDNA D330001F17 gene Gene	ENSMUSG00000022558	M400004995
214	2.031	Gpc6	glypican 6 Gene	ENSMUSG00000058571	M400014875
215	2.031	Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1 Gene	ENSMUSG00000070056	M300011774
216	2.031	Slc20a2	solute carrier family 20, member 2 Gene	ENSMUSG00000037656	M200009931
217	2.029	Entpd4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 Gene	ENSMUSG00000022066	M400011543
218	2.021	Tyk2	tyrosine kinase 2 Gene	ENSMUSG00000032175	M400001433
219	2.020	Mycbp2	MYC binding protein 2 Gene	ENSMUSG00000033004	M300008551
220	2.018	Pcmdt2	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2 Gene	ENSMUSG00000027589	M300005710
221	2.017	C430014K11Rik	RIKEN cDNA C430014K11 gene Gene	ENSMUSG00000069564	M400015609
222	2.015	Mpdz	multiple PDZ domain protein Gene	ENSMUSG00000028402	M300006078
223	2.014	Smarcd2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2 Gene	ENSMUSG00000078619	M400000411
224	2.011	Btbd14a	nucleus accumbens associated 2, BEN and BTB (POZ) domain containing Gene	ENSMUSG00000026932	M400012979
225	2.008	Rora	RAR-related orphan receptor alpha Gene	ENSMUSG00000032238	M400001441
226	2.007	Boc	biregional cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (Cdon) binding protein Gene	ENSMUSG00000022687	M200013652
227	2.006	AL604063.4	Putative uncharacterized protein	ENSMUSG00000055697	M400005267
228	2.003	Alms1	Alstrom syndrome 1 homolog (human) Gene	ENSMUSG00000063810	M400008426
229	2.000	Smpd4	sphingomyelin phosphodiesterase 4 Gene	ENSMUSG00000005899	M200007629
230	0.500	Bloc1s1	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 1 Gene	ENSMUSG00000025349	M400000823
231	0.500	Phf6	PHD finger protein 6 Gene	ENSMUSG00000025626	M200005362
232	0.500	Nsmce1	non-SMC element 1 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000030750	M300007402
233	0.500	Ssu72	Ssu72 RNA polymerase II CTD phosphatase homolog (yeast) Gene	ENSMUSG00000029038	M400011586
234	0.500	Tmem121	transmembrane protein 121 Gene	ENSMUSG00000049036	M200009116
235	0.499	0610010K14Rik	RIKEN cDNA 0610010K14 gene Gene	ENSMUSG00000020831	M300002418
236	0.499	1700025K23Rik	RIKEN cDNA 1700025K23 gene Gene	ENSMUSG000000051736	M400012548
237	0.499	2610027C15Rik	family with sequence similarity 176, member B Gene	ENSMUSG00000050212	M300020921
238	0.499	AC105336.14	UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG14 homolog	ENSMUSG00000039887	M400002307
239	0.499	Vps29	vacuolar protein sorting 29 (S. pombe) Gene	ENSMUSG00000029462	M200005961
240	0.498	Def6	differentially expressed in FDCP 6 Gene	ENSMUSG00000002257	M200015055
241	0.498	Mrps30	mitochondrial ribosomal protein S30 Gene	ENSMUSG00000021731	M200009486
242	0.498	Polr2f	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F Gene	ENSMUSG00000033020	M200004328
243	0.498	Deaf1	deformed epidermal autoregulatory factor 1 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000058886	M200005980
244	0.498	Mcee	methylmalonyl CoA epimerase Gene	ENSMUSG00000033429	M200002860
245	0.498	Nanos1	nanos homolog 1 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000072437	M400012479
246	0.498	Csk	c-src tyrosine kinase Gene	ENSMUSG00000032312	M300008184
247	0.498	Tuba1b	tubulin, alpha 1B Gene	ENSMUSG00000023004	M300015433
248	0.497	D2Bwg1335e	DNL-type zinc finger protein	ENSMUSG00000075467	M300005386
249	0.497	Igfbp1	immunoglobulin (CD79A) binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000031221	M400001348
250	0.497	Leprot	leptin receptor overlapping transcript Gene	ENSMUSG00000035212	M300006142
251	0.497	Ppap2c	phosphatidic acid phosphatase type 2c Gene	ENSMUSG00000052151	M300002134
252	0.497	Clic1	chloride intracellular channel 1 Gene	ENSMUSG00000007041	M200006521
253	0.497	Pten	phosphatase and tensin homolog Gene	ENSMUSG00000013663	M200000642
254	0.497	Rab11a	RAB11a, member RAS oncogene family Gene	ENSMUSG00000004771	M200000553
255	0.497	Sh3bp4	SH3-domain binding protein 4 Gene	ENSMUSG00000036206	M400011817
256	0.497	Bcat1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic Gene	ENSMUSG00000030268	M400010737
257	0.496	Cd200	CD200 antigen Gene	ENSMUSG00000022661	M400011073
258	0.496	Mrps18b	mitochondrial ribosomal protein S18B Gene	ENSMUSG00000024436	M200006503
259	0.496	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000027323	M200000087
260	0.495	Peli1	pellino 1 Gene	ENSMUSG00000020134	M200006248
261	0.494	Gfra2	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2 Gene	ENSMUSG00000022103	M200013774
262	0.494	Alcam	activated leukocyte cell adhesion molecule Gene	ENSMUSG00000022636	M300003422
263	0.494	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 Gene	ENSMUSG00000061353	M400011403
264	0.494	Rgs11	regulator of G-protein signaling 11 Gene	ENSMUSG00000024186	M200003232
265	0.494	Tbcd12	TBC1D12: TBC1 domain family, member 12 Gene	ENSMUSG00000048720	M300004420

266	0.494	Chst1	carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1 Gene	ENSMUSG00000027221	M200008003
267	0.494	Srd5a3		ENSMUSG00000029233	M300006564
268	0.493	Pcdh7	protocadherin 7 Gene	ENSMUSG00000029108	M400001141
269	0.493	2410018M08Rik	RIKEN cDNA 2410018M08 gene Gene	ENSMUSG00000034173	M200012574
270	0.493	Mrpl20	mitochondrial ribosomal protein L20 Gene	ENSMUSG00000029066	M300006462
271	0.493	Psmg4	proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 4 Gene	ENSMUSG00000071451	M300021401
272	0.493	Mrpl36	mitochondrial ribosomal protein L36 Gene	ENSMUSG00000021607	M200005345
273	0.493	Psm6	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6 Gene	ENSMUSG00000021024	M300002517
274	0.493	Sh3yl1	Sh3 domain YSC-like 1 Gene	ENSMUSG00000020669	M200013491
275	0.493	Tmepai	prostate transmembrane protein, androgen induced 1 Gene	ENSMUSG00000038400	M400011417
276	0.493	Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1 Gene	ENSMUSG00000022010	M200004008
277	0.492	Bud31	BUD31 homolog (yeast) Gene	ENSMUSG00000038722	M400002183
278	0.492	Gamt	guanidinoacetate methyltransferase Gene	ENSMUSG00000020150	M200002525
279	0.492	Ywhaq	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide Gene	ENSMUSG00000076432	M400011166
280	0.492	Zfp637	zinc finger protein 637 Gene	ENSMUSG00000059689	M300013504
281	0.492	2410018G20Rik	family with sequence similarity 128, member B Gene	ENSMUSG00000022671	M300003446
282	0.491	Grin1a	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-like 1A Gene	ENSMUSG00000032199	M200004052
283	0.491	OTTMUSG00000004461	predicted gene, OTTMUSG00000004461 Gene	ENSMUSG00000055963	M400005362
284	0.491	AL808128.4		ENSMUSG00000082044	M400010908
285	0.491	Ndufa2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2 Gene	ENSMUSG00000014294	M300001272
286	0.490	1500032D16Rik	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial Precursor (NADH-ubiquinone oxidoreductase 9 kDa subunit)	ENSMUSG00000024038	M400011695
287	0.490	1810030N24Rik	RIKEN cDNA 1810030N24 gene Gene	ENSMUSG00000028295	M200005821
288	0.490	Emp2	epithelial membrane protein 2 Gene	ENSMUSG00000022505	M400010782
289	0.490	Tfpi	tissue factor pathway inhibitor Gene	ENSMUSG00000027082	M300005466
290	0.489	Cd24a	CD24a antigen Gene	ENSMUSG00000047139	M300017999
291	0.489	Uchl3	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase) Gene	ENSMUSG00000022111	M400000540
292	0.489	Tspan12	tetraspanin 12 Gene	ENSMUSG00000029669	M300006804
293	0.489	2310005N01Rik	RIKEN cDNA 2310005N01 gene Gene	ENSMUSG00000028863	M300006336
294	0.489	Ensa	endosulfine alpha Gene	ENSMUSG00000038619	M400011316
295	0.488	Clasp1	CLIP associating protein 1 Gene	ENSMUSG00000064302	M300005067
296	0.488	Hccs	holocytochrome c synthetase Gene	ENSMUSG00000031352	M200002845
297	0.488	Psm13	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13 Gene	ENSMUSG00000025487	M200006641
298	0.488	Tcp1	t-complex protein 1 Gene	ENSMUSG00000068039	M400011215
299	0.488	A230051G13Rik	RIKEN cDNA A230051G13 gene Gene	ENSMUSG00000049287	M300020030
300	0.488	AC142244.11	Uridine-cytidine kinase 2 (UCK 2)(EC 2.7.1.48)(Uridine monophosphokinase 2)(Cytidine monophosphokinase 2)	ENSMUSG00000026558	M200005101
301	0.487	Actr10	ARP10 actin-related protein 10 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000021076	M200006427
302	0.487	Fbxo25	F-box protein 25 Gene	ENSMUSG00000038365	M400002121
303	0.487	Nme1	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in Gene	ENSMUSG00000037601	M300011019
304	0.487	Atp6v0d1	ATPase, H transporting, lysosomal V0 subunit D1 Gene	ENSMUSG00000013160	M200000393
305	0.487	Psm5	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 5 Gene	ENSMUSG00000022193	M300003132
306	0.486	6530401N04Rik	RIKEN cDNA 6530401N04 gene Gene	ENSMUSG00000020956	M300002485
307	0.486	Exosc1	exosome component 1 Gene	ENSMUSG00000034321	M300009281
308	0.486	Pdgfra	platelet derived growth factor, alpha Gene	ENSMUSG00000025856	M400010861
309	0.486	Set	SET translocation Gene	ENSMUSG00000054766	M400004935
310	0.486	Slc25a5	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 5 Gene	ENSMUSG00000016319	M400000252
311	0.485	Eif4e2	eukaryotic translation initiation factor 4E member 2 Gene	ENSMUSG00000026254	M300005004
312	0.485	Sirt4	sirtuin 4 (silent mating type information regulation 2 homolog) 4 (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000029524	M200008673
313	0.485	Tagln2	transgelin 2 Gene	ENSMUSG00000026547	M400000941
314	0.485	Ppap2a	phosphatidic acid phosphatase 2a Gene	ENSMUSG00000021759	M300002937
315	0.485	Cisd1	CDGSH iron sulfur domain 1 Gene	ENSMUSG00000037710	M200006286
316	0.485	Uqcrh	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein Gene	ENSMUSG00000063882	M400008456
317	0.484	Mrps24	mitochondrial ribosomal protein S24 Gene	ENSMUSG00000020477	M200002524
318	0.484	Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1 Gene	ENSMUSG00000021273	M300009717
319	0.484	Fem1b	feminization 1 homolog b (C. elegans) Gene	ENSMUSG00000032244	M200004007
320	0.484	Mtap1b	microtubule-associated protein 1B Gene	ENSMUSG00000052727	M200001684
321	0.484	Polr2j	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J Gene	ENSMUSG00000039771	M200002020
322	0.484	D2ErtD750e	predicted gene, OTTMUSG00000015636 Gene	ENSMUSG00000027331	M200003045

323	0.484	Glrx3	glutaredoxin 3 Gene	ENSMUSG00000031068	M300007546
324	0.484	Pxmp4	peroxisomal membrane protein 4 Gene	ENSMUSG00000000876	M200004970
325	0.484	Tacc3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3 Gene	ENSMUSG00000037313	M200005723
326	0.483	E2f2	E2F transcription factor 2 Gene	ENSMUSG00000018983	M300001757
327	0.483	Plk2	polo-like kinase 2 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000021701	M200000136
328	0.483	Snx4	sorting nexin 4 Gene	ENSMUSG00000022808	M200005877
329	0.483	Rps11	ribosomal protein S11 Gene	ENSMUSG00000003429	M400011218
330	0.483	Snx16	sorting nexin 16 Gene	ENSMUSG00000027534	M200005652
331	0.483	Cmpk1	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 1 Gene	ENSMUSG00000028719	M200006649
332	0.483	Tmem128		ENSMUSG00000067365	M400011488
333	0.482	Rraga	Ras-related GTP binding A Gene	ENSMUSG00000070934	M300018457
334	0.482	Uqcrc2	ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2 Gene	ENSMUSG00000030884	M300007481
335	0.482	Znrf2	zinc and ring finger 2 Gene	ENSMUSG00000058446	M400006347
336	0.482	Mtx2	metaxin 2 Gene	ENSMUSG00000027099	M200012105
337	0.482	Ndufb7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7 Gene	ENSMUSG00000033938	M200006599
338	0.481	2510006D16Rik	RIKEN cDNA 2510006D16 gene Gene	ENSMUSG00000028797	M400009305
339	0.481	Asf1b	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000005470	M200006598
340	0.481	Med27	mediator complex subunit 27 Gene	ENSMUSG00000026799	M300005291
341	0.481	Mfap2	microfibrillar-associated protein 2 Gene	ENSMUSG00000060572	M200002538
342	0.481	Praf2	PRA1 domain family 2 Gene	ENSMUSG00000031149	M200009302
343	0.481	Dpy30	dpy-30 homolog (C. elegans) Gene	ENSMUSG00000024067	M400011462
344	0.481	Guk1	guanylate kinase 1 Gene	ENSMUSG00000020444	M300002194
345	0.481	Tkt	transketolase Gene	ENSMUSG00000021957	M200009754
346	0.481	Trappc1	trafficking protein particle complex 1 Gene	ENSMUSG00000049299	M400003528
347	0.480	Pno1	partner of NOB1 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000020116	M200005719
348	0.480	5430435G22Rik	RIKEN cDNA 5430435G22 gene Gene	ENSMUSG00000052688	M400011899
349	0.480	Sec13	SEC13 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000030298	M200006422
350	0.479	Psmc6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6 Gene	ENSMUSG00000021737	M200005618
351	0.479	Mrps28	mitochondrial ribosomal protein S28 Gene	ENSMUSG00000040269	M200008075
352	0.479	Pgp	phosphoglycolate phosphatase Gene	ENSMUSG00000043445	M400002754
353	0.479	Syng1	synaptogyrin 1 Gene	ENSMUSG00000022415	M300003269
354	0.478	CT009518.6-201		ENSMUSG000000051723	M400005915
355	0.478	Foxm1	forkhead box M1 Gene	ENSMUSG00000001517	M200013895
356	0.477	Ets1	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain Gene	ENSMUSG00000032035	M300008034
357	0.477	Mad211bp	MAD2L1 binding protein Gene	ENSMUSG00000034509	M200005697
358	0.477	Pbx3	pre B-cell leukemia transcription factor 3 Gene	ENSMUSG00000038718	M200002526
359	0.476	2700081O15Rik	RIKEN cDNA 2700081O15 gene Gene	ENSMUSG000000053080	M400004331
360	0.476	Hadh	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase Gene	ENSMUSG00000027984	M200000939
361	0.476	Nrp1	neuropilin 1 Gene	ENSMUSG00000025810	M300004780
362	0.475	BC028528	Uncharacterized protein C1orf54 homolog Precursor (Protein L259)	ENSMUSG00000038543	M300011618
363	0.475	Cdh11	cadherin 11 Gene	ENSMUSG00000031673	M200001793
364	0.475	Pacs2	phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 Gene	ENSMUSG00000021143	M300002585
365	0.475	Aip1l	aryl hydrocarbon receptor-interacting protein-like 1 Gene	ENSMUSG00000040554	M300012724
366	0.474	A230106M20Rik	RIKEN cDNA A230106M20 gene Gene	ENSMUSG00000013367	M300001219
367	0.474	Eif3eip	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E interacting protein Gene	ENSMUSG00000033047	M200013087
368	0.474	Psmc4	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4 Gene	ENSMUSG00000005779	M200000129
369	0.474	AC134441.4		ENSMUSG000000057157	M400005791
370	0.474	Wdr18	WD repeat domain 18 Gene	ENSMUSG00000035754	M300010076
371	0.473	Aprt	adenine phosphoribosyl transferase Gene	ENSMUSG000000006589	M400010967
372	0.473	Hdac2	histone deacetylase 2 Gene	ENSMUSG00000019777	M400000332
373	0.473	Mdh2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial) Gene	ENSMUSG00000019179	M200004205
374	0.473	Rcn2	reticulocalbin 2 Gene	ENSMUSG00000032320	M300008186
375	0.473	2810428I15Rik	RIKEN cDNA 2810428I15 gene Gene	ENSMUSG00000058833	M200005904
376	0.473	Atxn10	ataxin 10 Gene	ENSMUSG00000016541	M200001593
377	0.473	Bhlhb9	basic helix-loop-helix domain containing, class B9 Gene	ENSMUSG00000072964	M400005113
378	0.472	Map1lc3a	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha Gene	ENSMUSG00000027602	M300005718
379	0.472	Serpinh1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1 Gene	ENSMUSG00000070436	M400010981
380	0.472	Cdk2	cyclin-dependent kinase 2 Gene	ENSMUSG00000025358	M200000037
381	0.472	Exosc5	exosome component 5 Gene	ENSMUSG00000061286	M200005728
382	0.472	Igsl1	immunoglobulin superfamily, member 1 Gene	ENSMUSG00000031111	M300007562
383	0.472	Reep5	receptor accessory protein 5 Gene	ENSMUSG00000005873	M200004094
384	0.471	Phf14	PHD finger protein 14 Gene	ENSMUSG00000029629	M300006783

385	0.471	Nf2	neurofibromatosis 2 Gene	ENSMUSG00000009073	M300001009
386	0.471	Prdx1	peroxiredoxin 1 Gene	ENSMUSG00000028691	M300006233
387	0.471	3110056O03Rik	RIKEN cDNA 3110056O03 gene Gene	ENSMUSG00000035206	M300009780
388	0.471	Satb1	special AT-rich sequence binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000023927	M200001716
389	0.471	Vps35	vacuolar protein sorting 35 Gene	ENSMUSG00000031696	M200001977
390	0.470	AC034122.1	Lisch-like isoform 1	ENSMUSG00000040612	M400013964
391	0.470	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4 Gene	ENSMUSG00000020108	M200004194
392	0.470	Atp5c1	ATP synthase, H transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1 Gene	ENSMUSG00000025781	M300004763
393	0.470	2810022L02Rik	RIKEN cDNA 2810022L02 gene Gene	ENSMUSG00000038305	M200005657
394	0.470	Gnas	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus Gene	ENSMUSG00000027523	M400001016
395	0.469	2410131K14Rik	RIKEN cDNA 2410131K14 gene Gene	ENSMUSG00000032840	M200008520
396	0.469	Sle43a3	solute carrier family 43, member 3 Gene	ENSMUSG00000027074	M200008829
397	0.469	Il34	interleukin 34 Gene	ENSMUSG00000031750	M300007876
398	0.469	Klh15	kelch-like 5 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000054920	M300006538
399	0.469	Pid1	phosphotyrosine interaction domain containing 1 Gene	ENSMUSG00000045658	M300016593
400	0.469	Prkacb	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta Gene	ENSMUSG00000005034	M200003462
401	0.468	Pmf1	polyamine-modulated factor 1 Gene	ENSMUSG00000028066	M200007882
402	0.468	Rhoc	ras homolog gene family, member C Gene	ENSMUSG00000002233	M200000097
403	0.467	4933426K21Rik	RIKEN cDNA 4933426K21 gene Gene	ENSMUSG00000040649	M400009453
404	0.467	S100a13	S100 calcium binding protein A13 Gene	ENSMUSG00000042312	M200002378
405	0.467	Med9	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 9 homolog (yeast) Gene	ENSMUSG00000061650	M200008968
406	0.467	Pole3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit) Gene	ENSMUSG00000028394	M400011397
407	0.467	5930416I19Rik	RIKEN cDNA 5930416I19 gene Gene	ENSMUSG00000048668	M300019447
408	0.467	Ly75	lymphocyte antigen 75 Gene	ENSMUSG00000026980	M400000977
409	0.467	Rab31	RAB31, member RAS oncogene family Gene	ENSMUSG00000056515	M200006411
410	0.466	Defb3	defensin beta 3 Gene	ENSMUSG00000039775	M300012365
411	0.466	1500032L24Rik	RIKEN cDNA 1500032L24 gene Gene	ENSMUSG00000022452	M200011939
412	0.465	Eif4g2	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2 Gene	ENSMUSG00000005610	M300000699
413	0.465	Pdhx	pyruvate dehydrogenase complex, component X Gene	ENSMUSG00000010914	M300001117
414	0.465	Psmb7	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7 Gene	ENSMUSG00000026750	M200000852
415	0.465	Gtf2f2	general transcription factor IIF, polypeptide 2 Gene	ENSMUSG00000067995	M400011582
416	0.465	Col4a2	collagen, type IV, alpha 2 Gene	ENSMUSG000000031503	M200011974
417	0.465	Wbp1	WW domain binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000030035	M300006974
418	0.464	1810006K21Rik	RIKEN cDNA 1810006K21 gene Gene	ENSMUSG00000036372	M300010353
419	0.464	Gusb	glucuronidase, beta Gene	ENSMUSG00000025534	M300004681
420	0.464	2310008M10Rik	RIKEN cDNA 2310008M10 gene Gene	ENSMUSG00000041084	M400002473
421	0.464	Tmed3	transmembrane emp24 domain containing 3 Gene	ENSMUSG000000032353	M200005621
422	0.464	Cenpm	centromere protein M Gene	ENSMUSG00000068101	M400011504
423	0.464	Insig1	insulin induced gene 1 Gene	ENSMUSG00000045294	M300016263
424	0.464	Smpd3	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral Gene	ENSMUSG000000031906	M200009485
425	0.463	Aes	amino-terminal enhancer of split Gene	ENSMUSG00000054452	M300009535
426	0.463	Mocs2	molybdenum cofactor synthesis 2 Gene	ENSMUSG00000015536	M200003720
427	0.462	Rnaseh2b		ENSMUSG00000021932	M300003020
428	0.462	Sc4mol	sterol-C4-methyl oxidase-like Gene	ENSMUSG00000031604	M200006850
429	0.462	Schip1	schwannomin interacting protein 1 Gene	ENSMUSG00000027777	M300005774
430	0.461	Arrdc4	arrestin domain containing 4 Gene	ENSMUSG00000042659	M200013596
431	0.461	Tmem141	transmembrane protein 141 Gene	ENSMUSG00000026939	M300005395
432	0.461	S100a1	S100 calcium binding protein A1 Gene	ENSMUSG00000044080	M200004967
433	0.460	Peci	peroxisomal delta3, delta2-enoyl-Coenzyme A isomerase Gene	ENSMUSG00000021417	M200006211
434	0.459	Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide Gene	ENSMUSG00000029231	M200001112
435	0.459	Hdac3	histone deacetylase 3 Gene	ENSMUSG00000024454	M300004138
436	0.458	Cox7a2l	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2-like Gene	ENSMUSG00000024248	M400000731
437	0.458	E2f8	E2F transcription factor 8 Gene	ENSMUSG00000046179	M400003127
438	0.458	Mmp15	matrix metalloproteinase 15 Gene	ENSMUSG000000031790	M300007902
439	0.457	2700038C09Rik	RIKEN cDNA 2700038C09 gene Gene	ENSMUSG00000016344	M200012112
440	0.457	AC109311.12	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2-like	ENSMUSG00000029376	M200007209
441	0.457	Poldip2	polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2 Gene	ENSMUSG00000001100	M200012802
442	0.457	Cbfb	core binding factor beta Gene	ENSMUSG000000031885	M200000766
443	0.456	Bzw1	basic leucine zipper and W2 domains 1 Gene	ENSMUSG00000051223	M400003801
444	0.456	H2afv	H2A histone family, member V Gene	ENSMUSG00000041126	M300013029
445	0.456	2700060E02Rik	RIKEN cDNA 2700060E02 gene Gene	ENSMUSG00000021807	M300002960
446	0.455	Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4 Gene	ENSMUSG00000045382	M400014726
447	0.455	RP23-355N5.1	antagonist of mitotic exit network 1 homolog	ENSMUSG00000068250	M300021237

448	0.455	Thy1	thymus cell antigen 1, theta Gene	ENSMUSG00000032011	M400001424
449	0.455	Pts	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase Gene	ENSMUSG00000032067	M300008054
450	0.455	Srm	spermidine synthase Gene	ENSMUSG00000006442	M200000004
451	0.455	Sumo2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2 (yeast) Gene	ENSMUSG00000020738	M300002370
452	0.454	Cat	catalase Gene	ENSMUSG00000027187	M300005501
453	0.454	Tk1	thymidine kinase 1 Gene	ENSMUSG00000025574	M200001015
454	0.454	Ctsd	cathepsin D Gene	ENSMUSG00000007891	M400000147
455	0.454	Vangl2	vang-like 2 (van gogh, Drosophila) Gene	ENSMUSG00000026556	M200012875
456	0.454	5031439G07Rik	RIKEN cDNA 5031439G07 gene Gene	ENSMUSG00000036046	M300010219
457	0.454	AL928608.17		ENSMUSG00000083569	M400005866
458	0.453	Glrx	glutaredoxin Gene	ENSMUSG00000021591	M200006620
459	0.453	Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000027379	M200000832
460	0.453	Cox7c	cytochrome c oxidase, subunit VIIc Gene	ENSMUSG00000017778	M400000275
461	0.453	Cct5	chaperonin containing Tcp1, subunit 5 (epsilon) Gene	ENSMUSG00000022234	M200000704
462	0.452	Jmjd4	jumonji domain containing 4 Gene	ENSMUSG00000036819	M300010546
463	0.452	3110003A17Rik	RIKEN cDNA 3110003A17 gene Gene	ENSMUSG00000078453	M200005858
464	0.452	Dck	deoxycytidine kinase Gene	ENSMUSG00000029366	M300006637
465	0.452	Hnrpab	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B Gene	ENSMUSG00000020358	M200000009
466	0.451	Ebf3	early B-cell factor 3 Gene	ENSMUSG00000010476	M400013942
467	0.451	P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12 Gene	ENSMUSG00000036353	M400011613
468	0.450	Nedd8	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 8 Gene	ENSMUSG00000010376	M300001097
469	0.450	Optn	optineurin Gene	ENSMUSG00000026672	M200008850
470	0.450	Twf1	twinfilin, actin-binding protein, homolog 1 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000022451	M300003298
471	0.450	6720467C03Rik	RIKEN cDNA 6720467C03 gene Gene	ENSMUSG00000028218	M200005112
472	0.450	Lsm10	U7 snRNP-specific Sm-like protein LSM10 Gene	ENSMUSG00000050188	M400003658
473	0.450	Slc35b2	solute carrier family 35, member B2 Gene	ENSMUSG00000037089	M200004134
474	0.449	Gabarap	gamma-aminobutyric acid receptor associated protein Gene	ENSMUSG00000018567	M200006815
475	0.449	Uqcrfs1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1 Gene	ENSMUSG00000038462	M200012042
476	0.449	BC035537	family with sequence similarity 149, member A Gene	ENSMUSG00000070044	M400012198
477	0.449	Psm2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2 Gene	ENSMUSG00000015671	M200012118
478	0.449	Trappc2l	trafficking protein particle complex 2-like Gene	ENSMUSG00000015013	M200008106
479	0.448	Gsn	gelsolin Gene	ENSMUSG00000026879	M200004057
480	0.448	A330021E22Rik	RIKEN cDNA A330021E22 gene Gene	ENSMUSG00000040473	M300012687
481	0.448	Wdr1	WD repeat domain 1 Gene	ENSMUSG00000005103	M200001010
482	0.448	Polr2d	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D Gene	ENSMUSG00000024258	M300004017
483	0.448	Amz2	archaelysin family metalloproteinase 2 Gene	ENSMUSG00000020610	M200006537
484	0.447	Ccnb1	cyclin B1 Gene	ENSMUSG00000004131	M200004432
485	0.447	2700094K13Rik	RIKEN cDNA 2700094K13 gene Gene	ENSMUSG00000076437	M400004766
486	0.447	Freq	frequenin homolog (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000062661	M200013519
487	0.447	Prmt1	protein arginine N-methyltransferase 1 Gene	ENSMUSG00000052429	M200005596
488	0.447	Aurkb	aurora kinase B Gene	ENSMUSG00000020897	M300002450
489	0.447	Psm1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1 Gene	ENSMUSG00000030751	M200006835
490	0.447	Slc39a8	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 8 Gene	ENSMUSG00000053897	M200006914
491	0.446	Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase Gene	ENSMUSG00000058454	M400001334
492	0.446	Dyrk2	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 Gene	ENSMUSG00000028630	M400001100
493	0.446	Id1	inhibitor of DNA binding 1 Gene	ENSMUSG00000042745	M200000163
494	0.446	Magoh	mago-nashi homolog, proliferation-associated (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000028609	M200000288
495	0.446	Ifit2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 Gene	ENSMUSG00000045932	M300016852
496	0.446	Gpr83	G protein-coupled receptor 83 Gene	ENSMUSG00000031932	M200001879
497	0.445	1110031B06Rik	RIKEN cDNA 1110031B06 gene Gene	ENSMUSG00000009894	M400009880
498	0.445	Crlf2	cytokine receptor-like factor 2 Gene	ENSMUSG00000033467	M400013225
499	0.445	AC123060.4		ENSMUSG00000058700	M400006451
500	0.445	Slc25a20	solute carrier family 25 (mitochondrial carnitine/acylcarnitine translocase), member 20 Gene	ENSMUSG00000032602	M200006592
501	0.444	Ak5	adenylate kinase 5 Gene	ENSMUSG00000039058	M300011913
502	0.444	Nol3	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain) Gene	ENSMUSG00000014776	M200014645
503	0.444	Rad23b	RAD23b homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000028426	M200012782
504	0.444	Nasp	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) Gene	ENSMUSG00000028693	M300006234
505	0.444	Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1 Gene	ENSMUSG00000034353	M200001264
506	0.444	Taldo1	transaldolase 1 Gene	ENSMUSG00000025503	M300004665
507	0.444	Rhoa	ras homolog gene family, member A Gene	ENSMUSG00000007815	M300000921

508	0.444	Slc12a1	solute carrier family 12, member 1 Gene	ENSMUSG00000027202	M200001503
509	0.443	Dtymk	deoxythymidylate kinase Gene	ENSMUSG00000026281	M400011427
510	0.443	Drcnbn1a	family with sequence similarity 126, member A Gene	ENSMUSG00000028995	M300006419
511	0.443	Dcun1d4	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000051674	M400006137
512	0.442	Nt5c3l	5'-nucleotidase, cytosolic III-like Gene	ENSMUSG00000017176	M300001557
513	0.442	Pdlim7	PDZ and LIM domain 7 Gene	ENSMUSG00000021493	M400008888
514	0.442	Homer2	homer homolog 2 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000025813	M200000086
515	0.441	AL929446.5		ENSMUSG00000081613	M400005838
516	0.441	Apool	apolipoprotein O-like Gene	ENSMUSG00000025525	M200005424
517	0.441	Rps9	ribosomal protein S9 Gene	ENSMUSG00000006333	M300000782
518	0.441	Sorbs1	sorbin and SH3 domain containing 1 Gene	ENSMUSG00000025006	M400009136
519	0.441	EG434402	predicted gene, EG434402 Gene	ENSMUSG00000042293	M300013622
520	0.440	Atp5j2	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit f, isoform 2 Gene	ENSMUSG00000038690	M400011371
521	0.440	Ap2s1	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit Gene	ENSMUSG00000008036	M300000948
522	0.440	Idh2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP), mitochondrial Gene	ENSMUSG00000030541	M300007287
523	0.440	Pasma4	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4 Gene	ENSMUSG00000032301	M200006931
524	0.440	AC162932.2		ENSMUSG00000073240	M300016267
525	0.440	AC139042.18		ENSMUSG000000055771	M400005291
526	0.440	Commd9	COMM domain containing 9 Gene	ENSMUSG00000027163	M300005490
527	0.440	Taf10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor Gene	ENSMUSG00000043866	M300007488
528	0.439	2700050L05Rik	RIKEN cDNA 2700050L05 gene Gene	ENSMUSG00000039990	M300012474
529	0.439	Gtf3a	general transcription factor III A Gene	ENSMUSG00000016503	M300001521
530	0.439	Hes6	hairy and enhancer of split 6 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000067071	M400011312
531	0.439	Mrpl13	mitochondrial ribosomal protein L13 Gene	ENSMUSG00000022370	M200002853
532	0.438	Kif11	kinesin family member 11 Gene	ENSMUSG00000012443	M300001180
533	0.438	Bat3	HLA-B-associated transcript 3 Gene	ENSMUSG00000024392	M300004104
534	0.438	Atp5d	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit Gene	ENSMUSG00000003072	M300000374
535	0.437	Ndufb9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9 Gene	ENSMUSG00000022354	M300003231
536	0.437	Pop4	processing of precursor 4, ribonuclease P/MRP family, (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000030423	M200004345
537	0.436	Ccdc80	coiled-coil domain containing 80 Gene	ENSMUSG00000022665	M300003443
538	0.436	Ap1s1	adaptor protein complex AP-1, sigma 1 Gene	ENSMUSG00000004849	M400010727
539	0.436	Erc2	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2 Gene	ENSMUSG00000040640	M400012437
540	0.436	Tmem44	transmembrane protein 44 Gene	ENSMUSG00000022537	M300003354
541	0.435	Slc25a4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 4 Gene	ENSMUSG00000031633	M200003422
542	0.435	Ralb	v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related) Gene	ENSMUSG00000004451	M300000556
543	0.434	Ndufa3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3 Gene	ENSMUSG00000035674	M300010040
544	0.433	Dstn	destrin Gene	ENSMUSG00000015932	M200006229
545	0.433	Gng10	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10 Gene	ENSMUSG00000038607	M200013747
546	0.433	Mtch1	mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans) Gene	ENSMUSG00000024012	M200006584
547	0.432	Bak1	BCL2-antagonist/killer 1 Gene	ENSMUSG00000057789	M300003980
548	0.432	Commd8	COMM domain containing 8 Gene	ENSMUSG00000029213	M200014062
549	0.431	1110001J03Rik	formation of mitochondrial complexes 1 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000019689	M200004783
550	0.431	AL772308.4		ENSMUSG00000078289	M400010049
551	0.430	B830045N13Rik	RIKEN cDNA B830045N13 gene Gene	ENSMUSG00000035131	M300009718
552	0.430	2610029G23Rik	RIKEN cDNA 2610029G23 gene Gene	ENSMUSG00000031226	M200011952
553	0.430	Cyb5	cytochrome b-5 Gene	ENSMUSG00000024646	M300004251
554	0.429	BC043098	family with sequence similarity 168, member B Gene	ENSMUSG00000037503	M300010963
555	0.429	Tbeb	tubulin folding cofactor B Gene	ENSMUSG00000006095	M200005766
556	0.429	Ndufb8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8 Gene	ENSMUSG00000025204	M200000786
557	0.429	Nsdhl		ENSMUSG00000031349	M200008113
558	0.429	Arf4	ADP-ribosylation factor 4 Gene	ENSMUSG00000021877	M200000609
559	0.429	Slc40a1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 Gene	ENSMUSG00000025993	M300004878
560	0.428	AC120548.15		ENSMUSG00000071052	M400005655
561	0.428	Brp44l	brain protein 44-like Gene	ENSMUSG00000023861	M400010089
562	0.428	Synpr	synaptoporin Gene	ENSMUSG00000056296	M400005462
563	0.428	AC121603.4		ENSMUSG000000056849	M400005656

564	0.428	Evl	Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein Gene	ENSMUSG00000021262	M300002653
565	0.428	Limd2	LIM domain containing 2 Gene	ENSMUSG00000040699	M200004191
566	0.427	Selplg	selectin, platelet (p-selectin) ligand Gene	ENSMUSG00000048163	M200004309
567	0.427	Wdr25	WD repeat domain 25 Gene	ENSMUSG00000040877	M300012914
568	0.427	Armc10	armadillo repeat containing 10 Gene	ENSMUSG00000038525	M200004264
569	0.427	Plp2	proteolipid protein 2 Gene	ENSMUSG00000031146	M300007578
570	0.427	Zwint	ZW10 interactor Gene	ENSMUSG00000019923	M300001897
571	0.426	Eif3s5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F Gene	ENSMUSG00000031029	M200012121
572	0.426	Cdc42	cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000006699	M300000845
573	0.425	Abhd11	abhydrolase domain containing 11 Gene	ENSMUSG00000040532	M200005157
574	0.425	Ube2o	ubiquitin-conjugating enzyme E2O Gene	ENSMUSG00000020802	M300002396
575	0.425	Cox18	COX18 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000035505	M400001817
576	0.425	Nfu1	NFU1 iron-sulfur cluster scaffold homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000029993	M400011354
577	0.425	Ttll1	tubulin tyrosine ligase-like 1 Gene	ENSMUSG00000022442	M200015371
578	0.424	Nap111	nucleosome assembly protein 1-like 1 Gene	ENSMUSG00000058799	M400005271
579	0.424	Rassf4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4 Gene	ENSMUSG00000042129	M300013525
580	0.424	Tmem9	transmembrane protein 9 Gene	ENSMUSG00000026411	M400000923
581	0.423	2310007D09Rik	RIKEN cDNA 2310007D09 gene Gene	ENSMUSG00000027654	M200015690
582	0.423	Cox7b	cytochrome c oxidase subunit VIIb Gene	ENSMUSG00000031231	M200009381
583	0.423	Wdr6	WD repeat domain 6 Gene	ENSMUSG00000066357	M200006508
584	0.423	Nudt19	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19 Gene	ENSMUSG00000034875	M400001743
585	0.423	Ckap2	cytoskeleton associated protein 2 Gene	ENSMUSG00000037725	M400002048
586	0.422	Dynlrb1	dynein light chain roadblock-type 1 Gene	ENSMUSG00000047459	M300018303
587	0.422	2900002K06Rik	RIKEN cDNA 2900002K06 gene Gene	ENSMUSG00000055188	M400005078
588	0.422	Mobkl2a	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2A (yeast) Gene	ENSMUSG00000003348	M300000408
589	0.422	Srp19	signal recognition particle 19 Gene	ENSMUSG00000014504	M300001305
590	0.421	Fstl1	follistatin-like 1 Gene	ENSMUSG00000022816	M300003525
591	0.421	RP23-168M5.3	Novel protein	ENSMUSG00000078570	M300016531
592	0.421	Cdca7	cell division cycle associated 7 Gene	ENSMUSG00000055612	M300001755
593	0.420	Bri3bp	Bri3 binding protein Gene	ENSMUSG00000037905	M300011212
594	0.420	Tagln	transgelin Gene	ENSMUSG00000032085	M400011145
595	0.420	Dut	deoxyuridine triphosphatase Gene	ENSMUSG00000027203	M400012814
596	0.419	Lym2	LYR motif containing 2 Gene	ENSMUSG00000045854	M300016780
597	0.418	Mrpl52	mitochondrial ribosomal protein L52 Gene	ENSMUSG00000010406	M200006915
598	0.418	Traf4	Tnf receptor associated factor 4 Gene	ENSMUSG00000017386	M200001791
599	0.417	Med30	mediator complex subunit 30 Gene	ENSMUSG00000038622	M300011673
600	0.417	Psmc1	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, alpha Gene	ENSMUSG00000022216	M300018890
601	0.417	C1d	nuclear DNA binding protein Gene	ENSMUSG00000000581	M200000938
602	0.416	Lgmn	legumain Gene	ENSMUSG00000021190	M200003483
603	0.416	Cyb5b	cytochrome b5 type B Gene	ENSMUSG00000031924	M200003839
604	0.416	Uchl1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 Gene	ENSMUSG00000029223	M400011160
605	0.416	Cyb561d2	cytochrome b-561 domain containing 2 Gene	ENSMUSG00000037190	M200005012
606	0.416	Mia1	melanoma inhibitory activity 1 Gene	ENSMUSG00000058217	M400006240
607	0.415	Socs2	suppressor of cytokine signaling 2 Gene	ENSMUSG00000020027	M200001605
608	0.415	Emid1	EMI domain containing 1 Gene	ENSMUSG00000034164	M200000295
609	0.415	Tuba1c	tubulin, alpha 1C Gene	ENSMUSG00000043091	M300014179
610	0.414	Glce	glucuronyl C5-epimerase Gene	ENSMUSG00000032252	M200009949
611	0.414	Sh3glb1	SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin) Gene	ENSMUSG00000037062	M300010714
612	0.413	Socs3	suppressor of cytokine signaling 3 Gene	ENSMUSG00000053113	M200001348
613	0.413	Cnih3	cornichon homolog 3 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000026514	M200015434
614	0.413	Psmc2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2 Gene	ENSMUSG00000028837	M200004330
615	0.412	Entpd2	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 Gene	ENSMUSG00000015085	M300001354
616	0.412	Klhl13	kelch-like 13 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000036782	M200005293
617	0.412	Myc	myelocytomatosis oncogene Gene	ENSMUSG00000022346	M200000925
618	0.412	Pvrl3	poliovirus receptor-related 3 Gene	ENSMUSG00000022656	M300003438
619	0.412	Wbp5	WW domain binding protein 5 Gene	ENSMUSG00000042712	M300013846
620	0.412	CT009567.9		ENSMUSG00000068487	M400003089
621	0.411	Hint2	histidine triad nucleotide binding protein 2 Gene	ENSMUSG00000028470	M200005089
622	0.410	AL845293.5		ENSMUSG00000081999	M400003423
623	0.410	Mrpl34	mitochondrial ribosomal protein L34 Gene	ENSMUSG00000034880	M200006506
624	0.410	Slc6a11	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11 Gene	ENSMUSG00000030307	M300007126
625	0.410	Vps28	vacuolar protein sorting 28 (yeast) Gene	ENSMUSG00000062381	M200006791
626	0.410	Haao	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase Gene	ENSMUSG00000000673	M200006837

627	0.410	Pomp	proteasome maturation protein Gene	ENSMUSG00000029649	M200000831
628	0.409	Bace2	beta-site APP-cleaving enzyme 2 Gene	ENSMUSG00000040605	M200005841
629	0.409	Ndfip2	Nedd4 family interacting protein 2 Gene	ENSMUSG00000053253	M400004403
630	0.409	Stx7	syntaxin 7 Gene	ENSMUSG00000019998	M200003010
631	0.408	3300001G02Rik	RIKEN cDNA 3300001G02 gene Gene	ENSMUSG00000040767	M200006744
632	0.408	Mark4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4 Gene	ENSMUSG00000030397	M300007191
633	0.408	Tnni1	troponin I, skeletal, slow 1 Gene	ENSMUSG00000026418	M300005095
634	0.407	Zfhx3	zinc finger homeobox 3 Gene	ENSMUSG00000038872	M200001664
635	0.407	5430432M24Rik	family with sequence similarity 110, member A Gene	ENSMUSG00000027459	M200012310
636	0.407	Cdc42se2	CDC42 small effector 2 Gene	ENSMUSG00000052298	M400004064
637	0.407	Rnd3	Rho family GTPase 3 Gene	ENSMUSG00000017144	M200014530
638	0.406	1810058I24Rik	RIKEN cDNA 1810058I24 gene Gene	ENSMUSG00000073155	M400013672
639	0.406	Prickle4	prickle homolog 4 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000033475	M400001561
640	0.405	Akr1a4	aldo-keto reductase family 1, member A4 (aldehyde reductase) Gene	ENSMUSG00000028692	M200006829
641	0.405	Shisa4	shisa homolog 4 (Xenopus laevis) Gene	ENSMUSG00000041889	M300013417
642	0.405	Oxct1	3-oxoacid CoA transferase 1 Gene	ENSMUSG00000022186	M400000547
643	0.404	Gpx7	glutathione peroxidase 7 Gene	ENSMUSG00000028597	M200003823
644	0.404	Khdrbs3	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3 Gene	ENSMUSG00000022332	M200003563
645	0.403	Phlda3	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3 Gene	ENSMUSG00000041801	M400002551
646	0.403	2010204K13Rik	RIKEN cDNA 2010204K13 gene Gene	ENSMUSG00000063018	M300021184
647	0.403	Mpzl1	myelin protein zero-like 1 Gene	ENSMUSG00000026566	M300005180
648	0.403	Oprl1	opioid receptor-like 1 Gene	ENSMUSG00000027584	M400011092
649	0.402	5730446C15Rik	family with sequence similarity 108, member B Gene	ENSMUSG00000047368	M400011926
650	0.402	Tes	testis derived transcript Gene	ENSMUSG00000029552	M400001181
651	0.402	Fxc1	fractured callus expressed transcript 1 Gene	ENSMUSG00000030882	M200001569
652	0.402	Pdcd5	programmed cell death 5 Gene	ENSMUSG00000030417	M200004183
653	0.401	Mcm3	minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000041859	M300013395
654	0.401	Kif21b	kinesin family member 21B Gene	ENSMUSG00000041642	M300013278
655	0.401	Lmcd1	LIM and cysteine-rich domains 1 Gene	ENSMUSG00000057604	M200012898
656	0.399	Bcl11b	B-cell leukemia/lymphoma 11B Gene	ENSMUSG00000048251	M400014858
657	0.399	Stab1	stabilin 1 Gene	ENSMUSG00000042286	M400002608
658	0.399	Ndufs6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6 Gene	ENSMUSG00000021606	M400000492
659	0.398	AC158396.2-201		ENSMUSG00000072714	M400009999
660	0.397	4930452B06Rik	RIKEN cDNA 4930452B06 gene Gene	ENSMUSG00000021747	M200012674
661	0.397	Pde1a	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent Gene	ENSMUSG00000059173	M200008305
662	0.397	Gnl3l	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like Gene	ENSMUSG00000025266	M300004547
663	0.397	Mpdu1	mannose-P-dolichol utilization defect 1 Gene	ENSMUSG00000018761	M200016004
664	0.397	Ptk2b	PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta Gene	ENSMUSG00000059456	M300003077
665	0.396	Acat1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 Gene	ENSMUSG00000032047	M300008045
666	0.396	Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2 Gene	ENSMUSG00000030747	M200011933
667	0.396	Cox7a2	cytochrome c oxidase, subunit VIIa 2 Gene	ENSMUSG00000032330	M200000818
668	0.395	Ahi1	Abelson helper integration site 1 Gene	ENSMUSG00000019986	M300001939
669	0.394	Ndufb2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 2 Gene	ENSMUSG00000002416	M200006474
670	0.394	1810037I17Rik	RIKEN cDNA 1810037I17 gene Gene	ENSMUSG00000054091	M400004704
671	0.393	Banfl	barrier to autointegration factor 1 Gene	ENSMUSG00000024844	M200002560
672	0.393	Fxyd6	FXRD domain-containing ion transport regulator 6 Gene	ENSMUSG00000066705	M400011405
673	0.392	Abr	active BCR-related gene Gene	ENSMUSG00000017631	M300001591
674	0.392	Cops5	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 5 (Arabidopsis thaliana) Gene	ENSMUSG00000025917	M200000933
675	0.392	H19	H19 fetal liver mRNA Gene	ENSMUSG00000000031	M300000002
676	0.391	Eif3k	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K Gene	ENSMUSG00000053565	M300007308
677	0.391	Ngfrap1	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1 Gene	ENSMUSG00000046432	M200016095
678	0.391	AC116736.14	Putative uncharacterized protein	ENSMUSG00000051761	M400003880
679	0.391	Hoxa5	homeo box A5 Gene	ENSMUSG00000038253	M200000062
680	0.391	Tbc1d7	TBC1 domain family, member 7 Gene	ENSMUSG00000021368	M200013638
681	0.390	Ihpk2	inositol hexaphosphate kinase 2 Gene	ENSMUSG00000032599	M200016005
682	0.390	Rap1a	RAS-related protein-1a Gene	ENSMUSG00000068798	M400011902
683	0.390	Ndufv2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2 Gene	ENSMUSG00000024099	M200000835
684	0.390	Pbx4	pre-B-cell leukemia homeobox 4 Gene	ENSMUSG00000031860	M300007937
685	0.389	Paqr7	progesterin and adipoQ receptor family member VII Gene	ENSMUSG00000037348	M200009388
686	0.389	6330419J24Rik	RIKEN cDNA 6330419J24 gene Gene	ENSMUSG00000054850	M400004958
687	0.389	Ppic	peptidylprolyl isomerase C Gene	ENSMUSG00000024538	M200001825
688	0.389	Casp7	caspase 7 Gene	ENSMUSG00000025076	M300004466

689	0.388	Ankrd6	ankyrin repeat domain 6 Gene	ENSMUSG00000040183	M300012553
690	0.387	Ddt	D-dopachrome tautomerase Gene	ENSMUSG00000001666	M200002268
691	0.387	Eif3i	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit I Gene	ENSMUSG00000028798	M200008679
692	0.386	Ccdc34	coiled-coil domain containing 34 Gene	ENSMUSG00000027160	M300005489
693	0.386	Mrpl43	mitochondrial ribosomal protein L43 Gene	ENSMUSG00000025208	M300004513
694	0.386	Ppp2r2b	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform Gene	ENSMUSG00000024500	M300004178
695	0.385	Apex1	apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 Gene	ENSMUSG00000035960	M300010175
696	0.384	C530008M17Rik	RIKEN cDNA C530008M17 gene Gene	ENSMUSG00000036377	M300010354
697	0.384	Epb4.112	erythrocyte protein band 4.1-like 2 Gene	ENSMUSG00000019978	M400008704
698	0.384	Tead2	TEA domain family member 2 Gene	ENSMUSG00000030796	M200001157
699	0.383	A930005H10Rik	RIKEN cDNA A930005H10 gene Gene	ENSMUSG00000054426	M400004807
700	0.383	Ick	intestinal cell kinase Gene	ENSMUSG00000009828	M200014116
701	0.383	Zfp57	zinc finger protein 57 Gene	ENSMUSG00000036036	M200004111
702	0.382	AC109220.16		ENSMUSG00000083820	M400002187
703	0.382	Esco2	establishment of cohesion 1 homolog 2 ( <i>S. cerevisiae</i> ) Gene	ENSMUSG00000022034	M200014513
704	0.382	Fau	Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived) Gene	ENSMUSG00000038274	M400002114
705	0.382	Mmab	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) type B homolog (human) Gene	ENSMUSG00000029575	M200012831
706	0.382	Rrm2	ribonucleotide reductase M2 Gene	ENSMUSG00000020649	M200000030
707	0.382	Rerg	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor Gene	ENSMUSG00000030222	M400001238
708	0.381	Pgrmc1	progesterone receptor membrane component 1 Gene	ENSMUSG00000006373	M300000793
709	0.381	Snx7	sorting nexin 7 Gene	ENSMUSG00000028007	M200007424
710	0.381	2610110G12Rik	RIKEN cDNA 2610110G12 gene Gene	ENSMUSG00000024426	M300004122
711	0.380	Sf3b5	splicing factor 3b, subunit 5 Gene	ENSMUSG00000078348	M200006630
712	0.379	Cox5a	cytochrome c oxidase, subunit Va Gene	ENSMUSG00000000088	M300000005
713	0.378	Bdh1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1 Gene	ENSMUSG00000046598	M200006708
714	0.378	Pvr12	poliovirus receptor-related 2 Gene	ENSMUSG000000062300	M400000063
715	0.378	Impdh1	inosine 5'-phosphate dehydrogenase 1 Gene	ENSMUSG00000003500	M400000073
716	0.378	Olfm2	olfactomedin 2 Gene	ENSMUSG00000032172	M300008097
717	0.377	Dcakkd	dephospho-CoA kinase domain containing Gene	ENSMUSG00000020935	M200012012
718	0.377	Fxyd7	FXFD domain-containing ion transport regulator 7 Gene	ENSMUSG00000036578	M200013741
719	0.376	AC190403.1		ENSMUSG000000035129	M400001756
720	0.376	Loxl1	lysyl oxidase-like 1 Gene	ENSMUSG000000032334	M300008195
721	0.375	Dda1	DET1 and DDB1 associated 1 Gene	ENSMUSG00000074247	M200006719
722	0.375	Cdk4	cyclin-dependent kinase 4 Gene	ENSMUSG00000006728	M200002442
723	0.375	Pak3	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3 Gene	ENSMUSG00000031284	M200001308
724	0.374	2010107E04Rik	RIKEN cDNA 2010107E04 gene Gene	ENSMUSG00000021290	M200000112
725	0.374	Actr1a	ARPI actin-related protein 1 homolog A, contractin alpha (yeast) Gene	ENSMUSG00000025228	M300004523
726	0.373	Ppib	peptidylprolyl isomerase B Gene	ENSMUSG00000032383	M200000909
727	0.373	Manbal	mannosidase, beta A, lysosomal-like Gene	ENSMUSG000000063019	M200016286
728	0.373	Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11 Gene	ENSMUSG00000002379	M200005413
729	0.373	Rap2a	RAS related protein 2a Gene	ENSMUSG00000051615	M300022233
730	0.372	Ncapg	on-SMC condensin I complex, subunit G Gene	ENSMUSG00000015880	M400008584
731	0.372	Sle16a1	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1 Gene	ENSMUSG00000032902	M200002767
732	0.371	Cct6a	chaperonin containing Tcp1, subunit 6a (zeta) Gene	ENSMUSG00000029447	M400001166
733	0.371	Hoxb5	homeo box B5 Gene	ENSMUSG00000038700	M200000076
734	0.371	Rgs19	regulator of G-protein signaling 19 Gene	ENSMUSG00000002458	M200003820
735	0.371	Txndc17	thioredoxin domain containing 17 Gene	ENSMUSG00000020803	M200005648
736	0.369	Hras1	Harvey rat sarcoma virus oncogene 1 Gene	ENSMUSG00000025499	M400010813
737	0.369	Sin3b	transcriptional regulator, SIN3B (yeast) Gene	ENSMUSG000000031622	M300007824
738	0.369	Ube2c	ubiquitin-conjugating enzyme E2C Gene	ENSMUSG00000001403	M300000188
739	0.368	R74862		ENSMUSG00000059277	M200002223
740	0.367	CT010576.9		ENSMUSG00000052192	M400004034
741	0.367	Psmb1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 1 Gene	ENSMUSG00000014769	M300001326
742	0.367	Rsu1	Ras suppressor protein 1 Gene	ENSMUSG00000026727	M200000322
743	0.367	Eif3h	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H Gene	ENSMUSG00000022312	M400010040
744	0.366	Acat2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 Gene	ENSMUSG00000023832	M200012683
745	0.365	Psm8	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8 Gene	ENSMUSG00000030591	M200007825
746	0.364	Limk1	LIM-domain containing, protein kinase Gene	ENSMUSG00000029674	M200003373
747	0.363	AC154266.2		ENSMUSG00000069196	M400011265
748	0.363	Agpat1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha) Gene	ENSMUSG00000034254	M200002732
749	0.363	Vat1	vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)	ENSMUSG00000034993	M300009648

			Gene		
750	0.362	Sh3bgr1	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like Gene	ENSMUSG00000031246	M200004130
751	0.362	Sepp1	selenoprotein P, plasma, 1 Gene	ENSMUSG00000064373	M400010899
752	0.361	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1 Gene	ENSMUSG00000072949	M300013759
753	0.361	Kif4	kinesin family member 4 Gene	ENSMUSG00000034311	M300009278
754	0.360	Cox6b1	cytochrome c oxidase, subunit VIb polypeptide 1 Gene	ENSMUSG00000036751	M200000150
755	0.360	Lhfp13	lipoma HMGIC fusion partner-like 3 Gene	ENSMUSG00000058361	M400006300
756	0.360	Samd4b	sterile alpha motif domain containing 4B Gene	ENSMUSG00000037513	M300010971
757	0.360	Mad2l2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2 (yeast) Gene	ENSMUSG00000029003	M200002809
758	0.360	Pde1b	phosphodiesterase 1B, Ca <sup>2+</sup> /calmodulin dependent Gene	ENSMUSG00000022489	M200000021
759	0.359	Sqle	squalene epoxidase Gene	ENSMUSG00000022351	M200004466
760	0.358	Pfn	perforin 1 (pore forming protein) Gene	ENSMUSG00000027805	M400001029
761	0.358	Eif4a1	eukaryotic translation initiation factor 4A1 Gene	ENSMUSG00000059796	M400000306
762	0.357	Gipc1	GIPC PDZ domain containing family, member 1 Gene	ENSMUSG00000019433	M200004021
763	0.357	Nrarp	Notch-regulated ankyrin repeat protein Gene	ENSMUSG00000078202	M400001526
764	0.357	Foxo6	forkhead box O6 Gene	ENSMUSG00000052135	M400004007
765	0.356	Hcrtr1	hypocretin (orexin) receptor 1 Gene	ENSMUSG00000028778	M300006286
766	0.356	Mfsd2	major facilitator superfamily domain containing 2 Gene	ENSMUSG00000028655	M200008045
767	0.355	Ranbp1	RAN binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000005732	M200001437
768	0.354	Sox11	SRY-box containing gene 11 Gene	ENSMUSG00000063632	M4000013413
769	0.354	Scn3a	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha Gene	ENSMUSG00000057182	M400000982
770	0.353	Nav1	neuron navigator 1 Gene	ENSMUSG00000009418	M300001042
771	0.353	Mllt11	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11 Gene	ENSMUSG00000053192	M200005065
772	0.352	Hmmr	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM) Gene	ENSMUSG00000020330	M400000383
773	0.352	Skp1a	S-phase kinase-associated protein 1A Gene	ENSMUSG00000036309	M300010327
774	0.351	Shb	src homology 2 domain-containing transforming protein B Gene	ENSMUSG00000044813	M300015805
775	0.351	Tmem158	transmembrane protein 158 Gene	ENSMUSG00000054871	M400004961
776	0.351	Tpx2	deleted in azoospermia-like Gene	ENSMUSG00000027469	M200003024
777	0.350	D4Bwg0951e	Uncharacterized protein C9orf150 homolog	ENSMUSG00000048706	M200007845
778	0.350	Ndufs8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8 Gene	ENSMUSG00000059734	M300004360
779	0.348	Kpna2	karyopherin (importin) alpha 2 Gene	ENSMUSG00000018362	M400000288
780	0.347	C230078M08Rik	RIKEN cDNA C230078M08 gene Gene	ENSMUSG00000047439	M300018282
781	0.347	Slc25a1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, citrate transporter), member 1 Gene	ENSMUSG00000003528	M200004472
782	0.347	Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4 Gene	ENSMUSG00000017493	M200004334
783	0.347	Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 Gene	ENSMUSG00000031778	M200001237
784	0.347	Ier5l	immediate early response 5-like Gene	ENSMUSG00000078200	M400011699
785	0.347	Csrp2	cysteine and glycine-rich protein 2 Gene	ENSMUSG00000020186	M4000010759
786	0.346	Arpc3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3 Gene	ENSMUSG00000029465	M200004909
787	0.346	Gnb1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 1 Gene	ENSMUSG00000029064	M200000883
788	0.346	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase Gene	ENSMUSG00000021670	M400008904
789	0.344	Rps6ka6	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 6 Gene	ENSMUSG00000025665	M300004731
790	0.344	Ate9b	ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000038295	M300011479
791	0.344	Ndufc1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1 Gene	ENSMUSG00000037152	M400012805
792	0.343	Serfl	small EDRK-rich factor 1 Gene	ENSMUSG00000021643	M200000687
793	0.343	5730559C18Rik	RIKEN cDNA 5730559C18 gene Gene	ENSMUSG00000041605	M300005088
794	0.343	Lpl	lipoprotein lipase Gene	ENSMUSG00000015568	M300001423
795	0.343	Unc119	unc-119 homolog (C. elegans) Gene	ENSMUSG00000002058	M200005682
796	0.343	Lars2	leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial Gene	ENSMUSG00000035202	M300009774
797	0.341	Ccdc23	coiled-coil domain containing 23 Gene	ENSMUSG00000028643	M200007879
798	0.340	Lmo4	LIM domain only 4 Gene	ENSMUSG00000028266	M200006369
799	0.340	Pdzrn3	PDZ domain containing RING finger 3 Gene	ENSMUSG00000035357	M300009878
800	0.340	Csnk1e	casein kinase 1, epsilon Gene	ENSMUSG00000022433	M200016278
801	0.339	Cyp51	cytochrome P450, family 51 Gene	ENSMUSG00000001467	M200009287
802	0.338	Dera	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase homolog (C. elegans) Gene	ENSMUSG00000030225	M400001239
803	0.338	Dlk2	delta-like 2 homolog (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000047428	M400003306
804	0.338	AC167978.4		ENSMUSG00000066620	M400008233
805	0.338	Cox6a1	cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 1 Gene	ENSMUSG00000041697	M200013993
806	0.338	E2f1	E2F transcription factor 1 Gene	ENSMUSG00000027490	M300005663
807	0.334	Slc18a2	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2 Gene	ENSMUSG00000025094	M300004482
808	0.334	Dynlt1	dynein light chain Tctex-type 1D Gene	ENSMUSG00000000579	M300000090
809	0.332	Ccdc95	INO80 complex subunit E Gene	ENSMUSG00000030689	M300019970
810	0.332	Slc25a43	solute carrier family 25, member 43 Gene	ENSMUSG00000037636	M300011038
811	0.331	Dos	downstream of Stk11 Gene	ENSMUSG00000035640	M300010025

812	0.330	Eef1e1	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1 Gene	ENSMUSG0000001707	M200007877
813	0.329	Lyp1a2	lysophospholipase 2 Gene	ENSMUSG00000028670	M200007536
814	0.329	Bmp4	bone morphogenetic protein 4 Gene	ENSMUSG00000021835	M200002432
815	0.328	I110008P14Rik	RIKEN cDNA 1110008P14 gene Gene	ENSMUSG00000039195	M300012020
816	0.328	Ppp2r2a	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform Gene	ENSMUSG00000022052	M40000535
817	0.327	Psmb3	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 3 Gene	ENSMUSG00000069744	M400005941
818	0.326	O610009D07Rik	RIKEN cDNA 0610009D07 gene Gene	ENSMUSG00000037361	M200006613
819	0.325	Nefl	neurofilament, light polypeptide Gene	ENSMUSG00000022055	M200000742
820	0.325	Atpif1	ATPase inhibitory factor 1 Gene	ENSMUSG00000054428	M400004809
821	0.324	Odc1	ornithine decarboxylase, structural 1 Gene	ENSMUSG00000011179	M300001129
822	0.324	Phlda1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 Gene	ENSMUSG00000020205	M200001196
823	0.323	AC151732.2		ENSMUSG00000069962	M400005977
824	0.323	Pafah1b3	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha 1 subunit Gene	ENSMUSG00000005447	M200000211
825	0.321	AC123752.8		ENSMUSG00000078291	M400006353
826	0.320	Cxadr	coxsackie virus and adenovirus receptor Gene	ENSMUSG00000022865	M400013381
827	0.319	Cgref1	cell growth regulator with EF hand domain 1 Gene	ENSMUSG00000029161	M200014182
828	0.318	Ndufa4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4 Gene	ENSMUSG00000029632	M200013792
829	0.318	Hist2h2ac	histone cluster 2, H2ac Gene	ENSMUSG00000068855	M400012323
830	0.316	Gpr17	G protein-coupled receptor 17 Gene	ENSMUSG00000052229	M300020359
831	0.316	Nkiras2	NFKB inhibitor interacting Ras-like protein 2 Gene	ENSMUSG00000017837	M300001613
832	0.316	Sh3bgrl3	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein-like 3 Gene	ENSMUSG00000028843	M200004332
833	0.315	2010317E24Rik	RIKEN cDNA 2010317E24 gene Gene	ENSMUSG00000026955	M400000976
834	0.315	Ccna2	cyclin A2 Gene	ENSMUSG00000027715	M300005764
835	0.314	Numbl	numb-like Gene	ENSMUSG00000063160	M400011088
836	0.314	Dok4	docking protein 4 Gene	ENSMUSG00000040631	M200013028
837	0.313	Pcdhgc4	protocadherin gamma subfamily A, 11 Gene	ENSMUSG00000023036	M400009080
838	0.312	Lrrtm1	leucine rich repeat transmembrane neuronal 1 Gene	ENSMUSG00000060780	M200004818
839	0.312	AC175032.1-203	Transmembrane protein C10orf57 homolog	ENSMUSG00000072676	M200016354
840	0.312	Alpk1	alpha-kinase 1 Gene	ENSMUSG00000028028	M400005807
841	0.312	Isoc1	isochorismatase domain containing 1 Gene	ENSMUSG00000024601	M400000763
842	0.312	Ngef	neuronal guanine nucleotide exchange factor Gene	ENSMUSG00000026259	M200009440
843	0.311	Mem6	minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000026355	M200002043
844	0.311	Atox1	ATX1 (antioxidant protein 1) homolog 1 (yeast) Gene	ENSMUSG00000018585	M300001695
845	0.310	Uhrf1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1 Gene	ENSMUSG00000001228	M400011084
846	0.309	Gnb2	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 2 Gene	ENSMUSG00000029713	M200006860
847	0.309	Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3 Gene	ENSMUSG00000026688	M300005240
848	0.309	Mycn	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian) Gene	ENSMUSG00000037169	M200003436
849	0.308	Smarcd3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3 Gene	ENSMUSG00000028949	M200009308
850	0.308	F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor Gene	ENSMUSG00000048376	M300019182
851	0.307	Cdc20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000006398	M300000799
852	0.307	Sirt2	sirtuin 2 (silent mating type information regulation 2, homolog) 2 (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000015149	M200005063
853	0.306	Nipsnap3a	nipsnap homolog 3A (C. elegans) Gene	ENSMUSG00000015247	M200008035
854	0.305	Casp3	caspase 3 Gene	ENSMUSG00000031628	M400010978
855	0.305	Cpne6	copine VI Gene	ENSMUSG00000022212	M200002222
856	0.303	Ppp1r14b	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B Gene	ENSMUSG00000056612	M400005565
857	0.302	CT010471.11		ENSMUSG00000063180	M400008351
858	0.302	Meis2	Meis homeobox 2 Gene	ENSMUSG00000027210	M400000987
859	0.299	Fabp7	fatty acid binding protein 7, brain Gene	ENSMUSG00000019874	M400000340
860	0.299	Rasgef1b	RasGEF domain family, member 1B Gene	ENSMUSG00000029333	M300006616
861	0.298	Lhx2	LIM homeobox protein 2 Gene	ENSMUSG00000000247	M200009425
862	0.298	Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N Gene	ENSMUSG00000021091	M300002557
863	0.296	Scn3b	sodium channel, voltage-gated, type III, beta Gene	ENSMUSG00000049281	M400012915
864	0.296	Sfrp1	secreted frizzled-related protein 1 Gene	ENSMUSG00000031548	M400013755
865	0.293	Gata3	GATA binding protein 3 Gene	ENSMUSG00000015619	M200000214
866	0.293	Pgls	6-phosphogluconolactonase Gene	ENSMUSG00000031807	M200006491
867	0.292	Mcts2	malignant T cell amplified sequence 2 Gene	ENSMUSG00000042814	M400011498
868	0.292	Cdca3	cell division cycle associated 3 Gene	ENSMUSG00000023505	M200004327
869	0.292	Tmem176b	transmembrane protein 176B Gene	ENSMUSG00000029810	M200005978
870	0.288	AC115045.13	Transmembrane protein 176A (Kidney-expressed gene 2	ENSMUSG00000023367	M200005402

			protein)(Gene signature 188)		
871	0.288	Igsf3	immunoglobulin superfamily, member 3 Gene	ENSMUSG00000042035	M400002573
872	0.288	Tmem179	transmembrane protein 179 Gene	ENSMUSG00000054013	M400004673
873	0.287	Snx26	sorting nexin 26 Gene	ENSMUSG00000036882	M300010599
874	0.287	Mki67	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67 Gene	ENSMUSG00000031004	M200001580
875	0.287	Fkbp1b	FK506 binding protein 1b Gene	ENSMUSG00000020635	M200003910
876	0.285	Myod1	myogenic differentiation 1 Gene	ENSMUSG00000009471	M200000620
877	0.284	Hap1	huntingtin-associated protein 1 Gene	ENSMUSG00000006930	M200002975
878	0.284	Lphn1	latrophilin 1 Gene	ENSMUSG00000013033	M300001207
879	0.283	Blvrb	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH)) Gene	ENSMUSG00000040466	M400011885
880	0.282	AC166102.2	Hematological and neurological expressed 1-like protein (HN1-like protein)	ENSMUSG00000024165	M400000721
881	0.280	Gsto1	glutathione S-transferase omega 1 Gene	ENSMUSG00000025068	M200000102
882	0.280	Sulf2	sulfatase 2 Gene	ENSMUSG00000006800	M300000855
883	0.280	Timp2		ENSMUSG00000017466	M300001586
884	0.279	Hmgn2	high mobility group nucleosomal binding domain 2 Gene	ENSMUSG00000003038	M400000066
885	0.278	Ndufc2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2 Gene	ENSMUSG00000030647	M400001304
886	0.277	Lmo3	LIM domain only 3 Gene	ENSMUSG00000030226	M400001240
887	0.276	Panx1	pannexin 1 Gene	ENSMUSG000000031934	M200009383
888	0.275	6330527O06Rik	RIKEN cDNA 6330527O06 gene Gene	ENSMUSG00000027270	M400011677
889	0.274	Gpc1	glypican 1 Gene	ENSMUSG00000034220	M400001663
890	0.271	Shroom2	shroom family member 2 Gene	ENSMUSG000000045180	M300016154
891	0.271	Pftk1	PFTAIRE protein kinase 1 Gene	ENSMUSG00000028926	M200002365
892	0.270	Hmgb2	high mobility group box 2 Gene	ENSMUSG000000054717	M400012694
893	0.270	Ifi203	interferon activated gene 203 Gene	ENSMUSG00000039997	M300005163
894	0.269	Zdhhc12	zinc finger, DHHC domain containing 12 Gene	ENSMUSG00000015335	M300001402
895	0.268	Tubb5	tubulin, beta 5 Gene	ENSMUSG00000001525	M300000203
896	0.268	Arhgdia	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha Gene	ENSMUSG00000025132	M200016277
897	0.267	Ptn	pleiotrophin Gene	ENSMUSG00000029838	M200001169
898	0.267	Ddah2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 Gene	ENSMUSG00000007039	M200000598
899	0.267	Tusc3	tumor suppressor candidate 3 Gene	ENSMUSG00000039530	M200015414
900	0.267	Hsbp1	heat shock factor binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000031839	M300007929
901	0.266	Serpine2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 2 Gene	ENSMUSG00000026249	M200001184
902	0.265	CT009486.7	Ferritin light chain 1 (Ferritin L subunit 1)	ENSMUSG00000062382	M400006088
903	0.262	Mycl1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian) Gene	ENSMUSG00000028654	M200000384
904	0.262	Rnd2	Rho family GTPase 2 Gene	ENSMUSG00000001313	M300000179
905	0.262	Nola3	nucleolar protein family A, member 3 Gene	ENSMUSG00000027133	M200005732
906	0.261	Nsg2	neuron specific gene family member 2 Gene	ENSMUSG00000020297	M300002118
907	0.259	Tspan6	tetraspanin 6 Gene	ENSMUSG00000067377	M400011324
908	0.259	Hes5	hairy and enhancer of split 5 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000048001	M300018827
909	0.258	Calm3	calmodulin 3 Gene	ENSMUSG00000019370	M300001785
910	0.258	Gng12	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12 Gene	ENSMUSG00000036402	M200013566
911	0.257	Marcks	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate Gene	ENSMUSG00000069662	M400012790
912	0.256	AC159001.2		ENSMUSG00000058777	M400008454
913	0.255	Tex14	testis expressed gene 14 Gene	ENSMUSG00000010342	M200008499
914	0.253	Fads2	fatty acid desaturase 2 Gene	ENSMUSG00000024665	M200008136
915	0.253	Bid	BH3 interacting domain death agonist Gene	ENSMUSG00000004446	M200007560
916	0.252	Hn1	hematological and neurological expressed sequence 1 Gene	ENSMUSG00000020737	M200000693
917	0.252	Pf4dn	prefoldin 4 Gene	ENSMUSG00000052033	M400003978
918	0.250	Apcdd1	adenomatous polyposis coli down-regulated 1 Gene	ENSMUSG00000071847	M300021469
919	0.249	Hint1	histidine triad nucleotide binding protein 1 Gene	ENSMUSG00000020267	M200000158
920	0.248	Fgf13	fibroblast growth factor 13 Gene	ENSMUSG00000031137	M200002625
921	0.244	Atp5k	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e Gene	ENSMUSG00000050856	M400010735
922	0.243	AC117232.3	40S ribosomal protein S26	ENSMUSG00000025362	M400000825
923	0.243	Rras2	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2 Gene	ENSMUSG00000055723	M400005273
924	0.242	Fzd2	frizzled homolog 2 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000050288	M200016293
925	0.241	Ccnd2	cyclin D2 Gene	ENSMUSG00000000184	M200001209
926	0.239	Rps20	ribosomal protein S20 Gene	ENSMUSG00000028234	M400011542
927	0.238	8030462N17Rik	RIKEN cDNA 8030462N17 gene Gene	ENSMUSG00000047466	M400012487
928	0.238	Tcf7l2	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box Gene	ENSMUSG00000024985	M400009143
929	0.237	Prc1	protein regulator of cytokinesis 1 Gene	ENSMUSG00000038943	M400009510
930	0.236	Gng2	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2 Gene	ENSMUSG00000043004	M300014088
931	0.234	Cst3	cystatin C Gene	ENSMUSG00000027447	M200001658

932	0.233	6720460F02Rik	RIKEN cDNA 6720460F02 gene Gene	ENSMUSG00000020808	M200004319
933	0.233	Id3	inhibitor of DNA binding 3 Gene	ENSMUSG00000007872	M200000033
934	0.233	Hoxb6	homeo box B6 Gene	ENSMUSG00000000690	M200000081
935	0.233	Tubb2b	tubulin, beta 2b Gene	ENSMUSG00000045136	M200012963
936	0.232	Crabp1	cellular retinoic acid binding protein I Gene	ENSMUSG00000032291	M200007659
937	0.227	Cenpj	centromere protein J Gene	ENSMUSG00000064128	M300012555
938	0.222	Spc25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae) Gene	ENSMUSG00000005233	M300000653
939	0.221	Pld3	phospholipase D family, member 3 Gene	ENSMUSG00000003363	M200002371
940	0.221	Tpbp	trophoblast glycoprotein Gene	ENSMUSG00000035274	M300009824
941	0.220	Npnt	nephronectin Gene	ENSMUSG00000040998	M400014702
942	0.220	Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha Gene	ENSMUSG00000020914	M200001651
943	0.218	Ckap2l	cytoskeleton associated protein 2-like Gene	ENSMUSG00000048327	M200014321
944	0.217	Sh3gl3	SH3-domain GRB2-like 3 Gene	ENSMUSG00000030638	M300007341
945	0.217	Tuba1a	tubulin, alpha 1A Gene	ENSMUSG00000072235	M400011156
946	0.216	Dbn1	drebrin 1 Gene	ENSMUSG00000034675	M200003719
947	0.214	Idh1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble Gene	ENSMUSG00000025950	M200002837
948	0.213	Rprm	reprimin, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate Gene	ENSMUSG00000075334	M400011438
949	0.213	Tmeff1	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1 Gene	ENSMUSG00000028347	M200013742
950	0.210	Ly6h	lymphocyte antigen 6 complex, locus H Gene	ENSMUSG00000022577	M300003390
951	0.208	Maged2	melanoma antigen, family D, 2 Gene	ENSMUSG00000025268	M200004435
952	0.205	Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2 Gene	ENSMUSG00000027996	M400010896
953	0.203	Cdc2a	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe) Gene	ENSMUSG00000019942	M300001903
954	0.201	Nkd1	naked cuticle 1 homolog (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000031661	M200006903
955	0.197	Rps5	ribosomal protein S5 Gene	ENSMUSG00000012848	M200002233
956	0.192	Pbk	PDZ binding kinase Gene	ENSMUSG00000022033	M300003073
957	0.189	Hmgb3	high mobility group box 3 Gene	ENSMUSG00000015217	M300001378
958	0.189	Ptpro	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 15 Gene	ENSMUSG00000030223	M300007079
959	0.187	Grem2	gremlin 2 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis) Gene	ENSMUSG00000050069	M200005192
960	0.187	Pcsk9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 Gene	ENSMUSG00000044254	M300015282
961	0.185	Rab3b	RAB3B, member RAS oncogene family Gene	ENSMUSG00000003411	M200016300
962	0.184	Cd9	CD9 antigen Gene	ENSMUSG00000030342	M200001129
963	0.175	Nnat	neuronatin Gene	ENSMUSG00000067786	M400012513
964	0.172	Slc17a6	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 6 Gene	ENSMUSG00000030500	M200015295
965	0.171	Vash2	vasohibin 2 Gene	ENSMUSG00000037568	M300011001
966	0.167	Dynll1	dynein light chain LC8-type 1 Gene	ENSMUSG00000009013	M400011327
967	0.158	3110035E14Rik	RIKEN cDNA 3110035E14 gene Gene	ENSMUSG00000067879	M400012474
968	0.153	6330403K07Rik	RIKEN cDNA 6330403K07 gene Gene	ENSMUSG00000018451	M300001680
969	0.150	Tmsb4x	thymosin, beta 4, X chromosome Gene	ENSMUSG00000049775	M200009414
970	0.149	Ddc	dopa decarboxylase Gene	ENSMUSG00000020182	M200003183
971	0.145	Tubb2a	tubulin, beta 2a Gene	ENSMUSG00000058672	M400010936
972	0.140	Cdh13	cadherin 13 Gene	ENSMUSG00000031841	M200004974
973	0.134	Zcchc12	zinc finger, CCHC domain containing 12 Gene	ENSMUSG00000036699	M200013665
974	0.132	Sox4	SRY-box containing gene 4 Gene	ENSMUSG00000076431	M400010912
975	0.117	Stx1a	syntaxin 1A (brain) Gene	ENSMUSG00000007207	M200002322
976	0.116	Dpysl3	dihydropyrimidinase-like 3 Gene	ENSMUSG00000024501	M400014765
977	0.115	Arhgdig	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma Gene	ENSMUSG00000073433	M300003965
978	0.112	Dcx	doublecortin Gene	ENSMUSG00000031285	M200003157
979	0.105	Baspl	brain abundant, membrane attached signal protein 1 Gene	ENSMUSG00000045763	M300016694
980	0.105	Mfap4	microfibrillar-associated protein 4 Gene	ENSMUSG00000042436	M200006465
981	0.086	Ctxnl	cortixin 1 Gene	ENSMUSG00000048644	M300019424
982	0.079	Efcfbp2	N-terminal EF-hand calcium binding protein 2 Gene	ENSMUSG00000031837	M200009009
983	0.071	Marcks1l	MARCKS-like 1 Gene	ENSMUSG00000047945	M300018771
984	0.050	Gap43	growth associated protein 43 Gene	ENSMUSG00000047261	M300018113

EV = Expressionsverhältnis, (Tabelle aus Haag, Zipper et al. 2012)

**Tabelle S6. Differenziell exprimierte Gene in P9 Kleinhirnen von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>+/-</sup> vs. Wildtyp Mäusen.**

	EV	Symbol	Description	Ensembl ID	Oligo ID
1	3.694	Stmn1   Dlgap1	stathmin 1 Gene   discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1 Gene	ENSMUSG00000028832 ENSMUSG00000003279	M300006321
2	2.045	Hyou1	hypoxia up-regulated 1 Gene	ENSMUSG000000032115	M200008813
3	2.013	Sorl1	sortilin-related receptor, LDLR class A repeats-containing	ENSMUSG000000049313	M400003529
4	0.475	Mctp1	multiple C2 domains, transmembrane 1 Gene	ENSMUSG00000021596	M200011487
5	0.360	Agxt211	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1 Gene	ENSMUSG00000019232	M200006336

EV = Expressionsverhältnis, (Tabelle aus Haag, Zipper et al. 2012)

**Tabelle S7. Differenziell exprimierte Gene in P9 Kleinhirnen von *Ptch1*<sup>+/-</sup> *Nos2*<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp Mäusen.**

	EV	Symbol	Beschreibung	Ensembl ID	Oligo ID
1	13.371	Stmn1   Dlgap1	stathmin 1 Gene   discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 1 Gene	ENSMUSG00000028832   ENSMUSG00000003279	M300006321
2	4.042	Pomc	pro-opiomelanocortin-alpha Gene	ENSMUSG00000020660	M200004240
3	3.008	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial Gene	ENSMUSG00000029455	M200000997
4	2.442	Cit	citron Gene	ENSMUSG00000029516	M400016033
5	2.325	Uchl1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 Gene	ENSMUSG00000029223	M300006559
6	2.181	Ptch2	patched homolog 2 Gene	ENSMUSG00000028681	M200006050
7	2.167	Rusc2	RUN and SH3 domain containing 2 Gene	ENSMUSG00000035969	M300010178
8	2.108	Scn3a	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha Gene	ENSMUSG00000057182	M400000982
9	2.099	2610024B07Rik	RIKEN cDNA 2610024B07 gene Gene	ENSMUSG00000055593	M400005234
10	2.099	BC007180	BC007180 protein Fragment	ENSMUSG00000078161	M400004944
11	2.079	AC119876.9	Peroxisome assembly factor 1 (PAF-1)(Peroxin-2)(Peroxisomal membrane protein 3)	ENSMUSG00000040374	M300012630
12	2.061	Nova1	neuro-oncological ventral antigen 1 Gene	ENSMUSG00000053548	M400004507
13	2.045	Spsb2	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing	ENSMUSG00000038451	M200000999
14	2.004	Rutbc2	small G protein signaling modulator 1 Gene	ENSMUSG00000042216	M300013570
15	0.500	Blvrb	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH)) Gene	ENSMUSG00000040466	M400011885
16	0.496	Skp1a	S-phase kinase-associated protein 1A Gene	ENSMUSG00000036309	M300010327
17	0.495	0610040J01Rik	RIKEN cDNA 0610040J01 gene Gene	ENSMUSG00000060512	M200008012
18	0.490	Hmgn2	high mobility group nucleosomal binding domain 2 Gene	ENSMUSG00000003038	M400000066
19	0.487	Ddt	D-dopachrome tautomerase Gene	ENSMUSG00000001666	M200002268
20	0.483	Cntn2	contactin 2 Gene	ENSMUSG00000053024	M400004317
21	0.481	Syng1	synaptogyrin 1 Gene	ENSMUSG00000022415	M300003269
22	0.480	Tom1l2	target of myb1-like 2 (chicken) Gene	ENSMUSG00000000538	M400012183
23	0.478	Lypla2	lysophospholipase 2 Gene	ENSMUSG00000028670	M200007536
24	0.468	Zfp219	zinc finger protein 219 Gene	ENSMUSG00000049295	M400003527
25	0.424	Agpat1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha) Gene	ENSMUSG00000034254	M200002732
26	0.421	Hcn2	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 2	ENSMUSG00000020331	M200016228
27	0.371	Gpc1	glypican 1 Gene	ENSMUSG00000034220	M400001663
28	0.361	Lphn1	latrophilin 1 Gene	ENSMUSG00000013033	M300001207
29	0.335	Dlg4	discs, large homolog 4 (Drosophila) Gene	ENSMUSG00000020886	M400010772
30	0.335	Pcdhgc4	protocadherin gamma subfamily A, 11 Gene	ENSMUSG00000023036	M400009080
31	0.189	8030462N17Rik	RIKEN cDNA 8030462N17 gene Gene	ENSMUSG000000047466	M400012487
32	0.042	Gap43	growth associated protein 43 Gene	ENSMUSG000000047261	M300018113

EV = Expressionsverhältnis, (Tabelle aus Haag, Zipper et al. 2012)

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematische Darstellung des Shh-Signalweges in primären Zilien. ....	3
Abbildung 2. Duale Effekte von NO in der Karzinogenese. ....	10
Abbildung 3. Kreuzungsschema zum Erhalt der Genotypen <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/-</sup> und. ....	28
Abbildung 4. Verlaufsschema der chronischen UVB-Exposition zur Tumorinduktion. ....	29
Abbildung 5. H&E gefärbte histologische Schnittpräparate früher basaloider Proliferationen. .....	48
Abbildung 6. <i>Nos2</i> Defizienz steigert die Inzidenz von UVB-induzierten Basalzellproliferationen (BCPs). ....	49
Abbildung 7. <i>Ptch1</i> - Heterozygotie steigert die Inzidenz epithelialer Hauttumoren. ....	51
Abbildung 8. Histologische Merkmale unterschiedlicher Subtypen UVB-induzierter epithelialer Hauttumoren in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup> (A, C, E) und <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> (B, D, F) Mäusen. .....	52
Abbildung 9. <i>Nos2</i> Defizienz steigert die Inzidenz von BCC <sup>TB</sup> in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen. ..	53
Abbildung 10. Expression der Gene <i>Cox2</i> (A), <i>Nos2</i> (B), <i>Ptch1</i> (C), <i>Gli1/2</i> (D, E) und <i>N-Myc</i> (F) in rasierter Rückenhaul von Wildtyp-Mäusen. ....	55
Abbildung 11. Expression der Shh Zielgene <i>Ptch1</i> (A) und <i>Gli1</i> (B) in rasierter Rückenhaul von <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup> Mäusen. ....	56
Abbildung 12. Expression ausgewählter Shh-Zielgene in UVB-induzierten epithelialen Hauttumoren entsprechend des Genotyps ( <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup> versus <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> ) und der Histologie. ....	58
Abbildung 13. Deletion des Wildtyp- <i>Ptch1</i> Allels in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> BCC <sup>TB</sup> . ....	59
Abbildung 14. Elektropherogramme von Sequenzanalysen des <i>Ptch1</i> Promotors nach Natriumbisulfitkonversion. ....	61
Abbildung 15. Methylierungsmuster der 5'-CpG Insel von <i>Ptch1</i> in 24 BCC <sup>TB</sup> , 3 BCC <sup>KT</sup> und 5 Proben nicht-neoplastischen Hautgewebes. ....	62
Abbildung 16. Beispiel für eine <i>Tp53</i> Mutationsanalyse mittels SSCP und Sequenzierung. ..	66
Abbildung 17. Expression von <i>Cckar</i> und <i>Skint9</i> in UVB-induzierten BCC <sup>TB</sup> in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup> versus <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	68
Abbildung 18. „Heat-maps“ der Expressionsdatensätze, die am stärksten mit den Phänotypen <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup> und <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> BCC <sup>TB</sup> korrelieren. ....	69
Abbildung 19. Reduzierte Anzahl CD3-positiver T-Zellen in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> BCC <sup>TB</sup> /BCPs. 71	
Abbildung 20. <i>Nos2</i> Defizienz steigert die Inzidenz spontaner Medulloblastome in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Mäusen. ....	72
Abbildung 21. Histologisches Erscheinungsbild der Medulloblastome von <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>+/+</sup> und <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> <i>Nos2</i> <sup>-/-</sup> Mäusen. ....	73
Abbildung 22. Expression Medulloblastom-relevanter Kandidatengene in <i>Ptch1</i> <sup>+/-</sup> Medulloblastomen. ....	75
Abbildung 23. Duplex-PCR-Analyse des <i>Cdkn2A</i> ( <i>p19</i> <sup>ARF</sup> ) Gens in murinen Medulloblastomen. ....	77
Abbildung 24. Ergebnisse der Microarray-basierten Genexpressionsanalysen an murinen Kleinhirngewebs- und Medulloblastomproben unterschiedlicher Genotypen. ....	79
Abbildung 25. Identifizierung des <i>Nos2</i> -regulierten Kandidatengens <i>Gap43</i> . ....	81
Abbildung 26. Charakteristika und funktionelle Auswirkungen von <i>Gap43</i> Expression in der Zellkultur. ....	83
Abbildung 27. Proliferation und Akkumulation von GCPs im postnatalen Kleinhirn. ....	85

Abbildung 28. Schematisch dargestellter hypothetischer Mechanismus, durch den die *Nos2* Defizienz in *Ptch1*<sup>+/-</sup> Mäusen die MB-Entstehung fördert. .... 101

## 8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht über die verwendeten Antikörper. ....	20
Tabelle 2. Tumorproben für die molekulargenetischen Untersuchungen. ....	21
Tabelle 3. Chemikalien und Reagenzien. ....	23
Tabelle 4. Primersequenzen für qRT-PCR, Duplex-PCR und Genotypisierung. ....	24
Tabelle 5. Primersequenzen für die <i>Ptch1</i> Methylierungs- und Mutationsanalyse. ....	25
Tabelle 6. Primersequenzen, PCR- und Gelelektrophoresebedingungen für die SSCP/Heteroduplex-Analyse zur <i>Tp53</i> Mutationsanalyse. ....	26
Tabelle 7. Zusammenfassende Übersicht der Anzahl aufgrund von Komplikationen vorzeitig aus dem chronischen UVB-Versuch genommener Versuchstiere. ....	46
Tabelle 8. Anzahl von Basalzellproliferationen sowie Anzahl und Größe epithelialer Tumoren. ....	50
Tabelle 9. Genetische Veränderungen in den untersuchten epithelialen Hauttumoren. ....	64
Tabelle 10. Übersicht über die molekulargenetischen Veränderungen in den sechs untersuchten murinen Medulloblastomzelllinien. ....	77

## 8.5 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Guido Reifenberger, dass er mir die Chance gegeben hat, als einer Mutter von drei Kindern im Halbtageinsatz die vorliegende spannende und äußerst vielfältige Doktorarbeit zu gestalten. Er hat mir stets Freiraum für eigene Ideen und Forschungsansätze gewährt, Zeit für wissenschaftliche Diskussion eingeräumt und das Vertrauen geschenkt, trotz noch unvollendeter Dissertation die Arbeiten medizinischer Doktoranden/innen zu betreuen. An zweiter, aber nicht weniger bedeutender Stelle möchte ich Frau Dr. Marietta Wolter danken, ohne die zum einen eine Anstellung am Institut für Neuropathologie und somit auch die Anfertigung dieser Arbeit gar nicht erfolgt wäre, zum anderen für die tatkräftige Unterstützung, sowohl labor- und methodentechnischer Art, als auch im Hinblick auf die Ordnung und Korrektur meiner oft verworrenen und sprunghaften Gedanken und Ideen. Mein besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. Julia Reifenberger, die mich in die Diagnostik von Hauttumoren und Nahttechniken kompetent eingewiesen und während meiner Arbeit ständig begleitet und unterstützt hat. Ebenfalls danken möchte ich meinem Zweitgutachter, Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther für die naturwissenschaftliche Begutachtung meiner Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft während der Seminare am Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere. Und ein besonders großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Daniel Haag vom DKFZ in Heidelberg, der die praktische Durchführung und statistische Analyse der Microarray-Expressionsdaten für mich gemacht hat und mir stets viel Zeit und Geduld bei der Erklärung biomathematischer Sachverhalte geschenkt hat. Weiterhin habe ich das Glück, ein paar wirklich nette medizinische Doktoranden/innen, Herrn Dr. Frank Grünheck und Frau Özlem Bolat an meiner Seite zu haben, die meine Arbeit zum einen bei den molekulargenetischen Untersuchungen der Medulloblastome ergänzen konnten und mir zum anderen das Gefühl geben, einen Teil meiner wissenschaftlichen und menschlichen Erfahrungen sinnvoll und produktiv weitergeben zu können. Loben möchte ich auch die Vertreterinnen des Frauenbüros am NPI Frau Dr. Kerstin Kaulich, Frau Dr. Daniela Karra, Frau Dr. Ana-Maria Florea, Frau Dr. Natalie Schmidt und Frau Dr. Franziska Liesenberg, sowie die ehemalige Kollegin und Kollegen Frau Dr. Viola Westrich, Herr Dr. Peter Roerig und Herr Dr. Jörg Van den Boom für ihren ständigen Rat, ihre Hilfsbereitschaft und den Spaß, den wir miteinander hatten. Allen anderen Mitgliedern des NPI, einschließlich der

neurodegenerativen Arbeitsgruppen, den beteiligten Mitarbeitern der TVA Düsseldorf und unseren Kooperationspartnern aus der Pharmakologie (Herr Dr. Guang Dai, Herr Dr. Till Freudenberger und Frau Dr. Katharina Röck) sei ebenfalls gedankt für ihre Hilfsbereitschaft und die schöne Promotionszeit.

Ganz besonders danken möchte ich auch meiner Familie, die die lange Zeit des allmorgendlichen und Wochenenden füllenden Zusammenschreibens dieser Arbeit geduldet und ermöglicht hat, insbesondere meinem Mann, Herrn Frank Zipper, der sich mit viel Engagement um die Formatierung der vorliegenden Arbeit gekümmert hat.