

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med G. Reifenberger

**Molekulargenetische Analyse der Gene *GLI1*, *GLI2*,
GLI3, *BTRC* und *IGF2* in Medulloblastomen und
Basalzellkarzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Klaus Christian Scharwächter

2006

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan**

**Referent: Univ.-Prof. Dr. med Reifenberger
Koreferent: Priv. Doz. Dr. med Sabel**

**Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in den folgenden Originalarbeiten
veröffentlicht:**

Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T, Reifenberger G (2005) Somatic Mutations in the *PTCH*, *SMOH*, *SUFUH* and *TP53* genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 152:43-51.

Wolter M, Scharwächter C, Reifenberger J, Koch A, Pietsch T, Reifenberger G (2003) Absence of detectable alterations in the putative tumor suppressor gene *BTRC* in cerebellar medulloblastomas and cutaneous basal cell carcinomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 106:287-90.

1	Einleitung	1
1.1	Das Medulloblastom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Klinik und Makroskopie	2
1.1.4	Histologie	2
1.1.5	Therapie und Prognose	3
1.1.6	Molekulargenetik	3
1.2	Das Basalzellkarzinom	4
1.2.1	Epidemiologie	4
1.2.2	Ätiologie	5
1.2.3	Klinik und Makroskopie	5
1.2.4	Histologie	6
1.2.5	Therapie und Prognose	6
1.2.6	Molekulargenetik	7
1.3	Das Basalzellnävussyndrom (Goltz-Gorlin-Syndrom)	8
1.4	Der Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweg	8
1.4.1	Der Hedgehog Signaltransduktionsweg in <i>Drosophila</i>	8
1.4.2	Der Shh Signaltransduktionsweg beim Menschen	11
1.4.2.1	Das Shh Protein	11
1.4.2.2	Das Ptch Protein	12
1.4.2.3	Das Smoh Protein	13
1.4.2.4	Die Proteine Gli1, Gli2 und Gli3	13
1.4.2.5	Das Btrc (β -transducin repeat-containing) Protein	15
1.4.2.6	Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor Igf2	16
1.5	Aufgabenstellung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Tumormaterial und Blut	19
2.2	cDNA Synthese	20
2.3	Polymerasekettenreaktion	21
2.4	Agarosegelelektrophorese	22
2.5	SSCP/Heteroduplexanalyse	24
2.6	DNA-Sequenzierung	25
2.6.1	Vorbereitung der Proben	25
2.6.1.1	Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese	25
2.6.1.2	Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Exonuclease/Phosphatase-Behandl.	26
2.6.2	Sequenzierungsreaktion	26
2.6.3	Fällen des Sequenzierungsproduktes	27
2.6.4	Automatische Sequenzierung	27
2.7	Expressionsanalyse	29
2.7.1	Differentielle Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	29
2.7.2	Auswertung	30

3	Ergebnisse	31
3.1	Mutationsanalyse von <i>GLI1</i>	31
3.1.1	Neuer Polymorphismus in der Promotorregion von <i>GLI1</i>	31
3.1.2	Neue Polymorphismen in der Zink-Finger-Region von <i>GLI1</i>	31
3.2	Expressionsanalysen von <i>GLI2</i> , <i>GLI3</i> und <i>IGF2</i>	37
3.2.1	Expressionsanalyse von <i>GLI2</i>	37
3.2.2	Expressionsanalyse von <i>GLI3</i>	39
3.2.3	Expressionsanalyse von <i>IGF2</i>	41
3.3	Mutationsanalyse von <i>BTRC</i>	43
4	Diskussion	47
4.1	Untersuchungen an <i>GLI1</i> , <i>GLI2</i> und <i>GLI3</i>	47
4.1.1	Ergebnisse der Mutationsanalyse von <i>GLI1</i>	49
4.1.2	Funktionelle Bedeutung der verschiedenen Gli Proteine	50
4.1.3	Ergebnisse der Expressionsanalysen von <i>GLI2</i> und <i>GLI3</i>	52
4.2	Ergebnisse der Mutations- und Expressionsanalyse von <i>BTRC</i>	55
4.3	Ergebnisse der Expressionsanalyse von <i>IGF2</i>	57
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	61
7	Abkürzungsverzeichnis	71
8	Lebenslauf	72

1 Einleitung

1.1 Das Medulloblastom

1.1.1 Epidemiologie

Das Medulloblastom ist der häufigste bösartige Hirntumor im Kindesalter mit einer Inzidenz von ca. 0,5/100000 bei Kindern unter 15 Jahren. Der Altersgipfel liegt bei 7 Jahren, 70% der Tumoren manifestieren sich vor dem 16. Lebensjahr. Nach der 5. Lebensdekade treten Medulloblastome nur noch in seltenen Einzelfällen auf. Medulloblastome machen lediglich 1% der Hirntumore von Erwachsenen aus (101). Es findet sich eine Bevorzugung des männlichen Geschlechts von etwa 65% (136).

Medulloblastome sind maligne, invasiv wachsende Tumoren des Cerebellums. Mindestens 75% der Medulloblastome sind im Vermis lokalisiert, insbesondere in seinen hinteren, unteren Anteilen und reichen in den vierten Ventrikel hinein. Je älter die Patienten bei Diagnosestellung sind, umso größer wird der Anteil von Lokalisationen in den Kleinhirnhemisphären. Bei 30% der Patienten liegen bei Diagnosestellung bereits Liquormetastasen vor. Spontane extraneurale Metastasen sind sehr selten. Durch intraoperative Eröffnung von Blutgefäßen und hämatogene Verschleppung von Tumorzellen wurde jedoch in Einzelfällen eine iatrogene Fernmetastasierung beobachtet (136).

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Medulloblastoms beim Menschen ist in den meisten Fällen unklar. In Tierversuchen können Medulloblastome durch intracerebrale Injektion onkogener Viren, z. B. des JC-Virus, oder durch retrovirale Transfektion mit dem onkogenen SV40 großen T Antigen induziert werden, beim Menschen spielen onkogene Viren jedoch wahrscheinlich keine Rolle (128). Auch eine ursächliche Bedeutung von chemischen Kanzerogenen ist beim Menschen bislang nicht gesichert (87). Medulloblastome zeigen eine Assoziation mit verschiedenen Tumorsyndromen. So kommen sie vermehrt beim Basalzellnävus-Syndrom und beim Turcot-Syndrom vor. Auch bei *Ataxia teleangiectatica* sowie in Verbindung mit renalen Rhabdoidtumoren oder Wilms Tumoren werden Medulloblastome gehäuft beobachtet (39, 136).

1.1.3 Klinik und Makroskopie

Klinisch stehen Zeichen des erhöhten intrakraniellen Drucks mit Kopfschmerzen und morgendlichem Erbrechen sowie einer Kleinhirntaxie im Vordergrund. Durch Verlegung des vierten Ventrikels kann es zu Liquorstau mit *Hydrozephalus internus occlusus* des dritten Ventrikels und der Seitenventrikel kommen. Makroskopisch zeigt sich ein variables Erscheinungsbild. In einigen Fällen können die Tumoren fest und gut abgrenzbar sein, meist jedoch sind sie weich und schlecht umschrieben. In einigen Fällen zeigen sich nekrotische oder hämorrhagische Areale unterschiedlicher Ausdehnung. Das vitale Tumorgewebe erscheint makroskopisch grau-weißlich. In der Computertomografie und Magnetresonanztomografie zeigt sich typischerweise eine solide Raumforderung mit starker Kontrastmittelaufnahme (101, 136).

1.1.4 Histologie

Das Medulloblastom gehört zu den embryonalen Tumoren des zentralen Nervensystems, deren Dignität gemäß der WHO Klassifikation der Tumoren des Nervensystems als bösartig, entsprechend dem WHO-Grad IV eingestuft wird (136). Es können verschiedene histologische Varianten unterschieden werden, insbesondere drei sind von Bedeutung.

a) *Klassische Medulloblastome*: Diese bestehen aus dicht an dicht liegenden, kleinen, runden bis ovalen Zellen mit hyperchromatischen Kernen. Manchmal bilden die Zellen kammartige Formationen aus. Neuroblastische Rosetten, so genannte Homer-Wright-Rosetten, sind typisch, aber nicht immer vorhanden. Mitosen werden häufig beobachtet, Apoptosen ebenso. Nekroseareale kommen in einem Teil der Tumoren vor. Andere histologische Befunde sind vaskuläre Proliferationen, Kalzifizierungen oder Hämorrhagien. In manchen Medulloblastomen lassen sich neuronale Differenzierungsmerkmale, seltener gliale Phänotypen feststellen. Retikulinfasern sind im Tumorgewebe nicht vermehrt (136).

b) *Desmoplastische Medulloblastome*: Histologisch handelt es sich bei dieser Variante um Tumoren, die aus zeldichten, retikulinfaserhaltigen Arealen und so genannten *pale islands*, d.h. retikulinfreien Abschnitten bestehen. In den *pale islands* finden sich gleichförmige Zellen, die mikroskopisch wie auch elektronenmikroskopisch an neurocytäre Zellen erinnern. Die retikulinfaserhaltigen, desmoplastischen Tumoranteile bestehen dagegen aus undifferenzierten neuroepithelialen Zellen mit hoher Proliferationsaktivität (136).

c) *Großzellige (anaplastische) Medulloblastome*: Diese Variante liegt in ca. 4% der Fälle vor und besteht vollständig oder teilweise aus relativ großleibigen Zellen mit vergrößerten Kernen und prominenten Nucleoli. Große nekrotische Areale, eine hohe Mitoseaktivität und eine hohe Apoptoserate sind typisch. Großzellige Medulloblastome sind besonders aggressiv und haben auch bei maximaler Therapie meist eine sehr ungünstige Prognose (87, 136).

1.1.5 Therapie und Prognose

Ohne Behandlung ist die Prognose aller Medulloblastome infaust. Sie führen dann innerhalb weniger Monate zum Tod. Die Therapie beruht auf der Totalexstirpation soweit möglich, hochdosierter Radiotherapie und adjuvanter Chemotherapie. Wegen des relativ hohen Risikos von spinalen Liquormetastasen wird das Rückenmark auch ohne nachgewiesene Metastasierung oft präventiv mitbestrahlt. Bei sehr jungen Patienten von unter drei Jahren wird auf eine Strahlentherapie verzichtet (101, 136).

Die 5-Jahres-Überlebensrate konnte durch verbesserte Therapie auf 60-70% gesteigert werden. Selbst bei makroskopischer Totalexstirpation treten jedoch in ca. 40% der Patienten Lokalrezidive auf. Extraneurale Filiae sind bei Medulloblastomen selten. Besonders schlechte Heilerfolge werden bei unvollständiger Extirpation, Liquormetastasierung bei Diagnosestellung und Alter unter drei Jahren sowie bei großzelligen Tumoren erreicht. Das Ausmaß der Zellproliferation und die Apoptoserate haben keine Bedeutung für die Prognose (101, 136). Die prognostische Bedeutung der zellulären Differenzierung wird kontrovers diskutiert. Ungünstig scheint eine Amplifikation der Protoonkogene *MYC* und *NMYC* zu sein, welche mit höherer Therapieresistenz einhergeht und vor allem bei großzellig anaplastischen Medulloblastomen gefunden wird (87). Ein Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity = LOH) für Allele auf 17p soll ebenfalls mit einer erhöhten Metastasierungsrate und schlechter Prognose assoziiert sein (101, 136).

1.1.6 Molekulargenetik

Die häufigste spezifische Veränderung ist ein chromosomaler Bruch in 17p, meist bei 17p11.2. In den meisten dieser Fälle resultiert daraus eine Isochromosomenbildung (*i(17q)*). Diese kann in etwa 70% der Tumoren nachgewiesen werden (63). In einem Teil der Fälle geht nur 17p verloren, oder es liegt eine Monosomie 17 vor (63, 87, 136). In 17p13.3 liegt der DNA Abschnitt für das *Hypermethylated in cancer (HIC-1)* –Gen, welches eine Rolle in Medulloblastomen spielen könnte. Ebenfalls in der Region überlappender Deletionen liegt das *ABR* Gen, dessen Funktion unklar ist. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um ein Tumorsuppressorgen für Medulloblastome handeln könnte (87).

Seltener liegt ein Verlust der Heterozygotie (LOH) von 8p, 16q oder 7q vor (141), in etwa 40% der Fälle wird ein LOH von 10q beschrieben (92, 141). Ein weiteres betroffenes Chromosom ist Chromosom 1. Hier gibt es ein breiteres Spektrum an Veränderungen als auf Chromosom 17. Deletionen, unbalancierte Translokationen oder Duplikationen wurden beschrieben. Dabei kommt es oft zu einer Trisomie 1q ohne Verlust des p-Armes (136). Fast alle anderen Chromosomen können ebenfalls von Veränderungen betroffen sein, allerdings wesentlich seltener (136). Für die Tumorentstehung von großer Bedeutung sind Veränderungen in Entwicklung-kontrollierenden Genen, besonders Genen des Sonic

Hedgehog Signaltransduktionsweges. Es wurden Mutationen im humanen Homolog des Segmentpolaritätsgens *patched* (*PTCH*) und dem humanen Homolog von *smoothend* (*SMOH*) entdeckt (63, 87, 88, 96, 134), sowohl in desmoplastischen, wie in klassischen Formen. Der Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweg im allgemeinen, sowie die Bedeutung der einzelnen Komponenten, insbesondere die des Transkriptionsfaktors Gli, wird im Abschnitt 1.4 ausführlich erklärt. Es konnte des Weiteren eine Beteiligung des Wnt Signalweges in Form von Mutationen in β -Catenin und in *APC* in ca. 13% der sporadischen Medulloblastome nachgewiesen werden (41, 63). Die *PAX*-Genfamilie von Transkriptionsfaktoren, insbesondere *PAX 5* und *PAX 6* werden verstärkt exprimiert und könnten ebenfalls an der Medulloblastomentstehung beteiligt sein (136). In einigen Arbeiten wird die Hypothese formuliert, dass ein LOH von 17p mit Inaktivierung von *HIC-1* dabei zu klassischen und anaplastischen Medulloblastomen führen soll, während ein LOH von 9q22 mit *PTCH* Inaktivierung zur desmoplastischen Variante führen soll (87, 88, 105).

1.2 Das Basalzellkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Basalzellkarzinom (BCC) ist ein semimaligner Tumor der Haut, der lokal infiltrierend und destruierend wächst, aber nur in Ausnahmefällen metastasiert (91). Basalzellkarzinome sind die häufigsten Tumoren des Menschen. Ihre Häufigkeit ist allerdings starken lokalen Schwankungen unterworfen. Die Morbidität liegt z. B. in England bei etwa 110/100000, in Australien um etwa den Faktor 20 höher. Bevorzugt betroffen sind hellhäutige Menschen der Hauttypen I und II, der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 6. bis 8. Lebensjahrzehnt. Es besteht keine Geschlechtsbevorzugung (54, 67, 91). Epidemiologische Studien zeigen, dass auslösende Schädigungen jedoch bereits in relativ jungem Alter eintreten, so übernehmen Menschen, die vor ihrem 18. Lebensjahr von England nach Australien umziehen, das erhöhte australische Risiko, wenn sie nach dem 18. Lebensjahr auswandern, behalten sie dagegen das niedrigere englische Risiko (54, 67). Basalzellkarzinome treten ausschließlich auf behaarter Haut auf, Prädilektionsstelle ist dabei das Gesicht. In 80% der Fälle manifestieren sie sich oberhalb einer Verbindungslinie vom Mundwinkel zum unteren Ohransatz, hier besonders an der Nase. In abnehmender Häufigkeit folgen Rumpf, unteres Gesichtsdrittel und übrige Hautareale (91).

1.2.2 Ätiologie

Durch epidemiologische Studien wurden zahlreiche Risikofaktoren festgestellt. So zum Beispiel Hauttypen I und II (hellhäutige Menschen), Arbeiten im Freien, niedrige soziale Klasse und Basalzellkarzinom(e) in der Familienanamnese (40, 55, 121). Bei familiärer Belastung treten die Tumoren dabei oftmals signifikant früher im Leben auf als bei sporadischen Fällen. Basalzellkarzinome treten zu 80% in chronisch lichtexponierten Arealen auf (40, 55, 121). Hieraus wird als prädisponierender Faktor neben einer genetischen Belastung die Sonnenlichteinstrahlung deutlich, wobei insbesondere dem UVB Anteil des Lichtes (290 – 320nm) eine wesentliche Rolle zukommt. Aber auch nach anderer UV-Belastung wie zum Beispiel bei PUVA Therapie erhöht sich das Basalzellkarzinomrisiko (55). Die Auswirkungen der UV-Strahlen auf die Zelle sind dabei vielfältig. So wird durch die Absorption von UV Photonen das DNA Molekül in einen Erregungszustand versetzt, infolge dessen durch Umstrukturierung von Elektronen ein Photoprodukt entsteht, z. B. ein Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer oder ein Pyrimidin-Pyrimidon (6-4)-Photoprodukt. Wenn Photoprodukte unrepariert bleiben, führen sie zu Veränderungen der Basenabfolge, bei UVB Strahlung typischerweise zu einem C⇒T, oder CC⇒TT Austausch. Außerdem induziert UV Strahlung eine relative kutane Immunsuppression (10, 34). Auch eine durch andere, auch iatrogene Ursachen hervorgerufene Immunsuppression stellt einen Risikofaktor dar. So zeigen sich z. B. bei Transplantationspatienten vermehrt Basalzellkarzinome, immunsupprimierte Patienten haben insgesamt ein vierfach erhöhtes Basalzellkarzinomrisiko (40, 55). Ein weiterer Risikofaktor sind ionisierende Strahlen, z. B. bei Röntgen- oder Kobalttherapie, die nach einer Latenzzeit von bis zu etwa 20 Jahren zur Basalzellkarzinomentstehung führen können. Als chemisches Karzinogen ist Arsen bekannt, was zu Basalzellkarzinomentstehung auch an nicht sonnenexponierten Arealen (wie auch zu zahlreichen anderen inneren Neoplasien) führen kann. Alle diese Faktoren haben eine Latenzzeit von 10 bis 30 Jahren (40, 55).

1.2.3 Klinik und Makroskopie

Basalzellkarzinome entwickeln sich gewöhnlich auf makroskopisch normal aussehender Haut ohne Tumorstufen. Sie zeichnen sich durch ein langsames Wachstum aus. Anfänglich deutet oft eine linsengroße, durch Kratzen oder Rasieren mit einer kleinen Blutkruste überzogene, grauweiße Induration mit einzelnen Teleangiektasien auf ein Basalzellkarzinom hin. Basalzellkarzinome zeichnen sich durch eine große klinische und histologische Variationsbreite aus. Am häufigsten kommt mit ca. 50% das noduläre Basalzellkarzinom vor. Es ist klinisch durch einen unscharf begrenzten, kuppelartigen Tumor von wachsartiger, glasiger Farbe und derber Konsistenz gekennzeichnet. Typisch sind ein

perlartiger Randsaum und Teleangiektasien sowie eine zentrale Einsenkung. Im Verlauf kann es zur Ulzeration kommen. Die extremen Varianten des ulzerierten Basalzellkarzinoms stellen das *Ulcus rodens* und das *Ulcus terebrans* dar. Hierbei ist das Tumorgewebe nicht mehr auf das Korium beschränkt, sondern setzt sich destruierend in die Tiefe fort. Dabei kommt es zur Zerstörung sämtlicher Gewebe und dadurch insbesondere im Gesicht zu erheblichen Verstümmelungen. Arrosionsblutungen sind häufig. Durch Eröffnung der Schädelhöhle können in Einzelfällen meningeale Komplikationen auftreten. Auch in diesem Stadium kommt es gewöhnlich nicht zu Metastasierung. Neben dem nodularen Basalzellkarzinom stellen das sklerodermiforme und das superfizielle Basalzellkarzinom die häufigsten übrigen klinischen Subtypen dar. Das sklerodermiforme Basalzellkarzinom zeichnet sich durch eine ausgeprägte fibromatöse Reaktion des bindegewebigen Stromas aus. Es stellt sich als unscharf begrenzte, narbige, gelbliche Plaque dar, welche zentral erhaben oder auch atrophisch sein kann. Es besteht eine Tendenz zur Infiltration von tiefer gelegenen Strukturen. Das superfizielle Basalzellkarzinom imponiert klinisch als unregelmäßig geformte, scharf abgegrenzte rötlich-bräunliche Plaque, welche teilweise von kleinen Schuppen oder Krusten überzogen ist. Eine Pigmentierung kann ebenfalls vorkommen. Das Wachstum ist langsamer als das der übrigen Subtypen, sie ulzerieren nie (67, 91).

1.2.4 Histologie

Histologisch lassen Basalzellkarzinome entsprechend ihrer Abstammung aus der äußeren Haarwurzelscheide Ähnlichkeit zu den Haarfollikeln erkennen (82). Sie beginnen als haarkeimartiges Zellnest, welches im weiteren Verlauf zunächst endo-, später exophytisch wächst. Durch die Beziehung zur Basalmembran werden die peripheren Tumorzellen palisadenartig angeordnet, während die Zellen im Inneren regellos liegen. Die Zellen erinnern aufgrund ihres großen ovalen und stark basophilen Zellkerns an normale Basalzellen der Epidermis. Das mesodermale Stromagewebe kann durch Wechselwirkungen zu den Tumorzellen proliferieren und das Tumorgewebe strangförmig zergliedern, dieses Erscheinungsbild ist typisch für das sklerodermiforme BCC. Die Epidermis über dem Tumor ist meist atrophisch oder ulzeriert. Das superfizielle BCC zeigt zwischen Inseln normaler Haut nur kleine, knospenförmige Tumorzellnester, welche lediglich das obere Korium infiltrieren (82, 85, 91).

1.2.5 Therapie und Prognose

Die am häufigsten angewandte Therapie ist die Exzision, möglichst mit 0,5 cm Sicherheitsabstand und histologischer Schnittrandkontrolle. Bei alten Patienten stellt eine lokale Strahlentherapie eine Alternative dar. Des Weiteren ist eine Kryotherapie oder eine

photodynamische Therapie möglich (91). Einen neuen Therapieansatz stellt die lokale Immuntherapie mit dem topischen Immunmodulator Imiquimod dar, welcher eine starke zelluläre Immunantwort auslöst (114). Nachkontrollen finden nach 2, 6, 12 Monaten und dann in jährlichem Abstand statt. Die Heilerfolge bei primären Basalzellkarzinomen liegen bei 95–99%, bei Rezidiven bei 90% (91).

1.2.6 Molekulargenetik

Mutationen im *TP53*-Tumorsuppressorgen wurden in etwa 40% der Basalzellkarzinome gefunden (34). Das zugehörige p53-Protein spielt eine zentrale Rolle für die zelluläre Antwort auf eine DNA Schädigung, wo es schnell im Nukleus akkumuliert und eine Verzögerung des Zellzyklus in der G1 Phase auslöst. Dadurch wird Zeit für die DNA Reparatur gewonnen. Bei nicht mehr reparabler DNA kann durch p53 Apoptose ausgelöst werden. In fast der Hälfte aller menschlichen Neoplasien finden sich *TP53*-Mutationen (33, 90, 143). Bei den meisten Tumoren ist ein *TP53*-Allel von einer Mutation betroffen während das andere Allel durch eine chromosomale Deletion verloren gegangen ist (6, 10). In Basalzellkarzinomen findet sich dagegen nach eigenen Untersuchungen nur in 8 Prozent eine biallelische *TP53* Inaktivierung (95). Die Familie der *RAS*-Protoonkogene kodiert G-Proteine, die Guanosin-5'-triphosphat hydrolysieren und Zellsignale für viele Wachstumsfaktorrezeptoren vermitteln (34). Mutationen in *RAS*-Genen spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen und malignen Melanomen der Haut, in Basalzellkarzinomen ist die Bedeutung von *RAS*-Genmutationen umstritten. Während einzelne Autoren über UVB-typische Mutationen in *RAS*-Genen berichten (82, 122), ergaben eigene Analysen keine Mutationen in Basalzellkarzinomen (95).

Eine besondere Rolle in der Entstehung von Basalzellkarzinomen spielt der Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweg. Die Bedeutung seiner Komponenten, wie auch seine Funktion allgemein, werden in Kapitel 1.4 detaillierter erläutert. Sowohl für Patienten mit erblichem Basalzellnävussyndrom (35) als auch in der Mehrzahl der sporadischen Basalzellkarzinome finden sich Mutationen im *PTCH*-Tumorsuppressorgen, dem humanen Homolog des *Drosophila*-Gens *patched* (95, 134). Zusätzlich fanden sich auch im *SMOH*-Gen, das ein Transmembranprotein kodiert, welches mit Ptch interagiert (siehe unten), Mutationen bei sporadischen Basalzellkarzinomen (96). In Mausexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass auch eine Überexpression von Sonic Hedgehog (Shh) in Keratinozyten zur Induktion von Basalzellkarzinomen führen kann (81).

1.3 Das Basalzellnävussyndrom (Goltz-Gorlin-Syndrom)

Das Basalzellnävus- oder Goltz-Gorlin-Syndrom ist ein autosomal-dominant vererbtes Tumor- und Fehlbildungssyndrom. Es ist durch das Auftreten multipler Basalzellkarzinome der Haut bereits in jungen Jahren charakterisiert. Außerdem haben die Patienten eine Prädisposition für verschiedene benigne (z. B. Ovarialfibrome) und maligne Tumoren, insbesondere Medulloblastome (in ca. 5% der Fälle). Zusätzlich liegen Fehlbildungen vor, wobei besonders häufig Kieferzysten, Rippenanomalien, palmoplantare Grübchen und Verkalkungen der Falx cerebri beobachtet werden (39, 93).

Als Ursache der Erkrankung sind Keimbahnmutationen im *PTCH*-Tumorsuppressorgen beschrieben worden, welches auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q22) liegt und das humane Homolog des Segmentpolaritätsgens *patched* in *Drosophila* darstellt (35, 39, 49, 93, 112). Wie bereits erwähnt, konnten Mutationen in *PTCH* und weitere Veränderungen im Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweg (siehe Kapitel 1.4) auch in sporadischen Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen nachgewiesen werden (96, 134).

1.4 Der Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweg

Dieser Signaltransduktionsweg ist einer der fundamentalen Signaltransduktionswege für die Entwicklung des Embryos. Er ist verantwortlich für die Gestaltung des sich entwickelnden Neuralrohres, des Achsenskelettes, der Gliedmaßen, der Lunge, der Haut, der Haare sowie der Zähne. Veränderungen in einigen der an ihm beteiligten Gene sind bereits als Auslöser für verschiedene Syndrome und Tumorerkrankungen beschrieben worden, welche später in diesem Abschnitt noch detailliert dargestellt werden (16). Viele der bisherigen Erkenntnisse wurden aus Studien an der Taufliege *Drosophila* gewonnen und viele der Kernelemente sind in Vertebraten konserviert (130). Es soll daher zunächst kurz der Hedgehog Signaltransduktionsweg der Fliege umrissen werden.

1.4.1 Der Hedgehog Signaltransduktionsweg in *Drosophila*

In der Fruchtfliege übernimmt der Hedgehog Signaltransduktionsweg die Kontrolle einiger entscheidender Entwicklungsprozesse, wie zum Beispiel das Wachstum und den strukturellen Aufbau des Flügels. Es dient dabei der Spezifizierung von Zellen entlang der anterior – posterioren Grenze (38, 65, 102). Anders als bei Vertebraten, wo verschiedene

Hedgehogproteine bekannt sind (Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh), Desert Hedgehog (Dhh)), gibt es bei *Drosophila* nur ein Hedgehog Protein, welches die Entwicklungsprozesse kontrolliert. Es wurde 1980 zunächst als eines der Segmentpolaritätsgene beschrieben, bei dessen Mutation das Muster und die Polarität der Larvenssegmente gestört ist (78). Bei homozygoten Hedgehog Mutanten wird die Larvenhülle „cuticle“ umhüllt von dornartigen Fortsätzen, die „denticles“ genannt werden (70), was zur Namensgebung (Hedgehog = Igel) führte. Hedgehog ist ein sekretiertes, hormonartiges Protein, welches autokatalytisch gespalten wird, wodurch das aktive N-terminale Fragment frei wird. Dieses wird durch Anlagerung eines Cholesterolemoleküls an sein C-terminales Ende modifiziert (130). Der Signalweg wird aktiviert, indem Hedgehog an seinen Rezeptor Patched (Ptc) bindet. Patched ist ein Transmembranprotein, das zusammen mit Smoothend (Smo) einen Rezeptorkomplex an der Zellmembran bildet. In Abwesenheit von Hedgehog (siehe auch Abb. 1) inhibiert Patched das Smo Protein. Bindet Hedgehog an Patched (siehe auch Abb. 2), entfällt die Inhibition von Smo und es kommt zur Weiterleitung des Signals über einen mikrotubuli-assoziierten Proteinkomplex, bestehend aus den Proteinen Fused (Fu), Costal2 (Cos2), Suppressor of Fused (Sufu) und Cubitus Interruptus (Ci¹⁵⁵). Ci¹⁵⁵ wird hierbei gespalten, die transkriptionshemmende Form Ci⁷⁵ wird freigesetzt. Dieser fehlt die Bindungsstelle für das Creb-Bindungsprotein (CBP), die am C-terminalen Ende liegt. Durch die Proteinkinase A (Pka) vermittelte Phosphorylierung von Ci¹⁵⁵ wird die Spaltung unterstützt. Wenn Hh an Ptc bindet führt die daraus resultierende Aktivierung von Smo zu einer Lösung des Fu-Cos2-Ci Komplexes von den Mikrotubuli durch Phosphorylierung von Cos2 und Fu. Die Spaltung von Ci¹⁵⁵ wird verhindert. Ci¹⁵⁵ diffundiert in den Nukleus und aktiviert die Transkription von Wg, Ptc und Decapentaplegic (Dpp), einem TGFβ-Signalprotein, in Assoziation mit CBP. Anders als bei Vertebraten, wo auch die Ci-homologe Gli Transkription Hh abhängig ist, wird in *Drosophila* Ci posttranskriptional gesteuert (4, 2, 46, 50). Ptc, Smo, Ci und Fu steuern die Hh Aktivität in allen bisher untersuchten Prozessen, und zwar über ein Gleichgewicht zwischen transkriptionsaktivierenden (Ci¹⁵⁵) und – unterdrückenden (Ci⁷⁵) Formen von Ci (29). Ptc kontrolliert seine eigene Transkription, in Abwesenheit von Hh liegen nur geringe Mengen *PTC* RNA vor, da die *PTC*-Transkription und Expression durch Ptc gehemmt wird. Nur in Anwesenheit von Hh kommt es zu einer Zunahme. Es entsteht so ein negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen Ci und Ptc, welcher durch Hh reguliert wird (1, 21, 38, 124). Diese Beziehung ist in Vertebraten konserviert, alle drei Hh Proteine induzieren hohe *PTCH* Level (29).

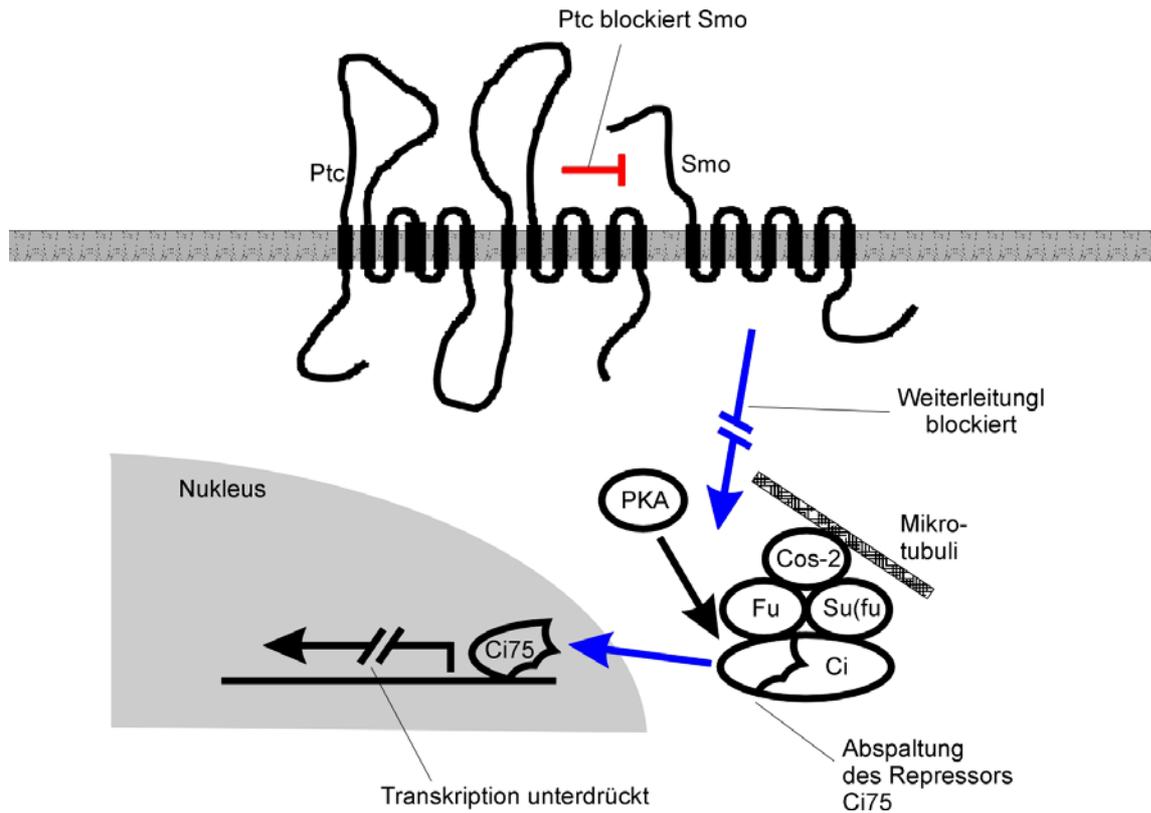


Abb. 1: Darstellung des Hh Signaltransduktionsweges ohne Aktivierung durch Hh (in Anlehnung an Referenz 2 und 50).

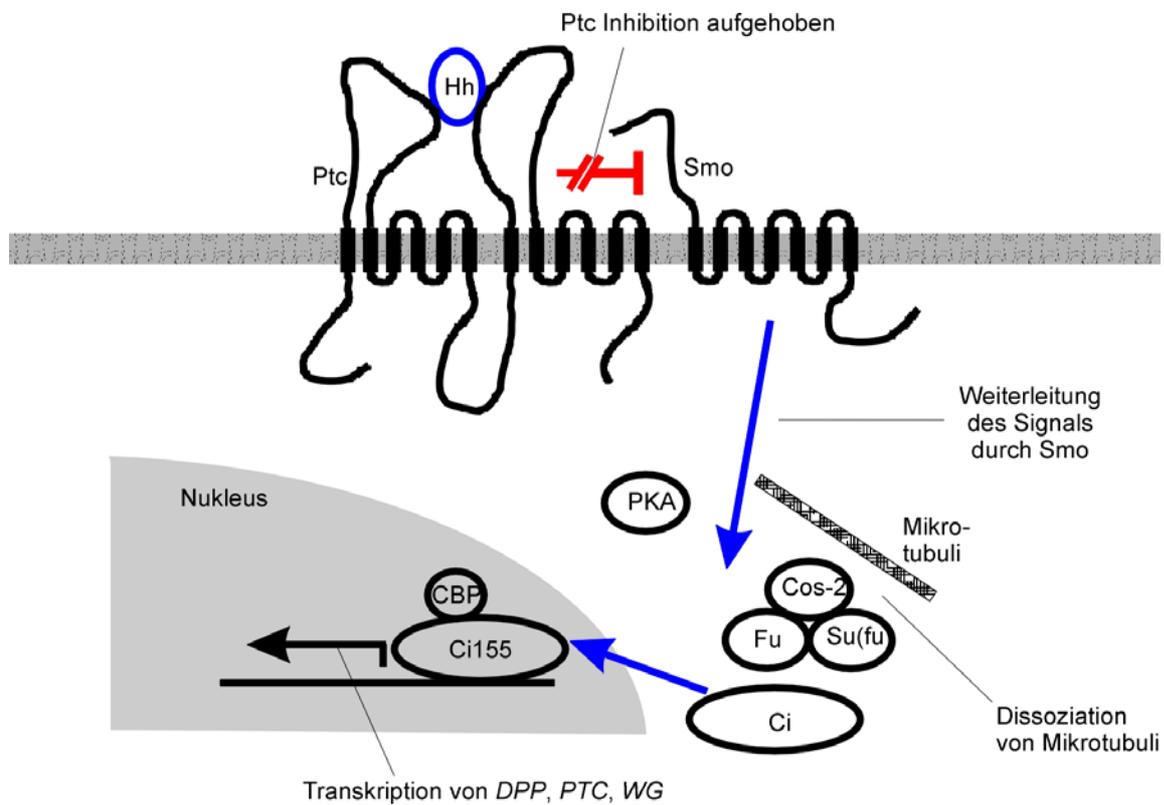


Abb. 2: Darstellung des Hh Signaltransduktionsweges mit Aktivierung durch Hh (in Anlehnung an Referenz 2 und 50).

1.4.2 Der Shh Signaltransduktionsweg beim Menschen

Die bereits erwähnten drei Hedgehogproteine der Vertebraten, Shh, Ihh und Dhh, können alle über denselben Signaltransduktionsweg agieren. Sie regulieren die Entwicklung der unterschiedlichen Organe durch ihr jeweils spezifisches Expressionsmuster. Dhh und Ihh sind im Wesentlichen verantwortlich für die Entwicklung der Keimbahn und des Skelettsystems, Ihh insbesondere auch für die Entwicklung der Talgdrüsen. Die Expression von Sonic Hedgehog ist bei Vertebraten am weitesten verbreitet, außerdem ist es das potenteste Hedgehogprotein (16). Seine Komponenten und deren Funktionen sollen im Einzelnen erläutert werden.

1.4.2.1 Das Shh Protein

Das *SHH* Gen ist auf Chromosom 7q36 lokalisiert (7). Das Sonic Hedgehog Protein wird ähnlich wie Hh durch das C-terminale, katalytisch wirkende Ende posttranslational durch Selbstspaltung gespalten. Durch die Anlagerung von Cholesterol an das N-terminale Fragment (Shh-N) entfaltet Shh seine Aktivität, indem es an den Transmembranrezeptor Ptch bindet (16, 51, 99). Es spielt eine entscheidende Rolle als Mediator für die Zone der Zellpolarisierung in den sich entwickelnden Extremitäten und wird in weiten Teilen des sich entwickelnden Zentralnervensystems, der Lunge, des Darms, der Zähne und der Haarfollikel exprimiert (22, 118, 130). So wird Shh beispielsweise im Notochord produziert und induziert die Bodenplattenentwicklung und später die Differenzierung von ventralen Neuronen inklusive den dopaminergen Neuronen. Auch für das Wachstum und den Aufbau des Kleinhirns ist in Purkinje Zellen produziertes Shh mitverantwortlich, indem es die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen in der äußeren Körnerschicht induziert. Auf der anderen Seite bewirkt es die Differenzierung von Bergmanngliazellen, die das Wachstum der Zellen der äußeren Körnerschicht hemmen (18). Der Shh Transport über größere Entfernungen findet dabei über verschiedene Mechanismen statt. Es konnte eine Shh Polymerform nachgewiesen werden, über die ein Langstreckentransport des Signals per Diffusion möglich ist (142). Die Langstreckenübermittlung wird auch durch Shh Bindung an das Protein Dispatched (Disp) ermöglicht. Dispatched ist ein Protein mit zwei Domänen für die Hh-Bindung. Das zugehörige Gen liegt auf 1q42 (16, 142). Megalin ist ein Rezeptor, der zur Gruppe der LDL Lipoproteine gehört. Shh bindet an Megalin mit hoher Affinität. Möglicherweise wird über Megalin vermittelte Endozytose die Shh Konzentration an der Zelloberfläche reguliert. Multimeres Shh könnte des Weiteren über Megalin transportiert werden (16).

Die Aktivität von Shh kann durch zwei Proteine, Hedgehog-Interacting Protein (Hip) (15) und Growth arrest specific 1 (Gas1) (56), inhibiert werden. Hip ist ein membranständiges Glycoprotein, welches Shh, wie auch Dhh und Ihh bindet, und damit ihre Ausbreitung

verringert (15). Gas1 ist ein 45 kDa Glycophosphatidylinositol-gekoppeltes Protein, welches ebenfalls die Ausbreitung von multimerem Shh einschränkt.

Eine fehlerhafte Shh Funktion bewirkt schwere Entwicklungsstörungen. So entwickelt sich in Mäusen ohne Shh Funktion die Bodenplatte nicht (13). Shh war das erste entdeckte Holoprosenzephalie auslösende Gen. Es konnten zwei Mutationen gefunden werden, bei denen die Shh Funktion verloren geht (7, 99). Die Gruppe der Holoprosenzephalien bezeichnet Defekte in der Prächordalplatte, welche zu kombinierten Gesichts- und Gehirnehlbildungen führen. Inzwischen wurden weitere Gene beschrieben, deren Mutation zur Holoprosenzephalie führen kann. Diese spielen entweder direkt im Shh-Signaltransduktionsweg eine Rolle (*PTCH*, *GLI2*) oder sind eng mit diesem verknüpft (*TDGF1*, *TGIF*, *FAST1*, *ZIC2*, *DHCR7*) (16). Umgekehrt führt die Überexpression von Shh zu einem ähnlichen Symptomenkomplex, wie bei Missense-*PTCH* Mutationen (s. u.). Transgene Mäuse, die Shh in der Haut überexprimieren, entwickeln multiple Basalzellkarzinome (23, 81). Beim Menschen kommt es zu Skelettveränderungen, wie Lippen-Kiefer-Gaumenspalten oder zusätzlichen Fingern und Zehen (16).

1.4.2.2 Das Ptch Protein

Das *PTCH*-Gen ist auf Chromosom 9q22.3 lokalisiert. Es kodiert für ein Rezeptorprotein mit 12 Transmembrandomänen, zwei großen extrazellulären und einer kleineren intrazellulären Domäne (26, 49). Der Proteinaufbau erinnert an ein Kanalprotein, es wurde allerdings keine Transportfunktion festgestellt. Ptch bindet Shh und die beiden anderen Hedgehogproteine mit relativ hoher Affinität mittels der zwei extrazellulären Domänen (25, 61). Ähnlich den Verhältnissen in *Drosophila* wird das Shh Signal über einen Ptch-Smoh Rezeptorkomplex weitergeleitet, wobei Smoh (s. u.) in Abwesenheit von Shh durch Ptch inhibiert wird (75). Für den genauen Hemmungsmechanismus gibt es verschiedene Modelle. Es könnte ein Ptch-Smoh Komplex vorliegen, in dem Smoh durch Konformationsänderung aktiviert wird, die durch die Bindung von Shh an Ptch induziert wird. Alternativ könnte Shh eine Dissoziation von Smoh aus dem Ptch-Smoh Komplex bewirken. Ptch könnte Smoh alternativ auch durch ein Intermediärprotein hemmen oder Ptch könnte Smoh katalytisch hemmen (16, 115). Für eine nichtstochiometrische (indirekte) Smoh-Hemmung durch Ptch spricht die Entdeckung, dass ein Verhältnis von Ptch zu Smoh von 1:45 bereits zu einer 80 prozentigen Hemmung von Smoh führt (115).

Sind die beiden großen extrazellulären Domänen von Ptch von einer Mutation betroffen, kann keine Shh Bindung stattfinden und es kommt zu einer konstitutiven Hemmung von Smoh. Ist das C-terminale Ende von einer Mutation betroffen, findet keine Hemmung von Smoh durch Ptch statt, auch unabhängig von einer Bindung von Shh (16). Es konnte gezeigt werden, dass *PTCH* Keimbahnmutationen die Ursache des Goltz-Gorlin Syndroms darstellen

(35, s. oben). In einem erheblichen Anteil sporadischer Basalzellkarzinome und bei Medulloblastomen (26, 88, 134), sowie bei Meningeomen, Fibrosarkomen, ovariellen Fibromen, Rhabdomyosarkomen und kardialen Fibromen wurden somatische *PTCH* Mutationen nachgewiesen (16, 130). Inzwischen konnte ein *PTCH* Homolog, *PTCH2*, identifiziert werden, dass auf 1p32–p34 lokalisiert ist. Das zugehörige Protein weist ebenfalls die für die Shh Bindung nötigen zwei extrazellulären Domänen auf, wird embryonal jedoch anders als *Ptch* exprimiert. Seine Funktion ist bis heute unklar (16). In sehr seltenen Fällen wurden Mutationen von *PTCH2* in Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen berichtet (109).

1.4.2.3 Das Smoh Protein

Das *SMOH*-Gen ist auf Chromosom 7q32 lokalisiert (96, 138). Es kodiert für ein Protein mit sieben Transmembrandomänen, welches strukturell an die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren erinnert. Dessen Funktion innerhalb des Signaltransduktionsweges ist die Weiterleitung des Hh Signals in das Zellinnere (75,130). Dafür sind besonders die dritte intrazelluläre Schleife sowie die siebte Transmembrandomäne wichtig. Die Interaktionen zwischen *Ptch* und *Smoh* werden vor allem durch das Cystein-reiche N-terminale Ende von *Smoh* bedingt (16, 130). Wie bereits erwähnt, ist der genaue Interaktionsmechanismus zwischen *Ptch* und *Smoh* noch Gegenstand der Diskussion.

Auch *Smoh* spielt in der molekularen Pathogenese von bestimmten Tumoren eine Rolle. So finden sich in ca. 10% der Basalzellkarzinome somatische Mutationen im *SMOH*-Gen, in der Mehrzahl der Fälle ist das so genannte hot spot codon 535 betroffen (138). Es handelt sich um eine aktivierende Mutation, welche zusammen mit dem Adenovirus E1A embryonale Rattenfibroblasten transformieren kann und in der Haut transgener Mäuse basalzellkarzinomartige Tumoren induziert (138). Aktivierende *SMOH* Mutationen führen, ähnlich wie inaktivierende *PTCH* Mutationen, zu einer Hochregulation der Shh Zielgene. Derartige Mutationen wurden außer in sporadischen Basalzellkarzinomen (96) auch in Medulloblastomen (96, 138) beschrieben.

1.4.2.4 Die Proteine Gli1, Gli2 und Gli3

Im Gegensatz zur Fruchtfliege sind bei Vertebraten nicht nur ein, sondern drei cubitus interruptus homologe Proteine, Gli1 – Gli3 bekannt. Die Aktivierung der Shh Zielgene erfolgt durch einen Synergismus von Gli1, Gli2 und Gli3. Für Gli2 und Gli3 wurden sowohl transkriptionsaktivierende wie auch -unterdrückende Domänen gefunden, in Gli1 dagegen nur -aktivierende (64). Es gilt als gesichert, dass Gli2 und Gli3 die Hauptmediatoren des Shh Signals im Zellkern sind (5, 62, 66, 73, 86, 130). Die Vermittlung des Signals wird jedoch noch durch externe Faktoren beeinflusst. So konnte ähnlich wie in *Drosophila* z. B. für den

humanen Suppressor of Fused gezeigt werden, dass er die transkriptionelle Aktivierung durch Gli1 durch Sequestrierung im Zytoplasma verhindern kann (20, 113).

Das menschliche *GLI1* Gen wurde zuerst als amplifiziertes Gen in Gliomen beschrieben (52). Es ist auf Chromosom 12q13 lokalisiert, erstreckt sich über ca. 13 kb genomische DNA und umfasst 12 Exone (16, 59). *GLI1* stellt den Prototyp für die Gli-Kruppel Genfamilie dar. Die entsprechenden Proteine sind charakterisiert durch eine konservierte Zink-Finger-Domäne, die aus fünf C₂-H₂ Zink-Fingern und einem konservierten Histidin-Cystein-Strukturmotiv besteht (139). Die Gli Zink-Finger-Domäne vermittelt die Anlagerung an die DNA am Basenpaarmotiv GACCACCCA (19, 59). Das Gli1 Protein umfasst 1106 Aminosäuren. Bisher sind zwei Isoformen bekannt (16). Das Protein wird keiner proteolytischen Spaltung unterzogen und weist keine Repressorfunktionen auf (16, 47). Während der Entwicklung kann Gli1 in vielen Geweben nachgewiesen werden, so z.B. im Gehirn in den anterioren und ventralen Anteilen des Telenzephalons, dem ventralen Mesenzephalon und dem sich entwickelnden Plexus choroideus, des Weiteren in der Haut, wie auch im Rippenmesoderm, und der mesodermalen Schicht des Gastrointestinaltraktes (16, 42, 59). Nach Abschluss der Organentwicklung wurde es in der Haut im Bereich der äußeren Haarwurzelscheide nachgewiesen, während sich in der interfollikularen Epidermis keine Gli1 Expression findet (28). Ein Nachweis von Gli1 gelang des Weiteren im Hoden, im Myometrium und im Eileiter, bei Mäusen auch im Gehirn (16, 42, 59). *GLI1* wird einer post-transkriptionellen Regulation unterzogen, d. h. es konnten verschieden lange 5' untranslatierte Regionen nachgewiesen werden, wobei die kürzeren Transkripte für Proteine mit einer deutlich gesteigerten transkriptionellen Aktivität kodieren, während die längeren Transkripte für Proteinen mit geringerer Transkriptionsaktivität kodieren (127). Typischerweise lassen sich dabei die kürzeren Transkripte verstärkt in Basalzellkarzinomen nachweisen, die längeren verstärkt in gesundem Gewebe (127). Gli1 aktiviert als Transkriptionsfaktor Shh Zielgene. Dadurch kommt es u. a. zu einer proliferationsanregenden Wirkung, wie im ZNS von Mäusen gezeigt werden konnte (64). Die Funktionsweise von Gli1 im gesunden und kranken Organismus wird im Teil „Diskussion“, Abschnitt 4, noch näher dargestellt.

Das *GLI2*-Gen ist auf Chromosom 2q14 lokalisiert (16). Für das Gli2 Protein ist sowohl eine Aktivator-domäne im C-terminalen Fragment, als auch eine Repressor-domäne im N-terminalen Fragment beschrieben worden (104). Ein Protein ohne die N-terminale Hälfte imitiert dabei Shh-Effekte (104). Gli1 und Gli2 zeigen deutlich überlappende Funktionen (72, 83). In spinalen Motoneuronen induzieren Gli1 und Gli2 die Zelldifferenzierung, Gli2 mediiert dabei jedoch direkt das Shh Signal (44). Nach Aktivierung durch Shh wird Gli2 zur ventralen Spezifizierung des caudalen Neuralrohrs benötigt (73). Es scheint dabei als Regulator der Ptch und Gli1 Expression zu wirken (72). Es konnte gezeigt werden, dass Gli2 dabei am *GLI1* Promotor bindet (45). Transgene Mäuse mit Mutationen in Gli2 entwickeln keine

Bodenplatte (72) - ähnlich Mäusen ohne Shh Funktion (13) - und entwickeln Stenosen von Ösophagus und Trachea sowie eine Lungenhypoplasie (72). Mäuse mit *GLI1/GLI2* Doppelmutationen zeigen dabei im Vergleich zu Mäusen mit alleiniger *GLI2* Mutation einen noch wesentlich schwerer beeinträchtigten Phänotyp und sterben kurz nach der Geburt mit zahlreichen verschiedenen Defekten des ZNS und der Lungen (72, 83). Mutationen von *GLI2* wurden bei Patienten mit Holoprosenzephalie beschrieben (100). Ähnlich wie *SHH*^{-/-} mutante Mäuse unterliegen auch *GLI2*^{-/-} mutante Mäuse einer Störung der Haarfollikelentwicklung mit reduzierter Zellproliferation. Zusätzlich wird Shh erheblich überexprimiert. Umgekehrt löst eine *GLI2*-daueraktivierende Mutation bei *SHH*^{-/-} Mäusen Shh-abhängige Genexpression und Zellproliferation aus (66). Gli2 fällt also offenbar die entscheidende Funktion bei der Übermittlung des Shh Signals zu (5, 66, 72, 73). Die Analyse von vier verschiedenen Isoformen von Gli2, welche durch posttranscriptionelle Splicingprozesse entstehen, ergab dass insbesondere die *GLI2β* Form, welche eine Aktivator- aber keine Repressordomäne enthält, in Basalzellkarzinomen überexprimiert wird (120).

Das *GLI3*-Gen ist auf Chromosom 7p13 lokalisiert. Während Gli2 Shh-vermittelt zur ventralen Spezifizierung im caudalen Neuralrohr benötigt wird (s. o.), kann in mehr rostralen Regionen nur Gli3 die Entwicklung von ventralen Zellen in Abwesenheit von Gli2 vermitteln. Somit wird das Shh Signal durch unterschiedliche, sich jedoch überlappende Funktionen von Gli2 und Gli3 entlang der rostral-caudalen Achse des sich entwickelnden Neuralrohres mediiert (73, 86). Für dieses Genprodukt ist ein ähnlicher, das N-terminale Fragment einbeziehender Regulationsmechanismus wie für Gli2 beschrieben worden (104). Gli3 unterdrückt die Gli2 Funktionen als Repressor des Shh Weges jedoch (44). Gli3 Mutationen sind die Ursache für mehrere erbliche Syndrome. So werden das Greig Cephalopolysyndaktyliesyndrom (GCPS), das Pallister-Hall Syndrom (PHS), sowie die postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A) durch mutierte und verkürzte Formen von Gli3 ausgelöst, wobei bei GCPS der Abbruch am aminoterminalen Ende, bei PAP-A der Abbruch am carboxyterminalen Ende und bei PHS die Verkürzung zwischen den beiden anderen, direkt hinter dem Zink-Finger-Motiv liegt (8, 103, 139). Für das Greig-Syndrom wurden zusätzlich auch Punktmutationen, bei denen Gli3 seine Funktion einbüßt, gefunden (131). Gli3 wurde sowohl in gesunder Haut als auch in Basalzellkarzinomen nachgewiesen (32). Transgene Mäuse mit Gli3 Mutationen zeigen eine Polydaktylie und schwere Defekte im dorsalen ZNS (83).

1.4.2.5 Das Btrc (β-transducin repeat-containing) Protein

Das humane *BTRC* Gen liegt auf Chromosom 10q24 (14, 24), einer in Tumoren häufig deletierten Region. Das entsprechende Protein wurde ursprünglich als ein *Xenopus*-Protein identifiziert, dass die Auswirkungen einer *CDC15* Mutation in *Saccharomyces cerevisiae*

unterdrücken kann (110). Inzwischen sind auch Homologe für *Drosophila* (Slimb) und den Menschen (u.a. Btrc) identifiziert. Das menschliche und das Fliegenprotein sind zu 78% homolog (119). Slimb (supernumerary limbs) gehört zur Familie der „F-box/WD-repeat“ Proteine. Diese Proteinfamilie besteht aus konservierten, sich wiederholenden Einheiten, die normalerweise auf Trp-Asp (bzw. WD) enden. Sie können in allen Eukaryonten nachgewiesen werden, nicht aber in Prokaryonten. F-box/WD-repeat Proteine haben steuernde Funktionen, u. a. in der Zellteilung, der Transkription, der Transmembransignalübertragung und der mRNA Modifikation (76). In der Fruchtfliege hemmt Slimb sowohl den Wingless- als auch den Hedgehog Signaltransduktionsweg, indem es Armadillo und Cubitus interruptus im Cytoplasma bindet und deren Degradierung im Proteasom induziert. Armadillo (Arm), das *Drosophila*-Homolog von β -Catenin, wird durch Wingless stabilisiert. Bei einem Verlust des als Gegenpol wirkenden Slimb kommt es zu einer Akkumulation von Ci und Arm. Außerdem führt der Verlust von Slimb zu einer vermehrten Bildung von transkriptionell aktivem Ci. Slimb stellt damit für beide Signalwege einen negativen Regulator dar (48).

Wegen der Homologie zu Slimb ist eine ähnliche negative Regulation von Btrc durch Proteindegredierung innerhalb des Sonic Hedgehog Weges zu vermuten. Eine Störung würde zu einer Aktivierung des Sonic Hedgehog Weges führen, was, ähnlich wie aktivierende Mutationen in Smoh oder inaktivierende Mutationen in Ptch (s.o.), zu Tumoren führen könnte. *BTRC* ist also ein Kandidat für ein Tumorsuppressorgen.

1.4.2.6 Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor Igf2

Das *IGF2*-Gen, das für den humanen Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor 2 (Igf2) kodiert, ist auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert (79). Normalerweise liegt beim Menschen, wie auch bei Mäusen, das maternale Allel in den meisten Geweben nach Abschluß der Entwicklung „*imprinted*“ vor, das heißt, es ist durch eine DNA-Methylierung transkriptionell inaktiviert, so dass nur das paternale Allel transkribiert wird (79, 97). Igf2 spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung. So beeinflusst es die fetale Zellteilung und -differenzierung zahlreicher unterschiedlicher Zelltypen und gilt neben *WNT* und *PDGFR α* als eines der Gli1 Zielgene, deren Transkription durch erhöhte Gli1 Level gesteigert ist (16). Eine Alteration dieser genetischen Prägung ist als Ursache für ein humanes fetales Wachstumssyndrom, das Beckwith-Wiedemann Syndrom beschrieben worden, welches klinisch mit Gigantismus, Makroglossie und Exomphalus einhergeht. Eine Überexpression von Igf2 konnte des Weiteren in verschiedenen Tumoren, z.B. in Wilms-Tumoren (107), kindlichen adrenokortikalen Tumoren (132), Hepatoblastomen (31), kolorektalen Karzinomen (116), Meningeomen (74) und Rhabdomyosarkomen (37, 84) nachgewiesen werden. Als Ursache für diese Überexpression kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht:

(a) Transkriptionelle Aktivierung des maternalen Allels durch einen Verlust der genetischen Prägung, dem so genannten „*Loss of imprinting*“ (LOI) (69, 97). (b) Uniparenterale Disomie, d.h. Verdoppelung des väterlichen Allels bei Verlust des mütterlichen Allels. (c) Überexpression von *IGF2* durch einen aberrant aktivierten Signaltransduktionsweg (36). Gerade diese letzte Möglichkeit ist von Bedeutung für die eigene Arbeit. So wurde *IGF2* in Rhabdomyosarkomen als ein mögliches Zielgen des Shh Signaltransduktionsweges beschrieben (36).

1.5 Aufgabenstellung

Eine aberrante Aktivierung des Shh Signaltransduktionsweges konnte bereits in Basalzellkarzinomen der Haut, in primitiven neuroektodermalen Tumoren des ZNS (PNETs), sowie in verschiedenen anderen Tumoren nachgewiesen werden. In bisherigen Untersuchungen wurden als Auslöser der Fehlregulation in Basalzellkarzinomen und PNETs vor allem Mutationen in den beiden Transmembranproteinen Ptch und Smoh gefunden, die in einer konstitutiven Aktivierung der Transkription von Shh Zielgenen, wie z. B. *GLI1* und *PTCH*, resultieren. Ein Teil der Tumoren zeigt jedoch keine Veränderungen in diesen beiden Proteinen, obwohl eine vermehrte Expression der Shh Zielgene *GLI1* und *PTCH* vorhanden ist. Dies legt die Hypothese nahe, dass außer *PTCH* und *SMOH* Mutationen Veränderungen auch in anderen Genen des Shh Signalweges in einem Teil der Basalzellkarzinome und PNETs vorliegen könnten.

Die vorliegende Arbeit diene daher der Beantwortung der folgenden Fragen:

1. Ist die aberrante Aktivität des Shh Signaltransduktionsweges bzw. die verstärkte *GLI1* Expression in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen ohne inaktivierende *PTCH* oder aktivierende *SMOH* Mutationen möglicherweise durch aktivierende Mutationen in *GLI1* bedingt?
2. Zeigen Basalzellkarzinome und Medulloblastome Mutationen, Deletionen oder Verluste der Expression des *BTRC* Gens?
3. Finden sich in diesen Tumoren Veränderungen der Expression der Gene *GLI2* und *GLI3*?

4. Wie verhält sich die Expression von *IGF2* in diesen Tumoren, insbesondere im Vergleich zur Expression der *GLI* Gene und zu *PTCH* oder *SMOH* Mutationen? Stellt *IGF2* möglicherweise ein Shh Zielgen dar, das in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen ebenfalls hochreguliert ist?
5. Finden sich Unterschiede im Expressionsniveau der Gene *GLI2*, *GLI3* oder *IGF2* in Tumoren mit oder ohne nachgewiesene *PTCH* oder *SMOH* Mutationen?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde eine Serie von 17 PNETs (13 Medulloblastome und 4 supratentorielle PNETs) und 31 Basalzellkarzinomen auf Mutationen in *GLI1* und auf mRNA-Expression der Gene *GLI2*, *GLI3* und *IGF2* in Ergänzung zu bereits am gleichen Tumorkollektiv durchgeführten Mutationsanalysen von *PTCH* und *SMOH* und Expressionsanalysen von *GLI1* untersucht. Des Weiteren wurde ein größeres Tumorkollektiv von 66 PNETs (62 Medulloblastome und 4 supratentorielle PNETs) und 25 Basalzellkarzinomen auf Veränderungen im *BTRC* Gen hin untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Tumormaterial und Blut

Für die Mutationsanalysen von *GLI1* wurden 31 Basalzellkarzinome der Haut und 17 primitive neuroektodermale Tumoren des ZNS (PNETs) ausgewählt, darunter 13 Medulloblastome und 4 supratentorielle PNETs. Aus diesem Kollektiv wurden 22 Basalzellkarzinome und 15 PNETs für die Expressionsanalysen von *GLI2*, *GLI3* und *IGF2* verwendet. Die Tumoren stammten aus der Tumormaterialsammlung der Abteilungen für Neuropathologie und Dermatologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Tumorgewebe von 4 Medulloblastomen wurde freundlicherweise von Dr. C. Sommer, Abteilung für Neuropathologie der Universität Mainz, zur Verfügung gestellt. Das durchschnittliche Alter der PNET Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation 16,7 Jahre, der Median lag bei 11 Jahren mit einer Altersspanne von 6 Monaten bis 46 Jahren. Es handelte sich um 10 männliche und 7 weibliche Patienten. Alle Hirntumoren wurden nach der WHO-Klassifikation für Tumoren des Nervensystems eingeteilt (9).

Die Basalzellkarzinome stammten von 19 männlichen und 12 weiblichen Patienten. Keiner dieser Patienten hatte Anzeichen für ein nävoïdes Basalzellkarzinom-Syndrom (Goltz-Gorlin Syndrom). Das Durchschnittsalter der Patienten bei Operation betrug 74 Jahre, der Median ebenfalls 74 Jahre, bei einer Altersspanne von 33 bis 89 Jahren. Gewebeproben der zu untersuchenden Tumoren wurden direkt nach der Operation eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Um sicherzustellen, daß die Proben für die molekularen Analysen ausreichende Mengen an Tumorzellen enthalten, wurden die Proben der PNETs und der Basalzellkarzinome histologisch begutachtet und nur Proben mit einem Tumorgehalt von mehr als 80% für weitere Untersuchungen verwendet. Von 24 der 33 Basalzellkarzinompatienten stand zusätzlich Blut zu Verfügung, das ebenfalls bei -80°C gelagert wurde. Aus den tiefgefrorenen Tumorgeweben wurden mittels Ultrazentrifugation über einen Cäsiumchloridgradienten die Nukleinsäuren gewonnen, deren Konzentration spektrophotometrisch bestimmt wurde. Als Kontrolle für die Expressionsanalysen diente RNA aus Hautgewebe zweier gesunder Personen und nichtneoplastisches, postmortal gewonnenes Kleinhirngewebe zweier Erwachsener.

Für die Mutationsanalyse von *BTRC* stand zusätzlich ein Tumorkollektiv aus 51 PNETs zur Verfügung, welches freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Pietsch vom Institut für Neuropathologie der Universität Bonn zur Verfügung gestellt wurde. Es setzte sich aus 36

männlichen und 15 weiblichen Patienten zusammen. Die Altersspanne reichte von 1 bis zu 59 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 10,1 Jahre. Für die eigenen Untersuchungen standen bereits extrahierte und aufgereinigte DNA- und RNA-Proben zur Verfügung.

2.2 cDNA-Synthese

Diese Methode bedient sich der Reversen Transkriptase, einem Enzym viralen Ursprungs, mit dessen Hilfe mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden kann. Um die Synthese komplementärer DNA zu induzieren, benötigt die Reverse Transkriptase Oligonukleotide, die als sogenannte Primer an die DNA binden. Bei der in den eigenen Untersuchungen angewandten „*Random Priming*“-Methode werden als Primer kurze DNA-Hexamere unterschiedlicher Sequenz eingesetzt, die zufällig an die mRNA binden.

Für einen cDNA-Syntheseansatz wurden 3 µl RNA Lösung mit einer Konzentration von 1 µg/µl mit 3 µl DEPC-behandeltem *Aqua dest.* verdünnt, 5 min auf 70°C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt, um die RNA zu linearisieren. Zu jeder Probe wurden 42 µl des Reaktionsgemisches (siehe unten) hinzugegeben und das Gemisch bei 42°C für 3 min erwärmt. Dann wurden 2 µl der Reversen Transkriptase (SuperScript Reverse Transcriptase 200 U/µl, GIBCO BRL) zugegeben und für mindestens 2 h bei 42°C inkubiert.

Reaktionsgemisch:

- 0,4 µl 0,1 M DTT (GIBCO BRL)
- 1,0 µl RNasin (40000U/ml) (PROMEGA)
- 1,7 µl BSA (GIBCO BRL)
- 2,5 µl 25mM dNTP-Gemisch (SIGMA)
- 3,0 µl pd(N)₆ Hexamerprimer (1,5µg/µl)
- 10,0 µl 5xH-RT-Puffer (GIBCO BRL)
- 23,4 µl DEPC-behandeltes *Aqua dest.*

2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur gezielten Vervielfältigung von Nukleotidsequenzen. Dabei wird der natürliche Ablauf der semikonservativen Replikation *in vitro* vereinfacht nachempfunden. Anstatt wie *in vivo* die Doppelhelix über eine DNA-Helikase zu spalten, werden die Wasserstoffbrückenbindungen hier durch Erhitzen auf über 90°C denaturiert. Man verwendet im Weiteren sogenannte Primer, kurze Oligonukleotide, die als Startsignalstücke das zu amplifizierende DNA-Stück eingrenzen. Nach der thermischen Spaltung (*Denaturierung*) des DNA Doppelstranges hybridisieren die Starter-Oligonukleotide dann bei niedrigerer Temperatur an die freien Wasserstoffbrückenbindungen der Einzelstränge des komplementären DNA Bereiches („*Annealing*“), und zwar jeweils am 5' Ende jedes der beiden Stränge. Durch eine erneute Temperaturerhöhung kann eine im Ansatz enthaltene hitzestabile (*Taq*) Polymerase nach Ansatz am Primer als Start nun freie Nukleotide zur Synthese eines neuen Stranges verwenden („*Elongation*“). Alle DNA-Polymerasen können grundsätzlich nur freie Nukleotide mit einem basengepaarten Nukleotid verknüpfen, daher sind Primer notwendig. Des Weiteren kann die Polymerase den Strang nur in 3' Richtung verlängern. *In vivo* muß daher der sogenannte Folgestrang über Okazakistücke entgegen der Laufrichtung der Replikationsgabel synthetisiert werden. Da *in vitro* durch die Primer jeweils am 5' Ende gestartet wird und die Doppelhelix thermisch vollständig gespalten ist, kann der gewünschte Abschnitt beider Stränge an einem Stück synthetisiert werden. Durch Wiederholen des Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation gelingt es, ein beliebiges DNA Stück zu amplifizieren.

Nachfolgend soll ein typischer PCR-Ansatz dargestellt werden, wie er in den eigenen Untersuchungen verwendet wurde.

DNA-Matrize	1 µl (20 ng/µl)
10 X PCR-Puffer	2,5 µl
2 mM dNTPs	2,5 µl
10 pmol/µl je Primer	1,5 µl
50 mM MgCl ₂	0,75 µl
<i>Taq</i> DNA Polymerase 5 u/µl	0,2 µl
<i>Aqua dest.</i>	<i>ad</i> 25 µl

Die Matrizen-DNA wurde in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt. Dann wurden die PCR-Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in einem anderen Gefäß zusammenpipettiert, kurz gemischt, herunterzentrifugiert und zur Matrizen-DNA zugegeben.

Der Ansatz wurde sofort in die PCR-Maschine (BIOMETRA T3 Thermocycler) gesetzt und das Programm gestartet (siehe unten).

Um die Produktspezifität zu erhöhen, wurde für die Primer Gli 1 Prom1, Gli 1 Prom2, Gli 1 Prom3, Gli 1 ZiFi cDNA 2, Gli 1 ZiFi cDNA 3, Gli 1 ZiFi gen1 – Gli 1 ZiFi gen6, Gli Reg. IV, sowie für BTRC9 dem PCR-Ansatz 1 x Faktor Q (QIAGEN), sowie für den Primer Gli 1 ZiFi cDNA 1 5 % Formamid zugegeben.

PCR-Programm:

- | | |
|---------------------------|--|
| 1. Initiale Denaturierung | 95°C für 2 min |
| 2. Denaturierung | 95°C für 30 s |
| 3. Anlagerung | 54°C - 62°C für 30 s (abhängig vom verwendeten Primerpaar) |
| 4. Elongation | 72°C für 30 s |
| 5. Finale Elongation | 72°C für 2 min |
- Wiederholung
der Schritte 2-4 35 - 40x (abhängig vom verwendeten Primerpaar)

2.4 Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, bei dem man sich die Eigenschaft von geladenen Molekülen zunutze macht, in einem elektrischen Feld zu wandern. Man verwendet zwischen 1-3% Agarosegele als stationäre Phase (Trägermaterial) und trägt das (negativ geladene) PCR-Produkt in dafür vorgesehene Ladetaschen des Gels auf. Durch Versetzen des Gels mit Ethidiumbromid gelingt es, die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, da Ethidiumbromid in die Doppelhelixstruktur interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Durch Auftragen eines DNA-Markers mit Banden definierter Größe ist eine Beurteilung des PCR-Produktes hinsichtlich der Fragmentgröße möglich.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde zunächst die entsprechende Menge Agarose (SIGMA) abgewogen. Danach wurde diese mit dem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer versetzt und durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen der

Agaroselösung auf ca. 60°C wurde Ethidiumbromid hinzugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml), durch Schütteln vermischt und in den entsprechenden Gelträger mit Probenkamm eingefüllt. Nach vollständigem Aushärten des Gels (ca. 30 min) wurden die Probenkämme entfernt, das Gel mit dem Träger in eine mit 1x TAE Puffer gefüllte Gel-Kammer gelegt und die Proben aufgetragen. Es wurde hierbei jeweils 5 µl PCR-Produkt mit 4 µl 6 x Ladungspuffer auf einer Terasakiplatte vermischt und parallel zu einem DNA-Größenmarker (200 ng *peggold 100 bp DNA Leiter plus*; PEQLAB) aufgetragen (siehe auch Abb. 3). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 0,5 bis 1 V/cm Elektrodenabstand. Die Strecke, die die Proben im Gel zurücklegten, wurde anhand der Bromphenolblau- und Xylencyanol-Banden des Ladungspuffers abgeschätzt. Die Auswertung der Proben erfolgte unter UV-Licht. Die fotografische Dokumentation wurde mittels Gel Doc 1000 (BIORAD) und des Video Copy Processors (MITSUBISHI) unter Verwendung von Molecular Analyst Software (BIORAD) durchgeführt.

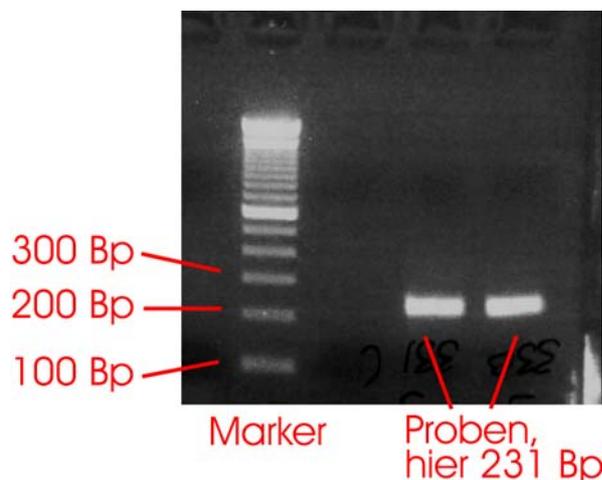


Abb. 3: Darstellung eines Agarosegels unter UV-Licht.

Rezepte für die verwendeten Puffer und Lösungen

1) 6 x Ladepuffer für Agarosegele:

- 30% Glycerin in *Aqua dest.*
- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylencyanol

2) 10 x - TAE Puffer:

- 400 mM Tris - Base
- 200 mM NaOAc
- 10 mM EDTA

2.5 SSCP/Heteroduplexanalyse

Die SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)/Heteroduplex-Analyse ist eine gelelektrophoretische Methode zum Nachweis von DNA-Mutationen. Sie beruht darauf, dass einzelsträngige DNA durch intramolekulare Wechselwirkungen komplexe Strukturen ausbildet, das heißt, sie liegt in einer für jede Sequenz spezifischen Konformation vor. Diese Konformation bedingt das Laufverhalten der Probe in einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel. Eine Mutation geht durch die Sequenzveränderung im Normalfall mit einer Konformationsänderung und damit mit einem aberranten Bandenmuster im Gel einher. Das Verfahren ist sehr empfindlich, durch Variation der Versuchsbedingungen, wie Gelzusammensetzung oder Lauftemperatur, kann die Nachweisempfindlichkeit weiter gesteigert werden. Alle Proben wurden daher sowohl bei Raumtemperatur wie auch bei 4°C überprüft. Man trägt für eine SSCP-Analyse amplifizierte, denaturierte DNA auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel auf. Ein Teil der Einzelstränge renaturiert spontan zu Doppelsträngen und wandert im elektrischen Feld schneller. Hybridisiert dabei ein Strang eines mutierten Allels mit dem komplementären Strang des Wildtypallels, entstehen dabei sogenannte Heteroduplexstränge, die in der Regel langsamer wandern, als die entsprechenden Homoduplices. Mittels einer Silberfärbung wird das Ergebnis sichtbar gemacht und im Gel fixiert. Auf dem fertigen Gel stellen sich die Banden der Einzelstränge in der Regel im oberen Bereich, die Doppelstrangbanden wegen ihres schnelleren Laufverhaltens im unteren Bereich dar. Das Bandenmuster ist jedoch neben der Sequenz stark abhängig von den Versuchsbedingungen. Abbildungen von SSCP-Gelen mit aberranten Bandenmustern sind im Ergebnisteil dargestellt.

Gelansatz und Versuchsaufbau

- (1) Gelansatz:
- 3 g Urea
 - 10 ml 30% 29:1 Polyacrylamidlösung (Acrylamid: N,N'-Methylenbisacrylamid, 3,3%) (BIORAD)
 - 3 ml 10 x TBE Puffer
 - 17 ml *Aqua dest.*
 - 65 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
 - 650 µl APS 5% (Ammoniumpersulfat)

(2) Die Lösung wurde blasenfrei zwischen 2 Glasplatten mit Abstandhalter gegossen, ein Kamm für die spätere Probenzugabe wurde oben eingesteckt. Nach vollständigem

Aushärten des Gels wurde der untere Abstandhalter und Kamm entfernt und das Gel samt Platten in die mit 1 x TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (WELABO) gespannt. Die zu testenden PCR-Produkte wurden mit Formamid-haltigem Ladungspuffer gemischt, zur Denaturierung ca. 10 min erhitzt und in die Probenaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120-140 V über Nacht. Nach Beenden des Laufs wurde das Gel nach Vorfixierung mittels 10% Ethanol und pH-Einstellung mit 1% HNO₃, mit 0,2% AgNO₃ und Entwicklerlösung (1,5% NaOH, 0,5% Formaldehyd) angefärbt und schließlich mit 0,75% Natriumcarbonat fixiert.

Rezepte für die verwendeten Lösungen

1) Ladepuffer für SSCP-Gele:

0,2 mg/ml Bromphenolblau/Xylencyanol (SIGMA)
80% Formamid

2) 10 x TBE Puffer:

900 mM Tris Base
900 mM Borsäure
20 mM EDTA

2.6 DNA-Sequenzierung

2.6.1 Vorbereitung der Proben

Vor der Sequenzierung (2.6.2) müssen zunächst überschüssige Primer und dNTPs aus der PCR-Reaktion entfernt werden. Dazu wurden zwei Verfahren verwendet:

2.6.1.1 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

Hierbei macht man sich die in einem Agarosegel (siehe 2.4) stattfindende elektrophoretische Auftrennung des PCR-Reaktionsgemisches in eine schneller laufende Primerwolke und eine langsamer laufende PCR-Produktbande zu nutze.

Der gesamte PCR-Ansatz (25 µl) wurde über ein 1 % Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende DNA-Bande ausgeschnitten. (1) Die Eluation der DNA erfolgte mit dem Jetsorb-Kit (GENOMED) nach Angaben des Herstellers: Zunächst wurde pro 100 mg ausgeschnittene Agarose 300 µl der Lösung L1 zugegeben. (2) Die Proben wurden für 15 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert bis die Agarose vollständig gelöst ist. (3) Dann wurde

der gesamte Ansatz in eine dafür vorgesehene Zentrifugiersäule pipettiert und (4) für 2 min bei 14000 g zentrifugiert. (5) Der Durchfluß wurde verworfen. (6) Im Anschluß wurden 700 µl der mit Ethanol versetzten Lösung L2 auf die Säule gegeben. (7) Nach 2 min Einwirkzeit wurde für 1 min bei 14000 g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. (8) Danach wurde die Säule bei 14000 g für 1 min trocken zentrifugiert, bevor (9) die DNA mit 30 µl 70-80°C warmen destillierten Wasser und 1 minütiger Zentrifugation ausgewaschen wurde. Die Qualität und Quantität der eluierten DNA wurde mit der in Kapitel 2.4 beschriebenen Methode überprüft. Bei zu niedriger DNA-Menge wurde eine Reamplifizierung durchgeführt (siehe 2.3) und das reamplifizierte PCR-Produkt wie oben beschrieben erneut aufgereinigt.

2.6.1.2 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Exonuclease/Phosphatase-Behandlung

Bei diesem Verfahren werden die überschüssigen Primer und dNTPs enzymatisch abgebaut. 4,5 µl des PCR-Produktes wurden mit 1 µl Exonuclease und 2 µl alkalischer Phosphatase versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme durch 15 minütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert.

2.6.2 Sequenzierungsreaktion

Die nichtradioaktive semiautomatisierte Sequenzierung mit dem ABI PRISM™ 377-18 DNA Sequenzierer (APPLIED BIOSYSTEMS) macht sich das Prinzip der Fluoreszenzmarkierung der Basen bei unterschiedlichen Wellenlängen zunutze. Sie bietet gegenüber der radioaktiven manuellen Sequenzierung den Vorteil, längere Sequenzen (500-550 Basen) lesen zu können. Außerdem entfällt der Umgang mit radioaktiven Chemikalien. Es wurde das Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (APPLIED BIOSYSTEMS) Kit verwendet.

Es ist nötig, die Reaktion für den Vorwärts- und den Rückwärtsprimer getrennt durchzuführen. Für jede Sequenzierungsreaktion wurden 7,5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt zusammen mit 0,5 µl des entsprechenden Primers 10 pmol/µl (Vor- bzw. Rückwärts) und 2 µl Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mixes in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben, danach mit einem Tropfen Mineralöl abgedeckt. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in einem BIOMETRA T3 Thermocycler für 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen:

10 sec bei 96°C

5 sec bei 50°C

4 min bei 60°C

Die Proben können bei 4°C für einige Tage dunkel aufbewahrt werden.

2.6.3 Fällen des Sequenzierungsproduktes

Nach der Sequenzreaktion ist es notwendig, die Proben zu fällen, um nicht in die Reaktion eingegangene fluoreszenzmarkierte Nukleotide aus der Lösung zu entfernen, da sie die lasergesteuerte Auswertung stören würden.

Dazu wurde (1) der gesamte Sequenzierungsansatz (10 µl) mit 1 µl 3 M Natriumacetat und 25 µl 95% Ethanol vermischt und für 15 min auf Eis gefällt. (2) Danach wurde die DNA für 30 min bei 14000 rpm und 4°C gefällt und der Überstand sofort abgezogen. (3) Das Pellet wurde 2 x mit je 200 µl 70% Ethanol gespült und unter Vakuum getrocknet. Alternativ wurden die Proben auch bei 37°C für ca. 15 min luftgetrocknet. (4) Die Pellets wurden in 4 µl FA-Ladungspuffer (Formamid:EDTA 5:1, 50 mg/ml Blue Dextran (SIGMA)) gelöst und konnten kühl und dunkel einige Tage aufbewahrt werden.

2.6.4 Automatische Sequenzierung

Für die Sequenzanalyse wurde ein ABI PRISM™ 377-18 DNA Sequencer (APPLIED BIOSYSTEMS) verwendet. Es handelt sich dabei um ein mikroprozessorgesteuertes Elektrophorese- und Fluoreszenzdetektionssystem.

Ähnlich wie in einer SSCP-Gelkammer wird auch hier ein Polyacrylamidgel (0,2 mm Dicke) zwischen zwei Glasplatten gegossen und in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt. Im Gegensatz zu den oben erwähnten SSCP-Gelen handelt es sich hier jedoch um denaturierende Gele, welche unter entsprechend höherer Wattzahl und Temperatur laufen. Da in diesem Fall mit wesentlich höheren Spannungen gearbeitet wird (2500 mV), wird das Gel von beiden Seiten durch einen Wasserkreislauf während des Laufes temperiert, so dass im gesamten Gel eine konstante Temperatur von 51°C herrscht, die über insgesamt 3 Meßfühler automatisch kontrolliert wird.

Neben den Vorteilen einer nichtradioaktiven Sequenzierung ist es in diesem Fall auch möglich, in einer einzelnen Spur pro Probe alle vier Basen gleichzeitig auszuwerten, da diese bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Dadurch werden Laufunterschiede innerhalb eines Gels durch Inhomogenitäten deutlich minimiert und eine höhere Genauigkeit erzielt (bis 98,5%). Die Auswertung erfolgt mittels eines Argon Lasers. Die PCR-Fragmente werden elektrophoretisch aufgespalten und laufen je nach Größe unterschiedlich schnell. Im unteren Bereich, der sogenannten „*reading zone*“, scannt der Laser kontinuierlich in einem 90° Winkel über das Gel. Dabei werden passierende Fragmente zur Fluoreszenz angeregt, das emittierte Licht wird an der Rückseite gespiegelt und durch ein Linsensystem einem Spektrographen zugeführt, der das Licht sammelt, durch Wellenlängenunterschiede aufspaltet, um es getrennt einer sogenannten „*charge coupled device*“ (CCD) Kamera (gekühlt auf -15°C) zuzuführen.

Mit Hilfe der Computer Software (Sequencing Analysis) ist es möglich, das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umzuwandeln. Die Software enthält Informationen über Intensitäten und Wellenlängen der einzelnen Basen, so daß eine Zuordnung gelingt. Es ist allerdings notwendig, über Einstellung von Filtern das System auf den jeweilig verwendeten Reaktionsmix anzupassen.

Gelaufbau:

Die Glasplatten sind vor Gebrauch gründlich zu reinigen. Dies erfolgte durch Abwaschen mit einem Detergenz (Alconox), gefolgt von *Aqua dest.* und von Isopropanol unter Verwendung von fusel- und eigenfluoreszenzfreien Tüchern. Durch das Aufsetzen der oberen Pufferkammer auf die Vorderseite der vorderen Glasplatte wurde diese durch die Abdichtung der Kammer teilweise hydrophob. Um Probleme beim Gießen späterer Gele (Blasenbildung) zu vermeiden, wurden daher die Platten grundsätzlich mit der gleichen Seite nach innen verwendet.

Nach gründlicher Reinigung wurden die beiden Glasplatten nach Einbringen zweier seitlicher Abstandhalter (0,2 mm dick) in die dafür vorgesehene Plastikkassette eingespannt.

Gelansatz:

- 21 g Urea
- 8,4 ml 30 % Polyacrylamid (29:1) (siehe 2.5)
- 6 ml 10 x TBE (siehe 2.5)
- 20 ml steriles *Aqua dest.*
- 15 µl TEMED (siehe 2.5)
- 350 µl 10 % APS (siehe 2.5)

(1) Die fertige PAA-Gellösung wurde in eine Perfusor Spritze aufgezogen. Verunreinigungen und Verklumpungen wurden durch den Aufsatz eines Sterilfilters zurückgehalten. (2) Unter ständigem Klopfen oder durch Schrägstellen der Kassette wurde die flüssige Gellösung langsam und gleichmäßig von oben zwischen die Platten gespritzt bis die offene untere Kante erreicht war. (3) Danach wurde der Haifischzahnkamm mit der glatten Seite in das Gel gesteckt.

Vorbereitung des Laufs und Sequenzierung:

(1) Die untere Pufferkammer wurde im Gerät mit 1 x TBE-Puffer gefüllt. (2) Der Kamm wurde nach vollständigem Aushärten des Gels herausgezogen. Man verwendet einen Haifischkamm, der so tief vorgeschoben wurde, bis die Zähne ca. 1 mm im Gel steckten. Die verbliebenen Räume zwischen den Zähnen dienten als Probetaschen, der Kamm blieb während des Laufs im Gel. (3) Die Gelkassette wurde ins Gerät eingehängt. (4) Das Gerät wurde verschlossen und mit dem Computer ein sogenannter „*Plate check*“ durchgeführt. Bei diesem überprüft das Gerät die Sauberkeit der Platten. (5) Nach dem „*Plate check*“ wurde die obere Pufferkammer angebracht, angeschlossen und mit 1 x TBE Puffer gefüllt. Die Probetaschen wurden gespült, die vordere Heizplatte montiert und angeschlossen. (6) Nach Einstellung der gewünschten Laufbedingungen erfolgte der Vorlauf („*Pre Run*“) für ca. 30 min, um die optimale Geltemperatur von 51°C zu erreichen. (7) Nach Beendigung des Vorlaufes wurden die Elektrophoreseparameter eingegeben, 2 µl der aufgereinigten PCR-Proben (siehe 2.6.3) pro Spur geladen und (8) die Elektrophorese gestartet.

Die Auswertung der Gelelektrophorese erfolgt automatisch durch die *Sequencing Analysis 3.4.1-Software* (APPLIED BIOSYSTEMS). Die so erhaltenen Sequenzen-Dateien wurden für die Mutationsanalyse mit Hilfe des Sequenzvergleichsprogramms des NCBI (National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) mit der Wildtyp-Sequenz verglichen.

2.7 Expressionsanalyse

2.7.1 Differentielle Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion. Allerdings wird hier zusätzlich zu den Primern des Zielgens ein weiteres Primerpaar für ein Kontrollgen der Reaktion zugegeben. Das Kontrollgen sollte im gesamten Kollektiv gleichmäßig exprimiert werden. Um eine bessere Darstellbarkeit zu gewinnen, sollten die Primer des Kontrollgens ein PCR-Produkt deutlich anderer Größe amplifizieren als die des Zielgens. Durch Vergleich der Expressionsstärken von Ziel- und Kontrollgen im Normalgewebe erhält man einen Referenzwert für die Expression des Zielgens im Tumorgewebe. Nach Ermittlung der Expressionsstärken für Ziel- und Kontrollgen in den Proben des zu untersuchenden Kollektivs konnten diese mit dem Vergleichswert im Normalgewebe verglichen werden und so eine Aussage über die Expressionsstärke des Zielgens im Untersuchungskollektiv im Vergleich zum Normalgewebe getroffen werden.

Für die differentielle RT-PCR wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

cDNA-Matrize	1 µl (1:10 verdünnte cDNA-Lösung, siehe 2.2)
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
2 mM dNTPs	2,5 µl
10 pmol/µl je Zielgen-Primerpaar	1,5 µl
10 pmol/µl je Kontrollgen-Primerpaar*	1,5 µl
50 mM MgCl ₂	0,75 µl
Taq DNA Polymerase 5 u/µl	0,2 µl
Aqua dest.	ad 25 µl

*Je nach Expressionsstärke des Ziel- und des Kontrollgens war es nötig, das hier dargestellte Konzentrationsverhältnis von Zielgen-Primer:Kontrollgen-Primer von 1:1 zu ändern, es ergaben sich somit je nach Reaktion unterschiedliche Substanzmengen, die Volumenunterschiede wurden durch Anpassung der *Aqua dest.* Menge ausgeglichen.

2.7.2 Auswertung

(1) Die Darstellung der Amplifikationsergebnisse erfolgte auf einem Agarosegel (siehe 2.4). Zur besseren Auflösung der Banden wurde ein 3% Gel verwendet. Die fotografische Dokumentation und Auswertung erfolgte mittels des Gel Doc 1000-Systems und Molecular Analyst Software (BIORAD). (2) Die Software ermöglicht eine Intensitätsmessung der DNA-Banden, so daß Zahlenwerte für die Expressionsstärken erhalten wurden.

(3) Das Expressionsniveau eines jeden Ziel- und Referenzgens im Tumor wurde anhand des folgenden Quotienten in bezug zum Expressionsniveau dieser Gene im Referenzgewebe quantifiziert.

$$\text{Relative Expressionsstärke} = \frac{\text{Zielgen-mRNA Tumorgewebe/Referenzgen-mRNA Tumorgewebe}}{\text{Zielgen-mRNA Normalgewebe/Referenzgen-mRNA Normalgewebe}}$$

Die relative Expressionsstärke wurde wie folgt bewertet:

0 - ≤ 0.3	keine Expression des Zielgens
0.3 - ≤ 0.5	Unterepression des Zielgens
0.5 - < 2.0	Genexpression des Zielgens entspricht der im Kontrollgewebe
≥ 2.0	Überexpression des Zielgens
≥ 5.0	deutliche Überexpression des Zielgens

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse von *GLI1*

Die Mutationsanalyse des *GLI1*-Gens wurde auf die Regionen fokussiert, die funktionell für die Transkription von *GLI1* selbst (Promotorregion) bzw. für die Interaktion des Gli1-Transkriptionsfaktors mit der DNA (Zink-Finger-Region) von Bedeutung sind. Diese Regionen wurden an einem Kollektiv von 31 Basalzellkarzinomen der Haut und 17 primitiven neuroektodermalen Tumoren des ZNS (5 klassische Medulloblastome, 8 desmoplastische Medulloblastome und 5 supratentorielle PNETs) analysiert. Die Lage der Primer ist in Abb. 4 wiedergegeben, die entsprechenden Primersequenzen finden sich in Tab. 1.

3.1.1 Neuer Polymorphismus in der Promotorregion von *GLI1*

Die Promotorkernregion erstreckt sich über 467 bp (von nt 559 bis nt 1025; GenBank Accession No. AF26306) genomischer DNA und enthält vier SP1-Bindungsstellen. Mit drei überlappenden PCR-Fragmenten (Gli 1 Prom1 208 bp; Gli 1 Prom2 244 bp; Gli 1 Prom3 225 bp) wurde die Promotorregion vollständig analysiert. In einem Basalzellkarzinom (BCC9; Tab. 2) und einem desmoplastischen Medulloblastom (dpMB14; Tab. 2) konnte ein identisches aberrantes SSCP-Bandenmuster detektiert werden. Die Sequenzierung des entsprechenden PCR-Produktes ergab einen A>C-Polymorphismus in einer Bindungsstelle für den SP1-Transkriptionsfaktor. Zusätzlich zeigten beide Tumoren eine 1 bp-Insertion an Position nt 615 (g.615insG; GenBank Accession No. AF026306). Die gleichen genetischen Veränderungen waren auch in der Blut-DNA des Basalzellkarzinompatienten nachweisbar.

3.1.2 Neue Polymorphismen in der Zink-Finger-Region von *GLI1*

Die Zink-Finger-Region kodiert für den Teil des Gli1-Transkriptionsfaktors, der direkt mit der DNA interagiert. Die Region erstreckt sich über 474 Basen der mRNA (nt 783 bis nt 1256, GenBank Accession No. X07483) und wird von den Exonen 7 bis 10 kodiert. Die Zink-Finger-Region wurde zunächst auf cDNA Ebene mit drei überlappenden PCR-Fragmenten analysiert. Anschließend erfolgte die Analyse auf genomischer Ebene (Abb. 4). Hierbei überdeckten sechs PCR-Fragmente den zu untersuchenden Bereich vollständig und überlappend.

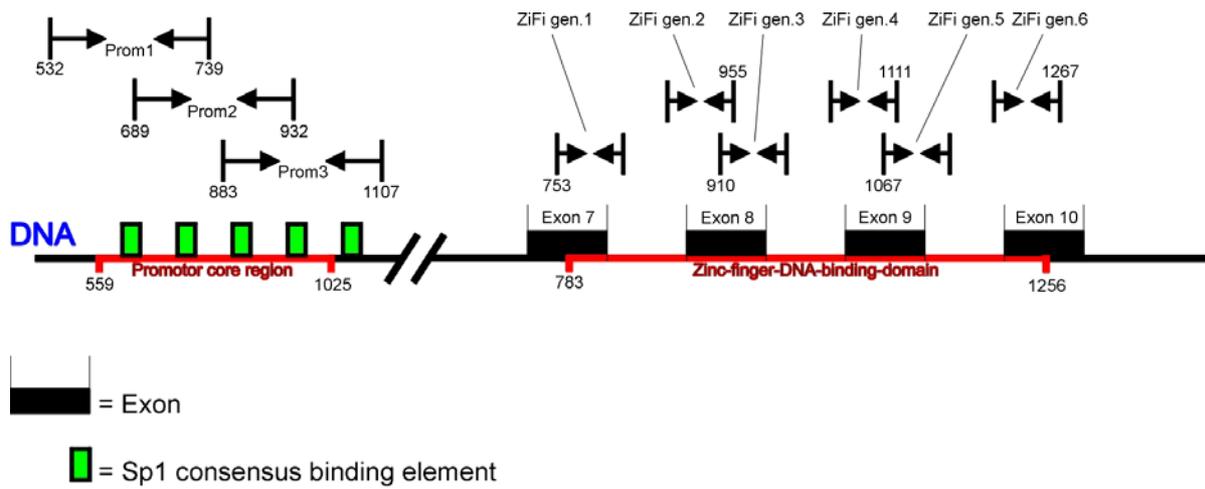


Abb. 4: Schematische Darstellung der Lage und Größe aller für die Sequenzanalyse von *GLI1* verwendeten PCR-Fragmente in der genomischen DNA Sequenz. Die Nummerierungen für die Promotorregion beziehen sich auf GenBank Accession No. AF26306, diejenigen für die Zink-Finger-Region auf GenBank Accession No. X07483.

Tab 1: Sequenzen der verwendeten Primer. IntF bzw IntR bezeichnet in Introns liegende Primerpaare

	5' Vorwärts 3'	5' Rückwärts 3'
Gli 1 Prom1 (F/R)	TTT GGG GCC AGC CGA TCC	CCT CTT GCC GTT CTG GAG
Gli 1 Prom2 (F/R)	CCT TCT CTT GCT TCC AGC	GCA GCG CAG CCT CGA TGC
Gli 1 Prom3 (F/R)	GGC TGG GGG GCC AGG TTG	GAG TCC CTA AGA AGC TGA GCA TCC
Gli 1 Prom4 (F/R)	CAG ACA GAG GTG AGA AGG G	ATC CGG AGT TCT AAT GTC TCA C
Gli 1 ZiFi cDNA 1 (F1/R1)	entspr. ZiFi gen F1	entspr. ZiFi gen R1
Gli 1 ZiFi cDNA 2 (F2/R2)	entspr. ZiFi gen F2	entspr. ZiFi gen R2
Gli 1 ZiFi cDNA 3 (F3/R3)	entspr. ZiFi gen F3	entspr. ZiFi gen R3
Gli 1 ZiFi gen 1 (F1/intR1)	GAA GCG TGA GCC TGA ATC TG	CAT GTC CCA CTC AGA ATC TCC
Gli 1 ZiFi gen 2 (intF1/R1)	CAT GGG AGA GCC TTG GAG AG	GCA TGT GAA CCA CCA GCA TG
Gli 1 ZiFi gen 3 (F2/intR2)	GAG CTG AGG CCC TTC AAA GC	TAC CTT GAA GGA GAG CCC TG
Gli 1 ZiFi gen 4 (intF2/R2)	CCA TGT CCT CTG TCT GAG AAC	CAT TGC TGA AGG CTT TAC TGC
Gli 1 ZiFi gen 5 (F3/intR3)	CAT ACA TGT GTG AGC ACG AG	TCT CCC TGG TAG GTG GCT TC
Gli 1 ZiFi gen 6 (intF3/R3)	GAT CCG TTT GCC TTC TGT C	CCC CAC GGT GCC GTT TGG
Gli 2 rt (F/R)	CTA CAT GCA GCA GCT GCG AC	CGG CAC TCC AGC CAG GCC
Gli 3 rt (F/R)	GAT GTC TGG GCA GAT TAG TG	CTG CAG GTC TGA CTT GTG TC
Gli Reg. IV (F/R)	GTA CCA CTG TGT CCC GCC G	GCT GCA GTC GGC CAA GTA C
Gli Reg. V/VI (F/R)	CGA GTA TCC ACG ATA CAA CC	CTG TGG TGA GTA GAC AGA GG
IGF2 (F/R)	GTC GAT GCT GGT GCT TCT CAC	GCA CAG TAC GTC TCC AGG AG
β2 MG rt (F/R)	ACC CCC ACT GAA AAA GAT GA	ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG
GAPDH rt (F/R)	CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA	TCT ACA CGG CAG GTC AGG TCC ACC
BTRC1 (F1/R1)	ACA GTA TGT TTA GCA AGC ACT GC	GTG CCC ATG TTG GTA ATG ACA C
BTRC2 (F2/R2)	GCA GTG GTC AGA GTC AGA TC	GTT CAG CAG CAC ATA GTG ATT TG
BTRC3 (F3/R3)	GAG AAC ATT CTG TCA TAC CTG G	AGC ATT CCC GTC AGG AGG
BTRC4 (F4/R4)	GGC AGA ACG AAG AGG ATG	AAG GCC GCT TAC TAT TTT CTG
BTRC5 (F5/R5)	GGA GTT TAC TGT TTA CAG TAT G	GGT GAA TCA ACG TGT TTA GC
BTRC6 (F6/R6)	CGG TCA GAG TGT GGG ATG	AAT GTA CTT GTC ATC AAA GTC TAC
BTRC7 (F7/R7)	ACC GAG CTG CTG TCA ATG	CTC ATG GCC TTC TAA CAC TC
BTRC8 (F8/R8)	GAC ATA GAA TGT GGT GCA TG	TCT TCC GGA ATG CTC CAC
BTRC9 (F9/R9)	CAG GGA CAC TCT GTC TAC	AGT ATG AGG TCA GTG TAT GG

Im Bereich der Zink-Finger-Region fanden sich in zwei PCR-Fragmenten abweichende Bandenmuster in der SSCP/Heteroduplex-Analyse, die nach ihrer Verifizierung sequenziert wurden.

In einem PNET (stP 2) sowie in einem Basalzellkarzinom (BCC 16) wurde bei der SSCP-Analyse eine aberrante Bande im Fragment 2 der genomischen DNA der *GLI1* Zink-Finger-Region (ZiFi gen. 2) entdeckt (Abb. 5). Die Sequenzanalyse erbrachte einen Basenaustausch an Position 864 von C nach T (GenBank Accession No. X07483, Exon 8). Dieser führt nicht zu einem Aminosäureaustausch im Molekül, an der entsprechenden Stelle bleibt Histidin erhalten (g.864C>T; p.H288H) (Abb. 5; Tab. 2). Die gleiche Veränderung konnte im Blut des Patienten nachgewiesen werden, was ebenfalls dafür spricht, dass es sich um einen Polymorphismus handelt. Der Basenaustausch konnte in den Tumoren ebenfalls auf cDNA Ebene nachgewiesen werden.

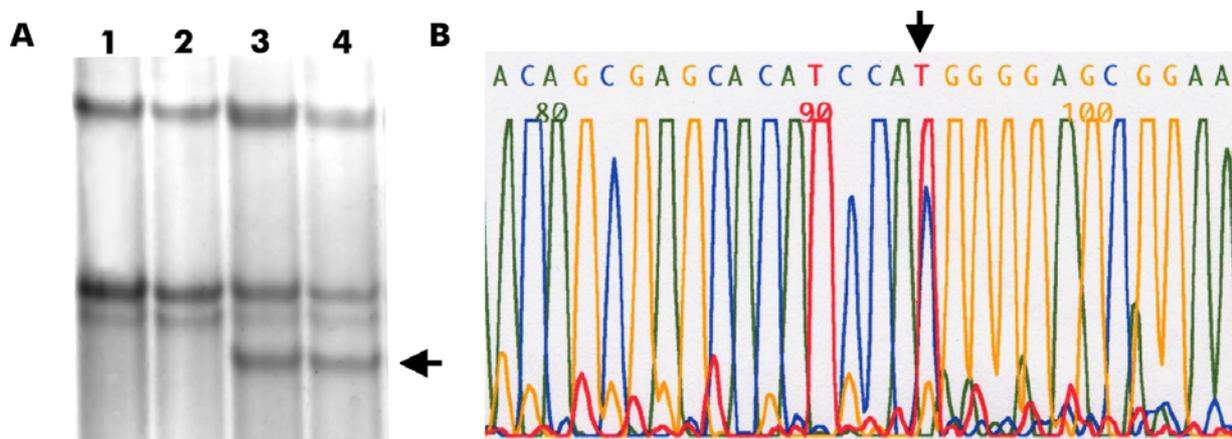


Abb. 5: **Mutationsanalyse der *GLI1* Zink-Finger-Region.** A, Die Abbildung zeigt ein silbergefärbtes SSCP/Heteroduplexgel mit den PCR-Produkten des zweiten Fragmentes der *GLI1* Zink-Finger-Region. In den Spuren 3 und 4 sind die PCR-Produkte von Tumor- (3) und Blut- (4) DNA des Basalzellkarzinompatienten BCC16 aufgetrennt, die ein zur Wildtyp-DNA (Spuren 1 und 2) verändertes SSCP-Bandenmuster aufweisen. Das PCR-Produkt aus der Tumor-DNA von Patient stP2 zeigte ein identisches Bandenmuster wie BCC16 (nicht dargestellt). B, Dargestellt ist ein Ausschnitt des Elektropherogramms der Sequenzanalyse der Tumor-DNA von BCC16. Deutlich zu erkennen (Pfeil) ist der Doppelausschlag für Cytosin und Thymin an Position 864 der Sequenz (GenBank Accession-No.: X07483). Es liegt eine heterozygote Veränderung in diesem Tumor vor.

In einem PNET (MB13) und zwei BCCs (BCC4, BCC9) wurden bei der SSCP-Analyse im vom sechsten PCR-Fragment für genomische DNA (ZiFi6) abgedeckten Bereich aberrante Banden festgestellt. Die Sequenzierung ergab für alle drei Tumoren und der Blut-DNA der Basalzellkarzinompatienten einen Basenaustausch von T nach C an Position 1164 (GenBank Accession No. X07483, Exon 10) (Abb. 6; Tab. 2). Wie die vorher beschriebene Veränderung führt dieser Basenaustausch bei der Translation ebenfalls nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Moleküls. An der entsprechenden Position bleibt Tyrosin erhalten (g.1164T>C; p.Y388Y).

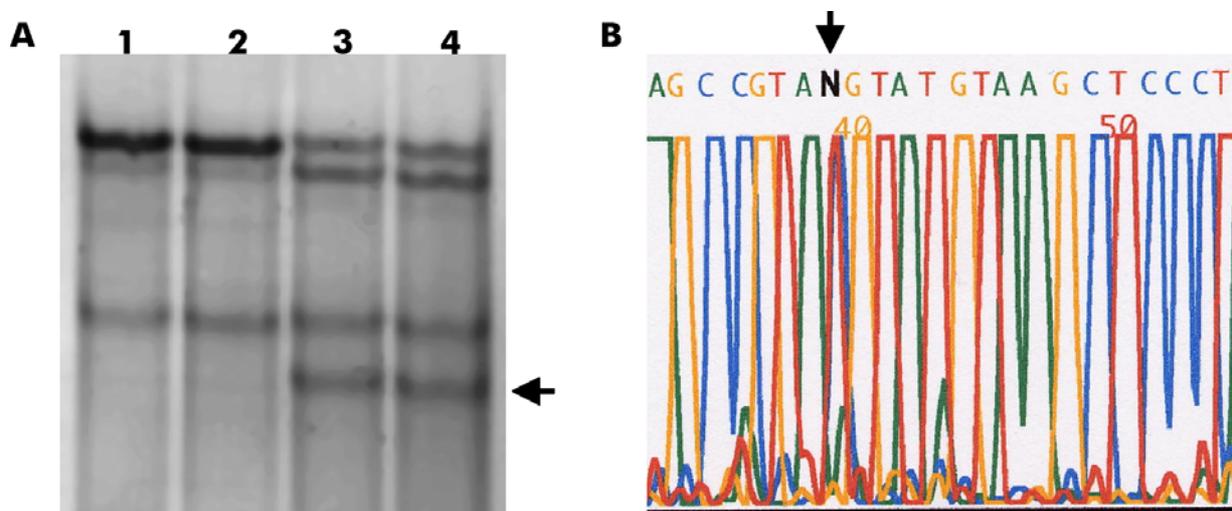


Abb. 6: **Mutationsanalyse der *GLI1* Zink-Finger-Region.** A, Die Abbildung zeigt das silbergefärbte SSCP/Heteroduplexgel mit den amplifizierten PCR-Produkten des sechsten Fragmentes der *GLI1* Zink-Finger-Region. In Spur 3 ist das PCR-Produkt der Tumor-DNA des betroffenen Medulloblastompatienten (MB13) aufgetrennt, die ein zum Wildtyp (Spuren 1 und 2) verändertes SSCP-Bandenmuster aufweisen. Das in Spur 4 dargestellte PCR-Produkt aus der Tumor-DNA des Patienten BCC9 zeigt ein identisches Bandenmuster wie MB13. B, Dargestellt ist ein Ausschnitt des Elektropherogramms der Sequenzanalyse der Tumor-DNA von MB13. Deutlich zu erkennen (Pfeil) ist der Doppelausschlag für Cytosin und Thymin (N) an Position 1164 der Sequenz (GenBank Accession-No.: X07483). Es liegt eine heterozygote Veränderung in diesem Tumor vor.

Tab 2: Überblick über die Ergebnisse der Mutations- und Expressionsanalyse von *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *IGF2*, *BTRC* und von *PTCH* und *SMOH* in Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen. Die Ergebnisse zu den *PTCH* und *SMOH* Mutationen entstammen der Publikation von Reifenberger *et al.* (95). 0 = keine Veränderungen nachgewiesen. # = für *GLI2* sind die Quotienten aus *GLI2* zu *GAPDH* angegeben, nicht normalisiert auf normale Haut und normales Kleinhirngewebe, da *GLI2* in normalem adultem Gewebe nicht exprimiert wird. * = Polymorphismen. n.a. = nicht analysiert.

Tumor	<i>GLI1</i> Promotor Mutation	<i>GLI1</i> Zink-Finger Mutation	<i>PTCH</i> * Mutation	<i>SMOH</i> * Mutation	<i>GLI2</i> # mRNA Expression	<i>GLI3</i> mRNA Expression	<i>IGF2</i> mRNA Expression
BCC1	0	0	c.992C>T:S331F	0	1,1	1,0	0,4
BCC2	0	0	0	0	n.a.	n.a.	n.a.
BCC3	0	0	c.1093C>T:Q365X	0	0,5	0,9	1,2
BCC4	0	c.1164T>C:Y388Y*	c.1047delC	0	n.a.	n.a.	n.a.
BCC5	0	0	c.2146delT	0	n.a.	n.a.	n.a.
BCC6	0	0	0	c.1604G>T:W535L	n.a.	n.a.	n.a.
BCC7	0	0	c.3944T>C:L1315P	c.1604G>T:W535L	0,3	0,9	1,0
BCC8	0	0	c.1434-1437del4	0	0,3	2,0	0,7
BCC9	0	c.1164T>C:Y388Y*	0	0	0,3	1,3	2,7
BCC10	0	0	c.2985G>T:R995S c.3054G>A:W1018X	0	0,2	2,0	0,8
BCC11	0	0	c.2560G>T:G854X	0	0,5	1,4	1,1
BCC12	0	0	0	0	n.a.	n.a.	n.a.
BCC13	0	0	0	0	1,1	1,3	1,0
BCC14	0	0	0	0	1,1	1,3	0,4
BCC15	0	0	0	0	0,4	0,9	0,8
BCC16	0	c.864C>T:H388H*	0	0	0,1	1,0	1,9
BCC17	0	0	IVS14+25T>C	0	0,5	1,3	1,2
BCC18	0	0	0	0	n.a.	n.a.	n.a.
BCC19	g.710C>T; g.615insG*	0	0	0	0,7	0,8	0,6
BCC20	0	0	IVS14+1G>A	c.1604G>T:W535L	0,7	0,9	0,8
BCC21	0	0	c.3378-3379CC>TT:V1126V, L1127L	0	0,6	0,9	1,2
BCC22	0	0	c.1249C>T:Q413X	0	1,3	1,4	0,8
BCC23	0	0	c.2287delG	0	1,7	1,0	3,3
BCC24	0	0	0	0	0,5	0,9	1,1
BCC25	0	0	c.2321G>A:G774E	0	0,3	3,1	0,5
BCC26	0	0	n.a.	0	0,2	1,0	2,0
BCC27	0	0	c.3634G>A;G1212S	0	0,0	0,7	0,9
BCC28	0	0	c.378delG	0	0,7	1,9	0,7
BCC31	0	0	c.2873delA	0	n.a.	n.a.	n.a.
BCC32	0	0	0	0	n.a.	n.a.	n.a.
BCC33	0	0	c.291insT	c.595C>T: R199W	n.a.	n.a.	n.a.
MB9	0	0	0	0	0,0	0,8	0,3
MB11	0	0	0	0	0,4	5,1	1,8
MB13	0	c.1164T>C:Y388Y*	0	0	0,0	0,6	0,4
MB14	0	0	0	0	0,7	1,2	0,6
MB15	0	0	0	0	0,0	1,7	0,5
stP2	0	c.864C>T: H388H*	0	0	0,3	4,6	0,5
stP3	0	0	c.2161C>T:P721S	0	0,0	2,6	0,3
stP4	0	0	0	0	0,9	5,8	0,4
stP5	0	0	0	0	0,9	6,2	0,3
dpMB10	0	0	0	0	0,0	1,1	0,8
dpMB11	0	0	0	c.1598G>A:S533N	1,3	3,3	0,9
dpMB12	0	0	0	0	0,0	1,4	1,6
dpMB13	0	0	0	0	0,9	3,1	1,1
dpMB14	g.710C>T; g.615insG*	0	0	0	1,1	0,7	1,2
dpMB16	0	0	0	0	1,2	3,0	0,2

3.2 Expressionsanalysen von *GLI2*, *GLI3* und *IGF2*

Die Expressionsanalysen wurden auf cDNA Ebene mit Hilfe von differentiellen RT-PCRs durchgeführt. Dabei wird die Expression des zu untersuchenden Gens mit der eines Kontrollgens verglichen, welches im zu untersuchenden Kollektiv gleichmäßig exprimiert werden sollte. Des Weiteren verwendet man noch cDNA aus gesundem Gewebe als Normalkontrolle und benutzt deren Expressionswerte als Referenz. So kann man die Expressionsstärke eines Gens im Tumorgewebe im Vergleich zur Expression im Normalgewebe bestimmen (vergleiche Material und Methoden). In dieser Arbeit wurde für die Expressionsstudien ein Kollektiv von 22 Basalzellkarzinomen und 15 Medulloblastomen und supratentoriellen PNETs verwendet. Letztere setzten sich aus fünf Medulloblastomen, sechs desmoplastischen Medulloblastomen sowie vier supratentoriellen PNETs zusammen. Die Ergebnisse der Expressionsanalyse der Gene *GLI2*, *GLI3* und *IGF2* auf mRNA Ebene sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

3.2.1 Expressionsanalyse von *GLI2*

Physiologischerweise (11, 44, 72, 106) wird *GLI2* vor allem während der Entwicklung exprimiert und ist in adultem Kleinhirn- und Hautgewebe nicht nachweisbar. Mit der in den eigenen Untersuchungen angewandten Methode ließ sich *GLI2* ebenfalls nicht in adultem Kleinhirngewebe nachweisen. Im Unterschied dazu fand sich eine variable *GLI2*-Expression in Medulloblastomen und PNETs, d.h. insgesamt 9 von 15 untersuchten Tumoren zeigten ein positives Signal für *GLI2* (MB11, MB14, stP2, stP4, stP5, dpMB11, dpMB13, dpMB14, dpMB16) (siehe auch Abb. 7 sowie Tab. 2). Die Expressionsstärke war sehr heterogen und reichte von nicht nachweisbarer Expression bis zum 1,3-fachen der Kontrollgenexpression. Nur vier der sechs desmoplastischen Medulloblastome exprimierten *GLI2*, drei dieser vier zeigten jedoch eine stärkere Expression als alle anderen untersuchten PNETs. Zwei von 5 untersuchten klassischen Medulloblastomen zeigten eine *GLI2*-Expression, welche mit dem 0,4- bzw. 0,7-fachen der Kontrollgenexpression insgesamt geringer war, als die der desmoplastischen Varianten. Es ließ sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen desmoplastischen und klassischen Medulloblastomen nachweisen (Student's t-Test: $p=0,0961$). Drei der vier untersuchten supratentoriellen PNETs exprimierten *GLI2* mit einer Stärke vom bis zu 0,9-fachen Wert der Kontrollgenexpression. Auch unter Einbeziehung dieser Tumoren konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede in *GLI2* nachgewiesen werden (Student's t-Test: $p=0,0678$ für stPs und dpMBs gegen MBs; $p=0,1913$ für stPs und MBs gegen dpMBs). Der Vergleich zwischen Tumoren mit Mutationen

in *PTCH* oder *SMOH* und solchen ohne Mutation ergab keinen signifikanten Unterschied in der *GLI2*-Expression (Student's t-Test: $p=0,8490$).

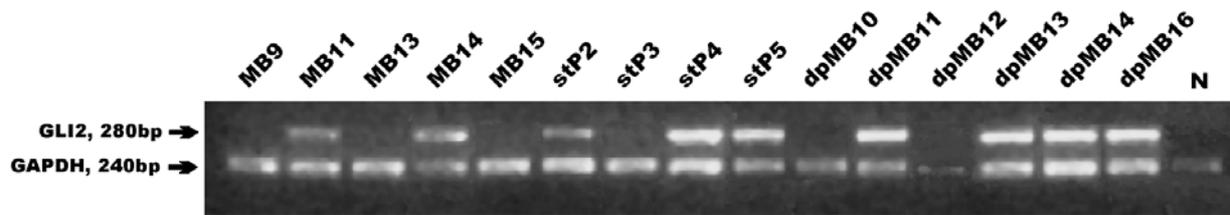


Abb. 7: Darstellung der Ergebnisse der differentiellen RT-PCR für *GLI2* in den untersuchten Medulloblastomen und sPNETs. N, Normales adultes Kleinhirngewebe als Normalkontrolle.

In der mRNA aus der Haut zweier gesunder Erwachsener ergab sich analog zu den Befunden für adultes Kleinhirngewebe keine *GLI2*-Expression mit der RT-PCR-Methode. Für die Expression von *GLI2* sind daher nur die Verhältnisse der Expression von *GLI2* zum Kontrollgen *GAPDH* dargestellt (siehe Abb. 8; Tab. 2). Im Gegensatz zu normaler Haut zeigten die meisten Basalzellkarzinome eine Expression des Gens, die aber von Fall zu Fall in ihrer Stärke eher heterogen war und von keiner Expression bis zum 1,7-fachen der Kontrollgenexpression reichte. Vier Basalzellkarzinome (BCC10, BCC16, BCC26, BCC27) exprimierten *GLI2* nicht, bzw. nur gering. Wie für die Medulloblastome und PNETs ergab sich auch für die Basalzellkarzinome kein Unterschied der Expressionsstärke beim Vergleich von Tumoren mit und ohne *PTCH*- oder *SMOH*-Mutationen (Student's t-Test: $p=0,9125$).

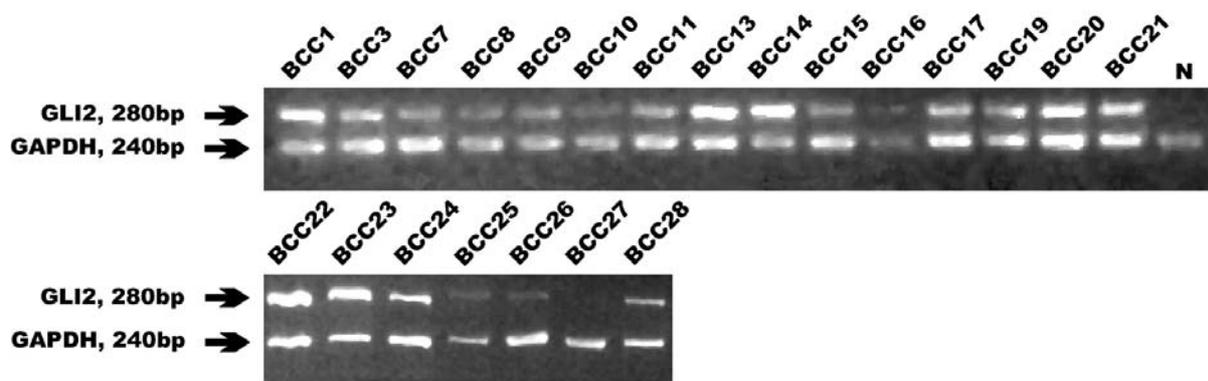


Abb. 8: Darstellung der Ergebnisse der differentiellen RT-PCR für *GLI2* in Basalzellkarzinomen. N, Gesundes Hautgewebe als Normalkontrolle.

3.2.2 Expressionsanalyse von *GLI3*

Die RT-PCR-Analyse der *GLI3* mRNA-Expression ergab in normalem adultem Kleinhirngewebe ein relativ schwaches Signal, das als Referenzwert für die *GLI3*-Expression in den Medulloblastomen und PNETs verwendet wurde. Alle 15 untersuchten Medulloblastome und sPNETs exprimierten *GLI3*, allerdings in von Fall zu Fall unterschiedlicher Stärke (siehe Abb. 9; Tab. 2). Es wurde folgende Einteilung der Expressionsstärke verwendet: Ein Verhältnis von Zielgen zu Kontrollgen (Tumor) zu Zielgen zu Kontrollgen (Kontrolle) von 0 bis 0,3 wurde als keine Expression gewertet, ein Verhältnis von 0,3 – 0,5 als Unterexpression, ein Verhältnis von 0,5 - 2 als gleiche Expression, ein Verhältnis von über 2 als starke Expression, und ein Verhältnis von über 5 als sehr starke Expression. Dabei zeigte sich folgende Verteilung: Sieben PNETs (MB9, MB13, MB14, MB15, dpMB10, dpMB12, dpMB14) exprimierten *GLI3* normal, fünf PNETs (stP2, stP3, dpMB11, dpMB13, dpMB16) exprimierten *GLI3* stark und drei PNETs (MB11, stP4, stP5) zeigten ein sehr starkes Signal. Vier PNETs (MB11, stP2, stP4, stP5) hoben sich mit Expressionsstärken vom 4,6- bis 6,2-fachen im Vergleich zum Kontrollgewebe von den restlichen Tumoren ab. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen *GLI2* und *GLI3*-Expression ergab sich in den untersuchten ZNS-Tumoren nicht. Es konnte auch kein Expressionsstärkeunterschied zwischen Tumoren mit und ohne Mutation in *PTCH* oder *SMOH* gefunden werden (Student's t-Test: $p=0,7349$). Expressionsunterschiede zwischen desmoplastischen und klassischen Medulloblastomen zeigten sich ebenfalls nicht (Student's t-Test: $p=0,8244$). Auch unter Einbeziehung der supratentoriellen PNETs konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Student's t-Test: $p=0,2370$ für stPs und dpMBs gegen MBs; $p=0,2464$ für stPs und MBs gegen dpMBs).

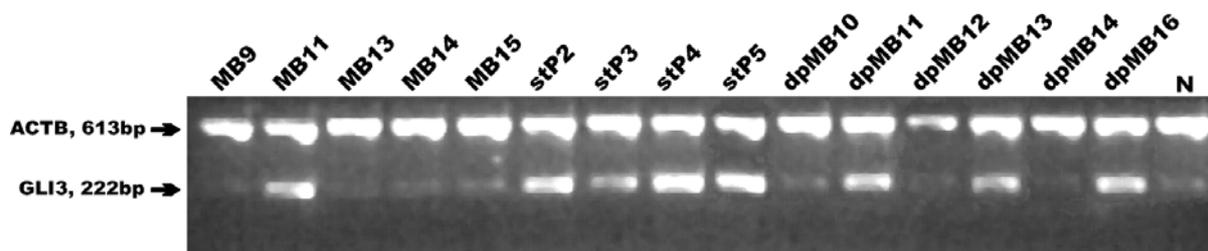


Abb. 9: Darstellung der Ergebnisse der differentiellen RT-PCR für *GLI3* in Medulloblastomen und sPNETs. N, Nichtneoplastisches Kleinhirngewebe als Normalkontrolle.

Auch in der Haut zweier gesunder Erwachsener wurde eine relativ schwache Expression von *GLI3* gefunden. Alle untersuchten Basalzellkarzinome exprimierten ebenfalls *GLI3*, wobei die

Signalstärke im Vergleich zu den PNETs geringer schwankte (in Basalzellkarzinomen zwischen 3,1-facher und 0,7-facher Expression relativ zu normaler Haut, in PNETs zwischen 6,2-fach und 0,6-fach relativ zu normalem Kleinhirngewebe) (siehe Abb.10; Tab. 2). Die Expressionsstärke wurde analog zu der der PNETs eingeteilt, dabei ergaben sich im einzelnen die folgenden Ergebnisse: 21 der untersuchten 22 BCCs exprimierten *GLI3* innerhalb der als normal definierten Grenzwerte, lediglich BCC25 zeigte eine 3,1-fach erhöhte Expression relativ zu normaler Haut. Innerhalb der Gruppe von Basalzellkarzinomen mit normaler Expression zeigten sich jedoch deutliche Schwankungen der Expressionsstärke, welche hier von 0,7-fach bis 2-fach relativ zu normaler Haut schwankte. Die drei Tumore mit der stärksten *GLI3*-Expression (BCC25: 3,1-fache Expression, BCC8 und BCC10: 2-fache Expression relativ zu normaler Haut) lagen mit Expressionsstärken von 0,2 - 0,3-fach für *GLI2* alle innerhalb der als „keine Expression“ definierten Grenzwerte. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Expressionsstärken von *GLI2* und *GLI3* ergab sich insgesamt für die Basalzellkarzinome allerdings nicht. Ein Unterschied der Expression von *GLI3* in Tumoren mit und ohne *PTCH*- oder *SMOH*-Mutationen bestand nicht (Student's t-Test: $p=0,7972$).

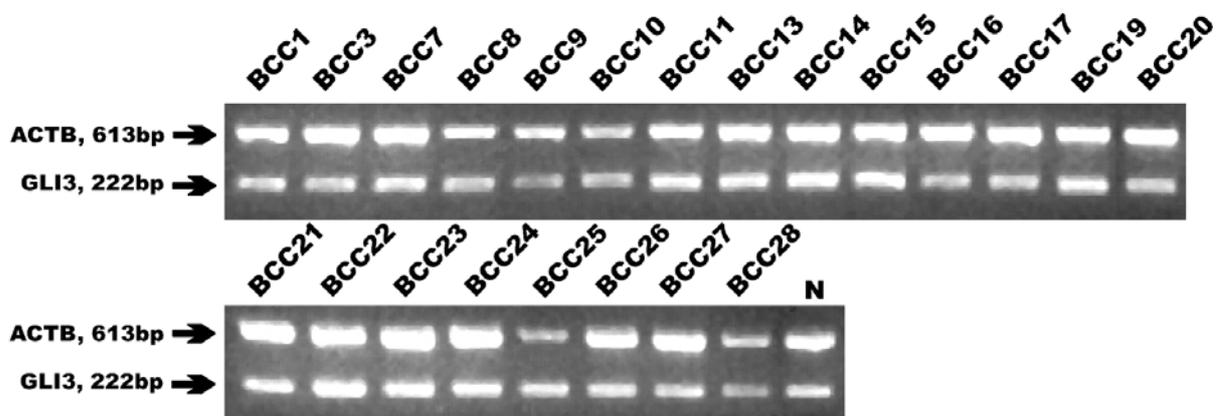


Abb. 10: Darstellung der Ergebnisse der differentiellen RT-PCR für *GLI3* in Basalzellkarzinomen. N, Normales adultes Hautgewebe als Normalkontrolle.

3.2.3 Expressionsanalyse von *IGF2*

Für die Expressionsanalyse von *IGF2* wurde als Referenzgen *β Actin (ACTB)* verwendet. *IGF2* wird in normalem adultem Kleinhirngewebe exprimiert, daher konnten die Ergebnisse aus dem Tumorkollektiv dazu ins Verhältnis gesetzt werden. Es wurde die auch für *GLI3* verwendete fünfteilige Skala verwendet. Alle der untersuchten PNETs exprimierten *IGF2* (Abb.11; Tab. 2), allerdings durchweg schwächer als die Basalzellkarzinome. Die Expressionsstärken reichten hier von 0,2- bis zu 1,8-facher *IGF2*-Expression relativ zu normalem Kleinhirngewebe. Im Einzelnen ergaben sich die folgenden Ergebnisse: Vier der untersuchten PNETs (MB9, stP3, stP5, dpMB16) zeigten keine *IGF2*-Expression, ebenfalls vier PNETs (MB13, MB15, stP2, stP4) unterexprimierten *IGF2*, sieben PNETs (MB11, MB14, dpMB10, dpMB11, dpMB12, dpMB13, dpMB14) zeigten eine normale Expression, keines zeigte eine starke oder sehr starke Expression relativ zu normalem Kleinhirngewebe. Fünf der sieben Tumoren mit der stärksten Expression waren desmoplastische Medulloblastome, allerdings zeigte das sechste untersuchte desmoplastische Medulloblastom (dpMB16) das schwächste Signal aller untersuchten PNETs (0,2-fach relativ zu normalem Kleinhirngewebe). Alle 4 untersuchten supratentoriellen PNETs (stP2, stP3, stP4, stP5) zeigten keine Expression oder eine Unterexpression, der Mittelwert ihres Signals ergab nur 0,37, im Vergleich dazu lag der Mittelwert der klassischen Medulloblastome bei 0,78 und der Mittelwert der desmoplastischen Medulloblastome bei 0,97. Insgesamt konnte keine Korrelation zur Expression von *GLI2* oder *GLI3* beobachtet werden. Die PNETs wiesen keine Expressionsunterschiede zwischen Tumoren mit und ohne *PTCH*- oder *SMOH*-Mutation auf (Student's t-Test: $p=0,7153$). Signifikante Expressionsunterschiede zwischen desmoplastischen und klassischen Medulloblastomen konnten nicht gefunden werden (Student's t-Test: $p=0,4835$). Auch unter Einbeziehung der supratentoriellen PNETs fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Student's t-Test: $p=0,9754$ für stPs und dpMBs gegen MBs; $p=0,1349$ für stPs und MBs gegen dpMBs).

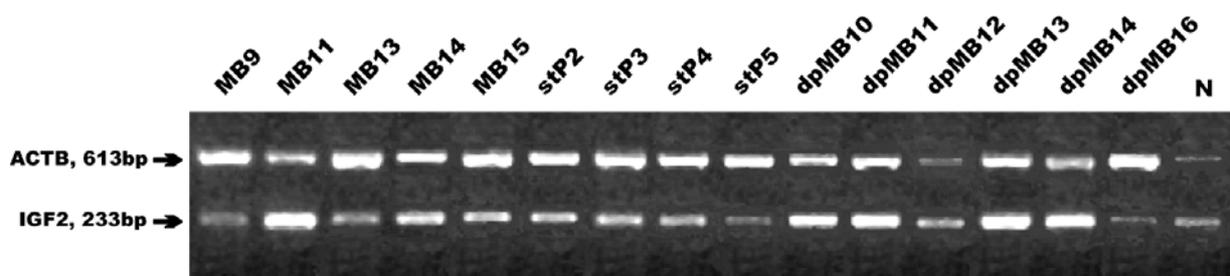


Abb. 11: Darstellung der Ergebnisse der differentiellen RT-PCR für *IGF2* in Medulloblastomen und sPNETs. N, Nichtneoplastisches Kleinhirngewebe als Normalkontrolle.

In gesunder adulter Haut fand sich eine *IGF2*-Expression. Zur Analyse der *IGF2*-Expression in Basalzellkarzinomen wurde die gleiche Einteilung verwendet, wie für die Medulloblastome und sPNETs. Alle der untersuchten Basalzellkarzinome exprimierten *IGF2* (siehe Abb. 12 sowie Tab. 2). Das Expressionsniveau reichte von 0,4- bis 3,3-fach relativ zur *IGF2*-Expression in gesunder Haut. Insgesamt zeigte sich folgendes Ergebnis: Drei Basalzellkarzinome (BCC1, BCC14, BCC25) unterexprimierten *IGF2*, 17 Tumore (BCC3, BCC7, BCC8, BCC10, BCC11, BCC13, BCC15, BCC16, BCC17, BCC19, BCC20, BCC21, BCC22, BCC24, BCC26, BCC27, BCC28) zeigten eine normale Expression relativ zu normaler Haut und zwei Tumore (BCC9, BCC23) zeigten eine starke Expression relativ zu normaler Haut. Das Basalzellkarzinom mit der stärksten *IGF2*-Expression (BCC23) zeigte auch die stärkste *GLI2*-Expression bei gleichzeitig starker *GLI3*-Expression. Weitere Zusammenhänge zwischen den Expressionsstärken von *IGF2*, *GLI2* und *GLI3* konnten jedoch nicht beobachtet werden. Das *IGF2*-Expressionsniveau unterschied sich nicht signifikant zwischen Tumoren mit und ohne Mutationen in *PTCH* oder *SMOH* (Student's t-Test: $p=0,6425$).

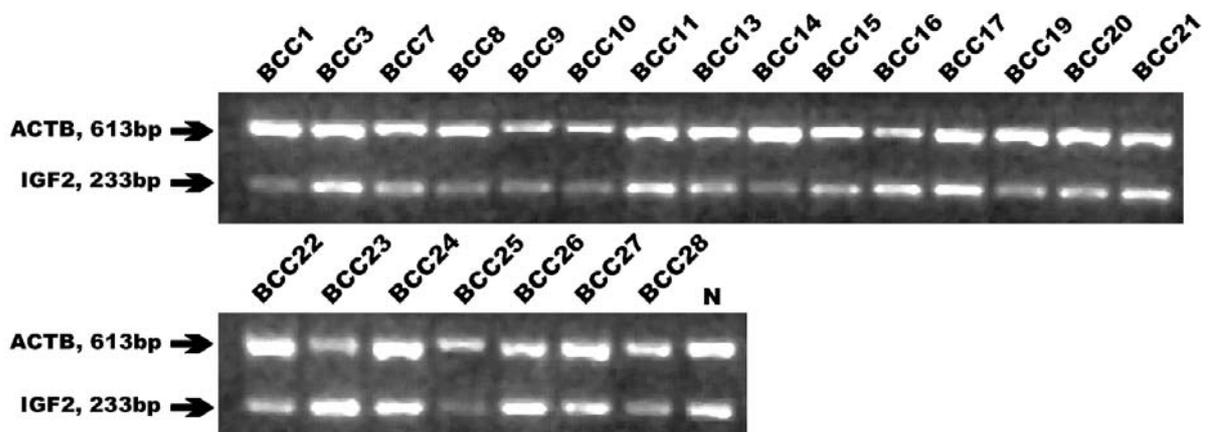


Abb. 12: Darstellung der Ergebnisse der differentiellen RT-PCR für *IGF2* im Basalzellkarzinomkollektiv. Gesundes Hautgewebe als Normalkontrolle ist als „N“ bezeichnet.

3.3 Mutationsanalyse von *BTRC*

Das humane *BTRC*-Gen erstreckt sich über 203,26 kbp genomischer DNA (AceView NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&l=BTRC>). Bisher sind vier Transkriptvarianten beschrieben worden (135), wobei die längste Transkriptvariante *BTRC*-Var1 2217 bp beträgt. Der zuerst beschriebenen, kürzeren Transkriptvariante *BTRC*-Var2 fehlen 108 bp, die für Exon 2 kodieren. Dieses bei Beginn der vorliegenden Arbeit einzige bekannte *BTRC*-Transkript wurde mit Ausnahme der ersten 165 Nukleotide der kodierenden Region mit neun überlappenden PCR-Fragmenten mittels SSCP/Heteroduplexanalyse auf Mutationen hin untersucht (Abb. 13). Für die Untersuchung stand ein Kollektiv aus 66 primitiven neuroektodermalen Tumoren des ZNS und 25 Basalzellkarzinomen der Haut zur Verfügung.

Bei der SSCP/Heteroduplex-Analyse konnten in vier Amplikons Tumoren mit aberrantem SSCP-Bandenmuster identifiziert werden (Tab. 3, Tab. 4). Nach Verifizierung der veränderten Bandenmuster wurden die entsprechenden PCR-Produkte in beide Richtungen sequenziert.

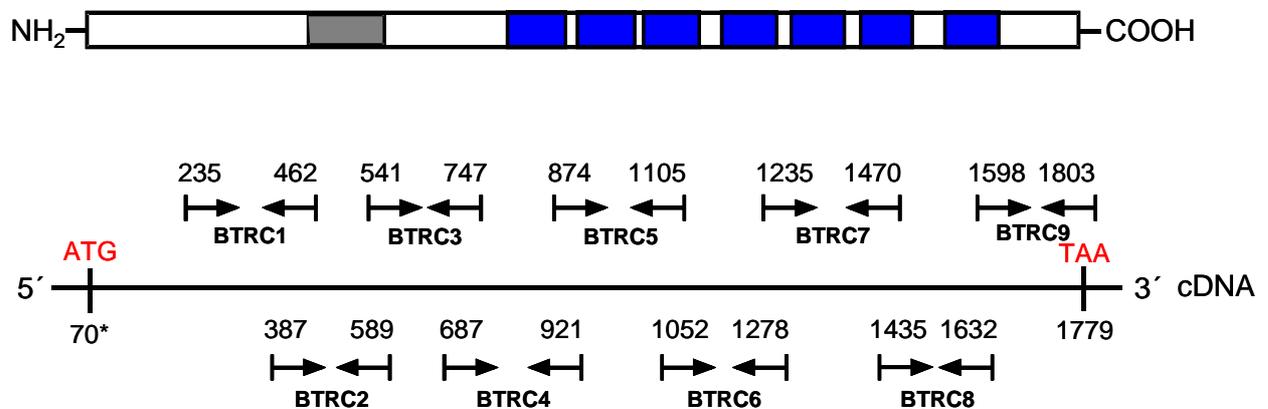


Abb. 13: Schematische Darstellung der Lage und Größe der neun Amplikons für die SSCP/Heteroduplex-Analyse von *BTRC*.

Die Nummerierungen der Primerbindungsstellen beziehen sich auf GenBank Accession-No. Y14153. F-Box Domäne; WD40-Wiederholungsdomäne, $\leftarrow \rightarrow$ Amplikon.

Die Sequenzierungen ergaben die folgenden neuen Sequenzpolymorphismen in *BTRC* (alle Nukleotidnummerierungen beziehen sich auf die GenBank Accession No. Y14153). Tumor-assoziierte somatische *BTRC*-Mutationen wurden nicht gefunden.

In vier PNETs (1114, 1071, 1099 und stP2) und vier BCCs (BCC3, BCC16, BCC26 und BCC27) wurde eine aberrante Bande im Amplikon BTRC3 im SSCP-Gel entdeckt. Die Sequenzanalyse zeigte einen Basenaustausch im Nukleotid 684 von Cytosin nach Thymin (c.684C>T) (Abb. 14). Dieser führt zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Methionin im Codon 193. Die gleiche Veränderung konnte auch in der Blut-DNA der Patienten nachgewiesen werden, so dass hier ein Polymorphismus vorliegt.

In einem PNET (1111) wurde eine aberrante Bande im Amplikon BTRC5 im SSCP-Gel detektiert. Bei dieser auch in der Blut-DNA des Patienten nachweisbaren Veränderung handelt es sich um einen Adenin nach Cytosin Basenaustausch (c.953A>C). Hier wird im Protein Asparagin durch Threonin (N295T) ersetzt.

Im Amplikon BTRC7 konnten zwei unterschiedliche aberrante SSCP-Bandenmuster beobachtet werden. Dabei fand sich an Position 1350 in vier PNETs (1107, 1154, 1064, 1111) ein Thymin- nach Guanin-Austausch, der zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin nach Lysin im Codon 472 führt. In einem anderen PNET (384) konnte eine A>G-Transition (A1276G) gefunden werden, die ebenfalls zu einer veränderten Aminosäuresequenz führt (I403V). Die veränderten SSCP-Muster waren auch in den korrespondierenden Blut-DNA-Proben nachweisbar.

Eine weitere aberrante SSCP-Bande wurde in einem PNETs (1072) und einem BCC (BCC25) im PCR-Fragment BTRC8 entdeckt. Die Sequenzanalyse erbrachte einen Basenaustausch an Position 1588 von Guanin nach Thymin (c.1588G>T), der auch zu einem Aminosäureaustausch (A507S) im Protein führt. In der konstitutionellen DNA (Leukozyten-DNA) des Patienten konnte die gleiche Veränderung nachgewiesen werden.

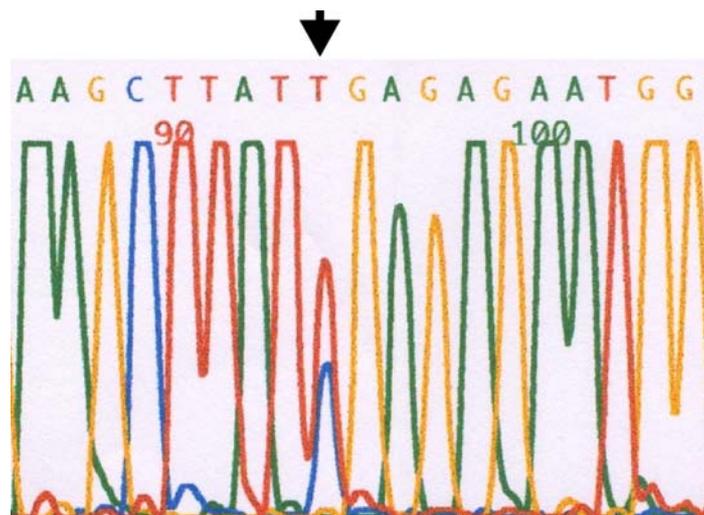


Abb. 14: Elektropherogramm der Sequenzierung von Tumor-DNA des Medulloblastoms 1071. Deutlich zu erkennen (Pfeil) ist der Doppelausschlag für Cytosin und Thymin an Position 684 der Sequenz (GenBank Accession No. Y14153). Die Wildtypsequenz hat an dieser Stelle ein Cytosin, während in der Tumor-DNA eine Heterozygotie vorliegt.

Tab. 3: Ergebnisse der BTRC-Mutationsanalyse in primitiven neuroektodermalen Tumoren des ZNS. * dpMB, desmoplastisches Medulloblastom; MB, klassisches Medulloblastom; MMB, Medullomyoblastom; stP, supratentorielles PNET; o, keine detektierbare Veränderung.

Tumor Nr.	Histologie*	BTRC1 [#]	BTRC2	BTRC3	BTRC4	BTRC5	BTRC6	BTRC7	BTRC8	BTRC9
370	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
385	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1057	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1058	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1107	dpMB	o	o	o	o	o	o	c.1350T>G: N427K	o	o
1114	dpMB	o	o	c.684C>T:1193M	o	o	o	o	o	o
1151	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1154	dpMB	o	o	o	o	o	o	c.1350T>G: N427K	o	o
1162	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1181	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
dpMB9	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
dpMB10	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
dpMB11	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
dpMB12	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
dpMB13	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
dpMB14	dpMB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
384	MB	o	o	o	o	o	o	c.1276A>G: I403V	o	o
392	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1051	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1052	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1055	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1056	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1059	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1060	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1064	MB	o	o	o	o	o	o	c.1350T>G: N427K	o	o
1065	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1068	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1069	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1070	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1071	MB	o	o	c.684C>T:1193M	o	o	o	o	o	o
1072	MB	o	o	o	o	o	o	o	c.1588G>T: A507S	o
1075	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1077	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1078	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1079	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1087	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1088	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1092	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1097	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1098	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1101	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1103	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1104	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1106	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1111	MB	o	o	o	o	c.953A>C: N295T	o	c.1350T>G: N427K	o	o
1116	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1152	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1153	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1155	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1164	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1165	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1175	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1176	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1177	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1178	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1179	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
MB9	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
MB11	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
MB13	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
MB14	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
MB15	MB	o	o	o	o	o	o	o	o	o
1099	MMB	o	o	c.684C>T:1193M	o	o	o	o	o	o
stP2	stP	o	o	c.684C>T:1193M	o	o	o	o	o	o
stP3	stP	o	o	o	o	o	o	o	o	o
stP4	stP	o	o	o	o	o	o	o	o	o
stP5	stP	o	o	o	o	o	o	o	o	o

Tab. 4: Ergebnisse der *BTRC*-Mutationsanalyse in Basalzellkarzinomen der Haut. o, keine detektierbare Veränderung.

Tumor Nr.	<i>BTRC1</i> [#]	<i>BTRC2</i>	<i>BTRC3</i>	<i>BTRC4</i>	<i>BTRC5</i>	<i>BTRC6</i>	<i>BTRC7</i>	<i>BTRC8</i>	<i>BTRC9</i>
BCC1	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC2	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC3	o	o	c.684C>T:193M	o	o	o	o	o	o
BCC7	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC8	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC9	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC10	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC11	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC12	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC13	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC14	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC15	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC16	o	o	c.684C>T:193M	o	o	o	o	o	o
BCC17	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC18	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC19	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC20	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC21	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC22	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC23	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC24	o	o	o	o	o	o	o	o	o
BCC25	o	o	o	o	o	o	o	c.1588G>T: A507S	o
BCC26	o	o	c.684C>T:193M	o	o	o	o	o	o
BCC27	o	o	c.684C>T:193M	o	o	o	o	o	o
BCC28	o	o	o	o	o	o	o	o	o

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen an *GLI1*, *GLI2* und *GLI3*

Die Entwicklung eines komplexen Organismus aus einzelnen Zellen setzt voraus, daß die Zellproliferation in strukturierte, planvolle Bahnen gelenkt wird. Diese Aufgabe wird von verschiedenen koordinierenden Signalkaskaden übernommen. Sie bestehen aus einem Netzwerk von Genen, deren Wechselwirkungen zueinander die planmäßige Entwicklung und den Aufbau des Körpers erst möglich machen. Schäden gleich welcher Art in einem Gen einer solchen Signalkaskade können nicht nur Störungen in diesem, sondern auch in assoziierten Pfaden auslösen. Derartige Ereignisse gehen dann oft, sofern sie überhaupt mit dem Leben vereinbar sind, mit Fehlbildungen oder Tumoren einher. Um dem Ziel der Verhinderung bzw. der Therapie solcher Veränderungen näher zu kommen, ist es unabdingbar, die zugrundeliegenden pathogenetischen Zusammenhänge zu verstehen und festzustellen, welche Gene bei bestimmten Krankheitsbildern betroffen sind (125).

Ein für die embryonale Entwicklung und das Wachstum verschiedener Organsysteme, wie zum Beispiel des ZNS, der Gliedmaßen, der Haut, der Lunge, des Darms, der Zähne oder der Haarfollikel, stellt der Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweg dar (62, 64). Seine Funktionsweise und seine wesentlichen Komponenten wurden bereits in der Einleitung dieser Arbeit erläutert. Zusammenfassend dargestellt entfaltet der Ligand Sonic Hedgehog nach Abspaltung eines C-terminalen Restes seine Aktivität an der Zielzelle über einen Rezeptorkomplex aus zwei Transmembranproteinen, Ptch und Smoh. Das Signal wird über eine für Vertebraten noch nicht vollständig aufgeklärte zytoplasmatische Proteinkaskade an den Zellkern weitergeleitet, wo es zur Aktivierung der Shh Zielgene kommt (130). In zahlreichen Untersuchungen konnte insbesondere für Shh selbst, wie auch für die beiden membranständigen Rezeptoren Ptch und Smoh, bereits deren Bedeutung für verschiedene Entwicklungsstörungen und Tumoren gezeigt werden. So führt ein Verlust der Shh Funktion durch ererbte Mutationen zu Holoprosenzephalie (7, 68, 80, 99). Des Weiteren entwickeln transgene Mäuse, die Shh in der Haut überproduzieren, Basalzellkarzinom-artige Tumoren (23, 81). Mutationen von *PTCH* spielen in der Tumorgenese eine große Rolle. Sie stellen als Keimbahnmutationen die Ursache des Goltz-Gorlin-Syndromes dar (35). Außerdem sind somatische *PTCH* Mutationen in einem erheblichen Anteil sporadischer Basaliome und Medulloblastome (134), sowie bei Meningeomen, Fibrosarkomen, ovariellen Fibromen, Rhabdomyosarkomen und cardialen Fibromen beschrieben worden (130). Aktivierende

SMOH Mutationen führen, ähnlich wie inaktivierende *PTCH* Mutationen, zu einer Hochregulation der Shh-Zielgene. Derartige Mutationen wurden in sporadischen Basaliomen und Medulloblastomen (96) wie auch in anderen primitiven neuroektodermalen Tumoren (130) beschrieben.

Im Gegensatz zu der Vielzahl von Erkenntnissen über diese Gene ist die genaue Funktionsweise der weiter unten in der Signalkaskade agierenden Komponenten schlechter verstanden. Auch in diesem Bereich des Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweges sind prä- oder posttranslationale Veränderungen jedoch von großer Bedeutung.

So stellt das *GLI1*-Gen ein wichtiges Zielgen des Shh Signaltransduktionsweges dar; das essentiell für die Übermittlung des Signals in den Zellkern ist. Von Nilsson *et al.* (2000) (77) konnte die Induktion von Hauttumoren durch erhöhte Gli1 Level gezeigt werden. In transgenen Mäusen, die Gli1 unter einem Keratin 5 Promotor in der Haut überexprimieren, gelang die Induktion von Basalzellkarzinomen und Trichoepitheliomen (77). Weiterhin kann ektopt produziertes Gli1 im hinteren Mittelhirn von transgenen Mäusen die Effekte von Shh simulieren und zur Aktivierung von Neuralrohrmarkern, wie *Ptch*, *Hnf-3 β* oder *Shh* führen. Außerdem hat Gli1 eine proliferationsfördernde Wirkung (43, 64). Ektope Expression von Gli1 in der embryonalen Epidermis von Fröschen führt zu Tumoren, die konstitutiv Gli1 produzieren (17). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass Basalzellkarzinome des Menschen eine konstitutive Überexpression zeigen (17, 28, 32, 96). Von Ghali *et al.* (1999) (28) wurde vermutet, daß intrazelluläres Gli1 als Transkriptionsfaktor seine eigene Aktivität kontrollieren kann. Von Dahmane *et al.* (1997) (17) wurde beschrieben, daß eine Mutation von *SMOH* oder *PTCH*, die zu einer Überaktivierung von Gli1 führt, BCCs auslöst. Die Autoren dieser Studie, wie auch Green *et al.* (32) kamen daher zu dem Schluß, daß Gli1 eine Schlüsselrolle in der Tumorentstehung spielen muss. Es wurde zuerst als amplifiziertes Gen in Gliomen beschrieben (52), konnte aber inzwischen auch in einigen anderen Tumoren amplifiziert nachgewiesen werden (64). Unter Anderem für die in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten Basalzellkarzinome wurde, wie auch für *PTCH* (134), eine Überexpression, jedoch keine Amplifikation für *GLI1* beschrieben (17, 96). In normalem Gewebe wurde Gli1 nach Abschluss der Organentwicklung bisher nur im Hoden, im Myometrium und im Eileiter, in der Maus auch im Hirn nachgewiesen (59).

Die eigene Arbeit sollte einen Beitrag zu der Frage liefern, ob neben den bereits bekannten Mutationen der membranständigen Rezeptoren *PTCH* und *SMOH*, mit einer resultierenden Aktivierung des Shh Signaltransduktionsweges mit Überexpression von *GLI1*, auch Veränderungen der weiter unten in der Signalkaskade gelegenen Komponenten an der Pathogenese von Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen beteiligt sind.

4.1.1 Ergebnisse der Mutationsanalyse von *GLI1*

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Serie sporadischer Basalzellkarzinome der Haut und primitiver neuroektodermaler Tumoren des ZNS auf Mutationen im *GLI1*-Gen hin untersucht. Die identische Tumorserie war bereits auf *PTCH* (134) und *SMOH* Mutationen (96) überprüft worden (95). Die beschriebene Überexpression von *GLI1* in Basalzellkarzinomen (17) konnte für das hier untersuchte Tumorkollektiv bereits in einer früheren Arbeit bestätigt werden (96). Mutationsanalysen von *GLI1* ergaben jedoch keine Mutation im gesamten überprüften Genbereich in Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen. Wegen der Größe des Gens wurde die Suche nach Mutationen allerdings auf die konservierten und funktionell bedeutsamen Bereiche der Promotorregion sowie der Zink-Finger-Region beschränkt. Eventuelle Mutationen in anderen Bereichen, die gegebenenfalls zu einer Konformationsänderung und damit einer Aktivitätsänderung des Transkriptionsfaktors führen, können also nicht sicher ausgeschlossen werden. Darüber hinaus kann wegen der immer noch recht kleinen Fallzahl eine Mutation in der Promotor- oder Zink-Finger-Region von *GLI1* als sehr seltenes Ereignis nicht ausgeschlossen werden.

Wie erwähnt, wurde *GLI1* zuerst als amplifiziertes Gen in Gliomen beschrieben (52). Anstatt einer aktivierenden Mutation in *GLI1* könnte also auch in Basalzellkarzinomen und primitiven neuroektodermalen Tumoren eine Amplifikation vorliegen, die zur Überexpression führt und daher für die Überaktivität verantwortlich sein könnte. Die Vorarbeit von Reifenberger *et al.* (96) zeigt jedoch, dass in Basalzellkarzinomen keine Amplifikation von *GLI1* vorliegt. Insgesamt sprechen die zur Zeit vorliegenden molekularen Befunde somit dafür, dass *GLI1* zwar ein mögliches Zielgen der aberranten Aktivierung des Shh-Signalweges in Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen darstellt, selbst aber offenbar nicht durch direkte genetische Veränderungen betroffen ist.

Einige neuere Studien haben jedoch die Bedeutung von Gli1 in der Tumorentstehung etwas relativiert. So erscheinen transgene Mäuse mit Mutationen in Gli1 weitgehend normal und zeigen erst in Kombination mit Gli2 Mutationen Defekte im Shh-Signalweg (83). Von Weiner *et al.* (2002) (129) konnte durch retrovirale Shh-Applikation ins Kleinhirn die Entstehung von Medulloblastomen auch in *GLI1* Null-mutanten Mäusen gezeigt werden, also Tumorentstehung unabhängig von *GLI1*. Die Autoren dieser Studie gehen davon aus, dass *GLI1* keine Schlüsselrolle in der Tumorgenese im Kleinhirn der Maus spielt, sondern dass Veränderungen auf Höhe der Rezeptoren oder durch Shh selbst über eine Aktivierung der Signalkaskade die Tumorentstehung verursachen. Die auch im hier verwendeten Tumorkollektiv nachgewiesene Überexpression von *GLI1* (96) wäre somit lediglich als Resultat einer Shh-Kaskadenaktivierung und nicht als Ursache der Tumorentstehung zu verstehen. Regl *et al.* (2002) (98) zeigten einen positiven Rückkopplungsmechanismus für *GLI2* und *GLI1*. In einem *in vitro* Modell konnte in menschlichen Keratinozyten gezeigt

werden, dass die Expression von Gli1 zu einer Induktion von zwei Gli2 Isoformen führt, welche in Basalzellkarzinomen überexprimiert sind. Es konnte weiter gezeigt werden, dass *GLI1* ein direktes Ziel von Gli2 ist, also Gli2 unmittelbar Gli1 induziert, während die Aktivierung von Gli2 durch Gli1 indirekt erfolgt. Die Expression von Gli1 oder Gli2 führte zu einer erhöhten DNA-Synthese (98). Andere Autoren (45) berichteten, dass Gli2 an den *GLI1* Promotor bindet. Von Sheng *et al.* (2002) (108) wurde in einem transgenen Mäusemodell durch eine Aktivierung von Gli2 eine spezifische Basalzellkarzinomentstehung induziert. Nach Abspaltung eines NH₂-terminalen Fragmentes von Gli2 konnten Gli1-ähnliche Effekte imitiert werden, hier entstanden durch Überaktivierung jedoch verschiedene Hauttumore, großteilig Trichoblastome, seltener Cylindrome und basaloide folliculäre Hamartome und in wenigen Fällen Basalzellkarzinome (108). Diese Arbeit wird durch ähnliche Ergebnisse in der Studie von Nilsson *et al.* (2000) (77) bestätigt. Somit würde die Gli2 Überaktivierung für die BCC Entstehung verantwortlich sein und zusätzlich eine *GLI1* Überexpression verursachen (98, 108). Weiter untermauert wird diese Erklärung durch die Ergebnisse von Bai *et al.* (2002) (5), hier konnte mittels *GLI1* nullmutanten und *PTCH/GLI1* doppelmutanten Mäusen gezeigt werden, dass Gli1 weder für die Signalübermittlung des Shh Signaltransduktionsweges in der Entwicklung noch für die (fehlerhafte) dauerhafte Signalübermittlung bei Ausfall der Ptch Hemmung verantwortlich ist. Vielmehr wird das Signal durch Gli2 übermittelt (5). Dazu passt auch das Ergebnis der hier vorliegenden Studie, in der gezeigt werden konnte, dass alle untersuchten Basalzellkarzinome und zwei Drittel der PNETs *GLI2* im Verhältnis zum mituntersuchtem Referenzgewebe überexprimieren.

Vor diesem sich während der Arbeit neu entwickelnden Hintergrund erscheint das Ergebnis der Mutationsanalyse von Gli1 nunmehr nicht überraschend, sondern gliedert sich in die bestehende Hypothese einer prädominierenden Bedeutung von Gli2 für die Shh Signaltransduktion gut ein.

4.1.2 Funktionelle Bedeutung der verschiedenen Gli Proteine

Exprimiert man humane *GLI*-Gene in *Drosophila*, so sieht man für Gli1 und Gli2 Hh-abhängige Aktivatorfunktionen, für Gli2 zusätzlich eine nicht Hh-abhängige, und für Gli3 eine Hh-abhängige Repressorfunktion (3). Für Gli2 und Gli3, aber nicht für Gli1, wurden für die N-terminale Hälfte Repressordomänen beschrieben, für Gli2 für den C-terminalen Teil zusätzlich noch eine Aktivator-domäne (104). In transgenen Mäusen kann durch Abtrennung der Repressordomäne aktiviertes Gli2 die zellulären Effekte von Shh simulieren (104). In einer anderen Arbeit (120) wurden vier verschiedene Isoformen von Gli2 untersucht, welche durch alternatives Splicen der mRNA generiert wurden. Insbesondere die Gli2 β Form,

welche eine Aktivator- aber keine Repressordomäne enthält, ist dabei in Basalzellkarzinomen überexprimiert (120).

Im Gegensatz zu den beiden Shh-Zielgenen *GLI1* und *GLI2* unterdrücken sich Gli3 und Shh gegenseitig (12, 29, 44, 62, 126). Motoyama *et al.* (2003) (73) konnten an *PTCH* Nullmutanten und *GLI2/GLI3/PTCH* Trippelmutanten zeigen, dass Gli2 essentiell für die ventrale Spezifikation im kaudalen Neuralrohr ist und dass in mehr rostral gelegenen Regionen Gli3 die ventrale Spezifikation ermöglicht, wenn Gli2 nicht vorhanden ist. Somit weisen Gli2 und Gli3 überlappende, jedoch spezifische Funktionen in der Übermittlung des Shh Signals entlang der rostro-caudalen Achse des Neuralrohres auf (73). Sieht man diese Ergebnisse vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der verschiedenen Komponenten, so entsteht ein Modell für einen Shh gesteuerten Rückkopplungsmechanismus. Es entsteht im Endeffekt ein anterior-posteriorer Gli3-Repressorgradient, durch den die Langstreckensignalgebung von Shh auf einen kontrollierten Bereich eingeschränkt wird (123, 126). Das vom Notochord kommende Shh Signal erreicht nach diesem Modell die Neuralplatte, die ventral in großen Bereichen exprimierten Proteine Gli2 und Gli3 werden daraufhin in ihre aktive Form umgewandelt und führen dann zu einer Aktivierung der Transkription von bestimmten Zielgenen inklusive *GLI1* (104). Dieses Modell wird durch Mutationsstudien an transgenen Mäusen gestützt, an denen die Bedeutung von Gli3 als Shh Repressor, von Gli2 als Übermittler des Shh Signals und von *GLI1* als Zielgen gezeigt werden konnte (83).

Eine Störung dieses Mechanismus hat erhebliche Auswirkungen auf den Organismus: Ähnlich wie *SHH*^{-/-} mutante Mäuse unterliegen auch *GLI2*^{-/-} mutante Mäuse einer Störung der Haarfollikelentwicklung mit reduzierter Zellproliferation. Zusätzlich wird Shh erheblich überexprimiert. Umgekehrt löst eine *GLI2*-daueraktivierende Mutation bei *SHH*^{-/-} mutanten Mäusen Shh-abhängige Genexpression und Zellproliferation aus (66). Beim Menschen wurden Mutationen von *GLI2* bei Patienten mit Holoprosenzephalie beschrieben, ähnlich wie für *SHH* Mutationen (100).

Transgene Mäuse mit *GLI3* Mutationen zeigen eine Polydaktylie und schwere Defekte im dorsalen ZNS. Diese werden in *GLI1/GLI3* Doppelmutanten nicht weiter verstärkt (83). Beim Menschen sind Mutationen von *GLI3* als Ursache für einige Syndrome gezeigt worden. Das Greig Cephalopolysyndaktyliesyndrom (GCPS), das Pallister Hall Syndrom (PHS), sowie die postaxiale Polydaktylie Typ A (PAP-A) werden durch verkürzte Formen von Gli3 ausgelöst, das Greig Cephalopolysyndaktyliesyndrom zusätzlich durch inaktivierende Gli3 Punktmutationen, wie bereits in der Einleitung näher dargestellt (8, 103, 131, 139).

Aufgrund dieser Befunde und der komplexen Interaktion zwischen den verschiedenen Gli-Proteinen ist es besonders interessant festzustellen, ob Veränderungen der Expression von *GLI2* oder *GLI3* in Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen vorliegen.

4.1.3 Ergebnisse der Expressionsanalyse von *GLI2* und *GLI3*

In der eigenen Untersuchung wurden Basalzellkarzinome und Medulloblastome auf mRNA-Expression von *GLI2* und *GLI3* mittels RT-PCR hin untersucht. In gesunder adulter Haut konnte keine *GLI2* Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Mehrheit der untersuchten Tumoren eine unterschiedlich starke *GLI2* mRNA Expression. Von 22 untersuchten Basalzellkarzinome exprimierten 21 *GLI2*. Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Ergebnissen von Grachtchouk *et al.* (30) sowie Ruiz-i-Altaba *et al.* (103). In der Arbeit von Tojo *et al.* (120) exprimieren sogar alle 15 untersuchten Basalzellkarzinome *GLI2* vermehrt. In anderen Hauttumoren konnte dagegen keine erhöhte *GLI2* Expression nachgewiesen werden (120). Dazu passend wurde in der Arbeit von Sheng *et al.* (108) in einem transgenen Mausmodell durch die Überexpression von Gli2 unter einem Keratin 5 Promotor in der Haut spezifisch die Entstehung von Tumoren induziert, die von ihrem Verhalten und ihrer Histologie Basalzellkarzinomen sehr ähnlich sind. In Verbindung mit der oben vorgestellten Funktion von Gli2 als Shh Mediator, der in seiner aktiven Form unter anderem die *GLI1* Expression fördert (44, 104), reihen sich die Ergebnisse dieser Arbeit in die auch von anderen Arbeitsgruppen (5, 98, 108, 120) favorisierte Meinung ein. Die Gli2 Überexpression ist nach diesen Ergebnissen bei der Entstehung von Basalzellkarzinomen über eine Aktivierung der Shh-Signalkaskade ein entscheidender Faktor. Folgt man dieser Überlegung, so sollte man annehmen, dass infolge der Gli2 Überexpression auch *GLI1* überexprimiert wird. In der Tat konnte von Regl *et al.* (98) in einem retroviralen *in vitro* Modell eine fünffach erhöhte *GLI1* mRNA Expression durch erhöhte *GLI2* Expression nachgewiesen werden. Die für das eigene Tumorkollektiv bereits veröffentlichten *GLI1* mRNA-Expressionsdaten (96) zeigen, dass auch *GLI1* in der Mehrheit der Basalzellkarzinome überexprimiert wird, d. h. sich die Ergebnisse also mit den Ergebnissen anderer Gruppen in diesem Punkt decken. Die Korrelation zwischen *GLI1* und *GLI2* Expression ergab, dass alle Fälle mit sehr starker *GLI2* mRNA Expression auch eine starke bis sehr starke Hochregulation der *GLI1* mRNA aufwiesen. Unsere Expressionsdaten unterstützen somit das in anderen Arbeiten (98, 104, 108) diskutierte Modell der Transkriptionsaktivierung von *GLI1* und anderen Proteinen durch aktiviertes Gli2.

Allerdings zeigte von den Basalzellkarzinomen mit schwacher *GLI2* Expression ein Teil starke bis sehr starke *GLI1* Signale, nur ein Teil der Tumoren zeigte schwache Signale für *GLI2* und *GLI1*. Für das Abweichen von diesem Modell von sechs BCCs gibt es verschiedene Erklärungen. In der Arbeit von Dahmane *et al.* (17) überexprimieren ebenfalls

fast alle BCCs *GLI1* mit deutlichen Schwankungen in der Expressionsstärke. Dies wird auf Unterschiede im Tumormaterial zurückgeführt. Nach Dahmane *et al.* (17) liegt die Stelle höchster *GLI1* Expression innerhalb eines Tumors in der Peripherie des Knotens, dort wo sich die meisten proliferierenden Zellen befinden. Es wäre also denkbar, daß bei einem etwas unterschiedlichen Expressionsmuster von *GLI1* und *GLI2* zufällig Stellen der Tumore mit geringer *GLI2* und starker *GLI1* Expression untersucht wurden, obwohl auch *GLI2* unmittelbar im Tumorknoten exprimiert wird (45). Unterschiede im Tumorgrad, also u.a. der Proliferationsgeschwindigkeit, die für unterschiedliche Expressionsstärken verantwortlich gemacht werden, wie in (111) beschrieben, spielen für BCCs keine Rolle, da es keine Tumorgrade bei BCCs gibt. In (120) wurde von einer Überexpression vor allem einer Gli2 β Isoform innerhalb der BCCs berichtet, welche über die Aktivator-domäne verfügt, bei der die Repressorfunktion jedoch nicht vorhanden ist. Inwieweit sich diese Isoform von Wildtyp Gli2 in Hinsicht auf die Aktivierung von Gli1 auswirkt, ist zurzeit unklar, die Aktivierung von Gli1 durch Gli2 erfolgt durch Bindung an den *GLI1* Promotor (45). Des Weiteren sind auch von Gli1 verschiedene Isoformen bekannt, dabei findet man in proliferierendem Gewebe und BCCs ausschließlich die kürzere γ -Form überexprimiert, während normalerweise auch die längeren α - und β -Formen exprimiert werden (127). Die unterschiedlichen Wirkungsweisen der Isoformen sind jedoch weitgehend unbekannt. Als wahrscheinlich kann allerdings auch vermutet werden, daß nicht nur Gli2 allein, sondern noch weitere Faktoren in die Gli1 Regulation eingreifen, welche z.B. in einem *in vitro* Modell wie (98) nicht miteingefasst werden. So zeigen z. B. in der hier untersuchten Tumorserie von den sechs BCCs mit wesentlich stärkerem *GLI1* Signal fünf deaktivierende Mutationen in *PTCH* (134).

In nichtneoplastischem adultem Kleinhirngewebe ließen sich *GLI2* Transskripte nicht nachweisen. Aus der Gruppe der untersuchten Medulloblastome und supratentoriellen PNETs exprimierten etwa zwei Drittel (9 von 15) der Tumoren *GLI2*, also im Vergleich zu den Basalzellkarzinomen deutlich weniger Tumoren. Vergleichbare Studien liegen bisher für *GLI2* nicht vor, allerdings wurde von Xiao *et al.* (137) die Expression von *GLI1* in ZNS Tumoren untersucht, wobei in einem Kollektiv von unterschiedlichen Tumoren des ZNS nur eine minimale Expression von *GLI1* festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis steht im klaren Gegensatz zu den Ergebnissen in diesem Kollektiv, bei dem von 15 untersuchten Medulloblastomen und supratentoriellen PNETs neun Tumoren *GLI1* überexprimierten (96). Vergleicht man die Expression von *GLI2* und *GLI1* in den einzelnen Tumoren, so zeigt sich in fast allen Fällen eine gleichartige Hochregulation der Transskripte. Von den drei Tumoren mit der stärksten *GLI2* Expression zeigten zwei eine starke *GLI1* Expression, ein Tumor exprimierte *GLI1* normal. Von den 6 Tumoren ohne *GLI2* Signal zeigten ein Tumor ein starkes und ein Tumor ein schwaches Signal für *GLI1*, die übrigen 4 wiesen für *GLI1* ebenfalls kein Signal auf. Im Gegensatz zu *GLI2* wurde *GLI3* sowohl in unveränderter adulter

Haut, als auch in nichtneoplastischem adultem Kleinhirngewebe exprimiert. Wie oben erwähnt, bestehen Unterschiede in der Regulation von Gli2 und Gli3. Während *GLI2* ein Shh-Zielgen darstellt, unterdrücken sich Shh als Mediator für Zellproliferation und Gli3 als Repressor dieser Aktivität unter physiologischen Bedingungen gegenseitig (12, 29, 44, 62, 126), so dass *in vivo* der erwähnte anterior-posteriore Gli3-Repressorgradient entsteht (126). In proliferierendem Gewebe sollte also nach dieser Überlegung die Expression von *GLI3* durch das Shh Signal erniedrigt werden (62). Dies war allerdings weder in den untersuchten Basalzellkarzinomen noch in den Medulloblastomen und supratentoriellen PNETs der Fall. Alle untersuchten Basalzellkarzinome exprimierten *GLI3*, 10 davon stärker als das Referenzgewebe. Analog dazu konnte von Green *et al.* (32) eine *GLI3* mRNA Expression sowohl mittels RT-PCR als auch mittels *in situ* Hybridisation in Basalzellkarzinomen nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu gelang es Dahmane *et al.* (17) mittels RT-PCR nur in zwei Drittel der untersuchten BCCs eine schwache *GLI3* Expression nachzuweisen. Interessant ist nun die Frage, warum Gli3 nicht als Repressor eines aktivierten Shh Signaltransduktionsweges herunterreguliert ist, sondern im Gegenteil eine teilweise deutliche Überexpression zeigt. Es könnten posttranslationale Mechanismen vorliegen, welche nur durch Untersuchungen auf Proteinebene aufzudecken wären. Andererseits fungiert Gli3 nach Motoyama *et al.* (2003) (73) jedoch in Abwesenheit von Gli2 als Vermittler des Shh Signals und ermöglicht im rostralen Neuralrohr eine ventrale Zelldifferenzierung. Bei einer anzunehmenden Aktivierung des Shh Signaltransduktionsweges in BCCs und PNETs wäre somit auch eine Hochregulation von Gli3 denkbar. Möglicherweise stellt diese Überexpression jedoch auch den Versuch des Gewebes dar, den Effekten einer veränderten, zu hohen Transkriptionsaktivität entgegenzuwirken, möglicherweise ist sie nur Ausdruck einer „aus den Fugen geratenen“ transkriptionellen Steuerung. Noch ausgeprägter als bei den Basalzellkarzinomen überexprimierten die PNETs *GLI3*. 12 von 15 untersuchten Tumoren zeigten ein stärkeres Signal für *GLI3* im Vergleich zu unverändertem Kleinhirngewebe. Es liegen zur Zeit keine Referenzuntersuchungen in dieser oder einer ähnlichen Tumorgruppe vor, die Bedeutung von Gli3 in der Entwicklung des Neuralrohres als Repressor des Shh Signals (12, 29, 44, 57, 123, 126) bzw. als Mediator im rostralen Teil (73) lassen jedoch vermuten, daß hier ähnliche Mechanismen zugrunde liegen dürften, wie oben für die BCCs beschrieben.

4.2 Ergebnisse der Mutations- und Expressionsanalyse von *BTRC*

Die Ubiquitin-abhängige Proteolyse durch das Proteosom spielt in einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie der Zellteilung, der Transkription und der Signalübertragung, eine wesentliche Rolle. Dabei wird das Zielprotein zuerst durch Phosphorylierung markiert. Das phosphorylierte Protein wird dann in einem Prozess, der drei Proteine benötigt, erkannt und ubiquitiniert. Zuerst wird Ubiquitin an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1, Abb. 15) in einer ATP-abhängigen Reaktion angehängt, so dass eine energiereiche Thiolester-Bindung entsteht. Anschließend wird das Ubiquitin dann vom E1-Protein auf das Protein E2 übertragen und mit Hilfe des Proteins E3 (blau markiert, Abb. 15) an das Zielprotein angelagert (Abb. 15). Weitere Ubiquitinreste können dann an die bereits vorhandene Ubiquitinmarkierung des Zielproteins angehängt werden, so dass eine Poly-Ubiquitinkette entsteht. Dieses poly-ubiquitinierte Protein wird dann durch das 26S Proteasom erkannt und degradiert. Das E3 Protein ist bei diesem Prozess in den meisten Fällen für die spezifische Erkennung des Zielproteins zuständig (60).

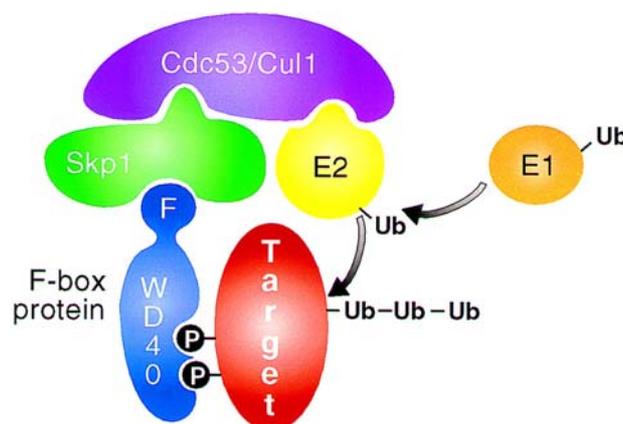


Abb. 15: Zusammensetzung und Funktion des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes (für Details siehe Text; Abb. nach Maniatis *et al.* (60).

In dem hier in Abb. 15 exemplarisch dargestellten SCF (Skp1, Cdc53/Cul1, E-Box)-Ubiquitin-Ligase-Komplex dient Cdc53/Cul1 als Gerüst, um Skp1 und ein spezifisches E2-Protein in räumliche Nähe zu bringen. Das Skp1-Protein wiederum interagiert mit einem F-Box Protein durch dessen F-Box-Domäne. Eine zweite proteinbindende Domäne des F-Box-Proteins, die WD40-Domäne, bindet spezifisch an das zur Degradation bestimmte Protein. In den letzten Jahren konnte eine größere Zahl dieser F-Box-Proteine identifiziert werden, die für die spezifische Erkennung der abzubauenen Proteine verantwortlich sind. Dazu zählen das *Drosophila* Slimb-Protein und sein humanes Homolog Btrc. Neuere Studien bringen Slimb und sein humanes Homolog Btrc mit der Regulation von drei verschiedenen Signalwegen in

Verbindung, dem Hedgehog Signalweg in *Drosophila*, sowie dem Wnt und NF- κ B Signalweg in Vertebraten. Als gemeinsames Merkmal weisen alle drei Signalwege die Signal-abhängige Phosphorylierung und Ubiquitinierung eines regulatorischen Proteins, seine Bindung an Slimb/Btrc und schließlich seinen Abbau durch das Proteasom auf. In *Drosophila* führt die Abwesenheit von Slimb zu einer Anreicherung von Cubitus interruptus, dem Effektorprotein des Hedgehog Signalweges (60). In Vertebratenzellen spielt Btrc eine bedeutende Rolle im Abbau der wichtigen regulatorischen Proteine des NF- κ B- und Wnt-Signaltransduktionsweges, I κ B α und β -Catenin (58, 60, 133, 140). Infolgedessen führt der Verlust der Btrc-Funktion zu einer Stabilisierung von β -Catenin und damit zu einer Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges (58).

Das humane *BTRC*-Gen kartiert auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q24), einer Region, die häufig sowohl in Gliomen, Prostata- und Schilddrüsentumoren (24) als auch in Medulloblastomen (92) Allelverluste ausweist. Gerstein *et al.* (27) konnte die Expression von aberranten *BTRC*-Deletionstranskripten in einer Prostata-Tumor-Zelllinie und in einem Prostata-Tumor-Xenograft nachweisen, wobei in beiden Fällen keine Mutationen in den Adenomatosis Polyposis Coli (*APC*) oder β -Catenin (*CTNNB1*) Genen vorhanden waren. Die Prostata-Tumor-Zelllinie zeigte ein nucleär erhöhtes β -Catenin Level, welcher darauf schließen lässt, dass die *BTRC* Veränderung den Wnt-Signaltransduktionsweg aktiviert.

In dieser Arbeit wurde ein Tumorkollektiv aus 66 primitiven neuroektodermalen Tumoren des ZNS und 25 Basalzellkarzinomen der Haut auf Mutationen in und aberranter Expression von *BTRC* untersucht. *BTRC* scheint ein interessantes Kandidatengen für diese Tumorserie zu sein, denn (i) trägt die Mehrzahl der BCCs Mutationen in Genen des Shh-Signalweges (88, 96, 109, 117, 134), (ii) konnten bisher in Medulloblastomen Mutationen in verschiedenen Genen des Shh- und Wnt-Signalweges nachgewiesen werden (41, 53, 88, 96, 117, 134) und (iii) zeigen Medulloblastome häufig Chromosom 10-Deletionen (71, 92). Im Gegensatz zu den Daten in Prostatakarzinomen konnten wir jedoch keine *BTRC* Mutationen in den untersuchten 66 PNETs und 25 BCCs identifizieren. Darüber hinaus zeigt keines der PNETs und BCCs einen Verlust der *BTRC* mRNA Expression (135). Damit bestätigen diese Ergebnisse die Daten von Taylor *et al.* (117), die ebenfalls keine *BTRC* Mutationen in 36 untersuchten Medulloblastomen fanden. Außerdem war *BTRC* weder in malignen Melanomen mutiert (94) noch in einer Serie von 42 verschiedenen Zelllinien und 48 primären Tumorproben unterschiedlicher Typen deletiert oder genomisch umgeordnet (14). Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass *BTRC* nur selten in humanen Tumoren verändert ist. Man könnte spekulieren, dass die mögliche Konsequenz einer Btrc Inaktivierung, nämlich die Störung von verschiedenen Signalwegen, nicht zu einem

selektiven Wachstumsvorteil führt oder möglicherweise nicht vereinbar mit dem Überleben der meisten Zelltypen ist.

4.3 Ergebnisse der Expressionsanalyse von *IGF2*

Der Shh-Signaltransduktionsweg stellt keine in sich abgeschlossene, unabhängige Einheit dar, sondern ist im Gegenteil Teil eines komplexen Netzwerkes aus einer Vielzahl sich gegenseitig beeinflussender Komponenten, deren aufeinander abgestimmtes Zusammenwirken eine regelhafte Entwicklung garantiert.

Ein Genprodukt, welches in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist, ist der Insulin-like Growth Factor II (*Igf2*). *Igf2* ist ein wichtiger Modulator in der Muskelentwicklung und – differenzierung (89), als auch ein Mitogen für eine Reihe unterschiedlicher Zelltypen (84). In zahlreichen sporadischen Tumoren wurde eine Überexpression von *IGF2* beschrieben (32, 74, 107, 116, 132). Einen Zusammenhang zwischen *IGF2*-Überexpression und einem aktivierten Shh-Signalweg konnte Hahn *et al.* (36) in *PTCH*-heterozygoten „*knock-out*“-Mäusen nachweisen. So zeigten diese *PTCH*^{neo76/+}-Mäuse nicht nur in ihren Rhabdomyosarkomen und Medulloblastomen, sondern bereits als Embryo, eine Überexpression von *IGF2*. In den *PTCH*^{neo76/+}-Mäusen ist *Igf2* sogar zwingend für die Tumorenstehung notwendig, denn in doppelt-heterozygoten „*Knock-out*“-Mäusen (*PTCH*^{neo76/+} *IGF2*^{+/-}) waren keine Tumore nachweisbar. Hahn *et al.* (36) konnte ausschließen, dass die *IGF2*-Überexpression durch einen Verlust des Imprintings des maternalen Allels oder durch eine Amplifikation des *IGF2*-Locus auf Chromosom 11 verursacht wird.

Um die Frage zu beantworten, ob auch in primären humanen Tumoren eine Überexpression von *IGF2* im Zusammenhang mit einem aktivierten Shh-Signaltransduktionsweg steht, wurde eine Expressionsanalyse für *IGF2* in dem oben beschriebenen Tumorkollektiv aus Basalzellkarzinomen und PNETs durchgeführt.

Alle untersuchten 22 BCCs und 15 PNETs dieser Studie exprimieren *IGF2*-mRNA. Eine Überexpression (Verhältnis der *IGF2*-Expression im Tumor zur Expression in nicht-neoplastischem Kontrollgewebe ≥ 2) konnte jedoch nur in drei BCCs nachgewiesen werden. Das Vorhandensein einer *PTCH*-Mutation in den BCCs korreliert auch nicht mit der *IGF2*-Expression in den Tumoren (Student's T-Test, $p = 0,6425$). Bei den PNETs zeigten sogar 8 der 15 untersuchten Tumoren eine Unterexpression von *IGF2* (Verhältnis der *IGF2*-Expression im Tumor zur Expression in nicht-neoplastischem Kontrollgewebe $\leq 0,5$). Die

anderen 7 PNETs wiesen ein *IGF2*-Transkriptlevel ähnlich dem in normalem Kleinhirngewebe auf.

Die von Hahn *et al.* (36) nachgewiesene Überexpression von *IGF2* in Zusammenhang mit einer Aktivierung des Shh-Signalweges in Rhabdomyosarkomen und Medulloblastomen von *PTCH^{neo76/+}*-Mäusen konnte in dieser Arbeit in diesem Ausmaße nicht an sporadischen humanen Medulloblastomen und BCCs bestätigt werden. Möglicherweise lassen sich die von Hahn *et al.* (36) an Mäusen gewonnenen Daten nicht ohne weiteres auf humane Medulloblastome übertragen. Neuere Studien weisen darauf hin, dass eine aberrante Aktivierung des Shh-Signalweges vornehmlich in der Pathogenese der desmoplastischen Medulloblastome eine wichtige Rolle spielt (88). In unserer PNET-Tumorserie befinden sich aber nur 6 desmoplastische Medulloblastome, von denen eines eine mögliche Aktivierung des Shh-Signalweges aufweist (*SMOH*-Mutation und höchsten Expressionswert des Shh-Effektors *GLI2*). Fünf dieser 6 dpMBs gehören immerhin zu den Tumoren, mit den höchsten *IGF2*-Expressionsleveln (Expressionslevel von 0,8 bis 1,2 im Vergleich zur Expression in nicht-neoplastischem Kleinhirngewebe). Unterschiede in den Studienergebnissen können allerdings auch darauf zurückzuführen sein, dass die unterschiedlichen Shh-Zielgene gewebespezifisch exprimiert werden. Eine Überexpression von *IGF2* in Rhabdomyosarkomen lässt daher nicht zwangsläufig auf eine Überexpression des Gens in Medulloblastomen des Kleinhirns und BCCs der Haut rückschließen. Möglicherweise wird *IGF2* in normalem Kleinhirngewebe und gesunder Haut aber auch schon deutlich höher exprimiert als im gesunden Muskelgewebe, so dass bei Normalisierung der Expressionswerte selbst bei gleich hoher Expression in den verschiedenen Tumoren die relative Expression in den Kleinhirn- und Hauttumoren niedriger wäre. Dies ließe sich nur durch einen direkten Vergleich der *IGF2*-Expression in den verschiedenen gesunden Geweben klären.

5 Zusammenfassung

Die aberrante Aktivierung des Sonic Hedgehog Signaltransduktionsweges spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Basalzellkarzinomen der Haut und primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) des zentralen Nervensystems, darunter insbesondere den Medulloblastomen des Kleinhirns. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass diese aberrante Aktivierung entweder durch inaktivierende Mutationen im Tumorsuppressorgen *PTCH* oder durch aktivierende Punktmutationen im Protoonkogen *SMOH* bedingt sein kann. Die Genprodukte dieser beiden Gene bilden gemeinsam den membranständigen Rezeptor für das Sonic Hedgehog (Shh) Signalmolekül. Allerdings sind Mutationen von *PTCH* oder *SMOH* nur in etwa zwei Drittel der sporadischen Basalzellkarzinome und lediglich 10-15% der Medulloblastome nachweisbar, d.h. ein Teil dieser Tumoren zeigt keine Veränderungen in diesen Genen, obwohl wichtige Zielgene des Shh-Signalweges, wie z.B. *GLI1* und *PTCH*, in diesen Tumoren überexprimiert sind.

Ein wesentliches Ziel der eigenen Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob in Basalzellkarzinomen und PNETs möglicherweise Mutationen in zwei anderen Genen (*GLI1* und *BTRC*) vorliegen, die für die intrazelluläre Weiterleitung des Shh-Signals wichtig sind. Hierzu wurde zunächst ein Tumorkollektiv von 31 Basalzellkarzinomen und 17 PNETs auf das Vorliegen von Mutationen in der Promotorregion und der Zinkfingerregion des *GLI1*-Gens hin untersucht. Es konnten zwei bisher nicht beschriebene Sequenzpolymorphismen in den untersuchten Genregionen nachgewiesen werden. In keinem der Tumoren fand sich jedoch eine *GLI1*-Mutation, so dass davon auszugehen ist, dass Mutationen der Promotor- und Zinkfingerregion von *GLI1* nicht für die beobachtete Überexpression von *GLI1* in Tumoren ohne *PTCH*- oder *SMOH*-Mutationen verantwortlich sind. Die molekulare Analyse des *BTRC*-Gens erfolgte an insgesamt 25 Basalzellkarzinomen und 66 PNETs. Es wurden wiederum mehrere neue Sequenzpolymorphismen aber keine Tumor-assoziierten somatischen Mutationen identifiziert, so dass auch *BTRC* in diesen Tumoren nicht von Mutationen betroffen ist. In einem weiteren Projektteil wurde die Expression der Gene *GLI2*, *GLI3* und *IGF2* auf Transkriptebene in 22 Basalzellkarzinomen und 15 PNETs semiquantitativ bestimmt. Hierbei zeigte sich eine Überexpression von *GLI2* mRNA in der Mehrheit der Basalzellkarzinome und PNETs im Vergleich zu normaler Haut bzw. normalem Kleinhirngewebe. Die Expression von *GLI3*- und *IGF2*-Transkripten war dagegen von Tumor zu Tumor variabel, wobei *GLI3* in drei Medulloblastomen und *IGF2* in keinem der untersuchten Tumoren eine starke Überexpression zeigte. Signifikante Assoziationen

zwischen der Expressionsstärke dieser Gene und Mutationen in den Genen *PTCH* oder *SMOH* ließen sich in der analysierten Tumorserie nicht nachweisen.

Zusammenfassend sprechen die eigenen Ergebnisse dafür, dass Mutationen der Gene *GLI1* und *BTRC* in der molekularen Pathogenese von Basalzellkarzinomen der Haut und primitiven neuroektodermalen Tumoren des Gehirns keine wesentliche Rolle spielen. Die häufige Überexpression von *GLI2* mRNA deutet darauf hin, dass in diesen Tumoren nicht nur *GLI1* sondern auch *GLI2* ein wichtiges Zielgen des Shh-Signalweges darstellt. Da sich für *GLI3* und *IGF2* keine signifikante Überexpression auf mRNA-Ebene in Basalzellkarzinomen und PNETs nachweisen ließ, scheinen diese beiden Gene nicht durch die aberrante Aktivierung des Shh-Signalweges in diesen Tumoren transkriptionell aktiviert zu werden. Insgesamt stellen die eigenen Ergebnisse einen wichtigen Fortschritt auf dem Weg zur molekularen Charakterisierung der Rolle des Shh-Signalweges in Basalzellkarzinomen der Haut und zentralnervösen PNETs dar. Weitergehende Analysen müssen zeigen, ob möglicherweise genetische Veränderungen im *GLI2*-Gen oder in anderen, bislang nicht untersuchten Genen des Shh-Signalweges in diesen Tumoren vorliegen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Alexandre C, Jacinto A, Ingham PW (1996) Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev* 10:2003–2013.
- 2 Aza-Blanc P, Kornberg TB (1999) Ci: a complex transducer of the hedgehog signal. *Trends Genet* 15:458–462.
- 3 Aza-Blanc P, Lin HY, Ruiz i Altaba A, Kornberg TB (2000) Expression of the vertebrate Gli proteins in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* 127:4293–4301.
- 4 Aza-Blanc P, Ramirez-Weber FA, Laget MP, Schwartz C, Kornberg TB (1997) Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89:1043–1053.
- 5 Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL (2002) Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signalling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 129:4753–4761.
- 6 Basset-Seguín N, Moles JP, Mils V, Dereure O, Guilhou JJ (1994) TP53 tumor suppressor gene and skin cancerogenesis. *J Invest Dermatol* 103:102S–106S.
- 7 Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW (1996) Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:353–356.
- 8 Biesecker LG (1997) Strike three for GLI3. *Nat Genet* 17:259–260.
- 9 Bisceglia M, D'Angelo V, Parisi S, Lelli G, Pasquinelli G, Cenacchi G, Giangaspero F (2000) Primary tumors of the central nervous system: histogenetic classification, grade of malignity, clinico-pathologic features and therapeutic criteria. *Pathologica* 92:534-561.
- 10 Brash DE, Ziegler A, Jonason AS, Simon JA, Kunala S, Leffell DJ (1996) Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1:136-42.
- 11 Brewster R, Mullor JL, Ruiz i Altaba A (2000) Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development* 127:4395–4405.
- 12 Buscher D, Ruther U (1998) Expression profile of Gli family members and Shh in normal and mutant mouse limb development. *Dev Dyn* 211:88–96.
- 13 Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407–413.

- 14 Chiaur DS, Murthy S, Cenciarelli C, Parks W, Loda M, Inghirami G, Demetrick D, Pagano M (2000) Five human genes encoding F-box proteins: chromosome mapping and analysis in human tumors. *Cytogenet Cell Genet* 88:255–258.
- 15 Chuang PT, McMahon AP (1999) Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397:617–621.
- 16 Cohen MM Jr (2003) The hedgehog signalling network. *Am J Med Genet* 123A:5–28.
- 17 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* 389:876–880.
- 18 Dahmane N, Ruiz-i-Altaba A (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development* 126:3089–3100.
- 19 Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S (1999) Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J Biol Chem* 274:8143–8152.
- 20 Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C (1999) Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol* 9:1119–1122.
- 21 Dominguez M, Brunner M, Hafen E, Basler K (1996) Sending and receiving the hedgehog signal: control by the *Drosophila* Gli protein Cubitus interruptus. *Science* 272:1621–1625.
- 22 Ericson J, Muhr J, Jessell TM, Edlund T (1995) Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. *Int J Dev Biol* 39:809–816.
- 23 Fan H, Oro, AE, Scott, MP, Khavari PA (1997) Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. *Nat Med* 3:788–792.
- 24 Fujiwara T, Suzuki M, Tanigami A, Ikenoue T, Omata M, Chiba T, Tanaka K (1999) The BTRC gene, encoding a human F-Box/WD40-repeat protein, maps to chromosome 10q24-q25. *Genomics* 58:104–105.
- 25 Fuse N, Maiti T, Wang B, Porter JA, Hall TM, Leahy DJ, Beachy PA (1999) Sonic hedgehog protein signals not as a hydrolytic enzyme but as an apparent ligand for patched. *Proc Natl Acad Sci* 96:10992–10999.
- 26 Gailani MR, Bale AE (1997) Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst* 89:1103–1109.
- 27 Gerstein AV, Almeida TA, Zhao G, Chess E, Shih IeM, Buhler K, Pienta K, Rubin MA, Vessella R, Papadopoulos N (2002) APC/CTNNB1 (beta-catenin) pathway alterations in human prostate cancers. *Genes Chrom Cancer* 34:9–16.
- 28 Ghali L, Wong ST, Green J, Tidman N, Quinn AG (1999) Gli1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulation of mesenchymal cells in normal human skin. *J Invest Dermatol* 113:595–599.

- 29 Goodrich LV, Scott MP (1998) Hedgehog and patched in neural development and disease. *Neuron* 21:1243–1257.
- 30 Grachtchouk M, Mo R, Yu S, Zhang X, Sasaki H, Hui CC, Dlugosz AA (2000) Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. *Nat Genet* 24:216–217.
- 31 Gray SG, Eriksson T, Ekstrom C, Holm S, von Schweinitz D, Kogner P, Sandstedt B, Pietsch T, Ekstrom TJ (2000) Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. *Br J Cancer* 82:1561-1567.
- 32 Green J, Leigh IM, Poulson R, Quinn AG (1998) Basal cell carcinoma development is associated with induction of the expression of the transcription factor Gli-1. *Br J Dermatol* 139:911–915.
- 33 Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54:4855–4878.
- 34 Grossman D, Leffell DJ (1997) The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. *Arch Dermatol* 13:1263–1270.
- 35 Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulous PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE (1996) Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* 85:841–851.
- 36 Hahn H, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, Potter D, Zimmer A, Muller U, Samson E, Quintanilla-Martinez L, Zimmer A (2000) Patched target *Igf2* is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem* 275:28341–28344.
- 37 Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G, Zimmer A (1998) Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med* 4:619–622.
- 38 Hepker J, Wang QT, Motzny CK, Holmgren R, Orenic TV (1997) *Drosophila cubitus interruptus* forms a negative feedback loop with patched and regulates expression of Hedgehog target genes. *Development* 124:549–558.
- 39 High A, Zedan W (2005) Basal cell nevus syndrome. *Curr Opin Oncol* 17:160-66.
- 40 Hogan DJ, To T, Gran L, Wong D, Lane PR (1989) Risk factors for basal cell carcinoma. *Int J Dermatol* 28:591–594.
- 41 Huang H, Mahler-Araujo BM, Sankila A, Chimelli L, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000) APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol* 2:433-437.
- 42 Hui CC, Slusarski D, Platt KA, Holmgren R, Joyner AL (1994) Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli2* and *Gli3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol* 162:402–413.

- 43 Hynes M, Stone DM, Dowd M, Pitts-Meek S, Goddard A, Gurney A, Rosenthal A (1997) Control of cell pattern in the neural tube by the zinc-finger transcription factor and oncogene Gli1. *Neuron* 19:15–26.
- 44 I Altaba AR (1998) Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by sonic hedgehog. *Development* 125:2203–2212.
- 45 Ikram MS, Neill GW, Regl G, Eichberger T, Frischauf AM, Aberger F, Quinn A, Philpott M (2004) GLI2 is expressed in normal human epidermis and BCC and induces GLI1 expression by binding to its promoter. *J Invest Dermatol* 122:1503–1509.
- 46 Ingham PW (1998) Transducing Hedgehog: the story so far. *Embo J* 17:3505–3511.
- 47 Ingham PW, McMahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059–3087.
- 48 Jiang J, Struhl G (1998) Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-Box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 391:493–496.
- 49 Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272:1668–1671.
- 50 Johnson RL, Scott MP (1998) New players and puzzles in the Hedgehog signaling pathway. *Curr Opin Genet Dev* 8:450–456.
- 51 Katsuura M, Hosono-Sakuma Y, Wagatsuma M, Yanagisawa S, Okazaki M, Kimura M (1999) The NH2-terminal region of the active domain of sonic hedgehog is necessary for its signal transduction. *FEBS Lett* 447:325–328.
- 52 Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B (1987) Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236:70–73.
- 53 Koch A, Waha A, Tonn JC, Sorensen N, Berthold F, Wolter M, Reifenberger J, Hartmann W, Friedl W, Reifenberger G, Wiestler OD, Pietsch T (2001) Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer* 93:445–449.
- 54 Krickler A, Armstrong BK, English DR, Heenan PJ (1991) Pigmentary and cutaneous risk factors for non-melanocytic skin cancer--a case-control study. *Int J Cancer* 48:650–662.
- 55 Lear JT, Tan BB, Smith AG, Bowers W, Jones PW, Heagerty AH, Strange RC, Fryer AA (1997) Risk factors for basal cell carcinoma in the UK: case-control study in 806 patients. *J R Soc Med* 90:371–374.
- 56 Lee CS, Buttitta L, Fan CM (2001) Evidence that the WNT-inductible growth arrest specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:11347–11352.
- 57 Litingtung Y, Chiang C (2000) Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci* 3:979–985.

- 58 Liu C, Kato Y; Zhang Z, Do VM, Yankner BA, He X (1999) beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates *Xenopus* axis formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6273–6278.
- 59 Liu CZ, Yang JT, Yoon JW, Villavicencio E, Pfendler K, Walterhouse D, Iannaccone P (1998) Characterization of the promoter region and genomic organization of *GLI*, a member of the Sonic hedgehog-Patched signaling pathway. *Gene* 209:1–11.
- 60 Maniatis T (1999) A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signalling pathways. *Genes Dev* 13:505–510.
- 61 Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ (1996) Biochemical evidence, that patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 384:176–179.
- 62 Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ (1996) Sonic hedgehog differentially regulates expression of *GLI1* and *GLI3* during limb development. *Dev. Biol.* 180:273–283.
- 63 Marino S (2005) Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med* 11:17–22.
- 64 Matisse MP, Joyner AL (1999) Gli genes in development and cancer. *Oncogene* 18:7852–7859.
- 65 Methot N, Basler K (1999) Hedgehog controls limb development by regulating the activities of distinct transcriptional activator and repressor forms of *Cubitus interruptus*. *Cell* 96:819–831.
- 66 Mill P, Mo R, Fu H, Grachtchouk M, Kim PC, Dlugosz AA, Hui CC (2003) Sonic hedgehog-dependent activation of *Gli2* is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev* 17:282–294.
- 67 Miller SJ (1991) Biology of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 24:1–13, 161–175.
- 68 Ming JE, Roessler E, Muenke M (1998) Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Mol Med Today* 4:343–349.
- 69 Miyaki M (1998) Imprinting and colorectal cancer. *Nat Med* 4:1236–1237.
- 70 Mohler J (1988) Requirements for hedgehog, a segment polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* 120:1061–1072.
- 71 Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A (1997) *DMBT1*, a new member of the *SRCR* superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet* 17:32–39.
- 72 Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC (1998) Essential function of *Gli2* and *Gli3* in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 20:54–57.
- 73 Motoyama J, Milenkovic L, Iwama M, Shikata Y, Scott MP, Hui CC (2003) Differential requirement for *Gli2* and *Gli3* in ventral neural cell fate specification. *Dev Biol* 259:150–161.

- 74 Muller S, Zirkel D, Westphal M, Zumkeller W (2000) Genomic imprinting of IGF2 and H19 in human meningiomas. *Eur J Cancer* 36:651–655.
- 75 Murone M, Rosenthal A, de Sauvage FJ (1999) Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr Biol* 9:76–84.
- 76 Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371:297–300.
- 77 Nilsson M, Unden AB, Krause D, Malmqwist U, Raza K, Zaphiropoulos PG, Toftgard R (2000) Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI1. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3438–3443.
- 78 Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795–801.
- 79 O'Dell SD, Day IN (1998) Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* 30:767–777.
- 80 Odent S, Attie-Bitach T, Blayau M, Mathieu M, Aug J, Delezo de AL, Gall JY, Le Marec B, Munnich A, David V, Vekemans M (1999) Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 8:1683–1689.
- 81 Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH Jr, Scott MP (1997) Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science* 276:817–821.
- 82 Owens DM, Watt FM (2003) Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nature Rev Cancer* 3:444–451.
- 83 Park HL, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL (2000) Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 127:1593–1605.
- 84 Pedone PV, Tirabosco R, Cavazzana AO, Ungaro P, Basso G, Luksch R, Carli M, Bruni CB, Frunzio R, Riccio A (1994) Mono- and bi-allelic expression of insulin-like growth factor II gene in human muscle tumors. *Hum Mol Genet* 3:1117–1121.
- 85 Perez-Losada J, Balmain A (2003) Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat Rev Cancer* 3:434–443.
- 86 Persson M, Stamatakis D, te Welscher P, Andersson E, Bose J, Ruther U, Ericson J, Briscoe J (2002) Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes Dev* 16:2865–2878.
- 87 Pietsch T, Taylor MD, Rutka JT (2004) Molecular pathogenesis of childhood brain tumors. *J Neurooncol* 70:203–15.
- 88 Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sorensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N, Wolf HK, von Deimling A, Wainwright B, Chenevix-Trench G, Wiestler OD, Wicking C (1997) Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res* 57:2085–2088.

- 89 Prelle K, Wobus AM, Krebs O, Blum WF, Wolf E (2000) Overexpression of insulin-like growth factor-II in mouse embryonic stem cells promotes myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 277:631–638.
- 90 Rady P, Scinicariello F, Wagner RF, Tying SK (1992) P53 mutations in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 52:3804–3906.
- 91 Rassner G (2000) *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas*; 6. Auflage; Urban und Fischer Verlag München; Jena.
- 92 Reardon DA, Michalkiewicz E, Boyett JM, Sublett JE, Entrekin RE, Ragsdale ST, Valentine MB, Behm FG, Li H, Heideman RL, Kun LE, Shapiro DN, Look AT (1997) Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 57:4042–4047.
- 93 Reifenberger J (2004) Hereditäre Tumorsyndrome; Kutane Manifestationen und molekulare Pathogenese am Beispiel des Gorlin- und Cowden-Syndroms. *Hautarzt* 55:942-951.
- 94 Reifenberger J, Knobbe CB, Wolter M, Blaschke B, Schulte KW, Pietsch T, Ruzicka T, Reifenberger G (2002) Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the WNT signalling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. *Int J Cancer* 100:549–556.
- 95 Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T, Reifenberger G (2005) Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 152:43-51.
- 96 Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, Reifenberger 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* 58:1798–1803.
- 97 Reik W, Maher ER (1997) Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 13:330–334.
- 98 Regl G, Neill GW, Eichberger T, Kasper M, Ikram MS, Koller J, Hintner H, Quinn AG, Frischauf AM, Aberger F (2002) Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinomas. *Oncogene* 21:5529–5539.
- 99 Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M (1996) Mutations in the human Sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:357–360.
- 100 Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillesen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Ruiz i Altaba A, Muenke M (2003) Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13424-13429.
- 101 Rood BR, Macdonald TJ, Packer RJ (2004) Current treatment of medulloblastoma: recent advances and future challenges. *Semin Oncol* 31:666-75.
- 102 Ruiz i Altaba A (1997) Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell* 90:193–196.

- 103 Ruiz i Altaba A (1999) Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet* 15:418–425.
- 104 Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H (1999) Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126:3915–3924.
- 105 Schofield D, West DC, Anthony DC, Marshal R, Sklar J (1995) Correlation of loss of heterozygosity at chromosome 9q with histological subtype in medulloblastomas. *Am J Pathol* 146:472–80.
- 106 Schweitzer R, Vogan KJ, Tabin CJ (2000) Similar expression and regulation of Gli2 and Gli3 in the chick limb bud. *Mech Dev* 98:171–174.
- 107 Schwienbacher C, Angioni A, Scelfo R, Veronese A, Calin GA, Massazza G, Hatada I, Barbanti-Brodano G, Negrini M (2000) Abnormal RNA expression of 11p15 imprinted genes and kidney developmental genes in Wilms' tumor. *Cancer Res* 60:1521–1525.
- 108 Sheng H, Goich S, Wang A, Grachtchoug M, Lowe L, Mo R, Lin K, de Sauvage FJ, Sasaki H, Hui CC, Dlugosz AA (2002) Dissecting the oncogenetic potential of Gli2: deletion of an NH(2)-terminal fragment alters skin tumor phenotype. *Cancer Res* 62:5308-5316.
- 109 Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C, Wainwright BJ (1999) Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumor suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet* 8:291–297.
- 110 Spevak W, Keiper BD, Stratowa C, Castanon MJ (1993) *Saccharomyces cerevisiae* cdc15 mutants arrested at a late stage in anaphase are rescued by *Xenopus* cDNAs encoding N-ras or a protein with beta-transducin repeats. *Mol Cell Biol* 13:4953–4966.
- 111 Stein U, Eder C, Karsten U, Haensch W, Walther W, Schlag PM (1999) GLI gene expression in bone and soft tissue sarcomas of adult patients correlates with tumor grade. *Cancer Res* 59:1890–1895.
- 112 Stockfleth E, Ulrich C, Hauschild A, Lischner S, Meyer T, Christophers E (2002) Successful treatment of basal cell carcinomas in a nevoid basal cell carcinoma syndrome with topical 5% imiquimod. *Eur J Dermatol* 12:569–572.
- 113 Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A (1999) Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci* 23:4437–4448.
- 114 Suzuki H, Wang B, Shivji GM, Toto P, Amerio P, Tomai MA, Miller RL, Saunderson DN (2000) Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 114:135–141.
- 115 Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418:892–896.

- 116 Takano Y, Shiota G, Kawasaki H (2000) Analysis of genomic imprinting of insulin-like growth factor 2 in colorectal cancer. *Oncology* 59:210–216.
- 117 Taylor MD, Liu L, Raffel CC, Hui C, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D (2002) Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 31:306–310.
- 118 Theil T, Kaesler S, Grotewold L, Bose J, Ruther U (1999) Gli genes and limb development. *Cell Tissue Res* 296:75–83.
- 119 Theodosiou NA, Zhang S, Wang WY, Xu T (1998) *Slimb* coordinates *wg* and *dpp* expression in the dorsal-ventral and anterior-posterior axes during limb development. *Development* 125:3411–3416.
- 120 Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K, Nakamura K, Kaneko F (2003) Expression of the *GLI2* oncogene and its isoforms in human basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 148:892–897.
- 121 Urbach F. Ultraviolet radiation and skin cancer. Aus: Smith KC. (1984) *Top. Photomedicine*, Plenum Press, NY pp67 – 104.
- 122 van der Schroeff JG, Evers LM, Boot AJ, Bos JL (1990) Ras oncogene mutations in basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of the human skin. *J Invest Dermatol* 94:423–425.
- 123 von Mering C, Basler K (1999) Distinct and regulated activities of human Gli proteins in *Drosophila*. *Curr Biol* 9:1319–1322.
- 124 von Ohlen T, Lessing D, Nusse R, Hooper JE (1997) Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 94:2404–2409.
- 125 Walterhouse DO, Yoon JW, Iannaccone PM (1999) Developmental pathways: Sonic hedgehog-Patched-Gli. *Environ Health Perspect* 107:167-171.
- 126 Wang B, Fallon JF, Beachy PA (2000) Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423–434.
- 127 Wang XQ, Rothnagel JA (2001) Post-transcriptional regulation of the Gli1 oncogene by the expression of alternative 5' untranslated regions. *J Biol Chem* 276:1311–1316.
- 128 Weggen S, Bayer TA, von Deimling A, Reifenberger G, von Schweinitz D, Wiestler OD, Pietsch T (2000) Low frequency of SV40, JC and BK polyomavirus sequences in human medulloblastomas, meningiomas and ependymomas. *Brain Pathol* 10:85-92.
- 129 Weiner HL, Bakst R, Hurlbert MS, Ruggiero J, Ahn E, Lee WS, Stephen D, Zagzag D, Joyner AL, Turnbull DH (2002) Induction of medulloblastomas in mice by sonic hedgehog, independent of Gli1. *Cancer Res* 62:6385–6389.
- 130 Wicking C, Smyth I, Bale A (1999) The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* 18:7844–7851.

- 131 Wild A, Kalff-Suske M, Vortkamp A, Bornholdt D, König R, Grzeschik KH (1997) Point mutations in human *GLI3* cause Greig syndrome. *Hum Mol Genet* 6:1979–1984.
- 132 Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oligny LL, Deal C (2000) Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2048–2056.
- 133 Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW (1999) The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B α and β -catenin and stimulates I κ B α ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13:270-283.
- 134 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* 57:2581–2585.
- 135 Wolter M, Scharwächter C, Reifenberger J, Koch A, Pietsch T, Reifenberger G (2003) Absence of detectable alterations in the putative tumor suppressor gene *BTRC* in cerebellar medulloblastomas and cutaneous basal cell carcinomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 106:287-90.
- 136 World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics, Tumours of the Nervous System. Edited by Paul Kleihues and Welster K. Covuelli, 2000.
- 137 Xiao H, Goldthwait DA, Mapstone T (1994) A search for gli expression in tumors of the central nervous system. *Pediatr Neurosurg* 20:178–182.
- 138 Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH Jr, de Sauvage FJ (1998) Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391:90–92.
- 139 Yang JT, Liu CZ, Villavicencio EH, Yoon JW, Walterhouse D, Iannaccone PM (1997) Expression of human *Gli* in mice results in failure to thrive, early death and patchy Hirschsprung-like gastrointestinal dilatation. *Mol Med* 3:826–835.
- 140 Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y (1998) Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature* 396:590-594.
- 141 Yin XL, Pang JC, Ng HK (2002) Identification of a region of homozygous deletion on 8p22-23.1 in medulloblastoma. *Oncogene* 9:1461-8.
- 142 Zeng X, Goetz JA, Suber LM, Scott WJ jr, Schreiner CM, Robbins DJ (2001) A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411:716–720.
- 143 Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE, Brash DE (1993) Mutation hotspots due to sunlight in the *p53* gene of non melanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4216–4220.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb.	Abbildung
<i>aqua dest.</i>	Aqua destillata
BCC	Basalzellkarzinom
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpMB	desmoplastisches Medulloblastom
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
LOH	Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“)
M	mol/l=molar
MB	Medulloblastom
mb	Megabasenpaare
min	Minute
mRNA	Boten-RNA („messenger-RNA“)
Nr.	Nummer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
RNA	Ribonucleinsäure
sec	Sekunde
stP	supratentorieller PNET
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
Vol.	Volumen
WHO	World health organisation

8 Lebenslauf

Name: Klaus Christian Scharwächter
Geboren: 11. August 1974 in Solingen

Wohnhaft: Oberstr. 15
42655 Solingen

Konfession: evangelisch

Schullaufbahn:

1980-84: Grundschule Stübchen, Solingen
1984-93: Gymnasium Schwertstraße, Solingen

06/1993: Abitur, allgem. Hochschulreife

Wehrdienst:

07-10/1993: Marineversorgungsschule List, Sylt (Marinesanitäter)
11/93-06/94: Bundeswehrkrankenhaus Ulm

Studium:

1994-2000: Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2000-2001: Praktisches Jahr am städt. Krankenhaus Wuppertal und an der
University of Tasmania, Hobart, Universitätskrankenhaus

1998-2001: Experimenteller Teil der Promotionsarbeit zum Thema „Molekulargenetische
Analyse der Gene *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *BTRC* und *IGF2* in Medulloblastomen
und Basalzellkarzinomen“ am Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
(Doktorvater Prof. Dr. G. Reifenberger)

Ärztliche Tätigkeit:

01/02-07/03: Arzt im Praktikum
Abteilung für Radiologie, städt. Klinikum Wuppertal, seit 01/04 Helios
Klinikum Wuppertal, Chefarzt Prof. Dr. BM Cramer

Seit 08/03: Assistenzarzt
Abteilung für Radiologie, Helios Klinikum Wuppertal,
Chefarzt Prof. Dr. BM Cramer