

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

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. G. Reifenberger

**Expressionsanalyse von Genen
des Sonic Hedgehog Signalweges in
Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jörg Dümpelmann

2008

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Walter Stummer

"I WANDERED LONELY AS A CLOUD"

I wandered lonely as a cloud
That floats on high o'er vales and hills,
When all at once I saw a crowd,
A host, of golden daffodils;
Beside the lake, beneath the trees,
Fluttering and dancing in the breeze.

Continuous as the stars that shine
And twinkle on the milky way,
They stretched in never-ending line
Along the margin of a bay:
Ten thousand saw I at a glance,
Tossing their heads in sprightly dance.

The waves beside them danced; but they
Out-did the sparkling waves in glee:
A poet could not but be gay,
In such a jocund company:
I gazed--and gazed--but little thought
What wealth the show to me had brought:

For oft, when on my couch I lie
In vacant or in pensive mood,
They flash upon that inward eye
Which is the bliss of solitude;
And then my heart with pleasure fills,
And dances with the daffodils.

William Wordsworth, 1804

INHALTSVERZEICHNIS

1	 EINLEITUNG	5
1.1	Der Hedgehog-Signalweg	5
1.2	Aktivierung des Signalweges durch Hedgehog	6
1.3	Signalweiterleitung in der Zelle	7
1.4	Unterschiede im Hedgehog-Signalweg zwischen <i>Drosophila</i> und Vertebraten	10
1.5	Zielgene des Shh-Signalweges beim Menschen	11
1.6	Das Medulloblastom	12
1.7	Das Basalzellkarzinom	14
1.8	Ziele der Arbeit	15
2	 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Tumorgewebe	16
2.2	Umschreibung von mRNA in cDNA (cDNA-Synthese)	18
2.3	„Real-time“ Reverse Transkriptase (RT)-PCR	19
2.4	Statistische Auswertung	24
3	 ERGEBNISSE	25
3.1	mRNA Expressionsanalyse von Komponenten des Sonic-Hedgehog-Signalweges in Medulloblastomen und supratentoriellen PNETs	28
3.2	mRNA Expressionsanalyse von Komponenten des Sonic-Hedgehog-Signalweges in Basalzellkarzinomen	30
4	 DISKUSSION	35
4.1	mRNA-Expressionsprofil von Genen des Sonic-Hedgehog-Signalweges in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen	35
5	 LITERATURVERZEICHNIS	43
6	 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	52
7	 DANKSAGUNG	53
8	 CURRICULUM VITAE	54
9	 ZUSAMMENFASSUNG	55

1. EINLEITUNG

1.1 DER HEDGEHOG-SIGNALWEG

Der Hedgehog (Hh)-Signalweg ist ein wesentlicher und grundlegender Signaltransduktionsweg der Embryonalentwicklung in *Drosophila* und Vertebraten. Die korrekte Funktion dieses Signalweges spielt eine entscheidende Rolle für die Entwicklung vieler Körperzellen und Organe, wie z.B. dem Gehirn, dem Skelettsystem, der Haut, den Haaren, den Gonaden und der Lunge (Bellusci *et al.* 1997; Hardcastle *et al.* 1998; Marigo and Tabin, 1996; Riddle *et al.* 1993; St-Jacques *et al.* 1998). Eine gestörte Funktion wird in Zusammenhang mit unterschiedlichen Krankheitsbildern gebracht. Dazu gehören sowohl vererbte Erkrankungen wie das Gorlin- oder Basalzellnävussyndrom (Gorlin 1995) und die Holoprosenzephalie, als auch sporadische Tumorerkrankungen wie Medulloblastome und Basalzellkarzinome (Tabelle 1). Beim sporadisch auftretenden Basalzellkarzinom handelt es sich um die häufigste Hautkrebsvariante in der weißen Bevölkerung. In fast allen Basalzellkarzinomen findet sich eine Aktivierung des Hh-Signalweges, die ursächlich für die Entstehung dieser Hauttumore zu sein scheint (Dahmane *et al.* 1997).

Die Forschung am Hedgehog-Signalweg begann 1980 mit einem Mutationscreening an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* mit dem Ziel Segmentierungsgene zu identifizieren, die an der Embryonalentwicklung beteiligt sind (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Dabei konnten phänotypisch auffällige Fliegen mit einer stacheligen Kutikula isoliert werden. Das für diesen Phänotyp verantwortliche Gen wurde entsprechend als *Hedgehog* (Igel) bezeichnet. Viele homologe Komponenten des *Drosophila*-Signalweges wurden bisher auch im Menschen nachgewiesen (Goodrich *et al.* 1996; Hahn *et al.* 1996a). Mit der Entdeckung, dass Mutationen in *Patched* (*PTCH*), dem Rezeptormolekül für Hh, für die familiäre und sporadische Form des Basalzellkarzinoms verantwortlich sind, wurde der Beweis erbracht, dass Schlüsselemente dieses Signalweges direkt an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind (Hahn *et al.* 1996b; Johnson *et al.* 1996).

Tabelle 1: Ausgewählte Krankheitsbilder, die mit Aberrationen im Hedgehog-Signalweg in Verbindung stehen.

Krankheitsbild	betroffenes Gen*	Literatur
Basalzellnävus- oder Gorlin-Syndrom	<i>PTCH</i>	Hahn <i>et al.</i> 1996 b Johnson <i>et al.</i> 1996 Lench <i>et al.</i> 1997 Wicking <i>et al.</i> 1997
	<i>PTCH2</i>	Smyth <i>et al.</i> 1999 Xie <i>et al.</i> 1998
Basaliom oder Basalzellkarzinom	<i>PTCH</i>	Gailani <i>et al.</i> 1996 Johnson <i>et al.</i> 1996 Wolter <i>et al.</i> 1997 Reifenberger <i>et al.</i> 1998
	<i>PTCH2</i>	Smyth <i>et al.</i> 1999
	<i>SMOH</i>	Xie <i>et al.</i> 1998 Reifenberger <i>et al.</i> 1998
Medulloblastom	<i>PTCH</i>	Raffel <i>et al.</i> 1997 Wolter <i>et al.</i> 1997
	<i>PTCH2</i>	Smyth <i>et al.</i> 1999
	<i>SMOH</i>	Reifenberger <i>et al.</i> 1998
	<i>SUFUH</i>	Taylor <i>et al.</i> 2002
Primitive neuroektodermale Tumoren	<i>PTCH</i>	Wolter <i>et al.</i> 1997 Vorechovsky <i>et al.</i> 1997

**PTCH*: Patched; *PTCH2*: Patched 2; *SHH*: Sonic Hedgehog; *SMOH*: Smoothened; *SUFUH*, Suppressor of fused

1.2 AKTIVIERUNG DES SIGNALWEGES DURCH HEDGEHOG

Zentrales Protein des Signalweges ist Hedgehog. Das von der produzierenden Zelle sezernierte Hh-Protein unterliegt verschiedenen modifizierenden Prozessen, bevor es zu den Zielzellen transportiert wird. Es besteht aus zwei großen Domänen, einer Signaldomäne und einer katalytischen Domäne. Nur die Signaldomäne dient zur Signalweiterleitung. Die katalytische Domäne ist für die Autokatalyse des Hh-Proteins verantwortlich. Im Rahmen der Autokatalyse kommt es, über eine Esterbindung und unter Abspaltung des katalytischen Anteils, zu einer Anheftung eines Cholesterolrestes an das Hh-Protein. In einem weiteren Schritt wird über eine Amidbindung ein Palmitinsäurerest an das Hh-Protein angeheftet (Pepinsky *et al.* 1998). Diese beiden Modifikationen dienen letztlich dazu, das Hh-Protein

einerseits in der Doppellipidmembran der Zelle zu verankern und andererseits es über die Plasmamembran weiterzuleiten. Der Transport zu den Zielzellen erfolgt über drei Mechanismen.

1. Bildung eines wasserlöslichen Hh-Proteins (Zeng *et al.* 2001)

Um eine Signalweiterleitung zu ermöglichen muss das Hh-Protein in einer wasserlöslichen Form vorliegen. Die Modellvorstellung beruht darauf, dass das in der Plasmamembran verankerte Hh-Protein eine multimerische Struktur aufweist: Ähnlich der Mizellenbildung bei den Gallensalzen, wird der lipidlösliche Anteil ins Innere verlagert, so dass sich die hydrophilen Anteile an der Außenseite befinden und dadurch eine Signalweiterleitung im hydrophilen Milieu ermöglicht wird.

2. Lösung des in der Plasmamembran verankerten Hh-Proteins durch Dispatched (Burke *et al.* 1999; Ma *et al.* 2002)

Das Membranprotein Dispatched (Disp) weist strukturelle Ähnlichkeit mit dem Ptch-Molekül auf, aber die Funktionen von Disp und Ptch sind unterschiedlich. Disp dient dazu, das in der Plasmamembran verankerte Hh-Protein zu lösen und somit dessen Weiterleitung zu ermöglichen. Der genaue Mechanismus dieser Wirkungsweise von Dispatched ist noch unklar (Burke *et al.* 1999).

3. Diffusion des multimerischen Hh-Proteins mit Hilfe von Tout-velu (Ttv) (Bellaiche *et al.* 1998; The *et al.* 1999)

1.3 SIGNALWEITERLEITUNG IN DER ZELLE

Der Hh-Rezeptorkomplex in den Zielzellen besteht aus den beiden Transmembranproteinen Patched (Ptch) und Smoothend (Smo). In Abwesenheit von Hh inhibiert Ptch die Signaltransduktion, indem es die Aktivität des Smo-Proteins unterdrückt. Kommt es zur Bindung von Hh an seinen Rezeptor Ptch, führt dies zur Aufhebung der Inhibierung von Smo durch Ptch, so dass das Hh-Signal weitergeleitet werden kann. Da viele der funktionellen Studien in *Drosophila* und in Zellkultursystemen durchgeführt wurden, soll

im weiteren die Signalweiterleitung, wie sie aus der Fruchtfliege bekannt ist, erklärt werden (Abb.1).

Der genaue Interaktionsmechanismus zwischen den beiden Transmembranproteinen Ptch und Smo ist weitgehend unbekannt. Eine Modellvorstellung deutet eine aktivierende Wirkungsweise des Hedgehog-Proteins auf Smo an. Dabei kommt es zu einer Dissoziation des Ptch/Smo-Komplexes, durch das Hh-Protein. Ein weiteres Modell geht von einem diffundierenden Zwischenprotein aus, welches unter Abwesenheit von Hh die Signalweiterleitung über Smo verhindert. Die Bindung von Hh an Ptch führt zu einer Aktivitätsänderung des Ptch-Proteins, wodurch sich Smo ablöst und das Signal weiterleitet. Auch im letzten Fall wird davon ausgegangen, dass Ptch über ein Zwischenprotein eine katalytische Wirkung ausübt, welche Smo inhibiert. Bindet Hh an Ptch wird Smo aktiviert, indem es zur Dissoziation von Ptch und dem Zwischenprotein kommt (Bale und Yu, 2001).

Im Cytoplasma findet sich das Effektorprotein des Hh-Signalweges, der Zinkfingertranskriptionsfaktor Cubitus interruptus (Ci). Dieser bildet einen Komplex mit den Proteinen Fused (Fu) und Costal2 (Cos2). Bei Cos2 handelt es sich um ein Kinesin-ähnliches Mikrotubulusprotein, bei Fused um eine Serin/Threonin-Kinase. Dieser Multiproteinkomplex ist in Abwesenheit vom Hedgehog Protein an das Mikrotubulussystem der Zelle gebunden. Die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert Ci und markiert das Protein so für eine proteolytische Spaltung. Dabei wird Ci (155kD) in eine 75 kD-kleine Repressorform gespalten, die sich in den Nukleus bewegt. Dort hemmt die Repressorform die Transkription von Zielgenen des Hh-Signalweges (Cohen, 2003).

Bindet Hh aber an Ptch kommt es zur Phosphorylierung von Fu und Cos2, so dass sich der Multiproteinkomplex vom Mikrotubulussystem löst. Ci wird nicht mehr durch die PKA phosphoryliert und die unprozessierte Aktivatorform von Ci transloziert in den Nukleus und aktiviert dort als Transkriptionsfaktor die Zielgene des Hh-Signalweges.

Zwei weitere Proteine sind an der Signalweiterleitung beteiligt, Suppressor of Fused (SuFu) und Supernumerary limbs (Slimb). SuFu bindet an Fu und Ci. Dieser Komplex hält Ci im Cytoplasma zurück (Jia *et al.* 2003; Nybakken und Perrimon, 2002). Slimb, ein F-Box-Protein, ist verantwortlich für den proteosomalen Abbau von Ci (Cohen, 2003).

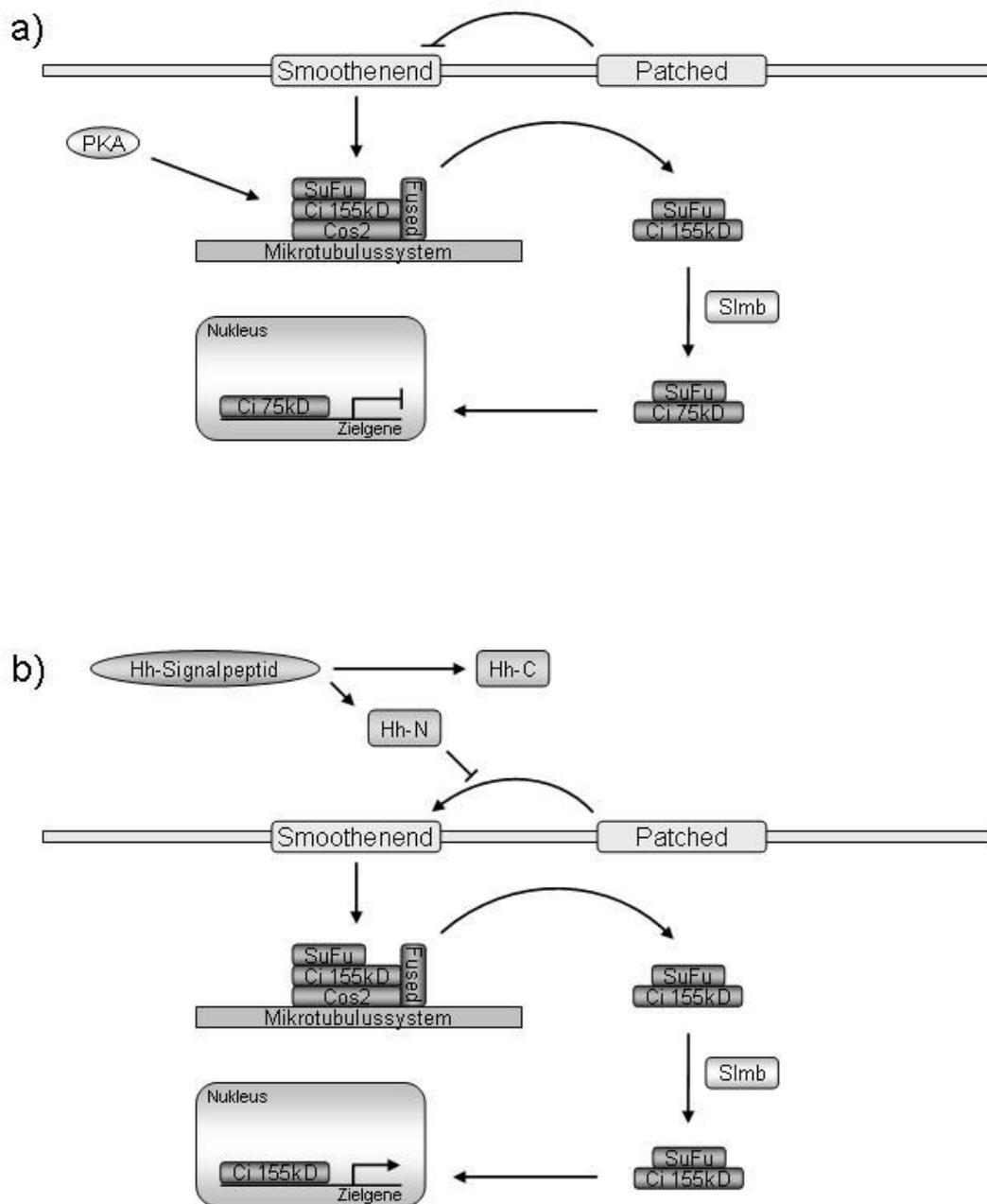


Abb.1: Der Hedgehog-Signaltransduktionsweg in *Drosophila*. a) In Abwesenheit von Hh inhibiert Ptc die Signalweiterleitung über Smo. Ci wird von der PKA phosphoryliert und die 75 kD-Repressorform von Ci transloziert in den Nukleus, wo sie die Expression der Hh-Zielgene hemmt. b) Durch eine autokatalytische Spaltung wird ein C-terminales und ein N-terminales Polypeptid aus Hh gebildet, wobei nur die Hh-N Form eine Signalfunktion besitzt. Die Bindung von Hh-N an den Rezeptorkomplex löst Smo aus der Inhibition durch Ptc und der Signalweg wird aktiviert. Ci wird aus dem Proteinkomplex freigesetzt und nicht länger phosphoryliert. Die Aktivatorform kann nun im Nukleus die Expression der Hh-Zielgene induzieren.

1.4 UNTERSCHIEDE IM HEDGEHOG-SIGNALWEG ZWISCHEN *DROSOPHILA* UND VERTEBRATEN

In Säugern konnten bisher drei Hedgehog-homologe Gene identifiziert werden: *Sonic Hedgehog (SHH)*, *Desert Hedgehog (DHH)* und *Indian Hedgehog (IHH)* (Echelard *et al.* 1993). *SHH* hat von den drei Morphogenen die größte Spannweite an biologischen Aufgaben und ist das einzige Hedgehog-Homolog, das im zentralen Nervensystem exprimiert wird. *Shh* ist für die Entwicklung des Gehirns, des Rückenmarks, der Hypophyse, der Gliedmaßen, der Lungen, des Darms und anderer Organe maßgeblich verantwortlich. *Ihh* ist an der Regulation der Knorpeldifferenzierung und dem Wachstum der langen Knochen beteiligt, während *Dhh* hauptsächlich bei der Entwicklung der männlichen Keimzellen eine Rolle spielt.

Vom *Ptc*-Protein finden sich in Vertebraten zwei Homologe, *Ptch* und *Ptch2*. Auch *Ptch2* ist ein Membranprotein, dessen Funktion allerdings bis heute weitgehend unklar ist. *Ptch2* wird vorzugsweise in der Haut und in den Hoden exprimiert und kann, wie *Ptch*, mit *Smo* einen Komplex bilden und die Hedgehog-Proteine binden. Während *PTCH* in über 60 % der sporadischen Basalzellkarzinome und in bis zu 20 % der Medulloblastome Mutationen aufweist, treten genetische Veränderungen in *PTCH2* in diesen Tumoren nur äußerst selten auf (Smyth *et al.* 1999).

Das Hedgehog-Interacting-Protein (*HIP*) wurde bisher nur in Vertebraten nachgewiesen. Es bindet direkt an alle drei bekannten Hedgehog-Proteine und führt, wie das *Ptch*-Protein, zu einer negativen Regulation der *Shh*-Signalkaskade (Chuang und McMahon, 1999). Ebenfalls wie das *PTCH*-Gen stellt *HIP* ein transkriptionelles Zielgen des *Shh*-Weges dar.

Das humane Homolog zum *Slimb*-Protein bei *Drosophila* stellt das β -transducin repeat-containing Protein (β TrCP, *BTRC*) dar. Das Gen ist auf 10q26 lokalisiert, einer chromosomalen Region, die häufig in Medulloblastomen Allelverluste aufweist (Mollenhauer *et al.* 1997; Reardon *et al.* 1997).

Cubitus interruptus (CI) stellt das *Drosophila* Homolog zur *GLI*-Genfamilie beim Menschen dar. In Vertebraten sind drei Zinkfingertranskriptionsfaktoren, *Gli1*, *Gli2* und *Gli3*, an der Weiterleitung des *Shh*-Signals beteiligt. *GLII* wurde bereits 1987 als amplifiziertes Gen in Glioblastomen beschrieben (Kinzler *et al.* 1987, 1988). Die Funktionen der drei Proteine sind unterschiedlich. *Gli1* ist ein Aktivator der Zielgene der *Shh*-Signalkaskade und besitzt nur aktivierende Wirkung. Für *Gli2* und *Gli3* konnten dagegen sowohl aktivierende als

auch inhibierende Eigenschaften nachgewiesen werden (Wang *et al.* 2000, Ingham and McMahon, 2001). Heute wird jedoch angenommen, dass Gli2 in Vertebraten im Gegensatz zu Gli1 die Hauptrolle für die Aktivierung der Zielgene des Shh-Signalweges durch die Inaktivierung des negativen Regulators Ptch spielt (Bai *et al.* 2002). Neueste Studien belegen diese These. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass einer der Hauptfaktoren zur Inhibierung der Apoptose, *BCL2*, Gli2-Bindungsstellen aufweist. Gli2 ist ein wesentlicher Aktivator von *BCL2* und sichert somit das Überleben der Zelle (Regl *et al.* 2002). Für Gli3 wurde eine Interaktion mit dem Suppressor of Fused (SuFuh) in Wirbeltieren und dem menschlichen Fused-Protein (Fu, STK36) beschrieben (Pearse *et al.* 1999; Murone *et al.* 2000). Im Mausmodell führt Shh zu einer verstärkten Produktion von Gli1 und Gli2 sowie einer verminderten Produktion von Gli3 (Ruiz i Altaba, 1999). Ebenso scheint Gli2 die Produktion von Gli1 zu fördern.

1.5 ZIELGENE DES SHH-SIGNALWEGES BEIM MENSCHEN

Aus Expressionsstudien in *Drosophila* und Untersuchungen an heterozygoten *PTCH* knock-out Mäusen sind eine Reihe von Genen bekannt, die durch das Shh-Signal aktiviert werden, wie *IGF2* (Ingram *et al.* 2002), *PDGFR α* (Xie *et al.* 2001), *FOXMI* (The *et al.* 2002), *CCNB1* (Barnes *et al.* 2001), *CCND2* (Yoon *et al.* 2002) und *NMYC* (Kenney *et al.* 2003). Von der Mehrzahl dieser Gene steht aber eine systematische Untersuchung der mRNA-Expressionsmuster in primären humanen Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen aus.

Der *Insulin-Wachstumsfaktor2* (*IGF2*) wird in Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen in *PTCH*^{+/-}-Mäusen verstärkt exprimiert und ist für die Entstehung dieser Tumoren zwingend notwendig. Da *IGF2* auch in nicht neoplastischem Gewebe von *PTCH*^{+/-}-Mäusen überexprimiert wird, besteht die Annahme, dass die Transkription von *IGF2* durch Ptch reguliert wird (Hahn *et al.* 2000).

Die Promotorregion des *Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor alpha* (*PDGFR α*)-Gens besitzt Gli1-Bindungsstellen und kann durch dieses Effektormolekül des Shh-Signalweges aktiviert werden. Eine deutlich erhöhte Expression von *PDGFR α* wurde bereits in murinen und humanen Basalzellkarzinomen beschrieben (Xie *et al.* 2001).

Die Forkhead Box-Proteine (Fox) spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Genen, die beim Zellwachstum, -proliferation, -differenzierung und -transformation von

Bedeutung sind. *FOXM1* ist ein Zielgen des Gli Transkriptionsfaktors im Shh-Signalweg. Es gibt drei verschiedene Transkript-Isoformen von *FOXM1*, wobei die *FOXM1b*-Isoform verstärkt in Glioblastomen (Liu *et al.* 2006) exprimiert wird und die Proliferation von Tumorzellen während der Entwicklung von Lungenkarzinomen stimuliert (Kim *et al.* 2006). Die Expression von *FOXM1* ist in Basalzellkarzinomen deutlich gegenüber der in normaler Haut erhöht (Teh *et al.* 2002). Außerdem führt Foxm1 zu einer erhöhten Expression von *CCNB1* (Leung *et al.* 2001). Die Cyclin-Proteinfamilie, zu der auch Cyclin B1 gehört, ist wesentlich an der Zellzyklusregulation beteiligt. Die zelluläre Lokalisation von Cyclin B1 ist von seiner Phosphorylierung abhängig. Im phosphorylierten Zustand befindet sich Cyclin B1 im Zellkern, unphosphoryliert liegt es im Zytoplasma der Zelle. Bei der Suche nach Interaktionen zwischen Cyclin B1 und anderen Proteinen wurde eine Verbindung mit Ptch, dem Rezeptor von Shh, gefunden. Ptch interagiert spezifisch mit der phosphorylierten Form von Cyclin B1 und verhindert so, dass das phosphorylierte Cylin B1 in den Zellkern gelangt (Barnes *et al.* 2001). Die Retention von Cyclin B1 durch Ptch führt zu einem Zellzyklusarrest. Durch exogene Zugabe von Shh konnte die Interaktion zwischen Cyclin B1 und Ptch aufgehoben werden (Hagting *et al.* 1999; Barnes *et al.* 2001).

Im *CCND2*-Promotor konnten spezifische Bindungsstellen für die Gli-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, so dass die *CCND2*-Expression wahrscheinlich ebenfalls direkt von den Gli-Faktoren gesteuert wird (Yoon *et al.* 2002). In menschlichen Rhabdomyosarkomzellen wurde nach Stimulation mit Gli1 eine vermehrte Expression von Cyclin D2 und eine verminderte Expression von *PKGB* (Plakoglobin) nachgewiesen (Yoon *et al.* 2002).

NMYC gehört mit *CMYC* und *LMYC* zur Familie der *MYC*-Protoonkogene. Eine erhöhte Aktivität der Myc-Protoonkogen-Familie ist verantwortlich für Zellproliferation und –transformation in vielen Geweben (Henriksson und Luscher, 1996). In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde eine solitäre Expressionserhöhung von Nmyc in den neuronalen Vorläuferzellen der Kleinhirn-Körnerzellen entdeckt (Kenney *et al.* 2003). Für die Proliferation dieser Zellen ist eine Aktivierung des Shh-Signalweges notwendig

1.6 DAS MEDULLOBLASTOM

Beim Medulloblastom handelt es sich um einen malignen, invasiven embryonalen Tumor des Kleinhirns, der bevorzugt in der Kindheit auftritt und primär über den Liquorweg

metastasiert. Histologisch werden Medulloblastome der WHO („*World Health Organization*“)-Grad IV Gruppe zugeordnet. Es handelt sich um einen bösartigen Tumor des zentralen Nervensystems (ZNS) während der Kindheit. Die Inzidenz wird mit 0,5/100000 Kindern unter 15 Jahren pro Jahr angegeben (Central Brain Tumor Registry of the United States, 1995). 70 % aller Medulloblastome entwickeln sich bei Kindern unter 16 Jahren, mit einer Häufung um das 7. Lebensjahr (Arseni *et al.* 1981; Roberts *et al.* 1991). Zu 65 % ist dieser Tumor beim männlichen Geschlecht zu finden. Trotz aggressiver chirurgischer Therapie, Strahlentherapie und Chemotherapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate erst bei ca. 60 % (Packer *et al.* 1999).

Das Medulloblastom kann histopathologisch in verschiedenen Varianten auftreten. Dazu gehören das desmoplastische Medulloblastom sowie einige selteneren Varianten, wie das großzellige Medulloblastom, das Medullomyoblastom und das melanotische Medulloblastom (Radner *et al.* 2002). Die desmoplastische Variante ist durch die Präsenz relativ gut differenzierter, niedrig proliferierender, retikulinfreier Knoten (sog. „*pale islands*“) innerhalb zellreicher, proliferationsaktiver, retikulinfaserreicher Tumoreale charakterisiert. Einen weiteren embryonalen Tumor des ZNS stellen die primitiven neuroektodermalen Tumore (PNETs) dar, die sich histopathologisch nicht von den Medulloblastomen unterscheiden, aber ausserhalb des Cerebellums auftreten (Radner *et al.* 2002).

Es wird angenommen, dass insbesondere desmoplastische Medulloblastome aus unreifen Körnerzellen der externen Keimzellschicht des Kleinhirns entstammen (Wechsler-Reya und Scott, 2001). Einen Schritt nach Vorne im Verständnis der Tumorentstehung der Medulloblastome machte die Entdeckung, dass Mutationen im Gen *PTCH*, welches für den Shh-Rezeptor kodiert, stark mit dem desmoplastischen Medulloblastom assoziiert sind. In 10-20 % der desmoplastischen Medulloblastome fanden sich Mutationen im Shh-Ptch-Signalweg (Louis *et al.* 2002).

Es gibt mehrere chromosomale Veränderungen, die sich häufig bei Medulloblastomen nachweisen lassen. Der Verlust des langen Armes von Chromosom 10 wird in 41 % aller Medulloblastome beschrieben. Interessanterweise ist mit *SUFUH* eine Komponente des Shh-Signalweges auf Chromosom 10q24.3 lokalisiert. Taylor *et al.* (2002) haben in desmoplastischen Medulloblastomen mehrere Mutationen im *SUFUH*-Gen nachweisen können, die alle mit einem Verlust der Heterozygotie (LOH) assoziiert waren.

Mutationen innerhalb des Shh-Signalweges scheinen somit eine wesentliche Rolle bei der Tumorentstehung, insbesondere der desmoplastischen Medulloblastome, zu spielen

(Pomeroy *et al.* 2002). Es ist somit von entscheidender Bedeutung mehr über die Zusammenhänge und Wirkungsweise des Sonic Hedgehog-Signalweges zu erfahren, um ein tieferes Verständnis der Tumorbilogie zu erhalten und Ansätze für neue Therapieformen zu entwickeln.

1.7 DAS BASALZELLKARZINOM

Das Basalzellkarzinom ist der häufigste Hauttumor des Menschen, mit lokalem destruktiven Wachstum, aber extrem seltener Metastasierung (0,003-0,1 %) (Leitlinie 2002, Deutsche Krebsgesellschaft). Die Inzidenz steigt seit Mitte des 19. Jahrhunderts mit durchschnittlich 3-8 % jährlich an. Die Rate der Neuerkrankungen in den Vereinigten Staaten von Amerika wird auf 600.000 Menschen jährlich geschätzt. Eine Kombination aus verschiedenen Faktoren wird dafür verantwortlich gemacht. Der Hauptrisikofaktor wird in der zunehmenden Exposition gegenüber UV-Strahlung, insbesondere dem UVB-Anteil (290-320 nm), gesehen. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit an einem Basalzellkarzinom zu erkranken mit der Nähe zum Äquator. Aber auch die verstärkten Freizeit-Aktivitäten, Änderungen im Kleidungsstil, die steigende Lebenserwartung und die Abnahme der schützenden Ozonschicht sind für die zunehmende Neuerkrankungsrate verantwortlich (Diepgen und Mahler, 2002). Es gilt das Gesetz, dass eine 10 % Abnahme der Ozonschichtdicke zu einem 20 % Anstieg der UV-Strahlenbelastung und einer 40 % Steigerung der Hautkrebsformen führt (Oikarinen und Raitio, 2000). Das Basalzellkarzinom entsteht zu 80 % an chronisch lichtexponierten Arealen der Haut. Dieses sind vor allem die Kopfregeion (Nase), der Nacken und der Handrücken. Basalzellkarzinome treten am häufigsten sporadisch auf. Allerdings gibt es auch erbliche Erkrankungen, wie z.B. das Gorlin-Syndrom, die mit einem hohen Risiko einhergehen, an multiplen Basalzellkarzinomen zu erkranken.

Als wesentlicher Promotor der Basalzellkarzinomentstehung hat sich der Shh-Signalweg herausgestellt. Es wird angenommen, dass Basalzellkarzinome ihren Ursprung von der äußeren Haarwurzelscheide nehmen. Unter physiologischen Bedingungen wird die Proliferation und Differenzierung der äußeren Haarwurzelscheide durch Shh reguliert. Die unkontrollierte Aktivierung des Shh-Signalweges kann somit zur Tumorentstehung beitragen. Molekulare Untersuchungen an Basalzellkarzinomen haben ergeben, dass in über 60 % der sporadischen Basalzellkarzinome *PTCH*-Mutationen vorliegen (Gailani *et al.* 1996; Wolter *et al.* 1997; Reifenberger *et al.* 2005). Zudem fand sich auch hier eine geringe Anzahl an

Mutationen im *SMOH*-Gen (Reifenberger *et al.* 1998; Xie *et al.* 1998). In fast allen Basalzellkarzinomen kann eine Aktivierung der klassischen Shh-Zielgene, wie *GLII* und *PTCH*, beobachtet werden.

1.8 ZIELE DER ARBEIT

Der Sonic Hedgehog-Signaltransduktionsweg stellt einen wichtigen Signalweg in der menschlichen Entwicklung dar und ist mit der Ausbildung verschiedener vererbter und erworbener Krankheitsbilder verknüpft. In den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, dass der Signalweg eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung von primitiven neuroektodermalen Tumoren des zentralen Nervensystems und von Basalzellkarzinomen der Haut spielt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher Komponenten und mögliche Zielgene des Shh-Signalweges systematisch auf ihre Expression in einem Tumorkollektiv bestehend aus 10 Medulloblastomen (5 klassischen und 5 desmoplastischen Medulloblastomen), 4 primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) und 33 Basalzellkarzinomen auf ihre mRNA Expression mittels Real-time Reverser Transkriptase-PCR untersucht werden. Die neu erzielten Expressionsdaten sollen dann mit bereits vorhandenen *PTCH*-Mutationsdaten in dem Tumorkollektiv korreliert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2 MATERIAL

2.1 TUMORGEWEBE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Tumorserie bestehend aus 10 Medulloblastomen (5 klassischen und 5 desmoplastischen Medulloblastomen), 4 supratentoriellen primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) und 33 Basalzellkarzinomen untersucht. Die ZNS-Tumoren stammten von 5 weiblichen und 9 männlichen Patienten, die in der Klinik für Neurochirurgie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, und an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg, operiert wurden. Das Durchschnittsalter dieser Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation 17,8 Jahre. Die Altersspanne reichte von 0,5-46 Lebensjahren und der Median betrug 12 Lebensjahre. Die Basalzellkarzinome stammten von 16 weiblichen und 17 männlichen Patienten, die in der Klinik für Dermatologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, operiert wurden. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation 68,8 Jahre und die Altersspanne reichte von 33-88 Lebensjahren. Der Median betrug 72 Lebensjahre. In der Tabelle 1 sind die relevanten Daten zu den untersuchten Tumorpatienten zusammengefasst.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden nur solche Gewebestücke verwendet, deren Tumoranteil mindestens 80 % betrug. Von den untersuchten Tumoren lag zu Beginn dieser Untersuchungen in ausreichender Menge genomische DNA und RNA vor, ebenso stand konstitutionelle DNA (Leukozyten-DNA) aus Blutproben der Basaliompatienten zur Verfügung.

Als Kontrollen für die mRNA-Expressionsanalysen diente RNA aus nicht-neoplastischem, cerebellärem Hirngewebe zweier Patienten, welches *post mortem* entnommen wurde, und gesunde Hautproben von zwei verschiedenen Patienten.

Tabelle 2: Klinische Daten zu Basalzellkarzinom- und Medulloblastom/PNET-Patienten.

Fall	Diagnose	Lokalisation	Geschlecht	Alter (Jahre)
BCC 3	BCC	Unterschenkel	m	68
BCC 7	BCC	Nase	m	58
BCC 8	BCC	Kinn	m	85
BCC 9	BCC	Wange	m	61
BCC 10	BCC	Stirn	m	74
BCC 11	BCC	Oberlippe	w	67
BCC 12	BCC	Oberlippe	w	75
BCC 13	BCC	Stirn	m	79
BCC 14	BCC	Axilla	m	59
BCC 15	BCC	Kinn	m	88
BCC 16	BCC	Wange	m	33
BCC 17	BCC	Nase	w	81
BCC 18	BCC	Nase	m	65
BCC 19	BCC	Kinn	w	74
BCC 20	BCC	Oberlippe	m	33
BCC 21	BCC	Stirn	w	84
BCC 22	BCC	Nase	w	68
BCC 23	BCC	Rücken	m	75
BCC 24	BCC	Wange	w	86
BCC 25	BCC	Hals	w	85
BCC 26	BCC	Kapillitium	w	69
BCC 28	BCC	Hinterkopf	w	52
BCC 33	BCC	Stirn	w	76
BCC 34	BCC	Wange	w	87
BCC 37	BCC	Ohr	m	54
BCC 40	BCC	Stirn	m	70
BCC 41	BCC	Ohr	w	58
BCC 42	BCC	Retroaurikulär	m	81
BCC 43	BCC	Nase	w	74
BCC 44	BCC	Stirn	m	55
BCC 45	BCC	Wange	w	56
BCC 46	BCC	Kapillitium	w	65
BCC 47	BCC	Retroaurikulär	m	77
MB 9	MB IV	Cerebellum	m	8
MB 11	MB IV	Cerebellum	w	6
MB 14	MB IV	Cerebellum	w	46
MB 15	MB IV	Spinal	m	37
MB 16	MB IV	Cerebellum	m	20
dpMB 10	dpMB IV	Cerebellum	m	11
dpMB 11	dpMB IV	Cerebellum	w	33
dpMB 13	dpMB IV	Cerebellum	m	12
dpMB 14	dpMB IV	Cerebellum	m	26
dpMB 16	dpMB IV	Cerebellum	w	36
stPNET 2	stPNET	temporo-parieto-occipital	m	0,5
stPNET 3	stPNET	occipito-parietal	m	7
stPNET 4	stPNET	fronto-temporal	w	2
stPNET 5	stPNET	frontal	m	5

MB IV = klassisches Medulloblastom WHO-Grad IV; dpMB IV = desmoplastisches Medulloblastom WHO-Grad IV; stPNET = supratentorieller primitiver neuroektodermaler Tumor WHO-Grad IV; BCC = Basalzellkarzinom; w = weiblich; m = männlich

2.2 UMSCHREIBUNG VON mRNA IN cDNA (cDNA-SYNTHESE)

Mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ ist es möglich, mRNA in komplementäre DNA (*copy DNA*; cDNA) umzuschreiben. Durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich dann spezifische Abschnitte aus der cDNA amplifizieren.

So genannte „Hexamer-Primer“, sechs Basen-kurze Oligonukleotide zufälliger Sequenz, binden an komplementäre Regionen der mRNA. Diese doppelsträngigen Bereiche dienen dann der Reversen Transkriptase als Startpunkt zur cDNA-Synthese. An die freien 3'-OH-Gruppen der Hexamer-Primer hängt das Enzym zur RNA-Sequenz komplementäre Desoxynukleotide an und ermöglicht so die Synthese einer DNA-Kopie von der mRNA-Vorlage.

Folgendes Protokoll wurde für die cDNA-Synthese verwendet:

- 1) 3 µg Gesamt-RNA in ein autoklaviertes Eppendorf-Röhrchen pipettieren
- 2) Auffüllen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem *Aqua destillata* bis zu einem Gesamtvolumen von 30,4 µl
- 3) Denaturierung bei 70°C für 5 Minuten
- 4) sofortiges Kühlen des Röhrchens auf Eis
- 5) Hinzugabe des RNA-Reaktionsgemisches (19,6 µl)
- 6) Inkubation des Gemisches bei 42°C für 50 Minuten
- 7) Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 72°C für 10 Minuten
- 8) Lagerung der fertigen cDNA bei -20°C

Das RNA-Reaktionsgemisch wurde nach folgendem Schema erstellt:

0,4 µl	0,1 M DTT (Invitrogen)
1,0 µl	RNasin (40 000 U/ml, Promega)
1,7 µl	BSA (2,9 mg/ml)
2,5 µl	dNTP-Gemisch (25 µM je dNTP)
3,0 µl	pd(N) ₆ (1,5 µg/µl, Pharmacia)
10,0 µl	5 x H-RT-Puffer (Invitrogen)
1,0 µl	Reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen)

Nach Beendigung der Synthese wurde die Qualität der synthetisierten cDNA durch PCR-Amplifikation eines in jeder Zelle vorkommenden Transkripts (hier: β -2-Mikroglobulin) überprüft. Von den cDNAs wurde für die „*Real-time*“ RT-PCR Expressionsanalyse Gebrauchslösungen mit einer Verdünnung von 1:50 in *Aqua dest.* hergestellt.

2.3 „*Real-time*“ Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Mit Hilfe der „*Real-time*“ RT-PCR wurde das Expressionsniveau von 18 Genen des Sonic-Hedgehog-Signaltransduktionsweges analysiert. Eine Liste der verwendeten Gene und dazugehörigen Oligonukleotidpaare findet sich in Tabelle 3. Die „*Real-time*“ RT-PCR ermöglicht die kontinuierliche quantitative Messung des gebildeten PCR-Produktes durch Interkalieren des SYBR[®] Green Fluoreszenzfarbstoffes in die doppelsträngige DNA. Als Kontrollgen wurde *ARF1* (ADP-Ribosylierungsfaktor 1) verwendet. Als Normalgewebestandard bei der Basaliomserie diente normales Hautgewebe und bei der Medulloblastom-Serie nicht-neoplastisches Kleinhirngewebe.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Gen	Oligonukleotid-name	Oligonukleotid-sequenz	Amplikon-grösse	Zugriffs-nummer	Oligonukleotid-konzentration (μ M)
<i>CCNB1</i>	CCNB1-Taq-F	5'-caggagaccatgtacatgactgtc	90 bp	XM_057222	F 900 / R 50
	CCNB1-Taq-R	5'-gtgacaccaaccagctgcag			
<i>CCND1</i>	CCND1-Taq F	5'-gatcgtgccacctggatg	108 bp	NM_001758	F 300 / R 300
	CCND1-Taq R	5'-acgggctccagcgacag			
<i>CCND2</i>	CCND2-Taq-F	5'-cgatgatcgcaactggaagtg	160 bp	XM_034567	F 50 / R 50
	CCND2-Taq-R	5'-accgctcaatctgtcctg			
<i>FUSED</i>	Fused-Taq-RT/F2	5'-ctgctgcccaggcgcctcat	128 bp	XM_050803	F 300 / R 300
	Fused-Taq-RT/R2	5'-ctgaggtcggccaagacac			
<i>PGKB alt. Ex.</i>	gCat-altEx-Taq-F	5'-ccttctagaacctctctgttg	112 bp	NM_002230	F 300 / R 300
	gCat-altEx-Taq-R	5'-cagggcacaccgtgcttg			
<i>PGKB</i>	gCat-Taq-F	5'-caccctgaggccgagatg	137 bp	M23410	F 50 / R 50
	gCat-Taq-R	5'-cacaggccagatccctgatc			
<i>FOXM1</i>	FOXM1-F	5'-caatggcaaggtctctcttg	129 bp	U74612	F 300 / R 900
	FOXM1-R	5'-ctgttctgctgtgattccaagtg			
<i>GLI1</i>	GLI1 Taq RT F	5'-gccacacaagtgcacgtttg	106 bp	NM_005269	F 300 / R 300
	GLI1 Taq RT R	5'-ggtgcgtcttcaggtttgcg			
<i>GLI2</i>	GLI2-Taq-F	5'-acgttcgaggcgtgctcg	132 bp	NM_030379	F 300 / R 50
	GLI2-Taq-R	5'-gtccgaggcgttgagaag			

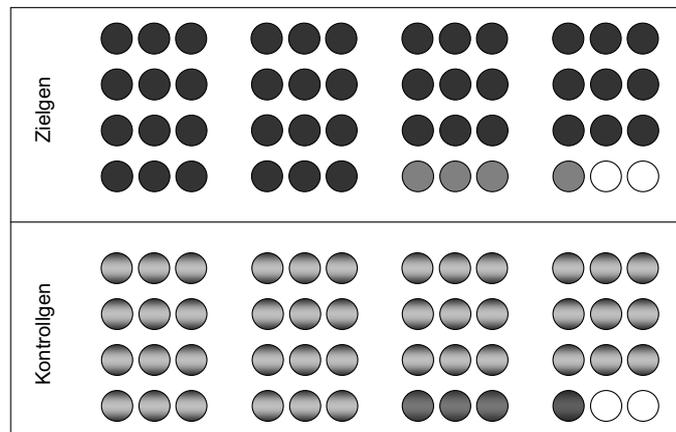
<i>GLI3</i>	GLI3-Taq-F GLI3-Taq-R	5'-gtggctggactgctcaagag 5'-ctagtctcgagtaggcctttgtg	150 bp	NM_000168	F 300 / R 50
<i>HHIP</i>	HIP Taq F1 HIP Taq R2	5'-ctcagtgctacggctggatg 5'-gcacatctgcctggatcgtg	138 bp	NM_022475	F 300 / R 50
<i>BTRC</i>	hβTRCP F2 hβTRCP R2	5'-cactatgtgctgctgaactg 5'-agcattcccctcaggaggtt	176 bp	Y14153	F 300 / R 900
<i>IGF2</i>	IGF2 Taq F IGF2 Taq R	5'-cttccaggtgtcatattggaagaac 5'-cctggagacgtactgtgctac	124 bp	NM_000612	F 300 / R 300
<i>PDGFRA</i>	PDGRFa Taq F PDGRFa Taq R	5'-gagcctaatacctctgccagctttc 5'-ctgctcactccaagaccgtcac	213 bp	XM_032213	F 50 / R 50
<i>PTCH2</i>	PTCH2-Taq-F2 PTCH2-Taq-R2	5'-ctgctccagtcacatgctaag 5'-cagggccaggccgtcttg	100 bp	XM_046559	F 50 / R 50
<i>PTCH</i>	PTCH-Taq-F PTCH-Taq-R	5'-gccagcggctacttactcatg 5'-gccactgacagtgcaaccag	119 bp	NM_000264	F 300 / R 300
<i>SMOH</i>	SMOH-Taq-F SMOH-Taq-R	5'-cgcagctccgggactatg 5'-tccagaccagggtgatcatg	169 bp	NM_005631	F 300 / R 300
<i>SUFUH</i>	SuFu1-F SuFu1-R	5'-ctgcacgccatctacggag 5'-ctccccacattctgtacatg	137 bp	AF144231	F 50 / R 50
<i>MYCN</i>	NMYC-Taq-F NMYC-Taq-R	5'-cctccaacaccaaggctgtcac 5'-gaaggcatggttgaggatcagctc	111 bp	NM_005378.4	F 300 / R 300
Kontrollgene					
<i>ARF1</i>	ARF1-F ARF1-R3	5'-gaccacgatcctctacaagc 5'-tcccacacagtgaagctgatg	111 bp	M36340	F 50 / R 50
<i>B2MG</i>	β2MG RT-F β2MG-RT-R	5'-acccccactgaaaaaatga 5'-catcttcaaacctccatgatg	115 bp	AB021288	

Zu Beginn der Experimente wurde von jedem Oligonukleotidpaar eine so genannte „Primermatrix“ erstellt, durch die das optimale Verhältnis des Vorwärts- und Rückwärtsprimers für die untersuchten Gene ermittelt wurde. Mit diesen, in Tabelle 3 dargestellten Oligonukleotidkonzentrationen, wurde dann die eigentliche Expressionsanalyse der Zielgene durchgeführt. Bei den folgenden Experimenten wurde dieses Schema für die Herstellung eines einfachen Reaktionsansatzes mit einem Konzentrationsverhältnis von 300 µM Vorwärts- zu 300 µM Rückwärts-Oligonukleotid verwendet:

2,5 µl	10 x Reaktionspuffer
1,75 µl	50 mM MgCl ₂
1,0 µl	5,0 mM dNTPs
0,125 µl	Hot Gold Star Taq Polymerase

0,75	µl	SYBR Green [®] Farbstoff (1/66000 verdünnt)
1,5	µl	Vorwärts-Oligonukleotid (10 pmol/µl)
1,5	µl	Rückwärts-Oligonukleotid (10 pmol/µl)
5	µl	cDNA-Gebrauchslösung
ad 25	µl	<i>Aqua dest.</i>

Auf einer Reaktionsplatte mit 96 Probestaschen konnten jeweils 14 Tumorproben mit dreifachem Ansatz, 2 Normalgewebeproben mit zweifachen Ansatz und 2 Leerkontrollen für das Ziel- und Kontrollgen durchgeführt werden. Die 25 µl eines jeden Reaktionsansatzes wurden in die Probestaschen gefüllt. Das entsprechende Schema findet sich in Abbildung 2.



Zielgen: Tumorproben	●	Kontrollgen: Tumorproben	●
Normalkontrollen	●	Normalkontrollen	●
Leerkontrollen	○	Leerkontrollen	○

Abbildung 2: Reaktionsplatte mit 96 Probestaschen

Die „Real-time“ RT-PCR wurde mit dem ABI Prism[®] 5700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Darmstadt) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt.

1. 50°C 2 min (Aktivierung der Uracil-Glykosylase)
2. 95°C 10 min (Aktivierung der *Hot Gold Star Taq* Polymerase)
3. 95°C 15 sec (Denaturierung des DNA-Doppelstranges)
4. 60°C 1 min (Anlagerung der Primer und DNA-Synthese)

Die Schritte 3 und 4 wurden 40 mal wiederholt.

Das Prinzip der „*Real-time*“ RT-PCR beruht auf der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in die gebildeten PCR-Produkte interkaliert. Durch die zunehmende Zyklenanzahl steigt die Fluoreszenz proportional mit der gebildeten Menge des PCR-Produktes an. Am Ende der „*Real-Time*“ RT-PCR kann die Produktzunahme mit Hilfe entsprechender Detektionssysteme auf einem Computermonitor dargestellt werden. Dies ist der Unterschied zur herkömmlichen PCR, bei der nur das Endprodukt der Reaktion dargestellt werden kann. Die Anregung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes erfolgt mittels einer Halogenlampe.

Um nun die PCR-Produkte zu quantifizieren, muss ein Fluoreszenz-Schwellenwert (Threshold Cycle oder C_T -Wert) festgelegt werden. Dabei handelt es sich um den Wert, bei dem die Fluoreszenz des PCR-Produktes die Basisfluoreszenz, welche zu Beginn des Experiments durch den Fluoreszenzfarbstoff hervorgerufen wird, signifikant übersteigt. Dabei ist zu Beginn des Experiments die Basisfluoreszenz normalerweise nicht messbar. Die Quantifizierung erfolgt somit aufgrund der Kinetik der PCR-Reaktion. Der C_T -Wert dient hierfür als Richtlinie, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Oligonukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der PCR-Reaktion durch Bildung bestimmter Produkte, gibt.

Aus den gewonnenen Daten lässt sich eine Amplifikationskurve erstellen, wie sie in Abbildung 3 dargestellt ist. Die Darstellung der Abszisse ist logarithmisch. Der Schwellenwert ist durch eine Linie bei dem Wert 0,1 festgelegt und schneidet die Amplifikationskurve im linearen Bereich. Um nun eine Beziehung zwischen der Menge des PCR-Produktes und Zyklenanzahl herzustellen, kann durch das Fällen des Lots, am Schnittpunkt zwischen Schwellenwert und Mittelwert des Zielgens, die Zyklenanzahl abgelesen werden. Im aufgeführten Beispiel liegt diese bei 18 „*Real-time*“ RT-PCR Zyklen. Durch diese Vorgehensweise, die durch die entsprechende Software (Gene Amp[®] 5700 SDS V 1.3) ausgeführt wurde, können nun die einzelnen Werte der Ziel- und Kontrollgene miteinander in Beziehung gesetzt werden und das Expressionsniveau errechnet werden. Eine Berechnung dieses Expressionsniveaus findet sich in Tabelle 4.

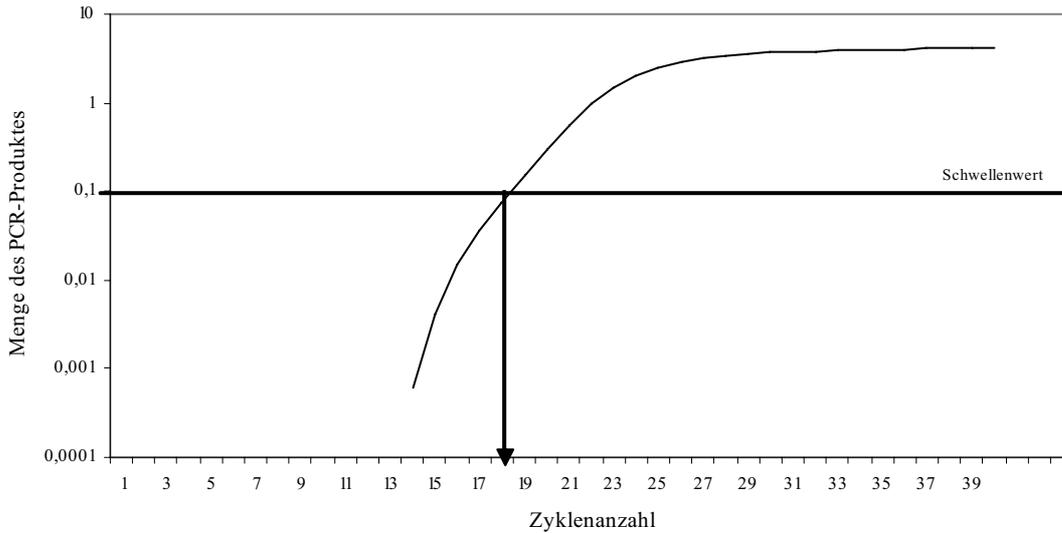


Abb. 3: Amplifikationskurve der „Real-time“ RT-PCR-Analyse

Die Schmelzkurvenanalyse dient dazu eine mögliche Kontamination des PCR-Produktes auszuschließen. Im nicht kontaminierten Zustand sollte der Schmelzkurvenverlauf wie in Abbildung 4 dargestellt verlaufen. Es findet sich ein eingipfeliges Verhalten der Schmelzkurve. Auf der Ordinate wird die Menge des PCR-Produktes und auf der Abszisse die Temperatur in Celsius aufgetragen. Im kontaminierten Zustand oder bei der Bildung von so genannten „Primerdimeren“ kommt es zur typischen Ausbildung zweier oder mehrerer Spitzenwerte im Verlauf der Schmelzkurve.

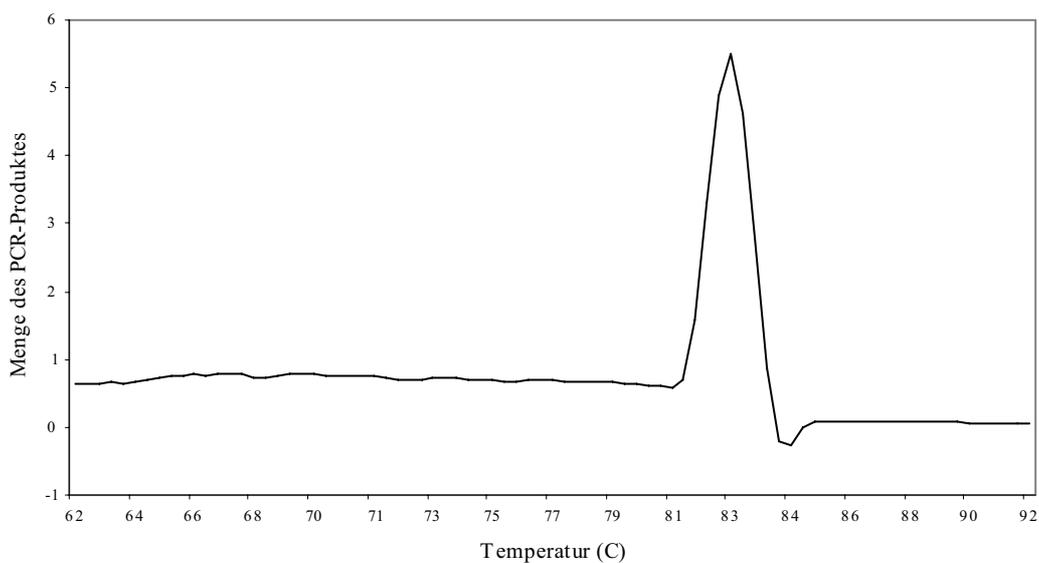


Abb. 4: Optimaler Schmelzkurvenverlauf bei einem reinen PCR-Produkt ohne Primerdimere

Beispielhaft sind nun je drei durch den Schwellenwert ermittelter C_t -Werte eines Ziel- und Kontrollgens nebst den C_t -Werten der Normalkontrollen in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Berechnung des Expressionsniveaus von Ziel- und Kontrollgen in einem Basaliom (BCC 42) und 2 gesunden Hautproben (NS 8, NS 11).

Tumor	Zielgen	Ct	MW Ct	Tumor	Kontrollgen	Ct	MW Ct	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	Rel. zu NS
BCC 42	Patched 2	18,1	18,4	BCC 42	ARF1	19,0	18,9	-0,5	-1,3	2,5
		18,1				18,6				
		19,0				19,1				
NS 8		22,4	23,1	NS 8		22,2	22,3	0,8	0,0	1,0
NS 8		22,1		NS 8		22,3				
NS 11		24,2		NS 11		22,1				
NS 11		23,6		NS 11		22,4				

Legende: MW = Mittelwert; BCC = Basaliom; NS = normale gesunde Hautprobe (*normal skin*); Rel. = Relative Expression des Zielgens im Vergleich zur Expression in normaler Haut (Expression = 1,0).

Zuerst erfolgte die Bildung des Mittelwertes (MW C_t) aus den drei Werten des Ziel- (MW C_t = 18,4) und Kontrollgens (MW C_t = 18,9). Anschließend wurde der ΔC_t Wert (MW C_t -Zielgen – MW C_t -Kontrollgen) errechnet (ΔC_t = 18,4 – 18,9 = -0,5). Nun wurde von jedem errechneten ΔC_t Wert der Ziel- und Kontrollgene der Wert von den Normalkontrollproben subtrahiert und so der $\Delta\Delta C_t$ Wert errechnet ($\Delta\Delta C_t$ = -0,5 - 0,8 = -1,3). Dadurch wird der Wert der Normalkontrollproben gleich null gesetzt und die Werte der Tumoren darauf bezogen. Die so errechneten $\Delta\Delta C_t$ -Werte wurden abschließend mit der Formel 2^{-x} „entlogarithmisiert“ ($2^{-(-1,3)} = 2,5$). Dadurch kann nun ein relatives Verhältnis der Ziel- und Kontrollgene zur Normalkontrolle errechnet werden, welches in der Spalte „Rel. zu NS“ zu erkennen ist. Folgende Werte wurden für die entsprechenden Expressionsniveaus festgesetzt:

Referenzwert Normales Gewebe	1,0
Unterepressionsniveau	< 0,5
Normales Expressionsniveau	0,5 - ≤ 2,0
Mäßige Überexpression	2,0 - ≤ 5,0
Starke Überexpression	≥ 5,0

2.4 Statistische Auswertung

Die univariate statistische Analyse zur Bestimmung der statistischen Signifikanz der Expressionswerte der einzelnen Tumorgruppen mittels eines Student's T-Test wurde mit der Graph Pad Prism 4 Software durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

Die vorliegende Expressionsstudie wurde an 14 primitiven neuroektodermalen Tumoren (5 klassische Medulloblastome, 5 desmoplastische Medulloblastome und 4 supratentorielle PNETs) und 33 Basaliomen (Tabelle 5) durchgeführt. Dabei wurden 10 Gene, deren Genprodukte direkt am Shh-Signalweg beteiligt sind und 8 mögliche Zielgene des Shh-Signalweges auf ihre mRNA-Expression in diesem Tumorkollektiv mittels einer „*Real-time*“ RT-PCR untersucht. Die neu ermittelten Expressionsdaten wurden mit bereits vorhandenen Mutationsdaten von Komponenten des Shh-Signalweges (Wolter *et al.* 1997, Reifenberger *et al.* 2004, Reifenberger *et al.*, 2005) korreliert.

Tabelle 5a: Expressionsprofile von Genen des Sonic Hedgehog-Signalweges in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen.

Tumor ^a	PTCH ^b Mutation	PTCH ^d mRNA Expression	PTCH2 ^d mRNA Expression	BTRC ^d mRNA Expression	SUFUH ^d mRNA Expression	SMOH ^d mRNA Expression	Fused ^d mRNA Expression	GLI1 ^d mRNA Expression	GLI2 ^d mRNA Expression	GLI3 ^d mRNA Expression	HIP ^d mRNA Expression
stP3	+	0,7	0,0	1,3	0,5	0,5	0,2	0,0	0,1	1,0	0,0
MB16	+	6,3	0,2	0,8	1,0	1,9	0,0	3,8	4,6	0,5	4,8
MB9	-	0,5	0,0	2,2	1,3	2,7	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1
MB11	-	0,3	0,2	0,6	0,4	5,4	1,8	0,0	0,6	4,1	0,1
MB14	+	4,3	2,8	3,1	0,3	3,3	0,3	5,9	9,6	0,4	9,1
MB15	+	0,5	0,0	0,7	0,4	1,8	0,3	0,0	0,0	0,4	0,1
dpMB10	+	0,3	0,0	1,5	0,7	0,7	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0
dpMB11	-	9,4	0,5	0,5	0,4	2,9	1,0	3,7	13,5	3,8	1,6
dpMB13	-	14,2	0,5	1,5	1,0	3,3	1,1	1,1	22,2	7,0	14,7
dpMB14	-	19,2	0,9	0,7	0,4	7,2	0,2	6,4	7,2	0,4	20,1
dpMB16	-	0,9	0,2	6,6	0,6	2,4	0,4	1,3	2,2	3,5	3,0
stP2	-	0,1	0,0	1,1	0,5	2,0	0,4	0,0	0,2	5,1	0,0
stP4	-	4,4	0,3	0,9	1,7	8,3	0,0	0,9	14,0	52,0	1,6
stP5	-	6,3	0,0	0,5	0,4	8,6	0,2	0,6	6,0	31,3	1,7
BCC 3	+	1,0	3,0	0,8	1,4	2,2	1,2	2,7	82,1	2,3	11,0
BCC 7	+	23,3	1,7	1,1	1,3	3,9	4,4	14,2	7,7	1,9	21,3
BCC 8	+	8,6	4,7	1,1	0,6	2,9	3,0	11,8	81,0	4,0	1,1
BCC 10	+	6,8	14,9	0,8	1,9	1,6	4,2	5,5	59,7	2,6	18,8
BCC 11	+	13,5	20,5	5,3	2,1	10,4	3,6	6,3	27,9	5,7	42,5
BCC 17	+	3,6	16,8	1,1	0,5	2,1	1,8	3,2	41,1	1,4	33,6
BCC 20	+	23,8	7,2	1,1	2,2	5,1	0,0	8,8	61,8	2,1	69,6
BCC 21	+	4,5	1,8	0,9	1,2	5,5	6,4	108,9	8,1	3,8	29,9
BCC 22	+	6,5	3,2	2,3	1,2	2,4	8,5	3,9	63,6	4,4	149,1
BCC 23	+	104,0	15,6	1,7	1,2	3,6	1,5	5,3	200,9	2,6	296,1
BCC 25	+	48,5	7,0	4,9	10,1	1,8	10,1	41,4	138,1	2,2	15,7
BCC 28	+	9,5	39,1	1,2	2,6	13,6	8,4	14,0	147,0	3,7	388,0
BCC 33	+	45,3	36,5	2,4	7,4	2,1	2,7	21,3	49,5	4,2	922,9
BCC 40	+	10,2	8,9	0,9	2,0	5,1	2,2	3,4	75,1	2,9	3,0
BCC 41	+	0,7	3,4	0,6	1,4	6,7	2,0	2,7	11,6	2,3	0,6
BCC 43	+	21,9	12,9	1,3	1,1	4,8	2,5	6,5	82,1	1,3	14,7
BCC 44	+	13,0	34,5	1,2	1,1	18,9	1,9	10,5	91,8	5,2	144,0
BCC 45	+	28,1	4,7	1,2	1,8	5,1	4,9	3,9	56,9	2,4	230,7
BCC 46	+	5,9	6,2	1,1	2,2	9,1	1,8	5,4	57,7	3,5	23,3
BCC 47	+	16,7	4,4	0,5	1,1	3,1	2,5	4,9	51,6	1,7	436,6
BCC 9	-	17,8	7,1	1,6	0,8	2,4	10,6	9,7	120,3	4,0	136,2
BCC 12	-	27,3	17,0	1,4	0,9	9,4	4,6	9,6	36,5	5,2	24,9
BCC 13	-	28,4	9,2	1,1	0,7	4,2	8,9	9,1	33,1	3,4	238,9
BCC 14	-	28,1	6,8	1,6	3,0	3,8	5,7	6,4	200,9	5,0	12,8
BCC 15	-	3,7	5,4	0,6	0,6	4,1	1,9	1,8	13,4	3,0	3,9
BCC 16	-	7,4	1,7	0,9	1,2	1,3	2,8	4,9	8,8	1,0	22,2
BCC 18	-	2,0	10,0	5,2	2,1	1,6	4,2	8,1	20,1	0,9	10,8
BCC 19	-	4,6	4,6	1,2	1,3	3,2	1,7	0,8	30,1	1,1	11,7
BCC 24	-	9,1	3,1	4,4	4,1	2,7	1,2	4,9	42,2	3,0	72,0
BCC 26	-	2,1	4,6	1,5	2,2	0,5	0,8	0,3	3,9	0,4	4,5
BCC 34	-	11,3	6,0	2,0	1,6	12,6	3,7	8,5	12,1	0,1	142,0
BCC 37	-	7,5	5,6	1,3	1,2	2,8	12,8	1,4	22,6	1,9	172,3
BCC 42	-	10,3	2,5	1,3	1,4	10,1	1,1	5,0	9,5	2,0	1,6

^a, stP = supratentorieller primitiver neuroektodermaler Tumor; dpMB = desmoplastisches Medulloblastom; MB = klassisches Medulloblastom; BCC = Basalzellkarzinom; ^b, + = Mutation vorhanden; - = keine Mutation detektiert; ^d, mRNA-Expressionsniveau im Vergleich zur Expression des entsprechenden Gens in nicht-neoplastischem Referenzgewebe

Tabelle 5b: Expressionsprofile von möglichen Zielgenen des Sonic Hedgehog-Signalweges in Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen

Tumor ^a	<i>PTCH</i> ^b Mutation	<i>IGF2</i> ^d mRNA Expression	<i>PDGFRa</i> ^d mRNA Expression	<i>PKGB</i> ^d mRNA Expression	<i>PKGB, alt.</i> ^d mRNA Expression	<i>FOXM1</i> ^d mRNA Expression	<i>CCNB1</i> ^d mRNA Expression	<i>CCND1</i> ^d mRNA Expression	<i>CCND2</i> ^d mRNA Expression	<i>NMYC</i> ^d mRNA Expression
stP3	+	0,1	9,0	0,6	0,0	11,2	1,4	0,2	58,1	0,2
MB16	+	0,1	5,7	0,3	0,1	7,3	7,9	0,2	5,2	41,8
MB9	-	0,0	0,2	2,1	0,6	20,3	2,9	0,1	35,0	2,8
MB11	-	1,5	0,1	0,5	0,1	2,5	0,8	2,3	1,4	3,9
MB14	+	0,2	3,4	0,8	0,2	1,8	2,2	1,5	1,1	16,2
MB15	+	0,0	0,2	0,7	0,1	7,6	0,8	0,2	21,3	5,3
dpMB10	+	0,8	1,7	0,8	0,2	17,7	2,2	0,2	18,9	2,4
dpMB11	-	0,5	6,2	0,9	0,1	1,4	1,0	1,8	1,6	71,3
dpMB13	-	1,2	12,6	0,9	0,2	9,7	7,5	0,2	11,2	71,5
dpMB14	-	0,5	17,2	0,2	0,3	5,1	3,7	0,1	2,8	47,8
dpMB16	-	0,0	0,4	0,4	0,7	5,0	6,2	1,8	10,1	2,3
stP2	-	0,0	1,4	0,3	0,1	2,0	3,6	0,1	0,1	0,3
stP4	-	0,0	0,3	1,7	0,6	18,8	22,6	5,4	7,0	69,1
stP5	-	0,2	7,8	0,2	0,0	10,6	2,8	0,8	12,6	2,5
BCC 3	+	6,6	4,8	0,6	1,6	1,9	4,1	1,6	1,6	2,7
BCC 7	+	1,4	1,0	0,6	4,0	1,4	19,4	2,3	3,6	28,3
BCC 8	+	1,3	0,4	0,6	3,9	4,4	5,6	3,0	2,8	16,8
BCC 10	+	0,6	1,4	2,1	3,7	3,2	4,2	2,9	5,6	16,1
BCC 11	+	2,8	1,3	1,6	1,0	8,9	5,4	2,6	1,3	10,7
BCC 17	+	5,1	1,1	0,7	1,4	5,1	9,5	0,7	2,2	2,9
BCC 20	+	0,2	1,4	0,5	1,6	1,9	5,2	0,8	15,1	7,1
BCC 21	+	0,7	1,1	0,2	1,2	3,9	26,0	0,9	7,4	32,5
BCC 22	+	0,4	0,7	0,6	2,6	9,4	7,5	2,2	4,1	3,7
BCC 23	+	5,1	0,4	0,5	1,1	2,5	1,1	2,5	9,6	1,8
BCC 25	+	0,1	0,9	2,0	4,0	7,7	5,7	5,5	5,4	14,6
BCC 28	+	0,8	0,4	0,6	3,2	9,6	14,1	2,6	35,8	13,6
BCC 33	+	3,4	1,2	1,1	1,6	2,3	6,6	3,0	3,0	2,6
BCC 40	+	1,0	2,0	0,5	5,2	1,1	1,8	0,5	2,3	1,8
BCC 41	+	1,1	2,2	0,4	1,6	1,5	1,8	1,8	2,8	3,8
BCC 43	+	4,2	2,5	0,6	2,3	2,0	8,2	1,8	4,1	2,8
BCC 44	+	9,2	2,3	0,3	2,9	5,0	7,8	1,1	29,2	7,9
BCC 45	+	0,8	2,9	0,6	1,5	1,3	6,6	3,1	3,1	1,8
BCC 46	+	0,2	1,3	0,6	1,3	2,7	4,9	2,9	3,4	4,1
BCC 47	+	1,6	1,9	0,8	1,1	3,9	4,0	2,5	3,8	5,7
BCC 9	-	0,8	1,6	0,7	2,0	8,1	5,8	1,7	10,2	2,9
BCC 12	-	1,6	1,1	0,5	4,4	4,9	20,3	2,7	7,7	15,2
BCC 13	-	2,8	9,7	2,3	4,9	11,3	20,5	0,8	3,7	3,6
BCC 14	-	0,2	0,8	1,7	4,0	6,9	3,3	2,9	16,5	6,1
BCC 15	-	1,8	2,4	0,2	1,1	1,3	9,6	0,6	7,1	1,3
BCC 16	-	5,7	1,4	2,5	4,9	1,9	5,9	2,1	1,9	3,1
BCC 18	-	4,2	1,7	1,2	3,4	12,6	3,6	6,5	1,9	2,8
BCC 19	-	0,2	0,4	0,6	1,5	4,7	1,9	0,7	4,9	0,5
BCC 24	-	0,7	0,9	3,6	3,8	9,5	4,9	2,6	3,5	2,1
BCC 26	-	0,7	0,8	3,5	7,2	2,5	2,7	1,3	1,8	0,4
BCC 34	-	0,3	1,9	0,1	1,4	4,3	2,8	1,7	2,9	6,6
BCC 37	-	0,1	0,9	0,5	1,4	2,8	13,1	0,2	3,4	0,9
BCC 42	-	1,5	2,5	0,5	1,7	2,1	3,6	0,5	5,5	4,3

^a, stP = supratentorieller primitiver neuroektodermaler Tumor; dpMB = desmoplastisches Medulloblastom; MB = klassisches Medulloblastom; BCC = Basalzellkarzinom; ^b, + = Mutation vorhanden; - = keine Mutation detektiert; ^d, mRNA-Expressionsniveau im Vergleich zur Expression des entsprechenden Gens in nicht-neoplastischem Referenzgewebe

3.1 MRNA EXPRESSIONSANALYSE VON KOMPONENTEN DES SONIC HEDGEHOG-SIGNALWEGES IN MEDULLOBLASTOMEN UND SUPRATENTORIELLEN PNETS

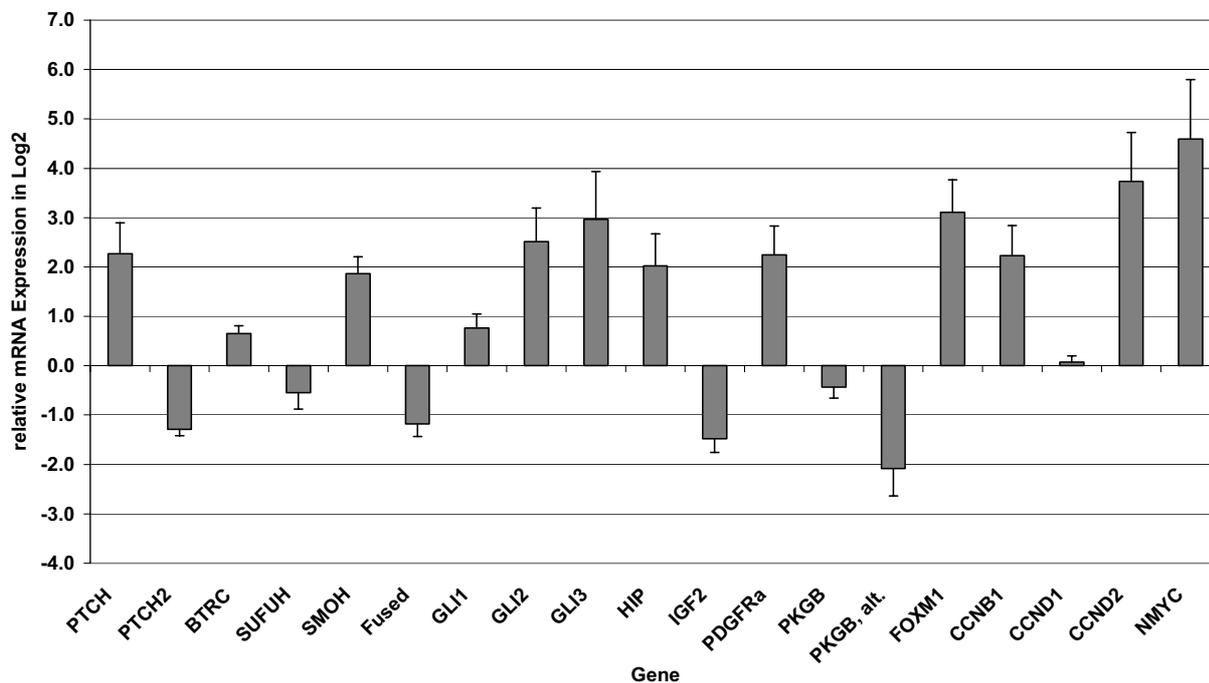


Abb.6: Grafische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse von Komponenten und möglichen Zielgenen des Sonic Hedgehog-Signalwegs in Medulloblastomen und supratentoriellen PNETs. Die vertikalen Balken entsprechen dem Mittelwert der mRNA-Expression in Log2 des jeweiligen Gens in den Tumoren (angegeben ist 25 % der Standardabweichung). Die Expression des nicht-neoplastischen Kleinhirngewebes ist für jedes Gen gleich null gesetzt. Ein Expressionsniveau von ≤ -1 entspricht daher einer Unterexpression des entsprechenden Gens; ein Wert ≥ 1 entspricht einer Überexpression des entsprechenden Gens im Vergleich zu dessen Expression in normalem Kleinhirngewebe.

Wie das obige Balkendiagramm zur mRNA Expression von Komponenten und möglichen Zielgenen des Sonic Hedgehog-Signalwegs in kindlichen Medulloblastomen und supratentoriellen PNETs verdeutlicht, konnte für die Gene *PTCH*, *SMOH*, *GLI2*, *GLI3*, *HIP*, *PDGFR α* , *FOXM1*, *CCNB1*, *CCND2* und *NMYC* ein erhöhtes Transkriptionslevel in den Tumoren im Vergleich zur Expression in nicht-neoplastischem Kleinhirngewebe festgestellt werden. Dabei zeigten die beiden Gene *CCND2* und *NMYC* die höchsten Expressionswerte aller untersuchten Gene in diesen Tumoren. Ein erniedrigtes Transkriptionsniveau konnte für *PTCH2*, *FUSED*, *IGF2* und das alternative Transkript von *PKGB* nachgewiesen werden, wobei die Transkriptvariante von *PKGB* die niedrigsten Expressionslevel in den untersuchten Tumoren zeigte. Für die Gene *BTRC*, *SUFUH*, *GLI1*, *PKGB* und *CCND1* lag die Expressionshöhe im Bereich der Expression in nicht-neoplastischem Hirngewebe.

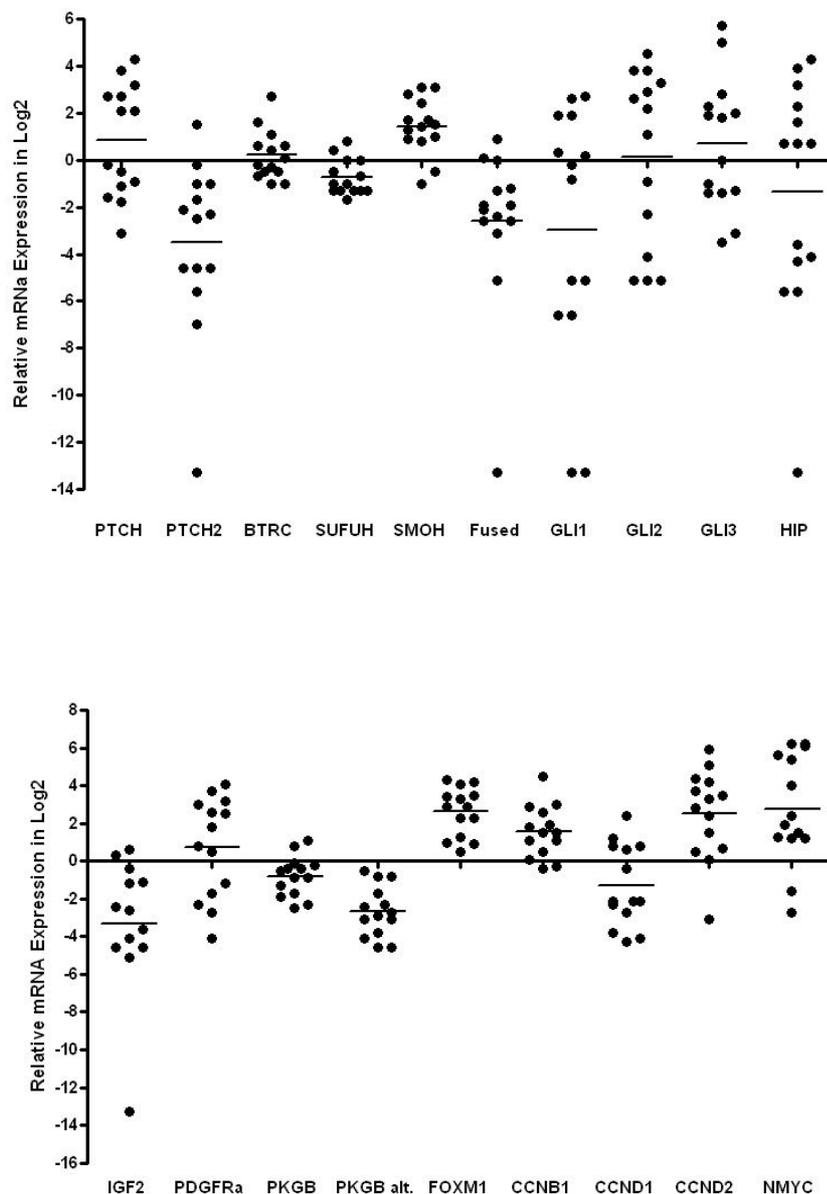


Abb. 7: **Verteilung der mRNA Expression in den einzelnen Medulloblastomen und supratentoriellen PNETs.** mRNA Expression der Komponenten (*obere Grafik*) und der möglichen Zielgene (*untere Grafik*) des Sonic Hedgehog-Signalweges in 5 klassischen und 5 desmoplastischen Medulloblastomen, sowie 4 PNETs. *Schwarze Querbalken*, Mittelwerte der Expression in dem entsprechenden Gen.

Innerhalb eines untersuchten Gens schwankte die Expression in den Tumoren oft sehr stark (Abb. 7). Besonders die Expression einiger Komponenten des Shh-Signalweges, wie *PTCH2*, *FUSED*, *GLI1*, *GLI2* und *HIP*, zeigten eine deutliche Streuung der Messwerte. Für *GLI2* zeigten 5 Tumoren Messwerte von $\leq 0,2$ (stP3, MB9, MB15, dpMB10 und stP2; Tab. 5a) und 7 Tumoren hatten eine mindestens 5fache Überexpression von *GLI2* (MB16, MB14,

dpMB11, dpMB13, dpMB14, stP4 und stP5), wobei dpMB13 eine 22fach höhere Expression aufwies als normales Cerebellumgewebe. Für *GLI3* betrug die Differenz zwischen dem niedrigsten (0,1; (MB9 und dpMB10) und dem höchsten Expressionswert (52,0; stP4) mehr als 52. Auch die *HIP* Expression in den Medulloblastomen war sehr heterogen: Fünf (dpMB13, dpMB14, dpMB16, MB14 und MB16) der 14 untersuchten Hirntumoren wiesen eine im Vergleich zu nicht-neoplastischem Kleinhirngewebe erhöhte mRNA Expression auf, teilweise sehr stark (20,1; dpMB14). Drei Tumoren hatten eine dem Referenzgewebe entsprechende Expression (dpMB11, stP4 und stP5), während in sechs Tumoren (stP2, stP3, MB9, MB11, MB15 und dpMB10) eine Expression fast nicht nachweisbar war. Von den sechs Tumoren war nur einer den desmoplastischen Medulloblastomen zuzuordnen, während die anderen zu den supratentoriellen und klassischen Medulloblastomen zählten.

In keinem der untersuchten Gene fand sich ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den klassischen und desmoplastischen Medulloblastomen bzw. zwischen Tumoren mit und ohne *PTCH*-Mutation (Student's T-Test, zweiseitig). Die Aussagekraft dieses Befundes ist jedoch aufgrund der kleinen Gruppengröße fraglich und bedarf einer Überprüfung in einer größeren Tumorserie.

3.2 MRNA EXPRESSIONSANALYSE VON KOMPONENTEN DES SONIC HEDGEHOG-SIGNALWEGES IN BASALZELLKARZINOMEN

Für viele Gene des Sonic Hedgehog-Signalweges konnte in den Basalzellkarzinomen eine deutliche Überexpression im Gegensatz zur Expression der entsprechenden Gene in normaler Haut nachgewiesen werden (Abb. 8). So zeigten die Gene *PTCH*, *PTCH2*, *SMOH*, *FUSED*, *GLI1*, *GLI2*, *HIP*, *FOXM1*, *CCNB1*, *CCND2* und *NMYC* im Mittel eine mindestens vierfach erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zur Expression in gesunder Haut. Die höchsten Expressionslevel konnten für *GLI2* und *HIP* ermittelt werden. Keines der untersuchten Gene wurde in den Hauttumoren geringer exprimiert als in gesunder Haut.

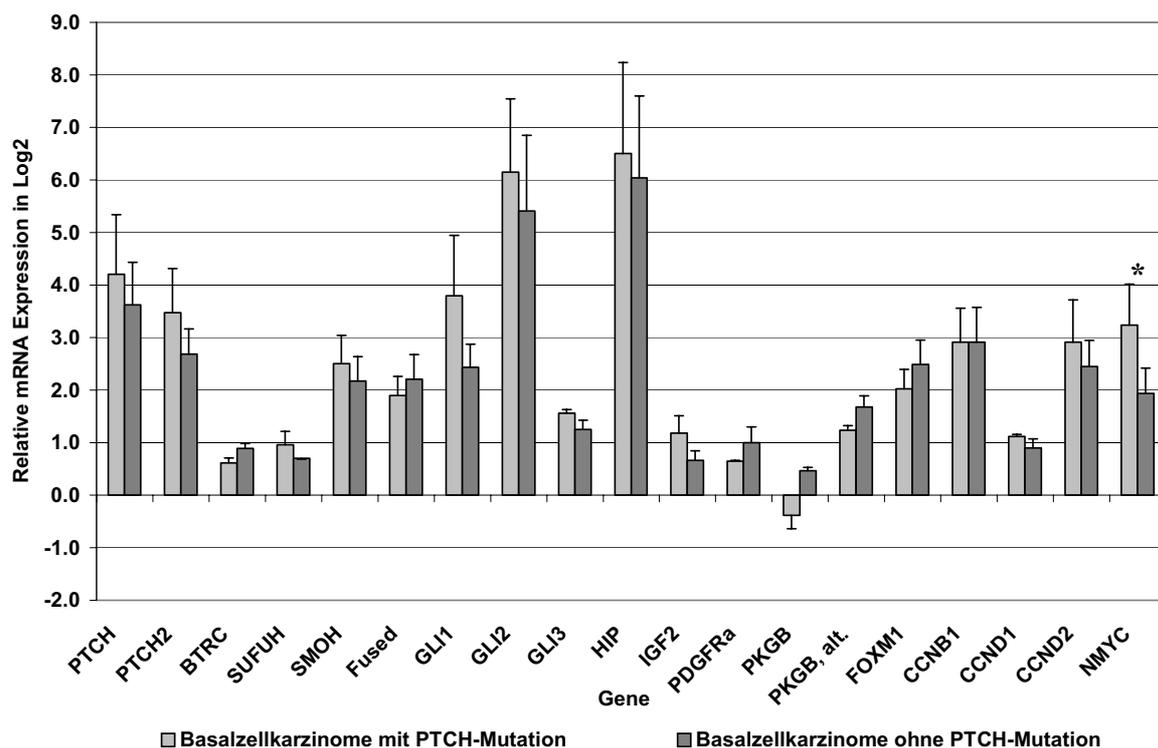


Abb. 8: Grafische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse von Komponenten und möglichen Zielgenen des Sonic Hedgehog-Signalwegs in Basalzellkarzinomen. Die vertikalen Balken entsprechen dem Mittelwert der mRNA-Expression des jeweiligen Gens in den Tumoren mit 25 % der Standardabweichung. Die Expression des nicht-neoplastischen Hautgewebes ist für jedes Gen gleich null gesetzt. Ein Expressionsniveau von ≤ -1 entspricht daher einer Unterexpression des entsprechenden Gens; ein Wert ≥ 1 entspricht einer Überexpression des entsprechenden Gens im Vergleich zu dessen Expression in normalem Hautgewebe. *, signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Tumoren mit und ohne *PTCH*-Mutation.

Signifikante Unterschiede im Expressionsniveau zwischen Tumoren mit und ohne *PTCH*-Mutation ergab der Student's T-test für *NMYC* ($p = 0.0242$), welches in den Basalzellkarzinomen mit *PTCH*-Mutation signifikant stärker exprimiert wurde (Mittelwert der Expression: 9,4) als in Tumoren ohne nachgewiesener *PTCH*-Mutation (Mittelwert der Expression: 3,8) (Abb. 8). Grundsätzlich zeigte sich jedoch die Tendenz, dass viele Tumoren mit *PTCH*-Mutation eine, wenn auch häufig nur gering verstärkte Expression der Gene des Shh-Signalweges und seiner möglichen Zielgene, aufwiesen, so z.B. *PTCH*, *PTCH2*, *GLI1*, *GLI2* und *HIP*.

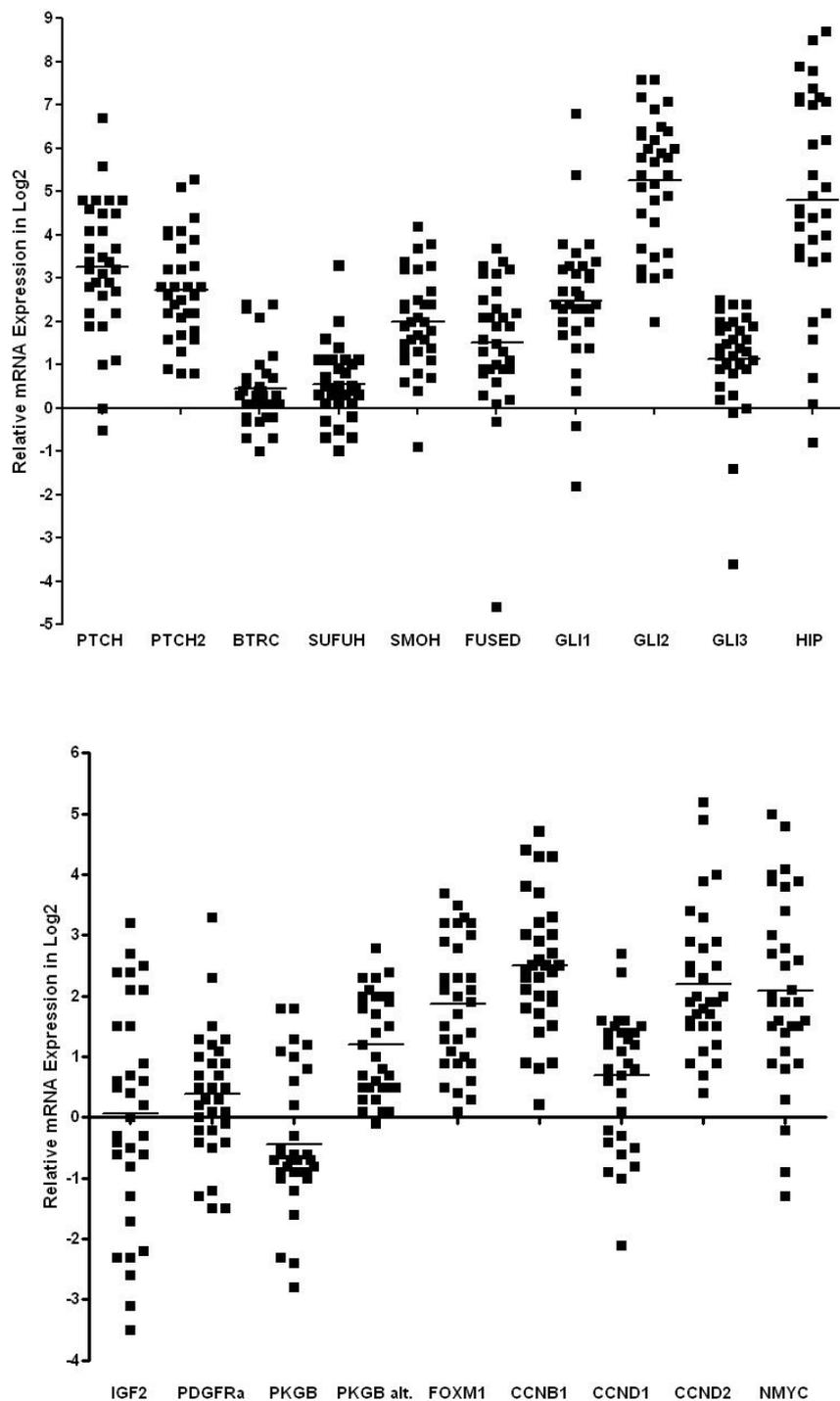


Abb. 9: **Verteilung der mRNA Expression in den einzelnen Basalzellkarzinomen.** mRNA Expression der Komponenten (*obere Grafik*) und der möglichen Zielgenen (*untere Grafik*) des Sonic Hedgehog-Signalweges in 33 BCCs. *Schwarze Querbalken*, Mittelwerte der Expression in dem entsprechenden Gen.

Auch in der Gruppe der Basalzellkarzinome streuten die Expressionslevel innerhalb eines untersuchten Gens oft sehr stark (Abb. 9, Tab. 5). So lag der niedrigste Messwert für *HIP* bei 0,6 in BCC41 und der höchste bei 922,9 für BCC33, wobei 11/33 (33 %) Tumoren Expressionsniveaus über einem Faktor 100 hatten und 30/33 (91 %) BCCs eine Überexpression des Gens aufwiesen, bezogen auf die Transkriptmenge in normalem Hautgewebe. Auch für die drei bekannten Zielgene des Sonic Hedgehog-Signalweges *PTCH*, *GLI1* und *GLI2* (Abb. 10) ließ sich in der Mehrzahl der untersuchten Tumore eine deutliche Genüberexpression nachweisen, die für *GLI2* am stärksten ausgeprägt war. Hier zeigten alle 33 BCCs eine Überexpression des Gens im Vergleich zu normaler Haut mit dem niedrigsten Messwert bei 3,9 (BCC 26) und dem höchsten bei 200,9 (BCC23, BCC14). Bei *PTCH* wiesen nur 2/33 BCCs (BCC3, BCC41) und bei *GLI1* nur 3/33 (BCC15, BCC19, BCC26) eine der in normaler Haut vergleichbaren Expression auf. Dagegen war die mRNA Überexpression in den möglichen Zielgenen des Sonic Hedgehog-Signalweges in den Basalzellkarzinomen nicht deutlich ausgeprägt. Nur für die Gene *FOXMI* (2/33), *CCNB1* (6/33), *CCND2* (5/33) und *NMYC* (8/33) lagen die Expressionswerte bei einigen Tumoren im zweistelligen Messbereich, wobei aber in allen vier Genen die Mehrzahl der Tumore eine $\geq 2,0$ fache Transkriptmenge im Vergleich zu normaler Haut aufwies (*FOXMI*: 25/33; *CCNB1*: 29/33; *CCND2*: 28/33 und *NMYC*: 26/33).

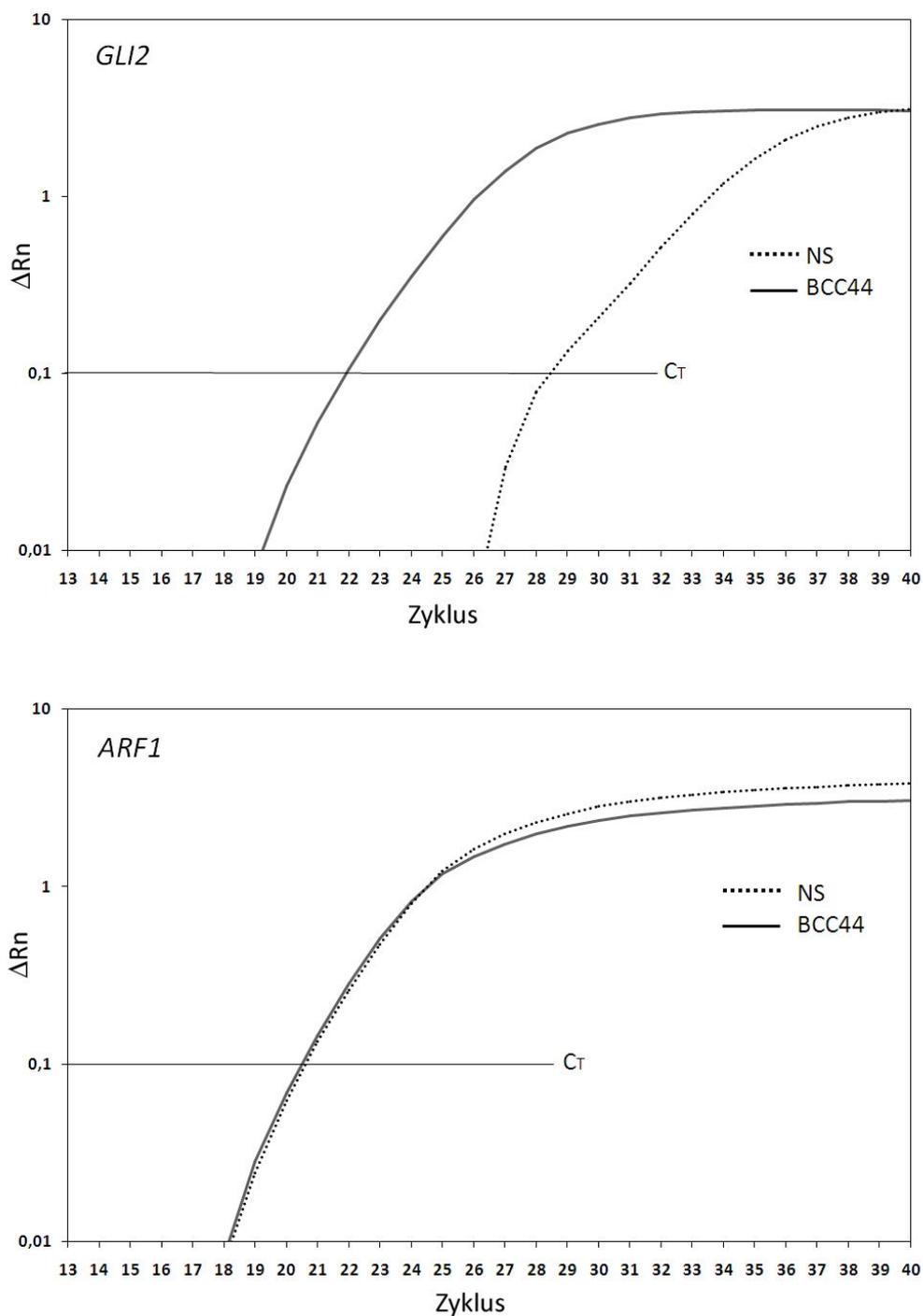


Abb. 10: „Real-time“ RT-PCR Expressionsprofil von *GLI2* im Basalzellkarzinom BCC44 im Vergleich zur Expression in normalem Hautgewebe (NS). Abszisse, Zyklenzahl; Ordinate, relative Zunahme an PCR-Produkt. Die Kurven für BCC44 und NS sind für das Referenzgen *ARF1* (untere Grafik) nahezu identisch, dagegen ist die *GLI2* Kurve für BCC44 im Vergleich zu NS deutlich nach links verschoben (obere Grafik). Dies weist auf die erhöhte *GLI2*-Expression im Tumor hin.

4. DISKUSSION

Die Identifizierung von Mutationen im humanen Homolog des *Drosophila* Segmentpolaritätgens *Patched* (*PTCH*) in Basalzellkarzinomen der Haut hat ein immenses Interesse an der Rolle dieses Gens bei humanen Erkrankungen ausgelöst (Hahn *et al.* 1996 b). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Mutationen in *PTCH* oder in anderen Komponenten des Sonic Hedgehog-Signalweges zur Bildung von verschiedenen primären humanen Tumoren beitragen, unter anderem auch zur Entstehung von Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Komponenten und mögliche Zielgene des Sonic Hedgehog-Signalweges systematisch auf ihre mRNA Expression in einem Tumorkollektiv bestehend aus embryonalen ZNS-Tumoren und kutanen Basalzellkarzinomen mittels „Real-time“ Reverser Transkriptase-PCR untersucht.

4.1 MRNA-EXPRESSIONSPROFILE VON GENEN DES SONIC HEDGEHOG-SIGNALWEGES IN MEDULLOBLASTOMEN UND BASALZELLKARZINOMEN

Bei den beiden Transmembranproteinen Patched (Ptch) und Smoothened (Smoh) handelt es sich neben der Gli-Proteinfamilie um die zentralen Bausteine des Sonic Hedgehog-Signalweges. In Abwesenheit von Sonic Hedgehog (Shh) inhibiert Ptch die Signalweiterleitung durch Smoh. Bindet Shh an Ptch kommt es zur Signalweiterleitung unter anderem über die Gli-Proteinfamilie (Hahn *et al.* 1996 a/b; Johnson *et al.* 1996; Xie *et al.* 1998). Doch Ptch ist nicht nur der Rezeptor für Sonic Hedgehog sondern auch transkriptionelles Zielgen dieses Signalweges (Marigo *et al.* 1996). Das lässt erwarten, dass bei einer Aktivierung des Signalweges die mRNA Expression von Ptch stark ansteigt.

Vom Ptch-Protein finden sich in Vertebraten zwei Homologe, Ptch und Ptch2. Auch Ptch2 ist ein Membranprotein, dessen Funktion allerdings bis heute weitgehend unklar ist. Ptch2 wird vorzugsweise in der Haut und in den Hoden exprimiert und kann, wie Ptch, mit Smoh einen Komplex bilden und die Hedgehog-Proteine binden. Während *PTCH* in über 60 % der sporadischen Basalzellkarzinome und in bis zu 20 % der Medulloblastome Mutationen aufweist, treten genetische Veränderungen in *PTCH2* in diesen Tumoren nur äußerst selten auf (Smyth *et al.* 1999).

Rahnama *et al.* (2004) zeigten, dass *PTCH* und *PTCH2* zu 57 % identisch sind und es sich bei *PTCH2* ebenfalls um ein Zielgen des Sonic Hedgehog-Signalweges handelt. Dies lässt vermuten, dass eine Aktivierung des Signalweges zu einer Überexpression von *PTCH2* führt. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass wie durch Marigo *et al.* (1996) und Rahnama *et al.* (2004) vermutet, auf mRNA-Ebene beide Gene in der Mehrzahl der Basalzellkarzinome überexprimiert werden, während nur die Hälfte der Medulloblastome *PTCH* überexprimieren und *PTCH2* sogar herunterregulieren.

Die wichtige Bedeutung von *PTCH* wird durch eine Studie von Barnes *et al.* (2001) und Hagting *et al.* (1999) im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus unterstützt. Anhand von Transfektionsexperimenten und immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Ptch spezifisch mit dem phosphoryliertem Cyclin B1 interagiert. Normalerweise verhindert die Bindung an Ptch, dass das phosphorylierte Cyclin B1 in den Zellkern gelangt. Die Retention von Cyclin B1 durch Ptch führt zu einem Zellzyklusarrest. Wurde in diesem Experiment Shh hinzugegeben, fand eine Interaktion zwischen Cyclin B1 und Ptch nicht statt. Die auf Proteinebene gewonnenen Daten lassen keine direkte Schlussfolgerung auf die in dieser Studie erhobenen mRNA Daten zu. Es fand sich jedoch in mehr als 50 % der Medulloblastome und fast 90 % der Basalzellkarzinome eine erhöhte *CCNB1* mRNA Expression.

Die drei Zinkfingertranskriptionsfaktoren, Gli1, Gli2 und Gli3, sind beim Menschen an der Weiterleitung des Shh-Signals beteiligt. *GLI1* wurde bereits 1987 als amplifiziertes Gen in Glioblastomen beschrieben (Kinzler *et al.* 1987, 1988). Die Funktionen der drei Proteine sind unterschiedlich. Gli1 ist ein Aktivator der Zielgene der Shh-Signalkaskade und besitzt nur aktivierende Wirkung. Für Gli2 und Gli3 konnten dagegen sowohl aktivierende als auch inhibierende Eigenschaften nachgewiesen werden (Wang *et al.* 2000; Ingham and McMahon, 2001). Heute wird jedoch angenommen, dass Gli2 in Vertebraten im Gegensatz zu Gli1 die Hauptrolle für die Aktivierung der Zielgene des Shh-Signalweges spielt (Bai *et al.* 2002). Mutationen im *GLI2* Gen wurden bei Patienten mit Holoprosenzephalie durch Roessler *et al.* (2003) beschrieben. Transgene Mäuse mit *GLI3* Mutationen wiesen Polydaktylien und Defekte im dorsalen ZNS auf, die sich in *GLI1/GLI3* Doppelmutanten nicht weiter verstärkten (Park *et al.* 2000). Beim Menschen werden Mutationen im *GLI3* Gen als Ursache des Pallister Hall Syndroms (PHS), Greig Cephalopolysyndaktyliesyndroms (GCPS) und der postaxialen Polydaktylie Typ A (PAP-A) angesehen (Ruiz i Altaba, 1999; Wild *et al.* 1997; Yang *et al.* 1997).

Die eigenen Medulloblastomergebnisse zeigen die geringste Überexpression für *GLI1*, die höchste für *GLI3*. Der Anteil an Tumoren mit Überexpression liegt jedoch bei *GLI1*, *GLI2* und *GLI3* unter 50 %. Es findet sich eine Studie von Xiao *et al.* (1994), in der die Expression von *GLI1* in unterschiedlichen ZNS-Tumoren untersucht wurde. Dort fand sich nur ein geringes Genexpressionsniveau von *GLI1*. In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen zeigen auch andere Arbeiten, wie z.B. Dahmane *et al.* (1997), von Tumor zu Tumor starke Unterschiede in der Expression von *GLI1*. Weiterhin ist bekannt, dass die Gli1 γ Form in Basalzellkarzinomen und anderen proliferierenden Geweben überexprimiert wird (Wang *et al.* 2001). Ebenso werden viele Faktoren in einem *in vitro* Modell, wie bei Regl *et al.* (2002) beschrieben, nicht miterfasst, so dass natürlich auch noch andere Faktoren in den hochkomplexen Regelkreisen interagieren. Die oben erwähnten differenzierten Regulationsmechanismen erlauben es, sich die Frage zu stellen, wieso *GLI3* in dem untersuchten Tumorkollektiv im Vergleich zu *GLI1* und *GLI2* in mehr Tumoren überexprimiert wird. Eine Studie, bei der in Abwesenheit von Gli2, Gli3 zu einer Zelldifferenzierung im Neuralrohr führte, könnte erklären, warum *GLI3* in unserem Tumorkollektiv überexprimiert ist (Motoyama *et al.* 2003). Die sowohl aktivierenden als auch inhibierenden Eigenschaften von Gli3 können jedoch auch dazu führen, dass Gli3 in proliferierenden Geweben durch Shh unterexprimiert wird (Marigo *et al.* 1996; Wang *et al.* 2000; Ingham and McMahon, 2001). Hier sind weitere Untersuchungen zur Klärung dieses komplexen Zusammenspiels notwendig.

Sheng *et al.* (2002) hat an einem transgenen Mausmodell durch Aktivierung von *GLI2* eine spezifische Basalzellkarzinomentstehung induziert. Vergleichbare Resultate brachten auch Nilsson *et al.* (2000) heraus. Als Resultat scheint die Überaktivierung von Gli2 für die Entstehung der Basalzellkarzinome verantwortlich zu sein und zusätzlich eine *GLI1* Überexpression zu verursachen (Ruiz i Altaba, 1997; Regl *et al.* 2002). Unsere Ergebnisse spiegeln die oben genannten Studien wieder. So findet sich für *GLI1*, *GLI2* und *GLI3* bis auf wenige Ausnahmen eine Genüberexpression in den untersuchten Basalzellkarzinomen. Für *GLI2* findet sich in allen untersuchten Tumoren eine deutliche Überexpression im Vergleich zu normaler Haut. Dies konnte auch Tojo *et al.* (2003) mittels quantitativer „*Reverser-Transkriptase*“ PCR in allen 15 humanen Basalzellkarzinomproben im Vergleich zu normalem Hautgewebe zeigen. Andere Hauttumoren wiesen dagegen keine erhöhte *GLI2* Expression auf.

Yoon *et al.* (2002) konnte Gli1 Bindungsstellen in der 5' Region von Cyclin D2 (*CCND2*) und Plakoglobin (*PKGB*) nachweisen. Die Gruppe der Cycline spielt eine

Schlüsselrolle bei der Steuerung des Zellzyklus. Zudem zeigten humane Rhabdomyosarkomzelllinien nach Stimulation mit Gli1 einen Anstieg der Genexpression von *CCND2* und *PKGB*. Die bei unseren Experimenten ermittelten normalen Expressionsmuster von *GLI1* in Medulloblastomen lassen vermuten, dass *CCND2* und *PKGB* ebenfalls normale Werte aufweisen. Im Falle von *PKGB* ist dies auch zutreffend. Das alternative Transkript von *PKGB* weist dahingegen größtenteils eine deutliche Unterexpression auf. Bei den Basalzellkarzinomen haben 50 % eine Überexpression und 50 % eine normale Expression des alternativen Transkripts von *PKGB*. Hier ist zu vermuten, dass die aktivierende Wirkung von Gli1 eher das alternative Transkript von *PKGB* betrifft. Weitere Studien dazu liegen derzeit noch nicht vor. Die Gli1 Bindungsstellen scheinen auf mRNA Ebene wenig Einfluss auf die Expression von *CCND2* zu haben. *CCND2* wird größtenteils deutlich überexprimiert, wohingegen *GLI1* in denselben Tumoren deutlich unterexprimiert wird. Eine fast überwiegende Überexpression von *CCND2* zeigt sich hingegen bei den Basalzellkarzinomen. *PKGB* wird zu großen Teilen normal exprimiert. Da es sich bei den Mitgliedern der Cyclin-Genfamilie um Faktoren handelt, die in hochkomplexen Regelkreisen involviert sind, scheinen weitere molekularbiologische Interaktionen Auswirkungen auf die Expression der oben genannten Genen zu haben.

Beim humanen *BTRC*-Gen handelt es sich um ein Gen, welches auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q26) lokalisiert ist (Chiaur *et al.* 2000), einer Region, die häufige Allelverluste in Medulloblastomen aufweist (Reardon *et al.* 1997). In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass das Homolog zu *BTRC*, Slimb, unter anderem im Hedgehog-Signalweg einen negativen Rückkopplungsmechanismus initiiert (Maniatis, 1999). Die eigenen Ergebnisse zeigen in fast allen Medulloblastomen eine normale Expression des *BTRC*-Gens. In einer Studie von Wolter *et al.* (2003) bei der 35 primitive neuroektodermale Tumoren und 33 Basalzellkarzinome auf ihre *BTRC*-Expression hin untersucht wurden, zeigen sich in 33 der Medulloblastome Expressionswerte von 60 % oder mehr im Vergleich zu gesundem Kleinhirngewebe. Bei den Basalzellkarzinomen ließ sich in 27 Fällen eine normale Expression nachweisen. Dies entspricht den eigenen Daten. Änderungen in der Expressionsstärke von *BTRC* sind somit kaum vorhanden und es lässt sich vermuten, dass *BTRC* Alterationen keine zentrale Bedeutung für die Entstehung von Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen besitzen.

Zwei weitere wichtige Bestandteile des Shh-Signalweges sind Suppressor of Fused (SuFu) und die Serin-Threonin Kinase Fused (Fu) in *Drosophila* (Preat *et al.* 1990). 2002 konnte durch Taylor *et al.* gezeigt werden, dass Mutationen im *SUFUH*-Gen unter anderem

zur Entstehung von Medulloblastomen beitragen. Bei SuFuh handelt es sich um einen negativen Regulator des Shh-Signalweges, der die nukleäre-zytoplasmatische Lokalisation der Gli-Transkriptionsfaktoren durch direkte Protein-Protein Interaktion reguliert (Wang *et al.* 2000; Dai *et al.* 1999). In Säugetierzellen führt SuFuh unter anderem dazu, dass Gli1 vom Nukleus ins Zytoplasma wandert und agiert somit im Sinne eines Tumorsuppressorgens. Dies wurde von Meng *et al.* (2001) an Versuchen mit Kolonkarzinomzellen (APC^{mut}) bei Mäusen dahingehend gefestigt, dass eine Überexpression von *SUFUH* zu einem verminderten Wachstum der Krebszellen führte. Betrachten wir die *SUFUH* Expression in unseren Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen, so zeigt sich ein relativ normales Expressionsniveau, trotz der leicht niedrigeren Expression von Plakoglobin. Auch hier lässt sich vermuten, dass das alternative Transkript von Plakoglobin eine bedeutendere Rolle einnimmt. Möglicherweise verhindert die erhöhte Expression von *PKGB alt.* eine höhere Expression von *SUFUH*. Doch ohne weitere Untersuchungen bleibt dies Spekulation. Das humane Homolog von Fused, hFu, reguliert die Aktivität von Gli1 und Gli2. hFu konvertiert Gli2 von einem schwachen, zu einem starken Transkriptionsfaktor, der die repressiven Effekte des humanen SuFu Homologs, SuFuh, auf Gli1 und Gli2, antagonisiert (Murone *et al.* 2000). Die genauen Mechanismen sind jedoch erst sehr unvollständig verstanden. Die Interaktionen des Shh-Signalweges finden überwiegend auf Proteinebene statt. Da es für viele Shh-Komponenten keine humanen Antikörper gab oder gibt, waren die eigenen Untersuchungen auf die mRNA Ebene beschränkt. Hier ließ sich eine deutliche Unterexpression bei *hFU* in unseren Medulloblastomen nachweisen. Die Expressionsanalyse ergab dagegen bei den Basalzellkarzinomen mit und ohne *PTCH*-Mutation in über 60 % der Fälle eine Überexpression von *hFU*. In 90 % dieser Fälle findet sich korrespondierend dazu eine meist normale Expression von *SUFUH*.

Ein weiteres Zielgen des Sonic Hedgehog-Signalweges stellt *IGF2* dar. Ingram *et al.* (2002) identifizierten insgesamt 11 neue Zielgene des Sonic-Hedgehog-Signalweges, darunter *IGF2*. Einen weiteren Zusammenhang zwischen aktiviertem Shh-Signalweg und *IGF2* Überexpression konnten Hahn *et al.* (2000) in $PTCH^{neo76/+}$ -Mäusen nachweisen. Bereits als Embryo zeigten diese $PTCH^{neo76/+}$ -Mäuse eine Überexpression von *IGF2*. In doppelt-heterozygoten „Knock-out“-Mäusen ($PTCH^{neo76/+}IGF2^{+/-}$) waren keine Tumoren (Rhabdomyosarkome und Medulloblastome) nachweisbar, so dass *Igf2* in den $PTCH^{neo76/+}$ -Mäusen zwingend für die Tumorentstehung verantwortlich ist. Die von Hahn *et al.* (2000) nachgewiesene Überexpression von *IGF2* konnten wir in unseren Untersuchungen an Medulloblastomen nicht bestätigen. Ebenso wies nur ein Drittel der Basalzellkarzinome eine

Überexpression auf. Bei den Medulloblastomen fand sich größtenteils eine Unterexpression, bei den Basalzellkarzinomen ein normales Expressionsniveau. Eine Studie von Pietsch *et al.* (1997) vermutet, dass die pathologische Aktivierung des Shh-Signalweges in der Pathogenese der desmoplastischen Medulloblastome eine vornehmliche Rolle spielt. Differenziert man jedoch hier in unserem Tumorkollektiv, so lässt sich ebenfalls nur feststellen, dass fast alle eine normale Transkription aufweisen. Ein Tumor (dpMB16) wies verminderte Expressionslevel auf. Ursächlich dafür könnte sein, dass in normalem Kleinhirngewebe *IGF2* bereits deutlich höher exprimiert wird als in gesundem Muskelgewebe. Relativ gesehen wäre die Expression im Kleinhirn- und Hautgewebe, bei Normalisierung der Expressionswerte, selbst bei gleich hoher Expression in den verschiedenen Tumoren, niedriger.

Die Promotorregion des *Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor alpha (PDGFR α)*-Gens besitzt, ebenfalls wie *CCND2* und *PKGB*, Gli1-Bindungsstellen und kann durch das Effektormolekül des Shh-Signalweges aktiviert werden. Eine deutlich erhöhte Expression von *PDGFR α* wurde bereits in murinen und humanen Basalzellkarzinomen beschrieben (Xie *et al.* 2001). Xie *et al.* (2001) zeigten an Zellkulturen das Gli1 *PDGFR α* aktivieren kann. Dies führt zur Aktivierung des ras-ERK-Signalweges. An *PTCH*^{+/-} Mäusen (einem System mit dauerhafter Aktivierung des Shh-Signalweges), konnte eine hohe *PDGFR α* Expression in Basalzellkarzinomen nachgewiesen werden (Aszterbaum *et al.* 1999). In murinen Basalzellkarzinomen gelang durch Western Blot Analysen in fast allen Tumoren der Nachweis einer *PDGFR α* Expression. Eine quantitative Analyse fehlt jedoch bisher in humanen Basalzellkarzinomen. Es wurde vermutet, dass die Genüberexprimierung von *PDGFR α* ein wesentlicher Bestandteil der Entstehung von Basalzellkarzinomen darstellt. Trotz weiter oben beschriebener deutlicher *GLII* Aktivierung fand sich *PDGFR α* in den eigenen Untersuchungen an Basalzellkarzinomen auf insgesamt normalem Expressionsniveau. Es kann also vermutet werden, dass die *PDGFR α* Expression zwar Bestandteil, jedoch nicht wesentlich für die Entstehung von Basalzellkarzinomen ist. Studien an primitiven neuroektodermalen Tumoren liegen bisher nicht vor. Unsere Ergebnisse zeigen in der Mehrzahl der Tumoren eine zum Teil deutliche Überexpression. Die Studienergebnisse von Xie *et al.* (2001) lassen sich somit auf unsere primitiven neuroektodermalen Tumoren übertragen.

Ebenfalls wie das *PTCH*-Gen stellt *HIP* ein transkriptionelles Zielgen des Shh-Weges dar. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen im Verlauf der Evolution neu aufgetretenen negativen Rückkopplungsmechanismus zur Regulation des Shh-Signalweges

(Tojo *et al.* 2002). Perrimon (1999) quantifizierte mittels „*Reverser-Transkriptase*“ PCR die Expression von *HIP* in humanen Basalzellkarzinomen. Es gelang ihm nachzuweisen, dass Proben mit den höchsten *HIP*-Expressionswerten ebenso die höchsten Genexpressionswerte bei *PTCH* aufwiesen. In anderen Hauttumoren und normalem Hautgewebe wurden erhöhte *HIP*-Expressionslevel nicht beschrieben, d.h. die Veränderung ist spezifisch für Basalzellkarzinome. Wie schon bei *PTCH* zeigten auch die Expressionswerte von *HIP* starke Schwankungen von Tumor zu Tumor, insgesamt wiesen allerdings mehr als 90 % der Basalzellkarzinome eine Überexpression des Gens im Vergleich zu normalem Hautgewebe auf. Somit bestätigen die eigenen Befunde die Ergebnisse von Perrimon (1999). Betrachtet man die *HIP*-Expression in den untersuchten Medulloblastomen, so zeigte sich ebenfalls eine sehr heterogene Expressionsbreite. Sehr interessant ist der direkte Vergleich mit *PTCH*. Ähnlich zu den Basalzellkarzinomexperimenten von Perrimon (1999) fällt auf, dass die Werte miteinander korrelieren, d.h. beide Gene werden in den jeweiligen Tumoren, bei geringen Differenzen, sehr ähnlich exprimiert. Die in den Basalzellkarzinomen beschriebenen Korrelationen der Expression von *PTCH* und *HIP* lässt sich in den Medulloblastomen somit nachvollziehen.

Bei den Forkhead Box-Proteinen (Fox) handelt es sich um wichtige Zellzyklusregulatoren. *FOXMI* ist ein Zielgen des Gli Transkriptionsfaktors im Shh-Signalweg (Teh *et al.* 2002). Foxm1 führt zu einer erhöhten Expression von *Cyclin B1* (*CCNB1*) in HeLa Zelllinien (Leung *et al.* 2001). Zudem wurde gezeigt, dass Foxm1 den *CCNB1* Promotor aktiviert. Die eigenen Ergebnisse ergaben für *FOXMI* in 75 % der Basalzellkarzinome eine Überexpression auf mRNA-Ebene. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Teh *et al.* (2002). Die *CCNB1* Expression wurde bereits oben eingehend erläutert. Hier soll nur noch kurz erwähnt werden, dass die eigenen Analysen ebenfalls eine Überexpression für *CCNB1* mRNA ergaben. Das Expressionsniveau lag dabei noch etwas über dem von *FOXMI*. Die *CCNB1* mRNA-Level waren relativ homogen mit Tendenz zu einer leichten Überexpression im Vergleich zu dem entsprechenden Normalgewebe. In den Medulloblastomen zeigten sich ebenfalls erhöhte *FOXMI* und *CCNB1* Werte. *CCND1* befand sich dagegen im normalen Transkriptionsbereich im Vergleich zu nicht-neoplastischem Kleinhirngewebe.

NMYC gehört mit *CMYC* und *LMYC* zur Familie der *MYC*-Protoonkogene. Es konnte gezeigt werden, dass *NMYC* ein direktes Zielgen des Shh-Signalweges ist und eine Aktivierung desselben zur vermehrten Expression von Nmyc führt. In diesem Kontext wurde von Kenney *et al.* (2003) anhand von DNA Microarrays *NMYC* als Zielgen des Shh-

Signalweges klassifiziert. *NMYC* wies von allen untersuchten Genen im eigenen Tumorkollektiv die höchsten Expressionswerte auf. Somit kann von einer deutlichen Aktivierung des Shh-Signalweges in allen drei Tumorsubtypen ausgegangen werden. Die Ergebnisse oben genannter Studien, lassen sich durch unsere Studien auf die primitiven neuroektodermalen Tumoren übertragen. In der Gruppe der Basalzellkarzinome fanden sich in den Tumoren mit *PTCH*-Mutation im Vergleich zu den Tumoren ohne *PTCH*-Mutation, nur für *NMYC* signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Student's T-test für *NMYC* $p = 0.0242$), d.h. *NMYC* mRNA wurde in den Basalzellkarzinomen mit *PTCH*-Mutation signifikant stärker exprimiert (Mittelwert der Expression: 9,4) als in Tumoren ohne nachgewiesener *PTCH*-Mutation (Mittelwert der Expression: 3,8) (Abb. 8). Unsere Expressionsanalyse bestätigt somit *NMYC* als ein wichtiges Zielgen des Sonic-Hedgehog-Signalweges in Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen.

Zusammenfassend sprechen unsere Expressionsanalysen an 14 embryonalen und ZNS-Tumoren, bestehend aus fünf klassischen und fünf desmoplastischen Medulloblastomen sowie vier primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) und 33 kutanen Basalzellkarzinomen mittels „Real-time“ Reverser Transkriptase-PCR dafür, dass der Sonic Hedgehog-Signalweg in Basalzellkarzinomen wesentlich häufiger aktiviert ist als in Medulloblastomen und supratentoriellen primitiven neuroektodermalen Tumoren.

5. LITERATURVERZEICHNIS

ARSENI C and Ciurea AV. 1981. Statistical survey of 276 cases of medulloblastoma (1935-1978). *Acta Neurochir. (Wien)*, 57, 159-62

ASZTERBAUM M, Epstein J, Oro A, Douglas V, LeBoit PE, Scott MP and Epstein EH Jr. 1999. Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat. Med.*, 5, 1285-91

BAI CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D and Joyner AL. 2002. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*, 129, 4753-4761

BALE AE and Yu KP. 2001. The hedgehog pathway and basal cell carcinoma. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 757-762

BARNES EA, Kong M, Ollendorff V and Donoghue DJ. 2001. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J.*, 20, 2214-2223

BELLAICHE Y, The I and Perrimon N. 1998. Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature*, 394, 85-88

BELLUSCI S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G and Hogan BL. 1997. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*, 124, 53-63

BURKE R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ and Basler K. 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signalling cells. *Cell*, 99, 803-815

CHIAUR DS, Murthy S, Cenciarelli C, Parks W, Loda M, Inghirami G, Demetrick D and Pagano M. 2000. Five human genes encoding F-box proteins: chromosome mapping and analysis in human tumors. *Cytogenet. Cell Genet.*, 88, 255-258

CHUANG PT and McMahon AP. 1999. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*, 397, 617-621

COHEN MM JR. 2003. The Hedgehog Signaling Network. *Am. J. Med. Genet.*, 123, 5-28

DAHMANE N, Lee J, Robins P, Heller P and Ruiz I Altaba A. 1997. Activation of the transcription factor Gli 1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*, 389, 876-881

DAI P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M and Ishii S. 1999. Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.*, 274, 8143-8152

DIEPGEN TL and Mahler V. 2002. The epidemiology of skin cancer. *Br. J. Dermatol.*, 146, 1-6

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

GAILANI MR, Bale SJ, Leffell DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Poliak S, Drum MA, Pastakia B, McBride OW and Kase R. 1992. Developmental defects in Gorlin syndrom related to a putative tumor suppressor gene on chromosom 9. *Cell*, 69, 11-7

GAILANI MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, Unden AB, Dean M, Brash DE, Bale AE and Toftgard R. 1996. The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat. Genet.*, 14, 78-81

GARSON JA, Pemberton LF, Sheppard PW, Varndell IM, Coakham HB and Kemshead JT. 1989. N-myc gene expression and oncoprotein characterisation in medulloblastoma. *Br. J. Cancer*, 59, 889-894

GOODRICH LV, Johnson RJ, Milenkovic L, McMahon JA and Scott MP. 1996. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.*, 10, 301-312

GORLIN RJ. 1995. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatologic Clinics*, 13, 113-124

HAGTING A, Jackman M, Simpson K and Pines J. 1999. Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal. *Curr. Biol.*, 9, 680-689

HAHN H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, Vorechovsky I, Bale AE, Toftgard R, Dean M and Wainwright B. 1996 a. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J. Biol. Chem.*, 271, 12125-12128

HAHN H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Unden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B and Bale AE. 1996 b. Mutations of the human homologue of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85, 841-851

- HAHN H**, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, Potter D, Zimmer A, Muller U, Samson E, Quintanilla-Martinez L and Zimmer A. 2000. Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J. Biol. Chem.*, 275, 28341-28344
- HARDCASTLE Z**, Mo R, Hui CC and Sharpe PT. 1998. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development*, 125, 2803-2811
- HENRIKSSON M** and Luscher B. 1996. Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv. Cancer Res.*, 68, 109-182
- INGHAM PW** and McMahon AP. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.*, 15, 3059-3087
- INGRAM WJ**, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR and Wainwright BJ. 2002. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene*, 21, 8196-8205
- JIA J**, Tong C and Jiang J. 2003. Smoothed transduces Hedgehog signal by physically interacting with Costal2/Fused complex through its C-Terminal tail. *Genes Dev.*, 17, 2709-2720
- JOHNSON RL**, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein Jr EH and Scott MP. 1996. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*, 272, 1668-1671
- KENNEY AM**, Cole MD and Rowitch DH. 2003. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development*, 130, 15-28
- KIM IM**, Ackerson T, Ramakrishna S, Tretiakova M, Wang IC, Kalin TV, Major ML, Gusarova GA, Yoder HM, Costa RH and Kalinichenko VV. 2006. The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer Res.*, 15, 2153-2161
- KINZLER KW**, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ and Vogelstein B. 1987. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*, 236, 70-73
- KINZLER KW**, Ruppert JM, Bigner SH and Vogelstein B. 1988. The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature*, 332, 371-374
- LENCH NJ**, Telford EA, High AS, Markham AF, Wicking C and Wainwright BJ. 1997. Characterization of human patched germ line mutations in naevoid basal cell carcinoma syndrome. *Hum. Genet.*, 100, 497-502

- LEUNG TW**, Lin SS, Tsang AC, Tong CS, Ching JC, Leung WY, Gimlich R, Wong GG and Yao KW. 2001. Over-expression of FoxM1 stimulates cyclin B1 expression. *FEBS Lett.*, 507, 59-66
- LIU M**, Dai B, Kang SH, Ban K, Huang FJ, Lang FF, Aldape KD, Xie TX, Pelloski CE, Xie K, Sawaya R and Huang S. 2006. FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer Res.*, 66, 3593-3602
- LOUIS DN**, Pomeroy SL and Cairncross JG. 2002. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell*, 1,125-128
- MA Y**, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K and Beachy PA. 2002. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell*, 111, 63-75
- MANIATIS T**. 1999. A ubiquitin ligase complex essential for the NF- κ B, Wnt/Wingless and Hedgehog signaling pathways. *Genes Dev.*, 13, 505-510
- MARIGO V AND TABIN CJ**. 1996. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9346-9351
- MARIGO V**, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM and Tabin CJ. 1996. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*, 384, 176-179
- MENG X**, Poon R, Zhang X, Cheah A, Ding Q, Hui CC and Alman B. 2001. Suppressor of fused negatively regulates β -catenin signaling. *J. Biol. Chem.*, 276, 40113-40119
- MOLLENHAUER J**, Wiemann S, Scheurle W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A and 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
- MOTOYAMA J**, Milenkovic L, Iwama M, Shikata Y, Scott MP and Hui CC. 2003. Differential requirement for Gli2 and Gli3 in ventral neural cell fate specification. *Dev. Biol.*, 259, 150-161
- MURONE M**, Luoh SM, Stone D, Li W, Gurney A, Armanini M, Grey C, Rosenthal A and de Sauvage FJ. 2000. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused. *Nat. Cell Biol.*, 2, 310-312
- NILSSON M**, Uden AB, Krause D, Malmqwist U, Raza K, Zaphiropoulos PG and Toftgard R. 2000. Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 3438-43.

- NÜSSLEIN-VOLHARD C** and Wieschaus E. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287, 795-801
- NYBAKKEN K** and Perrimon N. 2002. Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12, 503-511
- OIKARINEN A** and Raitio A. 2000. Melanoma and other skin cancers in circumpolar areas. *Int. J. Circumpolar Health*, 59, 52-6
- PACKER RJ**, Goldwein J, Nicholson HS, Vezina LG, Allen JC, Ris MD, Muraszko K, Rorke LB, Wara WM, Cohen BH and Boyett JM. 1999. Treatment of children with medulloblastoma with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A Children's Cancer Group Study. *J. Clin. Oncol.*, 17, 2127-2136
- PARK HL**, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M and Joyner AL. 2000. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development*, 127, 1593-1605
- PEARSE RV II**, Collier LS, Scott MP and Tabin CJ. 1999. Vertebrate homologs of *Drosophila* suppressor of fused interact with the Gli family of transcriptional regulators. *Dev. Biol.*, 212, 323-336
- PEPINSKY RB**, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA and Galdes A. 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.*, 273, 14037-14045
- PERRIMON N** and McMahon AP. 1999. Negative feedback mechanisms and their roles during pattern formation. *Cell*, 97, 13-6
- 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 und Wicking C. 1997. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res.*, 57, 2085-88
- POMEROY SL**, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zagzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES and Golub TR. 2002. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature*, 415, 436-442

PREAT T, Therond P, Lamour-Isnard C, Limbourg-Bouchon B, Tricoire H, Erk I, Mariol MC and Busson D. 1990. A putative serine/threonine protein kinase encoded by the segment-polarity fused gene of *Drosophila*. *Nature* 347, 87-89

RADNER H, Blumcke I, Reifenberger G and Wiestler OD. 2002. The new WHO classification of tumors of the nervous system 2000. *Pathology and genetics. Pathologie*, 23, 260-283

RAFFEL C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW and James CD. 1997. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res.*, 57, 842-845

RAHNAMA F, Toftgard R and Zaphiropoulos PG. 2004. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem. J.*, 378, 325-34

REARDON DA, Michalkiewicz E, Boyett JM, Sublett JE, Entekin RE, Ragsdale ST, Valentine MB, Behm FG, Li H, Heideman RL, Kun LE, Shapiro DN and Look AT. 1997. Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridisation. *Cancer Res.*, 57, 4042-4047

REGL G, Neill GW, Eichberger T, Kasper M, Ikram MS, Koller J, Hintner H, Quinn AG, Frischauf AM und Aberger F. 2002. Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinomas. *Oncogene*, 21, 5529-39

REIFENBERGER J, Knobbe CB, Sterzinger AA, Blaschke B, Schulte KW, Ruzicka T and Reifenberger G. 2004. Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas. *Int. J. Cancer*, 109, 377-84

REIFENBERGER J, Wolter M, Knobbe CB, Kohler B, Schonicke A, Scharwachter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T and Reifenberger G. 2005. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br. J. Dermatol.*, 152, 43-51

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

RIDDLE RD, Johnson RL, Laufer E and Tabin C. 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 75, 1401-1416

ROBERTS RO, Lynch CF, Jones MP and Hart MN. 1991. Medulloblastoma: a population-based study of 532 cases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 50, 134-44

- ROESSLER E**, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillesen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Ruiz I Altaba A and 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, 13424-29
- RUIZ I ALTABA A**. 1997. Catching a Gli-mouse of Hedgehog. *Cell*, 90, 193-6
- RUIZ I ALTABA A**. 1999. Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. *Trends Genet.*, 15, 418-425
- SHENG H**, Goich S, Wang A, Grachtchouk M, Lowe L, Mo R, Lin K, de Sauvage FJ, Sasaki H, Hui CC and Dlugosz AA. 2002. Dissecting the oncogenetic potential of *Gli2*: deletion of an NH(2)-terminal fragment alters skin tumor phenotype. *Cancer Res.*, 62, 5308-16
- SMYTH I**, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C and Wainwright BJ. 1999. Isolation and characterization of human patched 2 (*PTCH2*), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1q32. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 291-297
- ST-JACQUES B**, Dassule HR, Karavanova I, Botchkarev VA, Li J, Danielian PS, McMahon JA, Lewis PM, Paus R and McMahon AP. 1998. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr. Biol.*, 24, 1058-68
- TAYLOR MD**, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT and Hogg D. 2002. Mutations in *SUFU* predispose to medulloblastoma. *Nat. Genet.*, 31, 306-310
- THE I**, Bellaiche Y and Perrimon N. 1999. Hedgehog movement is regulated through tout velu-dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol. Cell*, 4, 633-639
- TEH MT**, Wong ST, Neill GW, Ghali LR, Philpott MP and Quinn AG. 2002. *FOXM1* is a downstream target of *Gli1* in basal cell carcinomas. *Cancer Res.*, 62, 4773-4780
- TOJO M**, Kiyosawa H, Iwatsuki K and Kaneko F. 2002. Expression of Sonic hedgehog signal transducer, hedgehog-interacting protein, by human basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, 146, 69-73
- TOJO M**, Kiyosawa H, Iwatsuki K, Nakamura K and Kaneko F. 2002. Expression of the *GLI2* oncogene and its isoforms in human basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.*, 148, 892-7
- VORECHOVSKY I**, Tingby O, Hartman M, Strömberg B, Nister M, Collins VP and Toftgård R. 1997. Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours. *Oncogene*, 15, 361-366

- WANG B**, Fallon JF and Beachy PA. 2000. Hedgehog-related processing of Gli3 produces anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*, 100, 423-434
- WANG XQ** and Rothnagel JA. 2001. Post-transcriptional regulation of the GLI1 oncogene by the expression of alternative 5' untranslated regions. *J. Biol. Chem.*, 276, 1311-6
- WECHSLER-REYA R** and Scott MP. 2001. The developmental biology of brain tumors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24, 385-428
- WICKING C**, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Negus K, Graham S, Suthers G, Haites N, Edwards M, Wainwright B and Chevenix-Trench G. 1997. Most germ-line mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident. *Am. J. Hum. Genet.*, 60, 21-26
- WILD A**, Kalff-Suske M, Vortkamp A, Bornholdt D, König R and Grzeschik KH. 1997. Point mutations in human GLI3 cause Greig Syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1979-84
- WOLTER M**, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T and Reifenberger G. 1997. Mutations in the human homologue of *Drosophila* segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system. *Cancer Res.*, 57, 2581-2585
- WOLTER M**, Scharwächter C, Reifenberger J, Koch A, Pietsch T and Reifenberger G. 2003. Absence of detectable alterations in the putative tumor suppressor gene BTRC in cerebellar medulloblastomas and cutaneous basal cell carcinomas. *Acta Neuropathol.*, 106, 287-290
- XIAO H**, Goldthwait DA and Mapstone T. 1994. A search for gli expression in tumors of the central nervous system. *Pediat. Neurosurg.*, 20, 178-182
- XIE J**, Aszterbaum M, Zhang X, Bonifas JM, Zachary C, Epstein E and McCormick F. 2001. A role of PDGFR α in basal cell carcinoma proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9255-9259
- XIE J**, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goggard A, Rosenthal A, Epstein Jr EH and de Sauvage FJ. 1998. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell-carcinomas. *Nature*, 391, 90-92
- YANG JT**, Liu CZ, Villavicencio EH, Yoon JW, Walterhouse D and 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, 826-35

YOON JW, Kita Y, Frank DJ, Majewski RR, Konicek BA, Nobrega MA, Jacob H, Walterhouse D and Iannaccone P. 2002. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J. Biol. Chem.*, 277, 5548-5555

ZENG X, Goetz JA, Suber LM, Scott WJ Jr, Schreiner CM and Robbins DJ. 2001. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature*, 411, 716-720

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ARF1	ADP (Adenosindiphosphat)-Ribosylierungsfaktor 1
BCC	Basalzellkarzinom
BTRC	β -transducin repeat-containing Protein
CCNB1	Cyclin B1
Ci	Cubitus interruptus
Cos2	Costal 2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Disp	Dispatchend
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpMB	desmoplastisches Medulloblastom
Fu	Fused
GCPS	Greig Cephalopolysyndaktyliesyndrom
Hh	Hedgehog
HIP	Hedgehog-Interacting-Protein
IGF2	Insulin-Wachstumsfaktor 2
kD	Kilodalton
LOH	Loss of Heterozygosity
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NS	Normales Hautgewebe
PAP-A	Polydaktylie Typ A
PDGFR α	Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor alpha
PHS	Pallister Hall Syndrom
PKA	Proteinkinase A
PKGB	Plakoglobin
PNET	Primitive neuroektodermale Tumoren
PTCH	Patched
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
Slimb	Supernumerary limbs
SMOH	Smoothened
SUFUH	Suppressor of Fused
Shh	Sonic Hedgehog
Ttv	Tout-velu
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

7. DANKSAGUNG

Herrn **Professor Dr. med. Guido Reifenberger** danke ich für die Überlassung des Themas. Er stand immer für meine Fragen zur Verfügung und hat durch seine konstruktive Kritik zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau **Dr. rer. nat. Marietta Wolter** danke ich für ihre geduldige, verständnisvolle und äußerst sympathische Art. Ohne sie wäre diese Arbeit so nicht vollendet worden. Durch sie wurde ich mit der Laborarbeit vertraut gemacht.

Den ehemaligen Mitarbeitern des Instituts, Frau **Dipl.-Biol. Kerstin Kaulich**, Herrn **Dr. rer. nat. Jörg van den Boom** und Herrn **Dr. rer. nat. Peter Roerig** danke ich für viele private Gespräche sowie schnelle Hilfe bei den kleinen und großen Problemen im Labor.

Frau **PD Dr. med. Julia Reifenberger** danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei den Basalzellkarzinomen.

Ebenfalls danke ich allen **Mitarbeitern** des Instituts für Neuropathologie, die immer ein offenes Ohr hatten.

Frau **Helga Kohc** und Herrn **Dieter Kohc** danke ich für ihr Vertrauen und dafür, dass sie eine so wundervolle Tochter haben.

Meiner Mutter **Christa Dümpelmann**, meinem Vater **Heinrich Dümpelmann** und meiner Schwester **Kirsten Dümpelmann** danke ich für ihre große Unterstützung. Sie haben mir im Leben sehr viel ermöglicht.

Liebe **Karin**, dir danke ich für die Begleitung seit Beginn meines Studiums in schweren und glücklichen Zeiten. Ich bin sehr glücklich jemanden wie dich gefunden zu haben!

ZUSAMMENFASSUNG

Die Entstehung von Medulloblastomen des Kleinhirns und Basalzellkarzinomen der Haut wird unter anderem auf Mutationen in Genen des Sonic-Hedgehog (Shh)-Signalweges zurückgeführt, darunter insbesondere Mutationen in den Genen *PTCH* und *SMOH*, deren Genprodukte den Zellmembran-ständigen Shh-Rezeptorkomplex bilden. Ziel dieser Arbeit war es, 18 Gene des Signalweges auf ihre mRNA-Expression in einer Serie von zehn Medulloblastomen (fünf klassische Medulloblastome und fünf desmoplastische Medulloblastome) und vier supratentoriellen primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNETs) sowie in 33 kutanen Basalzellkarzinomen systematisch zu untersuchen, um wesentliche Zielgene der aberranten Regulation des Shh-Signalweges in diesen Tumoren zu identifizieren.

In den Medulloblastomen und supratentoriellen PNETs konnte für 10 von 18 untersuchten Genen (*PTCH*, *SMOH*, *GLI2*, *GLI3*, *HIP*, *PDGFRA*, *FOXM1*, *CCNB1*, *CCND2* und *NMYC*) eine im Vergleich zu nicht-neoplastischem Hirngewebe mehr als zweifach erhöhte mittlere mRNA-Expression nachgewiesen werden, wobei *CCND2* und *NMYC*, beides bekannte Proto-Onkogene, die insgesamt höchsten relativen Expressionslevel aufwiesen. Allerdings zeigte die Expression der einzelnen Gene zum Teil erhebliche Schwankungen von Tumor zu Tumor. Beispielsweise war das Gen *HIP*, das für einen negativen Regulator von Shh kodiert, in fünf von vierzehn Tumoren verstärkt exprimiert, während in sechs Tumoren verminderte *HIP*-Transkriptlevel gefunden wurden. Die anderen acht untersuchten Gene zeigten im Mittel entweder keine Unterschiede zur Expression in nicht-neoplastischem Hirngewebe (*BTRC*, *GLI1*, *SUFUH*, *CCND1*, *PKGB*) oder eine verminderte Expression (*PTCH2*, *FUSED*, *IGF2*). Für keines der untersuchten Gene ergaben sich signifikante Expressionsunterschiede zwischen klassischen und desmoplastischen Medulloblastomen bzw. zwischen Medulloblastomen mit und ohne Mutation im *PCTH*-Tumorsuppressorgen.

Für 12 der 18 untersuchten Gene des Shh-Signalweges wurde in Basalzellkarzinomen ein mehr als zweifach erhöhtes Transkriptlevel im Vergleich zur Expression in normalem Hautgewebe nachgewiesen (*PTCH*, *PTCH2*, *SMOH*, *FUSED*, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*, *HIP*, *FOXM1*, *CCNB1*, *CCND2*, *NMYC*). Die Gene *HIP* und *GLI2* wiesen dabei die verhältnismäßig am stärksten ausgeprägten Expressionserhöhungen auf. Die mRNA Expressionslevel des *NMYC*-Gens waren signifikant höher in Basalzellkarzinomen mit *PTCH*-Mutation als in Basalzellkarzinomen ohne *PTCH*-Mutation. Für die anderen untersuchten Gene ergaben sich dagegen keine signifikanten Expressionsunterschiede in Relation zum *PTCH*-Mutationsstatus.

Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die wichtige Rolle einer aberranten Aktivierung des Shh-Signalweges für die Pathogenese von Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen. Für beide Tumorentitäten konnten unter den 18 untersuchten Genen 10 bzw. 12. Gene identifiziert werden, die eine mehr als zweifach höhere Expression im Tumorgewebe im Vergleich zu entsprechenden Normalgewebekontrollen aufwiesen. Die genaue Bedeutung dieser überexprimierten Gene für das Tumorstadium muss in zukünftigen molekularen und funktionellen Untersuchungen geklärt werden.

Dinkelhof, d. 25.2.08
Raf