



# **Der Hedgehog Rezeptor Patched bei der Tumorentstehung und in der Hämatopoese.**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von  
Anja Uhmann  
aus Erfurt

**Göttingen 2006**

Referent: Prof. Dr. W. Engel  
Koreferentin: PD Dr. S. Hoyer-Fender  
Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.06

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2002 bis April 2006 im Institut für Humangenetik der Universität Göttingen angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht bzw. zum Druck eingereicht:

Uhmann A, Ferch U, Bauer R, Tauber S, Arzinam Z, Chen C, Hemmerlein B, Wojnowski L, Hahn H. *A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing.* Int J Oncol, 2005 Dec; 27(6):1567-75.

Uhmann A, Dittmann K, Nitzki F, Kolova M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, T Heller, Armstrong V, Schulz-Schaeffer W, Wienands J, Hahn H. *Specification and differentiation defects of the lymphoid lineage in conditional patched mutant mice.* Nat. Immunol., 2006, eingereicht.

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Molekulare Grundlagen der Onkologie	1
1.2	Die Sonic hedgehog/Patched Signalkaskade	2
1.3	Die <i>PTCH/Ptch</i> -assoziierte Tumorigenese	6
1.3.1	Aufbau von <i>PTCH/Ptch</i>	6
1.3.2	Familiäre <i>PTCH</i> Mutationen	7
1.3.3	Spontane <i>PTCH</i> Mutationen	8
1.3.4	<i>Ptch</i> knock-out Mausmodelle	8
1.3.4.1	Die <i>Ptch</i> <sup>neo67</sup> Mauslinie	9
1.4	<i>PTCH/Ptch</i> -assoziierte RMS	11
1.4.1	Entstehung von <i>PTCH/Ptch</i> -assoziierten RMS	12
1.4.1.1	Entstehungsmechanismus von humanen <i>PTCH</i> -assoziierten RMS	12
1.4.1.2	Entstehungsmechanismus von murinen <i>Ptch</i> -assoziierten RMS	12
1.4.1.3	Ursprungszelle von <i>PTCH/Ptch</i> -assoziierten RMS	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit	16
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Statistische Auswertungsverfahren	17
2.2	Software	17
2.3	Datenbanken	17
2.4	Laborgeräte	18
2.5	Gebrauchswaren	19
2.6	Chemikalien und Reagenzien	20
2.7	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	21
2.8	Stammlösungen	21
2.9	Medien	24
2.9.1	Medien für die Bakterienkultur	24
2.9.2	Agarplatten	24
2.9.3	Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen	25
2.10	Biologisches Material	25
2.10.1	Bakterienstämme	25
2.10.2	Eukaryotische Zelllinien	25
2.10.3	Mauslinien	26
2.11	Plasmide	27
2.11.1	Klonierungsvektoren	27
2.11.2	Eukaryotische Expressionsplasmide zur Analyse des Shh/Ptch-Signalweges	27
2.11.3	<i>Pax7</i> Promotorplasmide	28
2.11.4	Kontrollexpressionsplasmide	29
2.11.5	Plasmidstandards für quantitative <i>real time</i> PCR	30
2.12	Synthetische Oligonukleotide	30
2.12.1	Synthetische DNA-Oligonukleotide	30
2.12.1.1	DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen	30
2.12.1.2	DNA-Oligonukleotide für Klonierungen	32
2.12.1.3	DNA-Oligonukleotide für DNA-Sequenzanalysen	32
2.12.1.4	DNA-Oligonukleotide für RT-PCR	34
2.12.1.5	DNA-Oligonukleotide für den Transkript-spezifischen PCR-Assay in <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> Mäusen	36
2.12.1.6	DNA-Oligonukleotide für den RACE-Assay	37
2.12.1.7	DNA-Oligonukleotide für die quantitative <i>real time</i> PCR	37
2.12.2	Synthetische RNA-Oligonukleotide	38
2.13	Enzyme	39

---

2.13.1	Restriktionsendonukleasen.....	39
2.13.2	DNA-Polymerasen .....	39
2.13.3	Weitere Enzyme.....	39
2.14	Antikörper.....	40
2.14.1	Primäre Antikörper.....	40
2.14.2	Sekundäre Antikörper und Fluorochrom-gekoppelte Streptavidin Reagenzien .....	42
2.15	Molekularbiologische Methoden.....	43
2.15.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	43
2.15.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	43
2.15.1.1.1	Plasmidpräparation geringer DNA-Mengen .....	43
2.15.1.1.2	Plasmidpräparation geringer hochreiner DNA-Mengen .....	43
2.15.1.1.3	Plasmidpräparation großer DNA-Mengen.....	44
2.15.1.2	Ethanol-fällung von DNA aus wässrigen Lösungen.....	44
2.15.1.3	Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	44
2.15.1.4	Isolierung von genomischer DNA .....	44
2.15.1.4.1	Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischer Zellkultur.....	44
2.15.1.4.2	Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe (Schwanzbiopsie, Dottersack u. ä.) ..	45
2.15.1.5	Isolierung von Gesamt-RNA.....	45
2.15.1.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischer Zellkultur .....	45
2.15.1.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben .....	46
2.15.1.5.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Knochenmark .....	46
2.15.1.6	Isolierung von poly(A) <sup>+</sup> -RNA aus Gesamt-RNA .....	46
2.15.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	47
2.15.3	Klonierungstechniken.....	47
2.15.3.1	Restriktionshydrolyse.....	47
2.15.3.2	Partielle Restriktionshydrolyse.....	48
2.15.3.3	Behandlung von DNA mit T4-DNA-Polymerase .....	48
2.15.3.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	48
2.15.3.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Herstellung transgener Mauslinien .....	48
2.15.3.6	Klonierung von PCR-Produkten.....	49
2.15.3.7	Ligation .....	49
2.15.3.8	Transformation von Bakterienzellen .....	49
2.15.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
2.15.4.1	Polymerase-Kettenreaktion an Plasmid-DNA, cDNA und genomischer DNA.....	50
2.15.4.2	Reverse Transkription.....	50
2.15.4.3	Rapid amplification of cDNA ends (RACE).....	51
2.15.4.4	Quantitative <i>real time</i> PCR .....	51
2.15.4.4.1	Aufbau und Auswertung der quantitativen <i>real time</i> PCR.....	51
2.15.4.4.1.1	Relative Quantifizierung.....	51
2.15.4.4.1.2	Plasmidstandards .....	52
2.15.4.4.1.3	Kalkulation von Plasmid-Molekülzahlen .....	52
2.15.4.4.1.4	Endogene Kontrolle .....	52
2.15.4.4.1.5	Durchführung und Aufbau der quantitativen <i>real time</i> PCR mit fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Sonden .....	53
2.15.4.4.1.6	Durchführung und Aufbau der quantitativen <i>real time</i> PCR mit SYBR green .....	53
2.15.4.4.1.7	Auswertung (Standardkurvenmethode).....	54
2.15.4.5	DNA Sequenzanalyse.....	54
2.15.5	Agarosegelelektrophorese .....	54
2.15.5.1	Ethidiumbromid-freie Agarosegelelektrophorese .....	55
2.15.6	Southern Blot .....	55
2.15.7	Klonierungen von eukaryotischen Expressionsplasmiden .....	57
2.15.7.1	Klonierung von <i>Ptch</i> Expressionsplasmiden .....	57
2.15.7.1.1	Klonierung von <i>pCR3.1 mPtch(K)wt</i> .....	57
2.15.7.1.2	Klonierung von <i>pCR3.1 mPtch(K)d67</i> .....	58
2.15.7.2	Klonierung der <i>Pax7</i> Promotorplasmide .....	58
2.15.7.2.1	Klonierung der <i>pGL3 Pax7prom</i> Reporterplasmide .....	59
2.15.7.2.2	Klonierung des <i>pPax7Cre<sup>TM</sup></i> Plasmids .....	59
2.16	Immunhistochemie und Immunzytochemie.....	61
2.16.1	Proteinchemische Methoden .....	61

2.16.1.1	Isolierung von Gesamtprotein.....	61
2.16.1.1.1	Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellkulturen .....	61
2.16.1.1.2	Proteinextrakte aus Geweben .....	61
2.16.1.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	62
2.16.1.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	62
2.16.1.4	Western Blot .....	62
2.16.1.5	Aktivitätsnachweis des <i>E. coli</i> $\beta$ -Galaktosidase Proteins .....	63
2.16.1.5.1	X-Gal-Färbung von Embryonen und Muskelfasern.....	63
2.16.1.5.2	X-Gal-Färbung an Kryostatschnitten.....	64
2.16.1.6	Quantitativer Aktivitätsnachweis der Luziferase (Dualer-Luziferase- Assay) und statistische Auswertung .....	64
2.16.2	Paraffinschnitte von Geweben.....	64
2.16.2.1	Gewebeeinbettung zum Anfertigen von Paraffinschnitten .....	64
2.16.2.2	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	65
2.16.3	Kryostatschnitte von Embryonen und Geweben.....	65
2.16.3.1	Fixierung und Äquilibration des Gewebematerials .....	65
2.16.3.2	Gewebeeinbettung zum Anfertigen von Kryostatschnitten.....	65
2.16.3.3	Anfertigung von Kryostatschnitten .....	66
2.16.4	Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung und Eindecken von Kryostat- und Paraffinschnitten..	66
2.16.5	Immunhistologische Antikörperfärbungen an Paraffinschnitten .....	66
2.16.6	Immunfluoreszenzanalysen .....	67
2.16.6.1	Durchflusszytometrische Analysen (FACS).....	67
2.16.6.2	Immunfluoreszenzfärbungen an kultivierten Zellen, Muskelfasern und Kryostatschnitten.....	68
2.17	Zellbiologische Methoden .....	69
2.17.1	Zellkultur eukaryotischer Zellen .....	69
2.17.1.1	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	70
2.17.1.1.1	Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionsplasmid-DNA .....	70
2.17.1.1.2	Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA .....	70
2.17.1.2	Stimulation des Shh/Ptch Signalweges durch Shh-N Protein .....	70
2.17.2	Isolierung und Kultivierung einzelner Muskelfasern .....	71
2.18	Zytologische und chemische Blut- und Knochenmarksanalysen.....	71
2.18.1	Assay zur Bestimmung der kolonieformenden Aktivität von Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks (Colony forming-unit Assay, CFU-Assay).....	71
2.18.2	Vollblutanalysen.....	72
2.18.2.1	Differentialblutbild und Blutausstriche.....	72
2.18.2.2	Retikulozyten-Färbung an Vollblut.....	72
2.18.3	Biochemische Analysen von Serumproben .....	72
2.18.4	Zytospin-Präparation von Knochenmarkszellen .....	73
2.19	Tierexperimentelle Methoden.....	73
2.19.1	Zucht und Haltung von <i>Mus musculus</i> .....	73
2.19.1.1	Schwanzbiopsie und Ohrlochmarkierung .....	73
2.19.1.2	Genotypisierung von Mäusen .....	73
2.19.1.3	Herstellung von transgenen Mauslinien .....	74
2.19.2	Bestimmung des Kopulationszeitpunktes und der Trächtigkeit sowie Isolierung von Mausembryonen .....	74
2.19.3	Injektionen und Blutabnahmen .....	75
2.19.3.1	Intraperitoneale und intramuskuläre Injektion von Tamoxifen.....	75
2.19.3.2	Blutabnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus und durch Herzpunktion .....	75
2.19.4	Sichtung und Präparation von Tumoren .....	75
2.19.4.1	Perfusion von Mäusen mit Paraformaldehyd.....	76
2.19.4.2	Präparation von Tumoren und Geweben .....	76
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>78</b>
3.1	Entstehung von RMS in konventionellen <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> knock-out Mäusen .....	78
3.1.1	Verminderte Expression von wt <i>Ptch</i> Transkripten und Überexpression mutanter <i>Ptch</i> <sup>d67</sup> Transkripte in RMS von <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> Mäusen .....	78
3.1.2	Verminderung der Expression von wt <i>Ptch</i> führt zur Aktivierung der Shh/Ptch Signalkaskade.....	80

3.1.3	Molekulare und funktionelle Analysen zur Expression des mutanten <i>Ptch<sup>neo67</sup></i> Allels in <i>Ptch</i> -assoziierten RMS .....	84
3.1.3.1	Exon 1a, 1b und 1c <i>Ptch</i> Spleissvarianten sind in murinen RMS überexprimiert .....	85
3.1.3.2	Das murine Homolog von Exon 1e ist Teil des murinen Exon 2 .....	86
3.1.3.3	Überexpression von Exon 1b <i>Ptch<sup>d67</sup></i> Transkripten in RMS.....	87
3.1.3.4	Das <i>Ptch<sup>d67</sup></i> Transkript wird zu einem <i>Ptch<sup>d67</sup></i> Protein translatiert.....	89
3.1.3.4.1	Immunfluoreszenz-Nachweis von <i>Ptch<sup>d67</sup></i> in transient transfizierten NIH/3T3 Zellen .	90
3.1.3.4.2	Nachweis von <i>Ptch<sup>d67</sup></i> im Western Blot .....	91
3.1.3.5	<i>Ptch<sup>d67</sup></i> Protein hat einen hemmenden Einfluss auf das <i>Ptch</i> wt Protein.....	92
3.2	Analyse der konditionellen <i>Ptch</i> knock-out Mäuse .....	94
3.2.1	Cre-vermittelte Rekombination des <i>pPtch<sup>NX</sup></i> Zielvektors <i>in vitro</i> .....	95
3.2.2	Etablierung von homozygoten <i>Ptch<sup>NX/NX</sup></i> Mäusen .....	96
3.2.3	Homozygote <i>Ptch<sup>NX/NX</sup></i> Mäuse sind phänotypisch unauffällig .....	97
3.2.4	Cre-Rekombinase-vermittelte Deletion von <i>Ptch</i> in der Keimbahn .....	99
3.2.4.1	Heterozygote <i>Ptch<sup>del/NX/+</sup></i> Mäuse entwickeln RMS und MB .....	99
3.2.4.2	Die homozygote <i>Ptch<sup>del/NX/del/NX</sup></i> Mutation ist embryonal letal.....	101
3.2.5	Deletion von <i>Ptch</i> in adulten Mäusen mittels einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase .....	105
3.2.5.1	Phänotyp adulter <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäuse nach induzierter Inaktivierung von <i>Ptch</i> .....	105
3.2.5.1.1	<i>In vivo</i> Rekombinationseffizienz des <i>Ptch<sup>NX</sup></i> Lokus .....	105
3.2.5.1.2	Hyperproliferative Organveränderungen in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen.....	108
3.2.5.1.3	T Zelldefekte in Thymi von <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen.....	111
3.2.5.1.3.1	Histologische Analysen von <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Thymi.....	111
3.2.5.1.3.2	Durchflusszytometrische Analysen von <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Thymozyten.....	112
3.2.5.1.4	B Zelldefekte in Milzen von <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	117
3.2.5.1.5	B Zelldefekt im Knochenmark von <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	120
3.2.5.1.5.1	Entwicklungsdefekt früher B Zellvorläufer im Knochenmark von <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen..	123
3.2.5.1.6	Differenzierungsdefekt der lymphoiden Linie im CLP-Stadium in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen ...	125
3.2.5.1.7	Ungestörte Granulozyten- und Makrophagendifferenzierung und partieller Defekt der Megakaryozyten- und Erythrozytenentwicklung in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	128
3.2.5.2	Versuch der Induktion von RMS in <i>Ptch<sup>NX/NX</sup> ERT<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	131
3.2.5.3	Induktion von Basaliomen in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen.....	132
3.3	Herstellung der <i>Tg(Pax7CreTM)</i> Mauslinien.....	135
3.3.1	<i>Pax7</i> spezifische Expression einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase.....	135
3.3.1.1	<i>In vitro</i> Analyse des murinen <i>Pax7</i> Promotors.....	137
3.3.1.1.1	Expression von <i>Pax7</i> in der Zelllinie C2C12 .....	137
3.3.1.1.2	<i>In vitro</i> Analyse der <i>Pax7</i> Luziferase Reporterplasmide .....	138
3.3.1.1.3	<i>In vitro</i> Analyse des <i>pPax7CreTM</i> Plasmids .....	139
3.3.1.2	Herstellung von <i>Tg(Pax7CreTM)</i> transgenen Mäusen .....	142
3.3.1.2.1	<i>In vivo</i> Analysen der CreTM-Rekombinaseexpression in <i>Tg(Pax7CreTM)</i> Mäusen	142
3.3.1.2.1.1	Keine Aktivität der CreTM-Rekombinase im Embryo .....	143
3.3.1.2.1.2	Die CreTM-Rekombinase wird im adulten Muskel exprimiert.....	144
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>147</b>
4.1	Analysen zur Entstehung von <i>Ptch</i> -assoziierten RMS.....	147
4.1.1	Shh/ <i>Ptch</i> Signalwegsaktivierung durch Reduktion von wt <i>Ptch</i> Transkripten .....	148
4.1.2	Das <i>Ptch<sup>d67</sup></i> Protein kann den Shh/ <i>Ptch</i> Signalweg nicht mehr hemmen.....	149
4.1.3	Ein modifiziertes Modell der <i>Ptch</i> -assoziierten Tumorigenese in <i>Ptch<sup>neo67/+</sup></i> Mäusen....	151
4.2	Induzierter konditioneller knock-out von <i>Ptch</i> .....	154
4.2.1	Hyperproliferative Veränderungen in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen.....	155
4.2.2	Gestörte Hämatopoese in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	155
4.2.2.1	Gestörte T Zellentwicklung in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	155
4.2.2.2	Gestörte B Zellentwicklung in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	157
4.2.2.3	Entwicklungsdefekt der lymphoiden Linie im Knochenmark von <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	158
4.2.2.4	Normale Entwicklung der myeloischen Linie in <i>tPtch<sup>-/-</sup></i> Mäusen .....	159
4.2.2.5	Zusammenfassende Betrachtung der Funktion von <i>Ptch</i> bei der Lymphopoese.....	162
4.2.3	Ausblick.....	163
4.2.4	Durch intramuskuläre Tamoxifengabe in 6 Wochen alte <i>Ptch<sup>NX/NX</sup> ERT2<sup>+/-</sup></i> Mäuse lassen sich keine RMS induzieren .....	165



---

4.2.4.1	Induktion von Basaliomen durch intramuskuläre Tamoxifengabe in 6 Wochen alte <i>Ptch<sup>NX/NX</sup>ERT2<sup>+/-</sup></i> Mäuse.....	166
4.2.4.2	Ausblick.....	168
4.3	Versuch des Nachweises der Ursprungszellen von <i>Ptch</i> -assoziierten RMS mit Hilfe von transgenen <i>Tg(Pax7CreTM)</i> Mauslinien .....	169
4.3.1	Keine Expression von <i>Tg(Pax7CreTM)</i> während der Embryonalentwicklung.....	171
4.3.2	<i>Tg(Pax7CreTM)</i> wird im adulten Muskel in Nervenstrukturen, nicht aber in Satellitenzellen aktiviert.....	172
4.3.3	Ausblick.....	174
4.3.3.1	Sind <i>Tg(Pax7CreTM)</i> Mäuse für Studien zur Ursprungszelle des RMS geeignet?.....	174
4.3.3.2	Sind <i>Tg(Pax7CreTM)</i> Mäuse für Studien an adulten Nerven geeignet? .....	175
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>176</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>178</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>182</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>197</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum vitae.....</b>	<b>199</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Molekulare Grundlagen der Onkologie

Die Entstehung von Tumoren wird seit jeher beobachtet. Schon Aristoteles (384 v. Chr. – 322 v. Chr.) verwendete den Begriff „Krebs“ (griech. "karkínos"), als er damit oberflächlich feststellbare, in benachbarte Organe infiltrierende und einwachsende Geschwülste beschrieb. Auch im ältesten bekannten Buch, dem „Papyrus Ebers“ (Ägypten; ca. 1550 v. Chr.; Zeit Amenhotep I./Anfang der 18. Dynastie/Neues Reich), sind Aufzeichnungen zur Behandlung von Tumoren zu finden (Nr. 857-877 Lehrtexte gegen Geschwülste) (Ebers G, 1875; Wreszinski W, 1913; Ghalioungui P, 1987). Als Heilmittel wurden damals neben Arsen und Verbänden auch operative Eingriffe empfohlen. Die Ursachen der Tumorentstehung begann man jedoch erst seit dem Anfang des 20. Jahrhunderts besser zu verstehen. Ellermann und Bang beschrieben erstmals Viren als Auslöser von Tumoren (Ellermann V und Bang O, 1908). Peyton Rous zeigte im Jahr 1911, dass Muskeltumoren durch den später nach ihm benannten Rous Sarkom Virus (RSV) entstehen können (Rous P, 1911) und erhielt 1966 für diese Entdeckung den Nobelpreis. Mitte der 70er Jahre gelang dann die Identifizierung von retroviralen Onkogenen als Tumorinduktoren. Es wurde gezeigt, dass diese retroviralen Onkogene relative Neuerwerbungen der Retroviren sind (Stehelin D *et al.*, 1976). Onkogene entstehen durch Veränderungen von Gensequenzen (Mutationen), die für das normale Zellwachstum, die Zellteilung und die Zelldifferenzierung eine Rolle spielen. Die Vorstufen von Onkogenen sind die sogenannten Protoonkogene. Protoonkogene sind normale Bestandteile der Zelle und werden erst durch schädliche Einflüsse (Radioaktivität, chemische Substanzen oder Viren) in die krebserzeugenden Formen, die Onkogene, umgewandelt. Es sind heute mehr als 100 Protoonkogene (Stand von 2004) bekannt. Protoonkogene werden aufgrund der kodierten Proteine in mehrere Gruppen eingeteilt. Zu diesen gehören Peptid-Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Proteinkinasen, G-Proteine und Transkriptionsfaktoren (Bishop JM, 1983; Cooper GM, 1987). Neue Dimensionen der Onkogen-Forschung wurden durch die Möglichkeit transgene Tiere herzustellen und durch die Technik der Inaktivierung von Genen in der Keimbahn (knock-out) eröffnet (Palmiter RD und Brinster RL, 1986; Sinn E *et al.*, 1987; Mansour SL *et al.*, 1988). Es konnten kausale Zusammenhänge zwischen mutierten bzw. ektopisch exprimierten Onkogenen und Krebsentstehung hergestellt werden,

wobei häufig unerwartete Funktionen dieser Gene während der embryonalen Entwicklung und der Differenzierung erkannt wurden.

Nicht immer konnte die Tumorentstehung durch Mutationen eines Onkogens erklärt werden. 1971 stellte Alfred Knudson eine „zwei Treffer“ Hypothese für die Entstehung von Retinoblastomen durch Tumorsuppressorgene vor. Er schlug vor, dass für die Entwicklung eines Retinoblastoms beide Allele des verantwortlichen Gens inaktiviert vorliegen müssen („two hit“ hypothesis, „zwei Treffer“ Hypothese) (Knudson AG, Jr., 1971). Dieses Modell erklärte erstmals die Tumorigenese durch Mutationen von Tumorsuppressorgenen. Sowohl das sporadische Auftreten von zwei somatischen Mutationen eines Tumorsuppressorgens innerhalb einer Zelle als auch die Mutation eines Allels in der Keimbahn und einer darauf folgenden somatischen Mutation des zweiten Allels (z. B. durch Verlust, welcher durch sogenanntes „loss of heterozygosity“ oder LOH erkennbar wird, oder durch inaktivierende Mutationen) können zur Tumorentwicklung führen. Heute ist bekannt, dass Tumorsuppressorgene als negative Regulatoren der Zellzyklusprogression (z. B. *Rb1*; *retinoblastoma 1*) (Stone JC *et al.*, 1989) und als Initiatoren des programmierten Zelltodes (Apoptose, z. B. *Trp53*, *transformation related protein 53*) (Vogelstein B und Kinzler KW, 1992) wirken. Einige Tumorsuppressorgene spielen eine Rolle bei der Zelladhäsion, indem sie Kontaktinhibition bewirken (z. B. *Cdh1*; *E-cadherin*) (Nagafuchi A *et al.*, 1987; Becker KF *et al.*, 1994; Oda T *et al.*, 1994).

Mutationen in Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen führen somit zur Unabhängigkeit von Mitogenen oder Wachstumsfaktoren, zur Resistenz gegen Wachstumsinhibitoren oder Apoptose und zur Entwicklung von invasiven Kapazitäten und genomischer Instabilität (Hanahan D und Weinberg RA, 2000). Die Kenntnis dieser Eigenschaften von Tumorzellen ist fundamental für das Verständnis der Krebsentstehung und für die Entwicklung von Krebstherapien.

## 1.2 Die Sonic hedgehog/Patched Signalkaskade

Nüsslein-Volhard und Wieschaus beschrieben erstmals die während eines Mutationsscreenings gefundenen Gene *Hedgehog* (*Hh*) und *Patched* (*Ptc*) in *D. melanogaster* (Nüsslein-Volhard C und Wieschaus E, 1980). Im Vergleich zu *D. melanogaster* wurden in Vertebraten drei zu *Hh* homologe und drei zu *Ptc* homologe Gene identifiziert. Zu den *Hh* Homologen zählen *Desert hedgehog* (*Dhh*), *Indian*

*Hedgehog (Ihh)* und *Sonic hedgehog (Shh)*. Zu den *Ptc* Homologen zählen *Patched (Ptch)*, *Patched 2 (Ptch2)* und *Translocation in renal carcinoma on chromosome 8 (Trc8)*. Die wichtigsten und in Vertebraten am besten untersuchten Homologen sind *Shh* und *Ptch*. Beide Gene sind in einen gemeinsamen Signalweg involviert, wobei *Ptch* der Rezeptor für *Shh* ist (Marigo V *et al.*, 1996a; Stone DM *et al.*, 1996).

In der signalsendenden Zelle wird das *Shh* Protein autokatalytisch gespalten und die aktivierende N-terminale Signaldomäne C-terminal mit Cholesterol sowie N-terminal durch Palmitoylierung modifiziert (Porter JA *et al.*, 1996; Pepinsky RB *et al.*, 1998; Chamoun Z *et al.*, 2001). Die Freisetzung dieses aktiven Liganden in den extrazellulären Raum wird durch das Membranprotein Dispatched (*Disp*) bewirkt (Burke R *et al.*, 1999).

In Abbildung 1 ist ein Modell der *Shh/Ptch* Signalkaskade innerhalb einer signalempfangenden somatischen Säugetierzelle dargestellt (links). Ohne die Bindung von *Shh* blockiert *Ptch* die Aktivität von Smoothened (*Smo*). Diese Blockade wird dabei nicht durch eine physikalische, sondern durch eine katalytische Interaktion zwischen *Ptch* und *Smo* hervorgerufen (Denef N *et al.*, 2000; Ingham PW, 2000; Taipale J *et al.*, 2002). Die Hemmung der *Smo* Aktivität bewirkt, dass die Transkriptionsfaktoren der Gli Familie über eine Reihe zytoplasmatischer Proteine (*Cos2*, *Costal 2*; *Fu*, *Fused*; *Sufu*, *Suppressor of fused*) im Zytoplasma gebunden bleiben und keine transkriptionelle Funktion ausüben können (Robbins DJ *et al.*, 1997; Ruiz i Altaba A, 1997; Monnier V *et al.*, 1998; Wang G *et al.*, 2000; Ingham PW und McMahon AP, 2001; Mullor JL *et al.*, 2002; Nybakken K und Perrimon N, 2002).

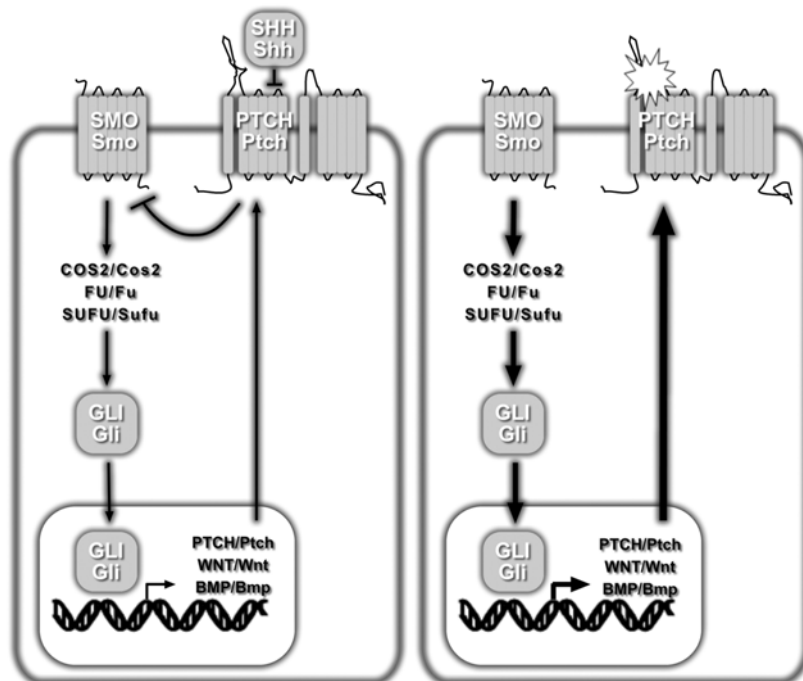
Durch die Bindung von *Shh* an seinen Rezeptor *Ptch* (Marigo V *et al.*, 1996a; Stone DM *et al.*, 1996) wird *Ptch* in seiner Funktion blockiert. Hierdurch wird die Aktivierung von *Smo* bewirkt, was die Freisetzung der zytoplasmatisch gebundenen Gli Proteine zur Folge hat. Daraufhin werden die Gli Transkriptionsfaktoren in den Nukleus transportiert, wo sie die Expression ihrer Zielgene aktivieren (*Ptch*; *Wnt*, *Wingless*; *Bmp*, *bone morphogenic protein*; siehe Kapitel 1.2) (Robbins DJ *et al.*, 1997; Ruiz i Altaba A, 1997; Monnier V *et al.*, 1998; Wang G *et al.*, 2000; Ingham PW und McMahon AP, 2001; Mullor JL *et al.*, 2002; Nybakken K und Perrimon N, 2002).

Die Gli-abhängige Transkription von *Ptch* bewirkt einen negativen Rückkopplungsmechanismus und damit die Inaktivierung des Signalweges nach *Shh*

Stimulierung. So wird sichergestellt, dass nach erfolgter Signalwegsstimulierung die Kaskade wieder in ihren unstimulierten Zustand zurückversetzt wird.

Die Kontrolle der Signalkaskade ist also direkt an die Funktionalität des Rezeptors Ptch gekoppelt. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass der Signalweg nur zu bestimmten Zeitpunkten und an bestimmten Orten durch Shh aktiviert wird (Ruiz i Altaba A *et al.*, 2002).

Heute ist bekannt, dass die mutationsbedingte Inaktivierung von *PTCH/Ptch* oder aktivierende Mutationen anderer Komponenten des Signalweges (*GLI/Gli*, *SHH/Shh*, *SMO/Smo*) sowohl beim Menschen als auch in der Maus zur pathologischen Aktivierung der Signalkaskade führen (Roberts WM *et al.*, 1989; Lam CW *et al.*, 1999). In Folge dessen werden *GLI/Gli* Zielgene verstärkt exprimiert, und es wird angenommen, dass dies zur Entstehung von Tumoren führt. In Abbildung 1 (rechts) ist eine somatische Zelle gezeigt, welche durch eine *PTCH/Ptch* inaktivierende Mutation einen konstitutiv aktiven Signalweg aufweist.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des normalen und des pathologisch aktiven Shh/Ptch Signalweges.** Dargestellt ist der Shh/Ptch Signalweg einer normalen somatischen Zelle (links) im Vergleich zu einer Zelle mit einem pathologisch aktiven Signalweg, ausgelöst durch inaktivierende *PTCH/Ptch* Mutationen. In der signalempfangenden Zelle (links) blockiert *PTCH/Ptch*, der natürliche Rezeptor des *SHH/Shh* Proteins, die Aktivität von *SMO/Smo*. Die Proteine Costal2 (*COS2/Cos2*), Fused (*FU/Fu*) und Suppressor of fused (*SUFU/Sufu*) vermitteln die zytoplasmatische Lokalisation von *GLI/Gli*. Durch die Bindung von *SHH/Shh* an seinen Rezeptor *PTCH/Ptch* wird die Aktivierung von *SMO/Smo* ausgelöst, und die *GLI/Gli* Transkriptionsfaktoren aktivieren im Nucleus die Transkription

ihrer Zielgene (*PTCH/Ptch*; *WNT/Wnt*, *Wingless*; *BMP/Bmp*, *bone morphogenic protein*). Die GLI/Gli-abhängige Expression von *PTCH/Ptch* bewirkt die negative Regulation der Signalwegsaktivierung. *PTCH/Ptch* inaktivierende Mutationen führen aufgrund der fehlenden Hemmung des Signalweges zur pathologischen Aktivierung von GLI/Gli Zielgenen und damit auch zur Überexpression von *PTCH/Ptch* selbst. In Großbuchstaben sind humane und in Kleinbuchstaben murine Homologe angegeben.

Die Aktivierung der Signalkaskade führt zur Transkription von verschiedenen Zielgenen. Diese wird durch die Familie der Gli Proteine vermittelt.

Die Familie der Gli Proteine der Vertebraten ist ortholog zum *D. melanogaster* Ci (cubitus interruptus) Protein (Kinzler KW *et al.*, 1987; Kinzler KW *et al.*, 1988; Kinzler KW und Vogelstein B, 1990) und umfasst 3 Proteine (Gli1, Gli2, Gli3), welche durch stark konservierte C2H2 Zinkfingerdomänen gekennzeichnet sind (Ruppert JM *et al.*, 1988). Während Gli2 sowohl als Transkriptionsaktivator als auch Transkriptionsrepressor wirken kann, aktiviert Gli1 nur die Expression seiner Zielgene (Ingham PW und McMahon AP, 2001). Nach seiner proteolytischen Prozessierung agiert auch das Gli3 Protein als Transkriptionsaktivator (Dai P *et al.*, 1999; Wang B *et al.*, 2000). Die Transkriptionsregulation der unterschiedlichen Gli Proteine erweitert zusätzlich die Regulation des Shh/Ptch Signalweges (Ingham PW und McMahon AP, 2001), vor allem, da die drei Gli Proteine synergistische oder redundante Wirkungsweisen besitzen (Ruiz i Altaba A, 1997; Ruiz i Altaba A, 1999; Aza-Blanc P *et al.*, 2000).

Die Gli Zielgene der Shh/Ptch Signalkaskade, zu denen auch *Ptch*, *Wnt*, *Dpp* (*Decapentaplegic*) und *Bmp* zählen, sind essentiell während der Embryogenese und der Differenzierung adulter Gewebe (Wetmore C, 2003). So spielt die *Wnt* Genfamilie eine wichtige Rolle während der Zelldifferenzierung, der Ausbildung der Zellpolarität, der Zellmigration und der Zellproliferation. Die Fehlregulation der Expression von *Wnt* Genen führt zu Entwicklungsdefekten und zur Tumorentstehung (Moon RT *et al.*, 1997; Miller JR *et al.*, 1999; Kuhl M *et al.*, 2000; Taipale J und Beachy PA, 2001). Ebenso ist bekannt, dass *Dpp* von *D. melanogaster* (ein *BMP* Ortholog) für die normale Entwicklung des embryonalen Ektoderms und adulter Gewebe notwendig ist (Podos SD und Ferguson EL, 1999). Sowohl in *D. melanogaster* als auch in Säugetieren wird außerdem der Zellzyklus über den Shh/Ptch Signalweg reguliert. So wird die Expression von *Cyclin D1* und *D2* in Säugetieren direkt von Gli1 aktiviert (Duman-Scheel M *et al.*, 2002; Mill P *et al.*, 2003). Aber auch mittels direkter

Interaktion von Ptch mit Cyclin B1 (Barnes EA *et al.*, 2001) und durch Shh-regulierte p21-vermittelte Hemmung des Zellzyklusarrestes reguliert der Signalweg direkt die Aktivität von Cyclinen (Fan H und Khavari PA, 1999).

Weiterhin wird auch die Expression der *Gli* Genfamilie über den Shh/Ptch Signalweg reguliert. So wird die Expression von *Gli1* durch die Aktivierung des Shh/Ptch Signalweges stimuliert (Bai CB *et al.*, 2002; Bai CB *et al.*, 2004), die *Gli3* Transkription dagegen scheint negativ durch das Shh-Signal reguliert zu werden (Marigo V *et al.*, 1996b). Durch eine pathologische Stimulierung des Signalweges wird somit auch eine Überexpression von *Gli1* beobachtet (Dahmane N *et al.*, 1997; Kappler R *et al.*, 2003). Auch die Überexpression von *Igf2* (*insulin-like growth factor 2*) in *Ptch*-assoziierten Tumoren lässt auf einen Regulierungsmechanismus über die Shh/Ptch Signalkaskade schließen (Hahn H *et al.*, 2000; Kappler R *et al.*, 2003).

Nach erfolgter Stimulation des Shh/Ptch Signalweges durch Shh bewirkt die Gli-abhängige Expression von *Ptch* eine negative Autoregulation der Signalwegsaktivität. Es ist bekannt, dass schon ein Ptch Molekül ausreicht, um eine fast 80 %ige Aktivitätshemmung von 45 Smo Molekülen zu bewirken (Taipale J *et al.*, 2002). Dies zeigt, wie wichtig die Expression von funktionellem Ptch für die Erhaltung der Balance und Regulierung des Shh/Ptch Signalweges ist.

### 1.3 Die *PTCH/Ptch*-assoziierte Tumorigenese

#### 1.3.1 Aufbau von *PTCH/Ptch*

Das *Ptch* Gen kodiert für ein Transmembranprotein mit 12 hydrophoben membranständigen Domänen, intrazellulären carboxy- und aminoterminalen (C- und N-terminal) Regionen und zwei großen extrazellulären Schleifen, die die Shh Ligandenbindung vermitteln (siehe Abbildung 1) (Hooper JE und Scott MP, 1989; Marigo V *et al.*, 1996c). Bei Verlust der zweiten extrazellulären Schleife des Proteins geht die Fähigkeit zur Ligandenbindung verloren, während die Repression von Smo erhalten bleibt (Briscoe J *et al.*, 2001). Wird der C-terminale Teil des Ptch Proteins deletiert, ist die Ligandenbindung weiterhin möglich, jedoch kann Smo nicht mehr durch Ptch inhibiert werden (Johnson RL *et al.*, 2000).

Das Ptch Protein besitzt, wie auch Ptch2 und Trc8, eine „sterol sensing domain“ (SSD) von etwa 180 Aminosäuren, welche fünf membranspannende Domänen

umfasst. Von weiteren SSD-Proteinen, z. B. denen der Cholesterolsignalkaskade (HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase; SCAP, SREBP cleavage activating protein) ist bekannt, dass sie Fähigkeiten zum Kargotransport besitzen, und dass sie in ihrer Aktivität durch Sterol- und/oder Lipoproteinkonzentrationen modifiziert werden (Kuwabara PE und Labouesse M, 2002). Doch obwohl die SSD für die Aktivität von Ptc essentiell ist (Chen Y und Struhl G, 1996; Marigo V *et al.*, 1996c; Stone DM *et al.*, 1996; Lewis PM *et al.*, 2001) und bekannt ist, dass Ptc in *D. melanogaster* zwischen Zellmembran und endozytotischen Vesikeln pendelt (Incardona JP *et al.*, 2000), ist die genaue Funktion der SSD von Ptc in Vertebraten bisher unklar. Im Mausmodell führt sowohl die Deletion eines Teils der SSD (*Ptc*<sup>neo67</sup>) (Hahn H *et al.*, 1998) als auch der komplette heterozygote Verlust eines *Ptc* Allels (*Ptc*<sup>neo12</sup>) (Goodrich LV *et al.*, 1997) zur Fehlregulation des Shh/Ptc Signalweges.

### 1.3.2 Familiäre *PTCH* Mutationen

Erste Hinweise, dass es sich beim humanen *PTCH* um ein Tumorsuppressorgen handeln könnte, stammen aus Untersuchungen einer autosomal-dominanten Erkrankung, welche die betroffenen Patienten zu Entwicklungsdefekten und zu Tumoren prädisponiert. Diese Erkrankung ist als Gorlin-Goltz-Syndrom bekannt.

Das Gorlin-Goltz-Syndrom (auch Nevoid Basal Cell Carcinoma; NBCCS genannt) wurde erstmals 1960 von Gorlin und Goltz beschrieben (Gorlin RJ und Goltz RW, 1960). Diese Erkrankung wird mit hoher Penetranz und variabler Expressivität vererbt, wobei etwa 40 % der Krankheitsfälle durch Neumutationen entstehen (Cohen MM, Jr., 2003). Das Syndrom ist durch eine Reihe von Entwicklungsstörungen (Hyperkeratose der Handflächen und Fußsohlen, Skelettanomalien, ektopische intrakraniale Verkalkungen, Gesichtsdysmorphien und Makrozephalie) sowie durch die Prädisposition zu verschiedenen Tumoren (Basaliome, Medulloblastome, MB; Rhabdomyosarkome, RMS) charakterisiert. Etwa 5 % der Patienten sind geistig retardiert.

1996 wurden von zwei unabhängigen Forschergruppen heterozygote Keimbahnmutationen in *PTCH* (humane chromosomale Region 9q22.3) als Ursache für NBCCS identifiziert (Hahn H *et al.*, 1996; Johnson RL *et al.*, 1996).



### 1.3.3 Spontane *PTCH* Mutationen

Gegenwärtig ist bekannt, dass auch sporadische Basaliome, MB (Unden AB *et al.*, 1996) und RMS (Bridge JA *et al.*, 2000; Tostar U *et al.*, 2006) durch somatische Mutationen in *PTCH* entstehen.

Das Basaliom ist der häufigste Tumor des Menschen (Daya-Grosjean L und Couve-Privat S, 2005). Heute wird angenommen, dass *PTCH* bei dessen Entstehung die Funktion eines „Gatekeepers“ spielt. Dies bedeutet, dass Basaliome nur dann entstehen können, wenn eine Mutation in *PTCH* vorliegt (Sidransky D, 1996; Adolphe C *et al.*, 2006). Da vielfach ein biallelischer Ausfall von *PTCH* in Basaliomen entdeckt wurde, sollte es sich bei *PTCH* um ein Tumorsuppressorgen handeln.

Auch in sporadischen MB und RMS wurden *PTCH* Mutationen entdeckt (Pietsch T *et al.*, 1997; Tostar U *et al.*, 2006). MB zählen zu den häufigsten neuroepithelialen, rasch proliferierenden Tumoren der hinteren Schädelgrube im Kindes- und Jugendalter (Fletcher CDM, 1995; Scotting PJ *et al.*, 2000). Das RMS ist ein Malignom des quergestreiften Skelettmuskels und ist das häufigste Weichteilsarkom im Kindesalter (Dagher R und Helman L, 1999).

Auch in vielen anderen Tumoren, wie beispielsweise in Tumoren der Brustdrüse (Kubo M *et al.*, 2004) und der Harnblase (Hamed S *et al.*, 2004), sind Mutationen in *PTCH* gefunden worden.

Zusätzlich ist heute bekannt, dass Fehlregulationen des Signalweges, welche durch Mutationen in anderen Genen der SHH/*PTCH* Signalkaskade oder auch durch Überexpression von *SHH* oder *GLI* ausgelöst werden, zu den oben genannten Tumoren, sowie zusätzlich zu Tumoren des Verdauungstraktes, des Pankreas und der Lunge führen können (Dahmane N *et al.*, 1997; Oro AE *et al.*, 1997; Berman DM *et al.*, 2003; Thayer SP *et al.*, 2003; Watkins DN *et al.*, 2003).

### 1.3.4 *Ptch* knock-out Mausmodelle

Goodrich *et al.* untersuchten 1997 erstmals die Funktion von *Ptch* durch Inaktivierung des Gens in Mäusen (Goodrich LV *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass homozygote *Ptch*<sup>neo12/neo12</sup> mutante Mäuse während der Embryogenese aufgrund von Neuralrohr- und Herzdefekten sterben (siehe auch Abbildung 3). Heterozygote Mäuse dagegen weisen Symptome auf, welche auch bei NBCCS-Patienten

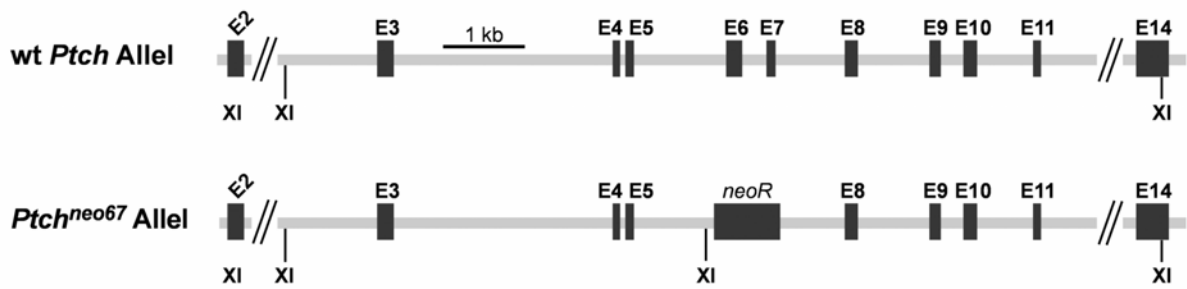
diagnostiziert werden. So wird eine Anzahl von Entwicklungsdefekten der Extremitäten (Syndakylie, Polydakylie) und eine hohe Inzidenz für das Auftreten von MB in diesen Mäusen beobachtet (Goodrich LV und Scott MP, 1998). 1998 wurde durch Analyse eines zweiten *Ptch* knock-out Mausmodells (Abbildung 2, Abbildung 3) (Hahn H *et al.*, 1998) gezeigt, dass heterozygot mutante *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäuse nicht nur die von NBCCS-Patienten bekannten Symptome aufweisen, sondern auch mit hoher Inzidenz RMS entwickeln.

Wie bereits erläutert wurde, sind MB kindliche Hirntumore und RMS die häufigsten Weichteilsarkome im Kindesalter. *Ptch* knock-out Mäuse sind daher nicht nur ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Funktion von *Ptch*, sondern auch ein hervorragendes Modell zur Überprüfung der Pathogenese dieser beiden kindlichen Tumore. Außerdem können anhand dieses Tiermodells neue Therapieansätze zur Behandlung dieser Tumoren überprüft werden.

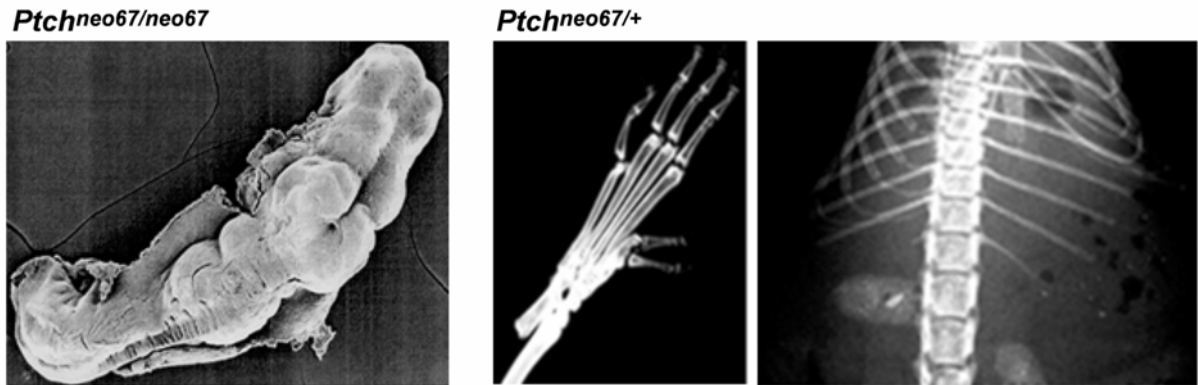
#### 1.3.4.1 Die *Ptch*<sup>neo67</sup> Mauslinie

In der *Ptch* knock-out Mauslinie *Ptch*<sup>neo67</sup> sind die Exone 6 und 7 von *Ptch* durch eine Neomycin-Resistenzkassette (*Ptch*<sup>neo67</sup> Allel) ausgetauscht worden. In Abbildung 2 ist der *Ptch*<sup>neo67</sup> Locus im Vergleich zum Wildtyp (wt) *Ptch* Locus der *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mauslinie dargestellt (Hahn H *et al.*, 1998).

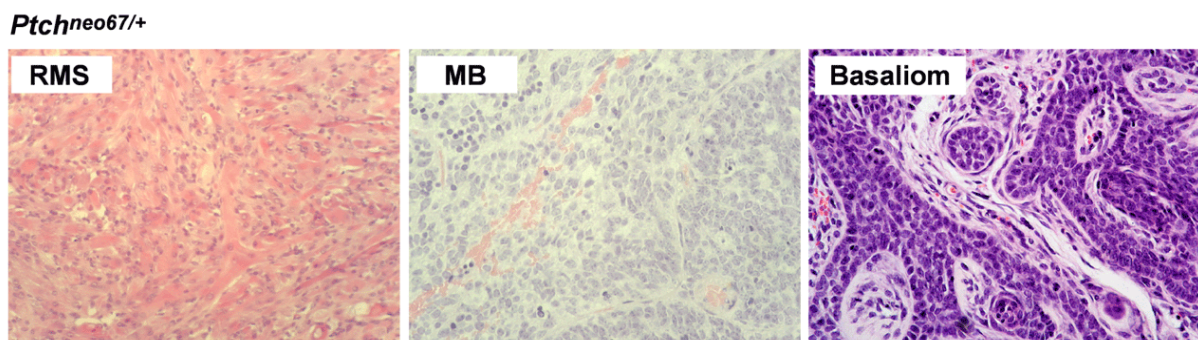
Die Mauslinie weist den bereits beschriebenen *Ptch* knock-out Phänotyp auf (siehe Kapitel 1.3.4). So sterben homozygot mutante *Ptch*<sup>neo67/neo67</sup> Embryonen während der Embryogenese aufgrund von Neuralrohr- und Herzdefekten (Abbildung 3, links). Heterozygote *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäuse können Entwicklungsdefekte aufweisen (Abbildung 3, Mitte) und entwickeln mit hoher Wahrscheinlichkeit RMS und MB (Abbildung 4, links und Mitte) (Hahn H *et al.*, 1998). Außerdem wird durch UV-Bestrahlung heterozygoter *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tiere die Entstehung von Basaliomen ausgelöst (Abbildung 4, rechts) (Aszterbaum M *et al.*, 1999).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des *Ptch<sup>neo67</sup>* Lokus.** Dargestellt sind die Exon- und Intronengenrenzen von Exon 2 bis Exon 14 (E2 bis E14) des *wt Ptch* Allels (*wt Ptch* Allel) und des mutanten *Ptch<sup>neo67</sup>* Allels von *Ptch<sup>neo67/+</sup>* Mäusen. Das *Ptch<sup>neo67</sup>* Allel enthält anstelle von Exon 6 und 7 eine Neomycin-Resistenzkassette (*neoR*) (Hahn H *et al.*, 1998).



**Abbildung 3: Entwicklungsdefekte der *Ptch<sup>neo67</sup>* Mauslinie.** Dargestellt sind eine Rasterelektronenmikroskop-Analyse eines *Ptch<sup>neo67/neo67</sup>* Embryos am Tag 9,5 *dpc* (links) sowie radiologische Analysen der Skelettanomalien von *Ptch<sup>neo67/+</sup>* Mäusen (Polydaktylie, Mitte und fehlende Rippe, rechts) (Hahn H *et al.*, 1998).



**Abbildung 4: Tumoren von *Ptch<sup>neo67/+</sup>* Mäusen.** Dargestellt sind Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbte Paraffinschnitte eines Rhabdomyosarkoms (RMS, links), eines Medulloblastoms (MB, Mitte) und eines Basalioms (rechts).

## 1.4 *PTCH/Ptch*-assoziierte RMS

Alle Skelettmuskeln, mit Ausnahme der Kopfmuskulatur, entwickeln sich aus den embryonalen Somiten. Die Myoblastenentwicklung aus den Somiten wird dabei Shh-abhängig reguliert. Die Zellproliferation und das Überleben der Zellen während der embryonalen Entwicklung der Muskulatur ist somit stark an den Shh/Ptch Signalweg gekoppelt (Cossu G und Borello U, 1999). Im adulten Organismus ist der Shh/Ptch Signalweg meist inaktiv, jedoch scheint auch hier die Proliferation und Differenzierung von sich aktiv teilenden Zellen Shh-abhängig reguliert zu sein.

Wie bereits beschrieben, werden in Vertebraten bestimmte Tumoren einschliesslich RMS durch Mutationen im Shh/Ptch Signalweg hervorgerufen. Man nimmt an, dass dies aufgrund einer pathologischen Aktivierung der Signaltransduktion geschieht. Das Auftreten von sporadischen RMS aufgrund somatischer *PTCH* Mutationen (Bridge JA *et al.*, 2000; Tostar U *et al.*, 2006) sowie die Prädisposition für RMS bei Gorlin-Goltz-Patienten (Gorlin RJ, 1987) zeigt den Einfluss der Shh/Ptch Signalkaskade bei der Entstehung von RMS im kindlichen oder adulten Organismus.

RMS sind Tumore des quergestreiften Skelettmuskels. Sie gehören zur Kategorie der klein-, blau- und rundzelligen Tumoren und sind die häufigsten Weichteilsarkome im Kindesalter. In zwei Drittel der Fälle treten RMS in einem Lebensalter unter sechs Jahren mit einer Mortalität von 40 % auf (Dagher R und Helman L, 1999).

Wahrscheinlich entstehen RMS aus primitiven mesenchymalen Zellen und nicht aus differenziertem Muskelgewebe. Die immunologische Diagnose erfolgt über den Nachweis von Muskelproteinen wie  $\alpha$ -Aktin, der schweren Myosinkette, Desmin, Myoglobin, Z-Banden Protein und MyoD (myogenic differentiation 1).

Es können zwei RMS Subtypen unterschieden werden. Charakteristisch für den embryonalen Subtyp (ERMS) sind spindelförmige, stromareiche Zellen. ERMS unterscheiden sich damit vom alveolären Subtyp (ARMS), der aus kleinen, runden, dicht gepackten Zellen besteht. ARMS entstehen häufig durch die Translokation des *Pax3* oder *Pax7* Gens mit dem *FKHR* (fork head box O1) Genlokus (Galili N *et al.*, 1993; Davis RJ und Barr FG, 1997; Barr FG, 1999; Keller C *et al.*, 2004). ERMS zeigen dagegen häufig den Verlust der Heterozygotie (LOH) am 11p15 Lokus (Merlino G und Helman LJ, 1999) und in einigen Fällen auch den Verlust von genomischem Material am *PTCH* Lokus auf Chromosom 9q22 (Bridge JA *et al.*, 2000) (siehe Kapitel 1.4.1.1). Obwohl ERMS nicht mit Pax-FKHR Fusionsproteinen in

Verbindung gebracht werden, wird in vielen ERMS *Pax7* überexprimiert (Tiffin N *et al.*, 2003).

#### **1.4.1 Entstehung von *PTCH/Ptch*-assoziierten RMS**

##### **1.4.1.1 Entstehungsmechanismus von humanen *PTCH*-assoziierten RMS**

Interessanterweise ist bei einigen Fällen von ERMS der Verlust von genomischem Material am *PTCH* Locus auf Chromosom 9q22 nachgewiesen worden (Bridge JA *et al.*, 2000).

In einer kürzlich durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass der SHH/*PTCH* Signalweg sehr häufig in humanen RMS dereguliert ist und LOH am *PTCH* Locus ein häufiges Ereignis bei ERMS ist (Tostar U *et al.*, 2006).

Bisherige Untersuchungen an *Ptch* knock-out Mäusen (siehe Kapitel 1.4.1.2) weisen darauf hin, dass die monoallelische Mutation von *Ptch* ausreichend für die Entwicklung von RMS ist (Wetmore C *et al.*, 2000; Calzada-Wack J *et al.*, 2002).

Daher wird heute davon ausgegangen, dass Haploinsuffizienz von *PTCH* die Entwicklung von *PTCH*-assoziierten Tumoren begünstigt. Jedoch ist bisher nicht geklärt, ob eine biallelische Inaktivierung von *PTCH* tatsächlich notwendig ist, um die Entwicklung von humanen RMS auszulösen. Des Weiteren ist nicht bekannt, aus welchen Zellen sich diese Tumoren entwickeln.

##### **1.4.1.2 Entstehungsmechanismus von murinen *Ptch*-assoziierten RMS**

Die meisten Erkenntnisse über die molekularen Vorgänge, die durch *Ptch* Mutationen ausgelöst werden und letztendlich in RMS resultieren, stammen aus Analysen der heterozygoten *Ptch*<sup>ne067/+</sup> Mäuse. Die Inzidenz für die Entwicklung von RMS ist bei diesen Tieren stark vom genetischen Hintergrund abhängig. So entwickeln 10 bis 15 % der heterozygoten *Ptch* mutanten Mäuse auf einem genetischen CD1 Hintergrund RMS (Hahn H *et al.*, 1998). Zusätzlich erhöhen dominante Allele des Balb/c genetischen Hintergrundes diese Prädisposition für die Entwicklung von RMS, wogegen rezessive C57BL/6N Allele die Inzidenz erniedrigen (Hahn H *et al.*, 2004).

Durch vergleichende Array-Analysen wurde gezeigt, dass sich das Expressionsprofil *Ptch*-assoziiierter RMS deutlich von den aggressiven, undifferenzierten *Trp53*-

assoziierten RMS unterscheidet (Kappler R *et al.*, 2004). RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen sind stark differenziert, wenig aggressiv und ähneln histologisch eher den ERMS als den ARMS. Auf einen ERMS Subtyp weist auch die starke *Igf2* Expression dieser Tumore hin (Hahn H *et al.*, 2000; Kappler R *et al.*, 2003). *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tiere auf einem *Igf2*-defizienten Hintergrund entwickeln keine RMS, was auf eine enge Kopplung zwischen RMS Entstehung in *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen und *Igf2* schliessen lässt (Hahn H *et al.*, 2000).

Weiterhin sind *Ptch*-assoziierte RMS durch die starke Expression von Zielgenen des aktiven Shh/*Ptch* Signalweges, wie *Ptch* und *Gli1*, gekennzeichnet (Dahmane N *et al.*, 1997; Kappler R *et al.*, 2003).

Auch Gene antiapoptotischer Signalwege (z. B. Bcl2, B cell leukemia/lymphoma 2) sowie der Zellzyklus-Inhibitor p27<sup>kip1</sup> (Cdkn1b, cyclin-dependent kinase inhibitor 1b (p27)) und der Wachstumsinhibitor Gadd45 $\alpha$  (growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha) werden im Tumorgewebe stark exprimiert (Kappler R *et al.*, 2003). Da PTCH/*Ptch* ohne den Einfluss seines Liganden SHH/Shh den apoptotischen Zelltod über die Aktivierung von Caspasen bewirkt, wurde eine zusätzliche Funktion von PTCH/*Ptch* als pro-apoptotischer „dependence“-Rezeptor postuliert (Thibert C *et al.*, 2003). „Dependence“-Rezeptoren vermitteln in Anwesenheit ihrer Liganden proliferative Signale, sind jedoch ohne Ligandenbindung für die Induktion des programmierten Zelltodes verantwortlich (Mehlen P und Bredesen DE, 2004). Dies lässt vermuten, dass die Entstehung von RMS in *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen neben der Induktion der Proliferation auch eng an die Hemmung der Apoptose gekoppelt ist.

Trotz der Einstufung von *Ptch* als Tumorsuppressorgen, wurde in RMS aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen keine biallelische Inaktivierung von *Ptch* gefunden. So konnten weder inaktivierende Mutationen im wt Allel noch der Verlust des wt Allels detektiert werden. Es wurde jedoch gezeigt, dass die starke *Ptch* Expression im Tumor durch die vermehrte Expression des mutanten Allels verursacht wird (Calzada-Wack J *et al.*, 2002). Gleichzeitig wird im Tumorgewebe die verminderte Expression von wt *Ptch* Transkripten beobachtet (Uhmann A *et al.*, 2005). Dies lässt darauf schließen, dass RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen aufgrund eines Expressionsungleichgewichts der *Ptch* Allele entstehen könnten. Bisher war aber nicht geklärt, wodurch dieses Ungleichgewicht erzeugt wird. Auch war nicht bekannt, ob das mutante Transkript

translatiert wird. Daher konnte bisher keine Aussage darüber getroffen werden, ob die verminderte Expression von wt Transkripten oder ein nicht funktionelles mutantes Protein zur Tumorigenese führt.

*PTCH* Transkripte können 5 unterschiedliche alternative erste Exone enthalten (Kogerman P *et al.*, 2002; Nagao K *et al.*, 2005a; Nagao K *et al.*, 2005b). Obwohl *in vitro* alle beschriebenen *PTCH* Isoformen zur Interaktion mit SMO befähigt sind, wurde gezeigt, dass nur die Expression von Exon 1b-enthaltenden *PTCH* Transkripten zur vollständigen Inaktivierung des SHH/*PTCH* Signalweges führt.

Da humane Exon 1b-enthaltende *PTCH* Transkripte in humanen Basaliomen überexprimiert sind (Kogerman P *et al.*, 2002), wurde die Hypothese aufgestellt, dass in humanen Basaliomen mit biallelischer *PTCH* Inaktivierung ein spezifischer *PTCH* Promotor aktiviert wird. In der Maus war bis zum Zeitpunkt der Arbeit nichts über *Ptch* Spleissvarianten oder deren Überexpression in Tumoren bekannt.

#### 1.4.1.3 Ursprungszelle von *PTCH/Ptch*-assoziierten RMS

Aufgrund der Tatsache, dass eine Aktivierung des Shh/*Ptch* Signalweges eine unkontrollierte Expansion von Stammzellen bewirkt (Zhang Y und Kalderon D, 2001), könnte es durchaus sein, dass RMS durch eine unkontrollierte Proliferation von Vorläuferzellen des Skelettmuskels entstehen. Diese Hyperproliferation könnte dabei durch die konstitutive Aktivierung des Shh/*Ptch* Signalweges und damit durch ein Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der myogenen Vorläuferzellen hervorgerufen werden. In Folge dessen könnten diese Zellen dabei zum Ziel von vermehrter Mutagenese werden, was schließlich in der Tumorentstehung resultiert.

Eine Möglichkeit um zu beweisen, dass *Ptch*-assoziierte RMS aus Muskelstammzellen entstehen, bietet die Methode des konditionellen knock-outs. Dabei wird neben der konditionellen *Ptch* knock-out Maus noch eine weitere Mauslinie benötigt, mit deren Hilfe *Ptch* gezielt in Muskelstammzellen deletiert werden kann. Um eine solche Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination zu ermöglichen, muß die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines spezifischen Muskelstammzell-Promotors exprimiert werden und darüberhinaus induzierbar sein.

---

Alle bisher untersuchten ERMS und ARMS exprimieren *Pax7* (Galili N *et al.*, 1993; Davis RJ und Barr FG, 1997; Barr FG, 1999; Keller C *et al.*, 2004). Dies trifft auch für *Ptch*-assoziierte RMS zu (Abbildung 48) (Barr FG, 2001; Tiffin N *et al.*, 2003).

Heute ist bekannt, dass *Pax7* in Satellitenzellen des Skelettmuskels exprimiert wird und für die Entstehung dieser Zellen notwendig ist (Sharp R *et al.*, 2002; Tiffin N *et al.*, 2003). Satellitenzellen sind eine Gruppe von Muskelstammzellen des adulten Skelettmuskels, die in der Lage sind, nach entsprechendem Stimulus zu proliferieren und neue Muskelfasern zu bilden.

Da RMS *Pax7* exprimieren, die adulten Stammzellen des Muskels, die Satellitenzellen, ebenfalls *Pax7* exprimieren und angenommen wird, dass sich RMS aus Muskelstammzellen entwickeln, könnte die Satellitenzelle die Ursprungszelle für die Entstehung von RMS darstellen.

Aus diesen Gründen wurde zur Herstellung der oben genannten Cre-exprimierenden Maus der *Pax7*-Promotor gewählt, der eine Satellitenzell-spezifische Expression der Cre-Rekombinase gewährleisten sollte. Da *Pax7* jedoch auch noch in anderen Geweben exprimiert wird und während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt, wurde eine induzierbare Cre-Rekombinase verwendet.



## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Pathogenese von *Ptch*-assoziierten RMS besser zu verstehen. Des Weiteren sollte der Versuch unternommen werden, die Ausgangszelle dieser Tumoren zu identifizieren. Hierzu wurden Mausmodelle verwendet.

Mit Hilfe von konventionell-hergestellten *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen sollte zunächst geklärt werden, welche *Ptch* Transkripte vom mutierten als auch von wt Lokus gebildet werden. Dann sollten die Funktionen der entsprechenden Proteine untersucht werden. Aufbauend auf diesen Untersuchungen sollte ein Modell zur Entstehung von *Ptch*-assoziierten RMS in *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen erstellt werden.

Um zu klären, ob RMS aus den adulten Stammzellen des Muskels, den Satellitenzellen, entstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine transgene Maus generiert, welche eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter dem *Pax7* Promotor exprimiert. Mit Hilfe dieser Mäuse sollte es möglich sein, *Ptch* in konditionellen *Ptch*<sup>NX/NX</sup> Mäusen gezielt in Satellitenzellen auszuschalten und zu untersuchen, ob sich Tumoren aus diesen Zellen entwickeln.

*Ptch*<sup>NX/NX</sup> Mäuse waren zum Beginn dieser Arbeit im Labor bereits generiert worden. Die Mäuse waren jedoch noch nicht charakterisiert. Daher wurde zunächst untersucht, ob die Einführung der *loxP*-Sequenzen oder der Neomycin-Resistenzkassette eine negative Auswirkung auf Expression oder Funktion von *Ptch* hat. Daher wurde *Ptch* durch die Kreuzung mit der *Tg(EllaCre)* Maus in der Keimbahn deletiert. Der entsprechende Phänotyp wurde mit dem der konventionellen knock-out Mäuse verglichen. Weiterhin wurde die *Ptch* Funktion im adulten Tier untersucht. Hierzu wurde die *ROSA26CreERT2* Mauslinie verwendet, welche eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter dem *ROSA26* Promotor exprimiert. Nach Induktion der Cre-Rekombinase in 6 und 8 Wochen alten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ROSA26CreERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen wurden der Phänotyp als auch molekulare Veränderungen untersucht.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Statistische Auswertungsverfahren

Statistische Auswertungen von Dualen-Luziferase-Assays (siehe Kapitel 2.16.1.6) und quantitativen *real time* PCR Assays (siehe Kapitel 2.15.4.4) wurden mit Hilfe der Software Statistica durchgeführt. Die statistischen Graphiken wurden in Box-Whisker-Plots dargestellt, um zentrale Tendenz, Streuung, Steigung und Spannweite einer Verteilung inklusive möglicher Ausreißer in einem Bild zusammenzufassen. Die Box umfasst die mittleren 50 % der Verteilung und reicht daher vom unteren bis zum oberen Quartil. Der Median (Zentralwert) wird durch einen senkrechten Strich an der entsprechenden Stelle in der Box deutlich gemacht.

Die Signifikanz von Unterschieden und Gleichheit der einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe eines t-Tests für unabhängige Gruppen (Mann-Whitney-U-Test) getestet. Wobei P Werte von  $P < 0,05$  als signifikant und P Werte  $P > 0,05$  als nicht-signifikant bezeichnet werden.

### 2.2 Software

ABI 3100 genetic analyser data collection 1.0	Applied Biosystems, Darmstadt
BD FacsDiva™	BD Biosciences, Heidelberg
EXEL	Microsoft Co., Redmond, USA
FlowJo	Treestar, Inc., Ashland, USA
FreeHand MX	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Intas GDS	Intas, Göttingen
Photoshop 6.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
SDS 2.1	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequencher	Applied Biosystems, Darmstadt
Simplicity 2.1	Berthold detection systems GmbH, Pforzheim
Statistica	StatSoft GmbH, Hamburg
WORD	Microsoft Co., Redmond, USA

### 2.3 Datenbanken

MGI_3.43-mouse genome informatics	<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
European Bioinformatics Institute (EBI)	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Information/">http://www.ebi.ac.uk/Information/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
MatInspector	<a href="http://www.genomatix.de/online/matinspector/matinspector.html">http://www.genomatix.de/online/matinspector/matinspector.html</a>

## 2.4 Laborgeräte

-80°C Schrank (MDF-U71V)	Sanyo Electric Co., Ltd., Japan
AcT 5 hematology analyzer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Agarosegelelektrophorese-Kammern	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Autoklav	W. Krannich GmbH & Co. K.G., Göttingen
Automat zur biochemischen Serumanalyse (MODULAR P)	Roche Diagnostics GmbH/Hitachi, Mannheim
BD LSR II flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Blotsystem (Turboblotter)	Whatman Inc., New Jersey, USA
Brutschränke; Begasungsbrutschränke (6000, BBD 6220)	Kendro Laboratory Products GmbH; Hanau
Crosslinker (Crosslinker CL-1)	Herolab GmbH, Wiesloch
Digitale Photokamera (PowerShot G2)	Canon Inc., Japan
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Entwicklermaschine (Curix 60)	AGFA Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie, Köln
Feinwaagen (Satorius Basic plus)	Satorius AG, Göttingen
Filmkassetten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gasbrenner (Gasprofi 2 scs)	WLD-TEC GmbH, Göttingen
Geiger-Zähler	Berthold detection systems GmbH, Pforzheim
Gewebeebett- und -entwässerungsautomat (TP 1020)	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Bensheim
Heizblöcke (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer (MR 3000/3001)	Heidolph Instruments, Schwabach
Homogenisator (Micra D-1)	ART-moderne Labortechnik e. K., Müllheim
Hybridisierungsöfen (HB-1000 Hybridizer)	UVP, Inc., Upland, USA
Inverses Mikroskop mit Fluoreszenzfilter (Axiovert 25, Filter set 43, 01, 09)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Kaltlichtquelle (KL 200)	Schott Glas, Mainz
Kryostat (Model CM 1900-1-1)	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Bensheim
Luminometer (MPL-3 (2 Injektoren))	Berthold detection systems GmbH, Pforzheim
MilliQ-Anlage	MembraPure GmbH, Bodenheim
Multipette	Eppendorf, Hamburg
PAGE-Kammer (PerfectBlue S)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PA-Gelgießkammer (45-V10-SC2)	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Paraffinspender, Ausgießstation (Dispenser PAG 12)	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
PCR-Gerät (PrimusHT)	MWG AG Biotech, Ebersberg
PCR-Gerät (Robocycler Gradient 96 Combo)	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande
pH-Meter (inoLab pH Level 1)	WTW GmbH, Wien, Österreich
Photometer, Thermodrucker (Biophotometer 6131 Thermodrucker DPU-414)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-jet)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Quecksilber-Kurzbogenlampe (HBO 50W/AC)	OSRAM, München
Schlittenmikrotom (HN 40)	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Bensheim
Schüttelbrutschrank	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Schüttelwasserbad (1083)	GFL mbH, Burgwedel
Sequenziergerät (ABI 3100)	Applied Biosystems, Darmstadt
Stereomikroskop (Stemi 2000)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Sterilbank (Euroflow Klasse IIA)	Clean Air Techniek bv, Woerden, Niederlande
Stromquellen für Elektrophorese	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Tank für Flüssigstickstoff	L'air liquide S.A., Paris Cedax, Frankreich
TaqMan (ABI Prism 7900H)	Applied Biosystems, Darmstadt
Ultraschallwasserbad	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
UV-Dokumentation (digital monochrome printer P91D)	Mitsubishi, Ratingen
UV-Transillimator / Software	Intas, Göttingen
Vakuumpumpe	Schütt Labortechnik, Göttingen
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Western Blot Kammer (#VEP-2)	Owl scientific, Inc., Woburn, USA
Wipp-Taumel-Tisch (Uinmax 1010)	Heidolph Instruments, Schwabach
Zählkammer nach Neubauer (Assistent)	Omnilab-Krannich, Göttingen
Zentrifuge für Zytospins (Cytospin 2)	Shandon Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Zentrifugen (Biofuge pico, fresco, primo, Multifuge 3L-R)	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Zwölfkanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg

## 2.5 Gebrauchswaren

1,5 ml Reaktionsgefäße	Ochs GmbH, Bovenden / Lengler
13 ml Röhren	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
50 ml Röhren	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
6-Loch-Platten (Tissue culture plate 6-well)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
96-Loch Glycerolstockplatte	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Aufreinigungsplatte 96-Loch (MAHVN45)	Millipore GmbH, Schwalbach
Autoradiographie-Filme (Hyperfilm MP)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Blotting-Papier (GB 33 B003)	Heinemann Labortechnik GmbH, Duderstadt
Deckgläser	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Dispensionspipetten (Combitips plus)	Eppendorf, Hamburg
ECL-Filme (Hyperfilm ECL)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
EDTA-Röhren	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Einwegspritzen (BD Plastipak)	BD GmbH, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Kanülen (Sterican Ø 0,45 x 12 mm; Ø 0,8 x 120 mm)	B. Braun Medical AG, Emmenbrücke
Kryokonservierungsröhrchen (Cryo.s)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Küvetten (UVette)	Eppendorf, Hamburg
Luminometer Messplatten (96 well assay plate)	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Na-Heparin)	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Nitrozellulosemembran (Hybond-XL)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Nitrozellulosemembran (Western Blot)	Bio-rad Laboratories GmbH, München
Objektträger (SuperFrost Plus)	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Objektträger-Kulturschalen (Culture slides)	BD Falcon, Heidelberg
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße und Deckel (ThermoFast 96, non-skirted, natural domed cap strips, natural)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Petrischalen	Ochs GmbH, Bovenden / Lengler
Pipettenspitzen, gestopft (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	G. Kisker GbR, Steinfurt

Pipettenspitzen, ungestopft (10 µl, 200 µl)	Ochs GmbH, Bovenden / Lengern
Pipettenspitzen, ungestopft (1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Skalpelle	Aesulap AG & Co.KG, Tuttlingen
Sterilfilter	Omnilab-Krannich, Göttingen
TaqMan Platten und Folien (96-well optical reaction plate, Optical adhesive covers)	Applied Biosystems, Darmstadt
Zellkulturschalen; 100 mm, 35 mm (Nunc Surface)	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden

## 2.6 Chemikalien und Reagenzien

Die folgenden nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, und von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen.

1 kb DNA und 100 bp DNA Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<sup>32</sup> P-dATP	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Borsäure	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
Cryoblock Einbettmedium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
Hemacolor	Merck KgaA, Darmstadt
Immuno Mount	Shandon Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Ketanest S (25 mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Lachsspermien-DNA (10 mg/ml;)	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande
Montagemedium (Immuno Mount)	Shandon Thermo Electron Corporation, Waltham
Montagemedium (Vectrashield mounting medium with DAPI)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
oligo(dT)-Nukleotide (50 ng/µl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PAGE Molekulargewichtsstandard (See blue plus2)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Pertex Montagemedium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)-Laufpuffer (NuPAGE MES 20x SDS-Running buffer)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rapid-hyb buffer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Ringer-Lactat (nach Hartmann)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Rnase-freies destilliertes Wasser	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rompun (2 %)	Bayer AG, Leverkusen
Sephadex G-50 fine	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
TRIZOL Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Tween20	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

## 2.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Soweit im Text nicht anders erwähnt, wurde bei der Verwendung von gebrauchsfertigen Reaktionssystemen nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

Annexin V-PE apoptosis detection kit	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
DNAeasy Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Dual-Luciferase reporter assay system	Promega GmbH, Mannheim
EasySep mouse hematopoietic progenitor cell enrichment kit	CellSystems, St. Katharinen
Enhanced chemoluminescence (ECL) Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
MicroSpin G-50 Columns	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Oligotex	Qiagen GmbH, Hilden
pGEM-Teasy vector System I	Promega GmbH, Mannheim
Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande
Protein assay Kit	Bio-rad Laboratories GmbH, München
QIAEX II / QIAquick gel extraction kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN plasmid purification	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep miniprep	Qiagen GmbH, Hilden
qPCR core kit	Eurogentec Deutschland GmbH, Köln
QuantiTect SYBR green PCR	Qiagen GmbH, Hilden
RotiFect	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SAWADY Mid Range PCR-System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Smart race cDNA amplification kit	BD Bioscience Clontech, Heidelberg
TA cloning kit (pCR II)	Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TaqMan ribosomal RNA control reagent, VIC probe	Applied Biosystems, Darmstadt
TransMessenger transfection reagent	Qiagen GmbH, Hilden
BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Eukaryotic TA expression kit (pCR3.1 unidirectional)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.8 Stammlösungen

Soweit im Text nicht ausdrücklich erwähnt, wurde für alle Stammlösungen in der MilliQ-Anlage (MembraPure GmbH, Bodenheim) aufbereitetes doppelt-destilliertes Wasser verwendet.

Brilliantkresylblau-Lösung (siehe Kapitel 2.18.2.2)	1 % (w/v)	Brilliantkresylblau 1x Phosphat gepufferte Natriumchlorid Lösung (PBS)
Citratpuffer (siehe Kapitel siehe Kapitel 2.16.5)	10 mM	Natriumcitrat                      pH 6,0
Collagenase H-Lösung (siehe Kapitel 2.17.2)	2 mg/ml	Clostridiopepidase A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Cresol (siehe Kapitel 2.15.4)	0,1 % (w/v)	DMEM, sterilfiltriert Cresol gesättigte Sukrose-Lösung

Denaturierungspuffer (siehe Kapitel 2.15.6)	1,5 M	NaCl		
	0,5 M	NaOH		
Deoxyribonukleotidtriphosphate (siehe Kapitel 2.15.4, dNTP-Mix)	10 mM	dATP		
	10 mM	dTTP		
	10 mM	dGTP		
	10 mM	dCTP		
Eosin, 1 % (siehe Kapitel 2.16.3.3)	1 % (w/v)	Eosin Y (wasserlöslich)		
	80 % (v/v)	Ethanol		
Glutaraldehyd/1x PBS (siehe Kapitel 2.16.1.5.1, 2.16.1.5.2)	0,2 % (v/v)	Glutaraldehyd		
		1x PBS		
Glyzerolreihe (siehe Kapitel 2.16.1.5.1, 2.19.2)	15 %, 30 %, 50 % bzw. 80 % (v/v)	Glyzerol		
		1x PBS		
Glycin/1x PBS (siehe Kapitel 2.16.6.2)	100 mM	Glycin		
		1x PBS		
Saures Hämatalaun nach Mayer (siehe Kapitel 2.16.3.3)	0,1 % (w/v)	Hämatoxylin		
	5 % (w/v)	Aluminiumammoniumsulfat		
	0,02 % (w/v)	Natriumjodat		
	5 % (w/v)	Chloralhydrat		
Hoch-stringenter Puffer (siehe Kapitel 2.15.6)	0,1 % (w/v)	Zitronensäure		
		Natriumdodecylsulfat (SDS)		
LacZ-Färbepuffer (siehe Kapitel 2.16.1.5)	0,2x Standard Natriumcitrat Lösung (SSC)			
		5 mM	$K_3Fe(CN)_6$	
		5 mM	$K_4Fe(CN)_6$	
		2 mM	$MgCl_2$	
		0,02 % (v/v)	NP-40	
		0,01 % (w/v)	Natrium Deoxycholat	
		500 µg/ml	X-Gal	
LacZ-Puffer (siehe Kapitel 2.16.1.5)	1x PBS			
		2 mM	$MgCl_2$	
		0,02 % (v/v)	NP-40	
Ladepuffer (siehe Kapitel 2.15.5)	1x PBS			
		0,01 % (w/v)	Natrium Deoxycholat	
		50 % (v/v)	Glyzerol	
		0,02 % (w/v)	Xylencyanol	
Lysepuffer für Plasmid-DNA Isolierungen (siehe Kapitel 2.15.1.1.1)	100 mM	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau	
		0,02 % (w/v)	SDS	
		0,02 % (w/v)	EDTA	
		200 mM	NaOH	
		1 % (w/v)	SDS	
		100 mM	Tris/HCl	pH 8,5
		200 mM	NaCl	
Lysepuffer für Proteinextrakte (siehe Kapitel 2.15.1.4.1)	5 mM	EDTA		
		0,2 % (w/v)	SDS	
		100 µg/ml	Proteinase K (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	

M-PBT Puffer (siehe Kapitel 2.16.1.4)	5 % (w/v)	Magermilchpulver	
	0,1 % (v/v)	Tween20	
	1x	PBS	
Natriumacetat-Essigsäure, pH 5,2 (siehe Kapitel 2.15.1.2)	3 M	Natriumacetat	
		Essigsäure	
Neu-Fuchsin Chromogen (siehe Kapitel 2.16.5)	0,6 % (v/v)	N,N-Dimethylformamid	
	0,05 % (w/v)	Levamisol	
	0,03 % (w/v)	Naphtol As-Bi Phosphat	
	0,02 % (w/v)	NaN <sub>3</sub>	
	0,01 % (w/v)	Neu-Fuchsin	
		1x TBS	pH 8,8 (Tris-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
Neutralisierungspuffer (siehe Kapitel 2.15.1.1.1)	2,55 M	Kaliumacetat	pH 5,5
Niedrig-stringenter Puffer (siehe Kapitel 2.15.6)	0,1 %	SDS	
		2x SSC	pH 7,0
PAGE-Sammelgel (siehe Kapitel 2.16.1.4)	4 % (v/v)	Acryl-/Bisacrylamid (1:29)	
	180 mM	Tris/HCl	pH 6,8
	0,1 % (w/v)	SDS	
	0,1 % (w/v)	APS	
	0,1 % (v/v)	TEMED	
Paraformaldehyd	4 % (w/v)	Paraformaldehyd	
		1x PBS	
Phosphat gepufferte Natriumchlorid Lösung, 10x, pH 7,4 (PBS)	1,4 M	NaCl	
	27 mM	KCl	
	15 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	65 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)-Laufgel (siehe Kapitel 2.16.1.4.)	7,5 bis 10 %	Acryl-/Bisacrylamid (1:29)	
	375 mM	Tris/HCl	pH 8,8
	0,1 % (w/v)	SDS	
	0,1 % (w/v)	Ammoniumpersulfat (APS)	
	0,1 % (v/v)	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	
Ponceau S Lösung (siehe Kapitel 2.16.1.4)	0,2 % (w/v)	Ponceau S	
	3 % (v/v)	Trichloressigsäure	
Protein-Ladepuffer (siehe Kapitel 2.16.1.4)	100 mM	Tris/HCl	pH 6,8
	20 % (v/v)	Glyzerol	
	10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol	
	4 % (w/v)	SDS	
	0,2 % (w/v)	Bromphenolblau	
Resuspensionspuffer (siehe Kapitel 2.15.1.1.1)	50 mM	Tris/HCl	pH 8,0
	10 mM	EDTA	
	100 µg/µl	RNase A (Ribonuclease A; Qiagen GmbH, Hildesheim)	
SDS-Lysepuffer (siehe Kapitel 2.16.1.1)	10 mM	Tris/HCl	pH 7,4
	1 mM	Natriumorthovanadat	
	1 % (w/v)	SDS	
Standard Natriumcitrat Lösung, 20x pH 7,0 (siehe Kapitel 2.15.6; SSC)	0,3 M	Natriumcitrat	
	3,0 M	NaCl	



STE-Puffer (siehe Kapitel 2.15.1.4.2)	50 mM	Tris/HCl	pH 8,0
	100 mM	NaCl	
	1 mM	EDTA	
	1 % (w/v)	SDS	
Sukrose/1x PBS (siehe Kapitel 2.16.3.1)	25 % (w/v)	Sukrose	
		1x PBS	
Transferpuffer (siehe Kapitel 2.16.1.4)	25 mM	Tris	
	200 mM	Glycin	
	20 % (v/v)	Methanol	
Tris-Borsäure-EDTA Lösung, 10x (siehe Kapitel 2.15.5; TBE)	890 mM	Tris/HCl	pH 8,0
	730 mM	Borsäure	
	12,5 mM	EDTA	
Tris-EDTA-Puffer (siehe Kapitel 2.15.3.5; TE)	5 mM	Tris/HCl	pH 7,4
	0,1 mM	EDTA	
Tris-gepufferte Natriumchlorid Lösung, 10x (siehe Kapitel 2.16.5, TBS)	0,5 M	Tris/HCl	pH 7,4
	1,5 M	NaCl	
TritonX-100/1x PBS (siehe Kapitel 2.16.6.2)	0,1 % (v/v)	TritonX-100	
		1x PBS	
TritonX-100/1x TBS (siehe Kapitel 2.16.5)	0,1 % (v/v)	TritonX-100	
		1x TBS	
X-Gal Stocklösung (siehe Kapitel 2.16.1.5)	40 mg/ml	X-Gal	
	100 %	N.N.-Dimethylsulfoxid (DMSO)	

## 2.9 Medien

### 2.9.1 Medien für die Bakterienkultur

Zur Kultivierung von Bakterienkulturen (*E. coli*; siehe Kapitel 2.15.1.1; 2.15.3.8) wurde mit Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v), NaCl; pH 7,0) gearbeitet.

Das LB-Medium wurde mit doppelt-destilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert. Die Selektion auf jeweilige Resistenz-vermittelnde Gene erfolgte durch Zugabe von 50 µg/ml Ampicillin (Stammkonzentration: 50 mg/ml; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bzw. 25 µg/ml Kanamycin (Stammkonzentration: 50 mg/ml; Carl Roth GmbH, Karlsruhe) direkt vor der Verwendung des Mediums.

### 2.9.2 Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben, der Ansatz wurde autoklaviert und auf 55°C abgekühlt. Nach Zugabe entsprechender Antibiotika (siehe Kapitel 2.9.1) wurde der noch warme LB-Agar in

10 cm Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Platten in sterilen Plastiktüten bei 4°C gelagert.

### 2.9.3 Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum) und Antibiotika kultiviert. Die für die jeweilige Zelllinie verwendeten Antibiotika und die eingesetzten Konzentrationen sind unter 2.10.2 aufgelistet. Bei einigen Experimenten wurde mit abweichenden Serumkonzentrationen gearbeitet, welche bei der Beschreibung der jeweiligen Experimente angegeben sind.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
fötales Kälberserum (fetal calf serum; FCS)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Geneticinsulfat (G418, 100 mg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MethoCult 3434 (Stem Cell Factor (SCF), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), Erythropoietin (EPO))	CellSystems, St. Katharinen
Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Pferdeserum (horse serum; HS)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Zeocin (100 mg/ml)	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande

## 2.10 Biologisches Material

### 2.10.1 Bakterienstämme

Zur Transformation und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der chemisch-kompetente Wirtstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet.

### 2.10.2 Eukaryotische Zelllinien

Die Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien erfolgte mit dem unter 2.9.3 beschriebenen Medium in speziellen Zellkulturschalen bei 37°C in einer konstanten CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre (5 % CO<sub>2</sub>) mit 95 % Luftfeuchtigkeit.

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.** Spalte 1: Bezeichnung der Zelllinie; 2: Ursprungsspezies und Zelltyp/Morphologie; Spalte 3: Verwendete Antibiotika und eingesetzte Konzentrationen; Spalte 4: Hersteller und Klonnummer/Literaturreferenz; Abkürzungen: PS Penicillin/Streptomycin; G418, Geneticinsulfat; *pGL 9xGli-BS*, Plasmid zur Gli-responsiver Expression der *Firefly Luziferase*; *pRL-CMV*, Plasmid zur konstitutiven Expression der *Renilla Luziferase* unter Kontrolle des *CMV* (Cytomegalie Virus) Promotor.

1	2	3	4
C2C12	Adulte Maus (Muskel/Myoblast)	1 % PS	ATCC LGC Promochem, Wesel; CRL-1772; (Yaffe D und Saxel O, 1977)
NIH/3T3	Embryonale Maus (Fibroblast)	1 % PS	ATCC LGC Promochem, Wesel; CRL-1658; (Jainchill JL <i>et al.</i> , 1969)
Shh light 2 (JHU-68)	NIH/3T3 stabil transfiziert mit <i>pGL 9xGli-BS</i> und <i>pRL-CMV</i>	0,15 mg/ml Zeocin 0,4 mg/ml G418	ATCC LGC Promochem, Wesel; CRL-2795; (Taipale J <i>et al.</i> , 2000a)

### 2.10.3 Mauslinien

Es wurden die Inzuchtlinien C57BL/6N (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, USA), Balb/c (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, USA), 129Sv (Zucht des Tierstalls des Institutes für Humangenetik, Universität Göttingen) und FVB/N (Zucht des Tierstalls des Institutes für Humangenetik, Universität Göttingen) verwendet. In Tabelle 2 sind die verwendeten genetisch manipulierten Mauslinien aufgelistet. Die Zucht und Haltung der Tiere als auch tierexperimentelle Methoden sind unter 2.19 beschrieben.

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Mauslinien.** Spalte 1: Bezeichnung der Mauslinie; Spalte 2: Genetischer Hintergrund; Spalte 3: Art der genetischen Veränderung; Spalte 4: Literaturreferenz.

1	2	3	4
<i>Pax7</i> G4	C57BL/6N	Gendeletion durch Integration des $\beta$ -Galaktosidase-Gens (knock-out)	(Mansouri A <i>et al.</i> , 1996)
<i>Ptch</i> <sup>d67</sup>	C57BL/6N / Balb/c	Gendeletion (knock-out)	(Hahn H <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ptch</i> <sup>NX</sup>	129Sv / C57BL/6N	konditionelle induzierbare Gendeletion	(diese Arbeit)
<i>ROSA26CreERT2</i>	129Sv	<i>CreERT2</i> -Gen Integration in den <i>ROSA26</i> Locus	(zur Verfügung gestellt von A Berns, Niederlanden)
<i>ROSA26-R</i>	C57BL/6N	Integration des $\beta$ -Galaktosidase-Gens in den <i>ROSA26</i> Locus	(Soriano P, 1999)
<i>Tg(Ella-Cre)</i>	C57BL/6N	Transgen zur Expression einer konstitutiv aktiven Cre-Rekombinase unter Kontrolle des <i>Ella</i> -Promotors	(Lakso M <i>et al.</i> , 1996)
<i>Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)</i>	C57BL/6N	Transgen zur Expression einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase unter Kontrolle des <i>Pax7</i> -Promotors	(diese Arbeit)

## 2.11 Plasmide

### 2.11.1 Klonierungsvektoren

Folgende Vektoren wurden für Klonierungen (siehe Kapitel 2.15.3) verwendet: *pGEM-Teasy* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), *pBSSK*<sup>+</sup> (Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande), *pCRII* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), *pCR3.1* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), *pGL3-basic* (Promega GmbH, Mannheim), *pUC19* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

### 2.11.2 Eukaryotische Expressionsplasmide zur Analyse des Shh/Ptch-Signalweges

Zur Analyse des Shh/Ptch Signalweges wurden die in Tabelle 3 aufgeführten eukaryotischen Expressionsplasmide verwendet.

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten eukaryotischen Expressionsplasmide zur Analyse des Shh/Ptch-Signalweges.** Spalte 1: Bezeichnung der Expressionsplasmide; Spalte 2: Bezeichnung der inserierten cDNA/Gen-Sequenz; Spalte 3: Bezeichnung der inserierten Promotorsequenz; Spalte 4: Bezeichnung des Leervektors; Spalte 5: Literaturreferenz. Die Leervektoren *pCR3.1* und *pcDNA/mycHis* wurden von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, *pGL-TK* von der Firma Promega GmbH, Mannheim bezogen. Abkürzungen: *CMV*, Cytomegalie Virus; *TK*, *Thymidin Kinase*; *wt*, Wildtyp.

1	2	3	4	5
<i>pcDNA mGli1 myc-His</i>	<i>Gli1</i>	<i>CMV</i> Promotor	<i>pcDNA/ myc-His</i>	(Sasaki H <i>et al.</i> , 1999)
<i>pCMV mShh-N</i>	<i>Shh-N</i> (600 bp; 1197AA)	<i>CMV</i> Promotor	<i>pCMV5</i>	(Kogerman P <i>et al.</i> , 2002)
<i>pCR3.1 mPtch(K)d67</i>	<i>Ptch</i> <sup>d67</sup>	<i>CMV</i> Promotor; Kozak-Konsensussequenz	<i>pCR3.1</i>	(Uhmann A <i>et al.</i> , 2005) (diese Arbeit)
<i>pCR3.1 mPtch(K)wt</i>	<i>wt Ptch</i>	<i>CMV</i> Promotor; Kozak-Konsensussequenz	<i>pCR3.1</i>	(Uhmann A <i>et al.</i> , 2005) (diese Arbeit)
<i>pGL3 9xGli BS</i>	<i>Firefly Luziferase</i>	9 Gli Bindestellen (Sasaki H <i>et al.</i> , 1999) proximal vom <i>TK</i> Promotor	<i>pGL-TK</i>	(Beer C <i>et al.</i> , 2003)

### 2.11.3 Pax7 Promotorplasmide

Zur Analyse der Expression des murinen *Pax7* Promotors wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Plasmide verwendet. Die Klonierung der Plasmide ist unter 2.15.7.2 beschrieben.

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Pax7 Promotorplasmide.** Spalte 1: Bezeichnung des Plasmids; Spalte 2: Bezeichnung der inserierten cDNA/Gen; Spalte 3: Größe des proximalen Teils des *Pax7* Promotors; Spalte 4: Bezeichnung/Referenz des Leervektors/Urspungsvektors. Der Leervektor *pGL3-basic* wurde von der Firma Promega GmbH, Mannheim, bezogen.

1	2	3	4
<i>pGL3 Pax7prom 3,2</i>	<i>Firefly Luziferase</i>	3,2 kb	<i>pGL3-basic</i>
<i>pGL3 Pax7prom 2,5</i>	<i>Firefly Luziferase</i>	2,5 kb	<i>pGL3-basic</i>
<i>pGL3 Pax7prom 1,5</i>	<i>Firefly Luziferase</i>	1,5 kb	<i>pGL3-basic</i>
<i>pPax7CreTM</i>	<i>MerCreMer</i>	3,5 kb	<i>pAN-MerCreMer</i> (Verrou C <i>et al.</i> , 1999)

### 2.11.4 Kontrollexpressionsplasmide

Die Verwendung der in Tabelle 5 aufgeführten Kontrollexpressionsplasmide ist bei den jeweiligen Experimenten beschrieben.

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kontrollexpressionsplasmide.** Spalte 1: Bezeichnung des Plasmids; Spalte 2: Bezeichnung der inserierten cDNA/Gen-Sequenz; Spalte 3: Bezeichnung des inserierten Promotorsequenz; Spalte 4: Literaturreferenz/Hersteller; Abkürzungen: *CMV*, Cytomegalie Virus; *TK*, *Thymin Kinase*.

1	2	3	4
<i>pAN MerCerMer</i>	<i>MerCreMer-Rekombinase</i>	$\beta$ Aktin Promotor	(Verrou C <i>et al.</i> , 1999);
<i>pEGFP-N1</i>	<i>EGFP</i>	CMV Promotor	BD Bioscience Clontech, Heidelberg
<i>pGL3 MG-185</i>	<i>Firefly Luziferase</i>	182 bp des proximalen <i>mMyogenin</i> Promotor	(Ohto H <i>et al.</i> , 1999) Promega GmbH, Mannheim ( <i>pGL3-basic</i> )
<i>pGL3-basic</i>	<i>Firefly Luziferase</i>	-	Promega GmbH, Mannheim
<i>ploxNeolox<math>\beta</math>Gal</i>	<i>loxP-flankierte Neomycin- Resistenzkassette</i>  <i><math>\beta</math>-Galaktosidase</i>	SV40 Promotor	(Schnutgen F <i>et al.</i> , 2003)
<i>pMC-Cre</i>	<i>Cre-Rekombinase</i>	TK Promotor	(Gu H <i>et al.</i> , 1993)  Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande ( <i>pMC-neo-polyA</i> )
<i>pRL-CMV</i>	<i>Renilla-Luziferase</i>	CMV Promotor	Promega GmbH, Mannheim

### 2.11.5 Plasmidstandards für quantitative *real time* PCR

Die verwendeten Plasmidstandards für die quantitative *real time* PCR (siehe Kapitel 2.15.4.4) sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Plasmidstandards für quantitative *real time* PCR.**

Spalte 1: Bezeichnung des Plasmids; Spalte 2: Bezeichnung der inserierten cDNA/Gen-Sequenz; Spalte 3: Bezeichnung des Leervektors; Spalte 4: Plasmidkopienzahl der eingesetzten ersten Verdünnung S1; Spalte 5: Literaturreferenz. Der Leervektor *pBSKS*<sup>+</sup> wurde von der Firma Stratagene, Amsterdam Zuidooost, Niederlande, der Vektor *pEGFP-N1* von der Firma BD Bioscience Clontech, Heidelberg und die Vektoren *pCR II* und *pcDNA 3.1* von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen.

1	2	3	4	5
<i>pBSKS</i> <sup>+</sup> <i>mPtc</i> wt	wt <i>Ptc</i>	<i>pBSKS</i> <sup>+</sup>	1400000	(Uhmann A <i>et al.</i> , 2005)
<i>pcDNA mGli1 myc-His</i>	<i>Gli1</i>	<i>pcDNA 3.1</i>	1400000	(Sasaki H <i>et al.</i> , 1999)
<i>pCRII 18S rRNA</i>	18S rRNA	<i>pCR II</i>	7000000	(Uhmann A <i>et al.</i> , 2005)

## 2.12 Synthetische Oligonukleotide

### 2.12.1 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Synthetische DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen GmbH, Hilden, bezogen. Die Stammkonzentration von 100 µM wurde mit Ampuwa eingestellt. Die für PCR (siehe Kapitel 2.15.4) eingesetzte Arbeitslösung wurde auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt.

#### 2.12.1.1 DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung von Mäusen ist unter 2.15.4.1 und unter 2.19.1.2 beschrieben. Hierzu wurde mit den in Tabelle 7 aufgelisteten DNA-Oligonukleotiden gearbeitet.

**Tabelle 7: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für Genotypisierung von Mauslinien.** Spalte 1: Bezeichnung der getesteten Mauslinie; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperatur bei der PCR; Spalte 3: Amplifizierte Fragmentgröße; Spalte 4: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 5: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3') Spalte 6: Literaturreferenz; Abkürzungen: <sup>wt</sup> Amplifikatlänge des Wildtyp Allels; <sup>mut</sup> Amplifikatlänge des mutanten Allels; <sup>T</sup> Amplifikatlänge des transgenen Allels; <sup>del</sup> Amplifikatlänge des Allels bei erfolgter Deletion durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination.

1	2	3	4	5	6
<i>Pax7 G4</i>	60°C	200 bp <sup>mut</sup>	<i>Pax7 Exon2-F</i>	GGGCTTGCTGCCTCCGATAGC	(Mansouri A <i>et al.</i> , 1996)
		600 bp <sup>wt</sup>	<i>Pax7 Exon2-R</i>	GTGGGGTCTTCATCAACGGTC	
			<i>Pax7-LacZ</i>	TCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCG	
<i>ROSA26-R</i>	56°C	250 bp <sup>mut</sup>	<i>Rosa1</i>	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	(Soriano P, 1999)
		500bp <sup>wt</sup>	<i>Rosa2</i>	GCGAAGAGTTTGTCCCTCAACC	
			<i>Rosa3</i>	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	
<i>Tg(Ella-Cre)</i>	67°C	600 bp <sup>T</sup>	<i>Ella-Cre F</i>	CCAGGCTAAGTGCCTTCTCTACA	(Lakso M <i>et al.</i> , 1996)
			<i>Ella-Cre R</i>	AATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT	
<i>Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)</i>	55°C	460 bp <sup>T</sup>	<i>mPax7seqF4</i>	AGGAAGAGACGCCAAGAGGTTTATC	(diese Arbeit)
			<i>MerSeqR1</i>	CATATGAACCAGCTCCCTATCTGC	
wt Gen <i>Pelota</i>	59°C	211 bp <sup>wt</sup>	<i>Pelo-F</i>	TGAGCCCAGACTGTACGTGAC	(diese Arbeit)
			<i>Pelo-R</i>	TCTGCACCTTAGCGTGAAGCC	
<i>Ptch<sup>neo67</sup></i>	60°C	bp <sup>mut</sup>	<i>neo-L</i>	AGTGCCAGCGGGGCTGCTAAA	(Hahn H <i>et al.</i> , 1998)
		635 bp <sup>wt</sup>	<i>mPTC11R3</i>	CTGCCTGTTATGTGGTTCAAACCG	
			<i>Pst4KF</i>	GGGAGGGGATTTCAGCAGAATGTT	
<i>Ptch<sup>NX</sup></i>	60°C	843 bp <sup>mut</sup>	<i>p910F.4</i>	AGCACCTGGACGACATCCTAAA	(diese Arbeit)
			<i>Neo-R</i>	GCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	
<i>Ptch<sup>NX</sup></i>	62°C	1735 bp <sup>mut</sup>	<i>Neo-F</i>	CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGG	(diese Arbeit)
			<i>p1011R.2</i>	TCTGTCCTGTTTCACTGAATGCATGG	
wt <i>Ptch</i>	60°C	1401 bp <sup>wt</sup>	<i>p910F.4</i>	AGCACCTGGACGACATCCTAAA	(diese Arbeit)
			<i>p1011R.2</i>	TCTGTCCTGTTTCACTGAATGCATGG	
<i>Ptch<sup>delNX</sup></i>	60°C	950 bp <sup>del</sup>	<i>Exon7-F</i>	AGGAAGTATATGCATTGGCAGGAG	(diese Arbeit)
			<i>Neo-R</i>	GCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	
<i>ROSA2CreERT2</i>	56°C	269 bp <sup>T</sup>	<i>RosCre ER-F</i>	ACCAGCCAGCTATCAACTC	(Berns A.; persönliche Mitteilung)
			<i>RosCre ER-R</i>	TATACGCGTGCTAGCGAAGATCTCCAC TTCCAGCAG	



### 2.12.1.2 DNA-Oligonukleotide für Klonierungen

Für Klonierungen (siehe Kapitel 2.11.3) wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten DNA-Oligonukleotide verwendet.

**Tabelle 8: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für Klonierungen.** Spalte 1: Bezeichnung des zu klonierenden Gens; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperatur bei der PCR; Spalte 3: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3'); fettgeschriebene Buchstaben markieren eingeführte/vorhandene Restriktionsendonuklease-Schnittstellen; Spalte 5: Bezeichnung der erkennenden Restriktionsendonuklease.

1	2	3	4	5
<i>pCR3.1 mPchwt</i>	60°C	<i>F-H3-ATG</i>	CCCA <b>AAGCTT</b> CCACCATGGCCTCGGCTGGTAA	<i>HindIII</i>
		<i>R-XbaI-Stop</i>	GCT <b>CTAGAT</b> CAGTTGGAGCTGCTCCCCCA	<i>XbaI</i>
<i>pGEM-Teasy mPax7prom</i>	60°C	<i>mPax7promF1</i>	AAGCACTGGCTGG <b>AAGCTC</b> ACAGCTGGA <b>ACTGGA</b>	<i>SstI</i>
		<i>mPaxNcoI cn</i>	TTCATG <b>CCATGG</b> CCATTCTGCGCACGCTGGAGACGAAT	<i>NcoI</i>
<i>pGEM-Teasy MerCreMer 5'</i>	60°C	<i>MCMfrag1BamHI-F</i>	CGC <b>GGATCC</b> ACGAAATGAAATGGGTGCTTC	<i>BamHI</i>
		<i>MCMfrag1Sall-R</i>	CATGGTCTGCAG <b>GTCGAC</b> GATCGTGTTGG	<i>Sall</i>
<i>pGEM-Teasy mPax7prom 3'</i>	60°C	<i>Paxfrag2 BamHI-F</i>	CTAGGCTCCAG <b>GGATCCC</b> CAGCAGCTATG	<i>BamHI</i>
		<i>Paxfrag2SnaBI-R</i>	CG <b>CTACGTAT</b> CCTGCGCACGCTGGAGACGAATCCAG	<i>SnaBI</i>
<i>pGEM-Teasy CI</i>	58°C	<i>IntronSnaBI-F</i>	CG <b>CTACGTA</b> AGTATCAAGGTTACAAGACAGTT	<i>SnaBI</i>
		<i>IntronBamHI-R</i>	CGC <b>GGATCCC</b> CCATCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGGAT GTCAG	<i>BamHI</i>

### 2.12.1.3 DNA-Oligonukleotide für DNA-Sequenzanalysen

Die für DNA-Sequenzanalysen (siehe Kapitel 2.15.4.5) verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 9: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für DNA-Sequenzanalysen.**  
Spalte 1: Bezeichnung des sequenzierten Plasmids; Spalte 2: Bezeichnung des sequenzierten DNA-Bereichs; Spalte 3: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3').

1	2	3	4
<i>pGEM-Teasy</i>	<i>variabel</i>	<i>pGEM-F</i>	TTTCCAGTCACGACGTTGTA
		<i>pGEM-R</i>	TGAGCGGATAACAATTCACACA
<i>pCR3.1 mPch(K)wt</i>	wt <i>Ptch</i> , <i>Ptch</i> <sup>d67</sup>	<i>mPTC2R</i>	CTGCACCAAGTGGACACTCTCTTCGT
<i>pCR3.1 mPch(K)d67</i>		<i>mPTC5R.2</i>	TTTGGGGCGACACTTTGATG
		<i>mPTC7</i>	GCATTCAGTGAACAGGACA
		<i>mPTC8</i>	CAGAAGATAGGAGAAGAGCC
		<i>mPTC8R</i>	GGCTCTTC CCTATCTTCTG
		<i>mPTC9</i>	ATCACGGAGACAGGTTACATGG
		<i>mPTC9R</i>	CCATGTAACCTGTCTCTCCGTGAT
		<i>mPTC10R</i>	GGTTAGCTGTCCCGGACTGTA
		<i>mPTC12</i>	GCTGTGGTGGTGGTATTCAAT
		<i>mPTC12R</i>	ATTGAATACCACCACCACAGC
		<i>mPTC13R</i>	TGTAGTACACGTGCGTGTGA
		<i>mPTC14R</i>	TCTCCTCCAGCATGACATAC
		<i>mPTC15R</i>	ATGATGCCATCTGCGTCTACCA
		<i>mPTC16R</i>	ACAGTCCCAGGCTCGTATAGT
		<i>mPTC20</i>	TTCTACTGAAGGGCATTCTGGC
		<i>mPTC21</i>	GCTATGAGAGCTACCCTGAGACTG
		<i>mPTC23R</i>	AACACTTCAGGG
		<i>mPTCgen1R</i>	GAGGAAGACTGCGCACACTAGAAA
		<i>mPTCgen3R.2</i>	TACACCCAGCAGAGTGGACACA
		<i>mPTCgen5F</i>	TGTCTCCAGCCAATGGCCTAAA
		<i>mPTCgen5R</i>	ACCCATTGTTTCGTGTGACCAGGA
		<i>mPTCgen6F</i>	ACTCCAGACATCAGCCTCCCTT

1	2	3	4
<i>pPax7CreTM</i>	<i>Chimeres Intron</i>	<i>Clseq-R1</i>	AGGCAAAGTGGATGTCAGTAAGA
	<i>mPax7 Promotor</i>	<i>mPax7prseq-F1</i>	GTTGGAGTGTGTTGTTTGTGTTGAA
		<i>mPax7prseq-R1</i>	GACCACAGCATCCTTGAGATGA
	<i>MerCreMer</i>	<i>MerSeqF1</i>	CCTTCAGTGAAGCCTCAATGATGG
		<i>MerSeqR1</i>	CATATGAACCAGCTCCCTATCTGC
		<i>MerSeqF2</i>	GTACACGTTTCTGTCCAGCACCTT
		<i>MerSeqF3</i>	TATGACCTGCTCCTGGAGATGTTG
		<i>MerSeqR3</i>	GTAAGGAATGTGCTGAAGTGGAGC
		<i>MerSeqR4</i>	GGATCAAAGTGTCTGTGATCTTGT
		<i>CreSeqF1</i>	AAATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT
		<i>CreSeqF2</i>	TTCGACCAGGTTTCGTTCACTCATG
		<i>CreSeqF3</i>	ATCTGCCACCAGCCAGCTATCAAC
		<i>CreSeqF4</i>	AACACGATCGTCGACCTGCAGA
		<i>CreSeqR4</i>	TTTCGTGGATCTCCAGAACCTCCA

#### 2.12.1.4 DNA-Oligonukleotide für RT-PCR

Der spezifische Nachweis von Transkripten erfolgte mittels PCR an cDNA (siehe Kapitel 2.15.4.1) und der in Tabelle 10 aufgelisteten DNA-Oligonukleotiden.

**Tabelle 10: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für RT-PCR.** Spalte 1: Bezeichnung der Gentranskripte; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperatur bei der PCR; Spalte 3: Amplifizierte Fragmentgröße; Spalte 4: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 5: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3') Spalte 6: Literaturreferenz; Abkürzungen: <sup>wt</sup> Amplifikatlänge des Wildtyp Transkriptes; <sup>del</sup> Amplifikatlänge des Transkriptes bei erfolgter Deletion durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination.

1	2	3	4	5	6
<i>Gapd</i>	58°C	576 bp	<i>Gapd-F</i>	ATCTTCTTGTGCAGTGCCAG	(Uhmann A <i>et al.</i> , 2005)
			<i>Gapd-R</i>	ATGACCACAGTCCATGCCAT	
<i>Gli1</i>	60°C	419 bp	<i>mGliF8</i>	TGCACCAAGCGCTACACAGATCCCA	Regine Bauer
			<i>mGliR9</i>	AGCTGATGCAGCTGATCCAGCCTA	
<i>Igf2</i>	55°C	454 bp	<i>Igf2 TaqManF</i>	TGTGCTGCATCGCTGCTTAC	Regine Bauer
			<i>Igf2 Exon6R</i>	TTGCTGGACATCTCCGAAGAG	
<i>Pax7</i>	58°C	585 bp	<i>mPax7-F1</i>	CCAAGATTCTGTGCCGATATCAGGA	(diese Arbeit)
			<i>mPax7-R1</i>	AGCTGGTTAGCTCCTGCCTGCTTA	
<i>wt Ptch</i>	55°C	731 bp <sup>wt</sup>	<i>mPtc11</i>	AAAGCCGAAGTTGGCCATGGGTAC	(diese Arbeit)
<i>Ptch<sup>delINX</sup></i>		451 bp <sup>del</sup>	<i>mPtc7R</i>	TGCCTGTTTCACTGAATGC	
<i>β Aktin</i>	58°C	646 bp	<i>β-actin-F</i>	CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>β-actin-R</i>	TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA	
<i>EBF</i>	54°C	649 bp	<i>EBF-F</i>	CAAGACAAGAACCCTGAAATG	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>EBF-R</i>	GTAACCTCTGGAAGCCGTAGT	
<i>Flt3</i>	54°C	624 bp	<i>Flt3-F</i>	TCTTGAGACCGTTACAAACC	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>Flt3-R</i>	ATGTCTGTTCCGAACAACCTC	
<i>Ikaros</i>	54°C	464 bp	<i>Ikaros-F</i>	CACTACCTCTGGAGCACAGC	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>Ikaros-R</i>	TCTGAGGCATAGAGCTCTTA	
<i>IL-7Rα</i>	58°C	315 bp	<i>IL-7Rα-F</i>	TTACTTCAAAGGCTTCTGGAG	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>IL-7Rα-R</i>	CTGGCTTCAACGCCTTTACCTCA	
<i>Pax5</i>	54°C	561 bp	<i>Pax5-F</i>	CGGGTCAGCCATGGTTGTG	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>Pax5-R</i>	GTGCTGTCTCTCAAACACG	
<i>PU.1</i>	58°C	391 bp	<i>PU.1-F</i>	CGGATGTGCTTCCCTTATCAAAC	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>PU.1-R</i>	TGACTTTCTTACCTCGCCTGTC	
<i>Rag-1</i>	58°C	554 bp	<i>Rag-1-F</i>	TGCAGACATTCTAGCACTCTGGCC	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>Rag-1-R</i>	ACATCTGCCTTACGTGATCCGG	
<i>Rag-2</i>	58°C	513 bp	<i>Rag-2-F</i>	CACATCCACAAGCAGGAAGTACAC	(DeKoter RP <i>et al.</i> , 2002)
			<i>Rag-2-R</i>	TCCCTCGACTATACACCACGTCAA	

### 2.12.1.5 DNA-Oligonukleotide für den Transkript-spezifischen PCR-Assay in *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen

Zur Unterscheidung zwischen Exon 1b enthaltenden mutanten und wt *Ptch* Transkripten wurde ein Transkript-spezifischer PCR Assay durchgeführt. Als Matritze wurde mit cDNA (siehe Kapitel 2.15.4.2) aus Tumor-RNA (RMS) und Skelettmuskel-RNA (siehe Kapitel 2.15.1.5.2) gearbeitet. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 11 aufgelistet. Pro PCR-Ansatz wurden die beiden Rückwärts-Oligonukleotide und das Vorwärtsnukleotid (je 0,43 µM) eingesetzt und 50 ng cDNA aus Tumor- oder Skelettmuskel zugegeben. Das Vorwärts-Oligonukleotid (*mPtch1b-nest*) bindet spezifisch an das alternative Exon 1b der *Ptch* Transkripte. Die Rückwärts-Oligonukleotide vermittelten die Sequenzspezifität für mutante (*Ex5/8-R*) oder wt (*Ex5/6-R*) Matrizen-cDNA und wurden so gewählt, dass die Fragmente bei der Amplifikation mit *mPtch1b-nest* jeweils 631 bp gross sind. Die verwendeten PCR-Bedingungen sind Kapitel 2.15.4 zu entnehmen.

Das so erzeugte Gemisch aus mutanten und wt *Ptch* Amplifikaten wurden in den Vektor *pGEM-Teasy* kloniert (siehe Kapitel 2.15.3.6). Dann wurden 90 unabhängige Klone isoliert und die aufgereinigte Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.15.1.1.2) sequenziert (siehe Kapitel 2.15.4.5). Die verwendeten DNA-Oligonukleotide für die Sequenzierung sind unter 2.12.1.3 aufgeführt.

#### Tabelle 11: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für den Transkript-spezifischen PCR-Assay zur Analyse des Ursprungsallels des alternativen *Ptch* Exone 1b.

Spalte 1: Bezeichnung des amplifizierten Transkripts; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperatur bei der PCR; Spalte 3: Amplifizierte Fragmentgröße; Spalte 4: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 5: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3') Spalte 6: Literaturreferenz. Die fett gedruckten Nukleotide des Oligonukleotids *Ex5/6-R* entsprechen der komplementären Sequenz zum *Ptch* Exon 6. Ebenso ist bei dem Oligonukleotid *Ex5/8-R* die komplementäre Sequenz zu *Ptch* Exon 8 markiert. Die normal gedruckten Nukleotide von *Ex5/6-R* und *Ex5/8-R* entsprechen komplementären Basen des *Ptch* Exon 5 (siehe Abbildung 10).

1	2	3	4	5	6
wt <i>Ptch</i> Exon1b	58°C	631 bp	<i>mPtch1b-nest</i>	GACCGGGACTATCTGCAC	(Uhmann A et al., 2005)
<i>Ptch</i> <sup>Δ67</sup> Exon1b			<i>Ex5/6-R</i>	<b>CGTAAAGGAGGCTTACCTAGGAG</b>	(diese Arbeit)
			<i>Ex5/8-R</i>	<b>GTTTGCAGGGCGTGAGCGAGGAG</b>	(diese Arbeit)

### 2.12.1.6 DNA-Oligonukleotide für den RACE-Assay

Für die Amplifikation von cDNA Enden (RACE, rapid amplification of cDNA ends) wurde mit dem Smart race cDNA amplification kit gearbeitet. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 12 aufgelistet. Das Experiment und die Verwendung der DNA-Oligonukleotide werden in Kapitel 3.1.3.2 beschrieben.

**Tabelle 12.** Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für den RACE-Assay. Spalte 1: Bezeichnung des amplifizierten Gens; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperaturen und Zyklenzahlen bei der RACE-PCR (oben) und der nachfolgenden nested RACE-PCR (unten); Spalte 3: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3'). Die Verwendung der Oligonukleotide ist in Kapitel 3.1.3.2 beschrieben.

1	2	3	4
<i>Ptch</i>	5 Zyklen mit 68°C und	<i>Exon2Race-R</i>	TCTGAAAACCTTCGCTCTCAGCCACAG
	5 Zyklen bei 66°C		
	20 Zyklen bei 68°C und	<i>Exon2Race-R</i>	TCTGAAAACCTTCGCTCTCAGCCACAG
	5 Zyklen bei 66°C		

### 2.12.1.7 DNA-Oligonukleotide für die quantitative *real time* PCR

DNA-Oligonukleotide für die quantitative *real time* PCR (siehe Kapitel 2.15.4.4.1) und die quantitative *real time* PCR mit SYBR green (QuantiTect SYBR green) (siehe Kapitel 2.15.4.4.1.6) sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13: Auflistung der für die quantitative *real time* PCR verwendeten DNA-Oligonukleotide.** Spalte 1: Bezeichnung der quantifizierten Gentranskripte; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperatur bei der *real time* PCR; Spalte 3: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids bzw. der Hybridisierungssonde; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3') und evt. Reporter-Quenchermarkierung; Spalte 5: Verwendete Endkonzantration der DNA-Oligonukleotide und der Sonden-DNA; Spalte 6: Literaturreferenz; Abkürzungen: 6-FAM, 6-Carboxyfluoreszein; MGB minor groove binder.

1	2	3	4	5	6
<i>wt Ptch</i>	60°C	<i>mPtchwtf</i>	TACCGTCAAGAATGCCACTGG	300 nM	(Uhmann A <i>et al.</i> , 2005) (diese Arbeit)
		<i>mPtchwtr</i>	GTGTTTCATACATTTGCTTGGGAGTC	300 nM	
		<i>mPtchw</i> Sonde	6-FAM-AAACTTGTCAGCGCTCA-MGB	200 nM	
<i>Gli1</i>	67°C	<i>mGli1-tq-f</i>	TACATGCTGGTGGTGCACATG	300 nM	(diese Arbeit)
		<i>mGli-tq-r</i>	ACCGAAGGTGCGTCTTGAGG	300 nM	

### 2.12.2 Synthetische RNA-Oligonukleotide

Synthetische RNA-Oligonukleotide (doppelsträngige siRNA, short interference RNA) wurden von der Firma Qiagen-Xeragon, Germantown, USA, bezogen und sind in Tabelle 14 aufgelistet. Die Auswahl der RNA-Sequenz erfolgte wie bei Elbashir *et al.* beschrieben (Elbashir SM *et al.*, 2002). Die Transfektion der siRNA in eukaryotische Zelllinien ist in Kapitel 2.17.1.1.2 beschrieben.

**Tabelle 14: Auflistung der verwendeten RNA-Oligonukleotide.** Spalte 1: Bezeichnung des Zieltranskriptes; Spalte 2: Bezeichnung der RNA-Oligonukleotide; Spalte 3: Art der Fluoreszenzmarkierung; Spalte 4: DNA-Zielsequenz (5'→3'); Spalte 5: RNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3'), die obere Sequenz stellt den kodierenden Strang, die untere Sequenz den kodogenen Strang dar; RNA wurde in Kleinbuchstaben und DNA in Großbuchstaben hervorgehoben.

1	2	3	4	5
<i>Ptch</i>	<i>mptch_Exon2 si</i>	3'-Rhodamin	GGCAGCTAATCTCGAGACC	(ggcagcuaaucucgagacc)d(TT)
				(ggucucgagauuagcugcc)d(TT)
<i>Ptch</i>	<i>mptch_Exon22 si</i>	3'-Rhodamin	AACCCTGTCTTTGCCCGGT	(aaccucugcuuugcccggg)d(TT)
				(accgggcaaagacaggguu)d(TT)
-	<i>Scramble si</i> (unspezifische siRNA)	5'-Fluorescein	TTCTCCGAACGTGTCACGT	(uucuccgaacgugucacgu)d(TT)
				(acgugacacguucggagaa)d(TT)

## 2.13 Enzyme

### 2.13.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Invitrogen GmbH, Karlsruhe, und New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, bezogen. Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet und unter Herstellerangaben gearbeitet.

### 2.13.2 DNA-Polymerasen

In Tabelle 15 sind die für PCR (siehe Kapitel 2.15.4) verwendeten DNA-Polymerasen aufgelistet.

**Tabelle 15: Auflistung der verwendeten DNA-Polymerasen.** Spalte 1: Bezeichnung der DNA-Polymerase und deren Ursprungsspezies; Spalte 2: Konzentration in Unit/ $\mu$ l; Spalte 3: optimale Amplifikationstemperatur; Spalte 4: Angabe der Fehlerfrequenz, wobei obere Zahlen die Frequenz einer fehlerhaften Basenpaarung und untere Zahlen die Frequenz einer Leserahmenverschiebung bezeichnen.; Spalte 5: Verwendung; Spalte 6: Hersteller. Die Amplifikationsgeschwindigkeit aller aufgezeigten DNA-Polymerasen beträgt 1 kb/min.

1	2	3	4	5	6
Taq-DNA-Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> )	5 U/ $\mu$ l	72°C	1x 10 <sup>-4</sup> 1x 10 <sup>-5</sup>	RT-PCR	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> )	5 U/ $\mu$ l	72°C	1x 10 <sup>-4</sup> 1x 10 <sup>-5</sup>	RT-PCR	Molzym GmbH & Co.KG, Bremen
SAWADY Mid Range PCR-System	5 U/ $\mu$ l	68°C	-	Klonierungen	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
T4-DNA-Polymerase (T4 N82-infizierte <i>E. coli</i> )	5 U/ $\mu$ l	37°C	-	Auffüllen von 5'-Enden; Hydrolyse von 3'-Enden	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 2.13.3 Weitere Enzyme

Die Proteinasen Collagenase H (Clostridiopeptidase A) und Proteinase K wurden von den Firmen Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, und Carl Roth GmbH, Karlsruhe, bezogen. Von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, wurde die RNase H (Ribonuclease H; 1 U/ $\mu$ l) bezogen. Des Weiteren wurde mit der T4-Ligase



und der reversen Transkriptase SuperScript II (200 U/μl) der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, gearbeitet.

## 2.14 Antikörper

### 2.14.1 Primäre Antikörper

Die für proteinchemische Methoden (siehe Kapitel 2.16.1.4, 2.16.5, 2.16.6) verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 16 aufgelistet. Die jeweiligen Verdünnungsmedien der Antikörper sind bei der Darstellung der jeweiligen Methode beschrieben.

**Tabelle 16: Auflistung der verwendeten primären Antikörper.** Spalte 1: Bezeichnung des primären Antikörpers; Spalte 2: Bezeichnung des Antigens und dessen Ursprungsspezies; Spalte 3: Ursprungsspezies des Antikörpers; Spalte 4: Verwendung des Antikörpers und eingesetzte Antikörperverdünnung; Spalte 5: Hersteller. Abkürzungen: IF, Immunfluoreszenz; WB, Western Blot; IHC, Immunhistochemie; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; PE, Phycoerythrin; Cy7, Cy5, Indodikarbocyanin-Derivate; RPE, R-Phycoerythrin.

1	2	3	4	5
anti-Cre-Rekombinase	Cre Rekombinase (P1 Bakteriophage)	Kaninchen; polyklonal	IF 1:1000	Covance Inc., HISS Diagnostics GmbH, Freiburg i. Br.
anti-β-Galaktosidase	β-Galaktosidase ( <i>E. coli</i> )	Kaninchen; polyklonal	IF 1:100	Molecular Probes; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
anti-Pax7	Pax7 (Huhn)	Maus; monoklonal	IF 1:200	Developmental Studies Hybridoma Bank; Iowa, USA
anti-Ptch C-20	Ptch (Mensch)	Ziege; polyklonal	IF 1:100 WB 1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
anti-Ptch G-19	Ptch (Maus)	Ziege; polyklonal	IF 1:100 WB 1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
anti-CD3	CD3 (Mensch)	Ratte; monoklonal	ICH 1:200	Serotec GmbH, Düsseldorf
anti-CD45R/B220	CD45R/B220 (Mensch)	Ratte; monoklonal	ICH 1:200	BD Biosciences Pharmingen, San Diego
anti-CD3 FITC	CD3 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD4 Biotin	CD4 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA

1	2	3	4	5
anti-CD8 $\alpha$ PE	CD8 $\alpha$ (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD8 $\alpha$ PE-Cy7	CD8 $\alpha$ (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD21 FITC	CD21 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD24 PE	CD24 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD25 FITC	CD25 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD43 Biotin	CD43 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD44 PE-Cy5	CD44 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD45R/B220 PE- Cy7	CD45R/B220 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-IgD FITC	IgD (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-TCR $\beta$ FITC	TCR $\beta$ (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-IgM RPE	IgM (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD117 (c-kit) Biotin	CD117 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-CD127 (IL-7R $\alpha$ ) PE	CD127 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
anti-Sca-1 FITC	Sca-1 (Maus)	Ratte; monoklonal	FACS 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA

## 2.14.2 Sekundäre Antikörper und Fluorochrom-gekoppelte Streptavidin Reagenzien

Die für proteinchemische Methoden (siehe Kapitel 2.16.1.4, 2.16.5, 2.16.6) verwendeten sekundären Antikörper sind in Tabelle 17 aufgelistet. Die in Tabelle 18 aufgelisteten Fluorochrom-gekoppelten Streptavidin Reagenzien wurden für die durchflusszytometrische Detektion von biotinylierten primären Antikörpern (siehe Kapitel 2.14.1) verwendet. Da an ein Biotin-Molekül vier Streptavidin-Moleküle binden, wird durch die Verwendung dieses Systems eine 4-fache Verstärkung des primären Antikörpersignals hervorgerufen.

**Tabelle 17: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.** Spalte 1: Bezeichnung des sekundären Antikörpers; Spalte 2: Antigen; Spalte 3: Ursprungsspezies des Antikörpers; Spalte 4: Verwendung des Antikörpers und eingesetzte Antikörperverdünnung; Spalte 5: Hersteller; Abkürzungen: IF, Immunfluoreszenz; WB, Western Blot; IHC, Immunhistochemie; Ig, Immunglobulin; HRP, horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase); FITC, Fluoresceinisothiocyanat; Cy3, Indokarbocyanin-Derivat; APAAP, alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase.

1	2	3	4	5
anti-Maus IgG (H+L) HRP-konjugiert	Maus IgG (H+L)	Kaninchen	WB 1:10.000	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire
anti-Kaninchen IgG (H+L) HRP-konjugiert	Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	WB 1:10.000	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire
anti-Ziege IgG (H+L) HRP-konjugiert	Ziege IgG (H+L)	Esel	WB 1:10.000	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire
anti-Ziege IgG (H+L) FITC-konjugiert	Ziege IgG (H+L)	Esel	IF 1:200	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire
anti-Kaninchen IgG Cy3-konjugiert	Kaninchen IgG	Ziege	IF 1:400	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire
anti-Maus IgG FITC-konjugiert	Maus IgG	Ziege	IF 1:200	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
anti-Ratte IgG	Ratte IgG	Kaninchen	IHC 1:50	Dako GmbH, Hamburg
APAAP anti Ratte	Ratte; monoklonal	Ratte	IHC 1:50	Dako GmbH, Hamburg

**Tabelle 18: Auflistung der verwendeten Fluorochrom-gekoppelten Streptavidin Reagenzien.**  
Spalte 1: Bezeichnung des Reagenz; Spalte 2: Eingesetzte Reagenzverdünnung; Spalte 3: Hersteller.  
Abkürzungen: PE, Phycoerythrin; Cy7, Indotricarbocyanin-Derivat. FITC, Fluoresceinisothiocyanat.

1	2	3
Streptavidin PE	1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Streptavidin PE Cy7	1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
Streptavidin FITC	1:50	Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, England

## 2.15 Molekularbiologische Methoden

### 2.15.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 2.15.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

##### 2.15.1.1.1 Plasmidpräparation geringer DNA-Mengen

Zur schnellen Isolierung von geringen Mengen Plasmid-DNA wurde eine 4 ml-Übernachtskultur transformierter Bakterien (siehe Kapitel 2.15.3.8; *E.coli* in LB-Medium mit Selektivantibiotikum) bei 5000 x g für 2 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer (siehe Kapitel 2.8) aufgenommen und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer (siehe Kapitel 2.8) lysiert. Zelluläre Proteine und genomische DNA wurden mit 200 µl Neutralisierungspuffer (siehe Kapitel 2.8) gefällt und abzentrifugiert (16000 x g; 10 min). Der klare Überstand wurde in 0,7 Vol 100 % Isopropanol überführt und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (16000 x g; 20 min) pelletiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20-50 µl Ampuwa aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde, wie unter 2.15.2 beschrieben, mit einem Photometer bestimmt. Anschließend wurden je Präparation 100 bis 200 ng DNA mit Hilfe einer oder mehrerer Restriktionshydrolysen (siehe Kapitel 2.15.3.1) analysiert.

##### 2.15.1.1.2 Plasmidpräparation geringer hochreiner DNA-Mengen

Für die DNA-Sequenzanalyse (siehe Kapitel 2.15.4.3) wurde hochreine Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep miniprep Kits isoliert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Messung der DNA-Konzentration sowie die Analyse der Präparationen erfolgten wie unter 2.15.1.1.1 beschrieben.

### **2.15.1.1.3 Plasmidpräparation großer DNA-Mengen**

Große Mengen Plasmid-DNA wurden mit dem QIAGEN plasmid purification Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Messung der DNA-Konzentration sowie die Analyse der Präparationen erfolgten wie unter 2.15.1.1.1 beschrieben. Je Präparation wurden 100 bis 200 ng aufgereinigter Plasmid-DNA durch mehrere Restriktionshydrolysen analysiert.

### **2.15.1.2 Ethanolfällung von DNA aus wässrigen Lösungen**

Die DNA-Fällung wurde zur Entfernung von Salzen und Schwebstoffen sowie zur Einengung des Lösungsvolumens eingesetzt. Der DNA-Probe wurden 3 Vol 96 % Ethanol und 1/10 Vol 3 M Natriumacetat-Essigsäure (pH 5,2) (siehe Kapitel 2.8) zugegeben. Die Präzipitation erfolgte 10 min bis über Nacht bei -20 bis -80°C. Durch Zentrifugation wurde die DNA pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem entsprechendem Volumen Ampuwa aufgenommen.

### **2.15.1.3 Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Durch die Phenol/Chloroform-Aufreinigung wurden die hydrophilen Nukleinsäuren von den hydrophoben Protein und Membranbestandteile getrennt und gereinigt. Die zu reinigenden Proben wurden mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und kräftig geschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 16000 x g getrennt und die obere wässrige Phase einer Ethanolfällung (siehe Kapitel 2.15.1.2) unterzogen.

### **2.15.1.4 Isolierung von genomischer DNA**

#### **2.15.1.4.1 Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischer Zellkultur**

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Zellkultur wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 1x PBS (siehe Kapitel 2.8) gewaschen. Pro Loch einer 6-Loch-Platte wurden 1000 µl Lysepuffer (siehe Kapitel 2.8) zugegeben, die abgelösten Zellen in 2,0 ml Gefäße überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dem Ansatz wurde 1 ml 100 % Isopropanol zugefügt und die DNA durch Zentrifugation bei 16000 x g für 10 min präzipitiert. Nach dem Waschen des DNA-Pellets in 70 %

Ethanol, wurde das Pellet getrocknet und in 80 bis 100 µl Ampuwa aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde, wie unter 2.15.2 beschrieben, mit einem Photometer bestimmt. Anschließend wurden 50 bis 100 ng DNA als Matrizen-DNA für PCR zur Genotypisierung (siehe Kapitel 2.15.4.1) und weiteren PCR Analysen verwendet.

#### **2.15.1.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe (Schwanzbiopsie, Dottersack u. ä.)**

Die auf Trockeneis gelagerten oder frischen Gewebeproben wurden in 500 µl 1x STE-Puffer (siehe Kapitel 2.8) aufgenommen, 25-50 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugefügt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Die genomische DNA wurde durch Ethanolfällung präzipitiert (siehe Kapitel 2.15.1.2). Für die Isolierung hochreiner genomischer DNA wurden die Proteinase-behandelten Proben einer Phenol/Chloroform-Aufreinigung (siehe Kapitel 2.15.1.3) unterzogen. Die wässrige Phase wurde in gleichem Volumen Isoamylalkohol/Chloroform (1:25) aufgenommen, kräftig geschüttelt und die Phasen für 10 min bei 16000 x g getrennt. Die genomische DNA der oberen Phase wurde einer Ethanolfällung unterzogen (siehe Kapitel 2.15.1.2). Die genomische DNA einiger Proben wurden mit dem DNAeasy Kit isoliert. Die DNA-Konzentration wurde, wie unter 2.15.2 beschrieben, mit einem Photometer bestimmt. Anschließend wurden 50 bis 100 ng DNA als Matrizen-DNA für PCRs zur Genotypisierung (siehe Kapitel 2.15.4.1; 2.19.1.2) bzw. 10 bis 20 µg DNA für Southern Blot Analysen (siehe Kapitel 2.15.6) verwendet.

#### **2.15.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA**

Isolierte RNA wurde für die Analyse von Transkripten mittels cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.15.4.2) und anschließender PCR an cDNA (siehe Kapitel 2.15.4.1) verwendet.

##### **2.15.1.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischer Zellkultur**

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde das alte Medium verworfen und die Zellen mit 1x PBS (siehe Kapitel 2.8) gewaschen. Durch die Zugabe von 1 ml TRIZOL Reagent wurden die Zellen lysiert. Die Lysate wurden in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt, auf Eis gelagert und 10 sek homogenisiert

(Vortexer). Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben, der Ansatz für 15 sek kräftig gemischt (Vortexer) und nochmals für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte bei 4000 x g für 40 min bei 4°C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1 ml 100 % Isopropanol gemischt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch eine Inkubation des Ansatzes bei -20°C für 10 min bis über Nacht und einem Zentrifugationsschritt (16000 x g für 35 min). Das RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 bis 100 µl RNase-freiem destillierten Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde, wie unter 2.15.2 beschrieben, bestimmt und um eine Degradierung der RNA auszuschließen, wurden 500 ng bis 2 µg Gesamt-RNA durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.15.5) überprüft.

#### **2.15.1.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Geweben**

Die auf Trockeneis gelagerten oder frischen Gewebe (siehe Kapitel 2.19.2; 2.19.4.2) wurden mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und in ein steriles 13 ml Röhrchen mit 2 ml TRIZOL Reagent überführt. Das Gewebe wurde für 30 bis 60 sek auf Eis homogenisiert (Homogenisator). Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 400 µl Chloroform zugegeben und der Ansatz wie unter 2.15.1.5.1 beschrieben, weiterbehandelt.

#### **2.15.1.5.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Knochenmark**

Knochenmark wurde wie unter 2.16.6.1 beschrieben isoliert und eine Ein-Zell-Suspension hergestellt. Das in 1x PBS gewaschene Zellpellet wurde in 200 µl TRIZOL Reagent aufgenommen und 10 sek homogenisiert (Vortexer). Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 40 µl Chloroform zugegeben und wie unter 2.15.1.5.1 beschrieben weiterbehandelt.

#### **2.15.1.6 Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA**

Die Isolierung von poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem Oligotex Kit. Dabei wurden 250 µg Gesamt-RNA eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

## 2.15.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der Absorptionsmaxima bei 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometer und Formel 1 bestimmt. Gleichzeitig wurde die Reinheit der Nukleinsäuren aufgrund der Messung der Absorptionsmaxima von Proteinen (Absorptionsmaximum bei 280 nm) bzw. Salzen (Absorptionsmaximum bei 230 nm) ermittelt. Bei den in Formel 2 angegebenen Verhältnissen der Absorptionsmaxima bezeichnet man die Nukleinsäurelösungen als rein.

$$c = OD_{260} \cdot f \cdot C$$

**Formel 1: Formel zur Berechnung von Nukleinsäure-Konzentrationen.** Abkürzungen:  $c$  gemessene Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ;  $f$ , Verdünnungsfaktor;  $C$ , nukleinsäurespezifischer Koeffizient (0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  für DNA; 0,04  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  für RNA).

$$\text{DNA} : OD_{230} / OD_{260} / OD_{280} = 1,0 : 1,8 : 1,0$$

$$\text{RNA} : OD_{230} / OD_{260} / OD_{280} = 1,0 : 2,0 : 1,0$$

**Formel 2: Verhältnisse der Absorptionsmaxima zur Bestimmung des Reinheitsgrades von DNA und RNA.** Abkürzungen:  $OD_{230}$ , optische Dichte bei 230 nm;  $OD_{260}$ , optische Dichte bei 260 nm;  $OD_{280}$ , optische Dichte bei 280 nm.

## 2.15.3 Klonierungstechniken

### 2.15.3.1 Restriktionshydrolyse

Restriktionshydrolysen von DNA wurden in Volumina von mindestens 10  $\mu\text{l}$  bei einer für das Enzym optimalen Temperatur für 1 bis 2 h oder über Nacht inkubiert. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 2 bis 3 U (Unit) der jeweiligen Restriktionsendonuklease (siehe Kapitel 2.13.1) eingesetzt. Die simultane Hydrolyse einer DNA-Probe mit zwei unterschiedlichen Enzymen erfolgte in einem für beide Enzyme optimalen Puffer. War dies nicht möglich, so wurde die DNA-Probe sequenziell hydrolysiert. Dazu wurde die DNA-Probe zunächst mit Enzym 1 im optimalen Puffer hydrolysiert und anschließend einer Ethanol-fällung (siehe Kapitel 2.15.1.2) unterzogen. Darauf hin wurde die Hydrolyse mit Enzym 2 im entsprechenden Puffer durchgeführt. Restriktionshydrolytische Reaktionen wurden durch Zugabe von je 5  $\mu\text{l}$  Ladepuffer (siehe Kapitel 2.8) abgestoppt.



### **2.15.3.2 Partielle Restriktionshydrolyse**

Partielle Restriktionshydrolysen wurden wie unter 2.15.3.1 durchgeführt. Dabei wurde jedoch mit verdünnten Restriktionsendonukleasen (1 U/ $\mu$ l) und Inkubationszeiten von 5 bis 30 min gearbeitet. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von je 5  $\mu$ l Ladepuffer (siehe Kapitel 2.8) abgestoppt.

### **2.15.3.3 Behandlung von DNA mit T4-DNA-Polymerase**

Zum Auffüllen der 5'-Enden sowie zum Hydrolysieren der 3'-Enden von DNA-Fragmenten nach erfolgter Restriktionshydrolyse (siehe Kapitel 2.15.3.1) wurde mit der T4-DNA-Polymerase gearbeitet. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

### **2.15.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Kit QIAquick gel extraction bzw. QIAEX II gel extraction. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel geschnitten und die DNA nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### **2.15.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Herstellung transgener Mauslinien**

Für die Injektion von DNA-Fragmenten in Maus-Oozyten (siehe Kapitel 2.19.1.3) wurde hochreine DNA isoliert. Dazu wurden 100  $\mu$ g DNA des *pPax7Cre<sup>TM</sup>* Plasmids (siehe Kapitel 2.11.3, 2.15.7.2.2) mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (siehe Kapitel 2.15.3.1) und das entsprechende DNA-Fragment mit dem Kit QIAEX II aus einem Ethidiumbromid-freien Agarosegel (siehe Kapitel 2.15.5.1) extrahiert. Die DNA wurde mit einer Ethanol-fällung (siehe Kapitel 2.15.1.2) präzipitiert und in mindestens 400  $\mu$ l TE-Puffer (siehe Kapitel 2.8) aufgenommen. Um Schwebstoffe zu entfernen wurde die DNA-Lösung zweimal zentrifugiert (15 min, 16000 x g). Nach jedem Zentrifugationsschritt wurden jeweils nur 80 % des Überstandes in ein neues Gefäß überführt. Der Rückstand von 20 % wurde verworfen. Die DNA-Konzentration wurde vermessen, auf eine Konzentration von

30 µg/ml eingestellt und durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.15.5) auf Reinheit und Konzentration hin überprüft. Das linearisierte Expressionskonstrukt wurde am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, in Maus Oozyten injiziert.

### **2.15.3.6 Klonierung von PCR-Produkten**

Amplifizierte DNA-Fragmente aus PCR Reaktionen (siehe Kapitel 2.15.4.1) wurden mit Hilfe des pGEM-Teasy TA-cloning Kits bzw. dem Eukaryotic TA expression kit (pCR3.1 unidirectional) direkt kloniert. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet.

### **2.15.3.7 Ligation**

Die Ligation von Restriktionsendonuklease-behandelter Plasmid-DNA mit entsprechend hydrolysierten DNA-Fragmenten (siehe Kapitel 2.15.3.1) erfolgte mit der *T4*-Ligase. Es wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die Inkubationen von Ligationsansätzen variierten zwischen 1 h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C.

### **2.15.3.8 Transformation von Bakterienzellen**

50 µl kompetente Zellen (*E. coli* DH10α, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden auf Eis aufgetaut und nach der Zugabe von 100 ng reiner Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.15.1.1.3) bzw. 5 bis 10 µl eines Ligationsansatzes (siehe Kapitel 2.15.3.7) für 20 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock des Ansatzes bei 42°C für 45 sek erfolgte die Transformation der DNA in die Zellen. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gelagert und anschließend mit 500 µl S.O.C.-Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C unter leichtem Schwenken wurde 10 bis 250 µl transformierte Zellen auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotika (siehe Kapitel 2.9.2) ausplattiert und die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

## 2.15.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.15.4.1 Polymerase-Kettenreaktion an Plasmid-DNA, cDNA und genomischer DNA

Die Amplifikation von DNA (siehe Plasmid-DNA, 2.15.1.1; cDNA, 2.15.1.5, 2.15.4.2; genomische DNA, 2.15.1.4) wurde in Reaktionsvolumina von 10 µl, 20 µl, 30 µl oder 50 µl pro Ansatz mit folgenden Reagenzien und Endkonzentrationen durchgeführt:

10-100 ng	Matrizen-DNA
0,43 µM	sequenzspezifisches Vorwärts-DNA-Oligonukleotid
0,43 µM	sequenzspezifisches Rückwärts-DNA-Oligonukleotid
0,2 mM	dNTP-Mix (siehe Kapitel 2.8)
1 % (v/v)	N.N.-Dimethylsulfoxid (DMSO)
0,01 % (v/v)	Cresol (siehe Kapitel 2.8)
1x	Polymerase-Puffer
0,1 U	Polymerase (siehe Kapitel 2.13.2)

Die PCR-Bedingungen wurden den verwendeten Matrizen-DNA, DNA-Oligonukleotiden (siehe Kapitel 2.12.1) und DNA-Polymerasen (siehe Kapitel 2.13.2) angepasst. Der erste Denaturierungsschritt bei 95°C wurde für 5 bis 10 min durchgeführt, darauf folgten 25 bis 35 Zyklen von je einem Denaturierungsschritt (95°C für 30 bis 60 sek), je einem DNA-Oligonukleotid-Anlagerungsschritt bei 50 bis 68°C (30 sek bis 2 min) und je einem Elongationsschritt bei 68 oder 72°C (1 bis 10 min). Am Ende des Programms wurde ein Elongationsschritt von 10 bis 30 min Länge (68 oder 72°C) zugefügt.

Je nach Weiterverwendung der PCR-Amplifikate wurde entweder der gesamte Ansatz oder nur ein Aliquot mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.15.5) untersucht.

### 2.15.4.2 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA in cDNA erfolgte mit der reversen Transkriptase SuperScript II und oligo(dT)-Nukleotiden, welche komplementär an den poly(A)<sup>+</sup>-Sequenzen der mRNA binden.

Die reverse Transkription wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Nach der Zugabe von 1 bis 2 µg Gesamt-RNA und 250 ng oligo(dT)-Nukleotiden wurde der Ansatz für 10 min bei 70°C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 100 mM DTT (Dithiothreitol; Endkonzentration 10 mM; Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 10 µM dNTP-Mix (Endkonzentration 0,5 mM; siehe Kapitel 2.8) und 5x first strand buffer (Endkonzentration 1x; Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Der Ansatz wurde für 10 min bei 25°C gelagert, für 2 min bei 42°C angewärmt und 1 µl SuperScript II (200 U/µl) unter vorsichtigem Mischen hinzugefügt. Die reverse Transkription wurde bei 42°C für 1 h durchgeführt und danach durch eine Inkubation bei 70°C für 10 min abgestoppt. Die cDNA-Proben wurden durch die Zugabe von 1 µl RNase H (1 U/µl) und einer Inkubation bei 37°C (20 min) von der Matrizen-RNA befreit. Dieser letzte Schritt ist nur für cDNA-Proben angewandt worden, welche anschließend mit der quantitativen *real time* PCR (siehe Kapitel 2.15.4.4) vermessen wurden. Die Kalkulation der cDNA-Konzentration erfolgte durch die Annahme, dass die Effizienz der cDNA-Synthese bei etwa 50 % liegt. Bei der reversen Transkription von 2 µg RNA würde somit 1 µg cDNA synthetisiert (bei einem Reaktionsvolumen von 20 µl bedeutet das eine Endkonzentration von 50 ng/µl).

#### **2.15.4.3 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)**

Zur Bestimmung der 3'-Enden von *Ptch* Transkripten wurde das RACE-Kit Smart race cDNA amplification kit verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide sind unter 2.12.1.6 aufgelistet.

#### **2.15.4.4 Quantitative *real time* PCR**

##### **2.15.4.4.1 Aufbau und Auswertung der quantitativen *real time* PCR**

###### **2.15.4.4.1.1 Relative Quantifizierung**

Der Vergleich verschiedener Expressionsniveaus eines Genes in unterschiedlichem Probenmaterial erfolgte durch eine relative Quantifizierung. Um das Expressionsniveau in den Proben miteinander vergleichen zu können, wurde eine Standardkurve mit Plasmid-DNA als Matrize (siehe Kapitel 2.11.5) erstellt. Zur

Normalisierung der Expression des Zielgens wurde die Expression eines endogenen Kontrollgens vermessen (siehe Kapitel 2.15.4.4.1.4).

#### **2.15.4.4.1.2 Plasmidstandards**

Die zur Erstellung von Standardkurven verwendeten Plasmide sind unter 2.11.5 aufgeführt. Sie beinhalten die jeweils zu amplifizierende cDNA- oder Amplikon-Sequenz des Zielgens. Die vorhergehende Kalkulierung der eingesetzten Molekülzahl ist unter 2.15.4.4.1.3 aufgeführt. Es wurden 6 serielle fünffach Verdünnungen (S1-S6) der Plasmid-DNA zur Erstellung einer Standardkurve hergestellt und amplifiziert. In Tabelle 6 ist für jedes verwendete Plasmid die erste Verdünnung S1 angegeben. Durch die Auftragung des Logarithmus der eingesetzten Molekülzahl gegen die Zyklusnummer (Ct-Wert; cycle treshold; Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert) wurde die jeweilige Standardkurve erstellt.

#### **2.15.4.4.1.3 Kalkulation von Plasmid-Molekülzahlen**

Zur Kalkulierung der eingesetzten Plasmid-Molekülzahlen wurden die Molekulargewichte der Plasmid-DNAs bestimmt. Dazu wurde pro Nukleotid das gemittelte Molekulargewicht der vier Nukleotide verwendet (326,95 g/mol) und das Gewicht je Plasmid-Molekül errechnet ( $1 \text{ Mol} = 6,023 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle}$ ).

#### **2.15.4.4.1.4 Endogene Kontrolle**

Als endogene Kontrolle wurde das Expressionsniveau des *18s* rRNA Gens jeder untersuchten cDNA-Probe bestimmt. Dazu wurden das Kit TaqMan ribosomal RNA control reagent, VIC probe nach Herstellerangaben verwendet.

#### **2.15.4.4.1.5 Durchführung und Aufbau der quantitativen *real time* PCR mit fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Sonden**

Die Amplifikation einzelner Zielsequenzen wurde in unabhängigen PCR-Reaktionen durchgeführt. Das Expressionsniveau des Zielgens wurde für jede cDNA-Probe in 2 bis 3 Replikaten je Lauf bestimmt. Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren geringer Volumina zu vermeiden, wurden die Plasmidstandards und die cDNA-Proben verdünnt, so dass immer ein Volumen von 10 µl je Ansatz pipettiert werden konnte. Die Kalkulation der eingesetzten cDNA-Mengen ist unter 2.15.4.2 beschrieben. Verwendete DNA-Oligonukleotide und fluoreszenzmarkierte, sequenzspezifische Sonden sind unter 2.12.1.7 aufgeführt. Die verwendeten PCR-96-Loch-Platten (TaqMan-Platten) und die TaqMan Abdeckfolien wurden von der Firma Applied Biosystems, Darmstadt, bezogen. Die Amplifikation wurde mit dem Kit qPCR core kit in einem Reaktionsvolumen von 30 µl pro Ansatz durchgeführt. Für die Amplifikation des Zielgens wurde 50 ng der Matrizen-cDNA, für die Amplifikation der 18S rRNA wurde 16 pg der Matrizen-cDNA eingesetzt. Die eingesetzte Molekülzahl der Plasmidstandard-DNA ist Tabelle 6 zu entnehmen. Zu jedem PCR-Ansatz wurden 0,3 µMol sequenzspezifische Vorwärts- bzw. Rückwärts-DNA-Oligonukleotide, 200 nMol fluoreszenzmarkierte, sequenzspezifische Sonde, 0,2 mMol dNTP-Mix, 4,0 mMol MgCl<sub>2</sub>, 1x Polymerase-Puffer (ROX passive reference; Eurogentec Deutschland GmbH, Köln) und 0,75 U Hot gold star DNA-Polymerase (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln) zugegeben. Die DNA-Polymerase wurde für 10 min bei 95°C aktiviert, gefolgt von 40 Zyklen mit je einem 15 sek langen Denaturierungsschritt bei 95°C und je einem 60 sek langen Anlagerungs-/Elongationsschritt bei 60°C. Die Amplifikation und Messung erfolgte mit Hilfe des ABI Prism 7900H Sequence detection system.

#### **2.15.4.4.1.6 Durchführung und Aufbau der quantitativen *real time* PCR mit SYBR green**

Die Bestimmung der Expression des *Gli1* Gens in unterschiedlichem Probenmaterial erfolgte durch die relative Quantifizierung unter Verwendung von sequenzspezifischen DNA-Oligonukleotiden (siehe Kapitel 2.12.1.7) und dem Kit QuantiTect SYBR green PCR. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet: Die DNA-Polymerase wurde zunächst für 15 min bei 95°C aktiviert, dann folgten 40 Zyklen bestehend aus je einem 15 sek langen Denaturierungsschritt bei 95°C, einem 30 sek langen Anlagerungsschritt bei 58°C und einem 30 sek langen Elongationsschritt bei 72°C. Durchführung, Messung und Auswertung erfolgten wie unter 2.15.4.4.1.5 beschrieben.

#### **2.15.4.4.1.7 Auswertung (Standardkurvenmethode)**

Die Auswertung der quantitativen *real time* PCR erfolgte mittels der Software SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt) und Microsoft EXEL (Microsoft Co., Redmond, USA). Die statistische Auswertung (siehe Kapitel 2.1) von 3 bis 6 Versuchsreihen wurde mit Hilfe der Software Statistica (StatSoft GmbH, Hamburg) durchgeführt. Die statistischen Graphiken wurden in Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Signifikanz von Unterschieden und Gleichheit der einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe eines t-Tests für unabhängige Gruppen (Mann-Whitney-U-Test) getestet. P Werte von  $P < 0,05$  wurden als signifikant, und P Werte  $P > 0,05$  wurden als nicht-signifikant gewertet (siehe Kapitel 2.1).

#### **2.15.4.5 DNA Sequenzanalyse**

Die zu sequenzierenden DNA-Proben wurden mit dem BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit nach Herstellerangaben amplifiziert und mit Sephadex G50 in einer MAHV N45-Platte aufgereinigt. Die Sequenzanalysen wurden mit dem ABI 3100 genetic analyser und der dafür vorgesehenen Software (ABI 3100 genetic analyser data collection 1.0, Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Sequencher (Applied Biosystems, Darmstadt).

#### **2.15.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten und die Überprüfung der 28S rRNA (5.1kb) und 18S rRNA (1,9 kb) von RNA-Proben erfolgten mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Den Nukleinsäure-Proben wurde vor dem Beladen des Gels 0,2 Vol Ladepuffer (siehe Kapitel 2.8) zugefügt. Je nach Größe der Nukleinsäuresequenzen wurde mit Gelen von 0,7 bis 2,5 % (w/v) Agaroseanteil in 1x TBE (siehe Kapitel 2.8) gearbeitet. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde

dem noch flüssigen Gel unter Schwenken Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in einer mit 1x TBE (siehe Kapitel 2.8) gefüllten Gelelektrophoresekammer bei einer konstanten Spannung von 30 bis 120 V. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des UV-Transilluminators der Firma Intas, Göttingen.

Die Größen der Nukleinsäure-Fragmente bei der Gelelektrophorese wurden durch paralleles Mitführen der DNA-Längenstandards 1 kb DNA Ladder und 100 bp DNA Ladder ermittelt. DNA-Konzentrationen wurden durch vergleichendes Abschätzen mit dem Standard 100 bp DNA Ladder überprüft.

#### **2.15.5.1 Ethidiumbromid-freie Agarosegelelektrophorese**

Zur Aufreinigung von hochreinen DNA-Fragmenten für die Herstellung transgener Mäuse (siehe Kapitel 2.15.3.5; 2.19.1.3) wurde mit Ethidiumbromid-freien Agarosegelen (1,5 % w/v) gearbeitet. Dabei wurde die restriktionshydrolysierte Plasmid-DNA (siehe Kapitel 2.15.3.1) in eine Geltasche geladen, welche sich fast über die gesamte Breite des Gels erstreckte. Eine äußere linke und äußere rechte Tasche wurde mit einem Längenstandard (siehe Kapitel 2.15.5) versehen. Die Auftrennung der Fragmente wurde bei einer konstanten Spannung von 90 V für 4 bis 5 h durchgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Abtrennen der linken und rechten Taschen und einem Stück der mittleren Gelbahn vom restlichen Gel und deren Färbung in einem Ethidiumbromid-Bad (1 h in 1x TBE mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid). Durch das Anlegen der Gelränder konnte die Laufhöhe des entsprechenden DNA-Fragments in dem Ethidiumbromid-freien Gelteil ermittelt werden. Das zu isolierende Fragment wurden aus dem Ethidiumbromid-freien Gelteil mit einem sterilen Skalpell entfernt und wie unter 2.15.3.5 beschrieben aufgereinigt.

#### **2.15.6 Southern Blot**

10 bis 15 µg der zu analysierenden DNA wurden mit einer entsprechenden Restriktionsendonuklease über Nacht bei 37°C inkubiert (siehe Kapitel 2.15.3.1). Den Ansätzen wurde 0,2 Vol Ladepuffer (siehe Kapitel 2.8) hinzugefügt und die DNA-Fragmente in einen 1 bis 1,5 % Agarosegel (siehe Kapitel 2.15.5) über Nacht bei 60 bis 80 V aufgetrennt. Danach wurden das Gel und ein fluoreszierendes Lineal mittels



UV-Licht dokumentiert. Dann wurde der Längenstandard (siehe Kapitel 2.15.5) aus dem Gel geschnitten. Das Gel wurde in eine Plastikwanne überführt und für 30 min in einer 0,25 N HCl-Lösung unter Schwenken (Wipp-Taumel-Tisch) inkubiert. Nach kurzem Schwenken des Gels in MilliQ Wasser wurde es für 30 min in Denaturierungspuffer (siehe Kapitel 2.8) unter Schwenken inkubiert und erneut in MilliQ Wasser gespült. Danach wurde das Gel in Transferpuffer (20x SSC; siehe Kapitel 2.8) überführt und für 15 min geschwenkt. Es wurde eine Nitrozellulosemembran (Hybond-XL) auf die genaue Gelgröße zugeschnitten, die Seiten (oben, unten, rechts, links) markiert und in 20x SSC äquilibriert. Die Membran wurde ohne Luftblasen auf das Gel gelegt und in ein Blotsystem (Whatman Inc., New Jersey, USA) nach Herstellerangaben eingebaut. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Membran von dem Gel gezogen, auf einem Filterpapier (siehe Kapitel 2.5) getrocknet und die DNA bei  $100 \text{ mJ/cm}^2$  kovalent auf der Membran gebunden (Crosslinker). Zusätzlich wurde die Membran bei  $80^\circ\text{C}$  für 2 h gebacken (Hybridisierungsofen). Zur Vorhybridisierung wurde die Membran in 2x SSC angefeuchtet, in eine Hybridisierungsröhre überführt und bei  $65^\circ\text{C}$  im Hybridisierungsofen für 2 h in 5 ml Rapid-hyb buffer mit  $200 \text{ }\mu\text{g/ml}$  denaturierter Lachsspermien-DNA (Sonicated salmon sperm DNA,  $10 \text{ mg/ml}$ ; Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande) vorhybridisiert.

Der Hybridisierungslokalus der verwendeten Sonde für die Detektion der wt *Ptch*, *Ptch*<sup>NX</sup> und *Ptch*<sup>delNX</sup> XhoI-hydrolysierten DNA-Fragmente ist in Abbildung 17 dargestellt. Die Sonde wurde durch Restriktionshydrolyse des Plasmids *pGEM-T KO#13*, welches 1200 bp der genomischen *Ptch* Sequenz enthält, isoliert. Dazu wurde es über Nacht mit *EcoRI* restriktionshydrolysiert, das 1200 bp lange DNA-Fragment durch zweifache Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (siehe Kapitel 2.15.3.4) und durch Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.15.5) quantifiziert. 25 bis 50 ng der Hybridisierungssonde wurde mit dem Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit durch den Einbau von alpha <sup>32</sup>P-dATP radioaktiv markiert. Dabei wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Danach wurde die radioaktiv-markierte Sonde durch Spindialyse aufgereinigt. Hierzu wurde mit den MicroSpin G-50 Säulchen nach Herstellerangaben gearbeitet. Die aufgereinigte Sonden-DNA wurde 5 min bei  $99^\circ\text{C}$  denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Nach dem Abgießen der Vorhybridisierungslösung aus der Hybridisierungsröhre

wurden abermals 5 ml des Rapid-hyb buffer mit 200 µg/ml denaturierter Lachsspermien-DNA zugegeben. Die radioaktiv-markierte, denaturierte Sonden-DNA wurde in die Hybridisierungslösung pipettiert und die Membran über Nacht bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung abgenommen und die Membran in der Hybridisierungsröhre mit einem niedrig-stringentem Waschpuffer (siehe Kapitel 2.8) zweimal für je 20 min gewaschen. Danach wurde die Membran in eine Plastikwanne überführt und die Strahlungsintensität der Membran mit dem Geiger-Zähler überprüft. Bei einer Strahlung über 5 Bq/cm<sup>2</sup> wurde die Membran mit hoch-stringentem Waschpuffer (siehe Kapitel 2.8) in der Plastikwanne bei 65°C für 20 min im Schüttelwasserbad gewaschen. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis die Strahlungsintensität der Membran einen Wert unter 5 Bq/cm<sup>2</sup> erreichte. Danach wurde die Membran in MilliQ Wasser geschwenkt, auf Filterpapier getrocknet, in Klarsichtfolie eingeschweißt und in eine Filmkassette überführt. Ein Autoradiographie-Film wurde bei -80°C für 2-3 Tage auf der Membran inkubiert. Nach der Entwicklung des Filmes wurde dieser mit Hilfe der Agarosegel-Fotos analysiert.

## **2.15.7 Klonierungen von eukaryotischen Expressionsplasmiden**

### **2.15.7.1 Klonierung von *Ptch* Expressionsplasmiden**

Zur Expression von mutanten und wt *Ptch* Proteinen der *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäuse in eukaryotischer Zellkultur wurde sowohl die wt *Ptch* als auch die mutante *Ptch* cDNA Sequenz, bei der die *Ptch* Exone 6 und 7 fehlen, unter die Kontrolle des *CMV* (Cytomegalie Virus) Promotor kloniert. Dabei wurde das Translationsstartcodon des alternativen Exone 1b übernommen und eine zusätzliche Kozak-Konsensussequenz (ccrccATGg; r-variable Base; der Transkriptionsstart ist in Großbuchstaben hervorgehoben) hinzugefügt.

#### **2.15.7.1.1 Klonierung von *pCR3.1 mPtch(K)wt***

Zur Amplifikation der wt *Ptch* cDNA wurde mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *F-H3-ATG/R-XbaI-Stop* (siehe Kapitel 2.12.1.2) gearbeitet. Dabei diente das Plasmid *pBSSK<sup>+</sup>mPtch(K)wt* (zur Verfügung gestellt von M. P. Scott, Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, USA) als DNA-Matrize. *pBSSK<sup>+</sup>mPtch(K)wt* umfasst die

murine wt *Ptch* cDNA Sequenz mit dem ersten alternativen Exon 1b. Das 4305 bp lange DNA-Fragment wurde in den Vektor *pCR3.1* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe; 2.15.3.6) ligiert und das Konstrukt *pCR3.1 mPtchwt* genannt. Da bei dieser Klonierung die Kozak-Konsensussequenz fehlte, wurde das das erste ATG enthaltene DNA-Fragment wieder ausgetauscht. Hierzu wurde aus dem Plasmid *pBSSK<sup>+</sup>mPtch(K)wt* durch eine *XbaI/BglII* Restriktionshydrolyse das die Kozak-Konsensussequenz und das erste ATG enthaltene DNA-Fragment isoliert. Das Fragment wurde gegen das *NheI/BglII* des Plasmids *pCR3.1 mPtchwt* ausgetauscht. Das entstandene Expressionsplasmid wurde *pCR3.1 mPtch(K)wt* genannt. Um Punktmutationen auszuschließen, wurde die gesamte inserierte *Ptch* cDNA-Sequenz sequenziert (siehe Kapitel 2.15.4.5). Die für die Sequenzierung verwendeten DNA-Oligonukleotide sind unter 2.12.1.3 aufgelistet.

#### 2.15.7.1.2 Klonierung von *pCR3.1 mPtch(K)d67*

Aus dem Plasmid *pCR3.1 mPtch(K)wt* wurde durch Restriktionshydrolyse mit *BglII* und partieller Restriktionshydrolyse (siehe Kapitel 2.15.3.2) mit *XhoI* die wt *Ptch* Sequenz gegen die mutante *Ptch<sup>d67</sup>* Sequenz ausgetauscht. Als Donor für die 1369 bp lange *Ptch<sup>d67</sup>* Sequenz diente das *XhoI/BglII* hydrolysierte Plasmid *pBSKS<sup>+</sup>mPtchd67*, welches die gesamte mutante *Ptch<sup>d67</sup>* Sequenz nicht aber die Kozak-Konsensussequenz enthält. Das klonierte Expressionsplasmid wurde *pCR3.1 mPtch(K)d67* genannt.

#### 2.15.7.2 Klonierung der *Pax7* Promotorplasmide

Zur gewebespezifischen Expression einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase wurde der 3217 bp lange proximale Teil des murinen *Pax7* Promotors mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *mPax7promF1/mPaxNcolcn* (siehe Kapitel 2.12.1.2) amplifiziert. Als Matrizen-DNA diente murine genomische wt DNA. Es wurde mit dem SAWADY Mid Range PCR-System gearbeitet. Distal wurde eine *SstI* Restriktionsschnittstelle durch das Vorwärts-DNA-Oligonukleotid und proximal eine *NcoI* Restriktionsschnittstelle durch das Rückwärts-DNA-Oligonukleotid eingeführt. Das Amplifikat wurde sowohl in den *pGEM-Teasy* Vektor als auch in den *pCR II* TA-cloning Vektor kloniert. Die Plasmide wurden *pGEM-Teasy Pax7prom* und *pCRII Pax7prom* genannt und wurden für weitere Subklonierungen verwendet.

### 2.15.7.2.1 Klonierung der *pGL3 Pax7prom* Reporterplasmide

Um die Expression des *Pax7* Promotors in eukaryotischen Zelllinien zu analysieren wurde das Gen der *Firefly Luziferase* unter die Kontrolle des Promotors kloniert.

Der 3,2 kb lange murine *Pax7* Promotor wurde über die Restriktionsschnittstellen *SstI/NcoI* aus *pGEM-Teasy Pax7prom* (siehe Kapitel 2.11.3) isoliert und in den *SstI/NcoI* geöffneten *pGL3-basic* kloniert. Dabei schließt der *Pax7* Promotor direkt an das erste ATG der *Firefly Luziferase* an. Das Plasmid wurde *pGL3 Pax7prom 3,2* genannt. Für die Klonierung des Plasmids *pGL3 Pax7prom 2,5* wurde der Promotor distal um 0,7 kb verkürzt. Dazu wurde das Plasmid *pGL3 Pax7prom 3,2* mit den Restriktionsenzymen *SstI/StuI* hydrolysiert und das 7300 bp lange Vektor-Fragment nach *T4-DNA-Polymerase* Behandlung (siehe Kapitel 2.15.3.3) religiert. *pGL3 Pax7prom 1,5* enthält ein distal um 1,7 kb verkürztes Promotor-Fragment. Für diese Klonierung wurde das Plasmid *pGL3 Pax7prom 3,2* mit *KpnI* hydrolysiert, das 6300 bp lange Vektor-Fragment isoliert und religiert (Abbildung 49).

### 2.15.7.2.2 Klonierung des *pPax7Cre<sup>TM</sup>* Plasmids

Das *pPax7Cre<sup>TM</sup>* Plasmid (siehe Abbildung 49) enthält 3217 bp der 5'-Sequenz des *Pax7* Promotors und daran anschließend ein chimeres Intron sowie das synthetische Gen der durch Tamoxifen induzierbaren *MerCreMer* Rekombinase (Verrou C *et al.*, 1999). Dabei entspricht die Position des endogene *Pax7* Translationsstartcodon der des *MerCreMer* Rekombinase Gens. Aus dem Expressionsplasmid *pAN MerCreMer* (zur Verfügung gestellt von M. Reth, Max-Planck-Institut für Immunobiologie, Freiburg) stammt auch die *Siamian Virus*-Polyadenylierungssequenz (*SV 40 Poly A* Sequenz).

Der 3'-Bereich des *MerCreMer* Rekombinase Gens wurde aus dem Expressionsplasmid *pAN MerCreMer* durch Restriktionshydrolyse mit *Sall/HindIII* (2047 bp) isoliert und in den *Sall/HindIII* geöffneten *pUC19* Vektor inseriert (*pUC MerCreMer 3'*; 4747 bp).

Die Amplifikation der 5'-Sequenz des *MerCreMer* Rekombinase Gens (971 bp) erfolgte mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *MCMfrag1BamHI-F/MCMfrag1Sall-R* (siehe Kapitel 2.12.1.2). Als Matrizen-DNA diente das Expressionsplasmid *pAN MerCreMer*. Das Amplifikat wurde in den Vektor *pGEM-Teasy* inseriert und über

Sequenzanalyse (siehe Kapitel 2.12.1.3) verifiziert. Das inserierte Fragment wurde über die bei der PCR eingeführten Schnittstellen (*Bam*HI/*Sa*II) isoliert und in den *Bam*HI/*Sa*II geöffneten *pUC19* Vektor ligiert (*pUC MerCreMer 5'*; 3671 bp).

Die 5'-Sequenz (352 bp) des *Pax7* Promotors wurde über die Schnittstellen *Sst*I/*Bam*HI aus dem Vektor *pCRII Pax7prom* (siehe Kapitel 2.11.3) isoliert und in den *Sst*I/*Bam*HI geöffneten Vektor *pUC MerCreMer 5'* inseriert (*pUC Pax7prom 3' MerCreMer 5'*; 4023 bp). Die 3'-Sequenz des *Pax7* Promotors (2865 bp) wurde mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *Paxfrag2BamHI-F/Paxfrag2SnaBI-R* (siehe Kapitel 2.12.1.2) und der Matrizen-DNA *pCRII Pax7prom* (siehe Kapitel 2.11.3) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Vektor *pGEM-Teasy* kloniert und sequenziert (*pGEM-Teasy Pax7prom 3'*; 5865 bp). Diese 3'-Sequenz des *Pax7* Promotors wurde mit einem chimere Intron kombiniert. Die Isolierung des chimere Introns (140 bp) erfolgte durch Amplifikation mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *IntronSnaBI-F/IntronBamHI-R* (siehe Kapitel 2.12.1.2). Als Matrizen-DNA diente das Plasmid *pCI-neo* (Promega GmbH; Mannheim). Das Amplifikat wurde in den Vektor *pGEM-Teasy* kloniert (*pGEM-Teasy CI*; 3140 bp) und durch Sequenzierung verifiziert. Das chimere Intron wurde durch Restriktionshydrolyse mit *Sna*BI/*Nco*I isoliert und in den *Sna*BI/*Nco*I geöffneten Vektor *pGEM-Teasy Pax7prom 3' CI* integriert (*pGEM-Teasy Pax7prom 3' CI*; 6005 bp).

Die Sequenz *Pax7prom 3' CI* (3005 bp) wurde aus dem Vektor *pGEM-Teasy Pax7prom 3' CI* durch Restriktionshydrolyse mit *Bam*HI isoliert und in den *Bam*HI geöffneten Vektor *pUC Pax7prom 3' MerCreMer 5'* integriert. Die korrekte Orientierung des klonierten Fragments wurde durch analytische Restriktionshydrolyse überprüft. Das Plasmid wurde *pUC Pax7prom CI MerCreMer 5'* genannt (7419 bp).

Der Vektor *pUC MerCreMer 3'* wurde partiell mit *Sst*I (siehe Kapitel 2.15.3.2), anschließend mit *Sa*II hydrolysiert und das Fragment *pUC MerCreMer 3'* (4747 bp) isoliert. In diesen geöffneten Vektor wurde das *Sa*II/*Sst*I Fragment (4328 bp) aus dem Vektor *pUC Pax7prom CI MerCreMer 5'* kloniert. Das Plasmid wurde *pUC Pax7prom CI MerCreMer* (9075 bp) genannt. Aus diesem Plasmid wurde durch Restriktionshydrolyse mit *Sst*I das Fragment *Pax7prom CI MerCreMer* (6375 bp) isoliert. Durch Ligation dieses Fragmentes in die *Sst*I Restriktionsschnittstellen des

Expressionsplasmids *pAN MerCreMer* wurde das Plasmid *pPax7CreTM* kloniert (13700 bp) (Abbildung 49).

Sowohl die Sequenz des chimären Introns und der *MerCreMer* Rekombinase als auch das korrekte Leserraster des Translationsstartcodons des *Pax7* Gens wurde durch Sequenzierung überprüft (siehe Kapitel 2.12.1.3). Die Amplifikationen wurden mit dem SAWADY Mid Range PCR-System durchgeführt.

Zur Herstellung transgener Mäuse wurden 100 µg des *pPax7CreTM* Plasmids mit den Restriktionsenzymen *SwaI/EclHkl (AhdI)* linearisiert und das 9282 bp große Fragment (*Pax7prom Cl MerCreMer SV 40 Poly A*), wie unter 2.15.3.5 und unter 2.19.1.3 beschrieben aufgereinigt und in Oocyten injiziert.

## **2.16 Immunhistochemie und Immunzytochemie**

### **2.16.1 Proteinchemische Methoden**

#### **2.16.1.1 Isolierung von Gesamtprotein**

##### **2.16.1.1.1 Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellkulturen**

Die Zellen wurden mit kaltem 1x PBS (siehe Kapitel 2.8) gespült und in 0,2 bis 2 ml heißem SDS-Lysepuffer (siehe Kapitel 2.8) von der Kulturschale gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Proben für 30 sek bei 99°C inkubiert und die Proteinkonzentrationen (siehe Kapitel 2.16.1.2) bestimmt.

##### **2.16.1.1.2 Proteinextrakte aus Geweben**

Die auf Trockeneis gelagerten oder frischen Gewebe (siehe Kapitel 2.19.4.2) wurden auf Trockeneis mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in SDS-Lysepuffer (siehe Kapitel 2.8) aufgenommen. Durch Homogenisierung (Homogenisator) auf Eis wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Proben wurden für 30 sek bei 99°C inkubiert und die Proteinkonzentrationen (siehe Kapitel 2.16.1.2) bestimmt.

### 2.16.1.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinextrakten wurde mit dem Protein assay Kit bestimmt. Das Reagenz wurde in einem Verhältnis von 1:5 mit Ampuwa verdünnt und durch einen Faltenfilter filtriert. Diese Verdünnung wurde bei Raumtemperatur für höchstens einem Monat gelagert. Die Protein-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:160 in Ampuwa verdünnt. Durch die Zugabe von 200 µl des verdünnten Protein assay reagent wurde eine Farbreaktion hervorgerufen. Die optische Dichte der Probe wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen und die Proteinkonzentration berechnet (Formel 3).

$$c = OD_{595} \cdot f \cdot C$$

**Formel 3: Formel zur Berechnung der Proteinkonzentration unter Verwendung des Protein Assay Kit (Bio-rad, Laboratories GmbH, München).** Abkürzungen: *c*, gemessene Konzentration in µg/µl; *OD*, optische Dichte; *f*, Verdünnungsfaktor; *C*, proteinspezifischer Koeffizient (0,02 µg/µl).

### 2.16.1.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde mit 7,5 bis 10 % Polyacrylamidgelen (siehe Kapitel 2.8), vertikalen PAGE-Kammern und 1x PAGE-Laufpuffer gearbeitet. Als Molekulargewichtsstandard wurde Seebblue plus 2 eingesetzt. 10 bis 20 µg der Proteinproben wurden in 2x SDS-Ladepuffer (siehe Kapitel 2.8) aufgenommen, 5 min bei 99°C inkubiert und bei 16000 x g für 2 min abzentrifugiert und in die Taschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für 3 bis 4 h bei Raumtemperatur und wurde wie unter 2.16.1.4 beschrieben weiter behandelt.

### 2.16.1.4 Western Blot

Das Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 2.16.1.3) und die Nitrozellulosemembran für Western Blots wurden für 10 min in Transferpuffer (siehe Kapitel 2.8) äquilibriert. Danach wurde die Western Blot Kammer wie vom Hersteller beschrieben unter Transferpuffer blasenfrei zusammengesetzt. Der Proteintransfer erfolgte über Nacht bei 4°C und 30 V. Der Proteintransfer wurde mit einer Ponceau S Färbung überprüft. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran für 10 min in Ponceau S Lösung (siehe Kapitel 2.8) inkubiert und mit MilliQ Wasser unter Schwenken (Wipp-Taumel-Tisch)

langsam entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde die Membran in M-PBT Puffer (siehe Kapitel 2.8) unter Schwenken für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membransondierung mit primärem Antikörper erfolgte in M-PBT Puffer unter Schwenken über Nacht bei 4°C. Danach wurde der Blot für 3x 10 min in M-PBT Puffer gewaschen und mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Antikörper in M-PBT Puffer für 2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nach erneutem Waschen des Blots (3x 10 min in M-PBT Puffer und 1x 10 min in 1x PBS) wurde die Sondierung mit Hilfe des ECL-Kits auf ECL-Filmen sichtbar gemacht.

Die eingesetzten Verdünnungen der verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgelistet.

### **2.16.1.5 Aktivitätsnachweis des *E. coli* $\beta$ -Galaktosidase Proteins**

#### **2.16.1.5.1 X-Gal-Färbung von Embryonen und Muskelfasern**

Die Embryonen wurden nach der Präparation (siehe Kapitel 2.19.2) in 1x PBS (siehe Kapitel 2.8) auf Eis gewaschen und für mindestens 2 h in 4 % Paraformaldehyd/1x PBS fixiert. Die präparierten Muskelfasern (siehe Kapitel 2.17.2) wurden ebenfalls in 1x PBS gewaschen und für 15 min in Paraformaldehyd (siehe Kapitel 2.8) fixiert. Nach dem Waschen (3x 20 min in 1x PBS auf Eis) wurden die Embryonen/Muskelfasern in 0,2 % Glutaraldehyd/1x PBS (siehe Kapitel 2.8) für 10 min auf Eis inkubiert und 3x 10 min lang in LacZ-Puffer (siehe Kapitel 2.8) äquilibriert. Danach wurden die Embryonen/Muskelfasern über Nacht bis 2 Tage in LacZ-Färbepuffer (siehe Kapitel 2.8) bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Um die Embryonen/Muskelfasern lichtmikroskopisch zu untersuchen, wurden sie in einer aufsteigenden Glycerolreihe (15 %, 30 %, 50 %, 80 %, in 1x PBS für je 12 h bei 4°C; siehe Kapitel 2.8) äquilibriert. Das Material kann so bei 4°C jahrelang gelagert werden. Die Embryonen wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops, die Muskelfasern am inversen Mikroskop analysiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert.



### **2.16.1.5.2 X-Gal-Färbung an Kryostatschnitten**

Die Gewebe (siehe Kapitel 2.19.4.2) oder Embryonen (siehe Kapitel 2.19.2) wurden nach der Präparation wie unter 2.16.3 beschrieben in Cryoblock Einbettmedium eingebettet und Kryostatschnitte am Kryostaten angefertigt. Die Schnitte wurden in 0,2 % Glutaraldehyd/1x PBS (siehe Kapitel 2.8) für 10 min auf Eis inkubiert und 3x 10 min in LacZ-Puffer (siehe Kapitel 2.8) äquilibriert. Danach wurden die Schnitte über Nacht bis 2 Tage in LacZ-Färbepuffer (siehe Kapitel 2.8) bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Nachfolgend wurden die gefärbten Schnitte in ein DAPI (4'6-Diamino-2-phenylindiol) -enthaltenden Montagemedium mit Hilfe von Deckgläsern eingedeckt. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskops mit Fluoreszenzfilter analysiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

### **2.16.1.6 Quantitativer Aktivitätsnachweis der Luziferase (Dualer-Luziferase-Assay) und statistische Auswertung**

Der quantitative Aktivitätsnachweis der Firefly (*pGL*-Vektoren) und der Renilla (*pRL*-Vektoren) Luziferase erfolgte mit dem Dual-Luciferase reporter assay system nach Herstellerangaben mit Hilfe des Luminometers MPL-3 und der dafür vorgesehenen Software (siehe Kapitel 2.2). Die statistische Auswertung (siehe Kapitel 2.1) der Versuchsreihen wurden mit Hilfe der Software Statistica durchgeführt. Die Graphiken wurden in Box-Whisker-Plots dargestellt. Die Signifikanz von Unterschieden und Gleichheit der einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe eines t-Tests für unabhängige Gruppen (Mann-Whitney-U-Test) getestet. P Werte von  $P < 0,05$  wurden als signifikant und P Werte  $P > 0,05$  wurden als nicht-signifikant gewertet (siehe Kapitel 2.1).

## **2.16.2 Paraffinschnitte von Geweben**

### **2.16.2.1 Gewebeeinbettung zum Anfertigen von Paraffinschnitten**

Zu analysierende Organe und Gewebe wurden mindestens 2 Tage bei 4°C in Paraformaldehyd (siehe Kapitel 2.8) fixiert und ebenso wie perfundierte Tiere (siehe Kapitel 2.19.4.1) in Paraformaldehyd bei 4°C gelagert. Vor der Paraffineinbettung wurden die Gewebe und Organe mit Hilfe eines Gewebeeinbett- und -

entwässerungsautomaten entwässert und anschließend maschinell in Paraffin eingegossen (Paraffinspender und Ausgießstation Tissue Block Dispenser PAG 12).

### **2.16.2.2 Anfertigung von Paraffinschnitten**

Paraffinschnitte wurden am Schlittenmikrotom angefertigt, auf Superfrost Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Für immunhistologische Antikörperfärbungen (siehe Kapitel 2.16.5) wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert. Hierzu wurden die Schnitte für 20 min mit 100 % Xylol inkubiert. Dann wurden sie 1x in einer 1:1 Alkohol/Xylolmischung, 2x in 99 % Ethanol und jeweils 1x in 90 % Ethanol, 70 % Ethanol und 50 % Ethanol geschwenkt, bevor sie dann kurz in destilliertem Wasser gespült wurden.

### **2.16.3 Kryostatschnitte von Embryonen und Geweben**

#### **2.16.3.1 Fixierung und Äquilibrierung des Gewebematerials**

Die Fixierung von präparierten Geweben (siehe Kapitel 2.19.4.2), Embryonen (siehe Kapitel 2.19.2) und Muskelfasern (siehe Kapitel 2.17.2) erfolgte in Paraformaldehyd (siehe Kapitel 2.8) für bis zu 2 h auf Eis. Nach drei gründlichen Waschschritten in 1x PBS wurde das Material wie unter 2.16.3.2 beschrieben weiterbehandelt. Skelettmuskeln und Embryonen wurden vor der Einbettung in 25 % Sukrose in 1x PBS (siehe Kapitel 2.8) auf Eis über Nacht äquilibriert. Embryonen wurden danach wie unter 2.16.3.2 beschrieben eingebettet. Skelettmuskeln wurden vor dem Einbetten in Cryoblock Einbettmedium für 30 sek in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan eingefroren.

#### **2.16.3.2 Gewebereinbettung zum Anfertigen von Kryostatschnitten**

Das vorbehandelte Material (siehe Kapitel 2.16.3.1) wurde in vorgekühltem Cryoblock Einbettmedium auf Trockeneis eingebettet. Die eingebetteten Gewebe/Embryonen können so bei -80°C gelagert werden.

### **2.16.3.3 Anfertigung von Kryostatschnitten**

Es wurden Kryostatschnitte der eingebetteten Gewebe (siehe Kapitel 2.16.3.2) von 2 bis 20 µm Dicke am Kryostat angefertigt, welche dann auf Superfrost Objektträger aufgezogen und für maximal 6 h bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Für Antikörperfärbungen und für X-Gal-Färbungen wurden die Schnitte lediglich 2 h getrocknet und dann direkt gefärbt.

### **2.16.4 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung und Eindecken von Kryostat- und Paraffinschnitten**

Die getrockneten Schnitte wurden 3 min in Hämatoxylin-Lösung (siehe Kapitel 2.8) inkubiert und in warmem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte 20 sek in Eosin-Lösung (siehe Kapitel 2.8) inkubiert und in MilliQ Wasser gewaschen. Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (70 %, 96 %, 99 % Ethanol). Die Präparate wurden dann kurz in Xylol geschwenkt. Abschließend wurde ein Tropfen Pertex Montagemedium auf den Objektträger pipettiert und ein Deckglas blasenfrei auf die Schnitte gelegt. Durch die Inkubation der Präparate bei 55°C für 15 min (Brutschrank) wurde das Montagemedium gehärtet. Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskops analysiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

### **2.16.5 Immunhistologische Antikörperfärbungen an Paraffinschnitten**

Paraffinschnitte wurden wie unter 2.16.2 beschrieben angefertigt und entparaffiniert. Die Demaskierung der Epitope erfolgte bei 700 W (1x 4 min und 4x 3 min in der Mikrowelle) in Citratpuffer (siehe Kapitel 2.8). Die Objektträger wurden in destilliertem Wasser auf Raumtemperatur abgekühlt, in 1x TBS/0,1 % Triton X-100 (siehe Kapitel 2.8) gespült und unspezifische Bindungen mit 10 % FCS/1x PBS blockiert (1 h bei Raumtemperatur). Die primäre Antikörperfärbung wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach dem Spülen der Schnitte in 1x TBS/0,1 % Triton X-100, wurde die sekundäre Antikörperfärbung für 1 h bei Raumtemperatur (feuchte Kammer) durchgeführt. Dann wurden die Schnitte erneut in 1x TBS/0,1 % Triton X-100 gespült. Danach folgte die APAAP (alkalische

Phosphatase anti-alkalische Phosphatase, siehe Kapitel 2.14.2) Färbung für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Spülen in 1x TBS/0,1 % Triton X-100 wurde die spezifische Antikörperfärbung durch Färbung mit Neu-Fuchsin Chromogen (siehe Kapitel 2.8) sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde nach 20 min mit Leitungswasser gestoppt. Der APAAP-Komplex besteht aus jeweils zwei Molekülen alkalischer Phosphatase aus Kälberdarmmukosa, welche an monoklonale IgG1-Antikörper gebunden vorliegen. Die IgG1-Antikörper binden an den verwendeten sekundären Antikörper. Durch die Zugabe der Neu-Fuchsin-Chromogenlösung hydrolysiert die alkalische Phosphatase das Naphtholphosphat-Ester der Lösung und das so entstehende Naphthol bildet zusammen mit dem farblosen Diazoniumsalz Neu-Fuchsin einen unlöslichen roten Azofarbstoff.

Als Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit saurem Hämalaun nach Mayer für 17 sek angefärbt (siehe Kapitel 2.8, 2.16.4). Die Schnitte wurden anschließend wie unter 2.16.4 beschrieben mit Immuno Mount eingedeckt. Die gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskops analysiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgelistet und wurden in 10 % FCS/1x PBS verdünnt.

## **2.16.6 Immunfluoreszenzanalysen**

### **2.16.6.1 Durchflusszytometrische Analysen (FACS)**

Thymus und Milz wurden aus durch CO<sub>2</sub>-Narkose getöteten Mäusen isoliert (siehe Kapitel 2.19.4.2) und durch ein feinmaschiges Sieb gedrückt. Zur Isolierung des Knochenmarks wurden Oberschenkel- und Unterschenkelknochen aus Mäusen präpariert und das Mark mit Kanüle (Sterican Ø 0,8 x 120 mm) und Spritze mit DMEM Medium ausgespült. Von Knochenmarks-, Thymus- und Milzsuspensionen wurden durch mehrmaliges Aufziehen durch die Kanüle Ein-Zellsuspensionen hergestellt. Diese wurden abzentrifugiert (300 g; 4°C; 4 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1x PBS (siehe Kapitel 2.8) aufgenommen. Die Zellen wurden in der Zählkammer quantifiziert und 1x 10<sup>6</sup> Zellen pro durchflusszytometrische Färbung eingesetzt. Die Färbungen erfolgten auf Eis in 1x PBS für jeweils 15 min. Die Zellen wurden in 1x PBS gewaschen und abzentrifugiert (300g; 4°C, 4 min). Gegebenenfalls erfolgte ein zweiter Färbeschritt.

Die verwendeten primären Antikörper und Fluorochrom-gekoppelten Streptavidin Reagenzien sind in Tabelle 16 und Tabelle 18 aufgelistet.

Abschließend wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen, abzentrifugiert (300 g; 4°C, 4 min), das Zellpellet in 500 µl 1x PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert (max. 1 h). Die Annexin V-Färbung von Thymozyten wurde mit dem Annexin V-PE apoptosis detection kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die Isolierung und Anreicherung von Lineage-negativen (Lin<sup>-</sup>) hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen aus 1x 10<sup>7</sup> Knochenmarkszellen erfolgte durch Depletion von Lineage-positiven Zellen mit Hilfe des EasySep mouse hematopoietic progenitor cell enrichment kit. Dieser Kit enthält eine Antikörper-Mischung von monoklonalen Antikörpern gegen die Mausantigene CD5, CD45R/B220, Mac-1, Gr-1, Ter119 und 7-4.

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden am BD LSR II flow cytometer durchgeführt. Die Software BD FACS Diva™ diente zur Aufnahme der Daten, die dann mit der Software FlowJo software analysiert wurden.

#### **2.16.6.2 Immunfluoreszenzfärbungen an kultivierten Zellen, Muskelfasern und Kryostatschnitten**

Die Zellen, Muskelfasern (siehe Kapitel 2.17.2) und Kryostatschnitte (siehe Kapitel 2.16.3) wurden in Paraformaldehyd (siehe Kapitel 2.8) für 5 bis 15 min fixiert und 3x 5 min in 100 mM Glycin/1x PBS (siehe Kapitel 2.8) gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte für 4 min mit 0,1 % Triton X-100/1x PBS (siehe Kapitel 2.8). Nach drei Waschschritten (je 5 min in 1x PBS) wurden unspezifische Bindungen für 1 h mit 5 % Pferdeserum (HS)/1 % Rinderserumalbumin (BSA)/1x PBS blockiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte in 5 % HS/1 % BSA/1x PBS für mindestens 2 h. Nach drei Waschschritten (je 10 min in 1x PBS) folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in 5 % HS/1 % BSA/1x PBS für 1 h. Die Zellen, Muskelfasern und Kryostatschnitte wurden nach 3 weiteren Waschschritten (je 10 min in 1x PBS) mit 35 µl DAPI-Montagemedium und Deckgläsern eingedeckt.

Für Immunfluoreszenzfärbungen von eukaryotischen Zellen wurden diese auf Objektträger-Kulturschalen kultiviert und direkt auf den Objektträgern fixiert und gefärbt.

Die Färbungen von Kryostatschnitten erfolgten wie bei den Zellkulturen, jedoch wurden die Schnitte hierfür nicht fixiert.

Muskelfasern wurden direkt nach der Präparation in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in diesem fixiert und angefärbt. Vor der DAPI-Färbung wurden die Muskelfasern vorsichtig auf einen gereinigten Objektträger überführt, auf diesem mit 35 µl DAPI-Montagemedium versetzt und ein Deckglas aufgelegt.

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur und unter Schwenken (Wipp-Taumel-Tisch) durchgeführt. Die gefärbten Objekte wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskops mit UV-Lampe und Fluoreszenzfilter analysiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert. Die eingesetzten Verdünnungen der verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 16 und Tabelle 17 aufgelistet.

## **2.17 Zellbiologische Methoden**

### **2.17.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen**

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte in Zellkulturschalen im Begasungsbrutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 16 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 79 % N<sub>2</sub> bei 37°C. Die verwendeten Medien sind unter 2.9.3 aufgeführt. Für bestimmte Experimente und Zellen wurde mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen bzw. unterschiedlichen Antibiotika gearbeitet. Diese Angaben sind unter 2.10.2 und bei der Beschreibung der Experimente angegeben.

Die verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind unter 2.10.2 aufgeführt. Alle Zelllinien wurden von der Firma ATCC LGC Promochem, Wesel, bezogen und wie unter 2.17.1 beschrieben kultiviert. Die Zellen wurden maximal 20x passagiert.

Zur Kryokonservierung von Zelllinien wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1x PBS (siehe Kapitel 2.8) gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA von einer 10 cm Zellkulturschale abgelöst. Nach der Zugabe von 3 ml Medium wurde durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren eine Ein-Zellsuspension hergestellt. Diese wurde bei 300 x g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Das

Zellpellet wurde in 10 ml Medium mit 10 % DMSO aufgenommen. Die durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren hergestellte Ein-Zellsuspension wurde zu je 1 ml in Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert. Das Einfrieren der Zelllinien erfolgte zunächst für 1 bis 2 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Danach wurden die Zellen über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, bevor sie zur Dauerlagerung in flüssigem Stickstoff überführt wurden.

Zur Revitalisierung von Zelllinien wurde ein Zellaliquot aus dem Stickstofftank schnell bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und die Zellen in eine Zellkulturschale mit auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmtem Medium überführt.

### **2.17.1.1 Transfektion eukaryotischer Zellen**

#### **2.17.1.1.1 Transfektion eukaryotischer Zellen mit Expressionsplasmid-DNA**

Die Transfektion von Zelllinien mit Expressionsplasmid-DNA (siehe Kapitel 2.11.2; 2.11.3) erfolgte mit dem Transfektionsmedium RotiFect. Hierbei wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Falls nicht anders angegeben, wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte 1 bis 3  $\mu\text{g}$  Expressionsplasmid-DNA mit 3  $\mu\text{l}$  RotiFect transfiziert.

#### **2.17.1.1.2 Transfektion eukaryotischer Zellen mit siRNA**

Die Transfektion von siRNA wurde mit dem Kit TransMessenger transfection reagent durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Pro Loch einer 6-Loch-Platte wurden 1,6  $\mu\text{g}$  siRNA eingesetzt. Das Verhältnis von eingesetzter Nukleinsäuremenge zu TransMessenger transfection reagent Volumen (in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) betrug dabei 1:5. Die verwendeten RNA-Oligonukleotide sind unter 2.12.2 aufgelistet.

#### **2.17.1.2 Stimulation des Shh/Ptch Signalweges durch Shh-N Protein**

Die Stimulation des Shh/Ptch Signalweges erfolgte in einigen Experimenten durch Zugabe von rekombinantem murinen Shh (Shh-N; R&D Systems, Eiesbaden-Nordenstadt) zum Medium. Das lyophilisierte Protein wurde in 0,1 % BSA/1x PBS (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gelöst und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert. Die Stimulation der Zellen erfolgte 4 h nach siRNA-Transfektion (2.17.1.1.2) durch Zugabe von 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Shh-N zum Medium (DMEM/0,5 % FCS). Die Zellen wurden danach für weitere 24 bis zu 48 h kultiviert.

## **2.17.2 Isolierung und Kultivierung einzelner Muskelfasern**

Die Isolierung und Kultivierung von einzelnen Muskelfasern erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll nach Rosenblatt *et al.* (Rosenblatt JD *et al.*, 1995).

Die Muskelstränge des *tibialis anterior*, *soleus* und *extensor digitorum longus* des Unterschenkels einer Maus wurden präpariert. Um jegliche Spannung zu vermeiden, wurden die Muskeln nur an den Sehnen mit feinen Pinzetten erfasst. Die präparierten Muskelstränge wurden in 37°C warmem DMEM für maximal 1 h gelagert. Zum Vereinzeln der Muskelfasern wurden die Muskelstränge in einer Collagenase H-Lösung (siehe Kapitel 2.8) für 1 bis 1,5 h bei 35°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde jeder Muskel in eine separate, mit HS gespülte Petrischale mit 37°C warmem DMEM überführt. Die Muskelfasern wurden mit Hilfe einer abgewinkelten Glas-Pasteurpipette (mit einer unter Feuer abgerundeten ca. 1 mm großen Öffnung) durch Auf- und Ab-Pipettieren aus dem Muskel gelöst. Überlebensfähige Fasern erscheinen lang und gerade. Diese Fasern wurden durch seriellen Transfer in 2 bis 3 mit HS gespülte Petrischalen in DMEM von den restlichen Fasern isoliert und konnten nun direkt fixiert oder in Kultur genommen werden. Die direkte Fixierung der Muskelfasern erfolgte in 2,0 ml Reaktionsgefäßen, in die die Fasern überführt und mit 4% Paraformaldehyd (siehe Kapitel 2.8; Endkonzentration ca. 3 %) für 5 min bei Raumtemperatur überschichtet wurden. Nach dem Waschen (3x 10 min in 1x PBS) der Fasern (siehe Kapitel 2.8) wurden die Fasern für Antikörperfärbung (siehe Kapitel 2.16.6.1) oder X-Gal-Färbung (siehe Kapitel 2.16.1.5.1) verwendet.

## **2.18 Zytologische und chemische Blut- und Knochenmarksanalysen**

### **2.18.1 Assay zur Bestimmung der kolonieformenden Aktivität von Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks (Colony forming-unit Assay, CFU-Assay)**

Die kolonieformende Aktivität von Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen wurde mit einem auf Methylzellulose-basierenden Medium (MethoCult 3434) analysiert. Die Isolierung von Lin<sup>-</sup> Zellen aus Knochenmark ist unter 2.16.6.1 beschrieben. Nach Quantifizierung der angereicherten Lin<sup>-</sup> Zellen (Zählkammer) wurden je Tier  $2 \times 10^3$  Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen in Triplikaten in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät. Dabei



wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Die Differenzierung und Zählung der Kolonien erfolgte 7 Tage nach dem Aussähen der  $\text{Lin}^-$  Zellen an einem inversen Mikroskop.

## **2.18.2 Vollblutanalysen**

### **2.18.2.1 Differentialblutbild und Blutausstriche**

Das zu analysierende Blut wurde direkt in EDTA-Röhrchen überführt und gut gemischt. Die Blutproben wurden bis zur Analyse auf 4°C (bis zu 6 h) gelagert.

Differentialblutbilder von EDTA-Vollblut aus Herzpunktionen (siehe Kapitel 2.19.3.2) wurden am AcT 5 hematology analyzer erstellt.

Blutausstriche wurden aus EDTA-Vollblut von Herzpunktionen (siehe Kapitel 2.19.3.2) und aus Blutabnahmen aus dem Augenhintergrund (siehe Kapitel 2.19.3.2) angefertigt. Die Zellen wurden mit Hemacolor angefärbt und ausgezählt.

### **2.18.2.2 Retikulozyten-Färbung an Vollblut**

EDTA-Vollblut aus Blutabnahmen aus dem Augenhintergrund (siehe Kapitel 2.19.3.2) wurde zu gleichen Teilen mit 1 % Brilliantkresylblau (siehe Kapitel 2.8) gemischt und Ausstriche angefertigt. Pro Ausstrich wurde die Anzahl der Retikulozyten je 1000 gezählter Zellen bestimmt.

## **2.18.3 Biochemische Analysen von Serumproben**

EDTA-Vollblut aus Herzpunktionen wurde abzentrifugiert (800 g; 4°C; 10 min) und das Serum in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die biochemische Analyse der Serumproben (Glukose, Cholesterin, Triglyceride, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Gesamt-Bilirubin, Harnstoff, Gesamtprotein) erfolgte mit enzymatischen *in vitro* Assays am MODULAR P.

#### **2.18.4 Zytospin-Präparation von Knochenmarkszellen**

Knochenmarkszellen wurden wie unter 2.16.6.1 beschrieben isoliert.  $2 \times 10^5$  Zellen jeder Probe wurden auf Objektträger zentrifugiert (Cytospin 2). Die Zellen wurden mit einer panoptischen Färbung nach Pappenheim angefärbt. 500 Zellen wurde ausgezählt und die Anzahl der erythropoetischen Vorläuferzellen bestimmt.

### **2.19 Tierexperimentelle Methoden**

#### **2.19.1 Zucht und Haltung von *Mus musculus***

Die verwendeten Mausstämme (siehe Kapitel 2.10.3) wurden im institutseigenen Tierstall (Gentechnischer Arbeitsbereich S1; Institut für Humangenetik, Universität Göttingen) gezüchtet. Die Tierhaltung erfolgte in Makrolonkäfigen Typ II und III, bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus (Hell-Periode: 6.00-18.00 Uhr), einer Temperatur von  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  und einer relativer Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 10\%$ . Pelletierte Zuchtdiät (Alleinfutter für Mäuse-Zucht, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser (Leitungswasser) standen den Tieren ständig zur Verfügung.

##### **2.19.1.1 Schwanzbiopsie und Ohrlochmarkierung**

Schwanzbiopsien (ca. 0,5 cm der Schwanzspitze) und gleichzeitige Ohrlochmarkierungen (Nummerierung der Mäuse) von 4 Wochen alten Mäusen wurden vom Tierstallpersonal im institutseigenen Tierstall vorgenommen.

##### **2.19.1.2 Genotypisierung von Mäusen**

Die Genotypisierungen von Mäusen erfolgte durch PCR (siehe Kapitel 2.15.4.1) an genomischer DNA aus Schwanzbiopsien (siehe Kapitel 2.15.1.4.2). Die für die unterschiedlichen Mauslinien verwendeten spezifischen DNA-Oligonukleotide und PCR-Konditionen sind unter 2.12.1.1 aufgeführt. Einige Genotypisierungen wurde mit Southern Blot Analyse (siehe Kapitel 2.15.6) verifiziert.

### **2.19.1.3 Herstellung von transgenen Mauslinien**

Die Injektion von linearisierter Expressionsplasmid-DNA (siehe Kapitel 2.15.3.5) in Oozyten und die Herstellung transgener Mäuse wurde vom Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen, durchgeführt. Transgene „Founder“ Tiere wurden in das Institut für Humangenetik, Universität Göttingen, überführt, wo sie zum Zuchtaufbau eingesetzt wurden.

### **2.19.2 Bestimmung des Kopulationszeitpunktes und der Trächtigkeit sowie Isolierung von Mausembryonen**

Um Embryonen eines bestimmten Alters zu isolieren, wurden jeden Morgen Weibchen aus Verpaarungen auf eine erfolgte Kopulation untersucht. Das Koagulat des Ejakulats bildet bis zu 24 h nach erfolgter Ejakulation eine sichtbare Vaginalplaque. Der Zeitpunkt der Vaginalplaquesichtung wurde als Tag 0,5 nach erfolgter Kopulation definiert (*days post coitum; dpc*). Die tatsächliche Trächtigkeit der vaginalplaque-positiven Weibchen wurde visuell erst nach 9,5 bis 10,5 Tagen bestätigt. Für die Isolierung früherer Embryonalstadien wurden vaginalplaque-positive Weibchen präpariert und die Embryonen isoliert. Die Isolierung von Mausembryonen erfolgte zu definierten Stadien der Embryonalentwicklung. Der Zeitpunkt der Isolierung wurde, wie oben beschrieben, bestimmt. Die tragenden Weibchen wurden schmerzfrei getötet (CO<sub>2</sub>-Narkose, zervikale Dislokation) und der Uterus mit den Embryonen isoliert. Die Embryonen wurden in 1x PBS (siehe Kapitel 2.8) auf Eis aus dem Uterusgewebe präpariert. Zur Genotypisierung der Embryonen wurde der jeweilige Dottersack aufbewahrt (siehe Kapitel 2.15.1.4.2). Für die Isolierung von embryonaler Gesamt-RNA wurden die Embryonen direkt in TRIZOL Reagent aufgenommen und wie unter 2.15.1.5.2 beschrieben weiterbehandelt. Zur Fixierung der Embryonen wurden die Hirnhöhlen mit einer sterilen Kanüle (B. Braun Medical AG, Emmenbrücke) geöffnet und somit für das Fixativ zugänglich gemacht. Die Embryonen wurden in 1x PBS gewaschen und für mindestens 2 h in Paraformaldehyd (siehe Kapitel 2.8) auf Eis fixiert. Um die Embryonen ohne weitere Behandlung lichtmikroskopisch untersuchen zu können, wurden sie in einer aufsteigenden Glycerolreihe (15 %, 30 %, 50 %, 80 %, in 1x PBS je 12 h bei 4°C) äquilibriert.

## **2.19.3 Injektionen und Blutabnahmen**

### **2.19.3.1 Intraperitoneale und intramuskuläre Injektion von Tamoxifen**

Zur Induktion der Cre-Rekombinase der Mauslinien *ROSA26CreERT2* und *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* wurde eine 100 mg/ml Tamoxifen (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim) Lösung in 96 % Ethanol hergestellt und diese in sterilem Sonnenblumenöl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) 1:10 verdünnt (10 mg/ml). Die Emulsion wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Induktion der MerCreMer-Rekombinase wurde eine 250 mg/ml 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) Lösung in 96% Ethanol hergestellt und diese in sterilem Sonnenblumenöl 1:25 verdünnt (10 mg/ml). Eine Emulgierung der Verdünnung wurde durch 5 min Ultraschallbehandlung erreicht. Die Emulsion wurde bei -20°C gelagert.

Die Mäuse wurden im Genick fixiert und 100 µl der Tamoxifenemulsion (10 mg/ml) intraperitoneal injiziert (tägliche Dosis 1 mg Tamoxifen). Intramuskulär (*musculus soleus*) wurden die fixierten Tiere einmalig mit 10 µl der 10 mg/ml konzentrierten Tamoxifenemulsion injiziert (einmalige Dosis 100 µg). Es wurden sterile Spritzen und Kanülen (Sterican Ø 0,45 x 12 mm) verwendet. Kontrolltieren wurden jeweils 100 µl bzw. 10 µl der Emulsion ohne Tamoxifen gespritzt.

### **2.19.3.2 Blutabnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus und durch Herzpunktion**

Die Blutabnahme aus dem Augenhintergrund (retroorbitaler Venenplexus) erfolgte mit angebrochenen Mikro-Hämatokrit-Kapillaren. Herzpunktionen wurden an narkotisierten Mäusen (siehe Kapitel 2.19.4.1) nach vorheriger Öffnung des Brustraumes durchgeführt. Das zu analysierende Blut wurde direkt in EDTA-Röhrchen überführt und gut gemischt. Die Blutproben wurden bis zur Analyse auf 4°C (bis zu 6 h) gelagert.

## **2.19.4 Sichtung und Präparation von Tumoren**

Mäuse mit erhöhter Tumorprädisposition wurden engmaschig beobachtet. 2 bis 3 Mal pro Woche wurden sie auf typische Symptome eines Medulloblastoms (MB) hin

untersucht (Ataxie, Abmagerung, Gangunsicherheit, Zittern). Bauchraum, Abdomen, Rücken sowie Extremitäten wurden abgetastet, um die Entwicklung von Weichteiltumoren zu diagnostizieren.

Tiere mit schwerer Ataxie wurden sofort schmerzfrei getötet (CO<sub>2</sub>-Narkose). Das Kleinhirn wurde zu weiteren Analyse präpariert (siehe Kapitel 2.19.4.2). Bei Auftreten eines Weichteiltumors wurde das Datum vermerkt und die weitere Tumorprogression engmaschig beobachtet. Bei einer geschätzten Tumorgöße von ca. 1 cm Durchmesser wurde die Maus schmerzfrei getötet (CO<sub>2</sub>-Narkose, zervikale Dislokation) und Tumor sowie Referenzgewebe aus dem Tier isoliert (siehe Kapitel 2.19.4.2).

#### **2.19.4.1 Perfusion von Mäusen mit Paraformaldehyd**

Mäuse wurden mit einer letalen Dosis 1 mg Rompun und 1,6 % Ketanest S (Ketanest S, 25 mg/ml) (Rompun 2 %) betäubt. Der Brustraum der Tiere wurde geöffnet und das Herz freigelegt. Das rechte Atrium wurde zur Eröffnung des Blutkreislaufs punktiert und gegebenenfalls das Blut für weitere Analysen verwendet. Der linke Ventrikel wurde punktiert, die Blutgefäße 10 min mit Ringer-Lactat und nachfolgend 10 min mit Paraformaldehyd (siehe Kapitel 2.8) gespült. Die fixierte Maus wurde bis zur Analyse in Paraformaldehyd bei 4°C gelagert.

#### **2.19.4.2 Präparation von Tumoren und Geweben**

Zu präparierende Mäuse wurden schmerzfrei durch CO<sub>2</sub>-Narkose oder zervikale Dislokation getötet. Das Tier wurde auf dem Präparationstisch fixiert und die Bauchhaut mit 70 % Ethanol desinfiziert und entfernt. Das Abdomen wurde entlang der Mittellinie geöffnet. Dann wurde vorsichtig die Bauchaorta durchtrennt, um die Maus auszubluten. Die jeweiligen Organe wurden dem Bauchraum entnommen und je nach Verwendungszweck weiterbehandelt. Zur Isolierung von RMS wurde zuerst die Haut über und um den Tumor entfernt und der Tumor sauber aus dem umliegenden Gewebe isoliert. Referenzgewebe (Skelettmuskel) wurde aus einem möglichst weit entfernt vom Tumor liegenden Skelettmuskel isoliert. Zur Präparation des Kleinhirns bzw. MB erfolgte die Tötung der Mäuse ausschließlich durch CO<sub>2</sub>-Narkose. Die Kopfhaut wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und abpräpariert. Die

---

Freilegung des Hirns erfolgte durch die Entfernung der Schädelkalotte ausgehend vom *Foramen magnum*. Das Kleinhirn wurde mit einem sterilen Spatel isoliert.

RMS, Referenzgewebe und Kleinhirn wurden auf Trockeneis eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur histologischen Abklärung gelagert (siehe Kapitel 2.16.3). Diese erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen (Dr. W. Schulz-Schaeffer) anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten (siehe Kapitel 2.16.2, 2.16.3, 2.16.4). Danach wurden die Gewebe weiteren Analysen zugeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Entstehung von RMS in konventionellen *Ptch*<sup>neo67/+</sup> knock-out Mäusen

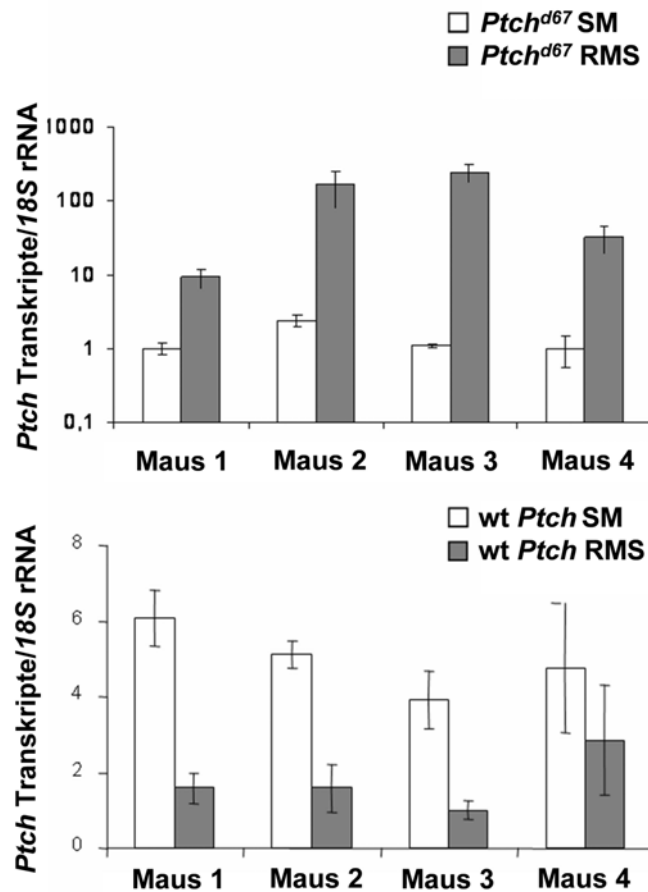
##### 3.1.1 Verminderte Expression von wt *Ptch* Transkripten und Überexpression mutanter *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripte in RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen

Heterozygote *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäuse (siehe Abbildung 2) entwickeln abhängig vom genetischen Hintergrund mit unterschiedlicher Inzidenz RMS (Hahn H *et al.*, 2004). Über die Entstehung von *Ptch*-assoziierten RMS ist bisher jedoch nicht viel bekannt.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte gezeigt werden, dass RMS aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tieren keine zusätzlichen inaktivierenden Mutationen im verbleibenden wt *Ptch* Allel aufweisen, welche zu einer biallelischen *Ptch* Inaktivierung führen würden (Calzada-Wack J *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass die Entstehung von RMS in diesem Mausmodell durch einen anderen Mechanismus ausgelöst wird.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass RMS und MB von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen *Ptch* Transkripte überexprimieren (Hahn H *et al.*, 1998). Die Überexpression von *Ptch* kommt hierbei nicht durch wt *Ptch* Transkripte, sondern durch die Überexpression von mutanten Transkripten (im Folgenden als *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripte bezeichnet) zustande (Calzada-Wack J *et al.*, 2002; Uhmman A *et al.*, 2005). Dies konnte sowohl durch Northern Blot Experimente (Calzada-Wack J *et al.*, 2002) als auch durch Transkript-spezifische TaqMan-Analysen (Uhmman A *et al.*, 2005) (Vorarbeiten von U. Ferch, Universität Göttingen, Institut für Humangenetik, Diplomandin) demonstriert werden.

Zum besseren Verständnis der nun folgenden Ergebnisse sind die quantitativen *real time* PCR-Analysen, die von Uta Ferch durchgeführt wurden, in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Mutante *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripte werden im RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen überexprimiert.** Dargestellt sind Auswertungen von quantitativen *real time* PCR-Analysen von RMS- und Skelettmuskel-cDNA aus 4 *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen. Der Nachweis der unterschiedlichen *Ptch* Transkripte erfolgte mit Transkript-spezifischen Sonden (siehe Text). Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen und die Werte auf die Expression von 18S rRNA normalisiert (Uhmann A *et al.*, 2005).

Bei der Transkription des mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Allels von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen wird Exon 5 ohne Leserasterverschiebung in das Exon 8 gespleisst (Abbildung 10) (Calzada-Wack J *et al.*, 2002; Uhmann A *et al.*, 2005). Dadurch ist die Unterscheidung der wt und der mutanten *Ptch* Transkripte möglich. In Transkript-spezifischen quantitativen *real time* PCR-Analysen wurden zwei unterschiedliche Sonden verwendet. Der Nachweis von wt Transkripten erfolgte mit einer Sonde, welche spezifisch an die Übergangssequenz von Exon 5 und 6 bindet. Die Sonde zum Nachweis der mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripte bindet dagegen an die Übergangssequenz von Exon 5 und 8.

In Organen von heterozygoten *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen werden beide Allele gleich stark exprimiert. Im RMS ist dagegen ein deutliches Ungleichgewicht der Expression



beider Transkripte zu beobachten. Während die Transkripte des mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Allels deutlich überrepräsentiert sind, ist die Expression des wt *Ptch* Allels in RMS verglichen mit den meisten normalen Geweben deutlich verringert (Abbildung 5) (Uhmann A *et al.*, 2005).

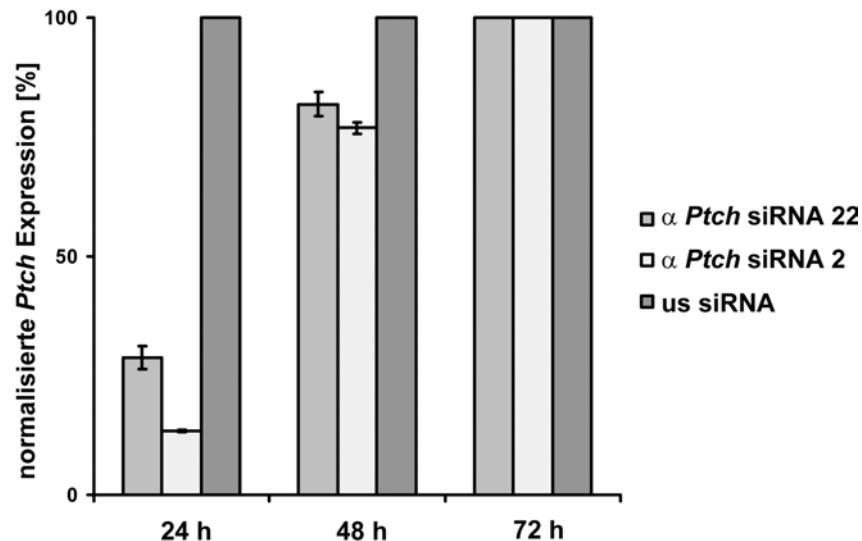
### 3.1.2 Verminderung der Expression von wt *Ptch* führt zur Aktivierung der Shh/*Ptch* Signalkaskade

Wie bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben wurde, führt die Fehlregulation der Shh/*Ptch* Signalkaskade zur Expression von Zielgenen der Kaskade. Hierzu gehören *Gli1*, *Igf2* und *Ptch*. In den von uns untersuchten RMS werden diese Gene verstärkt exprimiert (Dahmane N *et al.*, 1997; Hahn H *et al.*, 2000; Kappler R *et al.*, 2003). Da eine monoallelische *Ptch* Mutation für eine solche Fehlregulation nicht ausreichend ist (sonst wären alle Individuen mit heterozygoten *Ptch* Mutationen nicht lebensfähig), wurde zunächst überprüft, ob die Signalkaskade auch durch eine einfache Verminderung von wt *Ptch* Transkripten/Proteinen aktiviert werden kann.

Um eine durch *Ptch* Inaktivierung induzierte Signalwegaktivierung zu analysieren, wurden RNA Interferenz (RNAi) Experimente durchgeführt.

In einem Vorversuch wurde die Spezifität der verwendeten siRNA-Oligonukleotide (siRNA, short interference RNA) überprüft (Elbashir SM *et al.*, 2002). Hierzu wurden NIH/3T3 Zellen mit dem Expressionsplasmid *pCR3.1 mPtch(K)wt* und *Ptch*-spezifischer siRNA co-transfiziert (*mPtch\_Exon22 si* oder *mPtch\_Exon2 si*, Tabelle 14). 24, 48 und 72 h nach der Transfektion wurde die *Ptch* Expression quantifiziert (siehe unten). Als Kontrolle wurde unspezifische siRNA mit dem Expressionsplasmid co-transfiziert.

Im Vergleich zur Transfektion von unspezifischer siRNA wurde 24 h nach der Transfektion von *Ptch*-spezifischer siRNA (*mPtch\_Exon22 si* oder *mPtch\_Exon2 si*, Tabelle 14) eine nahezu 80 %ige Reduktion der *Ptch* Transkripte induziert. 48 h nach erfolgter Transfektion verringerte sich die *Ptch* mRNA Degradation und 72 h nach der Transfektion konnte kein Unterschied mehr zur Kontrolle (transfiziert mit unspezifischer siRNA) festgestellt werden (Abbildung 6).



**Abbildung 6: siRNA-vermittelte Degradation von *Ptch* Transkripten.** NIH/3T3 Zellen wurden mit dem Expressionsvektor *pCR3.1 mPtch(K)wt* und siRNA co-transfiziert. Es wurden zwei *Ptch*-spezifische siRNA verwendet. Das RNA-Oligonukleotid *mPtch\_Exon22 si* ( $\alpha$  *Ptch* siRNA 22) bindet an die Sequenz des Exone 22; *mPtch\_Exon2 si* ( $\alpha$  *Ptch* siRNA 22) bindet an die Sequenz von Exon 2 des *Ptch* Transkriptes (Tabelle 14). Als Kontrolle wurde unspezifische siRNA (us siRNA) transfiziert. 24, 48 und 72 h nach der Transfektion wurden die *Ptch* Transkripte anhand eines *Ptch*-spezifischen quantitativen *real time* Assay gemessen und auf die Expression von *18S* rRNA normalisiert. Die siRNA-vermittelte verminderte *Ptch* Expression wurde prozentual im Verhältnis zur *Ptch* Expression von mit unspezifischer siRNA transfizierten Kontrolle dargestellt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten aus 3 unabhängigen in Tripletten vermessenen Experimenten.

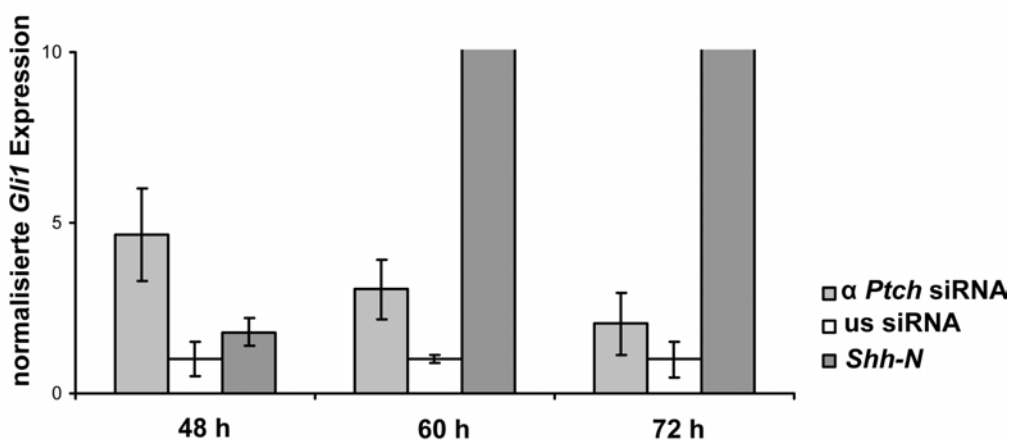
Nach diesem Vorexperiment wurde die Aktivität der Signalkaskade mittels der Zelllinie Shh light 2 (Taipale J *et al.*, 2000b) analysiert. Diese Zellen exprimieren konstitutiv die Renilla Luziferase (zur Normalisierung der Daten) sowie das Expressionsplasmid *pGL 9xGli-BS*, welches das *Firefly Luziferasegen* unter einem mit 9 Gli1 Bindungsstellen versehenen *Tymidinkinase* Promotor exprimiert. Eine Stimulation der Shh/*Ptch* Signalkaskade, welche eine Aktivierung von Gli1 umfasst, führt in diesen Zelllinien somit zu einer erhöhten Firefly Luziferase-Aktivität.

Shh light 2 Zellen wurden sowohl mit *Ptch*-spezifischer siRNA oder unspezifischer siRNA zur Messung der endogenen Gli1 Aktivität transfiziert. Als Positivkontrolle für die Aktivierung des Signalweges wurden die Zellen mit einem *Shh*-Expressionsplasmid (*pCMV mShh-N*) (Kogerman P *et al.*, 2002) zusammen mit unspezifischer siRNA co-transfiziert. In einigen Experimenten wurden die

Positivkontrollen auch mit rekombinantem murinen Shh-N Protein stimuliert (siehe Kapitel 2.17.1.2).

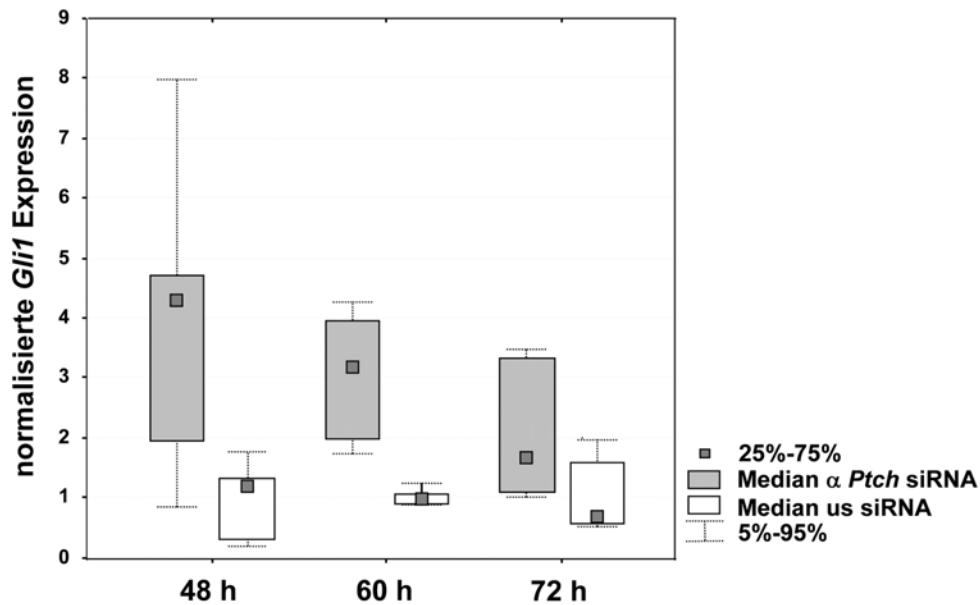
Dann wurde die zeitabhängige Degradierung der *Ptch* mRNA (24, 48, 60 und 72 h nach erfolgter Transfektion) sowie das Expressionsniveau von *Gli1* Transkripten mittels quantitativer *real time* PCR analysiert und auf die Expression der 18S rRNA normalisiert. Um die Aktivierung der Shh/*Ptch* Signalkaskade auf Proteinebene zu analysieren, wurde die Aktivität des Signalweges über Luziferase-Messung an den Zelllysaten mit dem Dualen-Luziferase-Assay bestimmt. Für beide Assays wurden jeweils 3 unabhängige Experimente durchgeführt, wobei jede Probe in Dubletten vermessen wurde.

Obwohl die Degradation von *Ptch* nach 24 h am stärksten war (siehe Abbildung 6), wurde anhand von Vorexperimenten festgestellt, dass die *Gli1*-Expression zu diesem Zeitpunkt nicht stimuliert wurde (Daten nicht gezeigt). Erst 48 bis 60 h nach Transfektion führte die siRNA-vermittelte Degradation der *Ptch* mRNA zur Induktion der *Gli1* Expression (Abbildung 7). Die Induktion war jedoch wesentlich geringer als diejenige, die durch *Shh* Expression stimuliert werden konnte. Abbildung 8 zeigt nochmals eine statistische Analyse und eine Darstellung der ermittelten Werte im Box-Whisker-Plot. 48 h nach der Transfektion mit *Ptch*-spezifischer siRNA konnte durch *Ptch* „knock-down“ eine signifikante Stimulierung der *Gli1* Transkription ( $P < 0,05$ ) erzielt werden. 60 bis 72 h nach der siRNA Transfektion nahm diese wieder ab. Das Expressionniveau von *Gli1* blieb jedoch im Vergleich zur Transfektion mit unspezifischer siRNA auch noch nach 72 h erhöht.



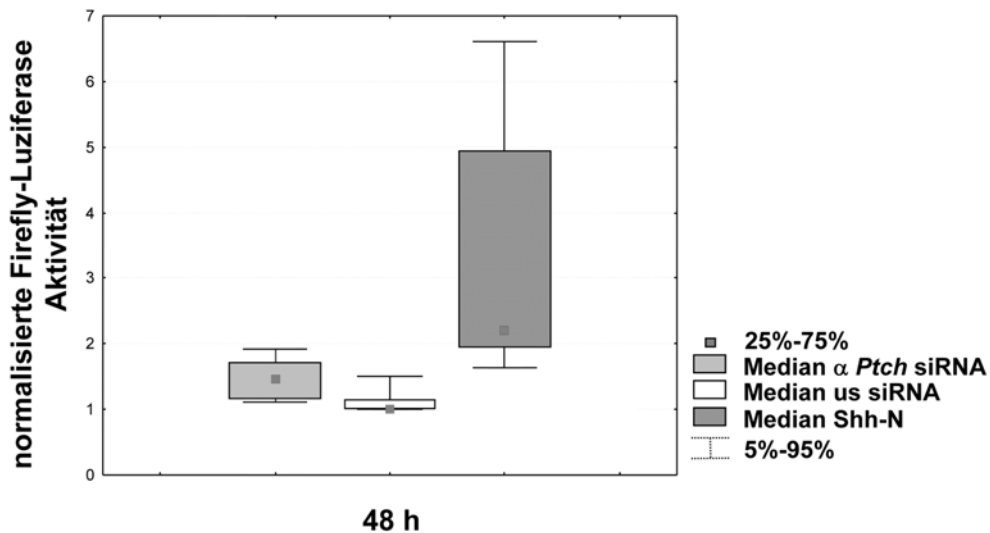
**Abbildung 7: siRNA-vermittelte Degradation von *Ptch* mRNA führt zu einer erhöhten *Gli1* Expression.** Die Zelllinie Shh light 2 wurde mit *Ptch*-spezifischer siRNA ( $\alpha$  *Ptch* siRNA), unspezifischer siRNA (us siRNA) oder *pCMV mShh-N* (*Shh-N*) transfiziert. 48, 60 bzw. 72 h nach der

Transfektion wurde cDNA aus Gesamt-RNA hergestellt. Die *Gli1* Expression wurde im quantitativen *real time* PCR-Assay bestimmt, auf die Expression der *18S* rRNA normalisiert und die Mittelwerte der Daten aus 3 unabhängigen in Dupletten vermessenen Experimenten berechnet.



**Abbildung 8: Signifikant erhöhte *Gli1* Expression durch siRNA-vermittelte Degradation von *Ptch* Transkripten.** Die Daten aus 3 unabhängigen Transfektionen von Shh light 2 mit *Ptch*-spezifischer siRNA ( $\alpha$  *Ptch* siRNA) oder unspezifischer siRNA (us siRNA) wurden im Box-Whisker-Plot dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden über den Mann-Whitney-U-Test berechnet und nach 48 und 60 h detektiert ( $P < 0,05$ ).

Anhand von Dualen-Luziferase-Messungen wurde nun die Aktivität des Signalweges analysiert. Dabei wurde deutlich, dass die siRNA-vermittelte Degradation der *Ptch* mRNA im Vergleich zur Stimulation mit Shh-N Protein nur zu einer geringen aber signifikanten Aktivierung führte (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Signifikant erhöhte Aktivität des Shh/Ptch Signalweges durch siRNA-vermittelte Degradation von *Ptch* Transkripten.** Die Daten aus 3 unabhängigen Transfektionen von Shh light 2 mit *Ptch*-spezifischer siRNA ( $\alpha$  *Ptch* siRNA) oder unspezifischer siRNA (us siRNA) wurden im Box-Whisker-Plot dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden über den Mann-Whitney-U-Test berechnet und nach 48 h detektiert ( $P < 0,05$ ). Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit unspezifischer siRNA transfiziert und mit Shh-N Protein (Shh-N) behandelt (Zugabe erfolgte 4 h nach der Transfektion). Zellen, welche nicht mit Shh-N stimuliert werden sollten, wurden mit Lösungsmittel (0,1 % BSA) behandelt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass transient transfizierte *Ptch*-spezifische siRNA zu einer Degradation von *Ptch* Transkripten führt. Daraus resultiert eine Aktivierung der *Gli1* Transkription, die frühestens 48 h nach erfolgter Transfektion deutlich wird. Die vermehrte *Gli1* Transkription führt außerdem nach 48 h zu einer Aktivierung von Gli1 Protein, und damit zur Aktivierung der Signalkaskade.

### 3.1.3 Molekulare und funktionelle Analysen zur Expression des mutanten *Ptch*<sup>neo67</sup> Allels in *Ptch*-assoziierten RMS

Die bisherigen, oben beschriebenen Daten weisen darauf hin, dass die verminderte Expression des wt Allels der Auslöser für die RMS Entstehung sein könnte. Da jedoch das mutante *Ptch*<sup>d67</sup> Allel im RMS sehr stark überexprimiert ist und das entsprechende Protein möglicherweise einen dominant-negativen Einfluss auf das wt *Ptch* Protein ausüben könnte, wurde die Funktion des *Ptch*<sup>d67</sup> Proteins untersucht.

Hier ist anzumerken, dass eine für das Gorlin-Goltz-Syndrom verantwortliche *PTCH* Mutation (G509V) in *D. melanogaster* aufgrund eines dominant-negativen Mechanismus zur Aktivierung von Smo führt (Hime GR *et al.*, 2004).

Daneben gibt es noch eine weitere Möglichkeit, wie man sich die Tumorentstehung erklären könnte. So wurde von Kogerman *et al.* postuliert, dass die alternativen ersten Exone des wt *PTCH* Gens (Exon1, Exon 1a, Exon1b) in normalen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden. *PTCH* Transkripte, welche das alternative Exon 1b exprimieren, sind dabei in humanen nodulären Basaliomen sehr stark überrepräsentiert. Obwohl *in vitro* alle 3 beschriebenen Transkripte zur Interaktion mit SMO befähigt sind, wurde gezeigt, dass nur Exon 1b zur vollständigen Inaktivierung des Shh/Ptch Signalweges in der Lage ist. Daraus wurde geschlossen, dass in *PTCH*-assoziierten Tumoren der *PTCH* 1b Promotor stark aktiviert wird, was zur Überexpression von *PTCH* 1b-haltigen Transkripten in den Basaliomen führt. Da diese Transkripte/Proteine jedoch in Basaliomen mutiert sein müssen (biallelischer Ausfall von *PTCH* in den meisten Basaliomen), können sie den Signalweg nicht mehr hemmen. Hierdurch kommt es dann zu einer „Runaway“ Aktivierung der Kaskade (Kogerman P *et al.*, 2002).

Aufgrund dieser Tatsachen und Hypothesen wurde die Zusammensetzung und die Expression der *Ptch* Transkripte und Proteine in RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen untersucht. Zusätzlich wurde die Funktion der hauptsächlich exprimierten *Ptch* Proteine bestimmt.

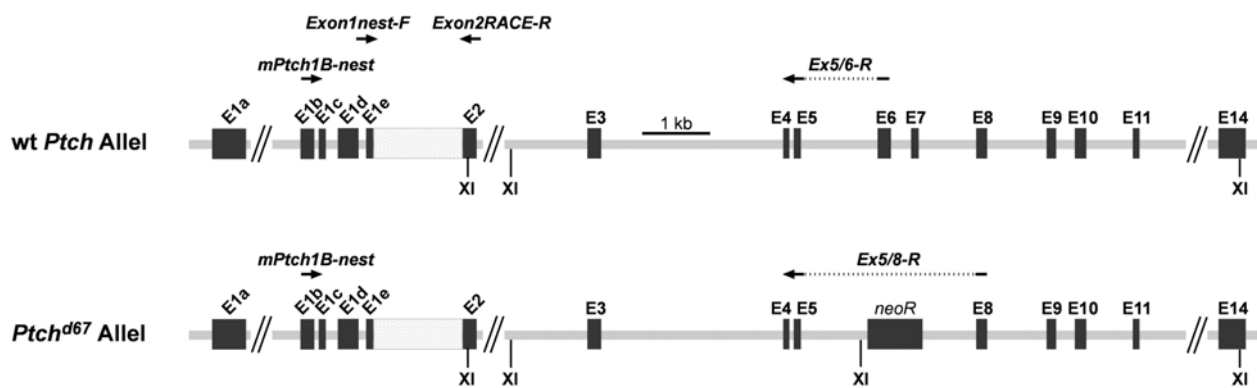
### **3.1.3.1 Exon 1a, 1b und 1c *Ptch* Spleissvarianten sind in murinen RMS überexprimiert**

Humane *PTCH* Transkripte können neben den alternativen ersten Exone 1a, 1b, 1c und 1d ein weiteres alternatives Exon, das Exon 1e, enthalten (Abbildung 10).

Die genomische Region des murinen *Ptch* Gens umfasst ebenfalls 5 alternative erste Exone (Kogerman P *et al.*, 2002; Nagao K *et al.*, 2005a; Nagao K *et al.*, 2005b) (siehe Abbildung 10). Wie die Arbeiten von Z. Arziman (Universität Göttingen, Institut für Humangenetik, Praktikantin) gezeigt haben, werden die alternativen Exone 1a, 1b und 1c im RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tieren im Vergleich zum Skelettmuskel stark exprimiert. Das Exon 1d weist dagegen ein etwa gleiches Expressionsniveau in Tumor und Skelettmuskel auf (Uhmann A *et al.*, 2005). Dasselbe trifft für das

Aquivalent des humanen Exon 1e zu. Jedoch wurde bei RT-PCR-Analysen mit in homologen Regionen bindenden DNA-Oligonukleotiden beobachtet, dass die Größe des murinen Exon 1e Amplifikats sich wesentlich vom humanen Homolog unterscheidet.

Diese Daten zeigten zunächst, dass nicht nur das Exon 1b im Tumor überexprimiert wird, sondern auch Exon 1a und 1c. Daher lässt sich die Hypothese von Kogermann *et al.* über eine vermehrte Aktivierung eines Exon 1b Promotors in Tumoren zunächst nicht mehr aufrechterhalten.



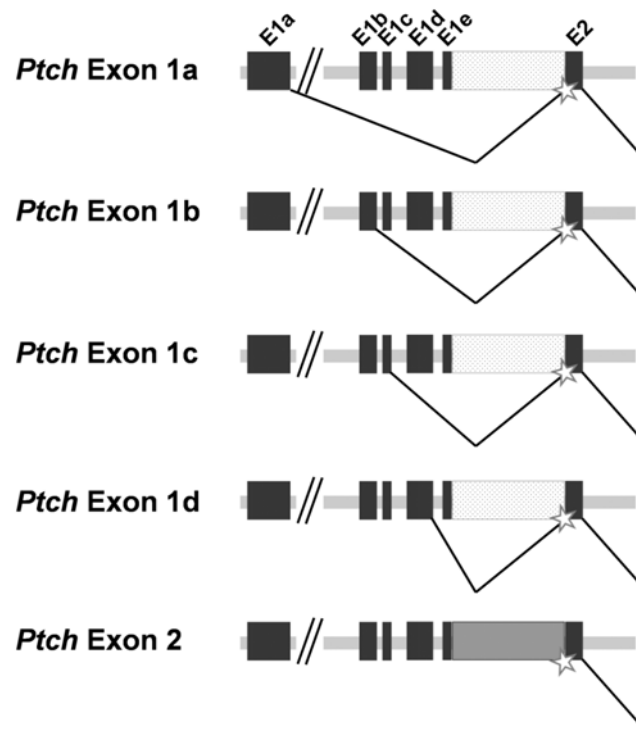
**Abbildung 10: Schematische Darstellung des wt *Ptch* Allels und des mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Allels.** Dargestellt sind die Exon- und Intronengrenzen vom alternativen Exon 1a bis Exon 14 (E1a bis E14) des wt *Ptch* Allels (wt *Ptch* Allel) und des mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Allels. Das *Ptch*<sup>d67</sup> Allel enthält anstelle von Exon 6 und 7 eine Neomycin-Resistenzkassette (*neoR*). Die Rückwärts-Oligonukleotide *Ex6/7-R* und *Ex5/8-R* wurden zusammen mit dem Vorwärts-Oligonukleotid *mPtch1B-nest* für die PCR-Analyse der Exon 1b-enthaltenden wt *Ptch* und *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripte aus RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tieren verwendet (Tabelle 11, siehe Kapitel 3.1.3.3). Das Oligonukleotidpaar *Exon1nest-F/Exon2RACE-R* wurde für die Analyse des alternativen *Ptch* Exons 1e verwendet (Tabelle 12).

### 3.1.3.2 Das murine Homolog von Exon 1e ist Teil des murinen Exon 2

Aufgrund der RT-PCR Analysen von Z. Arziman wurde vermutet, dass das murine *Ptch* Exon 1e eine andere Struktur als das humane Äquivalent besitzt (Kogerman P *et al.*, 2002; Nagao K *et al.*, 2005a; Nagao K *et al.*, 2005b; Uhmman A *et al.*, 2005). Zur Verifizierung dieser Vermutung wurde eine RACE-Analyse (rapid amplification of cDNA ends) an PolyA<sup>+</sup> RNA aus murinem wt Lebergewebe durchgeführt.

Für das RACE-Experiment wurde ein für das *Ptch* Exon 2 spezifischer Rückwärts-DNA-Oligonukleotid eingesetzt (*Exon2Race-R*; Abbildung 10). Danach wurden 25 ng des Amplifikats als Matrize für eine PCR-Analyse mit dem DNA-Oligonukleotidpaar

*Exon1nest-F/Exon2Race-R* verwendet (Abbildung 10). Die beiden amplifizierten Fragmente (1300 bp, 650 bp) wurden in den Vektor *pGEM-Teasy* kloniert und jeweils 10 Klone sequenziert. Alle analysierten Klone entsprachen der murinen genomischen Region zwischen dem postulierten Exon 1e und Exon 2. Daraus kann geschlossen werden, dass kein gesondert-gespleisstes murines Exon 1e existiert, sondern dass die Sequenz des Exons 1e ein Teil des alternativen *Ptch* Exon 2 Transkripts ist. Eine Zusammenfassung der murinen *Ptch* Transkripte wird in Abbildung 11 gezeigt.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der alternativen ersten Exone des *Ptch* Gens.** Dargestellt sind die ersten alternativen Exone 1a, 1b, 1c, 1d und 2 (E1a bis E2). Der Stern markiert die Akzeptorspleissstelle für die Exone 1a bis 1d. Die Analyse der Struktur des humanen Äquivalents von Exon 1e ergab, dass die Sequenz des murinen Exon 1e ein Teil des alternativen *Ptch* Exon 2 Transkripts ist (graue Box, unten). Im Gegensatz zum humanen Exon 1e wird es nicht in Exon 2 gespleisst.

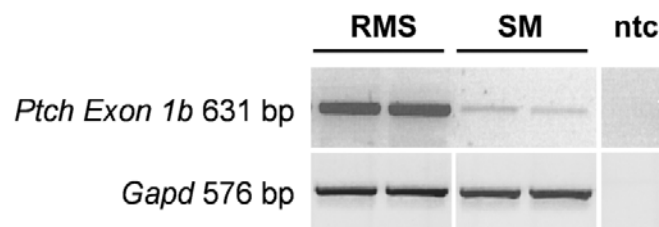
### 3.1.3.3 Überexpression von Exon 1b *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripten in RMS

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob Exon 1b im RMS tatsächlich – wie von Kogermann *et al.* vermutet - vermehrt in das mutierte *Ptch* Transkript gespleisst wird. Hierzu wurde eine Transkript-spezifische PCR-Analyse durchgeführt.



Dabei erfolgte zunächst die Amplifikation der *Ptch* cDNA mit einem spezifischen Exon 1b Vorwärts-DNA-Oligonukleotid (*mPtch1b-nest*) und zwei Rückwärts-DNA-Oligonukleotiden, wovon eines spezifisch für das mutante *Ptch*<sup>d67</sup> (bindet am Übergang von Exon 5 zu Exon 8, *Ex5/8-R*) und eines spezifisch für das wt Transkript (bindet am Übergang von Exon 5 zu Exon 6, *Ex5/6-R*) war (Abbildung 10). Die DNA-Oligonukleotide wurden so ausgewählt, dass sich die zu amplifizierenden Fragmente in ihren Basenpaarlängen exakt entsprachen (631 bp). Eine gleich starke Amplifikationseffizienz der eingesetzten Rückwärts-Oligonukleotide wurde durch eine PCR an cDNA überprüft, wobei die Rückwärts-DNA-Oligonukleotide getrennt verwendet worden sind (Daten nicht gezeigt).

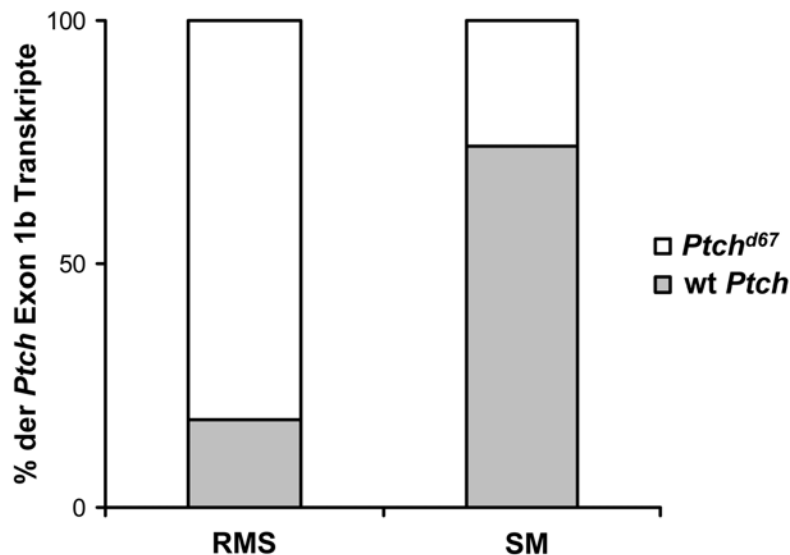
Der PCR-Assay mit den drei Primern wurde sowohl an cDNA von RMS als auch von Skelettmuskel desselben *Ptch*<sup>d67/+</sup> Tieres in doppeltem Ansatz durchgeführt (Abbildung 12). Das Gemisch aus Transkriptamplifikaten wurde in den Vektor *pGEM-Teasy* kloniert und 90 Klone sequenziert. Die wt *Ptch* Amplifikate wurden von den *Ptch*<sup>d67</sup> Amplifikaten aufgrund der Sequenzen des Exons 6 (*Ptch*) und des Exons 8 (*Ptch*<sup>d67</sup>) unterschieden.



**Abbildung 12: PCR-Assay zur gleichzeitigen Amplifikation von Exon 1b wt *Ptch* und *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripten.** Als Matrize diente cDNA aus RMS und Skelettmuskel (SM) eines *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tiers. Die *Ptch* Exon 1b Transkripte wurden mit dem Vorwärts-DNA-Oligonukleotid *mPtch1b-nest* und den Rückwärts-DNA-Oligonukleotiden *Ex5/6-R* und *Ex5/8-R* amplifiziert (Tabelle 11, siehe Abbildung 12). Als Kontrolle der eingesetzten Matrizen-cDNA wurden murine *Gapd* (*Glycerinaldehyd-3-phosphatase-dehydrogenase*) Transkripte amplifiziert. Abkürzungen: ntc, no template control.

Abbildung 13 zeigt, dass 82 % der im Tumorgewebe exprimierten Exon 1b-enthaltenen *Ptch* Transkripte vom mutierten *Ptch*<sup>d67</sup> Locus stammen. Im Skelettmuskel sind dagegen 72 % der Exon 1b-exprimierenden Transkripte wt *Ptch* Transkripte. Dies zeigt, dass die erhöhte Expression von Exon 1b im RMS auf eine im Vergleich zum Skelettmuskel erhöhte Expression des mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Allels zurückzuführen ist. Dies bedeutet, dass als Mechanismus der verstärkten

Signalwegsaktivierung in *Ptch*-assoziierten Tumoren die Überexpression eines nicht-funktionellen *Ptch*<sup>d67</sup> Proteins (hier des Exons 1b Transkripts; siehe Kapitel 3.1.2) als auch die verminderte Expression des wt *Ptch* Allels (siehe Kapitel 3.1.2) diskutiert werden darf.



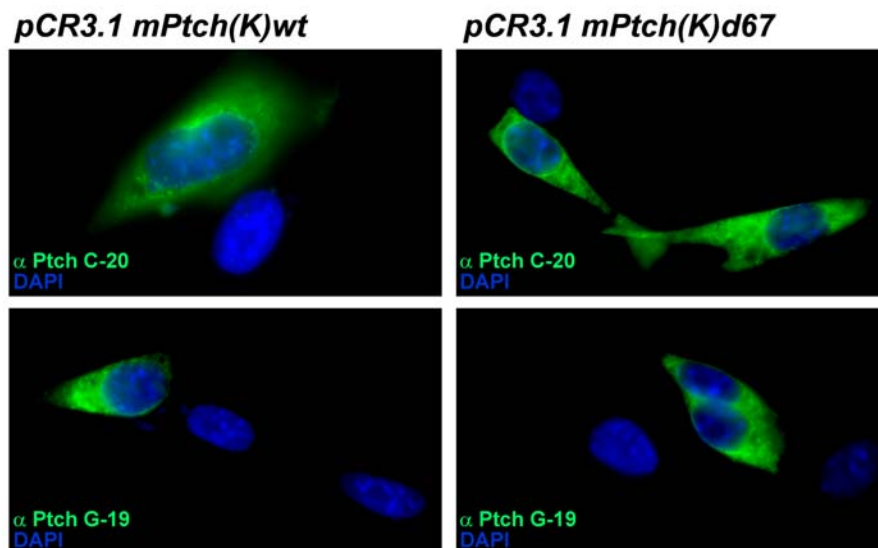
**Abbildung 13:** In RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tieren werden *Ptch* Exon 1b Transkripte vom *Ptch*<sup>d67</sup> Allel überexprimiert. Das Gemisch aus *Ptch* Transkriptamplifikaten (*mPtch1b-nest/Ex5/6-R/Ex5/8-R*) von RMS bzw. Skelettmuskel (SM) wurde in den Vektor *pGEM-Teasy* kloniert, 90 Klone sequenziert und die jeweiligen prozentualen Anteile der wt *Ptch* oder *Ptch*<sup>d67</sup> Amplifikate bestimmt.

#### 3.1.3.4 Das *Ptch*<sup>d67</sup> Transkript wird zu einem *Ptch*<sup>d67</sup> Protein translatiert

Exon 1b *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripte sind im RMS stark überrepräsentiert. Da in diesem Transkript Exon 5 ohne Leserasterverschiebung in das Exon 8 gespleisst wird, sollte bei der Translation ein aberantes *Ptch*<sup>d67</sup> Protein synthetisiert werden. Das errechnete Molekulargewicht des mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Proteins entspricht 147 kDa, da es im Vergleich zum wt Protein (159 kDa) um 147 Aminosäuren verkürzt ist. Die fehlende Proteinregion umfasst Teile der SSD des *Ptch* Proteins, was zu einem vollständigen Funktionsverlust von *Ptch*<sup>d67</sup> führt (siehe Abbildung 3, Abbildung 10) (Hahn H *et al.*, 1998).

### 3.1.3.4.1 Immunfluoreszenz-Nachweis von Ptch<sup>d67</sup> in transient transfizierten NIH/3T3 Zellen

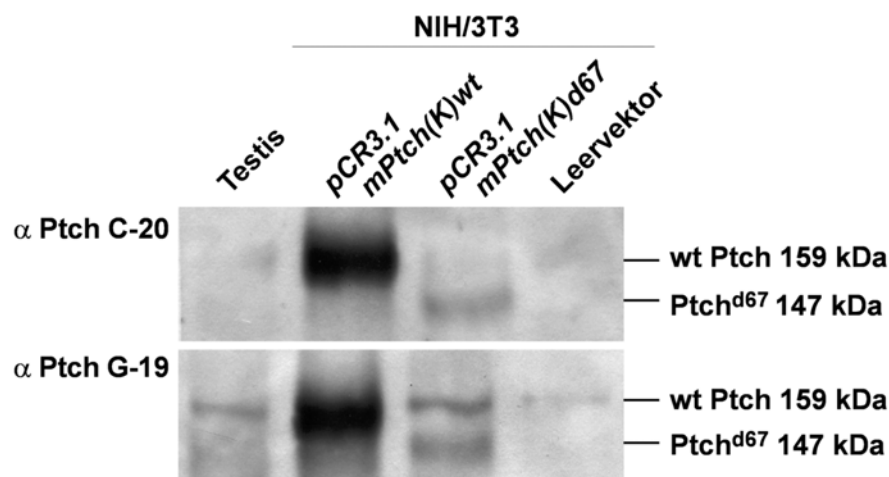
Zum immunchemischen Nachweis des mutanten Ptch<sup>d67</sup> Proteins wurden Expressionsplasmide zur Expression des mutanten Ptch<sup>d67</sup> Proteins (*pCR3.1 mPtch(K)d67*) und des wt Ptch Proteins (*pCR3.1 mPtch(K)wt*) in die murine Fibroblastenzelllinie NIH/3T3 transfiziert. Es wurden 2 anti-Ptch Antikörper verwendet, welche sich durch ihre Antigen-Epitop-Spezifität unterscheiden. Anti-Ptch G-19 bindet an ein Epitop im Exon 1B und anti-Ptch C-20 an eine C-terminale Region des Ptch Proteins, so dass sowohl das wt Ptch Protein als auch der unveränderte N- bzw. C-Terminus des mutanten Ptch<sup>d67</sup> Proteins nachgewiesen werden konnte. In Immunfluoreszenz-Analysen der transfizierten Zellen wurde sowohl das mutante als auch das wt Protein mit beiden Antikörpern detektiert (Abbildung 14). Wie bereits bei Deneff *et al.* für die subzelluläre Lokalisation von wt Ptch beschrieben worden ist (Deneff N *et al.*, 2000; Incardona JP *et al.*, 2000), zeigten beide Proteine eine vergleichbare zytoplasmatische (vesikuläre) bzw. membranständige Lokalisation auf. Eine endogene Ptch Expression in untransfizierten NIH/3T3 Zellen wurde nicht nachgewiesen.



**Abbildung 14: Immunfluoreszenz-Nachweis von wt Ptch und Ptch<sup>d67</sup> Protein.** NIH/3T3 Zellen wurden transient mit dem Plasmid *pCR3.1 mPtch(K)wt* oder *pCR3.1 mPtch(K)d67* transfiziert, fixiert, mit anti-Ptch Antikörpern gefärbt und mit einem DAPI-enthaltenden Montagemedium eingedeckt. Die beiden verwendeten Antikörper unterscheiden sich durch ihre Antigen-Epitop-Spezifität. Anti-Ptch G-19 (unten) bindet an ein Epitop im Exon 1B und anti-Ptch C-20 (oben) an eine C-terminale Region des Ptch Proteins. In Blau ist die DAPI-Kernfärbung und in Grün die Ptch-spezifische Färbung dargestellt.

### 3.1.3.4.2 Nachweis von Ptch<sup>d67</sup> im Western Blot

Zum Vergleich der molekularen Größe beider Ptch Proteine wurden Proteinextrakte aus transfizierten NIH/3T3 Zellen und aus murinem Testisgewebe (Positivkontrolle) im Western Blot analysiert. Abbildung 15 zeigt, dass mit den verwendeten anti-Ptch Antikörpern (G-19, C-20) Proteinbanden detektiert wurden, welche aufgrund ihrer Laufgeschwindigkeit den errechneten Molekulargewichten der Ptch Proteine (Ptch 159kDa, Ptch<sup>d67</sup> 147 kDa) entsprechen. Mit beiden Antikörpern wurden sowohl endogenes Ptch Protein im Testisextrakt (Testis) und das wt Ptch Protein in *pCR3.1 mPtch(K)wt* transfizierten Zellen als auch das mutante Protein in *pCR3.1 mPtch(K)d67* transfizierten Zellen nachgewiesen. Der anti-Ptch G-19 Antikörper zeigte dabei eine höhere Spezifität für das endogen von NIH/3T3 Zellen exprimierte Ptch Protein als der anti-Ptch C-20 Antikörper.



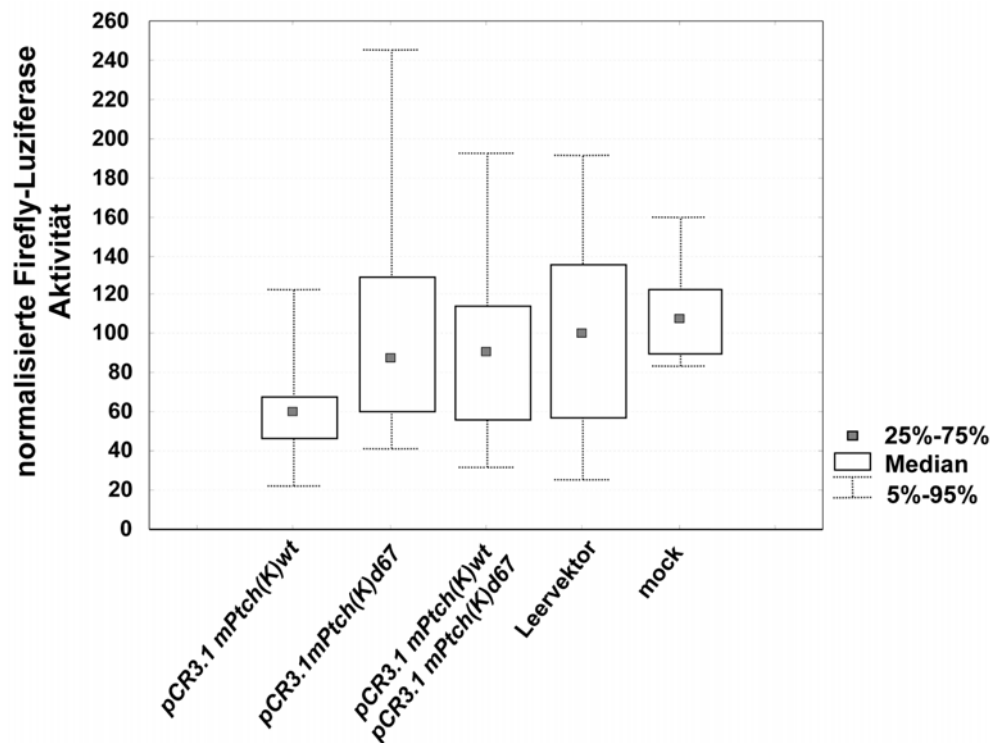
**Abbildung 15: Western Blot Nachweis von wt Ptch und Ptch<sup>d67</sup> Protein.** NIH/3T3 Zellen wurden transient mit dem Plasmid *pCR3.1 mPtch(K)wt*, *pCR3.1 mPtch(K)d67* oder mit dem *pCR3.1* Leervektor (Leervektor) transfiziert. Die Proteinextrakte der Zellen wurde zusammen mit einem Proteinextrakt aus murinem Testisgewebe (Testis) im Western Blot mit den Antikörpern anti-Ptch C-20 (oben) und anti-Ptch G-19 (unten) analysiert. Die Proteinbanden entsprechen den errechneten Molekulargewichten der Ptch Proteine (Ptch 159 kDa, Ptch<sup>d67</sup> 147 kDa).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalysen, dass das mutante *Ptch<sup>d67</sup>* Transkript *in vitro* translatiert wird. Die Größe des Ptch<sup>d67</sup> Proteins entspricht dem errechneten Molekulargewicht. Vergleichbar dem wt Protein ist das mutante Protein zytoplasmatisch (vesikulär) sowie membranständig lokalisiert (Denef N *et al.*, 2000; Incardona JP *et al.*, 2000).

### 3.1.3.5 Ptch<sup>d67</sup> Protein hat einen hemmenden Einfluss auf das Ptch wt Protein

Um den Effekt des mutanten Ptch<sup>d67</sup> Proteins auf den Hh/Ptch Signalweg zu untersuchen, wurden NIH/3T3 Zellen mit einem der beiden *Ptch* Expressionsplasmide, dem *pGL 9xGli-BS* Reporterplasmid und *pRL-CMV* (Normalisierungsplasmid zur konstitutiven Expression der Renilla Luziferase) co-transfiziert. Das verwendete Reporterplasmid *pGL 9xGli-BS* enthält das *Firefly Luziferasegen* unter der Kontrolle eines *Thymidinkinase* Promotors. Durch 9 distal vom Promotor integrierte Gli-Bindestellen wird das *Firefly Luziferasegen* in Anwesenheit von Gli1 exprimiert (Beer C *et al.*, 2003). Die im Dualen-Luziferase-Assay gemessene Aktivität der Firefly Luziferase wurde auf die Renilla Luziferase-Aktivität normalisiert. Als Kontrolle des aktiven Signalweges wurde der *pCR3.1* Leervektor zusammen mit *pRL-CMV* und *pGL 9xGli-BS* co-transfiziert. Es wurden jeweils 6 unabhängige Experimente durchgeführt, wobei jede Probe in Triplikaten vermessen wurde.

Die Expression des wt Ptch Proteins führte im Vergleich zur Leervektor-transfizierten Kontrolle zu einer Hemmung der Expression des Reportergens (Abbildung 16;  $P < 0,05$ ). Durch eine Expression des mutanten Ptch<sup>d67</sup> Proteins wurde dagegen kein Aktivitätsverlust des Signalweges nachgewiesen.



**Abbildung 16: Funktionsverlust von Ptch<sup>d67</sup>.** NIH/3T3 Zellen wurden transient mit den *Ptch* Expressionsplasmiden *pCR3.1 mPtch(K)wt*, *pCR3.1 mPtch(K)d67*, *pCR3.1* Leervektor oder ohne Expressionsplasmid (mock) mit *pRL-CMV* und *pGL 9xGli-BS* co-transfiziert. Die Proteinextrakte wurden im Dualen-Luziferase-Assay analysiert und die Werte der Firefly-Luziferase-Aktivität auf die Werte der Renilla-Luziferase-Aktivität normalisiert. Die Daten repräsentieren 6 unabhängige in Triplikaten vermessene Experimente. Die Ergebnisse sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. Die Signifikanz ( $P < 0,05$ ) wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test getestet.

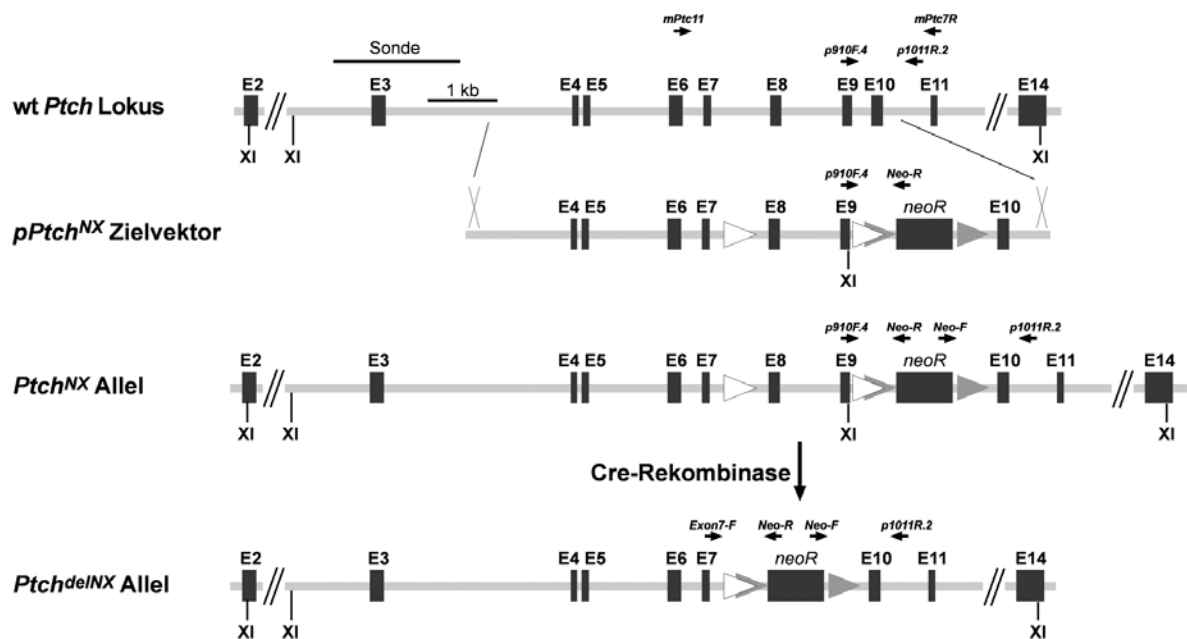
Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion der Exone 6 und 7 zu einem Funktionsverlust des Ptch<sup>d67</sup> Proteins führt. So ist Ptch<sup>d67</sup> im Gegensatz zu wt Ptch Protein nicht in der Lage den Shh/Ptch Signalweg zu inaktivieren. Weiterhin führte die simultane Expression von wt und mutantem Protein zu keinem Aktivitätsverlust des Signalweges. Dies weist darauf hin, dass das wt Protein in seiner Aktivität als Signalwegsrepressor effizient durch das mutante Protein inhibiert wird, möglicherweise über einen dominant-negativen Mechanismus.

### 3.2 Analyse der konditionellen *Ptch* knock-out Mäuse

Spontane *Ptch*-inaktivierende Mutationen führen zu einer abnormalen Aktivierung des Shh/*Ptch* Signalweges. Heterozygot vererbte *Ptch* Mutationen resultieren in Entwicklungsdefekten und Tumoren (Goodrich LV *et al.*, 1997; Hahn H *et al.*, 1998). Da der homozygote Verlust von *Ptch* embryonal letal ist, beschränkten sich Analysen des Shh/*Ptch* Signalweges in adultem Gewebe mit einer homozygoten *Ptch* Mutation bisher auf *in vitro* Studien. Um untersuchen zu können, wie sich der biallelische Verlust von *Ptch* in adulten Mäusen auswirkt, ob ein biallelischer Verlust von *Ptch* zur schnelleren Tumorigenese beiträgt und um die Funktion von *Ptch* Gewebe-spezifisch und altersabhängig untersuchen zu können, wurde eine konditionelle *Ptch* Nullmutation unter Verwendung des Cre-*loxP* Systems in der Maus etabliert (Uhmann A *et al.*, 2006 eingereicht).

Abbildung 17 zeigt das wt *Ptch* Allel, den Zielvektor (*pPtch*<sup>NX</sup>) sowie das *Ptch*<sup>NX</sup> Allel, welches durch homologe Rekombination des Zielvektors in den genomischen *Ptch* Locus generiert wurde. Im *Ptch*<sup>NX</sup> Locus befinden sich in Intron 7 und in Intron 9 *loxP*-Sequenzen. Durch eine Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination können so die Exone 8 und 9 im *Ptch*<sup>NX</sup> Allel deletiert werden. Die Deletion der Exone induziert eine Leserasterverschiebung des Transkripts, welche zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führt. Das postulierte *Ptch*<sup>delNX</sup> Protein ist 341 Aminosäuren lang und gegenüber dem wt *Ptch* Protein um 1093 Aminosäuren verkürzt. Der C-Terminus des *Ptch*<sup>delNX</sup> Proteins umfasst dabei 5 zusätzliche im wt Protein nicht vorhandene Aminosäuren.

Der *Ptch*<sup>NX</sup> Locus enthält weiterhin eine von *frt*-Sequenzen flankierte *Neomycin*-Resistenzkassette in Intron 9. Diese Kassette kann durch die Expression einer FLPase deletiert werden (Rodriguez CI *et al.*, 2000), falls sie die korrekte Transkription des *Ptch*<sup>NX</sup> Allels stören sollte. Der Zielvektor *pPtch*<sup>NX</sup> wurde in unserem Labor von Dr. M. Koleva generiert.



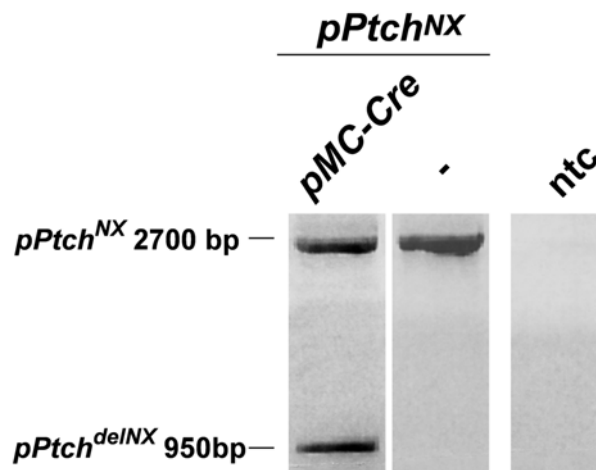
**Abbildung 17: Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung einer konditionellen *Ptch* Deletion.** Dargestellt sind die Exon- und Intronengen von Exon 2 bis Exon 14 (E2 bis E14) des wt *Ptch* Allels, des *Ptch<sup>NX</sup>* Allels und des *Ptch<sup>delNX</sup>* Allels. Durch homologe Rekombination wurde die Sequenz des Zielvektors *pPtch<sup>NX</sup>* gegen die entsprechende wt *Ptch* Sequenz ausgetauscht, so dass in den Introns 7 und 9 jeweils eine *loxP*-Sequenz und im Intron 9 eine *frt*-Sequenz-flankierte Neomycin-Resistenzkassette (*neoR*) eingefügt wurde (*Ptch<sup>NX</sup>* Allel). Durch Cre-vermittelte Rekombination der *loxP*-Sequenzen wird eine Deletion der Exone 8 und 9 induziert (*Ptch<sup>delNX</sup>* Allel). Zur Genotypisierung des *Ptch<sup>NX</sup>* Allels wurden sowohl das DNA-Oligonukleotidpaar *p910F.4/Neo-R* als auch das DNA-Oligonukleotidpaar *Neo-F/p1011R.2* verwendet, wobei das DNA-Oligonukleotid *p1011R.2* außerhalb des integrierten Zielvektors bindet. Das wt *Ptch* Allel wurde mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *p910F.4/p1011R.2* und das *Ptch<sup>delNX</sup>* Allel mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *Exon7-F/Neo-R* detektiert. Das DNA-Oligonukleotidpaar *mPtc11/mPtc7R* wurde für RT-PCR-Analysen der *Ptch* Transkripte eingesetzt. Die Lokalisation der für Southern Blot Analysen verwendeten Sonde ist ebenfalls dargestellt. Sie bindet außerhalb des integrierten Zielvektors. Abkürzungen: XI, *Xho*I.

### 3.2.1 Cre-vermittelte Rekombination des *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektors *in vitro*

Vor der Elektroporation des *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektors in embryonale Stammzellen (ES-Zellen, siehe Kapitel 3.2.2) wurde der Vektor zusammen mit einem Plasmid zur Expression einer konstitutiv aktiven Cre-Rekombinase (*pMC-Cre*) in die Zelllinie C2C12 wie unter 3.3.1.1.3 beschrieben transfiziert. Zur Kontrolle wurden Zellen lediglich mit dem *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektor transfiziert. 48 h nach erfolgter Transfektion wurde die Gesamt-DNA der Zellen isoliert und die Rekombination von *pPtch<sup>NX</sup>* mittels PCR analysiert. Hierzu wurde das DNA-Oligonukleotidpaar *Exon7-F/Neo-R* (Abbildung 17) verwendet. Abbildung 18 zeigt, dass durch die Co-Transfektion mit



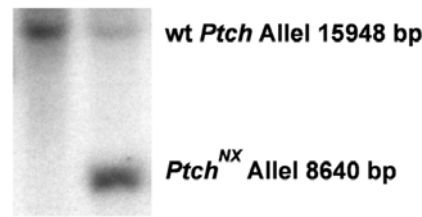
*pMC-Cre* die Exone 8 und 9 des *pPtch<sup>NX</sup>* Vektors deletiert wurden (*pPtch<sup>delNX</sup>* 950 bp). Bei der Kontrolltransfektion ohne *pMC-Cre* wurde kein *pPtch<sup>delNX</sup>*-spezifisches Amplifikat, sondern nur das *pPtch<sup>NX</sup>* Amplifikat (*pPtch<sup>NX</sup>* 2700 bp) detektiert.



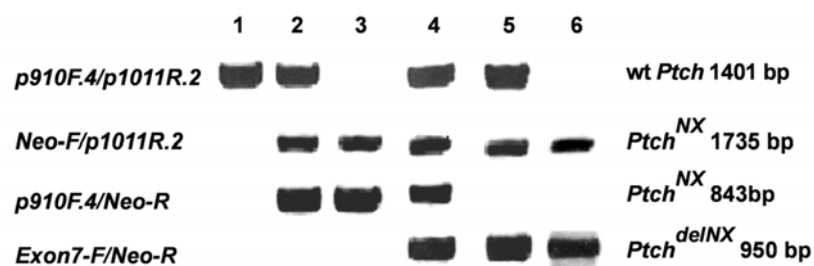
**Abbildung 18: Rekombination des *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektors durch Expression des *pMC-Cre* Plasmid.** Der *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektor wurde mit dem Plasmid *pMC-Cre* in C2C12 Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde der *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektor ohne Cre-exprimierenden Vektor transfiziert. Die Gesamt-DNA der Zellen wurde isoliert und eine PCR-Analyse mit dem Oligonukleotidpaar *Exon7-F/Neo-R* (Tabelle 7, Abbildung 17) durchgeführt. Abkürzungen: ntc, no template control.

### 3.2.2 Etablierung von homozygoten *Ptch<sup>NX/NX</sup>* Mäusen

Die Elektroporation des *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektors in RI ES-Zellen wurde von Dr. I. Adham (Universität Göttingen, Institut für Humangenetik) durchgeführt. Es wurden 3 Klone mittels PCR und Southern Blot Analyse identifiziert, bei denen die homologe Rekombination am *Ptch* Locus stattgefunden hatte. Zellen dieser positiven Klone wurden in Blastozysten von C57BL/6N Mäusen injiziert und in 129Sv Ziehmütter transferiert. Die chimären Nachkommen (gemischer genetischer Hintergrund, C57BL/6N x 129Sv) wurden mit C57BL/6N Weibchen verpaart. Heterozygote Nachkommen (*Ptch<sup>NX/+</sup>*) der F1 Generation der chimären Mäuse besaßen nach erfolgter Keimbahntransmission des *Ptch<sup>NX</sup>* Allels die Fellfarbe „agouti“. Zur Überprüfung des Genotyps wurden die Tiere mittels Southern Blot (Abbildung 19) und PCR-Analysen (Abbildung 20) genotypisiert. Die Anlagerungsposition der Southern Blot Sonde und die DNA-Oligonukleotidpaare zur Genotypisierung sind der Abbildung 17 zu entnehmen. Die Homozygote Mauslinie *Ptch<sup>NX/NX</sup>* wurde durch Geschwisterverpaarung von *Ptch<sup>NX/+</sup>* Tieren etabliert.



**Abbildung 19: Southern Blot Analyse von  $Ptch^{+/+}$  und  $Ptch^{NX/+}$  Tieren.** Genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurde mit *Xho*I restriktionshydrolysiert und im Southern Blot mit der in Abbildung 17 angegebenen Sonde hybridisiert. In der linken Spalte wurde genomische DNA aus einem  $Ptch^{+/+}$  und in der rechten Spalte aus einem  $Ptch^{NX/+}$  Tier aufgetragen.



**Abbildung 20: PCR-Analysen zur Genotypisierung der unterschiedlichen *Ptch* Allele.** Zur Genotypisierung von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien wurden das wt *Ptch* Allel mit dem Oligonukleotidpaar *p910F.4/p1011R.2*, das *Ptch*<sup>NX</sup> Allel mit den DNA-Oligonukleotidpaaren *Neo-F/p1011R.2* und *p910F.4/Neo-R* sowie das *Ptch*<sup>delNX</sup> Allel mit den DNA-Oligonukleotidpaar *Exon7-F/Neo-R* nachgewiesen (Tabelle 7). Die Anlagerungsstellen der DNA-Oligonukleotide sind Abbildung 17 zu entnehmen. Spur 1:  $Ptch^{+/+}$  DNA; Spur 2:  $Ptch^{NX/+}$  DNA; Spur 3:  $Ptch^{NX/NX}$  DNA; Spur 4:  $Ptch^{NX/+;delNX/+}$  DNA; Spur 5:  $Ptch^{delNX/+}$  DNA; Spur 6:  $Ptch^{delNX/delNX}$  DNA.

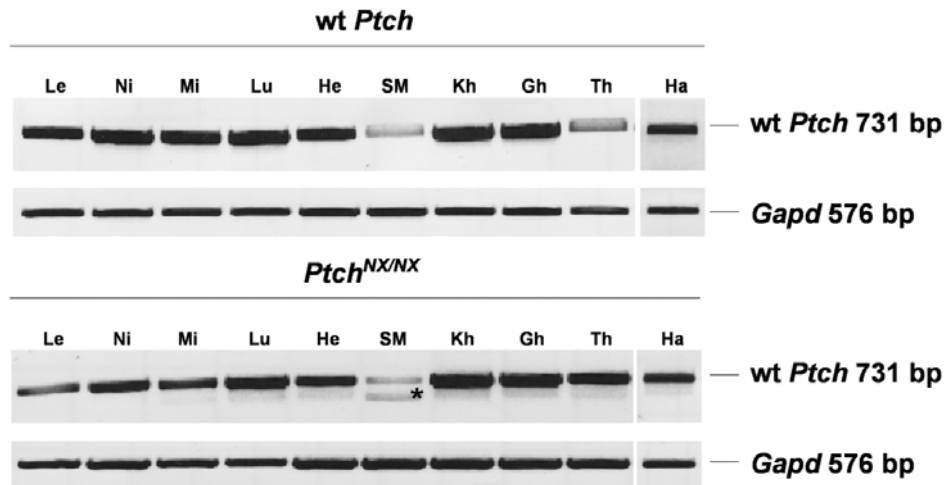
### 3.2.3 Homozygote $Ptch^{NX/NX}$ Mäuse sind phänotypisch unauffällig

Um auszuschließen, dass die *loxP*-Sequenzen in den Introns 7 und 9 sowie das *Neomycin*-Resistenzgen in Intron 9 die Funktionalität des *Ptch*<sup>NX</sup> Allels beeinträchtigen, wurden *Ptch* Transkripte aus diversen Organen von  $Ptch^{NX/NX}$  und wt Tieren des gleichen genetischen Hintergrunds untersucht. Hierzu wurden RT-PCR-Analysen mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *mPtc11/mPtc7R* (Tabelle 10, Abbildung 17) durchgeführt. Das DNA-Oligonukleotidpaar wurde so gewählt, dass sowohl das wt *Ptch* Transkript (731 bp) als auch das mutante *Ptch*<sup>delNX</sup> Transkript (451 bp) in einem PCR-Assay detektiert werden können. Als interne Matrizenkontrolle wurde die Amplifikation von *Gapd* Transkripten mitgeführt. Abbildung 21 zeigt die amplifizierten *Ptch* Transkripte von homozygoten  $Ptch^{NX/NX}$  Tieren im Vergleich zu wt Tieren. In keinem der untersuchten  $Ptch^{NX/NX}$  Organe wurden abnormale *Ptch* Spleissprodukte

festgestellt. In allen untersuchten Organen wurde das wt *Ptch* Transkript (731 bp) exprimiert. Im Skelettmuskel von *Ptch*<sup>NX/NX</sup> Tieren wurde zusätzlich eine weitere *Ptch* Spleissvariante detektiert (siehe Abbildung 21). Durch Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass diese einer normalen in wt Tieren exprimierten *Ptch* Spleissvariante entspricht (574 bp) (Nagao K *et al.*, 2005a; Nagao K *et al.*, 2005b). Hierbei handelt es sich um eine *Ptch* Isoform, welche durch das Spleissen von Exon 9 in Exon 11 zustande kommt.

Keines der heterozygoten *Ptch*<sup>NX/+</sup> (71 Tiere) oder homozygoten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> (75 Tiere) Tiere entwickelte über einen Zeitraum von 15 Monaten Tumore. Das *Ptch*<sup>NX</sup> Allel wurde im korrekten Mendel'schen Verhältnis vererbt. Alle die Tiere waren gesund, phänotypisch unauffällig und fertil.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der genetisch veränderte *Ptch*<sup>NX</sup> Locus die Transkription und das Spleissen von *Ptch* Transkripten nicht beeinflusst und keinen nachteiligen Effekt auf die Entwicklung der Tiere hat. Aus diesem Grund wurde auf die Deletion des *Neomycin*-Resistenzgenes durch Kreuzung der *Ptch*<sup>NX</sup> Tiere mit *FLPase*-exprimierenden Mäusen verzichtet.



**Abbildung 21: *Ptch*<sup>NX/NX</sup> Tiere exprimieren wt *Ptch* Transkripte.** Es wurden RT-PCR-Analysen an cDNA von Gesamt-RNA aus Organen von *Ptch*<sup>+/+</sup> (wt *Ptch*) und *Ptch*<sup>NX/NX</sup> Tieren mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *mPtc11/mPtc7R* zur Analyse der *Ptch* Transkripte durchgeführt (Tabelle 10). Die Anlagerungsstellen der DNA-Oligonukleotide am *Ptch* Locus sind Abbildung 17 zu entnehmen. Zur Kontrolle der cDNA wurden *Gapd* Transkripte amplifiziert. Die mit einem Stern markierte *Ptch* Spleiss-Variante im Skelettmuskel (SM) entspricht einem bei Nagao K *et al.* beschriebenen wt *Ptch* Transkript (Nagao K *et al.*, 2005a; Nagao K *et al.*, 2005b). Abkürzungen: Le, Leber; Ni, Niere; Mi, Milz; Lu, Lunge; He, Herz; SM, Skelettmuskel; Kh, Kleinhirn; Gh, Großhirn; Th, Thymus; Ha, Haut.

### 3.2.4 Cre-Rekombinase-vermittelte Deletion von *Ptch* in der Keimbahn

Konventionelle *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäuse entwickeln abhängig vom genetischen Hintergrund RMS und MB (Hahn H *et al.*, 2004). Homozygote mutante *Ptch*<sup>neo67/neo67</sup> Embryonen sterben aufgrund von Neuralrohr- und Herzdefekten am Tag 9,0 *dpc* bis 10,5 *dpc in utero* (Goodrich LV *et al.*, 1997; Hahn H *et al.*, 1998). Um den Phänotyp von *Ptch*<sup>delNX/+</sup> und *Ptch*<sup>delNX/delNX</sup> Tieren mit demjenigen der *Ptch*<sup>neo67</sup> Nullmutation zu vergleichen, wurden männliche *Ptch*<sup>NX/+</sup> Mäuse mit weiblichen *Tg(Ella-Cre)* Mäusen (Lakso M *et al.*, 1996) verpaart. *Tg(Ella-Cre)* Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase unter dem *Ella* Promotor, dessen höchste Aktivität sich auf die erste meiotische Teilung der Keimbahnzellen beschränkt (Lakso M *et al.*, 1996). Daher wurde in den direkten Nachkommen der oben genannten Kreuzung durch die Cre-Rekombinase eine unvollständige Rekombination am *Ptch*<sup>NX</sup> Locus erzeugt. Die Tiere entsprachen daher einem mosaikartigen Genotyp *Ptch*<sup>NX/+//delNX/+</sup> (Abbildung 20; Spur 4).

Weibliche Mäuse des Genotyps *Ptch*<sup>NX/+//delNX/+</sup> *Tg(Ella-Cre)* wurden mit männlichen wt Mäusen, welche aus der Zucht von C57BL/6N x Balb/c Mäusen stammten, verpaart. Da bekannt ist, dass rezessive Allele des C57BL/6N und dominante Allele des Balb/c Hintergrundes zu einer Prädisposition für die Entwicklung von RMS und MB führen (Hahn H *et al.*, 2004), konnte durch diese Kreuzung die Wahrscheinlichkeit der Tumorentwicklung in den Nachkommen erhöht werden. Heterozygote *Ptch*<sup>delNX/+</sup> Nachkommen mit diesem gemischten 129Sv/C57BL/6N/Balb/c genetischen Hintergrund wurden sowohl über Southern Blot Analyse (Abbildung 19) als auch durch PCR-Analysen an genomischer DNA aus Schwanzbiopsien identifiziert (Abbildung 20; Spur 5). Die Tiere wurden engmaschig auf die Entwicklung von Tumoren untersucht.

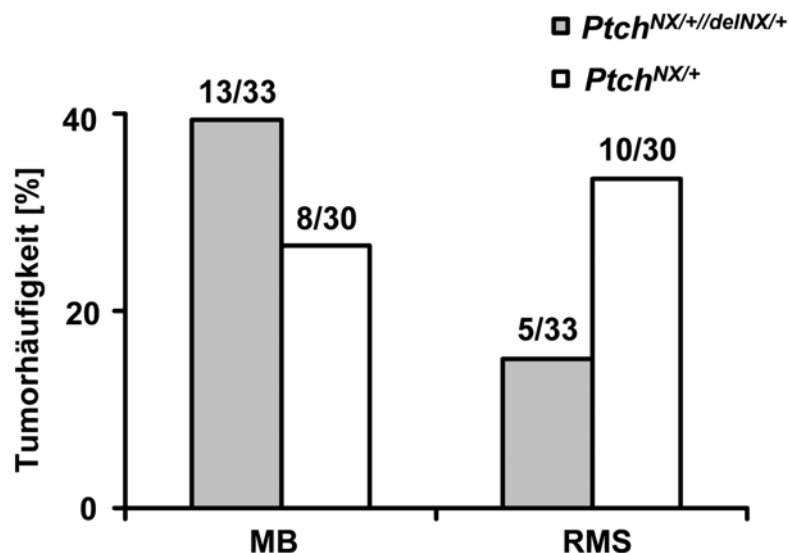
#### 3.2.4.1 Heterozygote *Ptch*<sup>delNX/+</sup> Mäuse entwickeln RMS und MB

Unter den Nachkommen der unter 3.2.4 beschriebenen Verpaarungen entwickelten sowohl *Ptch*<sup>NX/+//delNX/+</sup> Mosaiktiere als auch heterozygote *Ptch*<sup>delNX/+</sup> Tiere RMS und MB. Beide Tumortypen wurden durch Kryostatschnitte und HE-Färbungen von einem erfahrenen Pathologen (Dr. W. Schulz-Schaeffer; Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Neuropathologie) bestätigt. Die Abbildung 22 zeigt die Tumorfrequenz der untersuchten Tiere. 39 % der Mosaiktiere entwickelten RMS und 15 % MB (33 Tiere).

Heterozygote *Ptch*<sup>delNX/+</sup> Mäuse entwickelten mit einer Inzidenz von 33 % RMS und 27 % MB (30 Tiere). Die Häufigkeit der Tumorentwicklung der letzteren Kohorte ist damit vergleichbar zu der beschriebenen Tumorinzidenz von heterozygoten *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen des konventionellen knock-outs eines ähnlichen gemischten genetischen Hintergrundes (29 % für RMS und 25 % für MB) (Hahn H *et al.*, 2004). *Ptch*<sup>NX/+</sup> Kontrolltiere (22 Tiere) entwickelten über einen Zeitraum von 200 Tagen keine Tumore.

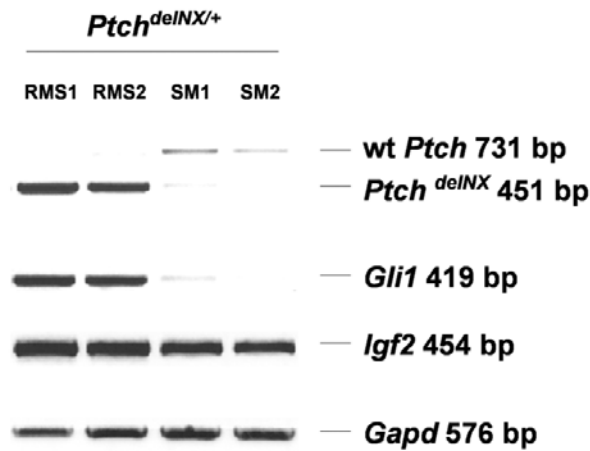
In RT-PCR-Analysen, die an cDNA von Tumor- und Referenzgeweben durchgeführt wurden, konnte in RMS im Vergleich zum untersuchten normalen Skelettmuskel eine abnormal hohe Expression von Zielgenen des Shh/Ptch Signalweges festgestellt werden (Abbildung 23). Weiterhin zeigte die RT-PCR-Analyse, dass in den untersuchten RMS das mutante *Ptch*<sup>delNX</sup> Transkript verglichen mit der Expression des wt Transkriptes in normalem Muskelgewebe deutlich überrepräsentiert war (Abbildung 23). Als interne Matrizenkontrolle wurde die Amplifikation von *Gapd* Transkripten mitgeführt.

Diese Daten zeigen, dass heterozygote *Ptch*<sup>delNX/+</sup> Mäuse wie auch *Ptch*<sup>neo67/+</sup> und *Ptch*<sup>neo12/+</sup> Mäuse zur Entwicklung von RMS und MB prädisponiert sind (Goodrich LV *et al.*, 1997; Hahn H *et al.*, 1998).



**Abbildung 22:** *Ptch*<sup>NX/+//delNX/+</sup> und *Ptch*<sup>delNX/+</sup> Tiere entwickeln RMS und MB. 33 *Ptch*<sup>NX/+//delNX/+</sup> Tiere und 30 *Ptch*<sup>delNX/+</sup> Tiere aus einer Rückkreuzung von weiblichen *Ptch*<sup>NX/+//delNX/+</sup> Tieren mit männlichen Tieren eines gemischten C57BL/6N x Balb/c genetischen Hintergrundes wurden über 200 Tage engmaschig auf die Entwicklung von RMS und MB untersucht. 13 der 33 *Ptch*<sup>NX/+//delNX/+</sup> Tiere entwickelten MB und 5 entwickelten RMS. 8 der 30 *Ptch*<sup>delNX/+</sup> Tiere entwickelten MB und 10

entwickelten RMS. Keines der 22 *Ptch*<sup>NX/+</sup> Kontrolltiere des jeweiligen genetischer Hintergrunds entwickelte Tumore.



**Abbildung 23: In RMS von von *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Tieren ist der Shh/Ptch Signalweg pathologisch aktiv.** Es wurden RT-PCR-Untersuchungen von RMS und normalem Muskelgewebe (SM) von *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Tieren mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *mPtc11/mPtc7R* (Tabelle 10) durchgeführt. Die Anlagerungsstellen der DNA-Oligonukleotide am *Ptch* Locus sind Abbildung 17 zu entnehmen. Mit den DNA-Oligonukleotidpaar *mGliF8/ mGliR9* (Tabelle 10) wurde die Expression von *Gli1* und mit *Igf2 TaqManF/Igf2 Exon6R* (Tabelle 10) die Expression von *Igf2* nachgewiesen. Zur Kontrolle der cDNA wurden *Gapd* Transkripte amplifiziert.

### 3.2.4.2 Die homozygote *Ptch*<sup>delINX/deINX</sup> Mutation ist embryonal letal

Zur Analyse des Phänotyps von homozygoten *Ptch*<sup>delINX/deINX</sup> Embryonen wurden heterozygote *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Tiere verpaart.

Die Genotypen der geborenen Nachkommen aus 6 Würfen, die aus dieser Verpaarung hervorgingen, wurden mit PCR-Analysen an genomischer DNA aus Schwanzbiopsien bestimmt.

Es wurden 12 *Ptch*<sup>+/+</sup> und 15 *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Mäuse, jedoch kein homozygoten *Ptch*<sup>delINX/deINX</sup> Tier geboren (Tabelle 19). Um den Zeitpunkt des Todes der homozygoten *Ptch*<sup>delINX/deINX</sup> Embryonen festzustellen, wurden die Weibchen aus den Geschwisterverpaarungen täglich auf erfolgte Kopulation untersucht. Vaginalplaque-positive Weibchen wurden von den Männchen getrennt, die Embryonen am Tag 9,5 *dpc* bis 10,5 *dpc* isoliert und von den umgebenden Dottersäcken getrennt. Die Embryonen wurden in 4 % Paraformaldehyd fixiert oder direkt zur Isolierung von Gesamt-RNA verwendet. Die Genotypen der isolierten Embryonen wurden über

PCR-Analysen an genomischer DNA aus den entsprechenden Dottersäcken bestimmt.

Am Tag 9,5 *dpc* bis 10,5 *dpc* konnten nur noch wenige der homozygot mutanten Embryonen isoliert werden (Tabelle 20). Die Zahl entsprach lediglich 50 % der nach Mendel erwarteten Anzahl. 7 resorbierte Embryonen wurden detektiert. Daraus kann geschlossen werden, dass homozygoten *Ptch*<sup>delINX/delINX</sup> Embryonen *in utero* absterben.

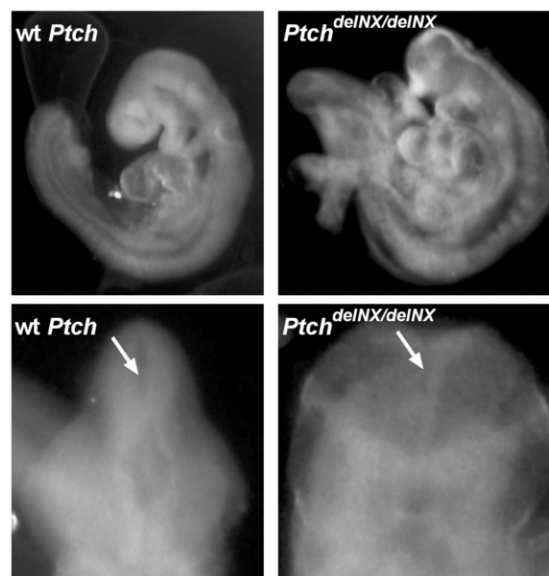
**Tabelle 19: Genotypen geborener Nachkommen aus der Geschwisterverpaarung von *Ptch*<sup>del/+</sup> Tieren.** Nachkommen aus Geschwisterverpaarungen von heterozygoten *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Tieren wurden anhand von PCR-Analysen an genomischer-DNA aus Schwanzbiopsien genotypisiert. In jeder Zeile sind die Gesamtanzahl der Nachkommen und die Anzahl der jeweiligen Genotypen pro Wurf dargestellt.

	Gesamtzahl geborener Nachkommen	Anzahl der genotypisierten Nachkommen	
		<i>Ptch</i> <sup>+/+</sup>	<i>Ptch</i> <sup>delINX/+</sup>
	5	4	1
	5	2	3
	5	2	3
	4	2	2
	4	2	2
	4	0	4
<b>Summe der analysierten Nachkommen</b>	<b>27</b>	<b>12</b>	<b>15</b>

Abbildung 24 zeigt den Phänotyp von *Ptch*<sup>delINX/delINX</sup> Embryonen im Vergleich zu *Ptch*<sup>+/+</sup> Geschwisterembryonen. Der *Ptch*<sup>delINX/delINX</sup> Phänotyp gleicht dem beschriebenen embryonalen Phänotyp der *Ptch*<sup>neo67/neo67</sup> bzw. *Ptch*<sup>neo12/neo12</sup> Nullmutation und ist u. a. durch schwere kraniofaziale Defekte, fehlende Großhirnstrukturen, starkes Wachstum und Verschlussdefekte des Neuralrohrs charakterisiert (Goodrich LV *et al.*, 1997; Hahn H *et al.*, 1998).

**Tabelle 20: Genotypen isolierter Embryonen aus der Geschwisterverpaarung von *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Tieren.** Embryonen aus Geschwisterverpaarungen von heterozygoten *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Tieren wurden am Tag 9,5 *dpc* bis 10,5 *dpc* isoliert und anhand von PCR-Analysen an genomischer DNA aus den entsprechenden Dottersäcken genotypisiert. Der Genotyp der abgestorbenen und resorbierten Embryonen konnte nicht bestimmt werden. In jeder Zeile sind die Gesamtzahl der Embryonen, die Anzahl der entsprechenden Genotypen und die Anzahl der abgestorbenen, resorbierten Embryonen pro Wurf dargestellt.

	Gesamtzahl der präparierten und genotypisierten Embryonen	Anzahl der genotypisierten Embryonen			Anzahl der abgestorbenen, resorbierten Embryonen
		<i>Ptch</i> <sup>+/+</sup>	<i>Ptch</i> <sup>delINX/+</sup>	<i>Ptch</i> <sup>delINX/delINX</sup>	
	9	4	3	2	1
	6	2	2	2	1
	14	4	9	1	1
	9	4	5	0	4
	12	4	7	1	0
<b>Summe der analysierter Embryonen</b>	<b>50</b>	<b>18</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>7</b>

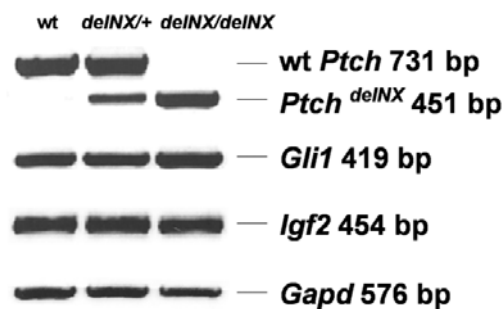


**Abbildung 24: *Ptch*<sup>delINX/delINX</sup> Embryonen sterben *in utero* und zeigen Entwicklungsdefekte.** Embryonen aus Geschwisterverpaarungen von *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Tieren wurden im Alter von 9,5 *dpc* bis 10,5 *dpc* präpariert, fixiert und phänotypisiert. Die Genotypen der Embryonen wurden über PCR-Analysen an genomischer DNA aus den entsprechenden Dottersäcken bestimmt. Die Pfeile weisen auf das Neuralrohr.



Abbildung 25 zeigt RT-PCR-Analysen an cDNA aus embryonaler *Ptch*<sup>delINX/delINX</sup> RNA im Vergleich zu Analysen von heterozygoten und wt Geschwisterembryonen. Es konnte gezeigt werden, dass homozygot mutante Embryonen nur das mutante *Ptch*<sup>delINX</sup> Transkript exprimieren. In den heterozygoten *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Embryonen wurden sowohl das wt *Ptch* als auch das *Ptch*<sup>delINX</sup> Transkript detektiert. Sequenzanalysen des amplifizierten *Ptch*<sup>delINX</sup> Transkriptes belegten, dass in diesem Transkript die Exone 8 und 9 deletiert waren. Des Weiteren wurde eine leichte Überexpression von *Gli1* und eine normale Expression von *Igf2* in *Ptch*<sup>delINX/delINX</sup> Embryonen im Vergleich zu *Ptch*<sup>+/+</sup> und *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Embryonen detektiert.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die *Ptch*<sup>delINX</sup> Mutation nach Mendel vererbt wird, eine leichte abnormale Induktion des Shh/Ptch Signalweges bewirkt, zu dem in konventionellen *Ptch* knock-out Mäusen bereits beschriebenen homozygot letalen Phänotyp führt und im heterozygoten Zustand zu Tumoren prädisponiert.



**Abbildung 25:** *Ptch*<sup>delINX/delINX</sup> Embryonen exprimieren das mutante *Ptch*<sup>delINX</sup> Transkript. Embryonen aus Geschwisterverpaarungen von *Ptch*<sup>delINX/+</sup> Tieren wurden im Alter von 9,5 dpc bis 10,5 dpc präpariert. Die Genotypen der Embryonen wurden über PCR-Analysen an genomischer DNA aus den entsprechenden Dottersäcken bestimmt. Nach Isolation der Gesamt-RNA der Embryonen wurden cDNA synthetisiert und RT-PCR-Analysen durchgeführt. Mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *mPtc11/mPtc7R* (Tabelle 10) wurden die *Ptch* Transkripte nachgewiesen. Die Anlagerungsstellen der DNA-Oligonukleotide am *Ptch* Locus sind Abbildung 17 zu entnehmen. Mit dem DNA-Oligonukleotidpaar *mGliF8/mGliR9* (Tabelle 10) wurde die Expression von *Gli1* und mit *Igf2 TaqManF/Igf2 Exon6R* (Tabelle 10) die Expression von *Igf2* nachgewiesen. Zur Kontrolle der cDNA wurden *Gapd* Transkripte amplifiziert.

### 3.2.5 Deletion von *Ptch* in adulten Mäusen mittels einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase

Um die *Ptch* Nullmutation in adulten Tieren induzieren zu können, wurden *ROSA26CreERT2* Mäuse (*ERT2*; genetischer Hintergrund, 129Sv; A. Berns, Netherland Cancer Institute, Amsterdam; persönliche Mitteilung) mit *Ptch*<sup>NX/NX</sup> Tieren verpaart. *ERT2* Mäuse exprimieren ein CreERT2-Rekombinaseprotein unter der Kontrolle des endogenen *ROSA26* Promotor (Friedrich G und Soriano P, 1991), welches erst durch die Bindung des Medikamentes Tamoxifen aktiviert wird.

Von den Nachkommen wurden *Ptch*<sup>NX/+</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> mit *Ptch*<sup>NX/NX</sup> Tieren weiterverpaart, um *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup>; *Ptch*<sup>NX/+</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup>; *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> und *Ptch*<sup>NX/+</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> zu generieren. Diese Tiere wurden im Alter von 8 Wochen mit einer Gesamtdosis 5 mg Tamoxifen (gespritzt wurde jeweils 1 mg pro Tag über 5 Tage) oder Lösungsmittel (Emulsion aus Ethanol und Sonnenblumenöl) behandelt (Imai T *et al.*, 2001). Die Tiere wurden engmaschig während und nach den Injektionen beobachtet und jeden zweiten Tag gewogen.

Die mit Tamoxifen-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tiere werden im Weiteren als *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäuse bezeichnet.

#### 3.2.5.1 Phänotyp adulter *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäuse nach induzierter Inaktivierung von *Ptch*

##### 3.2.5.1.1 *In vivo* Rekombinationseffizienz des *Ptch*<sup>NX</sup> Lokus

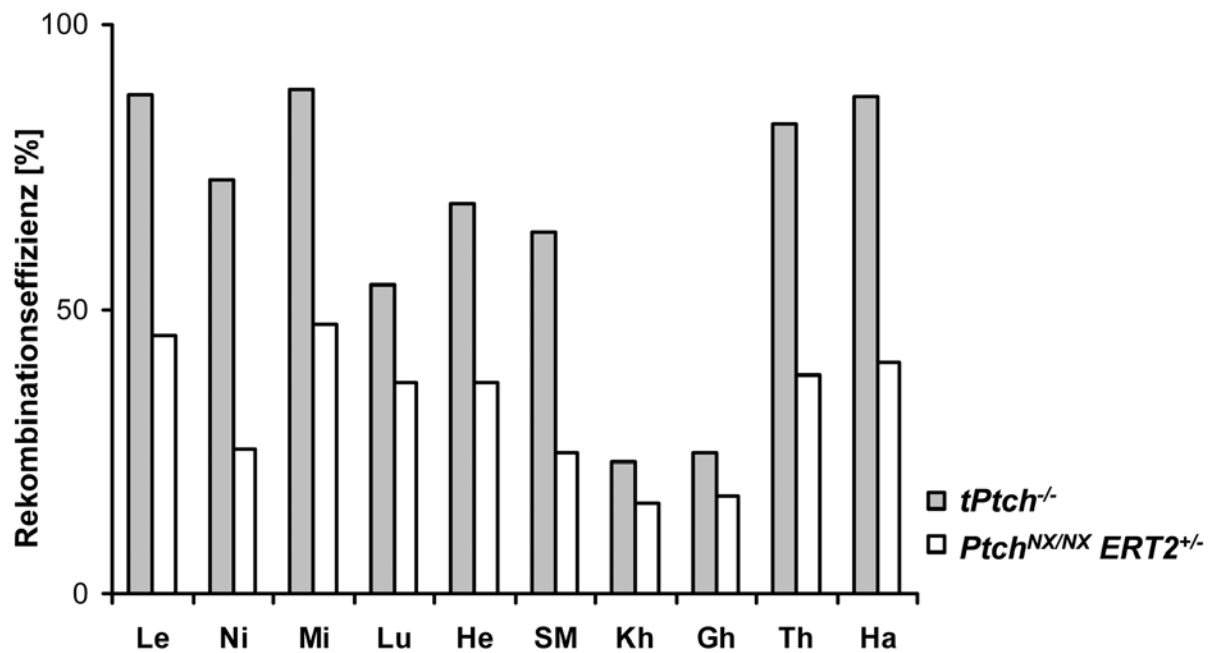
Die Tamoxifen-induzierte Rekombinationsrate des *Ptch*<sup>NX</sup> Lokus wurde mittels quantitativer *real time* PCR an genomischer DNA aus Organen von 6 Tieren des Genotyps *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> von Dr. A. Zibat (Universität Göttingen, Institut für Humangenetik, wissenschaftlicher Assistent) ermittelt. Es wurden 3 Tiere mit Tamoxifen und 3 Tiere mit Lösungsmittel behandelt. Die Organe der Tiere wurden 10 Tage nach der ersten Injektion präpariert und die genomische DNA der Organe isoliert. Standardkurven wurden durch die Amplifikation des *Ptch*<sup>NX</sup> Lokus aus Organen von *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> Tieren erstellt. Für die Normalisierung der Rekombinationsdaten des *Ptch*<sup>NX</sup> Lokus wurde ein *pelota* Gen-spezifischer PCR-Assay verwendet. Die Daten wurden mit der Standardkurven-Methode für relative Quantifizierung ausgewertet und die Deletionseffizienz als Verhältnis des detektierten *Ptch*<sup>del/NX</sup> Allels zur Summe der totalen Amplifikation von *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> DNA und

dem detektierten *Ptch*<sup>deINX</sup> Allel kalkuliert. In Abbildung 26 ist die Effizienz der Rekombination in Prozent am *Ptch*<sup>NX</sup> Locus verschiedener Organe dargestellt.

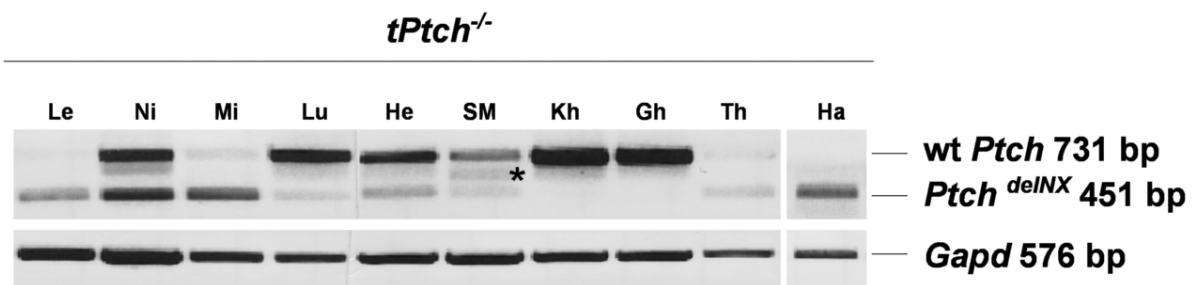
Anhand dieser Analysen konnte eine Rekombination am *Ptch*<sup>NX</sup> Locus auch in Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen festgestellt werden (Abbildung 26). Es wurde allerdings keine Rekombinationsrate in einem der Gewebe dieser Tiere von über 50 % beobachtet. Dies zeigt, dass die CreERT2-Rekombinase eine gewisse Grundaktivität ohne Gabe von Tamoxifen aufweist und somit „leaky“ ist. Aufgrund weiterer Analysen der Tiere konnte aber ein nachteiliger Effekt auf die Gesundheit der Mäuse durch diese „leakyness“ ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 3.2.5.1.2 bis 3.2.5.1.7).

Weiterhin wurde gezeigt, dass in *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen durch die Gabe von Tamoxifen (*tPtch*<sup>-/-</sup>) eine hohe Rekombinationsrate am *Ptch*<sup>NX</sup> Locus hervorgerufen wird (Abbildung 26). In Leber, Milz, Thymus und Haut wurden Rekombinationsraten von über 80 % festgestellt. Die erfolgte Rekombination des *Ptch*<sup>NX</sup> Locus in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde auch über RT-PCR-Analysen mit den DNA-Oligonukleotiden *mPtc11/mPtc7R* (Tabelle 10) an cDNA von unterschiedlichen Organen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 19 Tage nach der Tamoxifengabe analysiert (Abbildung 27). Die Analyse zeigte, dass 19 Tage nach Induktion der CreERT2-Rekombinaseaktivität in Leber, Milz, Thymus und Haut fast ausschließlich mutante *Ptch*<sup>deINX</sup> Transkripte exprimiert werden (Abbildung 27). Auch in Niere, Lunge, Herz und Skelettmuskel wurden *Ptch*<sup>deINX</sup> Transkripte detektiert. Jedoch werden in diesen Organen auch wt Transkripte exprimiert. Im Kleinhirn und Großhirn von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren wurde nur die Expression von wt *Ptch* Transkripten beobachtet, was durch die geringe Aktivität des *ROSA26* Promotors in diesen Geweben zu begründen ist (A. Berns, Netherland Cancer Institute, Amsterdam; persönliche Mitteilung).

Die Daten aus der Analyse der genomischen DNA stimmen daher mit den Expressionsanalysen überein. In Organen mit einer Rekombinationseffizienz von über 80 % (Abbildung 26; Leber, Milz, Thymus, Haut) werden vorwiegend *Ptch*<sup>deINX</sup> Transkripte exprimiert (Abbildung 27). In Niere, Lunge, Herz und Skelettmuskel mit einer Rekombinationseffizienz am *Ptch*<sup>NX</sup> Locus von 60 bis 75 % (Abbildung 26), werden sowohl *Ptch*<sup>deINX</sup> als auch wt Transkripte exprimiert (Abbildung 27).



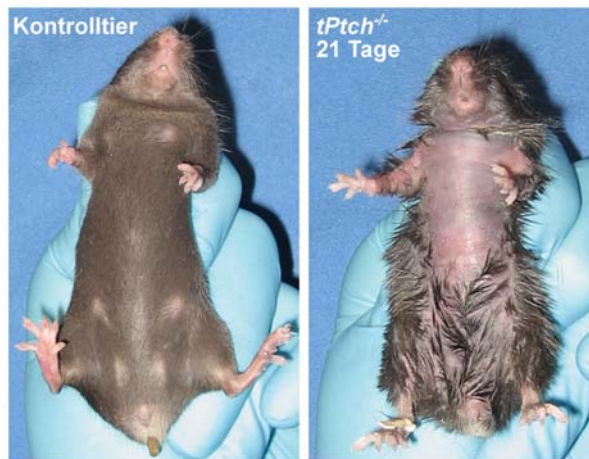
**Abbildung 26: Tamoxifen-induzierte Rekombinationseffizienz am *Ptch*<sup>NX</sup> Locus in *tPtch*<sup>-/-</sup> und in Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen.** Dargestellt ist die durch quantitative *real time* PCR an genomischer DNA ermittelten Rekombinationseffizienzen am *Ptch*<sup>NX</sup> Locus in Organen von *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tieren 10 Tage nach der ersten Tamoxifen- (*tPtch*<sup>-/-</sup>) bzw. Lösungsmittelgabe (*Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup>). Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten von jeweils 3 Organen aus 3 unterschiedlichen Tieren. Abkürzungen: Le, Leber; Ni, Niere; Mi, Milz; Lu, Lunge; He, Herz; SM, Skelettmuskel; Kh, Kleinhirn; Gh, Großhirn; Th, Thymus; Ha, Haut.



**Abbildung 27: Expression des *Ptch*<sup>delINX</sup> Allels in Organen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren.** Es wurden *Ptch* Transkript-spezifische RT-PCR-Analysen an cDNA verschiedener Organe von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe durchgeführt. Hierzu wurde das DNA-Oligonukleotidpaar *mPtc11/mPtc7R* (Tabelle 10) verwendet. Zur Kontrolle der cDNA wurden *Gapd* Transkripte amplifiziert. Das mit einem Stern markierte Transkript im Skelettmuskel (SM) entspricht einer *Ptch* Spleiss-Variante (Nagao K *et al.*, 2005a; Nagao K *et al.*, 2005b). Abkürzungen: Le, Leber; Ni, Niere; Mi, Milz; Lu, Lunge; He, Herz; SM, Skelettmuskel; Kh, Kleinhirn; Gh, Großhirn; Th, Thymus; Ha, Haut.

### 3.2.5.1.2 Hyperproliferative Organveränderungen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Erste phänotypische Veränderungen der *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiere wurden 10 Tage nach der ersten Tamoxifengabe beobachtet. Die Tiere verloren stark an Gewicht (bis zu 20 % nach 20 Tagen) und putzen sich intensiv, was nach 12 Tagen zu kahlen Hautstellen führte (Abbildung 28). Da sich die körperliche Verfassung zunehmend verschlechterte, wurden die Tiere spätestens 23 Tage nach der ersten Tamoxifengabe getötet.

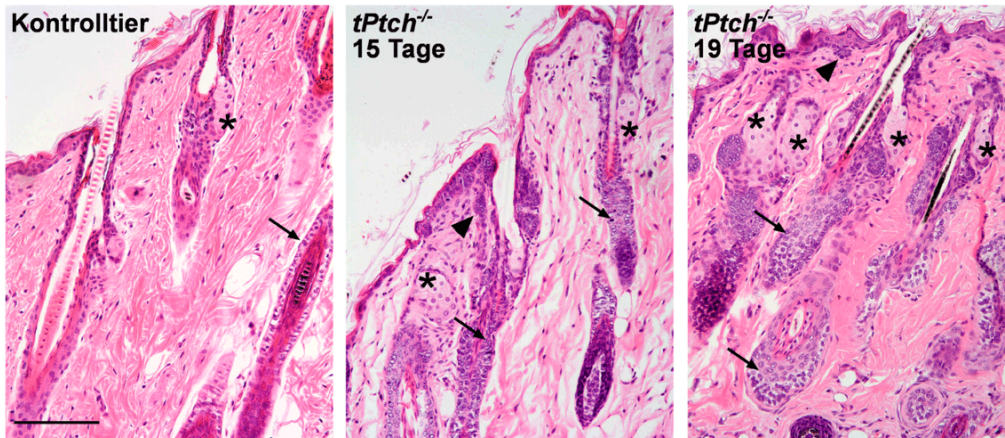


**Abbildung 28: Fellveränderungen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren.** Dargestellt ist ein *tPtch*<sup>-/-</sup> Tier 21 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (rechts) im Vergleich zu einem mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> Geschwistertier (links). *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiere nehmen stark an Gewicht ab, zeigen einen stark ausgeprägten Putztrieb und die Fellhaare fallen ventral aus.

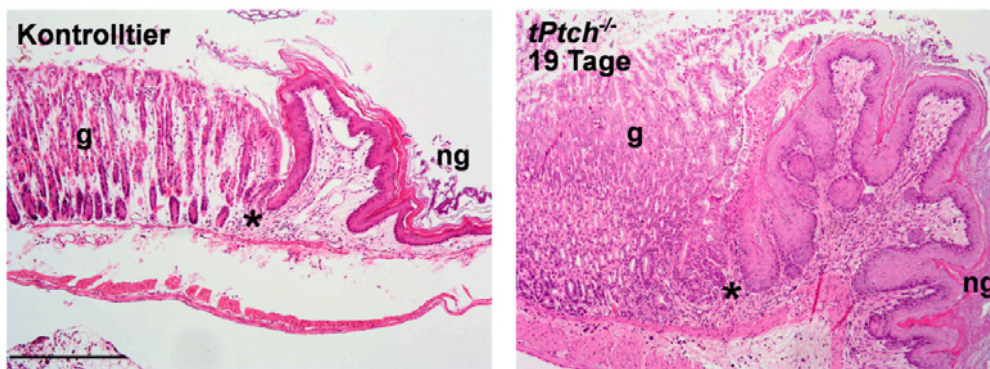
Histologische Untersuchungen von perfundierten *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren zeigten schon 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe schwere Abnormitäten der Haut. Es wurde eine starke Proliferation der interfollikulären und follikulären Epidermis festgestellt (Abbildung 29). Außerdem entwickelten die Tiere hyperproliferative Bereiche in der Magenwand (Abbildung 30) und im Mesenterium (Abbildung 31). Herz, Lunge, Leber, Niere, Pankreas und Skelettmuskeln von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten nach 19 Tagen keine histologischen Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

Die Blutwerte von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren waren weitgehend unauffällig (Tabelle 21). Jedoch wiesen erhöhte Harnstoffwerte in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe auf eine abnormale Nierenfunktion hin, obwohl keine auffällige Morphologie von *tPtch*<sup>-/-</sup> Nierengewebe festgestellt werden konnte. Des Weiteren wiesen *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiere erniedrigte Glukosewerte auf, was auf endokrinologische Defekte oder erhöhte Glukoneogenese im Magen-Darmtrakt zurückzuführen sein

könnte. In keiner der Kontrollkohorten wurden entsprechende Abnormitäten beobachtet. Die biochemische Analyse der Blutserumparameter wurde von Dr. T. Heller (Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Klinische Chemie) durchgeführt.

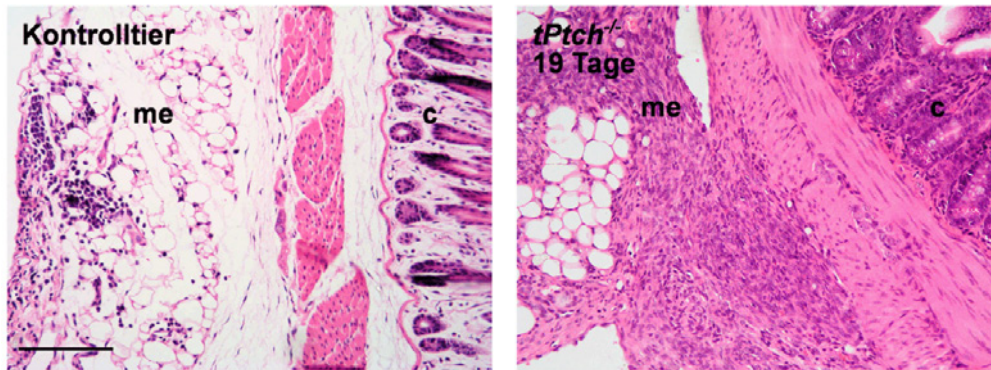


**Abbildung 29: Hyperproliferative Areale der Epidermis von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind HE gefärbte Paraffinschnitte von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 15 Tage (Mitte) und 19 Tage (rechts) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu einem mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tier (links). Die Pfeilköpfe zeigen auf Areale mit irregulärer interfollikulärer Proliferation der Epidermis. Pfeile kennzeichnen die äußere Wurzelscheide und Sterne die Talgdrüsen. Der Balken entspricht 2 mm im Präparat.



**Abbildung 30: Hyperproliferative Areale des Magens von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind HE gefärbte Paraffinschnitte eines *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiers 19 Tage (rechts) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu einem mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tier (links). Sterne markieren den Übergang vom nicht-glandulären, kutanen (ng) zum glandulären, mukösen Magen (g). Der Balken entspricht 5 mm im Präparat.





**Abbildung 31: Hyperproliferative Areale des Mesenteriums von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind HE gefärbte Paraffinschnitte eines *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiers 19 Tage (rechts) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu einem mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tier (links). Der Balken entspricht 2 mm im Präparat. Abkürzungen: me, Mesenterium; c, Magenkorpus.

**Tabelle 21: Biochemische Analyse von Blutsrumparametern von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Aus durch Herzpunktion entnommenem Vollblut wurde 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe das Serum von *tPtch*<sup>-/-</sup>, von Tamoxifen-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> und Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen gewonnen und Blutsrumparameter bestimmt. Abkürzungen: Glu, Glukose; Chol, Cholesterin; TG, Triglyceride; SGPT, Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase; Bil-T, Gesamt-Bilirubin; BUN, Blutharnstoff; Tprot, Gesamt-Protein. Die Anzahl der jeweils analysierten Tiere ist in der Spalte n angegeben. P Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Parameter mit signifikanten Unterschieden (P Wert <0,05) zwischen *tPtch*<sup>-/-</sup> und Kontrolltieren sind grau unterlegt.

	Tamoxifen-behandelte Kontrollen			Lösungsmittel-behandelte Kontrollen			<i>tPtch</i> <sup>-/-</sup>			
	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	P Wert
<b>Glu [mg/dl]</b>	262,1	50,1	17	302,8	52,9	17	170,7	42,1	9	0,00006
<b>Chol [mg/dl]</b>	98,4	14,5	13	122,3	31,8	15	114,4	25,5	8	0,83382
<b>TG [g/dl]</b>	149,0	38,6	13	165,5	43,4	13	179,9	44,7	7	0,36815
<b>SGPT [IU/l]</b>	59,7	11,5	10	67,1	27,5	8	57,5	10,5	6	0,68420
<b>Bil-T [mg/dl]</b>	0,3	0,1	13	0,2	0,1	15	0,2	0,2	10	0,51867
<b>BUN [mg/dl]</b>	25,8	4,5	15	20,4	2,9	16	31,1	5,1	11	0,00646
<b>Tprot [g/dl]</b>	5,3	0,3	11	5,3	0,8	15	5,7	0,4	6	0,26770

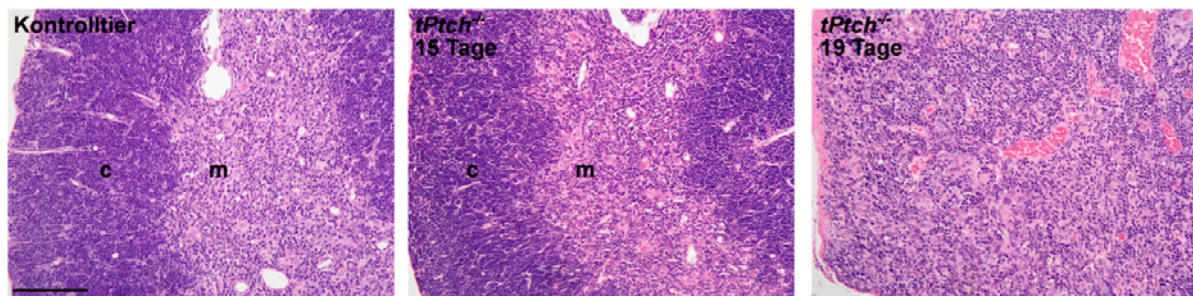
### 3.2.5.1.3 T Zelldefekte in Thymi von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

#### 3.2.5.1.3.1 Histologische Analysen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi

Ab dem 15. Tag nach der ersten Tamoxifengabe zeigten *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiere eine zunehmende Verkleinerung des Thymus (Abbildung 32). Die histologische Analyse der Thymi zeigte eine deutliche Reduktion der Thymusrinde (Kortex) (Abbildung 33). Nach 19 Tagen war diese in HE-Färbungen nicht mehr vom Mark des Thymus (Medulla) abgrenzbar. Immunhistologische Färbungen der T Zellpopulationen mit einem anti-CD3 Antikörper zeigten, dass die markständige T Zellfraktion in den *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi erhalten blieb. Im Thymuskortex war jedoch ein dramatischer Verlust von CD3<sup>+</sup> T Zellen zu beobachten (Abbildung 34, oben). Dagegen wurde keine Veränderung der B220<sup>+</sup> B Zellpopulation in den *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi detektiert (Abbildung 34, unten). Aufgrund der Lokalisation von T und B Zellen konnte Kortex und Medulla der *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi selbst am Tag 19 nach der ersten Tamoxifeninjektion noch unterschieden werden (vergleiche Abbildung 33 und Abbildung 34), was an HE gefärbten Paraffinschnitten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich war.



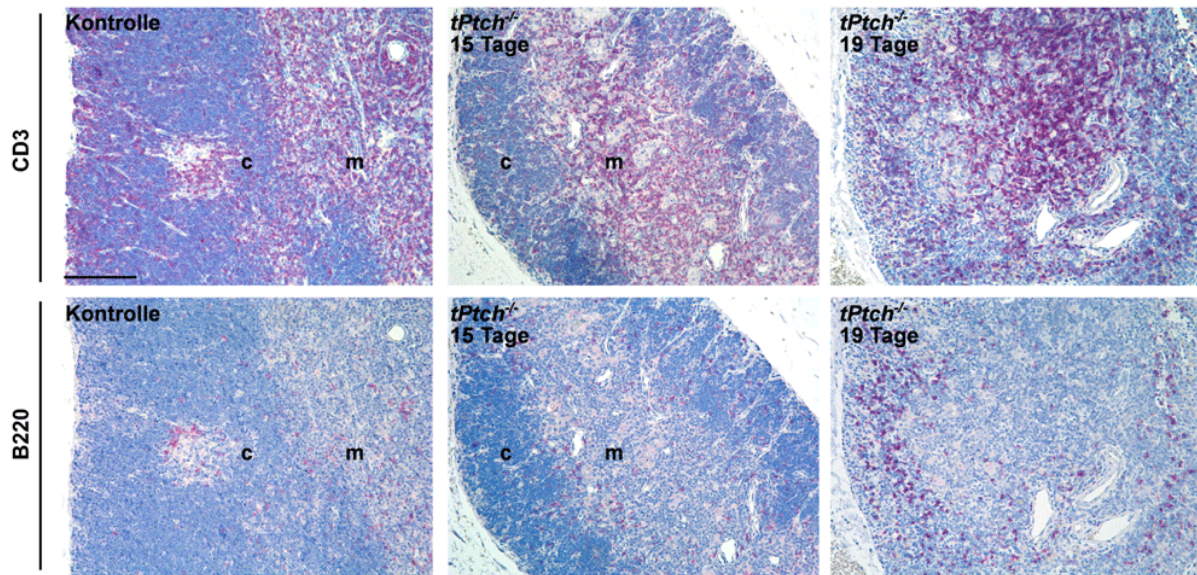
**Abbildung 32: Reduktion der Thymusgröße in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind die präparierten Thymi von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 15 Tage (Mitte) und 19 Tage (unten) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu einem mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tier (oben).



**Abbildung 33: Reduktion des Thymuskortex in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind HE gefärbte Paraffinschnitte von Thymi aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 15 Tage (Mitte) und 19 Tage (rechts) nach der ersten



Tamoxifengabe im Vergleich zu einem mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tier (links). Der Balken entspricht 2 mm im Präparat. Abkürzungen: c, Kortex; m, Medulla.



**Abbildung 34: Reduktion der T Zellpopulationen im Thymuskortex in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind anti-CD3 (oben) und anti-B220 (unten) gefärbte Paraffinschnitte von Thymi aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 15 Tage (Mitte) und 19 Tage (rechts) nach der ersten Tamoxifengabe im Vergleich zu einem mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tier (links). Der Balken entspricht 2 mm im Präparat. Abkürzungen: c, Kortex; m, Medulla.

### 3.2.5.1.3.2 Durchflusszytometrische Analysen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymozyten

Aufgrund der histologischen Abnormitäten von *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi wurden die Oberflächenproteine von Thymozyten durchflusszytometrisch untersucht. Mittels dieser Methode können Größe, Granularität und Fluoreszenz von Zellen untersucht werden. Zur Messung werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln von einem Laserstrahl vermessen. Dabei dient die Lichtstreuung des Laserstrahls nach dem Auftreffen auf die Zelle zur Messung der Größe und der Granularität der Zelle. Die Lichtstreuung nach vorn (forward scatter, FSC) ist ein Maß für die Größe der Zelle. Mit der seitwärts gerichteter Lichtstreuung (side scatter, SSC) wird die intrazelluläre Granularität gemessen. Zum Nachweis von Oberflächenproteinen der Zellen werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper verwendet, die das jeweilig nachzuweisende Antigen binden.

Anhand der spezifischen Expression von Oberflächenproteinen lassen sich die einzelnen Stadien der Thymozytendifferenzierung verfolgen. Die in den Thymus eingewanderten frühen T Zellvorläufer (early T cell progenitor; ETP) sind

charakterisiert durch die hohe Expression von c-kit (kit Onkogen). Im Verlauf ihrer Differenzierung zu Thymozyten durchlaufen sie die so genannten doppelt negativen Stadien, da in diesen Stadien weder CD4 noch CD8 exprimiert werden (DN CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>). Die DN Stadien können über die unterschiedliche Expression der Proteine CD44 und CD25 unterschieden werden (DN1 bis DN4). Ab dem DN3 Stadium (CD44<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup>) exprimieren Thymozyten zusätzlich CD3 und den T Zellrezeptor  $\beta$  (T cell receptor; TCR $\beta$ ), durch deren Nachweis auch frühe DN Stadien von späteren Thymozytenstadien unterschieden werden können. Während der weiteren Entwicklung der Thymozyten erhöht sich die Expression von CD4 und CD8. So exprimieren späte Thymozyten CD4 und CD8 (CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> doppelt positiv; DP). Die Stadien der einfach positiven CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Thymozyten (SP, single positive) stellen die Endstufe der Differenzierung der T Zellen dar, wobei CD4<sup>+</sup> SP T Zellen die Population der T Helferzellen und CD8<sup>+</sup> SP T Zellen die Population der zytotoxischen T Lymphozyten bilden (Rothenberg EV und Taghon T, 2005).

Um die Thymozytenentwicklung von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren zu untersuchen, wurden daher durchflusszytometrische Untersuchungen von simultanen Antikörperfärbungen mit anti-CD25/CD44/CD4/CD8 Antikörpern sowie Antikörperfärbungen mit anti-CD3 Antikörpern und mit anti-TCR $\beta$  Antikörpern durchgeführt. Als Kontrollen wurden bei jeder Färbung und Messung Thymozyten von Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup>, und Tamoxifen-behandelten bzw. Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> Mäusen mitgeführt. Die Analyse der Thymozyten wurden sowohl 15 als auch 19 Tage nach der Tamoxifen-bzw. Lösungsmittelgabe durchgeführt.

Besonders auffällig war zunächst die starke Reduktion der Gesamt-Thymozytenanzahl in den *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi (Abbildung 35, Abbildung 36; links). Die Werte in Abbildung 35 wurden anhand aller durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen von Thymozyten ermittelt. Die Granularität wurde gegen die Größe (SSC/FSC) aller Zellen aufgetragen (Abbildung 36, links). Aufgrund der definierten Granularität und Größe der Lymphozyten konnte so die Anzahl der Thymozyten in den vermessenen Proben ermittelt werden (Abbildung 36). Abbildung 35 zeigt, dass die relative Anzahl der Thymozytenfraktion aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi 13- bis 20-fach gegenüber der Kontrollthymi reduziert war.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurde in den einzelnen T Zellpopulationen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren eine stark reduzierte Zahl von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP T Zellen beobachtet.

Dagegen nahm die Zahl der unreifen CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> DN und reifen CD4 SP bzw. CD8 SP T Zellen zu (Abbildung 36; Mitte). Der Defekt war 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe noch deutlicher ausgeprägt als nach 15 Tagen.

Zusätzlich wurde eine Analyse der CD3 und TCR $\beta$  Expression der *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymozyten durchgeführt. Diese erlaubte die Unterscheidung von späten T Zellen, welche CD3 und TCR $\beta$  stark exprimieren und frühen T Zellen, die beide Oberflächenproteine nur gering exprimieren. Die Ergebnisse in Abbildung 37 zeigen, dass die Thymozyten aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi eine reduzierte CD3 und TCR $\beta$  schwach exprimierende Fraktion aufwiesen, während die Populationen von CD3<sup>+</sup> und TCR $\beta$ <sup>+</sup> T Zellen relativ erhalten blieb (links und Mitte).

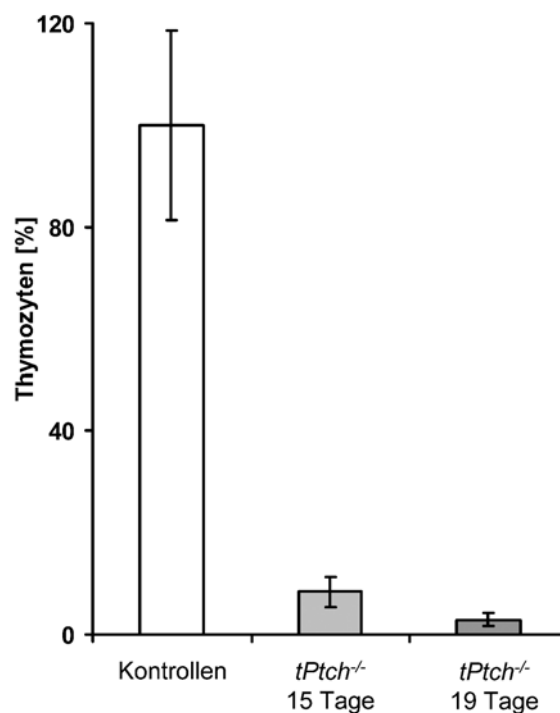
Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der anti-CD4/CD8 Antikörperfärbungen (Abbildung 36; Mitte) und zeigen, dass die Abnahme von unreifen T Zellen mit einer relativen Zunahme von reifen T Zellen in den *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi gekoppelt ist. Ob die *Ptch* Deletion die Funktionalität des T Zellrezeptors beeinflusst, ist mit dieser Analyse nicht eindeutig zu klären.

Zusammengefasst wiesen diese Ergebnisse auf einen Entwicklungsdefekt der T Zellen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen zwischen dem DN und dem DP Stadium hin. Der Verlust der T Zellen wurde hierbei nicht durch Apoptose induziert, was durch Analyse der Annexin V Expression der Thymozyten gezeigt werden konnte (Abbildung 37; rechts). So wurde im Vergleich zu den Kontrollkohorten keine signifikante Erhöhung von Annexin V-positiven *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymozyten in den untersuchten T Zell Populationen (DN; CD4 SP oder CD8 SP) beobachtet.

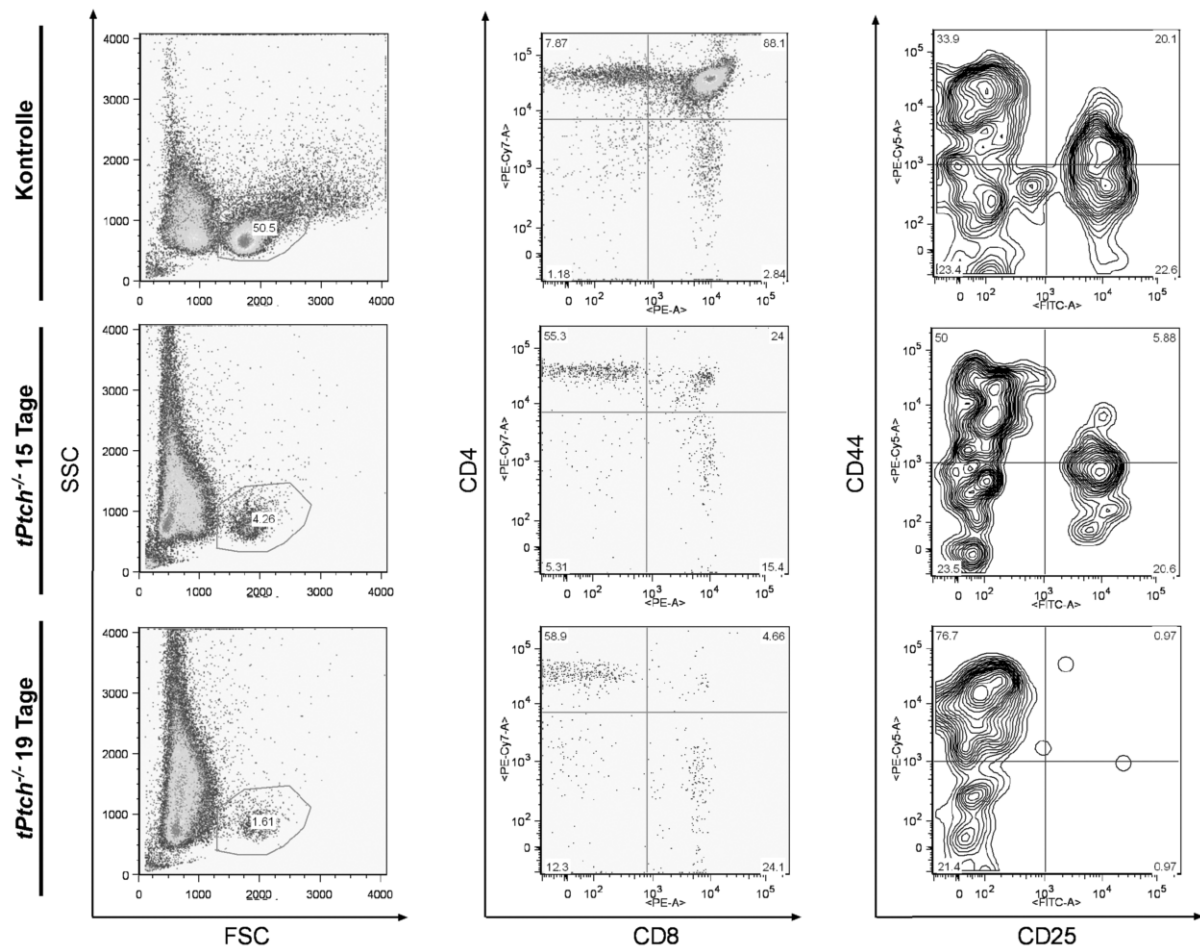
Um den Differenzierungsdefekt von *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymozyten näher zu definieren, wurden nun DN Thymozyten anhand der Expression von CD44 und CD25 untersucht. Die DN1 Population ist durch die Expression von CD44 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) charakterisiert und besitzt noch multiples Differenzierungspotential. Während der weiteren Entwicklung zum DN2 Stadium wird zusätzlich zu CD44 auch CD25 exprimiert (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>). Die Expression von CD44 und CD25 wird nachfolgend nacheinander reduziert, so dass im DN3 Stadium kein CD44 mehr exprimiert wird (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) und im DN4 Stadium beide Oberflächenproteine nicht mehr nachweisbar sind (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) (Huesmann M *et al.*, 1991; Ardavin C *et al.*, 1993; Godfrey DI *et al.*, 1993; Wu L *et al.*, 1996; Bhandoola A und Sambandam A, 2006b).

Bereits 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe zeigten die DN Populationen der *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäuse deutliche Unterschiede zu den untersuchten Kontrollkohorten (Abbildung 36; rechts). Es wurde eine relative Erhöhung der Anzahl von DN1 Thymozyten beobachtet, während die DN2 und DN3 Populationen deutlich reduziert waren. 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe war die DN1 Population stark überrepräsentiert, und DN2 und DN3 Thymozyten konnten nicht mehr detektiert werden. Veränderungen der relativen Zahlen von DN4 T Zellen wurden aber nicht festgestellt.

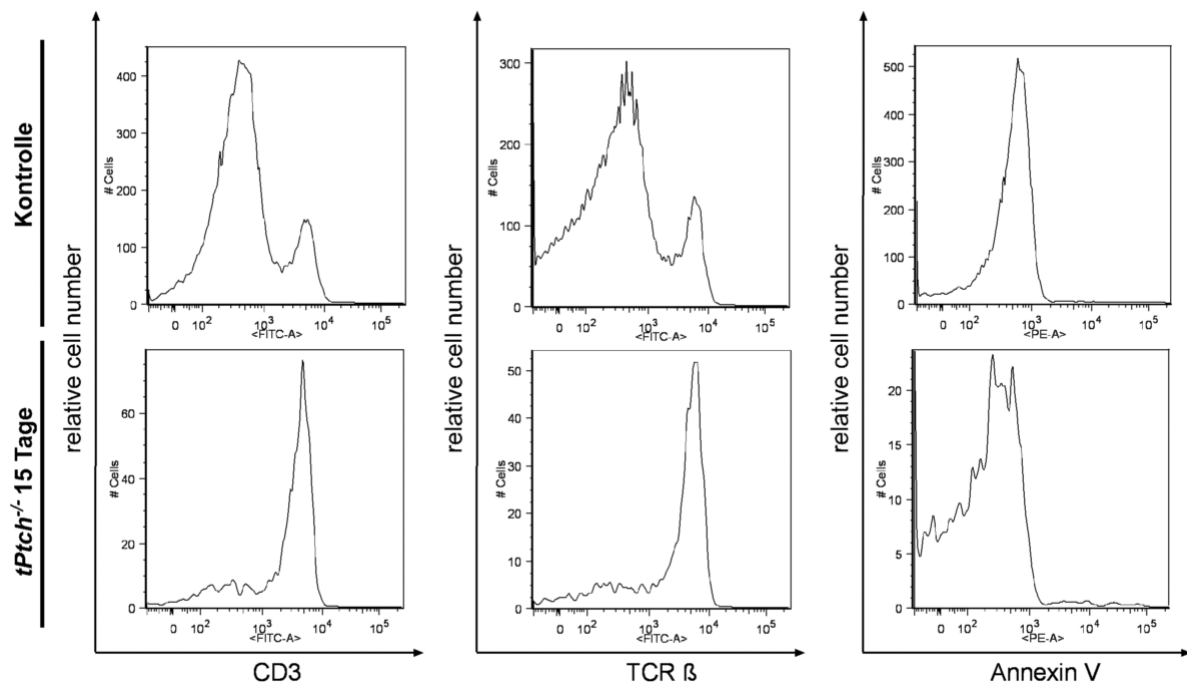
Die relative Erhöhung der DN1 Population in *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi ließ auf einen Entwicklungsdefekt der Thymozyten im oder nach dem DN1 Stadium schließen. Durch einen solchen Defekt lässt sich der komplette Verlust der DN2 und DN3 Populationen erklären. Die gleich bleibende Anzahl der DN4 Population könnte bedeuten, dass *Ptch* eventuell eine zusätzliche Rolle im oder nach dem DN4 Stadium spielen könnte.



**Abbildung 35: Reduktion der Thymozyten in *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi.** Dargestellt ist die relative Thymozytenzahl aus Thymi von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 15 Tage (Mitte; 4 Tiere) sowie 19 Tage (rechts; 3 Tiere) nach der ersten Tamoxifengabe und von Kontrolltieren (links; die Werte von 9 Tamoxifen- und 7 Lösungsmittel-behandelten Tieren wurden hierbei zusammengefasst). Die relative Anzahl der Thymozyten wurde in durchflusszytometrischen Messungen im SSC/FSC Plot (siehe Abbildung 36) bestimmt.



**Abbildung 36: Reifungsdefekt von T Zellen in Thymi von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Analysen von Thymozyten, welche aus Thymi von Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> (oben) und *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 15 Tage (Mitte) oder 19 Tage (unten) nach der ersten Tamoxifengabe isoliert wurden. Tamoxifen-behandelte *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Kontrolltiere zeigten ebenfalls eine normale T Zellentwicklung (Daten nicht gezeigt). Rechts ist der SSC/FCS Plot von Gesamthymuszellen aus der Färbung mit anti-CD44/CD25/CD4/CD8 Antikörpern dargestellt. Der Kreis markiert das verwendete Lymphozytenfenster. Die Zellen des Lymphozytenfensters wurden anhand ihrer anti-CD4/CD8 Färbung aufgetragen (Mitte). Rechts ist die anti-CD44/CD25 Färbung von CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DN Thymozyten (Mitte) dargestellt. Die relativen prozentualen Anteile der Populationen sind in den Quadranten bzw. Fenstern angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 37: Analyse der CD3, TCR $\beta$  und Annexin V Expression von  $tPtch^{-/-}$  Thymozyten.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Analysen von Thymozyten, welche aus Thymi von Lösungsmittel-behandelten  $Ptch^{NX/NX} ERT2^{-/-}$  (oben) und  $tPtch^{-/-}$  Tieren 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe (unten) isoliert wurden. Gezeigt sind die Auswertungen von anti-CD3 (links), anti-TCR $\beta$  (Mitte) und anti-Annexin V (rechts) Färbungen der Thymozyten des in Abbildung 36 (links) dargestellten Lymphozytenfensters. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten.

### 3.2.5.1.4 B Zelldefekte in Milzen von $tPtch^{-/-}$ Mäusen

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem oben beschriebenen T Zelldefekt in  $tPtch^{-/-}$  Mäusen um einen zellspezifischen oder aber um einen umfassenderen Immundefekt handelte, wurden weitere Analysen angeschlossen.

Trotz der normalen Histologie wurde zunächst die Milz als peripheres lymphatisches Organ der B Zell Reifung in  $tPtch^{-/-}$  Mäusen untersucht.

Vom Knochenmark wandern unreife B Zellen in die Milz ein, wo sie sich zu reifen B Zellen differenzieren. Die B Zellen der Milz lassen sich aufgrund der Expression von Oberflächenproteinen unterscheiden. So exprimieren unreife Typ 1 B Zellvorläufer (transitional B cell of type 1; T1;) B220 und CD24 aber kein CD21 (B220<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>). Typ 2 B Zellvorläufer (transitional B cell of type 2; T2) exprimieren hingegen sowohl B220, CD24 als auch CD21 (B220<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>). Beide B Zellvorläufertypen entwickeln sich zu reifen B Zellen (mature B cell, M), die

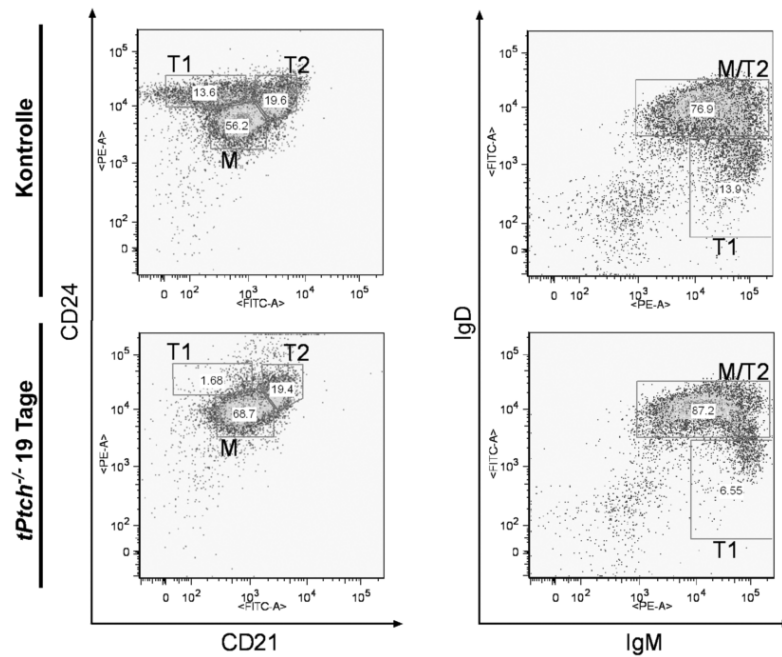
durch eine niedrige Expression von CD24 und CD21 gekennzeichnet sind ( $B220^+CD24^{low}CD21^{low}$ ) (Loder F *et al.*, 1999). Weiterhin lassen sich die B Zellen der Milz aufgrund ihrer Expression von IgM und IgD ebenfalls in diese Populationen einteilen. Die T1 B Zellpopulation exprimiert auf hohem Niveau IgM, aber nur schwach IgD ( $B220^+IgM^{high}IgD^{low}$ ). Unreife T2 B Zellen und reife B Zellen hingegen sind durch die starke Expression beider Oberflächenproteine gekennzeichnet ( $B220^+IgM^{high}IgD^{high}$ ) (Loder F *et al.*, 1999).

Wie Abbildung 38 (links) zeigt, wurde bei durchflusszytometrischen Untersuchungen der B Lymphozyten aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Milzen 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe eine starke Reduktion der T1 B Zellpopulation (T1;  $B220^+ CD24^+ CD21^-$ ) beobachtet. Die Fraktion der T2 B Zellen blieb stabil (T2;  $B220^+ CD24^+ CD21^+$ ), während die reifen B Zellen überrepräsentiert waren (M;  $B220^+ CD24^{low} CD21^{low}$ ).

Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurde auch die Expression von IgD und IgM von B Zellen der Milz analysiert. Abbildung 38 (rechts) zeigt, dass die T1 Population (T1;  $B220^+IgM^{high}IgD^{low}$ ) von *tPtch*<sup>-/-</sup> Milzen deutlich reduziert war. Die Zahl der reifen B Zellen (T2,  $B220^+IgM^{high}IgD^{high}$  und M,  $B220^+IgM^{low}IgD^{high}$ ) dagegen war relativ erhöht. Diese Daten bestätigen die beobachtete Abnahme der T1 B Zellpopulation (Abbildung 38; links) in *tPtch*<sup>-/-</sup> Milzen und weisen auf einen frühen Entwicklungsdefekt in der B Zelldifferenzierung hin.

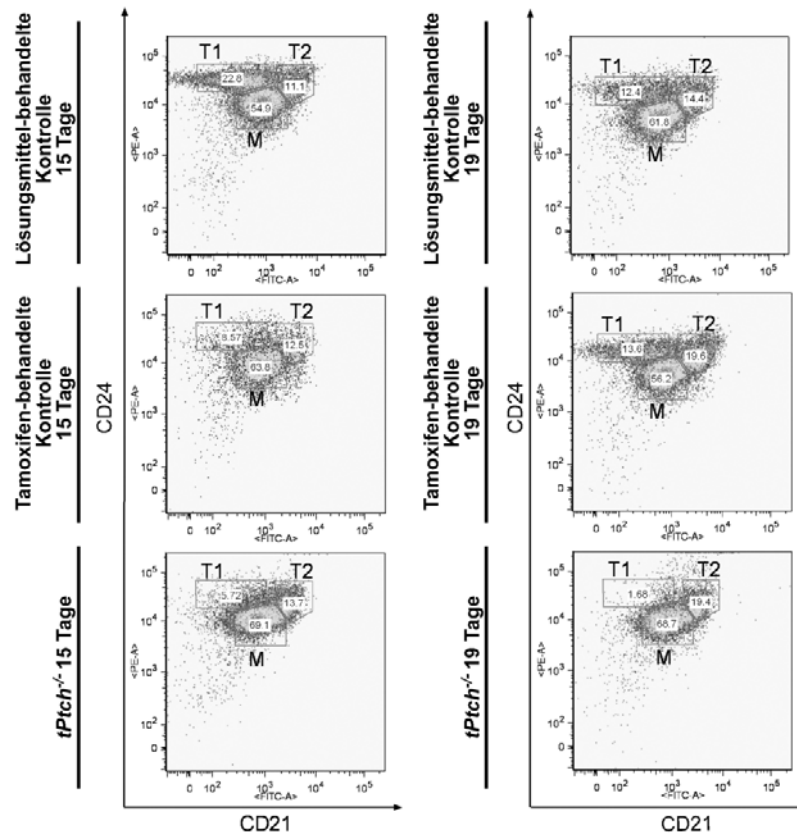
In den Tamoxifen-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> Kontrolltieren wurde 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe ein mäßiger Effekt von Tamoxifen auf die T1 B Zellpopulation beobachtet (Abbildung 39; links). Dieser Effekt war jedoch nach 19 Tagen nicht mehr detektierbar (Abbildung 39; rechts).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen einen Defekt der B Zellentwicklung vorliegt.



**Abbildung 38: Reduktion der T1 B Zellen in Milzen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Analysen von B Zellen, welche 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe aus der Milz eines *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiers (unten) isoliert wurden. Zum Vergleich sind B Zellen einer mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Maus (oben) dargestellt. Die Zellen wurden mit anti-CD24/CD21/B220 oder anti-IgD/IgM/B220 Antikörpern gefärbt. Gezeigt werden B220<sup>+</sup> Zellen (B Zellen), die je nach ihrer Expression von CD24 und CD21 (links) oder IgM und IgD (rechts) in verschiedene Populationen eingeteilt werden können. Die gekennzeichneten Subpopulationen in der Auftragsung anti-CD24/CD21 entsprechen den T1 (B220<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD21<sup>-</sup>), T2 (B220<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup>) und den reifen (M, mature; B220<sup>+</sup> CD24<sup>low</sup> CD21<sup>low</sup>) B Zellen. Bei der Färbung mit anti-B220/IgM/IgD sind die T1 B Zellen durch B220<sup>+</sup> IgM<sup>high</sup> IgD<sup>low</sup> (T1) und die Populationen der T2 und reifen B Zellen (T2/M) durch B220<sup>+</sup> IgM<sup>low/high</sup> IgD<sup>high</sup> Expression gekennzeichnet. Die relativen prozentualen Anteile der Populationen sind in den Fenstern angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten.





**Abbildung 39: Vergleich der B Zellpopulationen von Milzen aus Lösungsmittel-behandelten  $Ptch^{NX/NX}ERT2^{+/-}$ , Tamoxifen-behandelten  $Ptch^{NX/NX}ERT2^{-/-}$  und  $tPtch^{-/-}$  Mäusen 15 und 19 Tage nach der ersten Injektion.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Analysen von B Zellen, welche 15 (links) oder 19 Tage (rechts) nach der ersten Tamoxifengabe aus der Milz von  $tPtch^{-/-}$  Maus (unten) isoliert wurden. Zum Vergleich sind B Zellfärbungen eines mit Lösungsmittel-behandelten  $Ptch^{NX/NX}ERT2^{+/-}$  Tiers (oben) und eines mit Tamoxifen-behandelten  $Ptch^{NX/NX}ERT2^{-/-}$  (Mitte) Tiers dargestellt. Gezeigt werden B220<sup>+</sup> Zellen (B Zellen) einer anti-B220/CD24/CD21 Färbung, die aufgrund ihrer Expression von CD24 und CD21 in T1 (B220<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD21<sup>-</sup>), T2 (B220<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> CD21<sup>+</sup>) und reife (M, mature; B220<sup>+</sup> CD24<sup>low</sup> CD21<sup>low</sup>) B Zellen unterteilt werden können. Die relativen prozentualen Anteile der Populationen sind in den Fenstern angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten.

### 3.2.5.1.5 B Zelldefekt im Knochenmark von $tPtch^{-/-}$ Mäusen

Da die beschriebenen Defekte in der T und B Zellentwicklung in Thymus und Milz auch durch Defekte in früheren hämatopoetischen Entwicklungsstadien ausgelöst werden können, wurde das Knochenmark von  $tPtch^{-/-}$  Mäusen untersucht.

Die verschiedenen B Zellentwicklungsstadien im Knochenmark können durch ein spezifisches Expressionsmuster von B220, CD43 und IgM unterschieden werden. Frühe B Zellvorläufer exprimieren bis zum pro-B Zellstadium B220 und CD43, jedoch

kaum IgM ( $B220^{\text{high}} CD43^+ IgM^{\text{low}}$ ). Bei der weiteren Entwicklung zum pre-B Zellstadium nimmt die Expression von CD43 ab, wohingegen die Expression von B220 stetig bis zum Stadium der unreifen B Zellen zunimmt. Diese unreifen B Zellen exprimieren stark B220, mäßig IgM und kein CD43 ( $B220^{\text{high}} CD43^- IgM^{\text{low-high}}$ ).

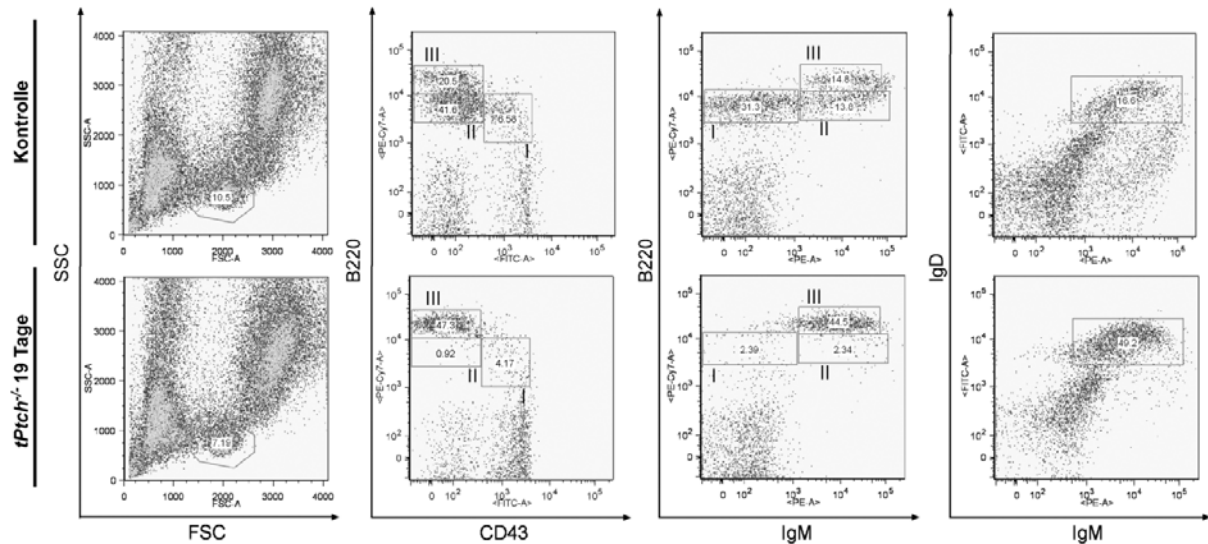
Auf den reifen, immunkompetenten rezirkulierenden B Zellen wird zusätzlich der B Zellrezeptor IgD exprimiert ( $B220^{\text{high}} CD43^- IgM^{\text{low}} IgD^{\text{high}}$ ). Reife B Zellen haben daher einen  $B220^{\text{high}} CD43^- IgM^{\text{low}} IgD^{\text{high}}$  Phänotyp (Busslinger M, 2004; Nagasawa T, 2006).

Im Knochenmark von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren wurde zunächst eine leichte Reduktion der gesamten Lymphozytenfraktion im Vergleich zu den Kontrollkohorten beobachtet. Dies wird anhand des SSC/FSC Plot in Abbildung 40 (links) gezeigt.

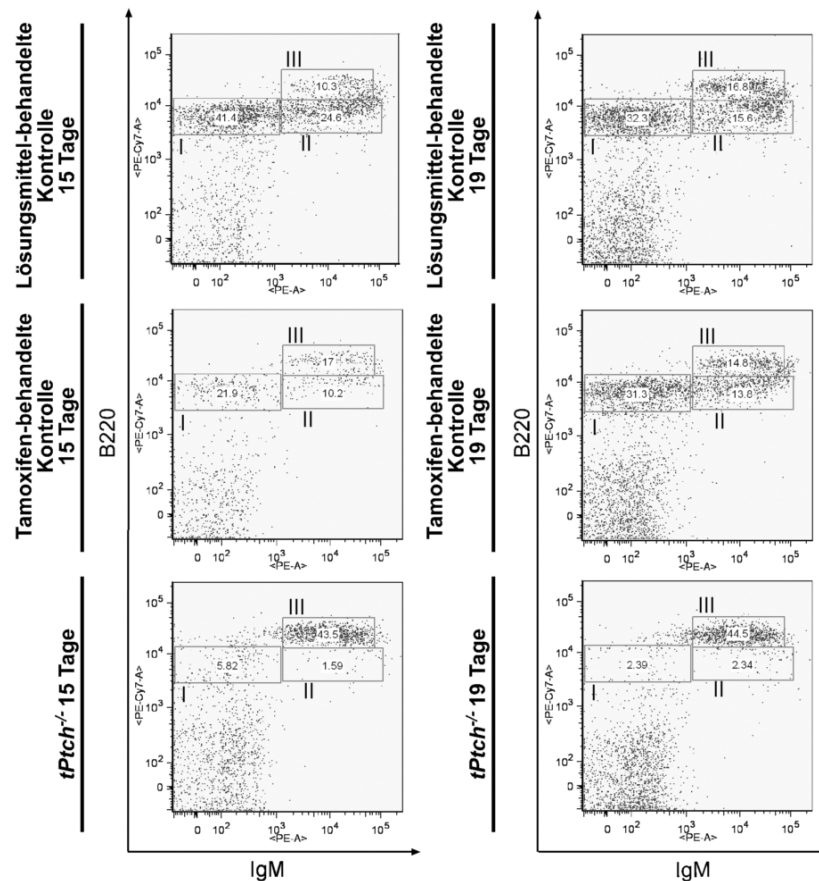
Durch die simultane Färbung mit anti-B220/CD43/IgM Antikörpern konnte eine Differenzierung der B Zellpopulationen vorgenommen werden. Abbildung 40 (Mitte links, Mitte rechts) zeigt die Auswertung dieser Färbung. Es fällt vor allem der fast vollständige Verlust der pre-B Zellen (Mitte links; Fraktion II;  $B220^+ CD43^-$ ) auf, während die relativen Zahlen der pro-B Zellen kaum Veränderungen zeigten (Mitte links; Fraktion I;  $B220^+ CD43^+$ ). Die Population der unreifen und rezirkulierenden B Zellen (Mitte links; Fraktion III;  $B220^{\text{high}} CD43^-$ ) hingegen war überrepräsentiert. Durch die Analyse der IgM Expression der einzelnen B Zellpopulationen (Abbildung 40; Mitte rechts) wurde die Vermehrung der unreifen (Fraktion II;  $B220^{\text{low}} IgM^{\text{low}}$ ) und rezirkulierenden (Fraktion III;  $B220^{\text{high}} IgM^{\text{high}}$ ) B Zellpopulationen bestätigt.

Anhand einer simultanen anti-B220/IgM/IgD Färbung (Abbildung 40, rechts) der Knochenmarkszellen konnte außerdem die relativ erhöhte Anzahl von rezirkulierenden B Zellen gezeigt werden ( $B220^+ IgD^{\text{high}} IgM^{\text{high}}$ ). Die Reduktion von pro- und pre-B Zellen als auch von unreifen B Zellen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Knochenmark und die damit verbundene relative Zunahme von rezirkulierenden B Zellen weist darauf hin, dass der Verlust von *Ptch* zu einer schweren Blockade der frühen B Zellentwicklung im pro- oder pre-B Zellstadium führt.

Auch im Knochenmark wurde ein Tamoxifen-spezifischer Effekt auf die B Zellentwicklung festgestellt. So wurde am Tag 15 nach der ersten Tamoxifengabe eine Reduktion von pro-, pre- und unreifen B Zellen beobachtet (Abbildung 41; links). Dieser Effekt war aber 19 Tage nach der ersten Tamoxifeninjektion nicht mehr messbar (Abbildung 41; rechts).



**Abbildung 40: Reifungsdefekt von B Zellen im Knochenmark von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Analysen von B Zellen, welche 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe aus dem Knochenmark einer *tPtch*<sup>-/-</sup> Maus (unten) isoliert wurden. Zum Vergleich sind B Zellen eines Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Kontrolltiers (oben) dargestellt. Die Zellen wurden mit anti-B220/CD43/IgM (Mitte links und Mitte rechts) oder anti-B220/IgM/IgD (rechts) Antikörpern gefärbt. Links ist der SSC/FSC Plot des Gesamtknochenmarks mit den im Weiteren verwendeten Lymphozytenfenstern dargestellt. Durch die Auftragung von B220 gegen CD43 können die B Zellen in 3 Fraktionen aufgeteilt werden (Mitte links). Hierbei entspricht Fraktion I den pro-B Zellen (B220<sup>+</sup> CD43<sup>+</sup>), Fraktion II den pre-B Zellen (B220<sup>+</sup> CD43<sup>-</sup>) und Fraktion III den unreifen, und gleichzeitig auch den reifen, rezirkulierenden B Zellen (B220<sup>high</sup> CD43<sup>-</sup>). Mittels der Auftragung von B220 gegen IgM können ebenso 3 B Zellpopulationen unterschieden werden (Mitte rechts). Fraktion I entspricht pro- und pre-B Zellen (B220<sup>+</sup> IgM<sup>-</sup>), Fraktion II den unreifen B Zellen (B220<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup>) und Fraktion III den reifen, rezirkulierenden B Zellen (B220<sup>high</sup> IgM<sup>+</sup>). Rechts ist die Auswertung der Färbung mit anti-B220/IgD/IgM Antikörpern abgebildet. Die B220<sup>+</sup> Lymphozyten aus den links dargestellten Lymphozytenfenstern sind rechts im IgD/IgM Plot dargestellt. Der Kasten markiert die B220<sup>+</sup> IgD<sup>high</sup> IgM<sup>high</sup> reife rezirkulierende B Zellfraktion. Die relativen prozentualen Anteile der Populationen sind in den Fenstern angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 41: Vergleich von B Zellpopulationen des Knochenmarks von Lösungsmittel-behandelten  $Ptch^{NX/NX} ERT2^{+/-}$ , Tamoxifen-behandelten  $Ptch^{NX/NX} ERT2^{+/-}$  und  $tPtch^{-/-}$  Tieren 15 und 19 Tage nach der ersten Injektion.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Analysen von B Zellen, welche aus Knochenmark einer Lösungsmittel-behandelten  $Ptch^{NX/NX} ERT2^{+/-}$  Maus (oben), einer Tamoxifen-behandelten  $Ptch^{NX/NX} ERT2^{+/-}$  Maus (Mitte) und einer  $tPtch^{-/-}$  Maus (unten) 15 (links) oder 19 (rechts) Tage nach der ersten Tamoxifengabe isoliert worden sind. Aufgetragen sind die anti-B220/IgM Färbung der Lymphozyten (verwendetes Lymphozytenfenster siehe Abbildung 40) aus der simultanen Färbung mit anti-B220/CD43/IgM. Fraktion I entspricht pro- und pre-B Zellen ( $B220^+ IgM^-$ ), Fraktion II den unreifen B Zellen ( $B220^+ IgM^+$ ) und Fraktion III den reifen, rezirkulierenden B Zellen ( $B220^{high} IgM^+$ ). Die relativen prozentualen Anteile der Populationen sind in den Fenstern angegeben. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für Ergebnisse aus 4 unabhängigen Experimenten.

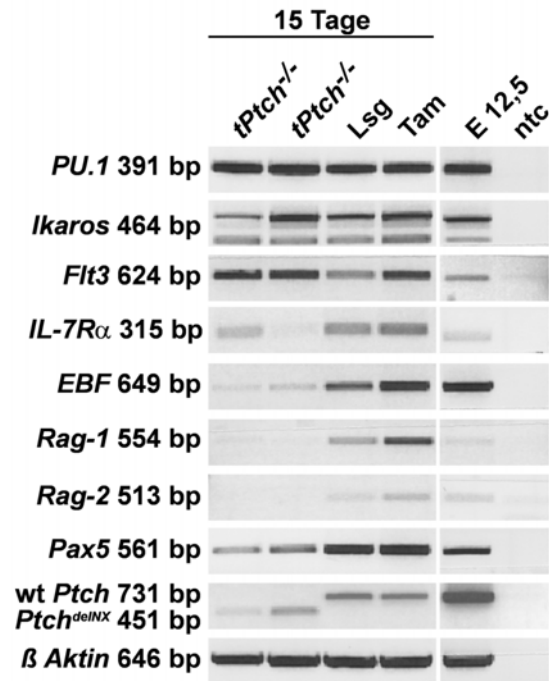
### 3.2.5.1.5.1 Entwicklungsdefekt früher B Zellvorläufer im Knochenmark von $tPtch^{-/-}$ Mäusen

Die Differenzierung von frühen B Zellvorläufern aus Stammzellen des Knochenmarks kann über die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren und Rezeptorproteine verfolgt werden. Für die Differenzierung der allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid progenitor, CLP) aus multipotenten Vorläuferzellen (multipotent progenitor, MPP) wird die Expression der

Transkriptionsfaktoren PU.1 (Sfpi1, SFFV proviral integration 1) und Ikaros (Zfpn1a1, zinc finger protein, subfamily 1A, 1) sowie die Expression des Rezeptors Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3) und die  $\alpha$ -Kette des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R $\alpha$ ) benötigt (Laiosa CV *et al.*, 2006). Die aktivierte IL-7R (Interleukin-7 receptor) Signalkaskade bewirkt die Entwicklung vom CLP zu B Zellvorläufern. Weiterhin führt die Expression des frühen B Zelltranskriptionsfaktors EBF (early B cell factor 1) zur Expression von Rag1/2 (recombination activating gene 1 bzw. 2) und damit zur VDJ Rekombination. Die Expression von EBF reguliert auch die Expression des B Zell-spezifischen Transkriptionsfaktors Pax5, welcher für die weitere Differenzierung der B Zelllinie unerlässlich ist (Buslinger M, 2004).

Um den Defekt in der B Zellentwicklung von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen genauer zu definieren, wurde die Expression der frühen Transkriptionsfaktoren *PU.1* und *Ikaros* sowie des Rezeptors *Flt3* untersucht. Die Expression dieser Transkripte zeigte im Gesamtknochenmark keinen Unterschied zwischen *tPtch*<sup>-/-</sup> Knochenmark und Kontrolltieren (Abbildung 42).

Jedoch wurde im Knochenmark von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren eine stark verminderte Expression von *IL-7R $\alpha$* , *EBF*, *Rag1/2* und *Pax5* detektiert (Abbildung 42). Da diese Faktoren essentiell für die korrekte Entwicklung früher B Zellen sind, lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen ein schwerer Defekt in der frühen B Zellentwicklung vorliegt. Anhand dieser Daten kann außerdem vermutet werden, dass ein Entwicklungsdefekt bei der Transition vom CLP-Stadium zu frühen B Zellvorläufern vorliegen könnte.



**Abbildung 42: Expressionsanalyse früher Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren im Knochenmark von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe wurde das Knochenmark von 2 *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren und einer *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> Maus (Tam) sowie von einem Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tier (Lsg) isoliert und RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Expression von *Ptch*<sup>de/NX</sup> Transkripten zeigt die effiziente Rekombination am *Ptch*<sup>NX</sup> Locus im Knochenmark (Tabelle 10; Abbildung 17). Die weiteren verwendeten Oligonukleotidpaare sind in Tabelle 10 aufgeführt und die amplifizierten Gentranskripte im Text beschrieben. Zur Kontrolle der cDNA wurden  $\beta$  *Aktin* Transkripte amplifiziert. Als Positivkontrolle für die PCR-Assays wurde cDNA aus embryonaler RNA (12,5 *dpc*) als Matrize verwendet. Abkürzungen: ntc, no template control.

### 3.2.5.1.6 Differenzierungsdefekt der lymphoiden Linie im CLP-Stadium in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Zur detaillierten Analyse des frühen T und B Zelldefektes von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks dieser Tiere durchflusszytometrisch analysiert.

Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks exprimieren keine Oberflächenproteine differenzierter Zellen und werden als Lineage-negativ (Lin<sup>-</sup>) bezeichnet. So kann anhand von Markerproteinen der hämatopoetischen Linien eine Negativselektion der Stamm- und Vorläuferzellen vorgenommen werden (Antikörper-Mix aus monoklonalen Antikörpern gegen folgende Mausantigene: CD5, CD45R/B220, Mac-1, Gr-1, Ter119 und 7-4). Die verbleibende Fraktion der kleinen,

nicht-granulären Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen enthält neben den hämatopoetischen Stammzellen (hematopoetic stem cell, HSC) auch Vorläuferzellen der myeloischen und lymphoiden Linie (Porse BT *et al.*, 2005). Während der hämatopoetischen Differenzierung wird ausgehend von den HSC zuerst die Population der MPP gebildet, die sich in die Megakaryozyt/Erythrozyt Vorläuferzellen (megakaryocyte/erythrocyte progenitor, MEP) und die lymphoid-spezifische multipotente Vorläuferlinie (lymphoid-primed multipotential progenitor, LMPP) verzweigt. Aus der LMPP Population entsteht dann die Population der Granulozyt/Makrophage Vorläuferzellen (granulocyte/macrophage progenitor, GMP) und die CLPs. Aus den MEP entwickeln sich sowohl Megakaryozyten als auch Erythrozyten, während die GMP sich zu Granulozyten oder Makrophagen differenzieren (siehe Abbildung 58) (Kondo M *et al.*, 1997; Akashi K *et al.*, 2000; Laiosa CV *et al.*, 2006).

Die Unterscheidung der Lin<sup>-</sup> Stamm- und Vorläuferzellen des Knochenmarks erfolgt durch eine Expressionsanalyse der Oberflächenproteine Sca-1 (Ly6a; lymphocyte antigen 6 complex, locus A) und c-kit. Die Populationen der HSC und MPP sind durch die hohe Expression von c-kit und Sca-1 (Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>high</sup>c-kit<sup>high</sup>) charakterisiert. Während ihrer Differenzierung zu myeloischen oder lymphoiden Vorläuferzellen wird die Expression von Sca-1 vermindert. Jedoch sind die Vorläuferzellen der myeloischen Linie, zu der die MEP und GMP gehören, durch die hohe Expression von c-kit (Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>low</sup> c-kit<sup>high</sup>) von der CLP Fraktion (Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>low</sup> c-kit<sup>low</sup>) unterscheidbar (Metcalf D, 1999). Weiterhin ist die Fraktion der CLP durch die Expression von IL-7R $\alpha$  identifizierbar (Bhandoola A und Sambandam A, 2006b).

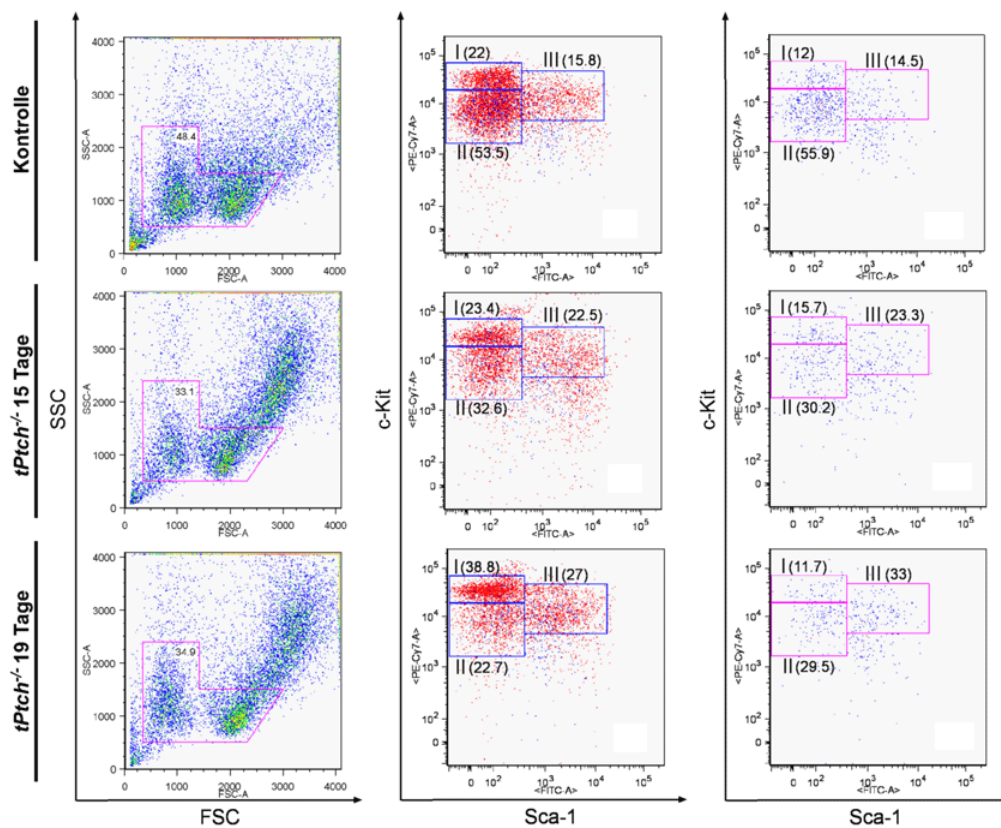
Zur Analyse des frühen T und B Zelldefektes wurden daher Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen anhand von simultanen anti-Sca-1/c-kit/IL-7R $\alpha$  Antikörperfärbungen durchflusszytometrisch analysiert.

Im Vergleich zu Kontrolltieren wurde in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren eine relativ erhöhte Anzahl von Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>high</sup> c-kit<sup>high</sup> Stammzellen und eine reduzierte Anzahl von Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>low</sup> c-kit<sup>low</sup> Vorläuferzellen detektiert (Abbildung 43, Fraktion II). Die Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>low</sup> c-kit<sup>low</sup> Population, welche größtenteils die lymphoiden Vorläuferzellen enthält, benötigt zur weiteren Differenzierung zu CLP die Expression von IL-7R $\alpha$  (Bhandoola A und Sambandam A, 2006b). Im Vergleich zu Kontrolltieren waren in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren die IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>low</sup> c-kit<sup>low</sup> Population deutlich reduziert

(Abbildung 43, blau hervorgehobene Punkte). Der relative Anteil der  $\text{Lin}^- \text{c-kit}^{\text{high}}$   $\text{Sca-1}^{-/\text{low}}$  Population, welcher den Großteil der myeloischen Vorläuferzellen enthält, veränderte sich dagegen nicht (Abbildung 43, Fraktion I) (Okada S *et al.*, 1992; Katayama N *et al.*, 1993; Porse BT *et al.*, 2005).

Diese Daten zeigen, dass die Inaktivierung von *Ptch* zu einem Differenzierungsdefekt der frühen lymphoiden Vorläuferzellen führt. Dieser Defekt muss vor oder während des CLP Stadiums stattfinden, da die  $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^{\text{low}} \text{c-kit}^{\text{low}} \text{IL-7R}\alpha^+$  Population deutlich reduziert ist. Ein Einfluss der *Ptch* Deletion auf die Entwicklung der myeloischen Linie konnte in dieser Analyse nicht festgestellt werden.

Tamoxifen-behandelte *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> Kontrolltiere zeigten keine Abnormitäten der  $\text{Lin}^-$  Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher kann davon ausgegangen werden, dass der beschriebene Tamoxifen-spezifische Effekt auf die B Zellentwicklung (siehe Kapitel 3.2.5.1.4; 3.2.5.1.5) nicht durch die  $\text{Lin}^-$  Knochenmarksfraktion vermittelt wurde.



**Abbildung 43: Abnormale Differenzierung früher B Zellvorläufer im Knochenmark von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Dargestellt sind durchflusszytometrische Analysen von anti-Sca-1/c-kit/IL-7R $\alpha$  gefärbten  $\text{Lin}^-$  Knochenmarkszellen von einer mit Lösungsmittel-behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> Maus (oben) und jeweils einer *tPtch*<sup>-/-</sup> Maus 15 Tage (Mitte) oder 19 Tage (unten) nach der ersten Tamoxifengabe.  $\text{Lin}^-$  Zellen wurden zunächst im SSC/FSC Plot dargestellt (links). Für die weitere Auswertung wurden kleine, nicht-granuläre Zellen gewählt (Porse BT *et al.*, 2005). Die gefärbten Zellen wurden in einer



anti-c-Kit/Sca-1 Auftragung dargestellt (Mitte und rechts). Alle Lin<sup>-</sup> Zellen sind in rot dargestellt und die IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> Zellen sind in blau hervorgehoben. Im rechten Teil der Abbildung sind nur Lin<sup>-</sup> IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen dargestellt. Die markierten Populationen entsprechen den Vorläufern der myeloischen Linie (Fraktion I; Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>high</sup> Sca-1<sup>-low</sup>), der CLP-enhaltenden Fraktion (Fraktion II; Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>low</sup> Sca-1<sup>-low</sup>) und der Population, welche HSC und MPP (Fraktion III, Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>high</sup> Sca-1<sup>high</sup>) enthält. Die relativen prozentualen Anteile der Populationen sind in den Fenstern angegeben. Die gezeigten Daten repräsentieren die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.2.5.1.7 Ungestörte Granulozyten- und Makrophagendifferenzierung und partieller Defekt der Megakaryozyten- und Erythrozytenentwicklung in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Zur detaillierten Analyse des Entwicklungspotentials von myeloischen Vorläuferzellen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen wurde die koloniebildende Aktivität von Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen ermittelt. 15 und 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe wurden 2000 Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen in einem Methylzellosemium über 7 Tage kultiviert und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (colony-forming unit, CFU) ermittelt (2.18.1). Im Vergleich zu Tamoxifen- und Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren wurde kein signifikanter Einfluss der *Ptch* Mutation auf die Differenzierung von Lin<sup>-</sup> Zellen zu Granulozyten/ Erythrozyten/ Makrophagen/ Megakaryozyten (CFU-GEMM), Granulozyten (CFU-G), Makrophagen (CFU-M), Granulozyten/ Makrophagen (CFU-GM) und erythroiden Vorläufern (burst-forming unit-erythroid, BFU-E) festgestellt (Tabelle 22).

An den gleichen Tierkohorten wurde eine Analyse von Zytospin-Präparationen von Gesamtknochenmark von Prof. Dr. C. Binder (Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Onkologie) durchgeführt. Hierbei wurde in den *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren eine starke Reduktion von pro-Erythroblasten beobachtet (Tabelle 23). Die Morphologie und die Anzahl aller anderen Knochenmarkszellen aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren zeigten jedoch keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zu den Kontrollkohorten.

Des Weiteren wurde die Morphologie und Anzahl von Blutzellen aus Vollblutausstrichen und durch automatisierte Zellzählungen analysiert (Dr. T. Heller; Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Klinische Chemie und G. Hindermann; Universität Göttingen, Institut für Humangenetik). Diese Analyse zeigte, dass die peripheren Lymphozyten in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren stark reduziert waren (Tabelle 24).

Dagegen war die Zahl der neutrophilen Granulozyten in den *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren erhöht. Alle anderen Blutzellwerte sowie die Morphologie der Zellen waren unauffällig.

Die normalen Erythrozytenzahlen im Vollblut (Tabelle 24) stehen im Gegensatz zu der beobachteten Reduktion der pro-Erythroblasten im Knochenmark (Tabelle 23). Da jedoch die CFU-GEMM und BFU-E kolonieformende Aktivität von Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren normal war (Tabelle 22) und die Anzahl der kurzlebigen Thrombozyten im Vollblut ebenfalls im Normalbereich lag (Tabelle 24), ruft die Inaktivierung von *Ptch* keinen generellen Entwicklungsdefekt der myeloischen Linie hervor, sondern bewirkt einen spezifischen Entwicklungsdefekt von Erythrozyten-Vorläuferzellen nach dem BFU-E-Stadium.

**Tabelle 22: Auszählung der koloniebildenden Einheiten von Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen (colony forming-unit assay, CFU-Assay).** Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen wurden von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe sowie von Tamoxifen- oder Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren isoliert und in einem Methylzellosemedium kultiviert. Pro Tier wurden 2x 10<sup>3</sup> Lin<sup>-</sup> Zellen in Triplikaten ausgesät. 7 Tage später wurden die entsprechenden Kolonien ausgezählt. Es wurde der prozentuale Anteil der verschiedenen Subpopulationen und der Gesamtkoloniezahl ermittelt. Die Anzahl der so analysierten Tiere ist in Spalte n angegeben. P Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Abkürzungen: CFU, colony-forming unit (koloniebildende Einheit); CFU-GEMM, Granulozyten/ Erythrozyten/Makrophagen/Megakaryozyten; CFU-GM, Granulozyten/ Makrophagen; CFU-G, Granulozyten; CFU-M, Makrophagen; BFU-E, burst-forming unit-erythroid, erythroide Vorläufer.

	Kontrollen			<i>tPtch</i> <sup>-/-</sup>			P Wert
	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	
<b>CFU-GEMM</b>	0,6	0,8	5	0,5	0,5	4	0,810985-
<b>CFU-GM</b>	16,9	6,4	5	13,9	6,8	4	0,312278
<b>CFU-G</b>	45,8	6,0	5	48,5	12,2	4	0,394041
<b>CFU-M</b>	62,8	5,7	5	61,7	15,7	4	0,635421
<b>BFU-E</b>	2,8	1,8	5	2,3	1,4	4	0,533895

**Tabelle 23: Auszählung von pro-Erythroblasten im Knochenmark von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen:** Zytopsin-Präparationen von Gesamt-Knochenmark wurden sowohl aus *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren (15 und 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe) als auch von Tamoxifen- bzw. Lösungsmittel-behandelten Kontrolltieren angefertigt. Nach einer panoptischen Färbung nach Pappenheim wurden die pro-Erythroblasten/500 Zellen ausgezählt. Da sich die Anzahl der pro-Erythroblasten von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren 15 und 19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe nicht unterschieden, wurden die Werte der Auszählung in der Tabelle zusammengefasst. Die Anzahl der jeweils analysierten Tiere ist in Spalte n angegeben. P Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Es wurde ein signifikanter Unterschied (P Wert <0,05) zwischen der pro-Erythroblastenanzahl von *tPtch*<sup>-/-</sup> und Kontrolltieren festgestellt.

	Kontrollen			<i>tPtch</i> <sup>-/-</sup>			
	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	P Wert
pro-Erythroblasten [Anzahl/500 Zellen]	99,3	9,3	4	38,5	6,7	4	0,000008

**Tabelle 24: Differentialblutbild von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen:** In Vollblut (gewonnen aus Herzpunktionen oder aus dem Augenhintergrund) von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren (19 Tage nach der ersten Tamoxifengabe) und Tamoxifen-behandelten Kontrolltieren wurden der Hämatokrit- und der Hämoglobingehalt automatisch bestimmt. Das Differentialblutbild wurde entweder von Blutaussstrichen ausgezählt oder aber automatisch bestimmt. Die Quantifizierung der Retikulozyten erfolgte wie unter 2.18.2.2 beschrieben. Die Anzahl der analysierten Tiere ist in Spalte n angegeben. P Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Parameter, bei denen signifikante Unterschiede (P Wert <0,05) zwischen *tPtch*<sup>-/-</sup> und Kontrolltieren festgestellt wurden, sind grau unterlegt. Abkürzungen: Hkt, Hämatokrit; Hgb, Hämoglobin; Ery, Erythrozyten; Re, Retikulozyten; Leu, Leukozyten; Thr, Thrombozyten; Ne, neutrophile Granulozyten; Ly, Lymphozyten; Mo, Monozyten; Eo, eosinophile Granulozyten; Ba, basophile Granulozyten.

	Kontrollen			<i>tPtch</i> <sup>-/-</sup>			
	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	Mittelwert	Mittelwert-abweichung	n	P Wert
Hkt [%]	42,5	2,8	7	40,9	6,2	5	0,663133
Hgb [g/dl]	13,4	0,6	6	13,1	1,8	5	0,810412
Ery [ $\times 10^6/\text{mm}^3$ ]	9,4	1,6	7	8,0	1,2	5	0,306530
Re [%]	40,5	19,6	10	33,8	5,6	4	0,266562
Leu [ $\times 10^3/\text{mm}^3$ ]	6,1	1,9	7	7,7	3,8	5	0,517902
Thr [ $10^5/\text{mm}^3$ ]	287,0	187,7	6	319,6	147,5	5	0,806576
Ne [%]	25,7	9,1	11	47,4	17,1	7	0,010858
Ly [%]	65,5	8,3	11	39,0	9,1	8	0,000164
Mo [%]	4,1	3,2	11	3,0	1,9	8	0,521337
Eo [%]	2,0	1,9	11	4,0	4,1	7	0,341399
Ba [%]	2,8	2,4	11	5,9	4,5	7	0,142791

### 3.2.5.2 Versuch der Induktion von RMS in *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT*<sup>+/-</sup> Mäusen

Bei der Bestimmung der Rekombinationseffizienz des *Ptch*<sup>NX</sup> Locus in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren wurde gezeigt, dass durch die systemische Tamoxifengabe eine effiziente Rekombination des *Ptch*<sup>NX</sup> Locus in vielen Geweben, einschließlich der Haut und der Skelettmuskulatur induziert wird (Abbildung 26; Abbildung 27). Das Zeitfenster von der Induktion der Rekombinase bis zum Tod der Tiere (maximal 23 Tage) war jedoch für eine eindeutige Tumorentwicklung in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen zu klein. Die Tumorigenese konnte daher in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren nicht untersucht werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, wird vermutet, dass sich RMS aus Satellitenzellen entwickeln. Falls diese Hypothese stimmen sollte, müsste es möglich sein, durch das gezielte Ausschalten von *Ptch* in diesen Zellen RMS zu induzieren.

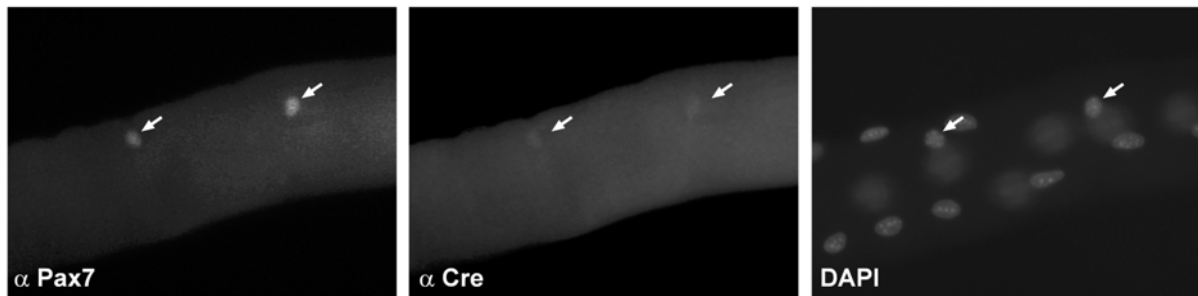
Um zu überprüfen, ob die hier verwendeten ERT2-Mäuse für eine solches Experiment geeignet sind und auch tatsächlich Cre-Rekombinase in Satellitenzellen exprimieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Muskelfasern aus 6 Wochen alten *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen durchgeführt. Durch die simultane Färbung mit Antikörpern gegen Cre-Rekombinase und dem Satellitenzellmarker Pax7 (Seale P *et al.*, 2000; Relaix F *et al.*, 2005; Kuang S *et al.*, 2006) wurde die Expression der *ERT2* Rekombinase in Satellitenzellen nachgewiesen (Abbildung 44).

Um auch die induzierbare Aktivität der CreERT2-Rekombinase nach Tamoxifengabe in Satellitenzellen in *ERT2* Mäusen zu dokumentieren, wurden Kryostatschnitte von Skelettmuskeln (*musculus soleus*) aus doppelt heterozygoten *ROSA26-R*<sup>+/-</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> (*ROSA26-R* Reportermauslinie, siehe Kapitel 3.3.1.2.1) Tieren nach intramuskulärer Tamoxifeninjektion (einmalige Dosis: 100 µg Tamoxifen in 10 µl Lösungsmittel) mit Antikörpern gegen Pax7 und β-Galaktosidase analysiert. Wie Abbildung 45 zeigt, wurde durch die Aktivierung der CreERT2-Rekombinase mit Tamoxifen eine Expression der β-Galaktosidase in Satellitenzellen (Pax7-positive Zellen), aber auch in anderen Zellen des Skelettmuskels, detektiert.

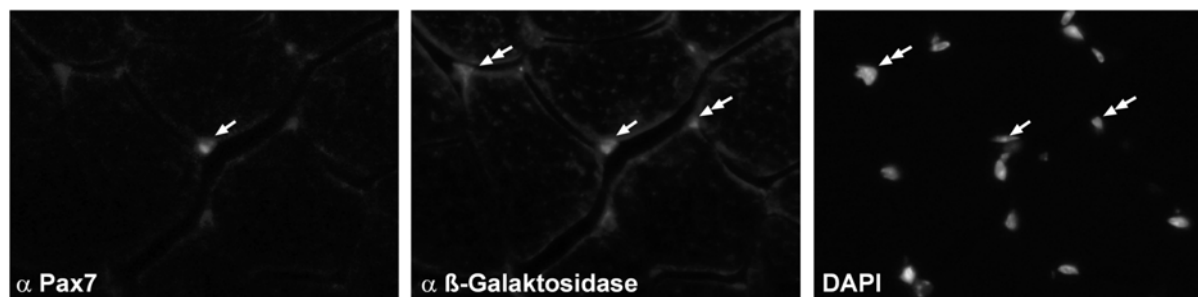
Aufgrund dieser Daten wurde in einem Pilotexperiment untersucht, ob sich a) in diesen Tieren durch eine solche Behandlung Muskeltumoren induzieren lassen und b) ob die lokale Injektion von 100 µg Tamoxifen in *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäuse einen systemischen Effekt hat und den unter 3.2.5.1 beschriebenen Phänotyp hervorruft .

Dazu wurden Tiere des Genotyps *Ptch*<sup>NX/+</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> und *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> im Alter von 6 Wochen einmalig 100 µg Tamoxifen intramuskulär (in den *musculus soleus*)

injiziert. Als Kontrolle wurden Tiere des gleichen Genotyps mit 10  $\mu$ l des Lösungsmittels behandelt. Um Sekundäreffekte durch Tamoxifen ausschließen zu können, wurden auch Mäuse der Genotypen *Ptch*<sup>NX/+</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> und *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>-/-</sup> mit Tamoxifen behandelt. Alle Tiere wurden nach der Behandlung engmaschig beobachtet. Bis zum Abschluss dieser Arbeit hatte keines der analysierten Tiere Weichteiltumoren entwickelt.



**Abbildung 44: Expression der CreERT2-Rekombinase in Satellitenzellen von *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen.** Dargestellt ist die simultane Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Pax7 (links) und anti-Cre-Rekombinase (Mitte) Antikörpern von fixierten einzelnen Muskelfasern einer *ERT2*<sup>+/-</sup> Maus. Die gefärbten Muskelfasern wurden in einem DAPI-enthaltenden Montagemedium (rechts) eingedeckt. Die Pfeile markieren Pax7 positive Satellitenzellen, die gleichzeitig CreERT2-Rekombinase exprimieren.



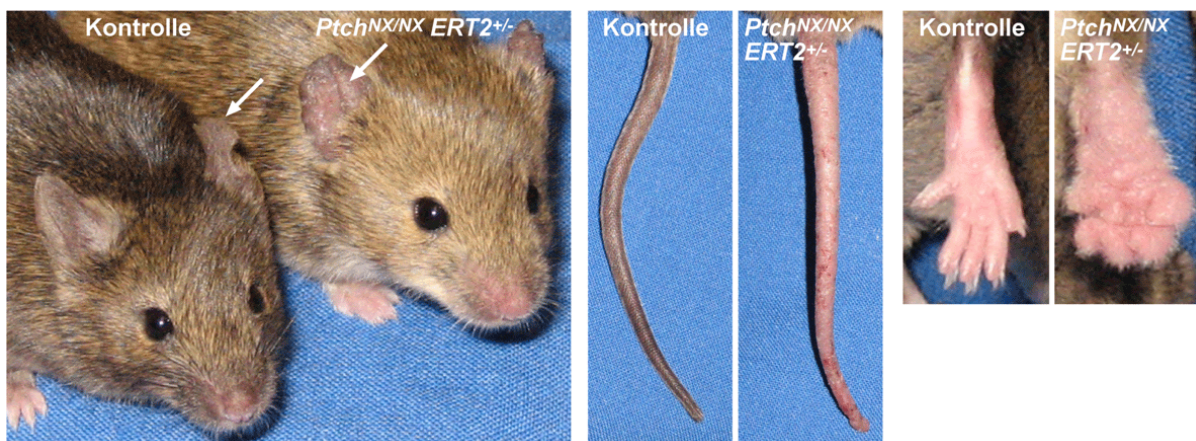
**Abbildung 45: Expression der  $\beta$ -Galaktosidase in Satellitenzellen von *ROSA26-R*<sup>+/-</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen nach intramuskulärer Tamoxifengabe (100  $\mu$ g).** Dargestellt ist die simultane Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Pax7 (links) und anti- $\beta$ -Galaktosidase (Mitte) Antikörpern an Kryostatschnitten des Muskels einer *ROSA26-R*<sup>+/-</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Maus 10 Tage nach intramuskulärer Tamoxifengabe. Die gefärbten Schnitte wurden in einem DAPI-enthaltenden Montagemedium (rechts) eingedeckt. Die einfachen Pfeile markieren eine  $\beta$ -Galaktosidase exprimierende, Pax7 positive Satellitenzelle, während die Doppelpfeile auf  $\beta$ -Galaktosidase exprimierende, Pax7 negative Muskelzellkerne weisen.

### 3.2.5.3 Induktion von Basaliomen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

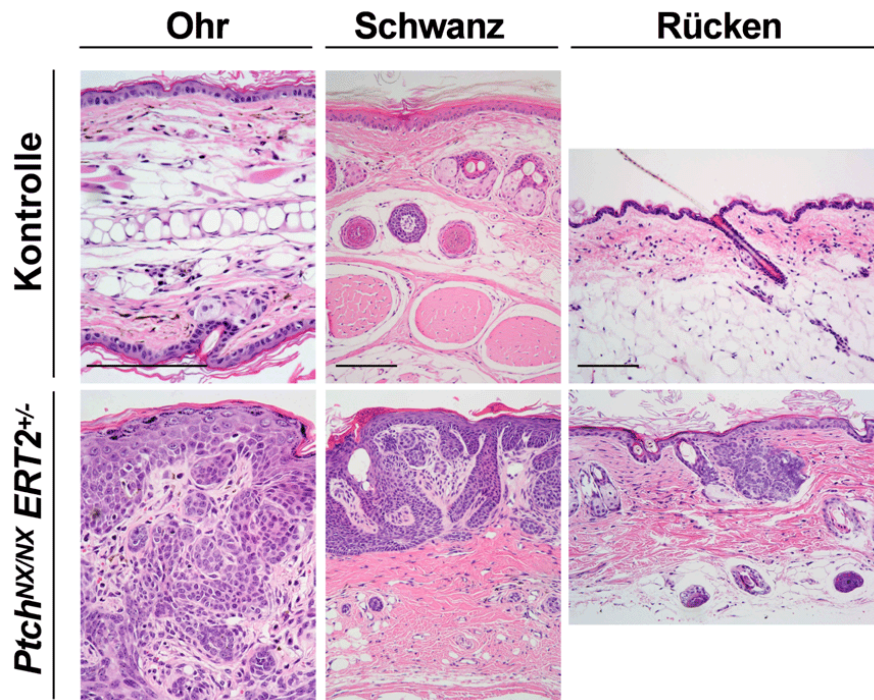
Interessanterweise wurden 1,5 bis 2 Monate nach der intramuskulären Tamoxifengabe bei den *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tieren (9 von 10 Tieren) hyperproliferative

Hautveränderungen an Ohren, Schwanz und auch an der Haut der Plantarseite der Pfoten beobachtet (Abbildung 46). Keines der Tamoxifen-behandelten *Ptch<sup>NX/+</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* oder Lösungsmittel-behandelten *Ptch<sup>NX/NX</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* Tiere zeigten diese Hautveränderungen.

Histologische Untersuchungen der Hautveränderungen zeigten, dass durch die einmalige intramuskuläre Gabe von 100 µg Tamoxifen in *Ptch<sup>NX/NX</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* Mäuse in gering behaarten Hautbereichen Basaliome entstehen (Abbildung 47, links und Mitte). Erst 6 Monate nach der Tamoxifengabe wurden auch erste hyperproliferative Veränderungen an der behaarten Haut der Tiere beobachtet (Abbildung 47, rechts). Im Gegensatz zu *tPtch<sup>-/-</sup>* Mäusen entwickelten die intramuskulär behandelten Tiere keinen starken Putztrieb. Die Tiere zeigten auch keine auffälligen Gewichts- oder Fellverluste (siehe Abbildung 28). Ebenso wurden keine Auffälligkeiten bei durchflusszytometrischen Analysen von Knochenmark, Milz und Thymus detektiert (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 46:** Die intramuskuläre Injektion von 100 µg Tamoxifen in *Ptch<sup>NX/NX</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* Mäuse induziert die Tumorigenese von Basaliomen an unbehaarten Hautarealen. Dargestellt sind ein *Ptch<sup>NX/NX</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* Tier 2 Monate nach der intramuskulären Tamoxifeninjektion und ein Lösungsmittel-behandeltes *Ptch<sup>NX/NX</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* Tier (Kontrolle). Die weißen Pfeile markieren die Ohren der beiden Tiere. Weiterhin sind die Schwänze und die Plantarflächen der Pfoten beider Tiere gezeigt. Die hyperproliferativen Veränderungen des Tamoxifen-behandelten Tieres sind sowohl an Ohren, Schwanz und Fuß makroskopisch sichtbar.



**Abbildung 47: Die intramuskuläre Injektion von 100 µg Tamoxifen in *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäuse induziert die Tumorigenese von Basaliomen.** Dargestellt sind HE-Färbungen von Ohr- (links), Schwanz- (Mitte) und Rücken- (rechts) eines *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tiers 6 Monate nach der intramuskulären Tamoxifeninjektion und eines Lösungsmittel-behandeltes *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tiers (Kontrolle). Die Entstehung von Basaliomen ist sowohl an Ohr-, Schwanz- und Rücken- (rechts) erkennbar. Die Balken entsprechen 2 mm im Präparat.

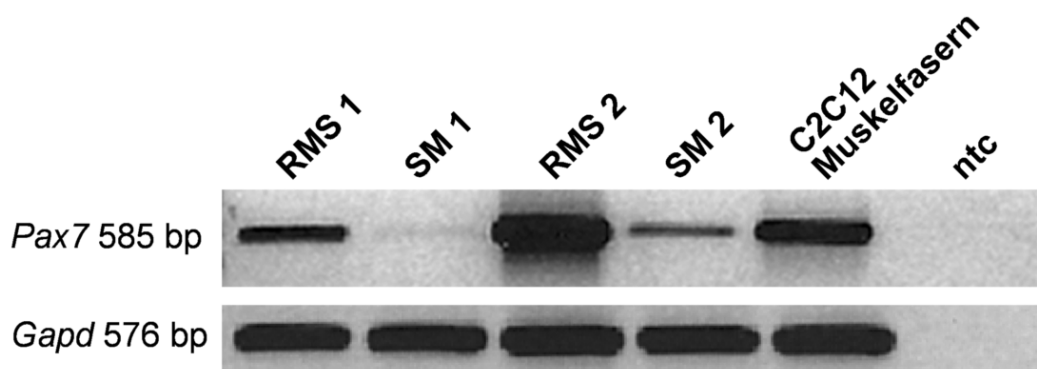


### 3.3 Herstellung der *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mauslinien

#### 3.3.1 *Pax7* spezifische Expression einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase

Mit Hilfe des konditionellen *Ptch* knock-outs sollte es möglich sein, die Ursprungszelle des RMS zu definieren. Da angenommen wird, dass RMS aus den adulten Stammzellen des Muskels, den Satellitenzellen, entstehen, sollte hierzu eine Maus generiert werden, die in diesen Zellen eine induzierbare Cre-Rekombinase exprimiert. Diese Maus sollte dann mit *Ptch<sup>NX/NX</sup>* Mäusen gekreuzt werden. Die Induktion der Cre-Rekombinase (z. B. durch Tamoxifen) sollte es erlauben, *Ptch* spezifisch in Satellitenzellen zu deletieren.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wurde der *Pax7* Promotor zur Expression einer induzierbaren Cre-Rekombinase gewählt. Dies resultiert aus der Tatsache, dass *Pax7* nicht nur in Satellitenzellen exprimiert wird, sondern für die Entwicklung dieser Zellen auch essentiell ist. Wie in Abbildung 48 gezeigt, wird *Pax7* auch in *Ptch*-assoziierten RMS aus *Ptch<sup>neo67/+</sup>* Mäusen exprimiert.

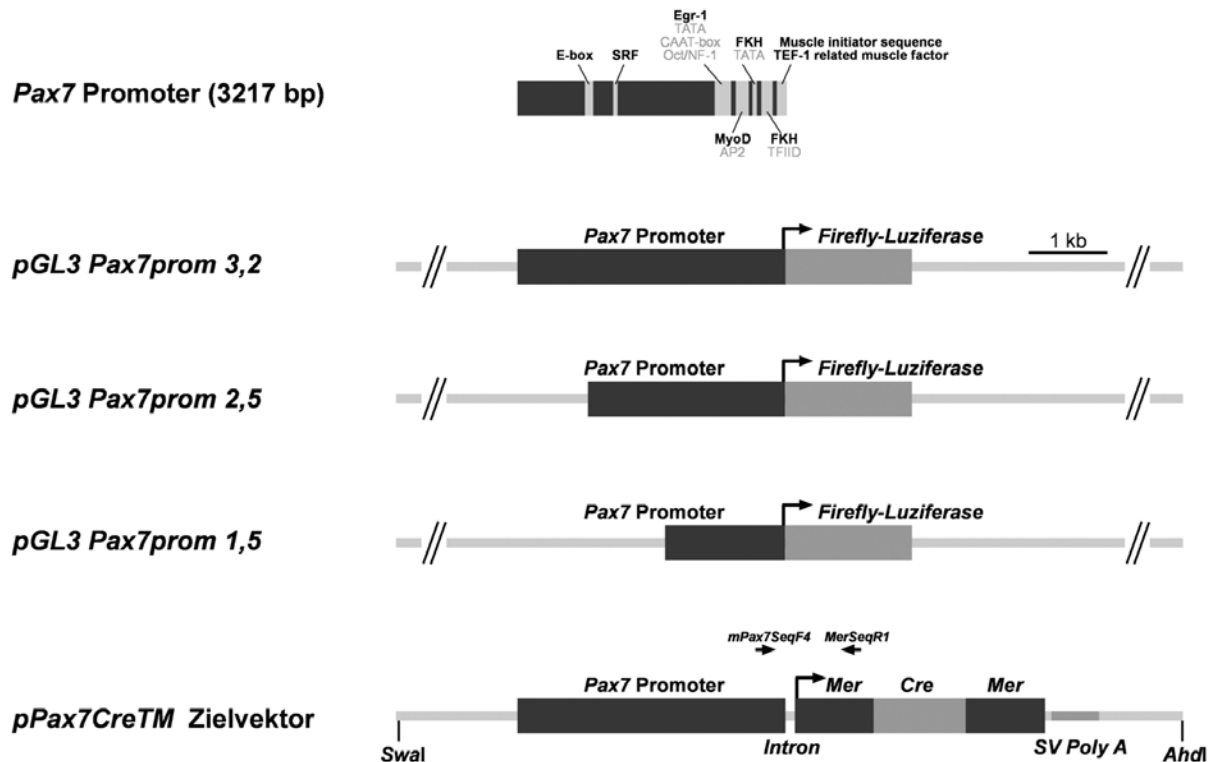


**Abbildung 48: *Pax7* Expression in *Ptch*-assoziierten RMS.** RT-PCR-Analyse von cDNA aus Gesamt-RNA von RMS und entsprechendem Skelettmuskel (SM) von *Ptch<sup>neo67/+</sup>* Tieren. Als Positivkontrolle wurde cDNA aus differenzierten Muskelfasern der myogenen Zelllinie C2C12 verwendet. Für die Amplifikation der murinen *Pax7* Transkripte wurde mit dem Oligonukleotidpaar *mPax7-F1/mPax7-R1* gearbeitet (Tabelle 10). Als Kontrolle der cDNA-Matrizen diente die Amplifikation von *Gapd* Transkripten. Abkürzungen: ntc, no template control.

Zur Herstellung einer transgenen Mauslinie, welche unter Kontrolle des *Pax7* Promotors eine induzierbare Cre-Rekombinase exprimiert, wurde zunächst ein 3217 bp langes Fragment aus genomischer Maus DNA isoliert. Dieses Fragment beinhaltet laut National Center for Biotechnology Information (NCBI;



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) den *Pax7* Promotor (Abbildung 49) und wurde, wie auch mehrere am 5'-Ende deletierte Fragmente, für *in vitro* Analysen in den *pGL3-basic* Vektor kloniert (siehe Kapitel 2.15.7.2.1). Die Promotor-Luziferase Konstrukte sind in Abbildung 49 dargestellt. Nach der funktionellen Analyse der Konstrukte (siehe Kapitel 3.3.1.1) wurde das Plasmid *pPax7Cre<sup>TM</sup>* hergestellt (siehe Kapitel 2.15.7.2.2), welches ebenfalls in Abbildung 49 gezeigt ist.



**Abbildung 49: Schematische Darstellung des murinen *Pax7* Promotors, der Luziferase Reporterkonstrukte sowie des Plasmids *pPax7Cre<sup>TM</sup>*.** Das analysierte Promotor Fragment umfasst 3217 bp des proximalen murinen *Pax7* Promotors (obere Zeile). Bindestellen (graue Boxen) für allgemeine (grau Lettern) und gewebespezifische (fette, schwarze Lettern) Transkriptionsfaktoren wurden durch Datenbankanalysen der Promotorsequenz bestimmt (MatInspector).

Die analysierten *Pax7* Luziferase Reporterplasmide (*pGL Pax7prom 3,2*; *pGL Pax7prom 2,5*; *pGL3 Pax7prom 1,5*) enthalten 3217 bp; 2489 bp bzw. 1499 bp des proximalen murinen *Pax7* Promotors. Hierbei wurde der endogene *Pax7* Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil) direkt mit dem des *Firefly* Luziferasegens verbunden.

Der *pPax7Cre<sup>TM</sup>* Zielvektor enthält 3217 bp des proximalen murinen *Pax7* Promotors. Anschließend enthält das Plasmid ein chimeres Intron, das Gen der induzierbaren *MerCreMer*-Rekombinase (Verrou C *et al.*, 1999) und eine *Siamian Virus 40*-Polyadenylierungssequenz (*SV Poly A*). Es wurde so kloniert, dass die Position des endogenen *Pax7* Translationsstartcodons dem der *MerCreMer* Rekombinase entspricht. Zur Herstellung *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* transgener Mäuse wurde der Zielvektor mit den Restriktionsendonukleasen *Swal/Ec/Hkl* (*AhdI*) linearisiert. Mit dem Oligonukleotidpaar

*mPax7SeqF4/MerSeqR1* wurde die Mauslinie *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* genotypisiert. Die exakten Klonierungsstrategien der Plasmide sind unter 2.11.3 beschrieben.

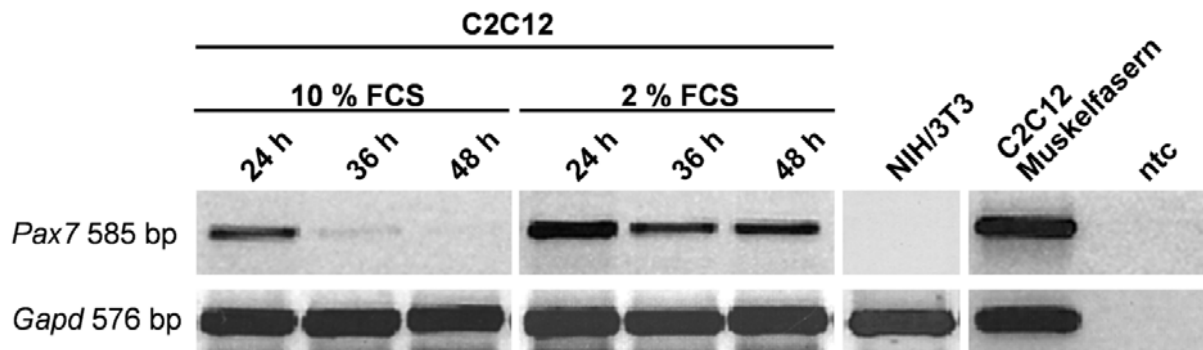
Abkürzungen: E-box, typische Proteinbindungsdomäne für myogene Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren; SRF, Proteinbindungsdomäne für das Protein serum response factor; Egr-1, Proteinbindungsdomäne für das Protein early growth response 1; TATA, Proteinbindungsdomäne für das Protein TATA-binding protein, welches die DNA-bindende Untereinheit des TFIID darstellt; CAAT-box, für eine erfolgreiche Transkription notwendige eukaryotische Promotersequenz; Oct, Proteinbindungsdomäne für Transkriptionsfaktoren mit POU Domänen; NF-1, Proteinbindungsdomäne für das Protein nuclear factor-1; MyoD, Proteinbindungsdomäne für das Protein myogenic differentiation 1, welches in proliferierenden Myoblasten und differenzierten Muskelfasern exprimiert wird und als transkriptioneller Aktivator von Muskel-spezifischen Genen agiert; AP-2, Proteinbindungsdomäne für das Protein activator protein 1; FKH, Proteinbindungsdomäne für fork head Transkriptionsfaktoren, die während der Entwicklung des frühen Embryogenese und im Nervensystem adulter Tiere exprimiert werden; TFIID, Proteinbindungsdomäne neben der TATA-Box für den Transkriptionsfaktor IID.

### **3.3.1.1 *In vitro* Analyse des murinen *Pax7* Promotors**

#### **3.3.1.1.1 Expression von *Pax7* in der Zelllinie C2C12**

Für *in vitro* Analysen der klonierten *Pax7* Promoter-Luziferase Reporterkonstrukte wurde die murine Zelllinie C2C12 ausgewählt, die durch Kultivierung von murinen Myoblasten entstanden ist (Yaffe D und Saxel O, 1977). Die Zelllinie wurde auf endogene Expression von *Pax7* durch RT-PCR-Analysen an cDNA überprüft (Murmann OV *et al.*, 2000). Abbildung 50 zeigt, dass C2C12 Zellen vor allem bei niedrigen Serumkonzentrationen (2 % FCS) und bei zusätzlicher hoher Zelldichte (Daten nicht gezeigt) eine starke *Pax7* Expression aufweisen.

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle nachfolgenden *in vitro* Experimente an C2C12 Zellen bei hoher Zelldichte und niedrigen Serumkonzentrationen durchgeführt. Als negative Kontrollzelllinie wurden NIH/3T3 eingesetzt, da diese keine endogene *Pax7* Expression zeigen (siehe Abbildung 50).

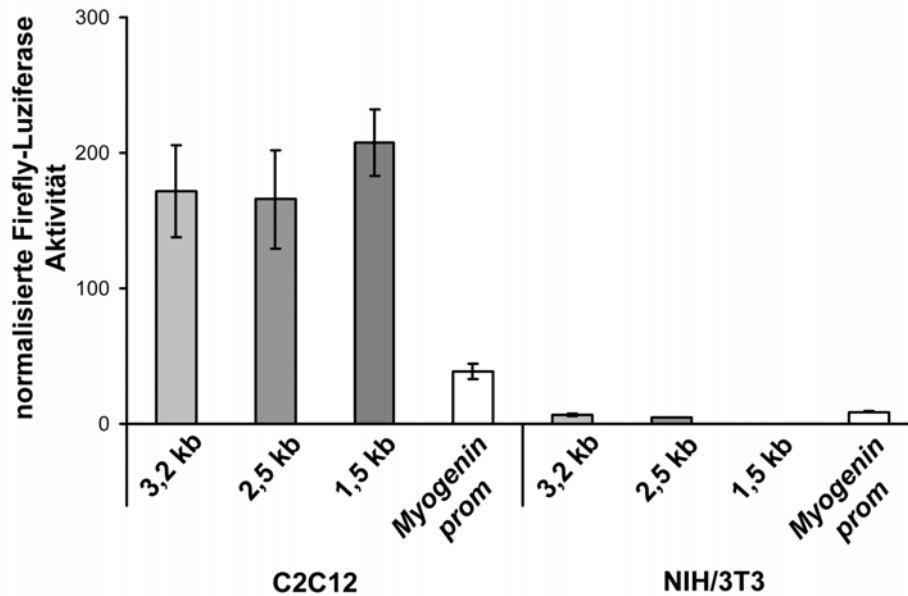


**Abbildung 50: Pax7 Expression der myogenen Zelllinie C2C12.** RT-PCR-Analysen an cDNA von C2C12 Zellen bei hohen (10 % FCS) und niedrigen (2 % FCS) Serumkonzentrationen. Als Positivkontrolle wurde cDNA aus Muskelfasern von differenzierten C2C12 Zellen eingesetzt. Außerdem wurde die Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 auf Pax7 Expression untersucht. Für die Amplifikation der murinen Pax7 Transkripte wurde mit dem Oligonukleotidpaar *mPax7-F1/mPax7-R1* gearbeitet. Als Kontrolle der cDNA-Matrizen diente die Amplifikation von *Gapd* Transkripten. Abkürzungen: FCS, fetal calf serum (fötales Kälberserum); ntc, no template control.

### 3.3.1.1.2 *In vitro* Analyse der Pax7 Luziferase Reporterplasmide

Zur *in vitro* Expressionsanalyse der Pax7 Luziferase Reporterkonstrukte (*pGL3 Pax7prom 3,2*; *pGL3 Pax7prom 2,5*, *pGL3 Pax7prom 1,5*; Abbildung 49) wurden diese zusammen mit dem Plasmid *pRL-CMV* in die Zelllinien C2C12 und NIH/3T3 co-transfiziert. 48 h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen abgeerntet und die Zelllysate mit dem Dualen-Luziferase-Assay analysiert.

Als Positivkontrolle wurde das Plasmid *pGL MG-185* (Expression der Luziferase unter Kontrolle des *Myogenin* Minimalpromotors, aktiv in C2C12 Zellen) (Ohto H *et al.*, 1999) und als Negativkontrolle der Leervektor *pGL3-basic* transfiziert. Abbildung 51 zeigt die Luziferasemessung aus 2 unabhängigen, jeweils in Triplets durchgeführten Experimenten. Die gemessenen Werte wurden auf die Aktivität der Renilla Luziferase (*pRL-CMV* Vektor) normalisiert. Die Grundaktivität des *pGL3-basic* Leervektors wurde subtrahiert. Alle analysierten Reporterplasmide exprimierten die Firefly Luziferase auf hohem, nahezu gleichem Niveau in C2C12 Zellen. Hingegen wurde fast keine Expression in den nicht-myogenen NIH/3T3 Zellen induziert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen nicht-myogenen Zelllinien (A673; 10T1/2) erzielt (Daten nicht gezeigt). Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass der klonierte Pax7 Promotor spezifisch im myogenen Zellen exprimiert wird.



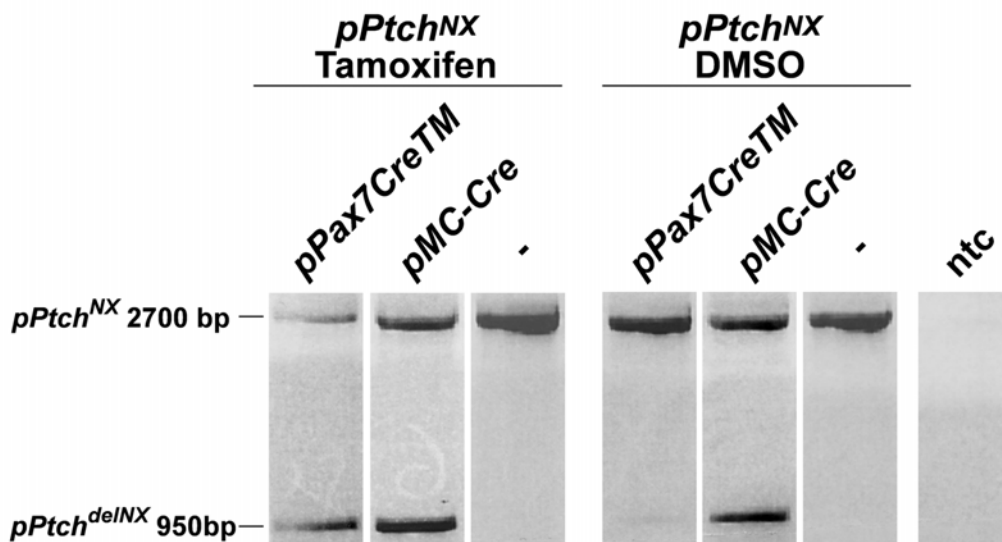
**Abbildung 51: Dualer-Luziferase-Assay zur Analyse der Pax7 Luziferase Reporterplasmide.** Co-Transfektionen der Pax7 Luziferase Reporterplasmide (3,2 kb, pGL3 Pax7prom 3,2; 2,5 kb, pGL3 Pax7prom 2,5; 1,5 kb, pGL3 Pax7prom 1,5) mit pRL-CMV in die Zelllinien C2C12 und NIH/3T3. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pGL MG-185 (Myogenin prom) mit pRL-CMV co-transfiziert. Die Mittelwerte wurden aus 2 unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden, errechnet. Die Expression wurde auf die Aktivität der Renilla Luziferase normalisiert. Die Grundaktivität des Leervektors pGL3-basic wurde subtrahiert.

### 3.3.1.1.3 In vitro Analyse des pPax7CreTM Plasmids

Abbildung 49 zeigt die Struktur des linearisierten pPax7CreTM Plasmids. Es beinhaltet 3217 bp der 5'-Sequenz des murinen Pax7 Promotors. Daran schließt ein chimeres Intron an. Dann folgt das synthetische Gen der Tamoxifen-induzierbaren MerCreMer-Rekombinase (Verrou C *et al.*, 1999). Hierbei entspricht die Position des endogenen Pax7 Translationsstartcodons der des MerCreMer Rekombinase Gens. Aus dem Expressionsplasmid pAN MerCreMer (zur Verfügung gestellt von M. Reth, Max-Planck-Institut für Immunobiologie, Freiburg) wurde die SV 40 Poly A Sequenz übernommen.

Die pPax7CreTM-vermittelte Rekombination des konditionellen pPtc<sup>NX</sup> Zielvektors (Abbildung 17) wurde zunächst *in vitro* auf DNA-Ebene durch Co-Transfektion beider Plasmide in C2C12 Zellen dokumentiert. 24 h nach der Transfektion wurde die exprimierte MerCreMer-Rekombinase (im Weiteren als CreTM-Rekombinase bezeichnet) durch Zugabe von 10 µM Tamoxifen (in DMSO) zum Medium induziert. Nach weiteren 24 h wurde die Gesamt-DNA der Zellen isoliert und durch PCR-

Analysen mit dem Oligonukleotidpaar *Exon7-F/Neo-R* (Tabelle 10; Abbildung 17) analysiert. Abbildung 52 zeigt die Rekombination des *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektors durch die induzierte Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase (Spur 1; *pPtch<sup>delNX</sup>* 950 bp). Durch Zugabe von reinem Lösungsmittel (DMSO) wurde dagegen keine Rekombination festgestellt (Spur 4; *pPtch<sup>NX</sup>* 2700 bp). Als Kontrolle wurde das *pMC-Cre* Plasmid mit dem *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektor co-transfiziert (Abbildung 52; Spur 2 und 5).



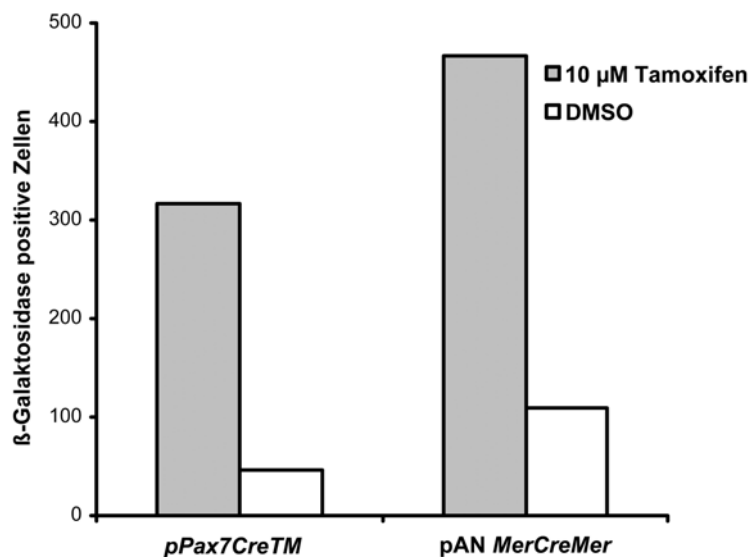
**Abbildung 52: Tamoxifen-induzierte Rekombination des *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektors durch Co-Transfektion mit dem *pPax7Cre<sup>TM</sup>* Plasmid.** Der *pPtch<sup>NX</sup>* Zielvektor wurde mit dem Plasmid *pPax7Cre<sup>TM</sup>* oder mit *pMC-Cre* in C2C12 Zellen co-transfiziert. Die Zellen wurden mit 10  $\mu$ M Tamoxifen oder Lösungsmittel (DMSO) behandelt. Die Gesamt-DNA der Zellen wurde isoliert und mit dem Oligonukleotidpaar *Exon7-F/Neo-R* (Tabelle 10; Abbildung 17) mittels PCR analysiert. Abkürzungen: ntc, no template control.

Die Induzierbarkeit und die Grundaktivität („leakyness“) der durch *pPax7Cre<sup>TM</sup>* exprimierten Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase wurde des Weiteren auch durch die Co-Transfektion mit dem Reporterplasmid *ploxNeolox $\beta$ Gal* bestimmt. Die Transfektion wurde an C2C12 Zellen durchgeführt. Als Kontrollplasmid wurde *pAN MerCreMer* eingesetzt. 24 h nach der Transfektion der Zellen wurde Tamoxifen (10  $\mu$ M) oder Lösungsmittel zum Medium gegeben. In Folge der Cre-vermittelten Rekombination des *ploxNeolox $\beta$ Gal* Plasmids wurde  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert, deren Enzymaktivität 24 h nach Zugabe von Tamoxifen durch X-Gal-Färbung nachgewiesen wurde. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Alle  $\beta$ -Galaktosidase positiven Zellen aus  $1 \times 10^5$  ausgesähten Zellen pro Platte wurden

ausgezählt. Nach alleiniger Transfektion des *ploxNeoloxβGal* Reporterplasmids wurde keine X-Gal-Färbung detektiert (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 53 zeigt, dass die Grundaktivität der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase sowohl in *pPax7Cre<sup>TM</sup>* als auch in *pAN MerCreMer* transfizierten Zellen gering ist. Durch Zugabe von Tamoxifen wurde ein fast 7-facher Aktivitätsanstieg der vom *pPax7Cre<sup>TM</sup>* Plasmid exprimierten Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erreicht. Die Induktion der Cre-Rekombinase des verwendeten Kontrollplasmids war dagegen geringer (4,2-fache Induktion durch Tamoxifen). Unspezifische Effekte durch die Tamoxifenzugabe zum Medium wurden durch Co-Transfektion einer konstitutiv aktiven Cre-Rekombinase (*pMC-Cre*) mit dem Reporterplasmid *ploxNeoloxβGal* ausgeschlossen. Es wurde auch keine unspezifische Rekombination durch Tamoxifen induziert (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das *pPax7Cre<sup>TM</sup>* Plasmid eine funktionelle, Tamoxifen-induzierbare Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase exprimiert, welche auch den *Ptch<sup>NX</sup>* Locus effizient rekombiniert.



**Abbildung 53: Tamoxifen-induzierte Rekombination des *ploxNeoloxβGal* Reporterplasmids durch Expression *pPax7Cre<sup>TM</sup>*.** Das *ploxNeoloxβGal* Reporterplasmid wurde mit *pPax7Cre<sup>TM</sup>* oder *pAN MerCreMer* in  $1 \times 10^5$  C2C12 Zellen co-transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mit 10 μM Tamoxifen oder DMSO behandelt (die Zugabe erfolgte 24 h nach der Transfektion). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit X-Gal gefärbt. Alle β-Galaktosidase-positiven Zellen wurden ausgezählt. Die Daten repräsentieren die Summe aller β-Galaktosidase positiven Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.3.1.2 Herstellung von *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* transgenen Mäusen

Transgene *Pax7Cre<sup>TM</sup>* Mäuse (*Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)*) wurden, wie unter 2.19.1.3 beschrieben, etabliert. In Kapitel 3.3.1.1.3 wird die Klonierungsstrategie des hierzu verwendeten Vektors beschrieben. Abbildung 49 zeigt die Struktur des linearisierten *pPax7Cre<sup>TM</sup>* Zielvektors.

Aus der Injektion des Vektors in befruchtete FVB/N und C57BL/6N Oozyten gingen 7 Tiere hervor, bei welchen das Plasmid in das Genom integriert worden war. Durch die Verpaarung dieser „Founder“ Tiere mit C57BL/6N wt Tieren konnten 4 unabhängige transgene *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linien etabliert werden (im Folgenden als Linien #14, #54, #21, #27 bezeichnet).

Die Integration des *Pax7Cre<sup>TM</sup>* Transgens wurde durch PCR-Analysen mit dem Oligonukleotidpaar *mPax7seqF4/MerSeqR1* an genomischer DNA aus Schwanzbiopsien überprüft (Tabelle 10; Abbildung 49).

Alle transgenen Linien wurden den im Folgenden beschriebenen Expressionsanalysen unterzogen. Als Kontrolle für die endogene Expression von *Pax7* während der Embryonalentwicklung und im adulten Tier wurde mit der Mauslinie *Pax7G4* gearbeitet. Diese Linie exprimiert unter dem endogenen *Pax7* Promotor  $\beta$ -Galaktosidase (Mansouri A *et al.*, 1996).

#### 3.3.1.2.1 *In vivo* Analysen der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinaseexpression in *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mäusen

Die Expression und Funktionalität der transgenen Linien wurden durch eine Verpaarung mit *ROSA26-R* Reportertermäusen (Soriano P, 1999) überprüft. Bei dieser Mauslinie wird eine *loxP*-Sequenz-flankierte *Neomycin*-Resistenzkassette mit nachgeschaltetem  $\beta$ -Galaktosidasegen vom endogenen *ROSA26* Locus aus exprimiert (Friedrich G und Soriano P, 1991). Nach Deletion der *Neomycin*-Resistenzkassette durch Cre-vermittelte Rekombination wird das  $\beta$ -Galaktosidasegen ubiquitär exprimiert.

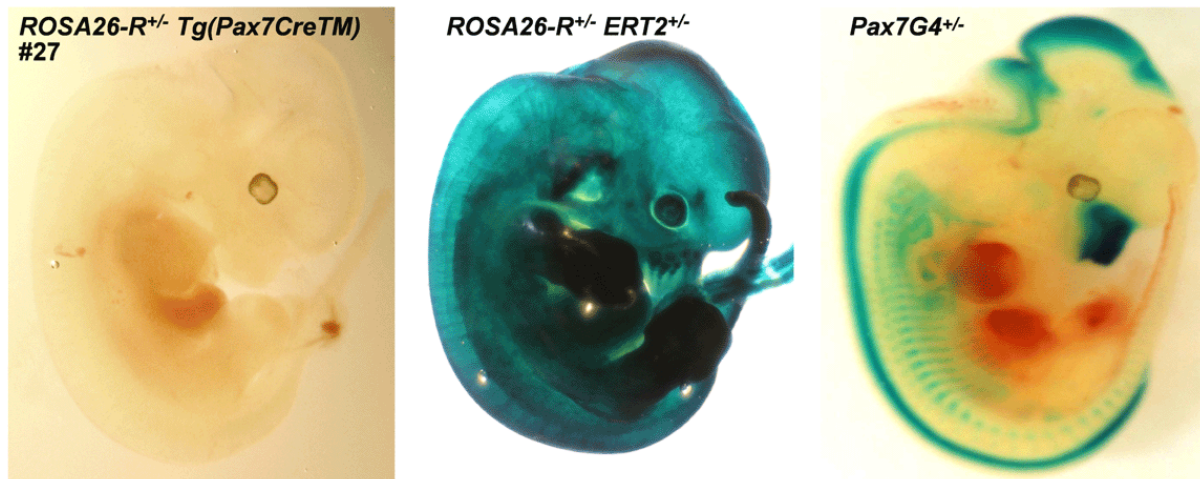
### 3.3.1.2.1.1 Keine Aktivität der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase im Embryo

Zur Analyse der Expression der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase während der Embryonalentwicklung wurden männliche *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Tiere mit heterozygoten *ROSA26-R<sup>+/-</sup>* Weibchen verpaart (Soriano P, 1999). Befruchtete Weibchen wurden durch Vaginalplaques identifiziert und von den Männchen isoliert. Die Induktion der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase in den Embryonen erfolgte *in utero* durch zweimalige intraperitoneale Injektion der Mütter mit je 1 mg Tamoxifen zum Zeitpunkt 8,5 *dpc* und 9,5 *dpc* oder 11,5 *dpc* und 12,5 *dpc*.

In einem Kontrollexperiment wurden auch Embryonen einer Kreuzung von männlichen heterozygoten *ROSA26CreERT2<sup>+/-</sup>* (*ERT2<sup>+/-</sup>*) (siehe Kapitel 3.2.5.2) mit weiblichen heterozygoten *ROSA26-R<sup>+/-</sup>* untersucht. Am Tag 12,5 *dpc* (bei Induktion an den Tagen 8,5 *dpc* und 9,5 *dpc*) bzw. am Tag 15,5 *dpc* (bei Induktion an den Tagen 11,5 *dpc* und 12,5 *dpc*) erfolgte die Isolierung, Fixierung und X-Gal-Färbung der Embryonen. Als weitere Kontrolle für die endogene Expression von *Pax7* wurden *Pax7G4<sup>+/-</sup>* Embryonen analysiert (Mansouri A *et al.*, 1996). Der Genotyp der Embryonen wurde über PCR-Analysen an genomischer DNA aus den entsprechenden Dottersäcken bestimmt.

In keiner der untersuchten 4 transgenen *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linien konnte eine Cre<sup>TM</sup>-vermittelte Rekombination in dem Entwicklungsstadium zwischen Tag 8,5 *dpc* bis 15,5 *dpc* detektiert werden (Abbildung 54; links). Von jeder *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linie wurde mindestens 2 Würfe für beide Induktionszeitpunkte untersucht. In den *ROSA26-R<sup>+/-</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* Kontrollembryonen wurde dagegen eine nahezu vollständige Rekombination am *ROSA26-R* Locus durch die Gabe von 2 mg Tamoxifen induziert (Abbildung 54; Mitte). Ebenso wurde die  $\beta$ -Galaktosidaseexpression in den *Pax7G4<sup>+/-</sup>* Kontrollembryonen nachgewiesen (Abbildung 54; rechts) (Mansouri A *et al.*, 1996).





**Abbildung 54: Keine Expression der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase in *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mauslinien während der Embryonalentwicklung.** Dargestellt ist ein mit X-Gal gefärbter *ROSA26-R<sup>+/-</sup> Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* (links), ein *ROSA26-R<sup>+/-</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* (Mitte) und ein *Pax7G4<sup>+/-</sup>* (rechts) Embryo im Alter von 12,5 *dpc*. Die Induktion der entsprechenden Cre-Rekombinase erfolgte *in utero* an den Tagen 8,5 und 9,5 *dpc* durch Gabe von je 1 mg Tamoxifen (kumulative Dosis 2 mg). Der abgebildete *ROSA26-R<sup>+/-</sup> Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Embryo stammt aus der Linie *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* #27 und wurde repräsentativ für alle untersuchten Linien abgebildet.

### 3.3.1.2.1.2 Die Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase wird im adulten Muskel exprimiert

Zur Untersuchung der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinaseexpression in adulten *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Tieren wurden doppelt heterozygote Nachkommen aus der Verpaarung von *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* x *ROSA26-R<sup>+/-</sup>* (Soriano P, 1999) im Alter von 6 Wochen mit 100 µg Tamoxifen, 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) oder Lösungsmittel (Emulsion aus Ethanol und Sonnenblumenöl) intramuskulär injiziert.

10 Tage nach der Tamoxifen- bzw. 4-OHT-Gabe wurden die Tiere schmerzfrei getötet und der injizierte Skelettmuskel (*musculus soleus*) isoliert. Der Muskel wurde fixiert, 10 µm Kryostatschnitte angefertigt und mit X-Gal angefärbt. In Kontrollexperimenten wurde die CreERT2-Rekombinase in *ROSA26-R<sup>+/-</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* Tieren mit Tamoxifen bzw. 4-OHT induziert (siehe Abbildung 45). Dieses Experiment sollte Aufschluss darüber geben, ob durch eine intramuskuläre Gabe von Tamoxifen bzw. 4-OHT tatsächlich eine Induktion der Rekombinaseaktivität erreicht werden kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob mit beiden Medikamenten eine vergleichbare Induktion der ERT2- bzw. der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase erzielt werden kann. Da durch die Gabe von 4-OHT eine zur Tamoxifengabe vergleichbare Induktion der Rekombination induziert wurde, erfolgte in weiterführenden

Experimenten die Induktion der ERT2- als auch der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase durch Gabe von Tamoxifen. Als Kontrolle für die endogene Expression von *Pax7* wurden Muskeln aus *Pax7G4<sup>+/-</sup>* Tieren analysiert. Alle Analysen wurden in 2 bis 3 unabhängigen Experimenten wiederholt.

In 3 von 4 *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linien wurde in unabhängigen Experimenten die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase in spezifischen Bereichen der Skelettmuskeln detektiert (Abbildung 56). Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Schwannsche Scheiden. Während 2 transgene Linien (#21, #27) eine vergleichbar starke Rekombination des *ROSA26-R* Locus zeigten, wurde in der Linie *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* #54 eine deutlich stärkere Rekombinationsrate festgestellt. In den Muskeln der Kontrolltiere aller Linien wurde keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität beobachtet.

Bei Analysen von Muskelschnitten konnte bei keiner der untersuchten *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linien eine Expression der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase in Satellitenzellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden einzelne Muskelfasern der jeweiligen Tiere präpariert, fixiert und mit X-Gal angefärbt. Auch bei dieser Analyse konnte bei keiner der 4 Linien eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Satellitenzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die als Kontrolle mitgeführten Muskelfasern von heterozygoten *Pax7G4<sup>+/-</sup>* Tieren gleichen Alters zeigten dagegen die beschriebene schwache  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Satellitenzellen (Abbildung 55) (Oustanina S *et al.*, 2004).

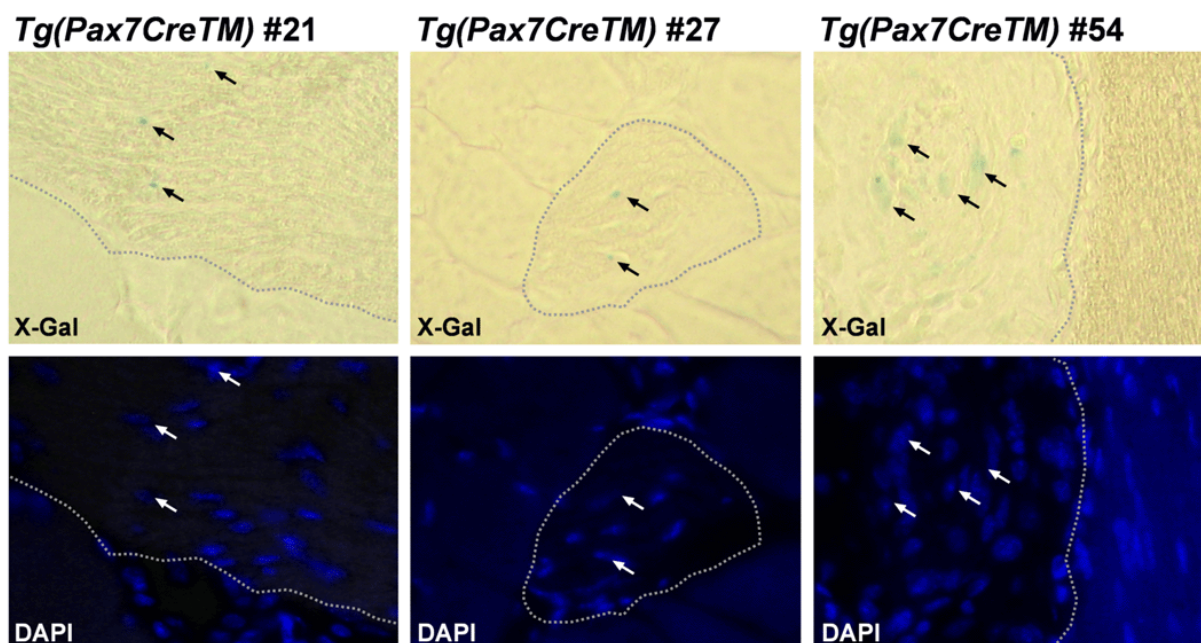


**Abbildung 55: Satellitenzellen aus *Pax7G4<sup>+/-</sup>* Mäusen exprimieren  $\beta$ -Galaktosidase.** Muskelfasern einer *Pax7G4<sup>+/-</sup>* Maus wurde isoliert, fixiert und mit X-Gal angefärbt. Der Pfeil weist auf eine  $\beta$ -Galaktosidase exprimierende Satellitenzelle (Oustanina S *et al.*, 2004).

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass in 3 von 4 *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linien die Tamoxifen-induzierbare Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase im adulten Muskel exprimiert wird,

wobei 2 der 4 Linien eine vergleichbar starke Expression aufweisen und eine Linie die CreTM-Rekombinase stärker exprimiert. Das CreTM-Expressionsprofil der 3 Linien unterscheidet sich nicht, was für eine Transgen-spezifische Expression spricht. Das *Tg(Pax7CreTM)* Transgen wird jedoch nicht in Satellitenzellen exprimiert.

Die Expression der CreTM-Rekombinase beschränkt sich im Muskel möglicherweise auf die Schwannschen Scheiden von Nerven. In diesen Strukturen wurde die endogene Expression von *Pax7* in der adulten Maus beschrieben (Rodger J *et al.*, 1999).



**Abbildung 56: CreTM-Rekombinaseaktivität in Nervenstrukturen von *Tg(Pax7CreTM)* Mäusen.** Doppelt heterozygote *ROSA26-R<sup>+/-</sup> Tg(Pax7CreTM)* Nachkommen der Linien *Tg(Pax7CreTM)* #21, #27, #54 wurden im Alter von 6 Wochen mit 100 µg Tamoxifen intramuskulär injiziert. 10 Tage nach der Injektion wurden Kryostatschnitte des injizierten *musculus soleus* angefertigt und mit X-Gal gefärbt (oben). Die gefärbten Schnitte wurden mit einem DAPI-enthaltenden Montagemedium (unten) eingedeckt (unten). Die schwarzen Pfeile deuten auf β-Galaktosidase-positive Zellen. Weiße Pfeile zeigen auf die entsprechenden Zellkerne in der DAPI-Färbung. Graue Linien markieren die Nerven-Muskelgrenzen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Analysen zur Entstehung von *Ptch*-assoziierten RMS

Das Tumorsuppressorgen *PTCH* ist mit der Entwicklung vieler humaner Tumore, unter anderem auch mit der von RMS, assoziiert (Bridge JA *et al.*, 2000; Tostar U *et al.*, 2006). Über den Mechanismus der Entstehung von *PTCH*-assoziierten RMS ist jedoch bisher nicht viel bekannt (siehe Kapitel 1.4). Das Verständnis wird besonders dadurch erschwert, dass in humanen *PTCH*-assoziierten Tumoren häufig nur eines der beiden *PTCH* Allele mutiert ist (Wetmore C, 2003) und *PTCH* überexprimiert wird. Dies trifft auch auf RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen zu. So wurden in diesen Tumoren, die sich durch eine starke Expression von *Ptch* auszeichnen, weder LOH am *Ptch* Locus noch Mutationen im wt *Ptch* Allel identifiziert (Calzada-Wack J *et al.*, 2002).

Interessanterweise kommt die Überexpression von *Ptch* in RMS durch *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripte zustande. Wt Transkripte sind im Tumor gegenüber dem Normalgewebe deutlich reduziert (siehe Abbildung 5). Dies konnte auch für das MB des *Ptch*<sup>neo12</sup> Mausmodells gezeigt werden (Wetmore C *et al.*, 2000). In den Organen der *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tiere konnten dagegen keine Unterschiede der *Ptch*<sup>d67</sup> und wt *Ptch* Transkriptniveaus beobachtet werden (Uhmann A *et al.*, 2005).

Um detailliertere Einblicke in die Entstehung von *Ptch*-assoziierten RMS zu erlangen, wurde im ersten Teil dieser Arbeit der Aufbau des überexprimierten mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripts und des daraus resultierenden Proteins untersucht.

Hierzu war es notwendig, sich zunächst einen Überblick über die verschiedenen *Ptch* Spleissvarianten zu verschaffen.

Humane *PTCH* Transkripte können 5 alternative erste Exone enthalten, die als Exon 1a, Exon 1b, Exon 1c, Exon 1d und Exon 1e bezeichnet werden (Kogerman P *et al.*, 2002; Nagao K *et al.*, 2005a; Nagao K *et al.*, 2005b). Die genaue Funktion der unterschiedlichen Spleissvarianten ist bis jetzt jedoch nicht eindeutig geklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass sich der Aufbau des humanen Exon 1e *PTCH* Transkripts von seinem murinen Gegenstück unterscheidet. Im Gegensatz zum humanen Exon 1e wird das murine Exon 1e nicht in Exon 2 gespleisst, sondern umfasst den gesamten Sequenzbereich zwischen den beiden Exonen.

Wie durch Kogerman *et al.* beschrieben, sind beim Menschen nur Exon 1B *PTCH* Transkripte zur vollständigen Hemmung von SMO in der Lage. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass die Exon 1b Spleissvariante bei der Aktivierung der Kaskade vermehrt exprimiert wird, um so die Aktivierung der Kaskade wieder auszubalancieren. Auch zeigen die Autoren, dass in humanen Basaliomen überwiegend Exon 1b *PTCH* Transkripte exprimiert werden. Da in diesen Tumoren trotz der Überexpression von Exon 1b Transkripten keine Inhibition von SMO hervorgerufen wird, postulieren Kogerman *et al.*, dass die überexprimierten *PTCH* Transkripte mutanten Transkripten entsprechen müssen. Die Tatsache, dass Exon 1b Transkripte im Gegensatz zu den 4 weiteren Spleissvarianten vermehrt im Tumor exprimiert werden, wurde durch die verstärkte Aktivierung des Exon 1b Promotors erklärt (Kogerman P *et al.*, 2002).

Wie aus unseren Analysen nun hervorgeht, werden in RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen neben Exon 1b *Ptch* Transkripten (die tatsächlich größtenteils vom mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Allel stammen) auch Exon 1a und Exon 1c *Ptch* Transkripte überexprimiert (Uhmann A *et al.*, 2005). Diese Daten zeigen, dass die Überexpression von *Ptch* in RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen nicht ausschließlich durch einen hyperaktiven Exon 1b Promotor zu erklären ist. Gegen einen solchen hyperaktiven Promotor spricht auch die Tatsache, dass man keine vermehrte Expression von wt Transkripten im Tumor detektieren kann. Da inzwischen bekannt ist, dass auch die Expression von Exon 1a Transkripten eine vollständige Hemmung des Signalweges bewirken kann (Shimokawa T *et al.*, 2004; Nagao K *et al.*, 2005a; Nagao K *et al.*, 2005b) und da Exon 1a Transkripte auch in RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tieren verstärkt exprimiert werden (Uhmann A *et al.*, 2005), kann sich die Theorie von Kogerman *et al.* nicht mehr halten.

#### **4.1.1 Shh/Ptch Signalwegsaktivierung durch Reduktion von wt *Ptch* Transkripten**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass a) eine monoallelische *Ptch* Mutation – nicht aber ein biallelischer Ausfall von *Ptch* – für die Entstehung von RMS notwendig ist, und b) die Tumorentstehung eher durch ein Ungleichgewicht der Expression des mutanten und wt Allels zustande kommt, wobei wt *Ptch* Transkripte im Tumor stark reduziert sind.

Um zu prüfen, ob die alleinige Reduktion von wt *Ptch* Transkripten ausreichend ist, um die Shh/*Ptch* Signalkaskade zu aktivieren, wurde wt *Ptch* mRNA mit Hilfe von *Ptch*-spezifischer siRNA degradiert. Durch die Verminderung von wt *Ptch* Transkripten konnte tatsächlich eine erhöhte Expression und Aktivität von Gli1 induziert werden.

Diese Daten zeigen, dass eine Fehlregulation des Shh/*Ptch* Signalweges durch die verminderte Expression von wt *Ptch* ausgelöst werden kann und auch in Abwesenheit eines mutanten *Ptch* Proteins zustande kommt.

Im Organismus könnte die verminderte Expression von wt *Ptch* z. B. durch den veränderten Methylierungsstatus dieses Allels ausgelöst werden, wie dies für andere Tumorsuppressorgene bereits beschrieben worden ist (Wijermans P *et al.*, 2000; Herman JG und Baylin SB, 2003). So konnte in unserem Labor auch gezeigt werden, dass durch Methylierung der *Ptch* Promotorsequenz eine vollständige Transkriptionsrepression induziert wird (Uhmann A *et al.*, 2005). Da auch die Behandlung von MB Zelllinien mit DNA demethylierenden Agenzien (5-Azacytidin) zur Reaktivierung der Expression von wt Transkripten führt (Berman DM *et al.*, 2002), ist eine Inaktivierung des wt *Ptch* Locus in RMS durch Methylierung denkbar. Die daraus resultierende verminderte Expression des wt Allels könnte eine Aktivierung des Signalweges bewirken und damit die Genese von RMS induzieren.

#### **4.1.2 Das *Ptch*<sup>d67</sup> Protein kann den Shh/*Ptch* Signalweg nicht mehr hemmen**

Vorarbeiten anhand von immunhistologischen Färbungen an RMS und embryonalen *Ptch*<sup>neo67/neo67</sup> Fibroblasten unserer Arbeitsgruppe deuteten auf die Translation von *Ptch*<sup>d67</sup> mRNA hin (Uhmann A *et al.*, 2005). Da bei der Transkription des mutanten *Ptch*<sup>d67</sup> Allels Exon 5 ohne Leserasterverschiebung in Exon 8 gespleisst wird (Hahn H *et al.*, 1998), sollte das mutante Protein sowohl C- als auch N-terminal die Struktur des wt Äquivalents besitzen. Bisher war jedoch nicht geklärt, ob *Ptch*<sup>d67</sup> Transkripte translatiert werden und welche Funktion *Ptch*<sup>d67</sup> Proteine besitzen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch die *in vitro* Expression von *Ptch*<sup>d67</sup> cDNA ein mutantes *Ptch*<sup>d67</sup> Protein generiert wird. Das detektierte *Ptch*<sup>d67</sup> Protein besitzt das theoretisch errechnete molekulare Gewicht. Sowohl der C- als auch der N-

Terminus des mutanten Proteins wurden nachgewiesen. Hieraus wurde geschlossen, dass die C- und N-terminale Struktur des Ptch<sup>d67</sup> Proteins der des wt Proteins entspricht. Das Ptch<sup>d67</sup> Protein ist vergleichbar dem wt Protein intrazellulär lokalisiert. Dies lässt die Aussage zu, dass das Fehlen von Exon 6 und 7 von *Ptch* weder die vesikuläre Lokalisation noch den Transport des Proteins zur Zellmembran beeinflusst.

Die Funktionalität des Ptch<sup>d67</sup> Proteins wurde anhand von *in vitro* Analysen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Shh/Ptch Signalweg durch die Expression von Ptch<sup>d67</sup> nicht gehemmt werden kann. Dies zeigt, dass die Deletion von Exon 6 und 7 zu einem Funktionsverlust von Ptch führt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, dass durch die gleichzeitige Expression von wt Ptch und Ptch<sup>d67</sup> Protein die Signalkaskade im aktiven Zustand gehalten wird. Aufgrund dessen kann man annehmen, dass Ptch<sup>d67</sup> die Wirkungsweise des wt Proteins in einer dominant-negativen Art und Weise beeinflusst. Dies wird auch durch eine Publikation aus dem Jahr 2004 unterstützt, in der eine *PTCH* Mutation gezeigt wird, die in *D. melanogaster* aufgrund eines dominant-negativen Mechanismus zur Aktivierung von Smo führt (Hime GR *et al.*, 2004).

Beim Vergleich der Expressionsstärken der beiden *Ptch* Expressionsplasmide im Western Blot (siehe Abbildung 15) fällt zunächst auf, dass das mutante Protein deutlich schwächer als das wt Protein exprimiert wird. Trotzdem scheint diese schwache Expression ausreichend zu sein, um die Hemmung der Signalkaskade durch das wt Protein zu blockieren. Dies könnte bedeuten, dass schon eine geringe Anzahl von Ptch<sup>d67</sup> Molekülen ausreichend ist, um die hemmende Funktion von wt Proteinen aufzuheben und damit eine Fehlregulation des Shh/Ptch Signalweges zu bewirken. Da jedoch schon ein wt Ptch Molekül in der Lage ist, 45 Smo Moleküle in ihrer Aktivität zu hemmen (Taipale J *et al.*, 2002), ist verwunderlich, warum das extrem überexprimierte wt Protein nicht in der Lage sein sollte, den Signalweg zu inaktivieren. Man könnte dies jedoch durch eine höhere Affinität von Ptch<sup>d67</sup> Molekülen zu Smo erklären.

Wenn nun Ptch<sup>d67</sup> tatsächlich dominant-negativ auf wt Ptch wirken sollte, stellt sich weiterhin die Frage, warum es nicht auch in normalen Organen von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen zu einer generellen Aktivierung des Signalweges kommt, wo doch beide Transkripte gleich stark exprimiert werden.



Hierzu ist zu sagen, dass unsere bisherigen Expressionsanalysen von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Organen nur auf transkriptioneller Ebene durchgeführt wurden und auch eine mögliche Instabilität des *Ptch*<sup>d67</sup> Transkriptes nicht untersucht wurde. Daher kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass in Organen von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen weniger *Ptch*<sup>d67</sup> als wt Protein exprimiert wird.

#### 4.1.3 Ein modifiziertes Modell der *Ptch*-assoziierten Tumorigenese in *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen

Basierend auf den oben dargestellten Daten lässt sich nun ein neues Modell zur *Ptch*-assoziierten Tumorigenese aufstellen.

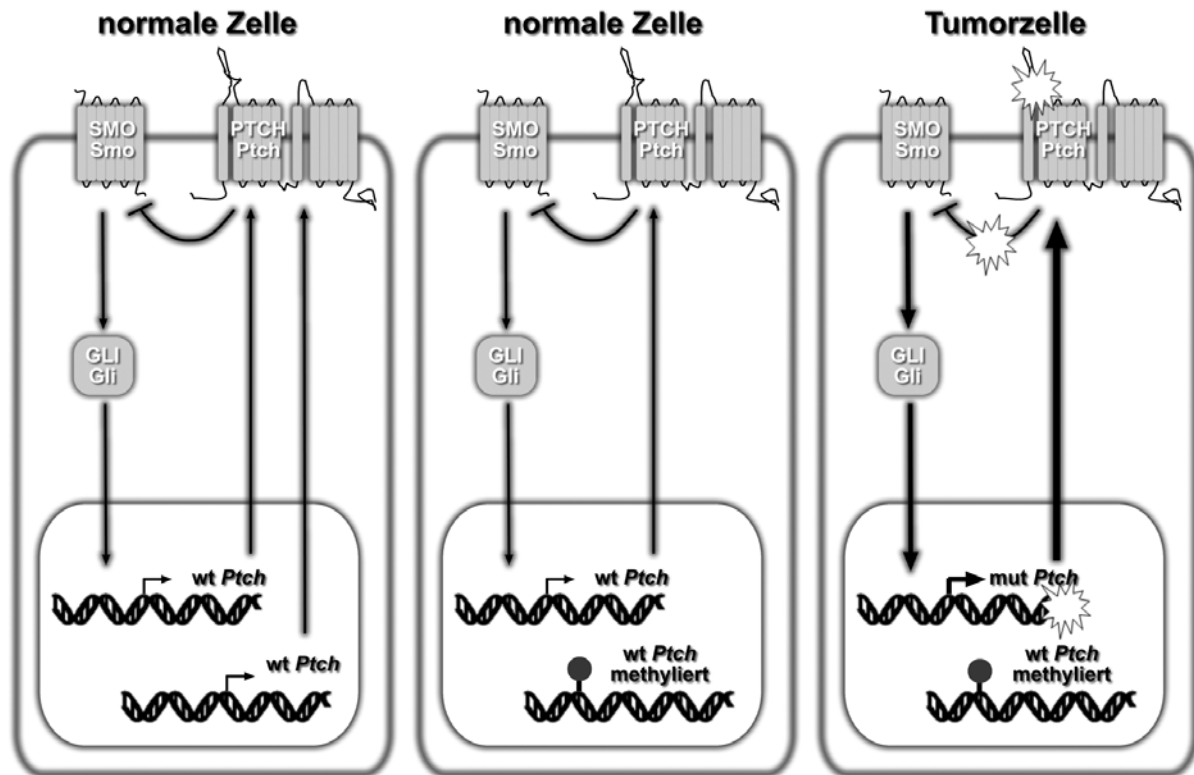
Das Modell nach Uhmann *et al.* ist in Abbildung 57 dargestellt und besagt, dass die *Ptch*-assoziierte Tumorigenese durch die Inaktivierung eines Allels (z. B. durch Methylierung) und einer nachfolgenden inaktivierenden Mutation des zweiten Allels hervorgerufen wird. Die Inaktivierung eines der beiden wt *Ptch* Allele hat keine Auswirkung, da der Shh/*Ptch* Signalweg noch ausreichend reguliert werden kann. Wird jedoch dieses Allel durch Mutation inaktiviert, kann die Signalkaskade nicht mehr gehemmt werden. *Gli* wird verstärkt exprimiert und aktiviert die Expression seiner Zielgene im Zellkern. *Ptch* gehört zu diesen Zielgenen. Aufgrund der Methylierung des wt *Ptch* Allels, wird nur das nicht-methylierte, mutante *Ptch* Allel exprimiert. Da dieses die Signalkaskade nicht hemmen kann, kommt es zu einer „run-away“ Aktivierung der Shh/*Ptch* Signalkaskade, was in einer starken Überexpression von *Gli* sowie auch *Ptch* und letztlich in Tumorigenese resultiert.

Weder die Mutation noch die Methylierung eines der beiden *Ptch* Allele besitzen in diesem Modell die Kompetenz, die Tumorigenese zu induzieren. Auch ist die Reihenfolge der Allel-Inaktivierungen in diesem Modell nicht ausschlaggebend. Bei den *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Tieren liegt jedoch die Mutation zuerst vor.

Das in Abbildung 57 vorgeschlagene Modell berücksichtigt sowohl die Charakteristik eines Tumorsuppressorgens als auch die beobachtete Überexpression von mutantem *Ptch* Protein in *Ptch*-assoziierten Tumoren. Gleichzeitig stimmt dieses Modell mit der Beobachtung überein, dass die Behandlung von *Ptch*-assoziierten Tumorzelllinien mit demethylierenden Agenzien zur Wiederherstellung der wt *Ptch* Expression führt (Berman DM *et al.*, 2002).



Auch für andere Tumorsuppressorgene ist ein solcher Mechanismus, bestehend aus Mutation eines Allels und Methylierung des zweiten Allels, beschrieben worden (Jones PA und Baylin SB, 2002; Herman JG und Baylin SB, 2003) und einige dieser Tumore sprechen auf eine Behandlung mit demethylierenden Agenzien an (Wijermans P *et al.*, 2000; Issa JP *et al.*, 2004).



**Abbildung 57: Schematische Darstellung eines Modells zur Entstehung von *Ptch*-assoziierten Tumoren.** Dargestellt ist links eine normale somatische Zelle, in der der Signalweg auf niedrigem Niveau aktiviert ist. Durch die Inaktivierung eines Allels, hier durch Methylierung (Mitte), wird der Signalweg durch die monoallelische *Ptch* Expression trotzdem noch normal reguliert. Erst die Inaktivierung des zweiten Allels durch Mutation (rechts) bewirkt ein Ungleichgewicht des Signalweges und damit die Tumorigenese. Die Inaktivierung der Allele kann auch in umgekehrter Reihenfolge geschehen. Letzendlich resultiert ein solcher Mechanismus jedoch immer in der ungehinderten Überexpression des mutanten *PTCH/Ptch* Allels. In Großbuchstaben sind humane, in Kleinbuchstaben homologe murine Gene und Proteine markiert. Abkürzungen: *Ptch*, Patched; *Smo*, Smoothened. Stern, Mutation in *PTCH/Ptch*; Strich mit Köpfchen, Methylierung.

Aufgrund der in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse kann dieses Modell noch erweitert werden. Neben der Reduktion von *wt Ptch* Transkripten könnte zusätzlich noch ein dominant-negativer Wirkmechanismus von *Ptch*<sup>d67</sup> in Frage kommen.

So kann postuliert werden, dass in gesunden Organen von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen ein ausreichendes Gleichgewicht zwischen wt und *Ptch*<sup>d67</sup> Protein vorherrschend ist und der Signalweg normal reguliert werden kann. Im Tumor dagegen wird durch das Stummschalten des wt Allels, z. B. durch Methylierung, das mutante Allel exprimiert. Auch wenn das mutante Transkript instabil wäre, würde trotzdem genügend *Ptch*<sup>d67</sup> Protein translatiert, um dominant-negativ die Aktivität von noch vorhandenem wt *Ptch* zu unterdrücken. Die daraus folgende Fehlregulation des Signalweges führt zur Überexpression des mutanten nicht-methylierten Allels und letztlich zur Entwicklung von Tumoren.

Ein dominant-negativer Mechanismus des *Ptch*<sup>d67</sup> Proteins würde auch erklären, warum in RMS von *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen trotz postulierter Methylierung des wt Allels noch wt Transkripte detektierbar sind.

Im Gegensatz zu Kogerman *et al.* wird jedoch in beiden Modellen der Expression von alternativen *Ptch* Transkripten keine spezifische Funktion während der Tumorentstehung zugestanden.

## 4.2 Induzierter konditioneller knock-out von *Ptch*

Um die Entstehung von RMS zu induzieren und somit detaillierter analysieren zu können, wurde eine Mauslinie etabliert, welche den konditionellen knock-out von *Ptch* gewährleistet.

Durch die *in vitro* Analyse des *pPtchNX* Zielvektors wurde gezeigt, dass die *Ptch* Exone 8 und 9 durch die Expression einer Cre-Rekombinase effizient deletiert werden können.

Die daraufhin etablierte homozygote *Ptch<sup>NX/NX</sup>* Mauslinie wurde über 1 Jahr beobachtet, und es wurde gezeigt, dass homozygote *Ptch<sup>NX/NX</sup>* Mäuse fertil sind, keine Tumoren entwickeln und wt *Ptch* Transkripte exprimieren.

Durch die heterozygote und homozygote Keimbahndeletion der *Ptch* Exone 8 und 9 konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch die *Ptch<sup>delNX</sup>* Mutation ein zu *Ptch<sup>neo67</sup>* und *Ptch<sup>neo12</sup>* Mäusen vergleichbarer Phänotyp erzeugt wird (Goodrich LV *et al.*, 1997; Hahn H *et al.*, 1998). Sowohl in Tumoren von *Ptch<sup>delNX/+</sup>* Mäusen als auch in *Ptch<sup>delNX/delNX</sup>* Embryonen wurde die Expression eines mutanten *Ptch<sup>delNX</sup>* Transkripts nachgewiesen, bei dem Exon 7 in Exon 10 gespleisst wird. Das Spleissen führt zu einer Verschiebung des Leserasters und zu einem vorzeitigen Stopcodon an der Aminosäure 349. Das aus der entsprechenden mRNA translatierte Protein sollte ein molekulares Gewicht von 38 kD haben. Durch die Deletion sollten wichtige funktionelle *Ptch* Domänen, wie die SSD und die zweite extrazelluläre Schleife, die für die Bindung von Shh notwendig ist, zerstört werden. Leider war es nicht möglich, ein 38 kD großes Protein in Geweben von *Ptch<sup>delNX/+</sup>* oder in *Ptch<sup>delNX/delNX</sup>* nachzuweisen. Der Grund hierfür ist sehr wahrscheinlich die mangelnde Spezifität der für dieses Experiment verwendeten Antikörper.

Im Folgenden wurde dann der Phänotyp von Mäusen analysiert, bei denen die biallelische Inaktivierung von *Ptch* im Alter von 8 Wochen induziert wurde. Hierzu wurden *Ptch<sup>NX/NX</sup>* Mäuse mit *ROSA26CreERT2<sup>+/-</sup>* Mäusen, welche eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase exprimieren, gekreuzt. Diese Mäuse wurden nach der Induktion der ERT2-Rekombinase „*tPtch<sup>-/-</sup>*“ Mäuse genannt. Der hervorgerufene komplexe Phänotyp ließ die Beobachtung der Tiere über einen Zeitraum von mehr als 23 Tagen nicht zu.

#### 4.2.1 Hyperproliferative Veränderungen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Die histologische Analyse der *tPtch*<sup>-/-</sup> Organe zeigte, dass durch die biallelische Inaktivierung von *Ptch* hyperproliferative, tumorartige Veränderungen der Haut, des Magens und der mesenterialen Zellen induziert werden. Obwohl der Beobachtungszeitraum von 23 Tagen zu kurz ist, um die Entstehung von Tumoren zu beobachten, kann vermutet werden, dass die biallelische Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier zur Entwicklung von Basaliomen, Magen- und mesenterialen Tumoren führt. Diese Vermutung wird auch durch Publikationen unterstützt, in denen gezeigt wird, dass die Fehlregulation des Shh/Ptch Signalweges zur Entwicklung von Basaliomen (Uden AB *et al.*, 1996; Adolphe C *et al.*, 2006) und Magentumoren (Berman DM *et al.*, 2003) führt.

#### 4.2.2 Gestörte Hämatopoese in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Neben hyperproliferativen Organveränderungen wurde ein schwerer Immundefekt in der B und T Zellentwicklung im Thymus und im Knochenmark identifiziert. Außerdem wurde gezeigt, dass dieser Defekt schon in der frühen Entwicklung von hämatopoetischen Vorläuferzellen vorliegt.

##### 4.2.2.1 Gestörte T Zellentwicklung in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Die stark verkleinerten Thymi der *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiere ließen zunächst einen Differenzierungsdefekt der T Zelllinie im Thymus vermuteten, und es wurde gezeigt, dass die T Zellentwicklung in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren im frühen DN1-DN2 Übergangsstadium und nach dem DN4 Stadium blockiert ist. Das Fehlen der jeweils nachfolgenden Subpopulationen (DN2 und DN3 bzw. DP und SP) kann nicht durch ein Absterben derselben erklärt werden, da keine erhöhten Annexin V-Werte detektiert wurden.

Die frühen T Zellvorläuferzellen (early T cell progenitor, ETP) wurden bei der Analyse von *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymozyten nicht berücksichtigt, da die ETP Population, die durch einen Lin<sup>low</sup> c-kit<sup>high</sup> CD25<sup>-</sup> Phänotyp charakterisiert ist, im murinem Thymus nur ca. 20000 Zellen groß und daher schwer zu isolieren ist (Bhandoola A und Sambandam A, 2006b).

Mit Hilfe der spezifischen Expression von Oberflächenproteinen ließen sich aber die einzelnen Stadien der Thymozytendifferenzierung verfolgen. Wie bereits ausführlich

im Ergebnisteil beschrieben, durchlaufen Thymozyten im Verlauf ihrer Differenzierung die sogenannten DN Stadien (DN, doppelt negativ für CD4 und CD8 Oberflächenmoleküle), die wiederum über die Expression der Proteine CD44 und CD25 in 4 Stadien (DN1 bis DN4) unterschieden werden können (Rothenberg EV und Taghon T, 2005). Dabei sind die ETP teilweise auch in der DN1 Subpopulation des Thymus zu finden (siehe Abbildung 58).

In bisherigen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde gezeigt, dass gerade während der DN Differenzierungsstadien der aktive Shh/Ptch Signalweg für die sich entwickelnden Thymozyten unerlässlich ist (Outram SV *et al.*, 2000; Gutierrez-Frias C *et al.*, 2004; Shah DK *et al.*, 2004; Sacedon R *et al.*, 2005; Andaloussi AE *et al.*, 2006). Daher kann davon ausgegangen werden, dass durch die Inaktivierung von *Ptch* das Gleichgewicht zwischen aktiviertem und inaktivem Shh/Ptch Signalweg gestört ist. Daraus könnte die Blockade der Thymozytenentwicklung zwischen dem DN1 und DN2 Stadium in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen resultieren. Zusätzlich könnte durch die *Ptch* Mutation auch die Proliferation der DN1 Subpopulation angeregt werden, was jedoch zunächst noch untersucht werden müsste.

Der Differenzierungsblock zwischen dem DN1 und DN2 Stadium resultierte in einer dramatischen Abnahme der DN2 und DN3 Zellpopulation. Interessanterweise blieb jedoch die relative Anzahl der DN4 Thymozyten in *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi unverändert. Dies könnte bedeuten, dass *Ptch* eine zusätzliche Rolle im oder nach dem DN4 Stadium spielen könnte, wobei in diesen Zellen durch die *Ptch* Mutation z. B. ein proliferativer Stimulus ausgelöst werden könnte, der aber die weitere Differenzierung der DN4 Zellen zu den DP und SP Stadien verhindert. Dadurch könnte auch das Fehlen der DP und SP Stadien erklärt werden.

Die Unterscheidung zwischen frühen DN Thymozyten und späten DP Thymozyten ist durch das Auftreten von CD4 und CD8 Oberflächenmolekülen möglich. Die Stadien der SP CD4<sup>+</sup> oder SP CD8<sup>+</sup> Thymozyten stellen die Enddifferenzierung der T Zellen dar, wobei SP CD4<sup>+</sup> T Zellen die Population der T Helferzellen und SP CD8<sup>+</sup> T Zellen die Population der zytotoxischen T Lymphozyten bilden (Rothenberg EV und Taghon T, 2005). Für diese späten Stadien ist bisher nicht bekannt, ob der Shh/Ptch Signalweg an der Regulierung der Entwicklung und/oder ihrer Funktion beteiligt ist. In unserem Modell konnte dies jedoch nicht untersucht werden, da die Entwicklung der

T Zellen bereits im DN1 Stadium gestört war und daher die späteren T Zell Stadien vollständig fehlten.

Eine Zusammenfassung der T Zellentwicklungsdefekte in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen ist in Abbildung 58 gezeigt.

#### 4.2.2.2 Gestörte B Zellentwicklung in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Die Differenzierung der B Zellvorläufer vollzieht sich im Knochenmark und lässt sich durch Analyse von spezifischen Oberflächenproteinen, wie B220, CD43, CD19 und IgM, verfolgen. Erst späte unreife B Zellstadien werden aus dem Knochenmark über die Blutbahn in die Milz geschwemmt, wo sie zu reifen B Zellen ausdifferenzieren (Busslinger M, 2004).

Die Analyse von *tPtch*<sup>-/-</sup> Milzen zeigte, dass auch die B Zelldifferenzierung in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen gestört verläuft. Vor allem die frühen Stadien peripherer B Zellen waren stark reduziert.

Über einen Einfluss des Shh/Ptch Signalwegs auf die Entwicklung von frühen B Zellen ist bisher nichts bekannt. Aufgrund der Daten kann nun geschlossen werden, dass *Ptch* essentiell für eine normale B Zellentwicklung ist.

Obwohl die Differenzierung von unreifen zu reifen B Zellen in der Milz Shh-abhängig verläuft (Sacedon R *et al.*, 2005), wurde in den *tPtch*<sup>-/-</sup> Milzen kein Entwicklungsdefekt in späten Stadien der B Zellen beobachtet. Dies könnte mit der Langlebigkeit von reifen B Zellen und dem kleinen Zeitfenster von 23 Tagen zusammenhängen. Ein möglicher negativer Einfluß von *tPtch*<sup>-/-</sup> auf die reifen, rezirkulierenden B Zellen der Milz und des Knochenmarks könnte somit unentdeckt geblieben sein. Da reife, rezirkulierende B Zellen jedoch auch im Knochenmark der *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiere detektiert wurden, ist zumindest die Migration dieser Zellen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren nicht gestört.

Die B Zelldefekte von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen sind in Abbildung 58 zusammengefasst dargestellt.

#### 4.2.2.3 Entwicklungsdefekt der lymphoiden Linie im Knochenmark von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Die Details der Differenzierung der HSC zum gesamten hämatopoetischen System und vor allem zu lymphoiden und myeloischen Vorläuferzellen sind bisher noch unklar. Bislang wird ein Modell postuliert, welches auf dem von Akashi-Kondo-Weissmann (Kondo M *et al.*, 1997) beruht. Dabei bilden die HSC des adulten Knochenmarks die ursprünglichste Population von Stammzellen, welche zur Entwicklung der lymphoiden Linien und aller anderen Blutzellen befähigt sind. Ausgehend von den HSC wird zuerst die Population der MPP gebildet, die sich in die MEP Linie und LMPP Linie verzweigt. Aus der LMPP Population entstehen die GMP sowie auch die CLP (siehe Abbildung 58) (Kondo M *et al.*, 1997; Akashi K *et al.*, 2000; Laiosa CV *et al.*, 2006; Nagasawa T, 2006).

Bei der Untersuchung des Gesamtknochenmarks von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren konnte zunächst der Defekt der B Zellentwicklung bis zum frühen CLP Stadium verfolgt werden. Da für die Entwicklung von B Zellen aus CLP die Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-7R und die Transkriptionsfaktoren EBF, Rag1/2 und Pax5 benötigt werden, wurde *tPtch*<sup>-/-</sup> Gesamtknochenmark auf deren Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der *tPtch*<sup>-/-</sup> induzierte Entwicklungsdefekt auch durch die reduzierte Expression von *IL-7R $\alpha$* , *EBF*, *Rag1/2* und *Pax5* charakterisiert ist. Da auch die pro- und pre-B Zellpopulationen in Gesamtknochenmark stark reduziert waren, musste der Defekt bei den CLP zu suchen sein.

Wie bereits erwähnt, werden T und B Zellen des Immunsystems von den CLP gebildet. Neben den B Zellvorläufern und den ETP entstehen aus den CLP weiterhin die natürlichen Killerzellen (NK, natural killer cell). Hierzu ist jedoch noch festzuhalten, dass ETP nicht nur aus den CLP, sondern höchstwahrscheinlich auch aus HSC, den MPP und auch direkt aus den LMPP hervorgehen können (siehe Abbildung 58) (Bhandoola A und Sambandam A, 2006a).

Die Vorläuferpopulationen benötigen für die Differenzierung zur lymphoiden Linie die Expression der Transkriptionsfaktoren PU.1 und Ikaros, sowie die Expression des Rezeptors Flt3 und die  $\alpha$ -Kette des IL-7R. Mit Hilfe von Gesamtknochenmarksanalysen konnte gezeigt werden, dass sich weder die Expression von *PU.1*, *Ikaros* noch *Flt3* in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren von Kontrollknochenmark unterscheidet. Dagegen wurde eine verminderte Expression von *IL-7R $\alpha$*  in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren detektiert. Da die

Expression von IL-7R $\alpha$  essentiell für die Entwicklung von B und teilweise auch von T Zellvorläufern ist, wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen die IL-7R $\alpha$  Expression der Lin<sup>-</sup> Knochenmarksfraktionen untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die IL-7R $\alpha$  exprimierende CLP Fraktion der Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>low</sup> Sca-1<sup>-low</sup> Knochenmarkspopulation in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren stark reduziert ist (Kondo M *et al.*, 1997; Orlic D *et al.*, 1997).

Die normale Expression von *PU.1*, *Ikaros* und *Flt3* im *tPtch*<sup>-/-</sup> Knochenmark ließ dagegen vermuten, dass die Entwicklung der Vorläufer- und Stammzellen vor dem CLP Stadium nicht durch die *Ptch* beeinflusst wird. Diese Vermutung wurde anhand der durchflusszytometrischen Analysen der Lin<sup>-</sup> Knochenmarksfraktion bestätigt. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl die Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>high</sup> c-kit<sup>high</sup> Fraktion, welche die HSC und MPP enthält, als auch die Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>-</sup> c-kit<sup>high</sup> Fraktion, die die myeloischen Vorläuferzellen enthält (Akashi K *et al.*, 2000) in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen keine Auffälligkeiten zeigten (siehe Abbildung 58).

#### 4.2.2.4 Normale Entwicklung der myeloischen Linie in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen

Die Vorläuferzellen, aus welchen sich die Zellen der myeloischen Linie entwickeln, sind die MEP und die GMP. Aus den MEP entwickeln sich sowohl Megakaryozyten als auch Erythrozyten, während die GMP zu Granulozyten oder Makrophagen differenzieren.

Weder im Differenzierungspotential von Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen noch in Differentialblutbildern von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren wurden Abnormitäten der Abkömmlinge der myeloischen Linie festgestellt. So waren alle CFU Werte normal. Selbst die Anzahlen der kurzlebigen Granulozyten und Thrombozyten im peripheren Blut zeigten keine Abweichungen von der Norm auf. Die dabei detektierte erhöhte Zahl von neutrophilen Granulozyten in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren kann mit der schlechten körperlichen Verfassung der Tiere begründet werden. Vergleichbar zu Bhardwaj *et al.* (Bhardwaj G *et al.*, 2001) lassen diese Ergebnisse den Schluß zu, dass die Aktivierung des Shh/Ptch Signalweges (bei Bhardwaj *et al.* durch Hh Stimulierung, hier durch die Deletion von *Ptch*) keinen Effekt auf das Differenzierungspotential von HSC hat, aus denen alle Zellen des Immunsystems hervorgehen (Akashi K *et al.*, 2000; Bhandoola A und Sambandam A, 2006b).

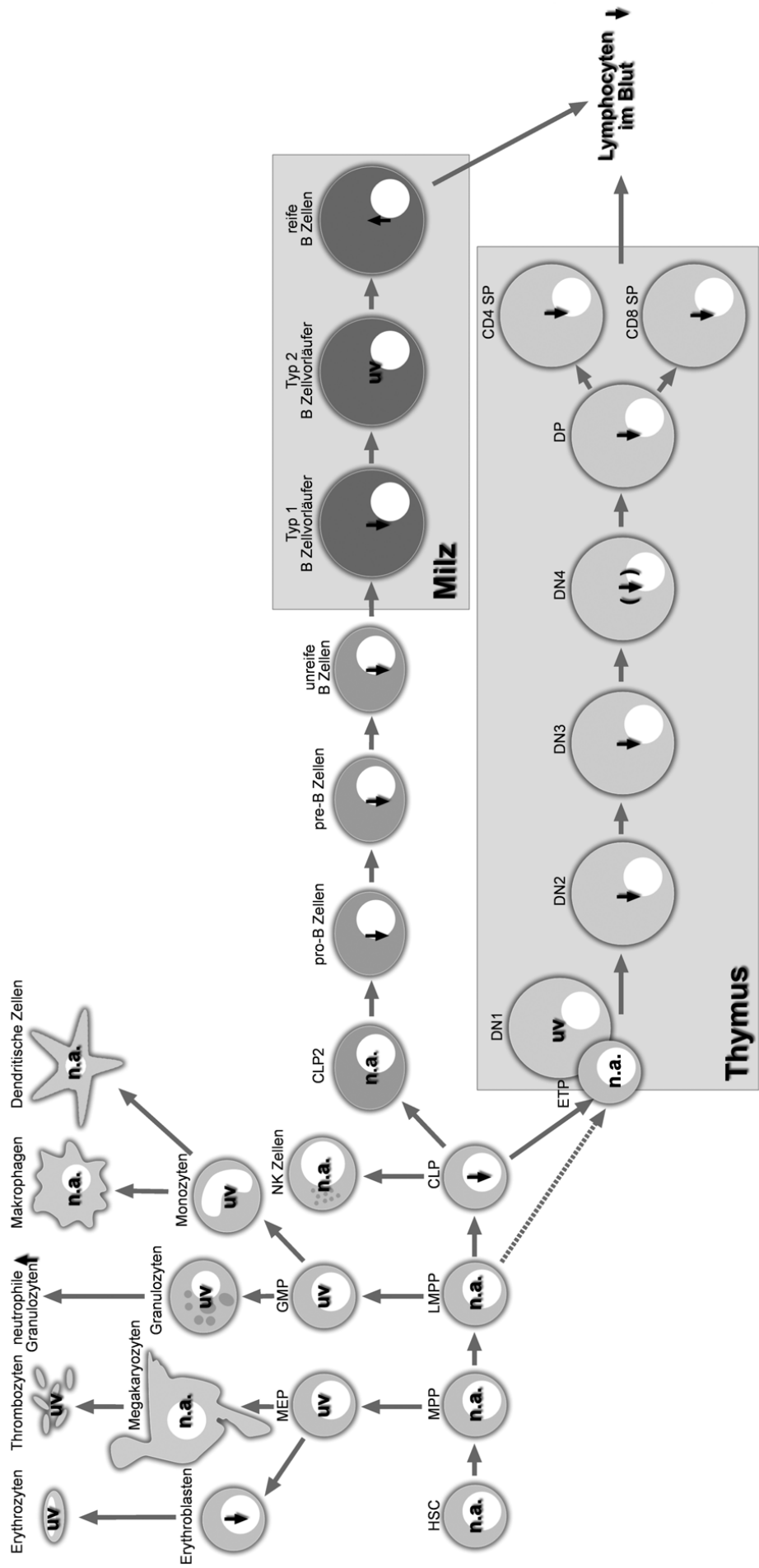


Unsere Ergebnisse zeigen jedoch einen Defekt in der Erythrozytenentwicklung in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen an. So waren trotz normaler BFU-E Zahlen die pro-Erythroblasten in Knochenmarkausstrichen von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren erniedrigt. Erythrozyten entstehen zusammen mit Megakaryozyten aus den MEP. Da die Zahl der peripheren, extrem kurzlebigen Thrombozyten normal war, kann davon ausgegangen werden, dass sich die MEP von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren normal entwickeln. Die allerersten Erythrozytenvorläufer werden durch BFU-E Zahlen angezeigt, die in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren normal waren. Erst die pro-Erythroblasten waren vermindert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Erythropoese in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren erst nach dem BFU-E Stadium gestört ist (siehe Abbildung 58).

Diese Daten stehen zunächst in Kontrast zu denen von Detmer *et al.* (Detmer K *et al.*, 2000). Hier wurde durch eine Behandlung von myeloischen Vorläuferzellen *in vitro* mit Cyclopamin eine Blockade der erythroiden Entwicklung ausgelöst. Im Gegensatz zu *Ptch* Mutationen inhibiert Cyclopamin die Hh Signalkaskade. Da aber sowohl ein „Zuviel“ als auch ein „Zuwenig“ der Aktivität der Shh/*Ptch* Signalkaskade die normale Entwicklung von Zellverbänden stört, können beide Zustände dieselben Defekte, d. h. in diesem Fall den Entwicklungsdefekt der Erythrozytenlinie, auslösen.

---

**Abbildung 58: Schematische Darstellung der gestörten Hämatopoese von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen.** Die Darstellung der Entwicklungsstadien der hämatopoetischen Vorläuferzellen ist von Nagasawa (Nagasawa T, 2006), die der DN Populationen der T Zelllinie von Bhandoola (Bhandoola A und Sambandam A, 2006b) und die der B Zellen von Busslinger (Busslinger M, 2004) übernommen worden. Abkürzungen: uv, unveränderte Population in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren; nach unten weisende Pfeile, reduzierte Population in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren; nach unten weisende Pfeile in Klammern, anzunehmende reduzierte Population in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren; n.a., nicht analysiert; HCS, hämatopoetische Stammzelle (hematopoietic stem cell); MPP, multipotentiale Vorläuferzelle (multipotential progenitor); LMPP, lymphoid-spezifische multipotente Vorläuferzelle (lymphoid-primed multipotential progenitor); CLP, allgemeine lymphoide Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor); MEP, Megakaryozyt/Erythrozyt Vorläuferzelle (megakaryocyte/erythrocyte progenitor); GMP, Granulozyt/Makrophage Vorläuferzelle (granulocyte/macrophage progenitor); NK, natürliche Killerzelle (natural killer cell); ETP, früher T Zellvorläufer (early T cell progenitor); DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> doppelt negative T Zelle (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double negative T cell); DP, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> doppelt positive T Zelle (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive cell); SP, einfach positive T Zelle (single positive T cell).



#### 4.2.2.5 Zusammenfassende Betrachtung der Funktion von *Ptch* bei der Lymphopoese

Die genaue Funktion des Shh/*Ptch* Signalweges während der Hämatopoese ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund von *in vitro* Experimenten wird jedoch eine wichtige Rolle dieses Signalweges bei proliferativen Vorgängen von humanen hämatopoetischen Zellen des peripheren Blutes postuliert (Bhardwaj G *et al.*, 2001; Kawai S und Sugiura T, 2001).

Unsere Ergebnisse zeigen erstmalig, dass *Ptch* eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der lymphoiden Zelllinien im adulten Organismus spielt.

Der beobachtete Verlust von IL-7R $\alpha$  exprimierenden Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>low</sup> Sca-1<sup>-low</sup> Vorläuferzellen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen weist stark auf eine Blockade der Entwicklung von CLP im Knochenmark hin, was sich in dem daraus resultierenden Verlust von frühen B Zellen in Milz und Knochenmark widerspiegelt.

Außer B Zellen entwickeln sich auch die ETP aus der CLP Fraktion. Aufgrund des CLP Verlustes in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen kann ein vermindertes Einwandern von ETP in den Thymus und ein damit verbundener Defekt der T Zellentwicklung angenommen werden. Jedoch ist eine ETP Differenzierung auch aus HSC, MPP oder LMPP möglich (Bhandoola A und Sambandam A, 2006b). Da die letzteren Zellpopulationen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren intakt erscheinen, ist eine normale CLP-unabhängige ETP Entwicklung in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren anzunehmen. Aufgrund des enormen Proliferationspotentials dieser ETP sollte daher eine relativ normale T Zellentwicklung im Thymus von *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren möglich sein. Dies war jedoch nicht der Fall. Obwohl die relative Anzahl von DN1 Zellen in *tPtch*<sup>-/-</sup> Thymi erhöht war, fehlten die DN2 und DN3 Stadien der Thymozyten vollständig, was auch durch den reduzierten Thymuskortex gezeigt wurde, in dem sich diese Populationen entwickeln (Palmer E, 2003). Hierbei sind DN3 Zellen der beste Indikator für eine normale T Zellentwicklung, da sich die Zellen ab diesem Stadium nur noch zu Thymozyten, nicht aber zu B Zellen entwickeln können (Bhandoola A und Sambandam A, 2006b). Die DN1 Fraktion dagegen sagt nichts über die in den Thymus eingewanderten ETP aus, da sich a) die in den Thymus eingewanderten ETP nicht alle in der DN1 Fraktion des Thymus befinden (Wu L *et al.*, 1991; Bhandoola A und Sambandam A, 2006b) (siehe Abbildung 58) und b) da sich Zellen des DN1 Stadiums auch in andere Zelllinien (z. B. B Zellen) weiterentwickeln können. Somit muss nun angenommen

werden, dass die Depletion der Thymozyten in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen entweder durch einen Migrationsdefekt der ETP zum Thymus hervorgerufen wird, oder aber durch ein defektes Thymusstroma ausgelöst wird, so dass sich die in den Thymus eingewanderten ETP nicht mehr weiterentwickeln können.

Obwohl nicht alle Fragen geklärt sind, wird offensichtlich, dass *Ptch* eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von T Zellen spielt.

Die hier vorgestellten Daten werden auch durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen untermauert. Aufgrund von bisherigen *in vitro* und *in vivo* Analysen ist bekannt, dass die Entwicklung von Thymozyten direkt von der Aktivität des Shh/Ptch Signalwegs abhängig ist (Outram SV *et al.*, 2000; Gutierrez-Frias C *et al.*, 2004; Shah DK *et al.*, 2004; Sacedon R *et al.*, 2005; Andaloussi AE *et al.*, 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass *Ptch* in DN Zellen exprimiert wird (Outram SV *et al.*, 2000). Außerdem konnte durch Shah *et al.* gezeigt werden, dass der Shh/Ptch Signalweg eine wichtige Rolle während der Proliferation von DN1 Zellen, sowie bei der Entwicklung zum DN2 Stadium spielt (Shah DK *et al.*, 2004). Dabei scheint vor allem die Regulierung der *IL-7R $\alpha$*  Expression durch die Shh/Ptch Signalkaskade wichtig zu sein (Gutierrez-Frias C *et al.*, 2004). Dies unterstreicht ebenfalls unsere Ergebnisse aus Knochenmarksanalysen, in denen gezeigt wird, dass *Ptch* in der CLP-enhaltenen Lin<sup>-</sup> Knochenmarksfraktion für die Expression von *IL-7R $\alpha$*  verantwortlich ist.

### 4.2.3 Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die biallelische ubiquitäre Inaktivierung von *Ptch* im adulten Tier zu einem partiellen Defekt in der Entwicklung der erythroiden Linie und zu schweren Differenzierungsdefekten lymphoider Zellen führt. Dies spiegelt vor allem die Involution des Thymus wider.

Anhand der Daten kann jedoch momentan nicht ausgeschlossen werden, dass auch ein Defekt des Thymusstromas in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen die Entwicklung der Thymozyten beeinflusst und damit zum Verlust von späten Differenzierungsstadien der T Zellen führt. Ebenso könnte auch das Stroma des Knochenmarks durch die Inaktivierung von *Ptch* zu den Entwicklungsdefekten der B Zelllinie und der gesamten lymphoiden Vorläuferpopulation führen. Diese Annahme wird vor allem dadurch unterstützt, dass

die aktive Shh/Ptch Signalkaskade auch die Expression von *Bmp* Genen im Knochenmarkstroma reguliert, welche wichtige regulatorische Funktionen während der Differenzierung der hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmarkstroma besitzen (Bhardwaj G *et al.*, 2001).

Um dies zu untersuchen, könnten Repopulationsanalysen von immundefizienten Mäusen durchgeführt werden, die mit *tPtch*<sup>-/-</sup> Lin<sup>-</sup> Knochenmarkszellen transplantiert werden. Dadurch könnte untersucht werden, ob der T und B Zelldefekt in *tPtch*<sup>-/-</sup> Tieren tatsächlich zellautonom ist. Weiterhin könnte über Proliferationsstudien untersucht werden, ob außer dem *tPtch*<sup>-/-</sup> induzierten Differenzierungsdefekt auch ein Proliferationsdefekt der entsprechenden Zellpopulationen (z. B. HSC, CLP, etc.) in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen vorliegt.

Die bisherigen Knochenmarks- und Blutanalysen konnten keinen Anhaltspunkt auf die Entwicklung einer Leukämie in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen liefern. Für einen definitiven Ausschluß eines leukämischen Potentials des *tPtch*<sup>-/-</sup> Knochenmarks könnten die oben beschriebenen Proliferations- und Repopulationsanalysen ebenfalls nützlich sein.

Zuletzt weisen die bisherigen Daten darauf hin, dass in *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen ein Immundefekt induziert wird, der dem „Severe Combined Immunodeficiency“ (SCID) Syndrom im Menschen entspricht. So führt SCID, ausgelöst durch *IL-7R $\alpha$*  Mutationen, zum kompletten Verlust von T Zellen und dem Verlust der adaptiven Immunität (Buckley RH, 2004). In ca. 15 % der SCID Fälle sind die auslösenden Faktoren noch nicht bekannt. In dem hier beschriebenen Mausmodell führt die Inaktivierung von *Ptch* zu einer verminderten Zahl von *IL-7R $\alpha$* <sup>+</sup> lymphoiden Vorläuferzellen, obwohl die Expression der Transkriptionsfaktoren *PU.1* und *Ikaros*, die direkt die Expression von *IL-7R $\alpha$*  stimulieren (Lee HC *et al.*, 2005), nicht beeinflusst ist. Da auch der Phänotyp der *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäuse mit dem von *IL-7R $\alpha$*  knock-out Mäusen vergleichbar ist (Peschon JJ *et al.*, 1994), besteht die Möglichkeit, dass eine Fehlregulation des Shh/Ptch Signalweges zur Entwicklung von SCID führen könnte.

#### 4.2.4 Durch intramuskuläre Tamoxifengabe in 6 Wochen alte *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäuse lassen sich keine RMS induzieren

Wie schon mehrmals in dieser Arbeit dargestellt, sollte mit Hilfe der konditionellen *Ptch* knock-out Mäuse geklärt werden, ob eine biallelische Inaktivierung von *Ptch* tatsächlich notwendig ist, um die Entstehung von RMS auszulösen.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, dass der biallelische Verlust von *Ptch* neben dem induzierten schweren Immundefekt auch zur Hyperproliferation einiger sich schnell teilender Gewebe führt. Die *Ptch* Inaktivierung, die durch die Gabe von 5 mg Tamoxifen induziert wurde, ließ jedoch die Beobachtung der *tPtch*<sup>-/-</sup> Tiere nicht über einen Zeitraum von mehr als 23 Tagen zu. Dieser Zeitraum war für die Entstehung von Tumoren, einschließlich der von RMS, zu kurz.

Daher wurde in einem zweiten experimentellen Ansatz die Rekombination des *Ptch*<sup>NX</sup> Locus in *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tieren durch die einmalige intramuskuläre Gabe von 100 µg Tamoxifen induziert.

Durch die intramuskuläre Tamoxifengabe sollte die Rekombination am *Ptch* Locus hauptsächlich im injizierten Muskel – hier vor allem in den adulten Stammzellen des Muskels, den Satellitenzellen (siehe Kapitel 4.3) induziert werden. Jedoch wurde bis zum Abschluss dieser Arbeit in keinem der analysierten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Tiere die Entwicklung von RMS beobachtet. Da aber gezeigt wurde, dass eine Rekombination in Satellitenzellen von *ROSA26-R*<sup>+/-</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen nach der Gabe von Tamoxifen stattfindet und auch im Muskelgewebe von *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäusen *Ptch*<sup>delNX</sup> Transkripte exprimiert werden, kann vermutet werden, dass durch die intramuskuläre Tamoxifengabe tatsächlich eine Rekombination des *Ptch*<sup>NX</sup> Locus im Muskel stattgefunden hat.

Nun gibt es mehrere Möglichkeiten, warum sich in diesen Tieren keine RMS entwickelten. So könnte das Alter der Tiere, bei dem die *Ptch* Inaktivierung stattfindet, ausschlaggebend sein. Außerdem wäre denkbar, dass sich die Entwicklung von RMS durch die Tamoxifengabe in den Muskel von sehr jungen Tieren *in utero* induzieren ließe, da pränatale und neugeborene Mäuse wesentlich mehr Satellitenzellen als 6 Wochen alte Tiere besitzen (Seale P *et al.*, 2000; Oustanina S *et al.*, 2004). Dadurch würde sich die Wahrscheinlichkeit einer biallelischen Inaktivierung von *Ptch* in Satellitenzellen erhöhen.

Außerdem prädisponiert der gemischte genetische Hintergrund (129Sv x C57BL/6N) der *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäuse nicht sehr stark zu RMS, wie auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe Kapitel 3.2.4.1). Das Einkreuzen von Balb/c Allelen wäre eine Möglichkeit, um die Inzidenz für RMS in *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen zu erhöhen (Hahn H *et al.*, 2004).

Des Weiteren könnte die verabreichte geringe Tamoxifendosis nicht ausreichend für die Induktion der Rekombination im Muskel sein. Diese Annahme ist jedoch eher unwahrscheinlich, da eine sehr effektive Rekombination in der unbehaarten Haut der Tiere stattgefunden hat (siehe Kapitel 4.2.4.1).

#### **4.2.4.1 Induktion von Basaliomen durch intramuskuläre Tamoxifengabe in 6 Wochen alte *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäuse**

Obwohl sich nach intramuskulärer Gabe von 100 µg Tamoxifen in den *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen keine RMS induzieren ließen, entwickelten sich Basaliome. Dabei waren vor allem unbehaarte Hautregionen betroffen, während stark behaarte Regionen wie die Bauchhaut erst 6 Monate nach der Tamoxifengabe hyperproliferative Areale aufwiesen. Erste Analysen der Tumoren an Ohren, Schwanz und der Plantarseiten der Pfoten zeigten dabei deutliche hyperproliferative tumorartige Veränderungen der Basalzellschicht sowie der äußeren Wurzelscheide.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, warum die Basaliome schneller in unbehaarten als an der behaarten Haut auftraten. Unterschiedliche äußere Faktoren (z. B. Putztrieb und Reize durch Einstreu) wie auch interne Unterschiede zwischen den Hautarealen (z. B. unterschiedliche Dicke des Unterhautfettgewebes, Schnelligkeit des Haarzyklus etc.) könnten die schneller auftretenden hyperproliferativen Bereiche unbehaarter Haut erklären. Auch die vermehrte Exposition der unbehaarten Haut mit UV-Strahlung wäre ein denkbarer Faktor. Allerdings kann dies ausgeschlossen werden, da die Tiere in Plexiglaskäfigen gehalten wurden, die die ohnehin schon geringe UV-Lichtemissionen der Lampen im Tierstall auf eine minimale UV-Bestrahlung reduzieren.

Eine weitere Möglichkeit ist eine bessere Durchblutung der unbehaarten Haut, so dass das gespritzte Tamoxifen hier besser anfluten kann und wirksamer ist.

Die Möglichkeit zur Induktion von Basaliomen in den *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäusen ist für die Erforschung dieser Tumoren und auch für die Entwicklung neuer Therapieansätze für den Menschen von großer Bedeutung.

90 % der sporadisch auftretenden humanen Hauttumore sind Basaliome und betreffen besonders häufig die weißhäutige Bevölkerung (Daya-Grosjean L und Couve-Privat S, 2005). Dabei sind vor allem Menschen ab dem vierzigsten Lebensjahr oder mit defektem Immunsystem prädisponiert (Price MA *et al.*, 1994). Auch spielt die Exposition mit UV-Licht eine übergeordnete Rolle bei der Induktion von Basaliomen (Crowson AN, 2006). Es ist bekannt, dass die heterozygote Keimbahnmutation von *PTCH* (neben der Prädisposition zu MB und RMS) auch zur Entwicklung von Basaliomen prädisponiert. Die Entstehung von Basaliomen sowohl in familiären als auch in sporadischen Fällen geht dabei häufig mit homozygot inaktivierenden Mutationen von *PTCH* einher (Gailani MR *et al.*, 1996; Hahn H *et al.*, 1996; Johnson RL *et al.*, 1996; Wicking C und Bale AE, 1997).

In den bisher gängigen heterozygoten *Ptch*<sup>neo67/+</sup> und *Ptch*<sup>neo12/+</sup> Tiermodellen ist die Induktion von Basaliomen durch UV-Bestrahlung möglich (Aszterbaum M *et al.*, 1999; Mancuso M *et al.*, 2004; So PL *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die Bestrahlung zum biallelischen Verlust von *Ptch* führt, was die Entstehung dieser Tumore bewirkt. Obwohl jedoch die Exposition mit UV-Licht auch zu anderen molekularen Effekten führen kann, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob eine zellautonome homozygote Inaktivierung von *Ptch* tatsächlich der Grund für die Entstehung von Basaliomen ist.

Nun wurde kürzlich durch Adolphe *et al.* ein weiteres konditionelles *Ptch* knock-out Mausmodell beschrieben. Die Autoren zeigen, dass sich auch in diesem Tiermodell durch die induzierte homozygote Deletion von *Ptch* in der Haut Basaliome induzieren lassen (Adolphe C *et al.*, 2006). Trotz der unterschiedlichen experimentellen Ansätze von Adolphe *et al.* und dieser Arbeit kann daher davon ausgegangen werden, dass die Entstehung von Basaliomen durch die homozygote Inaktivierung von *Ptch* ausgelöst wird. Ob sich diese Tumoren dabei aus Zellen der Basalzellschicht oder aber aus Zellen der äußeren Wurzelscheide entwickeln, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Daher konnte die Frage nach der Ursprungszelle des Basalioms noch nicht gelöst werden. Durch immunhistologische Antikörperfärbungen oder das



---

Einkreuzen anderer Zell-spezifischer Cre-Rekombinasen in *Ptch*<sup>NX/NX</sup> Mäuse könnte dies jedoch untersucht werden.

#### 4.2.4.2 Ausblick

Das hier beschriebene Tiermodell kann ersten Analysen zufolge sehr gut für die Analyse von Basaliomen genutzt werden. Vor allem ist dabei hervorzuheben, dass nach intramuskulärer Gabe von Tamoxifen mit keinen größeren körperlichen Beeinträchtigungen der Tiere, selbst über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten, zu rechnen ist.

Ob sich die so behandelten *Ptch*<sup>NX/NX</sup> *ERT2*<sup>+/-</sup> Mäuse tatsächlich für die Analyse von RMS eignen, muss noch geklärt werden. Wahrscheinlich muss der genetische Hintergrund durch das Einkreuzen von Balb/c Allelen, die für die Entwicklung von RMS prädisponieren (Hahn H *et al.*, 2004), korrigiert werden. Des Weiteren muss wahrscheinlich die *Ptch* Inaktivierung zu einem früheren Zeitpunkt erfolgen.

### **4.3 Versuch des Nachweises der Ursprungszellen von *Ptch*-assozierten RMS mit Hilfe von transgenen *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mauslinien**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein neues Modell zur Entstehung von *Ptch*-assozierten RMS vorgeschlagen (Uhmann A *et al.*, 2005) (siehe Kapitel 4.1.3). Die Ursprungszelle des RMS ist bisher jedoch nicht bekannt. Es wird aber angenommen, dass Muskelstammzellen an der Entwicklung von RMS beteiligt sind. Dabei werden sowohl die Satellitenzellen als auch die Zellen der „Side Population“ des Muskels in der Literatur als Muskelstammzellen und potentielle Vorläuferzellen von RMS diskutiert (Tiffin N *et al.*, 2003; Relaix F *et al.*, 2005), doch fehlen momentan geeignete Modellsysteme zur Lösung dieser Frage.

Das Tiermodell zur induzierbaren biallelischen Inaktivierung von *Ptch*, welches im zweiten Teil dieser Arbeit vorgestellt wurde, könnte dabei neue Möglichkeiten zur detaillierten Analyse der *Ptch*-assozierten Entwicklung von RMS bieten. Durch die intramuskuläre Injektion von Tamoxifen in *Ptch<sup>NX/NX</sup> ERT2<sup>+/-</sup>* Mäuse ist es jedoch bislang nicht möglich gewesen, die Entwicklung von RMS zu induzieren (siehe Kapitel 4.2.4).

In dieser Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, *Ptch* spezifisch in Satellitenzellen zu deaktivieren. Falls sich durch dieses Vorgehen RMS induzieren lassen sollten, wäre dies der direkte Nachweis dafür, dass diese Tumoren aus den Satellitenzellen entstehen. Um nun *Ptch* spezifisch in Satellitenzellen zu deletieren, wurden transgene Mauslinien zur Expression einer induzierbaren Cre-Rekombinase unter Kontrolle des murinen *Pax7* Promotors etabliert.

Um diese Strategie besser verstehen zu können, sollen an dieser Stelle die bekannten Daten der Literatur zur Expression von *Pax7* im Embryo und in adulten Geweben aufgelistet werden.

Die Expression von *Pax7* beschränkt sich nicht nur auf die Satellitenzellen im adulten Muskel. Der Transkriptionsfaktor wird auch im Verlauf der embryonalen Entwicklung exprimiert (Jostes B *et al.*, 1990; Goulding MD *et al.*, 1991; Mansouri A *et al.*, 1994; Relaix F *et al.*, 2006). So wird *Pax7* während der Embryogenese im dorsalen Neuralrohr exprimiert und reguliert die Entwicklung von dorsalen ektodermalen Zellen während der Neurulation (Jostes B *et al.*, 1990; Goulding MD *et al.*, 1991). In

späteren Entwicklungsstadien ist *Pax7* zur regionalen Differenzierung des Neuralrohrs notwendig (Wada H *et al.*, 1996). Seine Expression in den Zellen der Neuralleiste des Neuralrohrs (neural crest cells) führt zur Auswanderung der Zellen aus dem Neuralrohr in den sich entwickelnden Embryo, wo sie zu Neuronen, Gliazellen des peripheren Nervensystems und Melanozyten differenzieren (Stoykova A und Gruss P, 1994; Wada H *et al.*, 1996). *Pax7* wird auch während der Mesodermentwicklung im Dermatomyotom exprimiert (Stoykova A und Gruss P, 1994).

Die *Pax7* Expression im jungen adulten Tier beschränkt sich auf abgegrenzte Hirnbereiche (Stoykova A und Gruss P, 1994), Bereiche des peripheren Nervensystems (Jostes B *et al.*, 1990; Goulding MD *et al.*, 1991), neuromuskuläre Spindeln (Rodger J *et al.*, 1999) und auf einen Großteil der Satellitenzellen im Skelettmuskel (Seale P *et al.*, 2000; Kuang S *et al.*, 2006; Relaix F *et al.*, 2006).

Mäuse mit einer homozygoten *Pax7* Defizienz entwickeln Defekte in Zellen der anterioren Neuralleiste und sterben postnatal (Mansouri A *et al.*, 1996). Des Weiteren besitzen diese Mäuse nur eine geringe Anzahl Satellitenzellen im Skelettmuskel, die während der weiteren postnatalen Entwicklung stark abnimmt (Seale P *et al.*, 2000; Oustanina S *et al.*, 2004). Die Muskelfasern dieser Tiere sind jedoch normal entwickelt. Daher wird angenommen, dass die Expression von *Pax7* essentiell für die Erneuerung und Erhaltung der Satellitenzellpopulation im jungen Tier ist (Oustanina S *et al.*, 2004; Relaix F *et al.*, 2006).

Aufgrund dieser Daten ist der *Pax7* Promotor hervorragend dafür geeignet, Gene in Satellitenzellen zu exprimieren. Daher sollte dieser Promotor genutzt werden, um eine Cre-Rekombinase in Satellitenzellen zu exprimieren. Obwohl sich die Expression von *Pax7* im adulten Tier im Skelettmuskel auf die Satellitenzellen und auf Nervenstrukturen beschränkt (Jostes B *et al.*, 1990; Goulding MD *et al.*, 1991; Rodger J *et al.*, 1999; Seale P *et al.*, 2000; Kuang S *et al.*, 2006; Relaix F *et al.*, 2006), muss jedoch die Cre-Rekombinase induzierbar sein, um eine Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination während der embryonalen Entwicklung zu vermeiden. Daher wurde eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase verwendet (MerCreMer-Rekombinase (Verrou C *et al.*, 1999), im Folgenden als CreTM-Rekombinase bezeichnet).

Mit Hilfe von *in vitro* Analysen in C2C12 Zellen konnte gezeigt werden, dass das klonierte proximale murine *Pax7* Promotorfragment in myogenen Vorläuferzellen aktiviert wird. Die Vorarbeiten zeigten weiterhin, dass auch die Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase, welche unter diesem Promotor exprimiert wurde, in myogenen Zellen gebildet wird und sich durch die Gabe von Tamoxifen induzieren lässt. Daher wurde damit gerechnet, dass die Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase auch *in vivo* in myogenen Vorläuferzellen aktiv sein sollte.

#### 4.3.1 Keine Expression von *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* während der Embryonalentwicklung

In keiner der 4 etablierten transgenen *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mauslinien wurde eine Expression bzw. Aktivität der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase während der embryonalen Entwicklung festgestellt. Hierzu wurden die *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mäuse mit *ROSA26-R<sup>+/-</sup>* Reportermausen gekreuzt und die Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase mit einer kumulativen Dosis von 2 mg Tamoxifen *in utero* stimuliert. Die Embryonen wurden isoliert und mit X-Gal gefärbt. Es konnte jedoch keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Embryonen nachgewiesen werden.

Von Lang *et al.* wurde unabhängig von dieser Studie ein zu dem hier verwendeten 3,2 kb langes *Pax7* Promotorfragment vergleichbar langes *Pax7* Fragment (*Pax7-4*) benutzt, um die Aktivität dieses Fragments in transgenen Embryonen zu untersuchen. Hierzu haben Lang *et al.* das Promotorfragment vor das  $\beta$ -Galaktosidasegen kloniert. Dann wurden transgene Mäuse hergestellt und Embryonen am Tag 10,5 *dpc* bis 13,5 *dpc* isoliert. Wie die Daten von Lang *et al.* zeigen, wurde das  $\beta$ -Galaktosidasegen nur sehr schwach im Embryo exprimiert. Dabei beschränkte sich die Aktivität des Reportergens auf schmale Bereiche des Kleinhirns und der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze (Lang D *et al.*, 2003).

Aufgrund des Vergleichs unserer Daten mit den Daten von Lang *et al.* könnte sich nun die fehlende X-Gal-Färbung in unserem Experiment durch mehrere Faktoren erklären lassen: 1) Zunächst könnte die eingesetzte Dosis von 2 mg Tamoxifen zu gering gewesen sein, um die Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase in ausreichender Weise zu aktivieren. Da jedoch auch in der Literatur mit solchen Dosen gearbeitet wird, kann dies ausgeschlossen werden. 2) Des Weiteren ist es möglich, dass sich die Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase nicht optimal durch Tamoxifen induzieren lässt. Laut Empfehlung von

Prof. M. Reth (Max-Planck-Institut für Immunobiologie, Freiburg), aus dessen Labor diese Cre-Rekombinase stammt, sollte anstatt Tamoxifen das Analog 4-OHT benutzt werden. Unsere Experimente am adulten Tier haben jedoch gezeigt, dass sich durch 4-OHT und Tamoxifen derselbe Effekt auf die Induktion der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase im Muskel erzielen lässt. Daher kann angenommen werden, dass 4-OHT keine bessere Induktion der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase als Tamoxifen hervorruft. 3) Weiterhin ist es möglich, dass die Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase die *loxP*-Sequenz-flankierte Kasette am *ROSA26* Locus nicht optimal entfernt, was eine schwache oder keine X-Gal-Färbung nach sich ziehen könnte. Literaturangaben zufolge ist die hier eingesetzte *ROSA26-R* Mauslinie nicht für alle Cre-Rekombinasen eine optimale Reportermaus. 4) Auch die Länge des Promotorfragments könnte bei der Expression eine Rolle spielen. Das *Pax7* Promotorfragment von *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* ist in der 5'-Region um ca. 800 bp kürzer als das Promotorfragment von Lang *et al.* Innerhalb dieser 800 bp sind jedoch keine Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren gefunden worden, welche eine fehlende X-Gal-Färbung in *ROSA26-R<sup>+/-</sup> Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Embryonen erklären könnte.

Nun enthält das in dieser Arbeit eingesetzte Promotorfragment im Gegensatz zu Pax7-4 nicht nur den Transkriptionsstart von *Pax7*, sondern auch die Sequenz vom *Pax7* Transkriptionsstart bis hin zum *Pax7* Translationsstart. Hierbei handelt es sich um 25 bp. Innerhalb dieser Sequenz sind noch zusätzlich zwei für die myogene Expression von *Pax7* möglicherweise wichtige Proteinbindungsdomänen lokalisiert. Dies sind die Bindungsdomäne für „TEF1 related muscle factor“ und eine „*muscle initiator sequence*“ (Abbildung 49). Daher wurde nun überprüft, ob sich die Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase im adulten Muskel induzieren lässt. Gegebenfalls könnte sich dann die fehlende embryonale Aktivität von *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* sogar als vorteilhaft für die geplanten Studien erweisen, da dann keine „leakiness“ der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase während der Embryonalentwicklung auftreten sollte.

#### **4.3.2 *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* wird im adulten Muskel in Nervenstrukturen, nicht aber in Satellitenzellen aktiviert**

Keine der 4 transgenen *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linien zeigte eine induzierbare Cre<sup>TM</sup>-Rekombinaseaktivität in Satellitenzellen des adulten Muskels. Auch nach

intramuskulärer Gabe von 4-OHT (anstatt von Tamoxifen) konnte keine Aktivität in Satellitenzellen nachgewiesen werden.

Dies stimmt mit Daten der von Lang *et al.* beschriebenen transgenen Mauslinien überein, bei denen ebenfalls keine Reporterogenaktivität in Satellitenzellen nachgewiesen werden konnte (persönliche Mitteilung Epstein JA, Universität Pennsylvania, Philadelphia, USA).

Interessanterweise wurde aber die Expression und Aktivität der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase in Nervenfasern der Skelettmuskeln adulter *ROSA26-R<sup>+/-</sup> Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mäuse detektiert. Wahrscheinlich wird sie in den Schwannschen Scheiden exprimiert. Dies konnte in 3 der 4 untersuchten transgenen Linien nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um die *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linien #21, #27 und #54. Dies zeigt, dass es sich nicht um eine unspezifische Transgenexpression aufgrund der Integration im Genom handelt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase in diesen 3 Linien nur nach Tamoxifeninduktion nachweisbar ist. Daraus kann geschlossen werden, dass die 3 *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Linien nicht „leaky“ sind und sich sehr gut für induzierte Geninaktivierungen eignen.

Wie bereits beschrieben, enthält das klonierte murine *Pax7* Promotorfragment mehrere putative Proteinbindungsdomänen für myogene Transkriptionsfaktoren (Abbildung 49). Die Bindungsdomänen für allgemeine Transkriptionsfaktoren entsprechen im analysierten murinen *Pax7* Promotor denen des humanen *Pax7* Promotors (Oct, NF1, TATA, TFIID, CAAT-box) (Murmans *et al.*, 2000). Auch die Bindungsstellen für spezielle Transkriptionsfaktoren, wie Egr-1 (early growth response 1) und FKH (fork head), wurden im Vergleich zwischen humanem und murinem *Pax7* Promotor bestätigt. Des Weiteren wurden Bindungsstellen für muskelspezifische regulatorische Proteine im murinen Modell nachgewiesen. So sind sowohl eine „*muscle initiator sequence*“, eine Domäne für „TEF-1 related muscle factor“ als auch eine Domäne für den MyoD (myogenic differentiation 1) Transkriptionsfaktor, eine Domäne für SRF (serum response factor) und eine E-box Bindungsdomäne (Proteinbindungsdomäne für myogene Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren) in dem klonierten Promotorfragment enthalten. Dabei entsprechen sowohl die Lokalisation und die Sequenz der E-box als auch der MyoD Bindungsdomäne den von Murmans *et al.* beschriebenen Bindungsdomänen des humanen *Pax7* Promotors (Murmans *et al.*, 2000).

Von Murmann *et al.* wurde die Expression des klonierten humanen *Pax7* Promotors in der myogenen Zelllinie C2C12 nachgewiesen, was auch in dieser Arbeit für den murinen *Pax7* Promotor gezeigt wurde. Jedoch sind die myogenen Proteinbindungsdomänen *in vivo* scheinbar nicht ausreichend, um eine Expression des *Pax7* Promotorfragments in Satellitenzellen zu bewirken.

Zu FKH Proteinen ist festzuhalten, dass diese nicht nur Muskel-spezifisch sondern auch neuronal exprimiert werden (Fukunaga K *et al.*, 2005). Daher könnten die beiden FKH Bindungsdomänen für die Expression des Transgens im peripheren adulten Nervengewebe genügen. Die Expression von endogenem murinem *Pax7* in Schwannschen Scheiden von Nerven (Rodger J *et al.*, 1999) und auch in Bereichen des adulten peripheren Nervensystems ist bekannt (Jostes B *et al.*, 1990), doch bisher nicht näher untersucht worden.

### 4.3.3 Ausblick

#### 4.3.3.1 Sind *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mäuse für Studien zur Ursprungszelle des RMS geeignet?

Wie die hier vorgestellten Daten zeigen, konnte mit den bisherigen Versuchsansätzen keine Aktivierung der Cre<sup>TM</sup>-Rekombinase in Satellitenzellen erzielt werden. Daher wird man die *Tg(Pax7Cre<sup>TM</sup>)* Mauslinien zum jetzigen Zeitpunkt für eine Satellitenzell-spezifische *Ptch* Inaktivierung zum Nachweis der Ursprungszelle des RMS nicht nutzen können.

Da jedoch die verwendete Reportermaus *Rosa26-R* nicht sehr sensitiv ist, sollte man eventuell noch eine weitere Reportermauslinie testen. Dafür wäre z. B. die *R26R-EYFP* Mauslinie verwendbar, da diese als sensitiver gegenüber der Cre-Rekombinase-vermittelten Rekombination beschrieben wurde und auch durchflußzytometrische Analysen von EYFP-positiven Zellen zuläßt (Srinivas S *et al.*, 2001).

Des Weiteren sollte man höhere Dosen von 4-OHT oder Tamoxifen zur Induktion des Transgens testen, bevor man die endgültige Aussage trifft, dass sich die hier generierten Mauslinien nicht für eine Ablation von Genen in Satellitenzellen eignen.

#### **4.3.3.2 Sind *Tg(Pax7CreTM)* Mäuse für Studien an adulten Nerven geeignet?**

Mit Hilfe des hier beschriebenen *Tg(Pax7CreTM)* Mausmodells ist nicht nur die genaue Analyse der *Pax7* exprimierenden neuronalen Zellen des Muskels möglich, sondern auch die Analyse nach induzierter Geninaktivierung in diesen Zellen. Natürlich sind hierfür zunächst weitere Untersuchungen nötig, wie z. B. die Präparation der betroffenen Nerven, um die *Tg(Pax7CreTM)* Transgenexpression genauer zu charakterisieren. Anhand des bisher untersuchten Materials besteht die Vermutung, dass das Transgen in Zellkernen der Schwannschen Scheiden, welche sich aus Oligodendrozyten entwickeln, exprimiert wird (persönliche Mitteilung Dr. W. Schulz-Schaeffer, Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Neuropathologie). Sollte sich diese Annahme bestätigen, wäre auch die Expressionsanalyse von Gliazellen des Gehirns (Rodger J *et al.*, 1999) interessant und es würde die Möglichkeit eröffnet, mit Hilfe dieses Tiermodells die Regeneration von peripheren Nerven und des Zentralnervensystems im Zusammenhang mit unterschiedlichen Geninaktivierungen zu untersuchen.



## 5 Zusammenfassung

Heterozygote Keimbahnmutationen des Sonic Hedgehog (Shh) Rezeptors *Patched* (*Ptch*) sind im Gegensatz zu homozygoten Mutationen nicht letal und prädisponieren mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Entstehung von Basaliomen, Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen (RMS). Heute wird angenommen, dass es sich bei *Ptch* um ein Tumorsuppressorgen handelt, da für die Entstehung von Basaliomen die biallelische Inaktivierung von *Ptch* auf somatischer Ebene notwendig ist. Dagegen konnte jedoch gezeigt werden, dass für die Entstehung von RMS und MB ein monoallelischer Ausfall von *Ptch* genügt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Pathogenese von *Ptch*-assoziierten RMS besser zu verstehen. Des Weiteren sollte der Versuch unternommen werden, die Ausgangszelle dieser Tumoren zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst mit Hilfe anderer Labormitglieder demonstriert, dass die Entstehung von RMS in heterozygoten *Ptch*<sup>neo67/+</sup> Mäusen durch ein Ungleichgewicht der Expression des mutanten und des Wildtyp (wt) *Ptch* Allels zu erklären ist. Dabei wird in RMS das mutante Allel verstärkt, das wt Allel hingegen vermindert exprimiert. Um diese Beobachtung tiefergehend zu analysieren, wurden die verschiedenen Spleissvarianten von *Ptch* im RMS untersucht.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Shh/*Ptch* Signalweg sowohl durch die Expression von mutantern *Ptch* Protein als auch durch die Reduktion von wt *Ptch* aktiviert wird. Aufgrund der Ergebnisse wurde ein Modell zur Entstehung von *Ptch*-assoziierten RMS vorgeschlagen, in dem die Tumorentstehung durch mutationsbedingte Inaktivierung eines *Ptch* Allels und transkriptionelles Abschalten des anderen Allels induziert wird (Uhmann A *et al.*, 2005).

Um die Entstehung von *Ptch*-assoziierten Tumoren im Detail untersuchen zu können, wurde eine mutante Mauslinie charakterisiert, die die konditionelle, biallelische Deletion von *Ptch* im adulten Organismus ermöglicht. Unter Verwendung einer induzierbaren Cre-Rekombinase wurde *Ptch* systemisch in adulten Mäusen inaktiviert. Innerhalb kürzester Zeit führte dies zu hyperproliferativen Veränderungen der Haut, des Gastrointestinaltrakts und des Mesenteriums. Des Weiteren wurde durch die *Ptch* Deletion ein schwerer Defekt der T und B Zellentwicklung im Thymus und im Knochenmark ausgelöst. Der Defekt resultiert in einem Verlust von unreifen,

---

peripheren B Zellen und einem kompletten Verlust der T Zellen im Thymus (Uhmann A *et al.*, 2006 eingereicht).

Zusätzlich wurde nach lokaler Induktion der Cre-Rekombinase im Muskel der Tiere nach 90 Tagen die Entstehung von Basaliomen, nicht aber die von RMS oder anderen Defekten induziert.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit transgene Mäuse, die eine induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des murinen *Pax7* Promotors exprimieren hergestellt und charakterisiert. Mit Hilfe dieser Mauslinie sollte *Ptch* in den konditionellen *Ptch* knock-out Mäusen spezifisch in Satellitenzellen (adulte Stammzellen des Skelettmuskels) deletiert werden. Dadurch sollte der Beweis erbracht werden, dass RMS aus Satellitenzellen entstehen. Bis zum Abschluss dieser Arbeit konnte die transgen exprimierte Cre-Rekombinase in Satellitenzellen nicht aktiviert werden. Dagegen fand sich eine Aktivierung der Cre-Rekombinase in den Nerven des Skelettmuskels, in dem der *Pax7* Promotor ebenfalls aktiv ist. Daher könnten die generierten transgenen Mäuse ein neues Modell für die Untersuchung der Entwicklung und regenerativer Prozesse peripherer Nerven darstellen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

<sup>32</sup> P	Radioaktives Phosphorisotop
6-FAM	6-Carboxyfluoreszein
AP-2	Proteinbindedomäne für das Protein <u>a</u> ctivator protein 1
APAAP	<u>a</u> lkalische <u>P</u> hosphatase <u>a</u> nti- <u>a</u> lkalische <u>P</u> hosphatase
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
Bcl2	<u>B</u> cell <u>l</u> eukemia/ <u>l</u> ymphoma <u>2</u>
BFU-E	<u>b</u> urst- <u>f</u> orming <u>u</u> nit <u>e</u> rythroid
Bil-T	Gesamt-Bilirubin
<i>BMP/Bmp</i>	<u>b</u> one <u>m</u> orphogenetic <u>p</u> roteins
Bq	<u>B</u> ecquerel
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine (Rinderserumalbumin)
BUN	<u>b</u> lood <u>u</u> rea <u>n</u> itrogen (Blutharnstoff)
C	Protein- bzw. Nukleinsäure-spezifischer Koeffizient
c	Konzentration von Proteinen bzw. Nukleinsäuren
c	<u>c</u> ortex (Kortex)
CAAT-box	Proteinbindedomäne eukaryotischer Promotoren
<i>Cdh1</i>	<u>E</u> - <u>c</u> ad <u>h</u> er <u>i</u> n
cDNA	<u>c</u> opy <u>D</u> N <u>A</u>
CFU	<u>c</u> olony- <u>f</u> orming <u>u</u> nit
CFU-G	<u>c</u> olony- <u>f</u> orming <u>u</u> nit <u>g</u> ranulocyte
CFU-GEMM	<u>c</u> olony- <u>f</u> orming <u>u</u> nit <u>g</u> ranulocyte/ <u>e</u> rythrocyte/ <u>m</u> acrophage/ <u>m</u> egakaryocyte
CFU-GM	<u>c</u> olony- <u>f</u> orming <u>u</u> nit <u>g</u> ranulocyte/ <u>m</u> acrophage
CFU-M	<u>c</u> olony- <u>f</u> orming <u>u</u> nit <u>m</u> acrophage
Chol	<u>C</u> holesterin
<i>Ci</i>	<u>C</u> ubitus <u>i</u> nteruptus ( <i>D. Melanogaster</i> Gli-Homolog)
<i>c-kit</i>	<u>k</u> it <u>O</u> nkogen
CLP	<u>c</u> ommon <u>l</u> ymphoid <u>p</u> rogenitor (allgemeine lymphoide Vorläuferzelle)
CMP	<u>c</u> ommon <u>m</u> yeloid <u>p</u> rogenitor (allgemeine myeloische Vorläuferzelle)
CMV	<u>C</u> ytomegalie <u>V</u> irus
<i>Cos2/COS2</i>	<u>C</u> ostal <u>2</u>
CreTM	MerCreMer-Rekombinase
C-terminal	carboxyterminal
Ct-Wert	<u>c</u> ycle <u>t</u> reshold (Schwellenwert)
Cy3, Cy5, Cy7	Indodikarbocyanin-Derivate
DAPI	4'6-D <u>a</u> mino-2- <u>p</u> henylindiol
<i>Dhh</i>	<u>D</u> esert <u>h</u> edge <u>h</u> og
<i>DISP/Disp</i>	<u>D</u> isp <u>a</u> tch <u>e</u> d
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	N.N.- <u>D</u> imethylsulfoxid
DN	<u>d</u> ouble <u>n</u> egative (Doppelt negative)
dNTPs	<u>D</u> eoxyribon <u>u</u> kleotid <u>t</u> riphosphate
DP	<u>d</u> ouble <u>p</u> ositive (doppelt positive)
<i>dpc</i>	<u>d</u> ays <u>p</u> ost <u>c</u> o <u>i</u> tum (Tage nach der Kopulation)

---

<i>Dpp</i>	<u>Decapentaplegic</u>
DTT	<u>Dithiothreitol</u>
<i>E</i>	<u>Extinktion</u>
<i>EBF</i>	<u>early B cell factor 1</u>
E-box	Typische Proteinbindedomäne für myogene Helix-Loop-Helix Proteine
EDTA	<u>Ethylen-diamin-tetraacetat</u>
<i>Egr-1</i>	<u>early growth response 1</u>
EPO	<u>Erythropoietin</u>
<i>ERT2</i>	<u>ROSA26CreERT2</u>
ETP	<u>early lymphoid progenitor</u> (frühe T Zellvorläuferzelle)
<i>f</i>	Verdünnungsfaktor
FACS	<u>fluorescent-activated cell sorting</u> (durchflusszytometrische Analyse)
FCS	<u>fetal calf serum</u> (fötales Kälberserum)
FITC	<u>Fluoresceinisothiocyanat</u>
FKHR	<u>fork head box O1</u>
<i>FLPase</i>	DNA-Rekombinationsenzym (bindet an <i>fl</i> DNA-Konsensussequenzen)
<i>fl</i>	<u>fl</u> Sequenz (DNA-Konsensussequenz zur Bindung der FLPase)
<i>Fit3</i>	<u>FMS-like tyrosine kinase 3</u>
<i>Fu/FU</i>	<u>fused</u>
<i>g</i>	<u>granulärer, musköser Magen</u>
G418	Geneticinsulfat
Gadd45 $\alpha$	<u>growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha</u>
<i>Gapd</i>	<u>Glycerinaldehyd-3-phosphatase-dehydrogenase</u>
Gh	<u>Großhirn</u>
Gli-BS	<u>Gli-binding site</u> (Gli-Proteinbindungsdomäne)
Glu	<u>Glukose</u>
GMP	<u>granulocyte/macrophage progenitor</u> (Granulozyt/Makrophage Vorläuferzelle)
GSK-3	<u>glykogen synthetase kinase 3</u>
Ha	<u>Haut</u>
He	<u>Herz</u>
<i>Hh</i>	<u>Hedgehog</u>
<i>HMGCR</i>	<u>3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase</u>
HRP	<u>horseradish peroxidase</u> (Meerrettich Peroxidase)
HS	<u>horse serum</u> (Pferdeserum)
HSC	<u>hematopoietic stem cell</u> (hämatopoetische Stammzelle)
IF	<u>Immunfluoreszenz</u>
<i>Igf2</i>	<u>insulin-like growth factor 2</u>
IHC	<u>Immunhistochemie</u>
<i>Ihh</i>	<u>Indian hedgehog</u>
<i>Ikaros (Zfpn1a1)</i>	<u>zinc finger protein, subfamily 1A, 1</u>
IL-3	<u>Interleukin-6</u>
IL-6	<u>Interleukin-3</u>
IL-7Ra	$\alpha$ -Kette des <u>Interleukin-7</u> Rezeptors
Kh	<u>Kleinhirn</u>
LB	<u>Luria -Bertani</u>
Le	<u>Leber</u>

Lin <sup>-</sup>	<u>l</u> ineage <u>n</u> egative
LMPP	<u>l</u> ymphoid-primed <u>m</u> ultipotent <u>p</u> rogenitor (lymphoid-spezifische multipotente Vorläuferzelle)
LOH	<u>l</u> oss <u>o</u> f <u>h</u> eterozygosity (Verlust beider Genallele)
<i>loxP</i>	<i>loxP</i> Sequenz (DNA-Konsensussequenz zur Bindung der Cre-Rekombinase)
Lu	<u>L</u> unge
MB	<u>M</u> edullo <u>b</u> lastom
me	<u>M</u> edulla
MEP	<u>m</u> egakaryocyte/ <u>e</u> rythrocyte <u>p</u> rogenitor (Megakaryozyt/Erythrozyt Vorläuferzelle)
MGB	<u>m</u> inor <u>g</u> roove <u>b</u> inder (Bindung an der kleinen Furche der DNA)
Mi	<u>M</u> ilz
M-PBT	<u>M</u> ilchpulver- <u>P</u> BT-Lösung
MPP	<u>m</u> ultipotent <u>p</u> rogenitor (multipotente Vorläuferzelle)
<i>MyoD</i>	<i>myogenic differentiation 1</i>
NBCCS	<u>N</u> evoid <u>B</u> asal <u>C</u> ell <u>C</u> arcinoma <u>S</u> yndrome
<i>neoR</i>	<i>Neomycin-Resistenzgen</i>
<i>NF-1</i>	<i>nuclear factor-1</i>
ng	<u>n</u> icht- <u>g</u> randulärer, kutaner Magen
Ni	<u>N</u> iere
NK cell	<u>n</u> atural <u>k</u> iller <u>c</u> ell (natürliche Killerzelle)
ntc	<u>n</u> o <u>t</u> emplate <u>c</u> ontrol (PCR Kontrollreaktion ohne Zugabe von Matrizen DNA)
N-terminal	aminoterminal
Oct	Proteinbindedomäne für POU Domänen Transkriptionsfaktoren
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
p27 <sup>kip1</sup> (Cdkn1b)	<u>c</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase inhibitor <u>1b</u> (p27)
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> el <u>e</u> lektrophorese
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Phosphat-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
PBT	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>t</u> ween20 saline (Phosphat-gepufferte Natriumchlorid Lösung mit Tween20)
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
<i>PKA</i>	<i>protein kinase A</i>
PS	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
<i>Ptch/PTCH</i>	<i>Patched</i>
<i>Ptch<sup>dt2</sup></i>	<i>Ptch</i> Allel mit der Deletion der Exone 1 und 2
<i>Ptch<sup>dt67</sup></i>	<i>Ptch</i> Allel mit Deletion der Exone 6 und 7
<i>Ptch<sup>delNX</sup></i>	<i>Ptch</i> Allel mit Cre-vermittelter Deletion der Exone 8 und 9
<i>Ptch<sup>NX</sup></i>	<i>Ptch</i> Allel zur Cre-vermittelten Deletion der Exone 8 und 9
<i>PU.1 (Sfpi1)</i>	<i>SPFV proviral integration 1</i>
RACE	<u>r</u> apid <u>a</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds (Amplifikation von cDNA Enden)
<i>Rag-1</i>	<i>recombination activating gene 1</i>
<i>Rag-2</i>	<i>recombination activating gene 2</i>
<i>Rb1</i>	<i>Retinoblastoma 1</i>
RL	<u>R</u> enilla <u>L</u> uziferase
RMS	<u>R</u> habdo <u>m</u> yo <u>s</u> arkom
RNAi	<u>R</u> NA <u>i</u> nterference (RNA Interferenz)
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
RPE	<u>R</u> - <u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
RSV	<u>R</u> ous <u>S</u> arkom <u>V</u> irus

---

<i>Sca-1 (Ly6a)</i>	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus A</i>
SCAP	<i>SREBP cleavage activating protein</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SCID	<i>Severe Combined Immundeficiency (schwere kombinierte Immundefizienz)</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SGPT	<i>Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase</i>
<i>Shh/SHH</i>	<i>Sonic hedgehog</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SM	<i>Skelettmuskel</i>
<i>Smo/SMO</i>	<i>Smoothed</i>
SP	<i>single positive (einfach positive)</i>
SSC	<i>standard saline citrate (Standard Natriumcitrat Lösung)</i>
SSC/FSC	<i>side scatter/forward scatter</i>
<i>Sufu/SUFU</i>	<i>suppressor of fused</i>
SV40	<i>Siam Virus 40</i>
TATA	Proteinbindedomäne für <i>TATA</i> -binding Protein
TBE	<i>Tris-Borsäure-EDTA Lösung</i>
TBS	<i>tris-buffered saline (Tris-gepufferte Natriumchlorid Lösung)</i>
<i>TCRβ</i>	<i>T cell receptor β</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'Tetramethylethyldiamin</i>
TFIID	Proteinbindedomäne neben TATA für den <i>Transkriptionsfaktor IID</i>
TG	<i>Triglyceride</i>
Th	<i>Thymus</i>
TK	<i>Thymidin Kinase</i>
Tprot	Gesamt-Protein
<i>tPch<sup>-/-</sup></i>	Tamoxifen-induzierte <i>Ptch<sup>de/NX</sup></i> Mutation
<i>TRC8</i>	<i>translocation in renal cell carcinoma 8</i>
<i>Trp53 (p53)</i>	<i>transforming-related protein 53</i>
U	<i>unit (Enzymaktivitätseinheit)</i>
UV-Licht	<i>Ultraviolettes Licht</i>
v/v	<i>volume/volume (Volumen/Volumen)</i>
VIC®	Fluorochrom
Vol	<i>Volumen</i>
w/v	<i>weight/volume (Gewicht/Volumen)</i>
WB	<i>Western Blot</i>
<i>Wg/Wnt/WNT</i>	<i>Wingless</i>
wt	<i>Wildtyp</i>
x g	fache Erdbeschleunigung

## 7 Literaturverzeichnis

Adolphe C, Hetherington R, Ellis T und Wainwright B, 2006. '*Patched1 functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression.*' *Cancer Res* 66(4): 2081-8.

Akashi K, Traver D, Miyamoto T und Weissman IL, 2000. '*A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.*' *Nature* 404(6774): 193-7.

Andaloussi AE, Graves S, Meng F, Mandal M, Mashayekhi M und Aifantis I, 2006. '*Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus.*' *Nat Immunol.*

Ardavin C, Wu L, Li CL und Shortman K, 1993. '*Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population.*' *Nature* 362(6422): 761-3.

Aszterbaum M, Beech J und Epstein EH, Jr., 1999. '*Ultraviolet radiation mutagenesis of hedgehog pathway genes in basal cell carcinomas.*' *J Investig Dermatol Symp Proc* 4(1): 41-5.

Aza-Blanc P, Lin HY, Ruiz i Altaba A und Kornberg TB, 2000. '*Expression of the vertebrate Gli proteins in Drosophila reveals a distribution of activator and repressor activities.*' *Development* 127(19): 4293-301.

Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D und Joyner AL, 2002. '*Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway.*' *Development* 129(20): 4753-61.

Bai CB, Stephen D und Joyner AL, 2004. '*All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3.*' *Dev Cell* 6(1): 103-15.

Barnes EA, Kong M, Ollendorff V und Donoghue DJ, 2001. '*Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression.*' *Embo J* 20(9): 2214-23.

Barr FG, 1999. '*The role of chimeric paired box transcription factors in the pathogenesis of pediatric rhabdomyosarcoma.*' *Cancer Res* 59(7 Suppl): 1711s-1715s.

Barr FG, 2001. '*Gene fusions involving PAX and FOX family members in alveolar rhabdomyosarcoma.*' *Oncogene* 20(40): 5736-46.

Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR und Hofler H, 1994. '*E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas.*' *Cancer Res* 54(14): 3845-52.

Beer C, Buhr P, Hahn H, Laubner D und Wirth M, 2003. '*Gene expression analysis of murine cells producing amphotropic mouse leukaemia virus at a cultivation temperature of 32 and 37 degrees C.*' *J Gen Virol* 84(Pt 7): 1677-86.

Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM und Beachy PA, 2002. '*Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade.*' Science 297(5586): 1559-61.

Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN und Beachy PA, 2003. '*Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours.*' Nature 425(6960): 846-51.

Bhandoola A und Sambandam A, 2006a. '*From stem cell to T cell: one route or many?*' Nat Rev Immunol 6(2): 117-26.

Bhandoola A und Sambandam A, 2006b. '*From stem cell to T cell: one route or many?*' Nature Rev. Immunol. 6: 117-26.

Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN und Bhatia M, 2001. '*Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation.*' Nat Immunol 2(2): 172-80.

Bishop JM, 1983. '*Cellular oncogenes and retroviruses.*' Annu Rev Biochem 52: 301-54.

Bridge JA, Liu J, Weibolt V, Baker KS, Perry D, Kruger R, Qualman S, Barr F, Sorensen P, Triche T und Suijkerbuijk R, 2000. '*Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study.*' Genes Chromosomes Cancer 27(4): 337-44.

Briscoe J, Chen Y, Jessell TM und Struhl G, 2001. '*A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube.*' Mol Cell 7(6): 1279-91.

Buckley RH, 2004. '*The multiple causes of human SCID.*' J Clin Invest 114(10): 1409-11.

Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ und Basler K, 1999. '*Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells.*' Cell 99(7): 803-15.

Busslinger M, 2004. '*Transcriptional control of early B cell development.*' Annu Rev Immunol 22: 55-79.

Calzada-Wack J, Kappler R, Schnitzbauer U, Richter T, Nathrath M, Rosemann M, Wagner SN, Hein R und Hahn H, 2002. '*Unbalanced overexpression of the mutant allele in murine Patched mutants.*' Carcinogenesis 23(5): 727-734.

Chamoun Z, Mann RK, Nellen D, von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA und Basler K, 2001. '*Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal.*' Science 293(5537): 2080-4.



- Chen Y und Struhl G, 1996. '*Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog.*' Cell 87(3): 553-63.
- Cohen MM, Jr., 2003. '*The hedgehog signaling network.*' Am J Med Genet A 123(1): 5-28.
- Cooper GM, 1987. '*Cellular oncogenes and cancer.*' Clin Physiol Biochem 5(3-4): 122-9.
- Cossu G und Borello U, 1999. '*Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals.*' Embo J 18(24): 6867-72.
- Crowson AN, 2006. '*Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications.*' Mod Pathol 19 Suppl 2: S127-47.
- Dagher R und Helman L, 1999. '*Rhabdomyosarcoma: an overview.*' Oncologist 4(1): 34-44.
- Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P und Ruiz i Altaba A, 1997. '*Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours.*' Nature 389(6653): 876-81.
- Dai P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M und Ishii S, 1999. '*Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3.*' J Biol Chem 274(12): 8143-52.
- Davis RJ und Barr FG, 1997. '*Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma.*' Proc Natl Acad Sci U S A 94(15): 8047-51.
- Daya-Grosjean L und Couve-Privat S, 2005. '*Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas.*' Cancer Lett 225(2): 181-92.
- DeKoter RP, Lee HJ und Singh H, 2002. '*PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors.*' Immunity 16(2): 297-309.
- Denef N, Neubuser D, Perez L und Cohen SM, 2000. '*Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed.*' Cell 102(4): 521-31.
- Detmer K, Walker AN, Jenkins TM, Steele TA und Dannawi H, 2000. '*Erythroid differentiation in vitro is blocked by cyclopamine, an inhibitor of hedgehog signaling.*' Blood Cells Mol Dis 26(4): 360-72.
- Duman-Scheel M, Weng L, Xin S und Du W, 2002. '*Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E.*' Nature 417(6886): 299-304.
- Ebers G, 1875. '*Papyrus Ebers. Das Hermetische Buch über die Arzneimittel der alten Ägypter in hieratischer Schrift.*' Leipzig (2 Bände).

Elbashir SM, Harborth J, Weber K und Tuschl T, 2002. '*Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs.*' *Methods* 26(2): 199-213.

Ellermann V und Bang O, 1908. '*Experimentelle Leukemie bei Hühnern.*' *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* 46: 595-609.

Fan H und Khavari PA, 1999. '*Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest.*' *J Cell Biol* 147(1): 71-6.

Fletcher CDM, 1995. '*Diagnostic Histopathology of Tumors.*' Churchill Livingstone Vol2.

Friedrich G und Soriano P, 1991. '*Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice.*' *Genes Dev* 5(9): 1513-23.

Fukunaga K, Ishigami T und Kawano T, 2005. '*Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: expression and function of forkhead transcription factors in neurons.*' *J Pharmacol Sci* 98(3): 205-11.

Gailani MR, Leffell DJ, Ziegler A, Gross EG, Brash DE und Bale AE, 1996. '*Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma [see comments].*' *J Natl Cancer Inst* 88(6): 349-54.

Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ, 3rd, Emanuel BS, Rovera G und Barr FG, 1993. '*Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma.*' *Nat Genet* 5(3): 230-5.

Ghalioungui P, 1987. '*The Ebers Papyrus.*' Kairo.

Godfrey DI, Kennedy J, Suda T und Zlotnik A, 1993. '*A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression.*' *J Immunol* 150(10): 4244-52.

Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM und Scott MP, 1997. '*Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants.*' *Science* 277(5329): 1109-13.

Goodrich LV und Scott MP, 1998. '*Hedgehog and patched in neural development and disease.*' *Neuron* 21(6): 1243-57.

Gorlin RJ, 1987. '*Nevoid basal-cell carcinoma syndrome.*' *Medicine (Baltimore)* 66(2): 98-113.

Gorlin RJ und Goltz RW, 1960. '*Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome.*' *New Eng J Med* 262: 908-12.

Goulding MD, Chalepakis G, Deutsch U, Erselius JR und Gruss P, 1991. '*Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis.*' *Embo J* 10(5): 1135-47.

Gu H, Zou YR und Rajewsky K, 1993. '*Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting.*' Cell 73(6): 1155-64.

Gutierrez-Frias C, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Cejalvo T, Crompton T, Zapata AG, Varas A und Vicente A, 2004. '*Sonic hedgehog regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34+ precursor cells.*' J Immunol 173(8): 5046-53.

Hahn H, Nitzki F, Schorban T, Hemmerlein B, Threadgill D und Rosemann M, 2004. '*Genetic mapping of a Ptch1-associated rhabdomyosarcoma susceptibility locus on mouse chromosome 2.*' Genomics 84(5): 853-8.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B und Bale AE, 1996. '*Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome.*' Cell 85(6): 841-51.

Hahn H, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, Potter D, Zimmer A, Muller U, Samson E und Quintanilla-Martinez L, 2000. '*Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma.*' J Biol Chem 275(37): 28341-4.

Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G und Zimmer A, 1998. '*Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome.*' Nature Med 4: 619-622.

Hamed S, LaRue H, Hovington H, Girard J, Jeannotte L, Latulippe E und Fradet Y, 2004. '*Accelerated induction of bladder cancer in patched heterozygous mutant mice.*' Cancer Res 64(6): 1938-42.

Hanahan D und Weinberg RA, 2000. '*The hallmarks of cancer.*' Cell 100(1): 57-70.

Herman JG und Baylin SB, 2003. '*Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation.*' N Engl J Med 349(21): 2042-54.

Hime GR, Lada H, Fietz MJ, Gillies S, Passmore A, Wicking C und Wainwright BJ, 2004. '*Functional analysis in Drosophila indicates that the NBCCS/PTCH1 mutation G509V results in activation of smoothed through a dominant-negative mechanism.*' Dev Dyn 229(4): 780-90.

Hooper JE und Scott MP, 1989. '*The Drosophila patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning.*' Cell 59(4): 751-65.

Huesmann M, Scott B, Kisielow P und von Boehmer H, 1991. '*Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice.*' Cell 66(3): 533-40.

Imai T, Jiang M, Chambon P und Metzger D, 2001. '*Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha*

*mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A 98(1): 224-8.

Incardona JP, Lee JH, Robertson CP, Enga K, Kapur RP und Roelink H, 2000. '*Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic hedgehog by Patched-1.*' Proc Natl Acad Sci U S A 97(22): 12044-9.

Ingham PW, 2000. '*How cholesterol modulates the signal.*' Curr Biol 10(5): R180-3.

Ingham PW und McMahon AP, 2001. '*Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles.*' Genes Dev 15(23): 3059-87.

Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J und Kantarjian HM, 2004. '*Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies.*' Blood 103(5): 1635-40.

Jainchill JL, Aaronson SA und Todaro GJ, 1969. '*Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells.*' J Virol 4(5): 549-53.

Johnson RL, Milenkovic L und Scott MP, 2000. '*In vivo functions of the patched protein: requirement of the C terminus for target gene inactivation but not Hedgehog sequestration.*' Mol Cell 6(2): 467-78.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Jr. und Scott MP, 1996. '*Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome.*' Science 272(5268): 1668-71.

Jones PA und Baylin SB, 2002. '*The fundamental role of epigenetic events in cancer.*' Nat Rev Genet 3(6): 415-28.

Jostes B, Walther C und Gruss P, 1990. '*The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system.*' Mech Dev 33(1): 27-37.

Kappler R, Bauer R, Calzada-Wack J, Rosemann M, Hemmerlein B und Hahn H, 2004. '*Profiling the molecular difference between Patched- and p53-dependent rhabdomyosarcoma.*' Oncogene 23(54): 8785-95.

Kappler R, Calzada-Wack J, Schnitzbauer U, Koleva M, Herwig A, Piontek G, Graedler F, Adamski J, Heinzmann U, Schlegel J, Hemmerlein B, Quintanilla-Martinez L und Hahn H, 2003. '*Molecular characterization of Patched-associated rhabdomyosarcoma.*' J Pathol 200(3): 348-56.

Katayama N, Shih JP, Nishikawa S, Kina T, Clark SC und Ogawa M, 1993. '*Stage-specific expression of c-kit protein by murine hematopoietic progenitors.*' Blood 82(8): 2353-60.

- Kawai S und Sugiura T, 2001. '*Characterization of human bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 gene promoters: activation of BMP promoters by Gli, a sonic hedgehog mediator.*' Bone 29(1): 54-61.
- Keller C, Hansen MS, Coffin CM und Capecchi MR, 2004. '*Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin.*' Genes Dev 18(21): 2608-13.
- Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ und Vogelstein B, 1987. '*Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma.*' Science 236(4797): 70-3.
- Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH und Vogelstein B, 1988. '*The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins.*' Nature 332(6162): 371-4.
- Kinzler KW und Vogelstein B, 1990. '*The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome.*' Mol Cell Biol 10(2): 634-42.
- Knudson AG, Jr., 1971. '*Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.*' Proc Natl Acad Sci U S A 68(4): 820-3.
- Kogerman P, Krause D, Rahnama F, Kogerman L, Uden AB, Zaphiropoulos PG und Toftgard R, 2002. '*Alternative first exons of PTCH1 are differentially regulated in vivo and may confer different functions to the PTCH1 protein.*' Oncogene 21(39): 6007-16.
- Kondo M, Weissman IL und Akashi K, 1997. '*Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.*' Cell 91(5): 661-72.
- Kuang S, Charge SB, Seale P, Huh M und Rudnicki MA, 2006. '*Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis.*' J Cell Biol 172(1): 103-13.
- Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S und Katano M, 2004. '*Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer.*' Cancer Res 64(17): 6071-4.
- Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR und Moon RT, 2000. '*The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape.*' Trends Genet 16(7): 279-83.
- Kuwabara PE und Labouesse M, 2002. '*The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role?*' Trends Genet 18(4): 193-201.
- Laiosa CV, Stadtfeld M und Graf T, 2006. '*Determinants of Lymphoid-Myeloid Lineage Diversification.*' Annu Rev Immunol.
- Lakso M, Pichel JG, Gorman JR, Sauer B, Okamoto Y, Lee E, Alt FW und Westphal H, 1996. '*Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage.*' Proc Natl Acad Sci U S A 93(12): 5860-5.
- Lam CW, Xie J, To KF, Ng HK, Lee KC, Yuen NW, Lim PL, Chan LY, Tong SF und McCormick F, 1999. '*A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas.*' Oncogene 18(3): 833-6.

- Lang D, Brown CB, Milewski R, Jiang YQ, Lu MM und Epstein JA, 2003. '*Distinct enhancers regulate neural expression of Pax7.*' Genomics 82(5): 553-60.
- Lee HC, Shibata H, Ogawa S, Maki K und Ikuta K, 2005. '*Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor.*' J Immunol 174(12): 7800-6.
- Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B und McMahon AP, 2001. '*Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1.*' Cell 105(5): 599-612.
- Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC und Carsetti R, 1999. '*B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals.*' J Exp Med 190(1): 75-89.
- Mancuso M, Pazzaglia S, Tanori M, Hahn H, Merola P, Rebessi S, Atkinson MJ, Di Majo V, Covelli V und Saran A, 2004. '*Basal cell carcinoma and its development: insights from radiation-induced tumors in Ptch1-deficient mice.*' Cancer Res 64(3): 934-41.
- Mansour SL, Thomas KR und Capecchi MR, 1988. '*Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes.*' Nature 336(6197): 348-52.
- Mansouri A, Stoykova A und Gruss P, 1994. '*Pax genes in development.*' J Cell Sci Suppl 18: 35-42.
- Mansouri A, Stoykova A, Torres M und Gruss P, 1996. '*Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7<sup>-/-</sup> mutant mice.*' Development 122(3): 831-8.
- Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM und Tabin CJ, 1996a. '*Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor [see comments].*' Nature 384(6605): 176-9.
- Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A und Tabin CJ, 1996b. '*Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development.*' Dev Biol 180(1): 273-83.
- Marigo V, Scott MP, Johnson RL, Goodrich LV und Tabin CJ, 1996c. '*Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb.*' Development 122(4): 1225-33.
- Mehlen P und Bredesen DE, 2004. '*The dependence receptor hypothesis.*' Apoptosis 9(1): 37-49.
- Merlino G und Helman LJ, 1999. '*Rhabdomyosarcoma--working out the pathways.*' Oncogene 18(38): 5340-8.

- Metcalf D, 1999. '*Stem cells, pre-progenitor cells and lineage-committed cells: are our dogmas correct?*' *Ann N Y Acad Sci* 872: 289-303; discussion 303-4.
- Mill P, Mo R, Fu H, Grachtchouk M, Kim PC, Dlugosz AA und Hui CC, 2003. '*Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development.*' *Genes Dev* 17(2): 282-94.
- Miller JR, Hocking AM, Brown JD und Moon RT, 1999. '*Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways.*' *Oncogene* 18(55): 7860-72.
- Monnier V, Dussillol F, Alves G, Lamour-Isnard C und Plessis A, 1998. '*Suppressor of fused links fused and Cubitus interruptus on the hedgehog signalling pathway.*' *Curr Biol* 8(10): 583-6.
- Moon RT, Brown JD und Torres M, 1997. '*WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development.*' *Trends Genet* 13(4): 157-62.
- Mullor JL, Sanchez P und Altaba AR, 2002. '*Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease.*' *Trends Cell Biol* 12(12): 562-9.
- Murmann OV, Niggli F und Schafer BW, 2000. '*Cloning and characterization of the human PAX7 promoter.*' *Biol Chem* 381(4): 331-5.
- Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K und Takeichi M, 1987. '*Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA.*' *Nature* 329(6137): 341-3.
- Nagao K, Togawa N, Fujii K, Uchikawa H, Kohno Y, Yamada M und Miyashita T, 2005a. '*Detecting tissue-specific alternative splicing and disease-associated aberrant splicing of the PTCH gene with exon junction microarrays.*' *Hum Mol Genet* 14(22): 3379-88.
- Nagao K, Toyoda M, Takeuchi-Inoue K, Fujii K, Yamada M und Miyashita T, 2005b. '*Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, patched, having distinct first exons.*' *Genomics* 85(4): 462-71.
- Nagasawa T, 2006. '*Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development.*' *Nature Rev. Immunol.* 6: 107-16.
- Nusslein-Volhard C und Wieschaus E, 1980. '*Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila.*' *Nature* 287(5785): 795-801.
- Nybakken K und Perrimon N, 2002. '*Hedgehog signal transduction: recent findings.*' *Curr Opin Genet Dev* 12(5): 503-11.
- Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T und Hirohashi S, 1994. '*E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines.*' *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(5): 1858-62.

- Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga SI, Ozaki H, Sato S und Kawakami K, 1999. '*Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear translocation of Eya.*' Mol Cell Biol 19(10): 6815-24.
- Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, Nishikawa S, Miura Y und Suda T, 1992. '*In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells.*' Blood 80(12): 3044-50.
- Orlic D, Girard LJ, Lee D, Anderson SM, Puck JM und Bodine DM, 1997. '*Interleukin-7R alpha mRNA expression increases as stem cells differentiate into T and B lymphocyte progenitors.*' Exp Hematol 25(3): 217-22.
- Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH, Jr. und Scott MP, 1997. '*Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog.*' Science 276(5313): 817-21.
- Oustanina S, Hause G und Braun T, 2004. '*Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification.*' Embo J 23(16): 3430-9.
- Outram SV, Varas A, Pepicelli CV und Crompton T, 2000. '*Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte.*' Immunity 13(2): 187-97.
- Palmer E, 2003. '*Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire.*' Nat Rev Immunol 3(5): 383-91.
- Palmiter RD und Brinster RL, 1986. '*Germ-line transformation of mice.*' Annu Rev Genet 20: 465-99.
- Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA und Galdes A, 1998. '*Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog.*' J Biol Chem 273(22): 14037-45.
- Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD und Davison BL, 1994. '*Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice.*' J Exp Med 180(5): 1955-60.
- 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(11): 2085-8.
- Podos SD und Ferguson EL, 1999. '*Morphogen gradients: new insights from DPP.*' Trends Genet 15(10): 396-402.
- Porse BT, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Hasemann MS, Anderson K, Damgaard I, Jacobsen SE und Nerlov C, 2005. '*Loss of C/EBP alpha cell cycle control increases*



*myeloid progenitor proliferation and transforms the neutrophil granulocyte lineage.* J Exp Med 202(1): 85-96.

Porter JA, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV und Beachy PA, 1996. '*Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain.*' Cell 86(1): 21-34.

Price MA, Goldberg LH und Levy ML, 1994. '*Juvenile basal cell carcinoma.*' Pediatr Dermatol 11(2): 176-7.

Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A und Buckingham M, 2006. '*Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells.*' J Cell Biol 172(1): 91-102.

Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A und Buckingham M, 2005. '*A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells.*' Nature.

Robbins DJ, Nybakken KE, Kobayashi R, Sisson JC, Bishop JM und Therond PP, 1997. '*Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2.*' Cell 90(2): 225-34.

Roberts WM, Douglass EC, Peiper SC, Houghton PJ und Look AT, 1989. '*Amplification of the gli gene in childhood sarcomas.*' Cancer Res 49(19): 5407-13.

Rodger J, Ziman MR, Papadimitriou JM und Kay PH, 1999. '*Pax7 is expressed in the capsules surrounding adult mouse neuromuscular spindles.*' Biochem Cell Biol 77(2): 153-6.

Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF und Dymecki SM, 2000. '*High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP.*' Nat Genet 25(2): 139-40.

Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ und Partridge TA, 1995. '*Culturing satellite cells from living single muscle fiber explants.*' In Vitro Cell Dev Biol Anim 31(10): 773-9.

Rothenberg EV und Taghon T, 2005. '*Molecular genetics of T cell development.*' Annu Rev Immunol 23: 601-49.

Rous P, 1911. '*A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from tumor cells.*' J. Exp. Med. 13: 397-411.

Ruiz i Altaba A, 1997. '*Catching a Gli-mouse of Hedgehog.*' Cell 90(2): 193-6.

Ruiz i Altaba A, 1999. '*Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer.*' Trends Genet 15(10): 418-25.

Ruiz i Altaba A, Sanchez P und Dahmane N, 2002. '*Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells.*' Nat Rev Cancer 2(5): 361-72.

- Ruppert JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao FT, Law ML, Seunanez HN, O'Brien SJ und Vogelstein B, 1988. '*The GLI-Kruppel family of human genes.*' Mol Cell Biol 8(8): 3104-13.
- Sacedon R, Diez B, Nunez V, Hernandez-Lopez C, Gutierrez-Frias C, Cejalvo T, Outram SV, Crompton T, Zapata AG, Vicente A und Varas A, 2005. '*Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis.*' J Immunol 174(3): 1456-61.
- Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M und Kondoh H, 1999. '*Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling.*' Development 126(17): 3915-24.
- Schnutgen F, Doerflinger N, Calleja C, Wendling O, Chambon P und Ghyselinck NB, 2003. '*A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse.*' Nat Biotechnol 21(5): 562-5.
- Scotting PJ, Thompson SL, Punt JA und Walker DA, 2000. '*Paediatric brain tumours: an embryological perspective.*' Childs Nerv Syst 16(5): 261-7; discussion 268.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P und Rudnicki MA, 2000. '*Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells.*' Cell 102(6): 777-86.
- Shah DK, Hager-Theodorides AL, Outram SV, Ross SE, Varas A und Crompton T, 2004. '*Reduced thymocyte development in sonic hedgehog knockout embryos.*' J Immunol 172(4): 2296-306.
- Sharp R, Recio JA, Jhappan C, Otsuka T, Liu S, Yu Y, Liu W, Anver M, Navid F, Helman LJ, DePinho RA und Merlino G, 2002. '*Synergism between INK4a/ARF inactivation and aberrant HGF/SF signaling in rhabdomyosarcomagenesis.*' Nat Med 8(11): 1276-80.
- Shimokawa T, Rahnema F und Zaphiropoulos PG, 2004. '*A novel first exon of the Patched1 gene is upregulated by Hedgehog signaling resulting in a protein with pathway inhibitory functions.*' FEBS Lett 578(1-2): 157-62.
- Sidransky D, 1996. '*Is human patched the gatekeeper of common skin cancers? [news; comment].*' Nat Genet 14(1): 7-8.
- Sinn E, Muller W, Pattengale P, Tepler I, Wallace R und Leder P, 1987. '*Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes in vivo.*' Cell 49(4): 465-75.
- So PL, Lee K, Hebert J, Walker P, Lu Y, Hwang J, Kopelovich L, Athar M, Bickers D, Aszterbaum M und Epstein EH, Jr., 2004. '*Topical tazarotene chemoprevention reduces Basal cell carcinoma number and size in Ptch1+/- mice exposed to ultraviolet or ionizing radiation.*' Cancer Res 64(13): 4385-9.
- Soriano P, 1999. '*Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain.*' Nat Genet 21(1): 70-1.

Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, Williams CM, Tanabe Y, Jessell TM und Costantini F, 2001. '*Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus.*' BMC Dev Biol 1: 4.

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM und Vogt PK, 1976. '*DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA.*' Nature 260(5547): 170-3.

Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F und Rosenthal A, 1996. '*The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog [see comments].*' Nature 384(6605): 129-34.

Stone JC, Crosby JL, Kozak CA, Schievella AR, Bernards R und Nadeau JH, 1989. '*The murine retinoblastoma homolog maps to chromosome 14 near Es-10.*' Genomics 5(1): 70-5.

Stoykova A und Gruss P, 1994. '*Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns.*' J Neurosci 14(3 Pt 2): 1395-412.

Taipale J und Beachy PA, 2001. '*The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer.*' Nature 411(6835): 349-54.

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP und Beachy PA, 2000a. '*Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine.*' Nature 406(6799): 1005-9.

Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP und Beachy PA, 2000b. '*Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine.*' Nature 406(6799): 1005-9.

Taipale J, Cooper MK, Maiti T und Beachy PA, 2002. '*Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed.*' Nature 418(6900): 892-7.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL und Hebrok M, 2003. '*Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis.*' Nature 425(6960): 851-6.

Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM und Mehlen P, 2003. '*Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog.*' Science 301(5634): 843-6.

Tiffin N, Williams RD, Shipley J und Pritchard-Jones K, 2003. '*PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells.*' Br J Cancer 89(2): 327-32.

Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R und Uden AB, 2006. '*Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH*

*and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development.* J Pathol 208(1): 17-25.

Uhmann A, Dittmann K, Nitzki F, Koleva M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Heller T, Armstrong V, Schulz-Schaeffer W, Wienands J und Hahn H, 2006 eingereicht. '*Specification and differentiation defects of the lymphoid lineage in conditional patched mutant mice.*'

Uhmann A, Ferch U, Bauer R, Tauber S, Arziman Z, Chen C, Hemmerlein B, Wojnowski L und Hahn H, 2005. '*A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing.*' Int J Oncol 27(6): 1567-75.

Uden AB, Holmberg E, Lundh-Rozell B, Stahle-Backdahl M, Zaphiropoulos PG, Toftgard R und Vorechovsky I, 1996. '*Mutations in the human homologue of Drosophila patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation.*' Cancer Res 56(20): 4562-5.

Verrou C, Zhang Y, Zurn C, Schamel WW und Reth M, 1999. '*Comparison of the tamoxifen regulated chimeric Cre recombinases MerCreMer and CreMer.*' Biol Chem 380(12): 1435-8.

Vogelstein B und Kinzler KW, 1992. '*p53 function and dysfunction.*' Cell 70(4): 523-6.

Wada H, Holland PW und Satoh N, 1996. '*Origin of patterning in neural tubes.*' Nature 384(6605): 123.

Wang B, Fallon JF und Beachy PA, 2000. '*Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb.*' Cell 100(4): 423-34.

Wang G, Amanai K, Wang B und Jiang J, 2000. '*Interactions with Costal2 and suppressor of fused regulate nuclear translocation and activity of cubitus interruptus.*' Genes Dev 14(22): 2893-905.

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA und Baylin SB, 2003. '*Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer.*' Nature 422(6929): 313-7.

Wetmore C, 2003. '*Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models.*' Curr Opin Genet Dev 13(1): 34-42.

Wetmore C, Eberhart DE und Curran T, 2000. '*The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched.*' Cancer Res 60(8): 2239-46.

Wicking C und Bale AE, 1997. '*Molecular basis of the nevoid basal cell carcinoma syndrome.*' Curr Opin Pediatr 9(6): 630-5.

Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M und Ferrant A, 2000. '*Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the*

---

*treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients.* J Clin Oncol 18(5): 956-62.

Wreszinski W, 1913. *'Der Papyrus Ebers: I. Teil, Umschrift, in: Medizin der alten Ägypter, Band III.'* Leipzig (2 Bände).

Wu L, Li CL und Shortman K, 1996. *'Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny.'* J Exp Med 184(3): 903-11.

Wu L, Scollay R, Egerton M, Pearse M, Spangrude GJ und Shortman K, 1991. *'CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus.'* Nature 349(6304): 71-4.

Yaffe D und Saxel O, 1977. *'Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle.'* Nature 270(5639): 725-7.

Zhang Y und Kalderon D, 2001. *'Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the Drosophila ovary.'* Nature 410(6828): 599-604.

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik (Leitung Herr Professor Dr. W. Engel) der Universität Göttingen angefertigt.

Mein Dank gilt in erster Linie Frau Professor Dr. H. Hahn für die Bereitstellung des sehr interessanten und spannenden Themas, für ihre intensive wissenschaftliche Betreuung, ihre Diskussionsbereitschaft, ihren Humor und dafür, dass sie immer voll hinter ihren Mitarbeitern steht.

Bei Herrn Professor Dr. W. Engel (Institut für Humangenetik) bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Referates und bei Frau PD Dr. S. Hoyer-Fender (Institut für Zoologie, Anthropologie und Entwicklungsbiologie) für die Übernahme des Korreferates dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. J. Wienands (Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie) für die Kollaboration mit seinem Labor bedanken, ohne welche die immunologische Analyse der *tPtch*<sup>-/-</sup> Mäuse nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danke ich Herrn Dr. W. Schulz-Schaeffer (Abt. für Neuropathologie) für sein Engagement und seine wertvolle Hilfe in Fragen der Immunhistologie.

Frau Professor Dr. C. Binder (Abt. für Onkologie), Frau Dr. T. Heller (Abt. für Klinische Chemie) und Frau G. Hindermann (Institut für Humangenetik) danke ich für ihre große Hilfe bei den zytologischen Knochenmarks- und Blutanalysen.

Für die Bereitstellung des Expressionsplasmids *pAN MerCreMer* möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. M. Reth (MPI für Immunobiologie, Freiburg) bedanken. Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. A. Berns (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam), der uns die Mauslinie *ROSA26CreERT2* noch vor deren Publikation zur Verfügung stellte. Herrn Professor Dr. M. P. Scott (Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, USA) danke ich für die Bereitstellung des Vektors *pBSSK<sup>+</sup> mPtch(K)wt*.

Frau Dr. M. Koleva (ehemals Institut für Humangenetik) danke ich für die Klonierung des Zielvektors *pPtch<sup>NX</sup>* sowie des ES-Zellscreens und Dr. I. Adham (Institut für Humangenetik) für seine Hilfe beim der Keimbahntransmission des *pPtch<sup>NX</sup>* Vektors.

Dr. A. Zibat (Institut für Humangenetik) danke ich für seine Hilfe bei der Analyse der Rekombinationseffizienz des *Ptch<sup>NX</sup>* Locus.

---

Außerdem möchte ich mich beim gesamten Team des Tierstalls der Humangenetik bedanken, insbesondere Stefan Wolf, Alexandra Pahl und Kerstin Beyer.

Mein ganz herzlicher Dank gilt außerdem allen Labormitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Hahn. Allen voran danke ich meiner lieben kleinen Frauke und der fast immer fröhlichen Anke. Nicht nur die gemeinsamen Raucherpausen und das entspannte Arbeiten werde ich ganz schrecklich vermissen, sondern auch alles drumherum. Es war super. Danke auch an Regine, Du hast immer ein offenes Ohr gehabt für große und kleine Problemchen, ob wissenschaftlicher oder privater Art. Astrid und Ina, danke ich für Sektchen und fröhliches Arbeiten. Danke auch an Ines, Arne und Frauke P. für Eure aufmunternden Worte.

Außerdem geht ein ganz großer Dank an Kai (Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie). Mit Dir zu Arbeiten ist fast wie Urlaub.

Natürlich möchte ich nicht vergessen allen zu danken, die dafür verantwortlich sind, dass ich immer noch fröhlich aus der Wäsche gucke. Danke Mama und Papa, was habe ich Euch vollgequatscht... aber keine Sorge, dass werde ich auch weiterhin tun. Danke mein lieber kleiner, großer Bruder Martin, Du bist mein ganzer Stolz. Danke Anne und nochmals Frauke, mit Euch zu telefonieren, lässt den Alltag vergessen. Außerdem danke an meine Lieblingskleinfamilie und Tatortgucker: Tina, Alf, Philip, Olivia und Balu.

## 9 Curriculum vitae

### Persönliche Angaben

geboren am 23. Dezember 1976 in Erfurt  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

Sommersemester 2006 **Rigorosum und Abschluss der Dissertation** (Dr. rer. nat.)  
Sept 2002 bis April 2006 **Promotion** am Institut für Humangenetik, Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Hahn, Universität Göttingen  
,Der Hedgehog Rezeptor Patched bei der Tumorentstehung und in der Hämatopoese'  
Jan 2002 **Diplom in Biologie** (Note: sehr gut)  
2001-2002 **Diplomarbeit** am Institut für Genetik, Prof. Dr. C.F. Lehner, Universität Bayreuth  
'Phänotypische und molekulare Untersuchungen der Funktion von *l(3)85Aa*'  
Herbst 1998 Vordiplom in Biologie  
1996-2000 **Studium der Biologie**, Universität Bayreuth  
Juni 1996 **Abitur** (Note: sehr gut), Integrierte Gesamtschule Erfurt  
Juni 1993 Realschulabschluß, Integrierte Gesamtschule Erfurt

### Berufserfahrung

April-Juli 2002 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Institut für Genetik, Prof. Dr. C.F. Lehner, Universität Bayreuth  
Aug-Sept 2000 **Industriepraktikum**, Abt. Antiinfektiva Forschung, Dr. R. Gahlmann, Bayer AG  
pharma research, Wuppertal  
'Expression und Isolierung der humanen UMP-CMP-Kinase in *E.coli*'  
Herbst 1999/2000 **Praktikum** am Institut für Genetik, Prof. Dr. C.F. Lehner, Universität Bayreuth  
'Klonierung des *D. virilis* Gens *three rows* im genomischen Kontext des *D. melanogaster three rows* in den Transformationsvektor *pCasper4*'  
'Isolierung des in *E. coli* überexprimierten N-terminalen Fragmentes des *D. melanogaster* Esp1p zur Herstellung eines Antikörpers'  
Sept-Okt 1999 **Praktikum** am Thüringer Medizin-Lebensmittel-Veterinär-Untersuchungsamt, Abt. Mikrobiologie, Dr. U. Warweg, Erfurt

### Publikationen

Uhmann A, Ferch U, Bauer R, Tauber S, Arzinam Z, Chen C, Hemmerlein B, Wojnowski L, Hahn H. *A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing*. Int J Oncol, 2005 Dec; 27(6):1567-75.

Uhmann A, Dittmann K, Nitzki F, Kolova M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Heller T, Armstrong V, Schulz-Schaeffer W, Wienands J, Hahn H. *Specification and differentiation defects of the lymphoid lineage in conditional patched mutant mice*. Nat. Immunol., 2006, eingereicht.



