



# **Patched-assoziierte Tumoren: Modifikatorgene und Pathogenese**

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

vorgelegt von  
Frauke Nitzki  
aus Hannover

**Göttingen 2008**

Referent:

Prof Dr. W. Engel

Korreferent:

Prof. Dr. R. Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2003 bis März 2008 im Institut für Humangenetik der Universität Göttingen angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hahn H, **Nitzki F**, Schorban T, Hemmerlein B, Threadgill D und Rosemann M. *Genetic mapping of a Ptch1-associated rhabdomyosarcoma susceptibility locus on mouse chromosome 2*. Genomics. 2004 Nov;84(5):853-8.

**Nitzki F**, Kruger A, Reifenberg K, Wojnowski L und Hahn H. *Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers*. Lab Anim. 2007 Apr;41(2):218-28.

Uhmann A, Dittmann K, **Nitzki F**, Dressel R, Koleva M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Nitsche M, Heller T, Armstrong V, Schulz-Schaeffer W, Wienands J und Hahn H. *The hedgehog receptor patched controls lymphoid lineage commitment*. Blood. 2007 Sep 15;110(6):1814-23.



<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Entstehung von Krebs	1
1.2	Der Hedgehog/Patched-Signalweg	2
1.3	Hh/Ptch-assoziierte Tumorigenese	4
1.4	<i>Ptch</i> -assoziierte Tumoren	5
1.4.1	Das Rhabdomyosarkom	6
1.4.2	Das Medulloblastom	7
1.4.3	Modifikatorgene bei <i>Ptch</i> -assoziierten RMS und MB	7
1.4.4	Das Basalzellkarzinom	8
1.5	Mausmodelle für <i>Ptch</i> -assoziierte Tumoren	11
1.5.1	Die <i>Ptch</i> <sup>neo67</sup> -knockout-Maus	11
1.5.2	Die konditionelle <i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> -knockout-Maus	11
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	12
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Statistische Auswertungsverfahren	13
2.2	Software	13
2.3	Datenbanken	13
2.4	Laborgeräte	14
2.5	Gebrauchswaren	15
2.6	Chemikalien und Reagenzien	16
2.7	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	17
2.8	Stammlösungen	17
2.9	Medien	19
2.9.1	Medien für die Bakterienkultur	19
2.9.2	Agarplatten	20
2.9.3	Medien für die Kultur eukaryontischer Zellen	20
2.10	Biologisches Material	20
2.10.1	Bakterienstämme	20
2.10.2	Eukaryontische Zelllinien	20
2.10.3	Mauslinien	21
2.11	Synthetische DNA-Oligonukleotide	22
2.11.1	DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen	22
2.11.2	DNA-Oligonukleotide für DNA-Sequenzanalysen	22
2.11.3	DNA-Oligonukleotide für die Kopplungsanalyse	24
2.11.4	DNA-Oligonukleotide für RT-PCR	24
2.11.5	DNA-Oligonukleotide für die quantitative <i>real time</i> PCR	25
2.11.5.1	DNA-Oligonukleotide für die quantitative <i>real time</i> PCR an cDNA	25
2.11.5.2	DNA-Oligonukleotide für TaqMan-Analysen an gDNA	26
2.11.6	Sonden	26
2.12	Gebrauchsfertige TaqMan Assays für Genexpressionsanalysen	27
2.13	Enzyme	28
2.14	Antikörper	28
2.14.1	Primäre Antikörper	28
2.14.2	Sekundäre Antikörper und Alkalische Phosphatase-gekoppelte Streptavidin Reagenzien	29
2.15	Molekularbiologische Methoden	29
2.15.1	Präparative und analytische Arbeiten mit Nukleinsäuren	29
2.15.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	29
2.15.1.1.1	Transformation von Bakterienzellen	29

2.15.1.1.2	Plasmidpräparation geringer DNA-Mengen .....	30
2.15.1.1.3	Plasmidpräparation großer DNA-Mengen .....	30
2.15.1.1.4	Restriktionshydrolyse .....	30
2.15.1.2	Phenol/Chloroform-Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	31
2.15.1.3	Isolierung von genomischer DNA .....	31
2.15.1.3.1	Isolierung von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	31
2.15.1.3.2	Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe für Genotypisierungen.....	31
2.15.1.3.3	Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe für Southern Blot-Analysen .	32
2.15.1.4	Isolierung von Gesamt-RNA .....	32
2.15.1.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischer Zellkultur .....	32
2.15.1.4.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe .....	32
2.15.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	33
2.15.1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	33
2.15.1.6.1	Polymerase-Kettenreaktion an cDNA .....	34
2.15.1.6.1.1	Reverse Transkription.....	34
2.15.1.6.2	qRT-PCR .....	34
2.15.1.6.2.1	Durchführung und Aufbau der TaqMan-Analyse zur Quantifizierung der Rekombinationseffizienz nach Aktivierung der Cre-Rekombinase.....	35
2.15.1.6.2.2	Durchführung und Aufbau der gebrauchsfertigen TaqMan Assays .....	35
2.15.1.6.2.3	Durchführung und Aufbau der qRT-PCR mit SYBR Green .....	36
2.15.1.6.2.4	Auswertung nach der Standardkurvenmethode .....	37
2.15.1.7	Agarosegelelektrophorese.....	38
2.15.1.8	Southern Blot-Analyse zur Detektion der homologen Rekombination des Vektors <i>pPtch<sup>flox</sup></i> .....	38
2.15.1.9	DNA-Sequenzanalyse .....	39
2.15.1.9.1	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	40
2.15.1.9.2	Klonierung von PCR-Produkten .....	40
2.15.1.10	Mikroarray-Analyse.....	40
2.15.2	Histologische Techniken .....	40
2.15.2.1	Einbettung von Geweben .....	40
2.15.2.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung .....	41
2.15.2.3	X-Gal-Färbung an Kryoschnitten .....	41
2.15.2.4	Immunhistologische Antikörperfärbungen .....	41
2.15.2.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung .....	42
2.15.2.5.1	Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	43
2.15.2.5.2	Durchführung der <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	44
2.15.3	Zellbiologische Methoden.....	45
2.15.3.1	Zellkultur eukaryontischer Zellen .....	45
2.15.3.2	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen .....	46
2.15.3.3	Isolierung und Kultivierung adulter muriner Fibroblasten .....	46
2.15.3.4	Aktivierung der Cre-Rekombinase in <i>Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup></i> -Zellen durch Tamoxifen .. .....	46
2.15.3.5	Herstellung von Shh-konditioniertem Medium.....	47
2.15.3.6	Stimulation des Hh/Ptch-Signalweges durch konditioniertes Shh Medium.....	47
2.15.3.7	Blockade des Hh/Ptch-Signalweges durch Cyclopamin.....	47
2.15.3.8	Bestimmung der Zellproliferationsrate mittels Inkorporation von 5-Bromo-2- Deoxyuridin .....	47
2.15.4	Tierexperimentelle Methoden.....	48
2.15.4.1	Zucht und Haltung von <i>Mus musculus</i> .....	48
2.15.4.1.1	Schwanzbiopsie und Ohrlochmarkierung.....	48

2.15.4.1.2	Genotypisierung von Mäusen.....	48
2.15.4.1.3	Isolierung von Mausserum .....	48
2.15.4.1.4	Bestimmung des Kopulationszeitpunktes und der Trächtigkeit sowie Isolierung von Mausernyonen.....	49
2.15.4.1.5	Narkotisierung von Mäusen.....	49
2.15.4.1.6	Epilation.....	49
2.15.4.1.6.1	Lokale Applikation von Tamoxifen auf die epilierte Haut.....	50
2.15.4.1.7	Intraperitoneale und intramuskuläre Injektion von Tamoxifen .....	50
2.15.4.1.8	Perfusion von Mäusen mit Paraformaldehyd .....	50
2.15.4.1.9	Sichtung und Präparation von Tumoren .....	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
3.1	Abhängigkeit der Tumorzinzidenz vom genetischen Hintergrund bei <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> -Mäusen ...	52
3.1.1	Detektion des RMS-Suszeptibilitätslokus <i>Parms1</i> auf Chromosom 2 .....	55
3.1.1.1	Analyse von Kandidatengenomen .....	59
3.1.1.1.1	SNP-Analysen .....	59
3.1.1.1.1.1	Detektion von cSNP in <i>Bmf</i> .....	60
3.1.1.1.1.2	Detektion von cSNP in <i>Disp2</i> .....	60
3.1.1.1.1.3	Detektion von cSNP in <i>Wt1</i> .....	60
3.1.1.1.1.4	Detektion von cSNP in <i>Dll4</i> .....	61
3.1.1.1.2	Expressionsanalysen.....	62
3.1.1.2	Etablierung einer neuen N2-Mauskolonie zur Eingrenzung von <i>Parms1</i> .....	62
3.1.1.3	Detektion einer genetischen Kontamination im Mausstamm B6 .....	63
3.1.1.3.1	Nachweis von auffälligen Genotypen in N2-Mäusen .....	63
3.1.1.3.2	Zeitverlauf der Kontamination von B6-Mäusen .....	64
3.1.1.3.3	Identifikation der kontaminierenden Mauslinie .....	66
3.1.2	Entwicklung von RMS in <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> -Mäusen mit 50 % DBA2J-, 129Sv- und FVB/N-Hintergrund.....	70
3.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse des Kartierungsprojektes .....	72
3.1.4	Mikroarray-basierte Genexpressionsanalysen von RMS aus CD1 <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> - und (BALBxB6) <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> -Mäusen.....	73
3.2	Analyse von konditionellen <i>Ptch</i> <sup>flox</sup> -knockout-Mäusen: Allgemeine Charakterisierung und Induktion von BCC .....	76
3.2.1	Allgemeine Charakterisierung .....	76
3.2.1.1	<i>Ptch</i> -Transkription und Spleißen von <i>Ptch</i> -Transkripten .....	76
3.2.1.2	Deletion von <i>Ptch</i> in der Keimbahn.....	79
3.2.1.3	Deletion von <i>Ptch</i> in adulten <i>Ptch</i> <sup>flox</sup> -Mäusen und Induktion von BCC-Vorläuferläsionen .....	81
3.2.1.3.1	Deletion von <i>Ptch</i> durch i.p. Gabe von 5 mg Tamoxifen.....	81
3.2.1.3.2	BCC-Vorläuferläsionen und andere Anomalien in <i>tPtch</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	82
3.2.2	Induktion von BCC durch i.m. Gabe von 100 µg Tamoxifen.....	85
3.2.2.1	<i>In vivo</i> -Analyse der Tamoxifen-induzierten Aktivität der Cre-ERT2 in ROSA26-R-Reporter-mäusen .....	87
3.2.2.2	Entstehung von BCC aus Basalzellen und der äußeren Wurzelscheide.....	89
3.2.2.3	Spontane Regression von BCC .....	91
3.2.2.4	Expressionsanalysen von <i>Ptch</i> in BCC.....	94
3.2.2.5	Expressionsanalysen von <i>Gli1</i> und <i>Gli2</i> in BCC.....	95
3.2.2.6	Immunphänotyp von BCC.....	98
3.2.2.7	Analyse der kanonischen Wnt-Signalkaskade in BCC .....	99
3.2.2.8	Expressionsanalysen von Differenzierungsmarkern in regredienten BCC.....	99
3.2.2.9	Zusammenfassung der Charakteristika der induzierten BCC.....	101

3.2.3	Induktion von BCC in unterschiedlichen Phasen des Haarzyklus .....	102
3.2.3.1	Synchronisierung des Haarzyklus.....	102
3.2.3.2	Aktivierung der Cre-ERT2.....	103
3.2.3.3	Induktion von BCC in unterschiedlichen Haarzyklusphasen .....	103
3.2.4	Etablierung stabiler <i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> -, <i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup> - und <i>Ptch</i> <sup>-/-</sup> -Zelllinien.....	105
3.2.4.1	Herstellung der <i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> -Zelllinie .....	106
3.2.4.2	Herstellung von fünf monoklonalen <i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup> -Zelllinien.....	106
3.2.4.3	Herstellung einer <i>Ptch</i> <sup>-/-</sup> -Zelllinie .....	107
3.2.4.4	Charakterisierung der <i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup> -Fibroblasten (B9) .....	108
3.2.4.4.1	Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade durch Tamoxifen .....	108
3.2.4.4.1.1	Untersuchung der Rekombinationseffizienz am <i>Ptch</i> <sup>flox</sup> -Lokus .....	108
3.2.4.4.1.2	Untersuchung der Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges .....	110
3.2.4.4.2	Untersuchung der Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges in Abhängigkeit von der Konfluenz.....	111
3.2.4.4.3	Blockade der Hh/Ptch-Signalkaskade durch Cyclopamin .....	112
3.2.4.4.4	Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade durch Shh.....	114
3.2.4.5	Charakterisierung der Zelllinien <i>Ptch</i> <sup>-/-</sup> und <i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> .....	116
3.2.4.5.1	Expressionsprofile .....	116
3.2.4.5.2	Untersuchung der Proliferationsraten.....	118
3.2.4.6	Zusammenfassung der Zellkulturexperimente.....	119
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>121</b>
4.1	BALB-Allele des Locus <i>Parms1</i> vermitteln Suszeptibilität für RMS.....	121
4.1.1	Analyse von potenziellen RMS-modifizierenden Genen im Locus <i>Parms1</i> .....	122
4.1.2	Ausblick .....	125
4.2	Detektion und Charakterisierung der genetischen Kontamination im Mausstamm B6 .....	126
4.2.1	Identifikation von DBA-Inzuchtlinien als Ursprung der Kontamination.....	127
4.2.2	Ausblick .....	127
4.3	Unterschiedliche Expressionsmuster von RMS aus CD1 <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> - und (BALBxB6) <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> -Mäusen.....	128
4.4	Charakterisierung der <i>Ptch</i> <sup>flox</sup> -knockout-Maus und Induktion von BCC.....	128
4.4.1	Phänotyp- und Transkriptanalysen.....	129
4.4.2	Induktion von BCC.....	130
4.4.2.1	Entstehung von BCC nach i.m. Applikation von 100 µg Tamoxifen .....	130
4.4.2.2	Initiation und Progression von BCC .....	132
4.4.2.3	Spontane Regression und Differenzierung von BCC .....	133
4.4.3	Entstehung von BCC möglicherweise unabhängig vom Haarzyklus .....	137
4.4.4	Etablierung stabiler Zelllinien für <i>in vitro</i> -Analysen der Ptch-Funktion.....	138
4.4.5	Ausblick .....	141
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>143</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>145</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>166</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>167</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Entstehung von Krebs

Der Begriff Krebs wurde vermutlich erstmalig im 5. Jahrhundert v. Chr. vom griechischen Arzt Hippokrates verwendet (karkinos [griech.] – Krebs). Damit wurden nicht heilende Geschwüre bezeichnet, die von erweiterten Blutgefäßen umgeben sind. Man nahm damals an, dass Krebs durch Melancholie entstehe, wenn Organismus und Seele durch ein Überwiegen der schwarzen Galle vergiftet werden. Heute weiß man, dass Krebserkrankungen entstehen, wenn die Regulation des Zellwachstums gestört ist und die entsprechenden Kontrollmechanismen nicht mehr funktionieren. So kann durch Veränderungen der DNA (Mutationen) aus einem Proto-Onkogenen ein Onkogen entstehen oder die Funktion von Tumorsuppressorgenen gestört werden.

Protoonkogene, die unter anderem für Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren oder Proteinkinasen kodieren, kontrollieren Zellwachstum, Zellteilung und Differenzierung. Aktivierende Mutationen in diesen Genen führen daher zu Tumoren (D Hanahan und RA Weinberg, 2000). Tumorsuppressorgene dagegen verhindern normalerweise unkontrolliertes Zellwachstum, indem sie den Zellzyklus oder die Apoptose regulieren. Inaktivierende Mutationen und der Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens können daher ebenfalls zu Krebs führen. Nach Knudsons „zwei Treffer“-Hypothese erfordert die Entstehung von Tumoren durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen eine Inaktivierung beider Allele des entsprechenden Gens (AG Knudson, Jr., 1971). Bei krebsprädisponierenden Erbkrankheiten kann die Mutation eines Allels des Tumorsuppressorgens vererbt werden, während ein zweites somatisches Ereignis zur Mutation des zweiten Allels führt. Häufig geht hierbei das zweite Allel verloren, was mit einem Verlust der Heterozygotie (aus dem Engl.: Loss of Heterozygosity – LOH) einhergehen kann. Natürlich können auch zwei somatische Mutationen auftreten. Dieses Ereignis findet sich bei sporadischen Tumoren. Hierbei ist häufig ein Allel des Tumorsuppressorgens mutiert und das andere verloren gegangen, epigenetisch abgeschaltet oder ebenfalls mutiert. Somit muss ein kompletter Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens vorliegen, um die Entstehung von Tumoren zu bewirken.

Zu den Tumorsuppressorgenen gehört *Patched (Ptch)*, das eine essentielle Komponente der Hedgehog/Ptch-Signalkaskade ist.

## 1.2 Der Hedgehog/Patched-Signalweg

Der Hedgehog (Hh)/Ptc-Signalweg spielt eine bedeutende Rolle bei der Embryonalentwicklung verschiedener Gewebe und Organe, da er das Überleben, die Proliferation und Differenzierung von Zellen sowie die Musterbildung reguliert (JE Hooper und MP Scott, 2005). Dieser in Abbildung 1 dargestellte Signalweg ist zwischen Vertebraten und Invertebraten stark konserviert (LV Goodrich *et al.*, 1997; A Ruiz i Altaba, 1999).

Bereits 1980 wurden die wesentlichen Komponenten des Signalweges, *Hh* und *Ptc*, bei *Drosophila melanogaster* identifiziert (C Nusslein-Volhard und E Wieschaus, 1980). *Ptc* ist der Rezeptor für den Liganden Hh und vermittelt durch einen komplexen Mechanismus das Signal unter anderem über das Protein Cubitus interruptus (Ci) ins Zellinnere.

Im Gegensatz zu *D. melanogaster* wurden in Vertebraten bisher mehrere *Ptc*-Homologe identifiziert. Dazu gehört neben *Ptc* auch *Ptc2* (I Smyth *et al.*, 1999; L Frohlich *et al.*, 2002). Weiterhin existieren in Vertebraten mehrere Hh-Homologe, die als *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Desert hedgehog* und *Indian hedgehog* bezeichnet werden (Y Echelard *et al.*, 1993). Auch bei den Gli-Proteinen, die ortholog zu Ci aus *D. melanogaster* sind, liegen in Vertebraten mehrere Homologe vor (JE Hooper und MP Scott, 2005). Sie werden Gli1, Gli2 und Gli3 genannt.

Ist der Hh/Ptc-Signalweg inaktiv, verbleiben die Gli-Transkriptionsfaktoren bzw. Ci im Zytoplasma, da sie an einen Proteinkomplex gebunden sind. Dieser Proteinkomplex besteht aus den zytoplasmatischen Proteinen Fused (Fu), Suppressor of Fused (Sufu) sowie Costal-2 (*D. melanogaster*) bzw. bei Vertebraten wahrscheinlich dem Costal-2-Homolog Kinesin family member 7 (Kif7) (Y Katoh und M Katoh, 2004; D Huangfu und KV Anderson, 2006). Die Freisetzung der Gli-Transkriptionsfaktoren erfolgt erst nach der Aktivierung des Signalweges durch Hh (PW Ingham und AP McMahon, 2001).

*Shh*, das wichtigste der Hh-Homologe, wird in Vertebraten in einer Signal sendenden Zelle synthetisiert. Wichtig für seine Funktion sind nach einer autokatalytischen Spaltung die Palmylierung der aminoterminalen (N-terminalen) Region sowie die Bindung von Cholesterol an die carboxyterminale (C-terminale) Domäne. Durch das Transmembranprotein Dispatched Homolog 1 (Disp1), welches Homologie zu *Ptc* zeigt, erfolgt möglicherweise der Transport des modifizierten Liganden in den Interzellularraum (T Kawakami *et al.*, 2002; H Tian *et al.*, 2005).

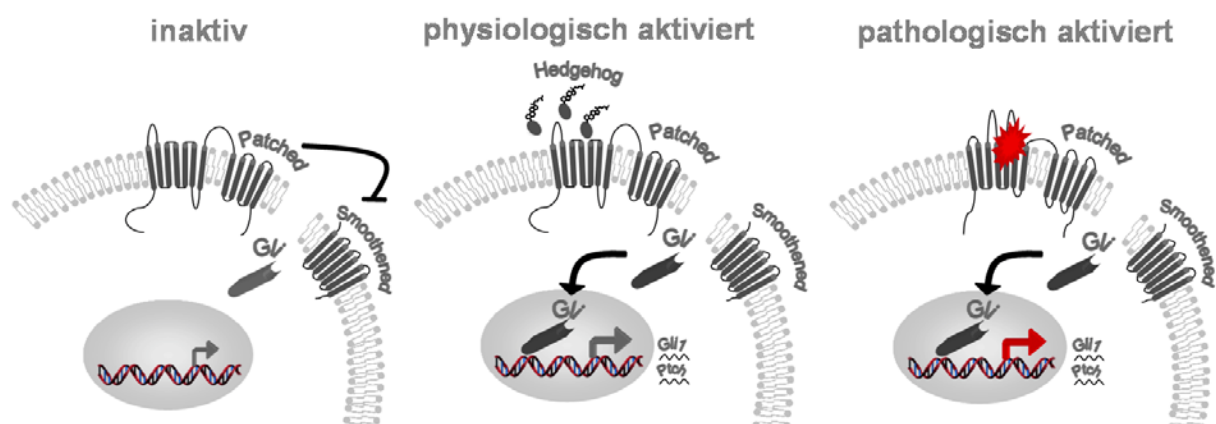
*Ptc* kodiert für ein Membranprotein aus zwölf transmembranen Domänen, zwei hydrophilen extrazellulären Schleifen, einer intrazellulären Schleife sowie C- und

N-terminalen intrazellulären Regionen. Die so genannte „sterol sensing domain“ (SSD), die für die Aktivität von Ptch notwendig ist, umfasst die Region zwischen der zweiten und sechsten transmembranen Domäne (PE Kuwabara und M Labouesse, 2002). Obwohl die genaue Funktion der SSD unklar ist, wird eine Rolle in der Bindung von Hh angenommen (R Burke *et al.*, 1999). Anderen Vermutungen zufolge könnte die SSD eine Funktion in der Regulation des Transports und der Degradation von Smoothed (Smo), dem Signalpartner von Ptch, besitzen (H Strutt *et al.*, 2001).

Smo besteht aus sieben transmembranen Domänen und besitzt eine den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ähnliche Struktur (J Alcedo *et al.*, 1996). Normalerweise wird die Aktivität von Smo durch Ptch blockiert. Diese Blockade erfolgt wahrscheinlich nicht durch eine direkte Interaktion zwischen Ptch und Smo, sondern durch die Sekretion eines Smo-inhibitorischen Moleküls durch Ptch (JK Chen *et al.*, 2002).

Durch die Bindung des Liganden Hh an die extrazellulären Schleifen von Ptch (V Marigo *et al.*, 1996a) wird die Inhibition von Smo aufgehoben (LV Goodrich und MP Scott, 1998). Hierdurch wird die Aktivierung der Signalkaskade ausgelöst, da Smo die Aktivität weiterer Komponenten des Signalweges bewirkt.

Die Aktivität des Signalweges wird vor allem durch die Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie vermittelt. Im inaktiven Zustand des Signalweges werden die Gli-Transkriptionsfaktoren normalerweise von einem Proteinkomplex im Zytoplasma gehalten (MM Cohen, Jr., 2003). Im aktiven Zustand werden die Gli-Proteine aus dem zytoplasmatischen Proteinkomplex entlassen und gelangen in den Nukleus. Dort bewirken sie die Transkription ihrer Zielgene (K Nybakken und N Perrimon, 2002).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des inaktiven, physiologisch und pathologisch aktivierten Hh/Ptch-Signalweges.** Gezeigt ist der inaktive (links) und durch die Bindung des Liganden Hh physiologisch aktivierte Hh/Ptch-Signalweg (Mitte) einer normalen somatischen Zelle im Gegensatz zu einer Zelle mit einem pathologisch aktivierten Signalweg (rechts). Die pathologische Aktivierung kann durch eine inaktivierende Ptch-Mutation (roter Stern) verursacht werden.

Der inaktive Zustand der Signalkaskade beruht auf der Inhibition der Aktivität von Smo durch Ptch. Ausgelöst durch die Bindung des Liganden Hh an Ptch oder durch eine inaktivierende Ptch-Mutation vermittelt Smo die Translokation von Gli1 und weiteren Gli-Transkriptionsfaktoren in den Nukleus. Dort wird die Transkription von Zielgenen, darunter *Ptch* und *Gli1*, ausgelöst.

Bei Säugern fungieren Gli1 und Gli2 als hauptsächliche Aktivatoren der Hh/Ptch-Signalkaskade. Gli3 hingegen übt eine repressorische Aktivität auf die Kaskade aus, die durch das Hh-Signal aufgehoben wird. Interessanterweise wird hierbei im Rahmen eines positiven Rückkoppelungsmechanismus die *Gli1*-Transkription aktiviert. Dafür werden funktionelle Gli2- und Gli3-Proteine benötigt (M Kasper *et al.*, 2006). Die Expression von *Gli1* ist folglich ein zuverlässiger Marker für den Aktivitätszustand der Hh/Ptch-Signalkaskade (M Kasper *et al.*, 2006). Da Gli-Proteine wiederum die *Ptch*-Transkription stimulieren, gehört neben *Gli1* auch *Ptch* zu den heute bekannten Zielgenen der aktivierten Hh/Ptch-Signalkaskade (Y Katoh und M Katoh, 2006) (siehe Abbildung 1).

Die Hh/Ptch-Signalkaskade ist unter anderem an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. So wurde bereits 1999 gezeigt, dass Shh einen terminalen Zellzyklus-Arrest verhindert (H Fan und PA Khavari, 1999). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen der zellulären Lokalisierung von Cyclin B1 und Ptch nachgewiesen (EA Barnes *et al.*, 2001). Erst durch die nukleäre Translokation kann Cyclin B1 den Beginn der Mitose (M-Phase) bewirken (J Li *et al.*, 1997). Die nukleäre Translokation von Cyclin B1 wird jedoch durch eine Bindung an die intrazelluläre Schleife des Ptch-Proteins verhindert. Shh stört die Interaktion von Ptch mit Cyclin B1 und ermöglicht so die nukleäre Lokalisierung des letzteren Proteins (EA Barnes *et al.*, 2001). Diese Daten zeigen, dass Ptch den Zellzyklus inhibieren kann, was wahrscheinlich zusätzlich zur Blockade der M-Phase auch durch eine Blockade der Synthesephase (S-Phase) hervorgerufen wird (C Adolphe *et al.*, 2006).

Die Hh/Ptch-Signalkaskade hat deshalb eine essentielle Funktion in der Regulation des Zellzyklus. Eine Deregulation der Kaskade, z. B. durch inaktivierende *Ptch*-Mutationen, kann daher gravierende Folgen auf die Proliferation von Zellen haben.

### 1.3 Hh/Ptch-assoziierte Tumorigenese

Durch Überexpression von Hh, durch eine inaktivierende Ptch-Mutation oder auch durch aktivierende Smo- oder Gli-Mutationen wird der Hh/Ptch-Signalweg pathologisch aktiviert (siehe Abbildung 1).

Aufgrund der wichtigen Funktionen des Signalweges in der Kontrolle von Zellproliferation und -differenzierung führt eine pathologische Aktivierung, die durch Mutationen einzelner



Komponenten hervorgerufen wird, zur Entstehung von Krebs. Je nach der Rolle der betreffenden Komponenten kann eine Klassifizierung in Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene vorgenommen werden. In Aktivatoren des Signalweges wie Hh, Smo und Gli zeigten sich in Tumoren vereinzelt aktivierende Mutationen (s. u.). Diese Proteine besitzen demnach onkogenes Potenzial. Dagegen wurden in Tumoren inaktivierende Mutationen in *Ptch*, das eine inhibitorische Wirkung auf den Signalweg hat, festgestellt (H Hahn *et al.*, 1999). Daher wird *Ptch* als Tumorsuppressorgen eingestuft.

Das Tumorspektrum, das durch eine pathologische Aktivierung der Signalkaskade hervorgerufen wird, ist sehr breit. Eine Deregulation des Signalweges wurde bei Tumoren des Verdauungstrakts, des Pankreas, der Lunge, der Harnblase und des Ovars festgestellt (DM Berman *et al.*, 2003; SP Thayer *et al.*, 2003; DN Watkins *et al.*, 2003; S Hamed *et al.*, 2004; X Chen *et al.*, 2007). Weiterhin wurden aktivierende *Smo*-Mutationen in Haut- und neuroektodermalen Tumoren (I Vorechovsky *et al.*, 1997a; J Reifenberger *et al.*, 1998; J Xie *et al.*, 1998; CW Lam *et al.*, 1999) sowie die Überexpression von *Gli1* in Hauttumoren, Schwannomen, Chondrosarkomen und Leberzellkarzinomen festgestellt (N Dahmane *et al.*, 1997; H Endo *et al.*, 2004; S Huang *et al.*, 2006; TD Tiet *et al.*, 2006).

Die Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade kann durch Cyclopamin verhindert werden. Cyclopamin ist ein Pflanzenalkaloid aus der Pflanze *Veratrum californicum* (Kalifornischer Germer), das bei Vertebraten zu Holoprosenzephalie und Zyklopie führen kann (S Coventry *et al.*, 1998). Dies wurde zunächst bei Lämmern festgestellt, deren Mütter während der Trächtigkeit den Kalifornischen Germer verzehrt hatten (MA McFerrer, 2006). Heute weiß man, dass diese Entwicklungsdefekte auf eine Inhibition der Hh/Ptch-Signalkaskade während der Embryonalentwicklung zurückzuführen sind (J Taipale *et al.*, 2000). Aufgrund seiner inhibierenden Wirkung auf den Hh/Ptch-Signalweg wird Cyclopamin momentan in präklinischen Studien zur Therapie von Hh/Ptch-assoziierten Tumoren eingesetzt (SP Thayer *et al.*, 2003; SS Karhadkar *et al.*, 2004; V Clement *et al.*, 2007; G Feldmann *et al.*, 2007).

#### **1.4 *Ptch*-assoziierte Tumoren**

Es ist bekannt, dass somatische Mutationen von *Ptch* zur Entstehung von Basalzellkarzinomen (engl.: „Basal Cell Carcinoma“ – BCC), Medulloblastomen (MB) und Rhabdomyosarkomen (RMS) führen (C Raffel *et al.*, 1997; I Vorechovsky *et al.*, 1997a;

JA Bridge *et al.*, 2000; H Zhang *et al.*, 2001; J Reifenberger *et al.*, 2005; U Tostar *et al.*, 2006). Weiterhin werden Keimbahnmutationen in *Ptch* mit einer seltenen autosomal dominant vererbten Erkrankung, dem Gorlin-Goltz- oder Basalzellnävus-Syndrom (engl.: „Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome“ – NBCCS), in Verbindung gebracht (RJ Gorlin, 1987; H Hahn *et al.*, 1996; RL Johnson *et al.*, 1996). Das NBCCS zeichnet sich durch verschiedene Entwicklungsdefekte sowie eine Prädisposition für die Bildung von Tumoren in einer Vielzahl von Geweben aus. Daran ist die duale Funktion des Hh/Ptch-Signalweges in der Embryogenese sowie der malignen Transformation erkennbar. Die Patienten erkranken überwiegend an BCC, darüber hinaus entwickeln ca. 5 % der Patienten MB (DG Evans *et al.*, 1991; MR Gailani *et al.*, 1992). Weiterhin wird das NBCCS mit anderen Tumoren, zu denen auch das RMS gehört, assoziiert (RJ Gorlin, 1987; U Tostar *et al.*, 2006).

*Ptch*-Mutationen, die zur Entstehung von Tumoren führen, sind häufig in Regionen mit einer wichtigen Funktion in der Signaltransduktion lokalisiert. Sowohl Keimbahn- als auch sporadische *Ptch*-Mutationen sind häufig in den beiden extrazellulären Schleifen zu finden (E Lindstrom *et al.*, 2006). Auch die N-terminale Region oder die intrazelluläre Schleife ist bei NBCCS-Patienten oftmals betroffen (E Lindstrom *et al.*, 2006). Alle diese Mutationen rufen eine Inaktivierung von Ptch hervor. Weiterhin stören Mutationen, die zu einem verkürzten C-Terminus führen, die Inhibition von Smo (RL Johnson *et al.*, 2000).

#### 1.4.1 Das Rhabdomyosarkom

Wie unter 1.4 beschrieben, können RMS aufgrund somatischer *Ptch*-Mutationen entstehen (JA Bridge *et al.*, 2000; U Tostar *et al.*, 2006).

Beim RMS, einem Tumor des quer gestreiften Skelettmuskels, handelt es sich um das häufigste Weichteilsarkom bei Kindern. Die Histologie des malignen klein-, blau- und rundzelligen Tumors ähnelt dem fötalen Skelettmuskel. Meist treten RMS sporadisch auf. Man unterscheidet im Wesentlichen zwischen dem embryonalen (ERMS) und dem alveolären Subtyp (ARMS). ERMS zeichnen sich durch einen differenzierteren Phänotyp mit spindelförmigen Zellen aus, während für ARMS kleine, runde und dicht gelagerte Zellen typisch sind.

In spontanen RMS wurde neben LOH von *Ptch* zusätzlich auch LOH von *SUFU* beschrieben (U Tostar *et al.*, 2006). Weiterhin wurde in RMS sowie in humanen RMS Zelllinien auch die Amplifikation von *Gli1* (WM Roberts *et al.*, 1989; JW Yoon *et al.*, 2002) oder der chromosomalen Region, in der das Gen lokalisiert ist, beschrieben (JA Bridge *et al.*, 2002). Da auch NBCCS-Patienten eine Prädisposition für RMS zeigen (RJ

Gorlin, 1987), beruht die Entstehung dieses Tumors vermutlich auf einer pathologischen Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade. Tatsächlich zeichnen sich RMS häufig durch eine erhöhte Expression der Zielgene des Hh/Ptch-Signalkaskadenweges, *Ptch* und *Gli1* aus (U Tostar *et al.*, 2006). Auch *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse, die eine heterozygote Keimbahnmutation in *Ptch* tragen, entwickeln RMS (H Hahn *et al.*, 1998; M Aszterbaum *et al.*, 1999), die eine hohe Expression von *Ptch* und *Gli1* aufweisen (H Hahn *et al.*, 1998; R Kappler *et al.*, 2003). Analysen dieser Mäuse zeigten weiterhin, dass der genetische Hintergrund der Tiere die RMS-Inzidenz stark beeinflusst. So entstehen keine RMS, wenn die Mutation auf dem Inzuchtstamm C57BL/6N (B6) propagiert wird. Dagegen entwickeln sich diese Tumoren in bis zu 15 % der *Ptch*-heterozygoten knockout-Tiere des Auszuchtstammes CD1 (J Calzada-Wack *et al.*, 2002). Diese Daten zeigen, dass es Modifikatorgene geben muss, die die Prädisposition zu RMS bei bestehender *Ptch*-Mutation beeinflussen.

#### 1.4.2 Das Medulloblastom

Das MB, ein maligner embryonaler Tumor des Kleinhirns, ist mit einer Inzidenz von 20 % einer der häufigsten bösartigen Hirntumoren bei Kindern. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten, die an diesem rasch proliferierenden Tumor erkrankt sind, liegt zwischen 55 und 80 % (A Rossi *et al.*, 2008). In 12 bis 18 % sporadischer MB wurden somatische *Ptch*-Mutationen oder LOH am *Ptch*-Lokus detektiert (T Pietsch *et al.*, 1997; M Wolter *et al.*, 1997; J Xie *et al.*, 1997; RH Zurawel *et al.*, 2000a). In diesen Tumoren wurde eine Überexpression von *Ptch* und *Gli1* nachgewiesen, was auf die Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade schließen lässt (RH Zurawel *et al.*, 2000a; JI Pritchard und JM Olson, 2008). Die Fehlregulation des Hh/Ptch-Signalkaskadenweges führt auch in etwa 5 % der NBCCS-Patienten zur Entwicklung eines MB (DG Evans *et al.*, 1991).

MB entwickeln sich auch in heterozygoten *Ptch*-knockout-Mäusen (LV Goodrich *et al.*, 1997; H Hahn *et al.*, 2000; C Wetmore *et al.*, 2000; RH Zurawel *et al.*, 2000b). Wie bereits für RMS beschrieben (siehe 1.4.1), ist auch die Entstehung von MB von Modifikatorgenen abhängig. Die Inzidenz für MB bei *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen auf B6-Hintergrund ist mit 72 % sehr hoch (H Hahn *et al.*, 2004). Dagegen entstehen bei *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen auf CD1-Hintergrund nur zu 8 % MB (S Pazzaglia *et al.*, 2002).

#### 1.4.3 Modifikatorgene bei *Ptch*-assoziierten RMS und MB

Wie schon erwähnt, entwickeln *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse Tumoren abhängig vom genetischen Hintergrund. *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse auf B6-Hintergrund entwickeln keine RMS, wohingegen diese Tumoren in bis zu 15 % auf CD1-Hintergrund anzutreffen sind (J Calzada-Wack *et*

*al.*, 2002). Dagegen prädisponiert der B6-Hintergrund zu MB, die bei mehr als 72 % aller heterozygoten *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Tiere innerhalb der ersten 300 Tage nach der Geburt auftreten (H Hahn *et al.*, 2004). Diese Daten zeigen, dass die Tumorfrequenz in *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen auch von anderen Genen als *Ptch* modifiziert wird. Eine Kartierung und Charakterisierung dieser Gene in der Maus sollte durchführbar sein. Die Identifizierung derjenigen Gene oder Genvarianten, welche die individuelle Suszeptibilität für Hh/Ptch-assoziierte MB und RMS beeinflussen, wird einen großen Beitrag zum besseren Verständnis der Funktion der Hh/Ptch-Signalkaskade leisten. Weiterhin sollte es möglich sein, diese Gene auf ihre Relevanz bei der Entstehung von menschlichen MB und RMS zu überprüfen. Das Wissen über einzelne oder additive Effekte von genetischen Polymorphismen und ihren Einfluss auf das individuelle Risiko von Kindern, an einem dieser beiden hochmalignen Tumoren zu erkranken, könnte einen Einfluss auf die frühzeitige Erkennung und dadurch eventuell auf die Heilungschancen haben.

#### **1.4.4 Das Basalzellkarzinom**

Mit einer Inzidenz, die sämtliche andere Tumorentitäten übertrifft, ist das BCC der häufigste Tumor des Menschen (Al Rubin *et al.*, 2005). Jährlich sind allein in den USA mehr als 750.000 neue Fälle zu verzeichnen und die Rate der Neuerkrankungen ist weiter steigend (MR Karagas *et al.*, 1992; DL Miller und MA Weinstock, 1994; E de Vries *et al.*, 2005).

Das BCC ist ein langsam wachsender, semimaligner Tumor, der umliegendes Gewebe schädigen kann, jedoch äußerst selten metastasiert (JK Robinson und M Dahiya, 2003). Charakteristisch für die Histologie sind basaloid differenzierte Zellverbände, die von dermale Stroma umgeben sind. Generell werden BCC in differenzierte und undifferenzierte bzw. solide BCC unterteilt (AN Crowson, 2006). Zu den differenzierten BCC gehören hauptsächlich der infundibulozystische, keratotische, follikuläre und pleomorphe Typ. Bei undifferenzierten BCC unterscheidet man zwischen indolenten und aggressiven Tumoren. Zum indolenten Typ gehören superfizielle und noduläre BCC, zum aggressiven hingegen infiltrative und metatypische BCC (AN Crowson, 2006).

Die Behandlung von BCC kann durch Exzision, mikrographische Chirurgie nach Mohs, Kürettage, Laser- oder Kryochirurgie und Bestrahlung, aber auch mit Imiquimod, einem Immunmodulator, erfolgen (MP Bukhardt Perez *et al.*, 2007). Aufgrund der Häufigkeit sind die Kosten für die Behandlung dieser Erkrankung durchaus relevant für das Gesundheitssystem. Durch alternative effektivere Therapien könnten die Kosten deutlich

reduziert werden. Daher ist eine bessere Kenntnis der molekularen Grundlagen der Entstehung und Progression von BCC äußerst wichtig.

Zu den Risikofaktoren für BCC gehören neben heller Haut, UV-Licht und Immunsuppression auch die genetische Veranlagung (L Daya-Grosjean und S Couve-Privat, 2005). So wurden z. B. Mutationen des Gens p53 in BCC identifiziert (G Gigliamari und A Sarasin, 2003; J Reifenberger *et al.*, 2005; T Mizuno *et al.*, 2006). Auch Patienten mit der Erkrankung Xeroderma pigmentosum weisen eine erhöhte Inzidenz für die Entstehung von BCC auf (KH Kraemer *et al.*, 1987; KH Kraemer *et al.*, 1994). Das höchste Risiko für BCC mit über 90 %iger Wahrscheinlichkeit haben hellhäutige Patienten mit NBCCS (VE Kimonis *et al.*, 1997). Oft entwickeln Patienten bis zum 20. Lebensjahr bereits ein BCC, später können sie bis zu 1000 dieser Tumoren aufweisen (VE Kimonis *et al.*, 1997).

Interessanterweise wurde in 60 bis 70 % der sporadischen BCC LOH der Region 9q22, in der das *Ptch*-Gen lokalisiert ist, nachgewiesen (MR Gailani *et al.*, 1996; AB Uden *et al.*, 1997). Heute nimmt man an, dass der Funktionsverlust von *Ptch* eine Voraussetzung für die Entstehung von BCC darstellt (D Sidransky, 1996). Schon seit längerem wird spekuliert, ob *Ptch* als so genanntes „gatekeeper“-Gen fungiert (D Sidransky, 1996; I Vorechovsky *et al.*, 1997b). Darunter versteht man Gene, die durch Mutationen unmittelbar die Entwicklung von Tumoren auslösen können.

Auch heterozygote *Ptch*-knockout-Mäuse können BCC entwickeln. Die Tumoren entstehen jedoch nicht *per se*, sondern erst nach Behandlung der Tiere mit ionisierender oder UV-Bestrahlung (M Aszterbaum *et al.*, 1999; M Mancuso *et al.*, 2004).

BCC entwickeln sich auch in anderen Tiermodellen, die mit einer Deregulation der Hh/*Ptch*-Signalkaskade einhergehen. So entstehen BCC in transgenen Mäusen, die durch die Verwendung des *Keratin 5 (K5)*-Promotors eine erhöhte Expression von *Gli1* oder *Gli2* in der Haut aufweisen (M Grachtchouk *et al.*, 2000; M Nilsson *et al.*, 2000; ME Hutchin *et al.*, 2005). Ebenso entwickeln sich BCC durch die Expression von *Shh* unter der Kontrolle des *Keratin 14 (K14)*-Promotors (AE Oro *et al.*, 1997).

Als Ursprungszellen für BCC kommen verschiedene Zellpopulationen, darunter die Basalzellen der interfollikulären Epidermis und Zellen des Haarfollikels, in Betracht (JP Lacour, 2002). In der Literatur finden sich jedoch kontroverse Angaben.

Haarfollikelzellen kommen für den BCC-Ursprung deshalb in Frage, weil die Entwicklung des Haarfollikels von der Hh/*Ptch*-Signalkaskade abhängig ist. Am Beginn der

Entstehung des Haarfollikels steht die Ausbildung einer so genannten Haarplakode. Diese wird u. a. durch den Wnt-Signalweg (abgeleitet von: „*Wingless*“ und „*Int-1*“) hervorgerufen. Ausgehend von der Haarplakode wird die Entstehung eines dermalen Kondensats aus mesenchymalen Zellen induziert. An der Invagination der Haarplakode in die Dermis und bei der Ausbildung der dermalen Papille, die sich aus dem Kondensat mesenchymaler Zellen entwickelt, ist der Hh/Ptch-Signalweg beteiligt. Danach werden weitere Strukturen des Haarfollikels, wie z. B. die innere Wurzelscheide, gebildet (SE Millar, 2002). Diese Daten zeigen, dass für die Entwicklung des Haarfollikels ein intakter Hh/Ptch-Signalweg nötig ist. Unterstützt wird dies durch Untersuchungen von *Shh*-knockout-Mäusen. Bei diesen Tieren entstehen zwar die Haarplakode und das dermale Kondensat, jedoch kommt es nicht zur vollständigen Ausbildung des Haarfollikels (B St-Jacques *et al.*, 1998; C Chiang *et al.*, 1999).

Für den Ursprung von BCC aus Basalzellen spricht die basaloide Morphologie der Tumorzellen (ME Maloney, 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass BCC aus Basalzellen entstehen, die eine ektopische Expression von *Gli1* aufweisen (N Dahmane *et al.*, 1997). Daher scheinen sowohl der Haarfollikel als auch die interfollikuläre Epidermis als Ausgangsstruktur für BCC in Frage zu kommen.

Auch bei der Homöostase des Haarzyklus von adulten Haarfollikeln ist die Hh/Ptch-Signalkaskade essentiell (N Sato *et al.*, 1999; LC Wang *et al.*, 2000; RD Paladini *et al.*, 2005). Der Haarzyklus besteht aus einer Wachstumsphase (Anagen), gefolgt von einer Übergangsphase (Katagen) und einer Ruhephase (Telogen), nach welcher das Haar ausfällt und wieder ein neuer Haarschaft gebildet wird (R Paus und G Cotsarelis, 1999). Bei der Maus umfasst der Haarzyklus nur 25 Tage, wobei das Anagen ca. 15 Tage einnimmt. Danach folgen Katagen und Telogen, bis am Tag 25 bzw. 0 erneut das Anagen einsetzt (S Muller-Rover *et al.*, 2001).

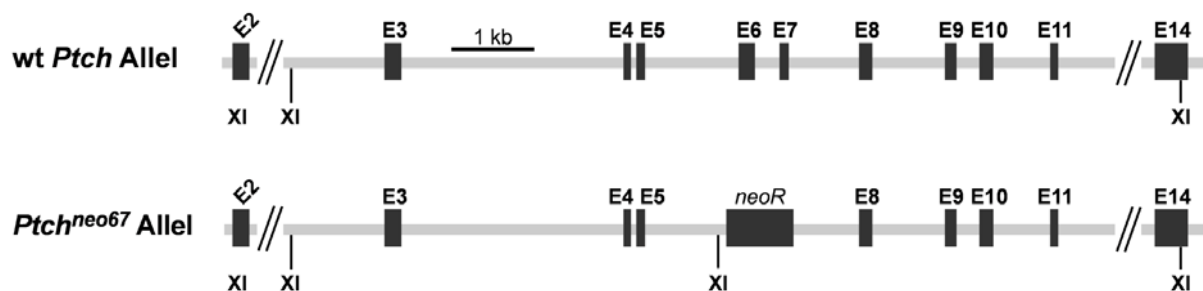
Während des Anagens werden *Shh* und die Zielgene *Ptch*, *Gli1* und *Gli2* des Hh/Ptch-Signalweges im Haarfollikel exprimiert (VA Botchkarev *et al.*, 2001; AE Oro und K Higgins, 2003; C Lo Celso *et al.*, 2004). Befindet sich der Haarfollikel jedoch im Katagen oder Telogen, ist die Expression dieser Gene reduziert (AE Oro und K Higgins, 2003; RD Paladini *et al.*, 2005). Somit ist der Hh/Ptch-Signalweg nur während der Wachstumsphase des Haarfollikels aktiv.

## 1.5 Mausmodelle für *Ptch*-assoziierte Tumoren

### 1.5.1 Die *Ptch*<sup>neo67</sup>-knockout-Maus

Wie bereits erwähnt, entstehen in heterozygoten *Ptch*<sup>neo67</sup>- oder *Ptch*<sup>neo12</sup>-Mäusen vor allem MB und RMS (Goodrich et al 1997, Hahn et al 1998).

In der *Ptch*-knockout-Mauslinie *Ptch*<sup>neo67</sup>, die in dieser Arbeit verwendet wurde, sind die Exone 6 und 7 eines *Ptch*-Allels durch eine Neomycin-Resistenzkassette ausgetauscht (*Ptch*<sup>neo67</sup>-Allel). In Abbildung 2 ist der *Ptch*<sup>neo67</sup>-Lokus im Vergleich zum Wildtyp (wt) *Ptch*-Lokus der *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mauslinie dargestellt (H Hahn et al., 1998).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des *Ptch*<sup>neo67</sup>-Lokus.** Dargestellt sind das wt *Ptch*- und das mutante *Ptch*<sup>neo67</sup>-Allel von *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen. Anstelle der Exone 6 und 7 enthält das *Ptch*<sup>neo67</sup>-Allel eine Neomycin-Resistenzkassette (*neoR*) (H Hahn et al., 1998). Abkürzungen: E, Exon; XI, *XhoI*

Homozygote *Ptch*<sup>neo67/neo67</sup>-Embryonen sterben während der Entwicklung zwischen Tag 9 und 10,5 nach der Befruchtung *in utero* aufgrund von Neuralrohr- und Herzdefekten. Heterozygote Mäuse hingegen zeigen ähnliche Symptome wie NBCCS-Patienten. So treten bei *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen Großwuchs und Skelettanomalien auf, und die Tiere entwickeln RMS und MB (H Hahn et al., 1998; H Hahn et al., 2000). BCC entstehen erst nach Bestrahlung *Ptch*-heterozygoter Tiere mit UV- oder ionisierender Strahlung (M Mancuso et al., 2004).

Wie bereits unter 1.4 beschrieben, ist die Inzidenz von RMS und MB in *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen vom genetischen Hintergrund abhängig. Je nach genetischem Hintergrund können die Tumorinzidenzen für RMS zwischen 0 und 63 % und für MB zwischen 8 und 72 % liegen (H Hahn et al., 2004).

### 1.5.2 Die konditionelle *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-knockout-Maus

Neben den konventionellen *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-knockout-Tieren wurde in dieser Arbeit auch ein konditionelles *Ptch*-knockout-Mausmodell verwendet. Hierbei handelt es sich um die

Mauslinie *Ptch*<sup>flox/flox</sup>, die von Mitarbeitern der AG Hahn etabliert wurde. Durch *loxP*-Sequenzen in den Intronen 7-8 sowie 9-10 kann in diesen Mäusen durch die Aktivität einer Cre-Rekombinase eine Deletion der Exone 8 und 9 des *Ptch*-Gens induziert werden. Für eine genauere Darstellung des *Ptch*<sup>flox</sup>-Lokus und zur Charakterisierung der Mauslinie, an der im Rahmen dieser Arbeit mitgewirkt wurde, siehe 3.2.1.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Mutationen im Tumorsuppressorgen *Ptch*, einer Komponente des Hh/Ptch-Signalweges, führen zur Entstehung von BCC, RMS und MB. Der häufigste Tumor des Menschen ist das BCC, während das RMS das häufigste Weichteilsarkom bei Kindern ist. Das MB, ein maligner, primitiver neuroektodermaler Tumor des Kleinhirns, ist für 20 % aller pädiatrischen Hirntumoren verantwortlich (RP Humphreys, 1982).

Auch *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse entwickeln MB und RMS mit einer hohen Frequenz, wobei die Inzidenz beider Tumoren vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängig ist (H Hahn *et al.*, 1998). Ziel des Projektes war die Identifikation der tumormodifizierenden Gene für diese beiden Tumorentitäten. Hierzu wurden verschiedene Rückkreuzungen mit den genannten *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen für Hochdurchsatz-PCR-Verfahren und genomweite Kopplungsanalysen hergestellt. Weiterhin sollten identifizierte Lozi, die die Suszeptibilität für RMS oder MB beeinflussen, eingengt und potenzielle tumormodifizierende Gene identifiziert werden.

Der zweite Aspekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Generierung eines Modells, in dem sich durch die Induktion einer *Ptch*-Mutation einfach und zuverlässig BCC induzieren lassen. Ein solches Modell ist für eine bessere Kenntnis der Rolle des Hh/Ptch-Signalweges bei der Pathogenese von BCC und somit für die Etablierung neuer Therapien von essentieller Bedeutung. Zu Beginn dieser Arbeit existierte kein solches Tiermodell. In unserem Labor wurde jedoch ein konditionelles *Ptch*-knockout-Mausmodell etabliert. Nach einer allgemeinen Charakterisierung dieses Modells sollte versucht werden, BCC mittels einer ubiquitär exprimierten induzierbaren Cre-Rekombinase im adulten Tier zu induzieren und gegebenenfalls zu analysieren.

Des Weiteren wurden Zelllinien aus den konditionellen *Ptch*-knockout-Mäusen etabliert und charakterisiert. Diese Zelllinien sollen künftig als Modellsystem für die *in vitro*-Analyse der Funktion von Ptch eingesetzt werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Statistische Auswertungsverfahren

Die Kopplungsanalyse zur Berechnung von LOD-Scores und der Permutationstest erfolgten durch Michael Rosemann, GSF Neuherberg, anhand der Software MapManager QTX.

Von Bettina Kulle, Department of Biostatistics & Department of Mathematics, Oslo, Norwegen, wurde die Auswertung der Mikroarray-Analysen mit Hilfe der Software Bioconductor/R durchgeführt, für die Normalisierung wurde die RMA-Methode verwendet. Eine hierarchische Clusteranalyse erfolgte nach der höchsten t-Test Statistik zwischen verschiedenen genetischen Hintergründen.

Alle weiteren statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe der Programme Excel bzw. Statistica (siehe 2.2).

### 2.2 Software

2100 Expert Software	Agilent Technologies, Waldbronn
ABI 3100 Genetic Analyser Data Collection 1.0	Applied Biosystems, Darmstadt
EXCEL	Microsoft Co., Redmont, 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
Statistica	StatSoft GmbH, Hamburg
WORD	Microsoft Co., Redmont, USA

### 2.3 Datenbanken

MGI_3.54-Mouse Genome Informatics	<a href="http://www.informatics.jax.org/">http://www.informatics.jax.org/</a>
Mouse Phenome Database	<a href="http://www.jax.org/phenome">http://www.jax.org/phenome</a>
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Ensembl release 48	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>

## 2.4 Laborgeräte

-80 °C Schrank (MDF-U71V)	Sanyo Electric Co., Ltd., Japan
Agarosegelelektrophorese-Kammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Waldbronn
Autoklav	W. Krannich GmbH & Co. K.G., Göttingen
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 & Co, Köln
Feinwaagen (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Filmkassetten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gasbrenner (Gasprofi 2 scs)	WLD-TEC GmbH, Göttingen
Geiger-Zähler	Berthold detection systems GmbH, Pforzheim
Gewebeeinbett- und -entwässerungsautomat (TP 1020)	Leica Mikrosysteme 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 (Modell CM 1900-1-1)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
MilliQ-Anlage	MembraPure GmbH, Bodenheim
Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Paraffinspender, Ausgießstation (Dispenser PAG 12)	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
PCR-Gerät	Eppendorf, Hamburg
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 Mikrosysteme 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 7900HT)	Applied Biosystems, Darmstadt
UV-Dokumentation (Digital Monochrome Printer P91D)	Mitsubishi, Ratingen

UV-Transilluminator/Software	Intas, Göttingen
Vakuumpumpe	Schütt Labortechnik, Göttingen
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Wipp-Taumel-Tisch (Unimax 1010)	Heidolph Instruments, Schwabach
Zählkammer nach Neubauer (Assistent)	Omnilab-Krannich, Göttingen
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/Lenglern
13 ml Röhrchen	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
15 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
50 ml Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
6-Loch-Platten (Tissue Culture Plate 6-Well)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Aufreinigungsplatte 96-Loch (MAHVN45)	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
Einwegspritzen (BD Plastipak)	BD GmbH, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Kanülen (Sterican Ø 0,45 x 12 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
Nitrozellulosemembran (Hybond-XL)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
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/Lenglern
Pipettenspitzen, gestopft (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	G. Kisker GbR, Steinfurt
Pipettenspitzen, ungestopft (10 µl, 200 µl)	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Pipettenspitzen, ungestopft (1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Skalpelle	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen
Sterilfilter	Omnilab-Krannich, Göttingen
TaqMan Platten und Folien (96-Well Optical Reaction Plate, 384-well Optical Reaction Plate, Optical Adhesive Covers)	Applied Biosystems, Darmstadt
Zellkulturschalen, 100 mm, 35 mm (Nunclon Surface)	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden

## 2.6 Chemikalien und Reagenzien

Die im 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, 50 bp und 100 bp DNA Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<sup>32</sup> P-dCTP	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
BM Purple	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Borsäure	ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA
Cryoblock Einbettmedium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dig RNA Labeling Mix, 10x conc.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
Glycergel Montagemedium	Dako GmbH, Hamburg
I-Block (Blockierung bei Antikörperfärbungen)	Tropix, Bedford, USA
Immuno Mount	Shandon Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Ketanest S (25 mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Kolophonium	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Lachsspermien-DNA (10 mg/ml)	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande
Mayers Hämalauflösung	Merck KgaA, Darmstadt
Montagemedium (Vectrashield Mounting Medium with DAPI)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Oligo(dT)-Nukleotide (50 ng/μl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Paraformaldehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Pertex Montagemedium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Rapid-hyb Buffer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Ringer-Lactat (nach Hartman)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
RNase-freies destilliertes Wasser	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rompun (2%)	Bayer AG, Leverkusen
Sephadexg-50 fine	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
TriFast	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tween-20	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain
Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

## 2.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Affymetrix 430A Mouse Gene Chips	Affymetrix, High Wycombe, UK
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HiPure Plasmid DNA Purification Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MicroSpin G.50 Columns	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
One-Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix, High Wycombe, UK
Perfectprep Gel Cleanup	Eppendorf, Hamburg
pGEM-Teasy TA-cloning Kit	Promega GmbH, Mannheim
Prime-It RmT Random Primer Labeling Kit	Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande
QuantiTect PCR Probe Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen GmbH, Hilden
RNA 6000 Nano Assay Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
RNeasy Fibrous Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent, VIC Probe	Applied Biosystems, Darmstadt

Bei der Verwendung von gebrauchsfertigen Reaktionssystemen wurde nach den Angaben des jeweiligen Herstellers gearbeitet, soweit nicht anders im Text erwähnt.

## 2.8 Stammlösungen

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

Borsäure pH 5,1	0,2 M	Borsäure	pH 5,1
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	96 % (v/v)	Chloroform	
	4 % (v/v)	Isoamylalkohol	
Citratpuffer pH 3,0	10 mM	Natriumcitrat	pH 3,0
Citratpuffer pH 6,0	10 mM	Natriumcitrat	pH 6,0
Cresol	0,1 % (w/v)	Cresol	
		gesättigte Sukrose-Lösung	
Denaturierungspuffer	1,5 M	NaCl	
	0,5 M	NaOH	
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP-Mix)	10 mM	dATP	
	10 mM	dTTP	
	10 mM	dGTP	
	10 mM	dCTP	
Eosin, 1%	1 % (w/v)	Eosin y (wasserlöslich)	
	80 % (v/v)	Ethanol	
Glutaraldehyd/1xPBS	0,2 % (v/v)	Glutaraldehyd	
		1x PBS	
Hoch-stringenter Puffer	0,1 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS)	
		0,2x Standard Natriumcitrat Lösung (SSC) pH 7,0	

Hybridisierungspuffer	40 % (v/v)	Formamid	
	10 % (w/v)	Dextransulfat	
		4x SSC	pH 6,4
		1x Denhards	
LacZ-Färbepuffer	5 mM	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	
	5 mM	K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	0,02 % (v/v)	NP-40	
	0,01 % (w/v)	Natrium Deoxycholat	
	500 µg/ml X-Gal		
		1x PBS	
LacZ-Puffer	2 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	0,02 % (v/v)	NP-40	
	0,01 % (w/v)	Natrium Deoxycholat	
		1x PBS	
Ladepuffer	50 % (v/v)	Glyzerol	
	0,02 % (w/v)	Xylencyanol	
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau	
	0,02 % (w/v)	SDS	
	100 mM	EDTA	
Lysepuffer für Plasmid-DNA Isolierungen	200 mM	NaOH	
	1 % (w/v)	SDS	
MBSTL-Puffer pH 7,5	0,15 M	NaCl	
	0,1 M	Maleinsäure	
	2 mM	Levamisol	
	0,1 %	Tween-20	
Neu-Fuchsin Chromogen	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	2,55 M	Kaliumacetat	pH 5,5
Niedrig-stringenter Puffer	0,1 %	SDS	
		2x SSC	pH 7,0
NT-Puffer	0,15 M	NaCl	
	0,1 M	Tris/HCl	pH 7,5
NTM-Puffer	0,1 M	NaCl	
	0,1 M	Tris/HCl	pH 9,5
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>	
NTMLT-Puffer	0,1 M	NaCl	
	0,1 M	Tris/HCl	pH 9,5
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>	
	2 mM	Levamisol	
	0,1 %	Tween-20	

Paraformaldehyd	4 % (w/v)	Paraformaldehyd 1x PBS	
Phosphat gepufferte Natriumchlorid Lösung, 10x, pH 7,4 (PBS). Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde.	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>	
Proteinase K-Puffer	50 mM	Tris/HCl	pH 8,0
	5 mM	EDTA	
	40 µg/ml	Proteinase K	
Resuspensionspuffer	50 mM	Tris/HCl	pH 8,0
	10 mM	EDTA	
	100 µg/µl	RNase A (Ribonuclease A; Qiagen GmbH, Hilden)	
Standard Natriumcitrat Lösung (SSC), 20x pH 7,0 bzw. 6,4	0,3 M	Natriumcitrat	
	3 M	NaCl	
STE-Puffer	50 mM	Tris/HCl	pH 8,0
	100 mM	NaCl	
	1 mM	EDTA	
	1 % (w/v)	SDS	
STE- <i>in situ</i> -Puffer	10 mM	Tris/HCl	pH 8,0
	5 mM	EDTA	pH 8,0
	0,5 M	NaCl	
Stop-Puffer	10 mM	Tris/HCl	pH 8
	1 mM	EDTA	
Tris-EDTA Puffer pH 9,0 (TE)	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	
Tris-Borsäure-EDTA Lösung, 10x (TBE)	890 mM	Tris/HCl	pH 8,0
Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde.	730 mM	Borsäure	
	12,5 mM	EDTA	
Tris-gepufferte Natriumchlorid Lösung, 10x (TBS)	0,5 M	Tris/HCl	pH 7,4
Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde.	1,5 M	NaCl	
X-Gal Stocklösung	40 mg/ml	X-Gal	
	100%	N,N-Dimethylsulfoxid (DMSO)	

## 2.9 Medien

### 2.9.1 Medien für die Bakterienkultur

Bakterienkulturen (*E. coli*) wurden mit „lysogeny broth“-Medium (LB-Medium) (1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0) kultiviert. Das LB-Medium wurde mit doppelt-destilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert. 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) unmittelbar vor Verwendung des Mediums erfolgte die Selektion auf jeweilige Resistenz-vermittelnde Gene.

### 2.9.2 Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben, der Ansatz autoklaviert und auf 55 °C abgekühlt. Nach Zugabe entsprechender Antibiotika wurde der warme LB-Agar in 10 cm Petrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erstarren des Agars in sterilen Plastiktüten bei 4 °C gelagert.

### 2.9.3 Medien für die Kultur eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum) und Antibiotika kultiviert. Die für die verschiedenen Zelllinien verwendeten Antibiotika und die eingesetzten Konzentrationen sind unter 2.10.2 angegeben. Abweichende Serumkonzentrationen in einzelnen Experimenten sind in der jeweiligen Beschreibung genannt.

Dulbeccos 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
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin/EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

## 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 Eukaryontische Zelllinien

Die in Tabelle 1 angegebenen eukaryontischen Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % FCS und den unter 2.9.3 beschriebenen Antibiotika in speziellen Zellkulturschalen bei 37 °C in einer konstanten CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre (5 % CO<sub>2</sub>) mit 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.



**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten eukaryontischen Zelllinien.** Spalte 1: Bezeichnung der Zelllinie; 2: Ursprungsspezies und Zelltyp; Spalte 3: Verwendete Antibiotika und Konzentrationen; Spalte 4: Hersteller und Klonnummer/Literaturreferenz; Abkürzungen: PS Penicillin/Streptomycin; G418, Geneticinsulfat.

1	2	3	4
Hek293	embryonale humane Nierenzellen	1 % PS	ATCC LGC Promochem, Wesel; CRL-1573
Hek293 Shh	embryonale humane Nierenzellen stabil transfiziert mit Shh-Np	1 % PS 0,4 mg/ml G418	(JK Chen <i>et al.</i> , 2002)
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup>	adulte murine Fibroblasten	1 % PS	diese Arbeit
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup> B9	adulte murine Fibroblasten	1 % PS	diese Arbeit
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup> C6	adulte murine Fibroblasten	1 % PS	diese Arbeit
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup> D2	adulte murine Fibroblasten	1 % PS	diese Arbeit
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup> F4	adulte murine Fibroblasten	1 % PS	diese Arbeit
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup> <i>ERT2</i> <sup>+/-</sup> G2	adulte murine Fibroblasten	1 % PS	diese Arbeit
<i>tPtch</i> <sup>-/-</sup>	adulte murine Fibroblasten	1 % PS	diese Arbeit

### 2.10.3 Mauslinien

Es wurden die Inzuchtlinien B6 (Charles River Laboratories, Sulzfeld), BALB/c (BALB), (Charles River Laboratories, L'Arbresle, Frankreich), DBA2J, 129Sv, FVB/N (Zucht des Tierstalls des Institutes für Humangenetik, Universität Göttingen) und die Auszuchtlinie CD1 (Zucht des Tierstalls des Institutes für Humangenetik, Universität Göttingen) verwendet. Die verwendeten genetisch manipulierten Mauslinien sind in Tabelle 2 aufgelistet, Zucht und Haltung der Tiere sowie tierexperimentelle Methoden unter 2.15.4 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>Ptch</i> <sup>neo67</sup>	B6 / BALB / CD1	Gendeletion (knockout)	(H Hahn <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ptch</i> <sup>flox</sup>	129Sv / B6	konditionelle induzierbare Gendeletion	(A Uhmann <i>et al.</i> , 2007)
<i>ROSA26CreERT2</i>	129Sv	<i>CreERT2</i> -Gen Integration in den <i>ROSA26</i> -Lokus	(D Hameyer <i>et al.</i> , 2007)
<i>ROSA26-R</i>	B6	Integration des $\beta$ -Galaktosidase-Gens in den <i>ROSA26</i> -Lokus	(P Soriano, 1999)
<i>Tg(Elia-Cre)</i>	B6	Transgen zur Expression einer konstitutiv aktiven Cre-Rekombinase unter Kontrolle des <i>Elia</i> -Promotors	(M Lakso <i>et al.</i> , 1996)

## 2.11 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Synthetische DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Qiagen GmbH, Hilden, bezogen. Die Stammkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  wurde mit Ampuwa eingestellt. Für die PCR wurde eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  verwendet.

### 2.11.1 DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung von Mäusen ist unter 2.15.4.1.2 beschrieben. Hierzu wurde mit den in Tabelle 3 aufgelisteten DNA-Oligonukleotiden gearbeitet.

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für Genotypisierungen von Mauslinien.** Spalte 1: Bezeichnung der getesteten Genotypen; 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> Wildtyp-Allel; <sup>flox</sup> Allel mit integrierten *loxP*-Sequenzen; <sup>del</sup> Allel nach erfolgter Deletion durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination; <sup>KI</sup> knockin-Allel; <sup>T</sup> transgenes Allel.

1	2	3	4	5	6
<i>Ptch</i> <sup>+/+</sup>	60 °C	400 bp <sup>mut</sup>	<i>neo-L</i>	AGTGCCAGCGGGGCTGCTAAA	(H Hahn <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup>		635 bp <sup>wt</sup>	<i>mPTC11R3</i>	CTGCCTGTATGTGGTTCAAACCG	
			<i>Pst4KF</i>	GGGAGGGGATTCAGCAGAATGTT	
<i>Ptch</i> <sup>+/+</sup>	60 °C	1401 bp <sup>wt</sup>	<i>p910F.4</i>	AGCACCTGGACGACATCCTAAA	(A Uhmann <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ptch</i> <sup>flox/+</sup>			<i>p1011R.2</i>	TCTGTCCTGTTTCACTGAATGCATGG	
<i>Ptch</i> <sup>del/+</sup>					
<i>Ptch</i> <sup>flox/+</sup>	60 °C	843 bp <sup>flox</sup>	<i>P910F.4</i>	AGCACCTGGACGACATCCTAAA	(A Uhmann <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup>			<i>Neo-R</i>	GCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	
<i>Ptch</i> <sup>+/+</sup>	60 °C	445 bp <sup>wt</sup>	<i>mPTCNx_f</i>	TGGTAATTCTGGGCTCCCGT	Assay von A. Zibat, AG Hahn
<i>Ptch</i> <sup>flox/+</sup>		150 bp <sup>flox</sup>	<i>mPTCNx_r</i>	CCGGTAGAATTAGCTTGAAGTTTCT	
<i>Ptch</i> <sup>flox/flox</sup>			<i>mPTCwt_r</i>	TCAAGGAGCAGAGGCCCAA	
<i>Ptch</i> <sup>del/+</sup>	60 °C	950 bp <sup>del</sup>	<i>Exon7-F</i>	AGGAAGTATATGCATTGGCAGGAG	(A Uhmann <i>et al.</i> , 2007)
<i>Ptch</i> <sup>del/del</sup>			<i>Neo-R</i>	GCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	
<i>ROSA26-R</i> <sup>+/+</sup>	56 °C	250 bp <sup>KI</sup>	<i>Rosa1</i>	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	(P Soriano, 1999)
<i>ROSA26-R</i> <sup>+/-</sup>		500 bp <sup>wt</sup>	<i>Rosa2</i>	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC	
			<i>Rosa3</i>	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	
<i>ROSA26CreERT2</i> <sup>-/-</sup>	56 °C	269 bp <sup>T</sup>	<i>RosCre ER-F</i>	ACCAGCCAGCTATCAACTC	persönliche Mitteilung A. Berns, Niederlande
<i>ROSA26CreERT2</i> <sup>T/-</sup>			<i>RosCre ER-R</i>	TATACGCGTGCTAGCGAAGATCTCCAC TTCCAGCAG	

### 2.11.2 DNA-Oligonukleotide für DNA-Sequenzanalysen

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten, die in das Plasmid *pGEM-Teasy* kloniert wurden, dienen die Oligonukleotide *T7new* (5'-TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC TCA A-3') und *SP6new* (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AAT T-3'). Die für DNA-

Sequenzanalysen von aufgereinigten PCR-Produkten verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgelistet.

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

1	2	3	1	2	3
<i>Dll4</i>	<i>Dll4Exon1S</i>	AAGGCTCTGGAGCAAGCAGGT	<i>Bmf</i>	<i>BmfExon1S</i>	TCAGTAGGACAGCAGCCCA
	<i>Dll4Exon1AS</i>	AGAGCGGTCAGGCTCAGC		<i>BmfExon1AS</i>	AGGCTGAAAGCTCTTGAATAGA
	<i>Dll4Exon2S</i>	GTAATGTCTCACGTCCTCTC		<i>BmfExon2S</i>	TTACCAGTAACTCCAGGTCT
	<i>Dll4Exon2AS</i>	ATGCGGGAGTGTAAAGTGAG		<i>BmfExon2AS</i>	CGTAATTGACAGTAGCCAAGA
	<i>Dll4Ex2F</i>	TCCCTAACAAAGCAGATTCGGAGTC		<i>BmfExon3S</i>	CAGCCTGAGATCTGGCAGTG
	<i>Dll4Ex2R</i>	GCTCGGCTCAACATAACTGGTGTT		<i>BmfExon3AS</i>	ACAGTATCTGCTCTCCAGA
	<i>Dll4Exon3S</i>	AAACAGGCTGCTGCGAGGCA	<i>Disp</i>	<i>DispExon1S</i>	GGCAGCTGCCGGAACAAGTA
	<i>Dll4Exon3AS</i>	AGCGGAATCCGAGCGTCCA		<i>DispExon1AS</i>	AGAGGATGAACTAGCCAGGC
	<i>Dll4Exon4S</i>	AGAGTTGGCAGCAGTCAACTC		<i>DispExon2S</i>	GGTTCCTATCTCCTTGTCTCGC
	<i>Dll4Exon4AS</i>	GACTAAGGGTACAGTACAGCAT		<i>DispExon2AS</i>	CTGCTCCATCCAAGCTGCCAC
	<i>Dll4Exon5S</i>	AGGCCAAGAGCAGGAAGTGAG		<i>DispExon3S</i>	ATGCCTTGTCTCTGTCTTGCA
	<i>Dll4Exon5AS</i>	TGTAAGATGGGAGACCTGCTC		<i>DispExon3AS</i>	GTAGTAAGGGTGGTGAGCTG
	<i>Dll4Exon6S</i>	TGAGCAGGTCTCCCATCTTAC		<i>DispExon4S</i>	GAGTGGCTAGGCTGGTACC
	<i>Dll4Exon6AS</i>	ATAGGAAAGTCAGTTACTGACCA		<i>DispExon4AS</i>	CTCTTTGGTGATCCAGAACTC
	<i>Dll4Exon7S</i>	TTCAGGCGAGTGAATGCTCA		<i>DispExon5S</i>	ATCTACAATCCAGGTAGGAG
	<i>Dll4Exon7AS</i>	CACACTGACTGGATGCTAC		<i>DispExon5AS</i>	TCTCCCATGTCTTTGGAGAA
	<i>Dll4Exon8S</i>	GTAGCATCCAGTCAGTGTG		<i>DispExon6S</i>	TTCTCCAAAGACATGGGAGA
	<i>Dll4Exon8AS</i>	GACCACAATAGCAGACAGGT		<i>DispExon6AS</i>	TAACTCTGGACCTGCTCATC
	<i>Dll4Exon9S</i>	TGGTAGAAGAGCTTAAGCTCG		<i>DispExon7S</i>	TCCAGTCAGGTGCAGGCAAG
	<i>Dll4Exon9AS</i>	AGCCTAGGAGATCCTGTCAAAC		<i>DispExon7AS</i>	GGCTGCAGTCTTGAAGCTAG
	<i>Dll4Exon10S</i>	TCTGGGATCTAGACTGACAG		<i>DispExon8-1S</i>	CTACTGCTTGTCCAGCTC
	<i>Dll4Exon10AS</i>	TGAGATTGCTAGTGAACAGGAC		<i>DispExon8-1AS</i>	CAAGGCTAGAACATCTGGCAGG
	<i>Dll4Exon11S</i>	AGCACCTCTGGATCATTGCA		<i>DispExon8-1IS</i>	ACAGTCAGCCAGATCTCCA
	<i>Dll4Exon11AS</i>	CCACTCCACAGTGAGAAGAT		<i>DispExon8-1IAS</i>	ACAGACCCAGAATATTCGGTGT
<i>Wt1</i>	<i>Wt1Ex1-1S</i>	CAAGTCCAGCGCCGAGAAT		<i>DispEx8-1F</i>	AGCATGACAAGAGGTGAGAGAGCT
	<i>Wt1Ex1-2S</i>	TTCATCAAACAGGAGCCCAGCT		<i>DispEx8-2F</i>	TTCTGCACTACCTGCTAGACAGA
	<i>Wt1Ex1-3AS</i>	AAGCGGCGTGGGAGCAGGT		<i>DispEx8-3F</i>	CTTTACCATGTGGCATTCCGCATG
	<i>Wt1Ex2-S</i>	ATCGGGTACCCGCTGCTAGT		<i>DispEx8-4F</i>	TGAGGCTGTTGCTGGCGTTGCACA
	<i>Wt1Ex2-AS</i>	ATTCGGATAGGATGCGGTAC		<i>DispEx8-5F</i>	AAGTATCCTGACTTCTCGCCTAG
	<i>Wt1Ex3-S</i>	AGTACTCGCACTCCCGAGTCT		<i>DispEx8-6F</i>	TTGTCAACCGAGATGAGCAAGGCA
	<i>Wt1Ex3-AS</i>	CACTTCTGGATTCCAGGATC		<i>DispEx8-7F</i>	GTGTGGCCTTCTCTTACGTCAGA
	<i>Wt1Ex4-S</i>	CAGTACAGTCTTGTGATTGTG		<i>DispEx8-8F</i>	ACCTGCAGATACATGATGGCAGCT

<i>Wt1Ex4-AS</i>	TAGGCCTGTTCTCCCTTCAGAA	<i>DispEx8-9F</i>	GTTTCAGTGACGCTAAGGTAAGTCCA
<i>Wt1Ex5-S</i>	GAAGTTCCTACTGGATTCTGG	<i>DispEx8-10F</i>	TCGAAAGTTACTCCACAGTGGCCT
<i>Wt1Ex5-AS</i>	ATGTCAGGCCTAACTCCTGCGTT	<i>DispEx8-11F</i>	AGGATGTGCCTCTTTCATGGCTGA
<i>Wt1Ex6-S</i>	TGTTCCAGAGTGAGCCCATGGAGT	<i>DispEx8-12F</i>	AGGCATTAGTGGGTGAGGGTACT
<i>Wt1Ex6-AS</i>	AGAAGGTCCTTCAGCTGAG	<i>DispEx8-13F</i>	AGGACAAGTGGAGCAGAACTCAG
<i>Wt1Ex7-S</i>	GTTACATATGGCACAAGGTC	<i>Ptch mPtc11</i>	AAAGCCGAAGTTGGCCATGGGTAC
<i>Wt1Ex7-AS</i>	GTGTCAGAGTCCAGAATGAA	<i>mPtc4</i>	GGCCCTTGTTTTGAATGGTGGAT
<i>Wt1Ex8-S</i>	TCATCTGCAGCTAGGGTTTC	<i>mPtc6R</i>	AATGCCAATCAAGGAGCAGAGG
<i>Wt1Ex8-AS</i>	GACAGTCACAACATCAGCTC	<i>mPtc7R</i>	TGTCCTGTTTCACTGAATGC
<i>Wt1Ex9-S</i>	AGCTGCCAGAAAGCCGGCCTTATG	<i>W18R2</i>	TTCCAGTTAATGACTCCCA
<i>Wt1Ex9-AS</i>	CAGTTTCATTCAACAGTAGCT		
<i>Wt1Ex10-S</i>	TGATAGTTGAACCTGTGCCAG		
<i>Wt1Ex10-AS</i>	GAAAGGTGAGTGGGAGGAAT		

### 2.11.3 DNA-Oligonukleotide für die Kopplungsanalyse

In Tabelle 5 sind die analysierten Mikrosatellitenmarker aufgelistet. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind unter <http://www.informatics.jax.org/> angegeben.

**Tabelle 5: Auflistung der analysierten Mikrosatellitenmarker für die gesamt-genomische Kopplungsanalyse.** Abkürzung: Chr. Chromosom.

Chr. 1	Chr. 2	Chr. 3	Chr. 4	Chr. 5	Chr. 6	Chr. 7	Chr. 8	Chr. 9	Chr. 10
D1Mit294	D2Mit37	D3Mit164	D4Mit235	D5Mit386	D6Mit138	D7Mit306	D8Mit4	D9Mit328	D10Mit213
D1Mit411	D2Mit249	D3Mit6	D4Mit286	D5Mit79	D6Mit274	D7Mit310	D8Mit190	D9Mit336	D10Mit274
D1Mit22	D2Mit398	D3Mit49	D4Mit15	D5Mit197	D6Mit230	D7Mit96	D8Mit231	D9Mit35	D10Mit95
D1Mit132	D2Mit452	D3Mit318	D4Mit203	D5Mit239	D6Mit36	D7Mit68	D8Mit242	D9Mit12	D10Mit233
D1Mit399	D2Mit148	D3Mit17	D4Mit170	D5Mit406	D6Mit59	D7Mit101	D8Mit49	D9Mit125	
D1Mit223		D3Mit116		D5Mit95	D6Mit373	D7Mit259			
		D3Mit19							
Chr. 11	Chr. 12	Chr. 13	Chr. 14	Chr. 15	Chr. 16	Chr. 17	Chr. 18	Chr. 19	
D11Mit231	D12Mit182	D13Mit57	D14Mit109	D15Mit100	D16Mit182	D17Mit133	D18Mit110	D19Mit68	
D11Mit333	D12Mit124	D13Mit250	D14Mit60	D15Mit209	D16Mit211	D17Mit49	D18Mit177	D19Mit19	
D11Mit203	D12Mit34	D13Mit13	D14Mit113	D15Mit159	D16Mit139	D17Mit152	D18Mit186	D19Mit34	
	D12Mit99	D13Mit262	D14Mit265			D17Mit39		D19Mit71	
	D12Nds2	D13Mit78	D14Mit165						
		D13Mit151							

### 2.11.4 DNA-Oligonukleotide für RT-PCR

Der spezifische Nachweis von Transkripten erfolgte mittels RT-PCR an cDNA und der in Tabelle 6 aufgelisteten DNA-Oligonukleotide.

**Tabelle 6: 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> Wildtyp-Transkript; <sup>del</sup> Transkript nach 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	(A Uhmann <i>et al.</i> , 2005)
			<i>Gapd-R</i>	ATGACCACAGTCCATGCCAT	
<i>Gli1</i>	60 °C	419 bp	<i>mGliF8</i>	TGCACCAAGCGCTACACAGATCCCA	Regine Bauer; AG Hahn
			<i>mGliR9</i>	AGCTGATGCAGCTGATCCAGCCTA	
<i>Igf2</i>	55 °C	454 bp	<i>Igf2 TaqManF</i>	TGTGCTGCATCGCTGCTTAC	Regine Bauer; AG Hahn
			<i>Igf2 Exon6R</i>	TTGCTGGACATCTCCGAAGAG	
<i>wt Ptch</i>	55 °C	731 bp <sup>wt</sup>	<i>mPtc11</i>	AAAGCCGAAGTTGGCCATGGGTAC	(A Uhmann <i>et al.</i> , 2005)
<i>Ptch<sup>del</sup></i>		451 bp <sup>del</sup>	<i>mPtc7R</i>	TGTCCTGTTTCACTGAATGC	

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

### 2.11.5.1 DNA-Oligonukleotide für die quantitative *real time* PCR an cDNA

DNA-Oligonukleotide für die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) mit SYBR Green (QuantiTect SYBR Green) zur Messung von Genexpressionsniveaus sind in Tabelle 7 aufgelistet.

**Tabelle 7: Auflistung der für die qRT-PCR verwendeten DNA-Oligonukleotide.** Spalte 1: Bezeichnung der quantifizierten Gentranskripte; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperatur bei der qRT-PCR; Spalte 3: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3'); Spalte 5: Verwendete Endkonzentration der DNA-Oligonukleotide; Spalte 6: Referenz; Abkürzungen: <sup>wt</sup> Wildtyp-Transkript; <sup>del</sup> Transkript nach erfolgter Deletion durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination.

1	2	3	4	5	6
<i>18S rRNA</i>	60 °C	<i>18S forw</i>	CGCAAATTACCCACTCCCG	400 nM	diese Arbeit
		<i>18S rew2</i>	TTCCAATTACAGGGCCTCGAA	400 nM	
<i>Bcl-2</i>	60 °C	<i>Bcl2-F1</i>	GGACAACATCGCCCTGTGGATG	400 nM	diese Arbeit
		<i>Bcl2-R1</i>	AACAGAGGTGCGATGCTGGG	400 nM	
<i>Gli1</i>	58 °C	<i>mGli1-tq-f</i>	TACATGCTGGTGGTGCACATG	400 nM	diese Arbeit
		<i>mGli1-tq-r</i>	ACCGAAGGTGCGTCTTGAGG	400 nM	
<i>Gli2</i>	60 °C	<i>mGli2 RT-PCR-F</i>	GGTCATCTACGAGACCAACTGC	400 nM	diese Arbeit
		<i>mGli2 RT-PCR-R</i>	GTGTCTTCAGTTCTCCAGGC	400 nM	
<i>Gli3</i>	60 °C	<i>mGli3 F2</i>	GAAGGAACAACCCTAGTCAAGGAGGA	400 nM	diese Arbeit
		<i>mGli3-SybrgreenR</i>	CCAGCGGCACACGAACCTCTCT	400 nM	
<i>K1</i>	60 °C	<i>mK1-F</i>	TCAACGTTGAGGTTGACCCCTC	400 nM	diese Arbeit
		<i>mK1-R</i>	ACCTTCCTTCTGAGGATGCTG	400 nM	
<i>K10</i>	60 °C	<i>mK10-F</i>	GGATGCTGAAGAGTGGTTCAA	400 nM	diese Arbeit
		<i>mK10-R</i>	TCTGTTTCTGCCAAGGAGGCT	400 nM	

<i>Ptch</i>	58 °C	<i>mPtc10</i>	TACAGTCCGGGACAGCATACC	400 nM	diese Arbeit
		<i>mPtc11R</i>	GTACCCATGGCCAACCTCGGCTTT	400 nM	
<i>Ptch<sup>wt</sup></i>	60 °C	<i>mPtc-tq-Ex7F</i>	GTGGATGTCAAGGTTTATCCAG	400 nM	diese Arbeit
		<i>mPtc-tq Ex8R</i>	TGCTTGGGAGTCATTAAGTGA	400 nM	
<i>Ptch<sup>wt</sup></i>	60 °C	<i>mPtc11</i>	AAAGCCGAAGTTGGCCATGGGTAC	400 nM	diese Arbeit
		<i>mPtc-tq Ex8R</i>	TGCTTGGGAGTCATTAAGTGA	400 nM	
<i>Ptch<sup>del</sup></i>	60 °C	<i>mPtc-tq-Ex7F</i>	GTGGATGTCAAGGTTTATCCAG	400 nM	diese Arbeit
		<i>mPtc-tqEx7/10R</i>	GCATAGGCAAGCTGACAAGTTT	400 nM	
<i>Ptch<sup>del</sup></i>	60 °C	<i>mPtc11</i>	AAAGCCGAAGTTGGCCATGGGTAC	400 nM	diese Arbeit
		<i>mPtc-tq Ex7/10R2</i>	TTAAACAGGCATAGGCAAGCTGAC	400 nM	

### 2.11.5.2 DNA-Oligonukleotide für TaqMan-Analysen an gDNA

DNA-Oligonukleotide und fluoreszenzmarkierte Sonden für TaqMan-Analysen an genomischer DNA (gDNA) sind in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8: Auflistung der für die qRT-PCR verwendeten DNA-Oligonukleotide.** Spalte 1: Bezeichnung des analysierten Genlokus; Spalte 2: Verwendete Anlagerungstemperatur bei der TaqMan-Analyse; Spalte 3: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids oder der Hybridisierungssonde; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3'); Spalte 5: Verwendete Endkonzentration der DNA-Oligonukleotide und der Sonden-DNA; Spalte 6: Literaturreferenz; Abkürzungen: *flax* Allel mit integrierten *loxP*-Sequenzen; *del* Allel nach erfolgter Deletion durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination; 6-FAM, 6-Carboxyfluoreszein; YYE, Yakima Yellow.

1	2	3	4	5	6
<i>Ptch<sup>flax</sup></i>	60 °C	<i>mPTCNx_f</i>	TGGTAATTCTGGGCTCCCGT	400 nM	A. Zibat, AG Hahn
		<i>mPTCNx_r</i>	CCGGTAGAATTAGCTTGAAGTTCCT	400 nM	
		<i>mPTCNx_S2</i>	YYE-TTGGTTTGTAATTTTACTTTGACGGTACCTCGA	200 nM	
<i>Ptch<sup>del</sup></i>	60 °C	<i>mPTCdelNx_f</i>	TTCATTGAACCTTGGGGAACATT	400 nM	A. Zibat, AG Hahn
		<i>mPTCNx_r</i>	CCGGTAGAATTAGCTTGAAGTTCCT	400 nM	
		<i>mPTCdelNx_S1</i>	6-Fam-CACACCAGACCAGCTTGCAAAGAGATC	200 nM	
<i>Pelota</i>	60 °C	<i>Pelo-F1</i>	CGGTCTGAGTGCTGGTAGGGAA	400 nM	A. Zibat, AG Hahn
		<i>Pelo-R</i>	TCTGCACCTTAGCGTGAAGCC	400 nM	
		<i>Pelo-Sonde2</i>	6-Fam-GAGCGAGCAAAGCCAGGCAGAGTT	200 nM	

### 2.11.6 Sonden

Die im Rahmen dieser Arbeit für Southern Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen benutzten Sonden sind in Tabelle 9 angegeben.

**Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Sonden.** Spalte 1: Bezeichnung der detektierten Gentranskripte; Spalte 2: Bezeichnung der verwendeten Plasmide; Spalte 3: Verwendete Restriktionsendonukleasen zur Linearisierung des Plasmids; Spalte 4: Größe der Sonde; Spalte 5: Verwendung; Spalte 6: Literaturreferenz; Abkürzungen: <sup>lox</sup> Allel mit integrierten *loxP*-Sequenzen; <sup>del</sup> Allel nach erfolgter Deletion durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination.

1	2	3	4	5	6
wt <i>Ptch</i> <i>Ptch</i> <sup>lox</sup> <i>Ptch</i> <sup>del</sup>	<i>pGEM-T KO#13</i>	<i>EcoRI</i>	1,2 kb	Southern Blot-Analyse	(A Uhmann <i>et al.</i> , 2007)
<i>Gli2</i>	<i>pmGli2</i>	<i>HindIII</i> (antisense) <i>BamHI</i> (sense)	1,2 kb	<i>in situ</i> -Hybridisierung	zur Verfügung gestellt von M. Wijgerde, Rotterdam, Niederlande

## 2.12 Gebrauchsfertige TaqMan Assays für Genexpressionsanalysen

Ein gebrauchsfertiger 20x Mix zur Expressionsanalyse der in Tabelle 10 aufgelisteten Gene, der spezifische Oligonukleotide sowie eine FAM-markierte TaqMan Sonde enthielt, wurde von Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen.

**Tabelle 10: Auflistung der verwendeten TaqMan Assays für Genexpressionsanalysen.** Spalte 1: Bezeichnung der quantifizierten Gentranskripte; Spalte 2: Bezeichnung des Assays.

1	2
<i>Apoptosis inhibitor 5</i>	Mm00500189_m1
<i>Catenin src</i>	Mm00483042_m1
<i>Ets homologous factor</i>	Mm00468193_m1
<i>Midkine</i>	Mm00440279_m1
<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, J</i>	Mm00501277_m1
<i>Tnf receptor-associated factor 6</i>	Mm00493836_m1
<i>Wilms tumor homolog</i>	Mm00460570_m1
<i>ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 2</i>	Mm00651052_mH

## 2.13 Enzyme

**Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Enzyme.** Spalte 1: Bezeichnung des Enzyms; Spalte 2: Anwendung des Enzyms; Spalte 3: Hersteller; Abkürzungen: IHC, Immunhistochemie; *Taq*, *Thermus aquaticus*.

1	2	3
Restriktionsendonukleasen	Restriktionshydrolyse	Invitrogen GmbH, Karlsruhe New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	PCR und RT-PCR	Molzym GmbH & Co.KG, Bremen
T3 RNA Polymerase	Herstellung von Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierung	Promega GmbH, Mannheim
T7 RNA Polymerase	Herstellung von Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierung	Promega GmbH, Mannheim
RNase A	<i>in situ</i> -Hybridisierung	Carl Roth, Karlsruhe
Collagenase H (Clostridiopeptidase A)	primäre Kultivierung von Fibroblasten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteinase K	DNA-Isolierung <i>in situ</i> -Hybridisierung Antigendemaskierung für IHC	Carl Roth, Karlsruhe
Alkaline Protease (Proteinase, bacterial, Type XXIV)	Antigendemaskierung für IHC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Reverse Transkriptase SuperScript II	cDNA-Synthese	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.14 Antikörper

### 2.14.1 Primäre Antikörper

Die für Immunhistochemische Methoden verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 12 aufgelistet. Die jeweiligen Verdünnungsmedien der Antikörper sind der Beschreibung der jeweiligen Methode zu entnehmen.

**Tabelle 12: 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: Eingesetzte Antikörperversdünnung; Spalte 5: Hersteller.

1	2	3	4	5
anti- $\beta$ -Catenin	murines $\beta$ -Catenin	Kaninchen, polyklonal	1:1000	zur Verfügung gestellt von F. Brembeck, Berlin
anti-B220	murines B220	Ratte; monoklonal	1:200	BD Biosciences Pharmingen, San Diego
anti-Bcl-2	murines Bcl-2	Kaninchen; polyklonal	1:250	BD Biosciences Pharmingen, San Diego
anti-Caspase 3	humane Caspase 3	Kaninchen; polyklonal	1:500	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
anti-CD3	humanes CD3	Ratte; monoklonal	1:50	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf
anti-F4/80	murines F4/80	Ratte; monoklonal	1:100	AbD Serotec GmbH, Düsseldorf
anti-Gli1	murines Gli1	Kaninchen; polyklonal	1:150	Abcam, Cambridge, UK
anti-K1	murines K1	Kaninchen; polyklonal	1:1000	Covance Inc., HISS Diagnostics GmbH, Freiburg i. Br.



anti-K10	murines K10	Kaninchen; polyklonal	1:500	Covance Inc., HISS Diagnostics GmbH, Freiburg i. Br.
anti-K17	murines K17	Kaninchen; polyklonal	1:4000	zur Verfügung gestellt von P. Coulombe, Baltimore, USA
anti-Ki-67	humanes Ki-67	Maus; monoklonal	1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego
anti-p53	murines p53	Kaninchen; polyklonal	1:500	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
anti-p63	humanes p63	Maus, monoklonal	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg

## 2.14.2 Sekundäre Antikörper und Alkalische Phosphatase-gekoppelte Streptavidin Reagenzien

Die für immunhistochemische Methoden verwendeten sekundären Antikörper sind in Tabelle 13 aufgelistet. Für die Detektion des biotinylierten anti-Ratte Immunglobulins wurde StreptABComplex/AP (Dako GmbH, Hamburg) verwendet.

**Tabelle 13: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper.** Spalte 1: Bezeichnung des sekundären Antikörpers; Spalte 2: Antigen; Spalte 3: Ursprungsspezies des Antikörpers; Spalte 4: Eingesetzte Antikörperverdünnung und Verdünnungsmedium; Spalte 5: Hersteller; Abkürzungen: AP, Alkalische Phosphatase; Db, Dot blot; Fab, antigenbindendes Fragment; Ig, Immunglobulin; ISH, *in situ*-Hybridisierung; IHC, Immunhistochemie; HRP, horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase).

1	2	3	4	5
anti-Maus Ig AP-konjugiert	Maus IgG	Ziege	IHC: 1:500 in 0,2 % I-Block in TBS	Dako GmbH, Hamburg
anti-Kaninchen Ig AP-konjugiert	Kaninchen IgG	Ziege	IHC: 1:50 in 0,02 % I-Block in TBS	Dako GmbH, Hamburg
anti-Ratte Ig biotinyliert*	Ratte IgG	Kaninchen	IHC: 1:50 in 0,02 % I-Block in TBS	Dako GmbH, Hamburg
anti-Maus Ig HRP-konjugiert**	Maus	Ziege	IHC: lag als Arbeitslösung vor	Dako GmbH, Hamburg
Anti-Digoxigenin Fab AP-konjugiert	Digoxigenin	Schaf	Db: 1:5000 in NT-Puffer ISH: 1:500 in 0,02% I-Block in MBSTL	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

\*Der Antikörper wurde 2 h vor Verwendung mit Mausserum in einer Verdünnung von 1:100 im Verdünnungsmedium bei 4 °C präabsorbiert.

\*\*Teil des En Vision+ System-HRP (DAB) Reaktionssystems

## 2.15 Molekularbiologische Methoden

### 2.15.1 Präparative und analytische Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.15.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

##### 2.15.1.1.1 Transformation von Bakterienzellen

Zur Transformation von Bakterienzellen wurden 50 µl kompetenten Zellen (*E. coli* DH5α, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) 100 ng reine Plasmid-DNA oder 5 bis 10 µl eines Ligationsansatzes zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der DNA in die Bakterienzellen erfolgte durch einen Hitzeschock des Ansatzes bei 42 °C für

45 sek. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gelagert und mit 500 µl S. O.C.-Medium aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C unter leichtem Schwenken wurden 50 µl transformierte Zellen auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und die Platten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

#### **2.15.1.1.2 Plasmidpräparation geringer DNA-Mengen**

Um geringe Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurde eine 4 ml-Übernachtskultur transformierter Bakterien bei 5000xg für 2 min abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und durch die Zugabe von 200 µl Lysepuffer lysiert. Anschließend wurden zelluläre Proteine und genomische DNA mit 200 µl Neutralisierungspuffer gefällt und bei 16000xg für 10 min abzentrifugiert. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA wurde der klare Überstand in 0,7 Vol.-% 99,5 % Isopropanol überführt und bei 16000xg für 20 min pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-50 µl Ampuwa aufgenommen. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit einem Photometer bestimmt und 100 bis 200 ng DNA wurden mit Hilfe einer oder mehrerer Restriktionshydrolysen (siehe 2.15.1.1.4) analysiert.

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

Für die Isolierung großer Mengen von Plasmid-DNA wurde eine 100 ml Übernachtskultur transformierter Bakterien für 10 min bei 10000xg abzentrifugiert. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus dem Bakterien-Pellet erfolgte mit Hilfe des HiPure Plasmid DNA Purification Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers. Anschließend erfolgten die Messung der DNA-Konzentration und eine oder mehrere Restriktionshydrolysen (siehe 2.15.1.1.4) von 100 bis 200 ng aufgereinigter Plasmid-DNA.

#### **2.15.1.1.4 Restriktionshydrolyse**

Die Restriktionshydrolyse von DNA wurde in einem Volumen von 10 bis 50 µl durchgeführt. Pro µg DNA erfolgte die Zugabe von 2 bis 3 U des jeweiligen Enzyms. Bei der simultanen Hydrolyse mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen wurde ein für beide Enzyme optimaler Puffer verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h oder über Nacht bei einer für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Anschließend

folgten die Zugabe von 0,2 Vol.-% Ladebuffer (siehe 2.8) und die Auftrennung der Fragmente auf einem Agarosegel.

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

Die Phenol/Chloroform-Aufreinigung ermöglicht die Trennung der hydrophilen Nukleinsäuren von hydrophoben Protein- und Membranbestandteilen. Dazu wurden die Proben mit gleichem Volumen gepufferten Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und kräftig geschüttelt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 16000xg erfolgte eine Phasentrennung, wodurch die Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase verblieben. Die obere Phase wurde in 1 Vol.-% Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) überführt und kräftig geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 16000xg wurde die obere wässrige Phase in 3 Vol.-% 96 % Ethanol überführt und abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in Ampuwa aufgenommen.

### **2.15.1.3 Isolierung von genomischer DNA**

#### **2.15.1.3.1 Isolierung von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen**

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und pro Loch einer 6-Loch-Platte in 1 ml STE-Puffer mit 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) aufgenommen. Die abgelösten Zellen wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Präzipitation der DNA wurde 1 ml 99,5 % Isopropanol zugefügt und die DNA durch Zentrifugation bei 16000xg für 30 min pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in Ampuwa aufgenommen. Mit einem Photometer erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration. Für die PCR wurden 10 bis 100 ng DNA als Matrize eingesetzt.

#### **2.15.1.3.2 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe für Genotypisierungen**

Gewebeproben wurden über Nacht bei 55 °C in 250 µl STE-Puffer mit 12,5 µl Proteinase K (10 mg/ml) inkubiert. Feste Bestandteile wurden abzentrifugiert und der klare Überstand in 3 Vol.-% 99 % Ethanol überführt. Zur Präzipitation der DNA wurden die Reaktionsgefäße kräftig geschüttelt und für 10 min bei 16000xg zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in Ampuwa aufgenommen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am Photometer.

### **2.15.1.3.3 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe für Southern Blot-Analysen**

Gewebeproben wurden über Nacht bei 55 °C in 500 µl STE-Puffer mit 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) inkubiert. Zur Isolierung hochreiner genomischer DNA folgte eine Phenol/Chloroform-Aufreinigung.

### **2.15.1.4 Isolierung von Gesamt-RNA**

#### **2.15.1.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischer Zellkultur**

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch die Zugabe von 1 ml TriFast Reagent lysiert. Das Lysat wurden in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 60 sek homogenisiert (Vortexer). Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben, der Ansatz kräftig gemischt (Vortexer) und nochmals für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte bei 4000xg für 40 min bei 4 °C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß mit 1 ml 99,5 % Isopropanol überführt und die RNA durch eine Inkubation des Ansatzes bei -20 °C für 10 min bis über Nacht präzipitiert. Danach wurde die RNA bei 16000xg für 35 min abzentrifugiert und das RNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl RNase-freiem destilliertem Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde am Photometer bestimmt.

#### **2.15.1.4.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe**

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe mit TriFast (Peqlab, Erlangen) wurde die Gewebeprobe mit einem Skalpell zerkleinert und in TriFast überführt. Anschließend wurde das Gewebe für 60 sek auf Eis mit einem Homogenisator homogenisiert, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 400 µl Chloroform versetzt. Die folgenden Schritte sind unter 2.15.1.4.1 beschrieben. Für die Isolierung von RNA für Mikroarray-Analysen wurde anschließend eine zusätzliche Aufreinigung mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

RNA aus Hautproben zur Durchführung von qRT-PCR wurde mit Hilfe des RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Anschließend folgte eine zusätzliche Behandlung mit der in diesem Kit enthaltenen DNase I und dem zugehörigen Puffer (RDD-Puffer). Dazu wurden 20 µl Eluat mit 10 % (v/v) RDD-Puffer und 2,7 U DNase I versetzt, für 1 h bei 37 °C und danach für 15 min bei 75 °C inkubiert.

Die RNA wurde mit 99% Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt, bei 16000xg für 35 min abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 20 µl RNase-freiem destilliertem Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration am Photometer bestimmt.

### 2.15.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers. Anhand der folgenden Formel wurde die Konzentration berechnet.

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

**Formel zur Berechnung von Nukleinsäure-Konzentrationen.** Abkürzungen: *c* gemessene Konzentration in µg/µl; *f*, Verdünnungsfaktor; *C*, nukleinsäurespezifischer Koeffizient (0,05 µg/µl für DNA; 0,04 µg/µl für RNA).

Zur Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden außerdem die OD bei 230 nm und 280 nm gemessen. Protein- und Salzkontaminationen können durch die Bildung der Quotienten von  $OD_{260/280}$  und  $OD_{260/230}$  ermittelt werden. Im Folgenden sind diese Quotienten für reine Nukleinsäurelösungen angegeben:

$$OD_{260/280} \text{ (DNA)} > 1,8$$

$$OD_{260/230} \text{ (DNA)} = 2$$

$$OD_{260/280} \text{ (RNA)} > 2$$

$$OD_{260/230} \text{ (RNA)} = 2$$

### 2.15.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA in Reaktionsvolumina von 10 µl bis 20 µl pro Ansatz wurde mit folgenden Reagenzien und Endkonzentrationen durchgeführt:

10 - 100 ng	Matrizen-DNA
0,5 µM	sequenzspezifisches Vorwärts-DNA-Oligonukleotid
0,5 µM	sequenzspezifisches Rückwärts-DNA-Oligonukleotid
0,2 mM	dNTP-Mix
1 % (v/v)	N.N.-Dimethylsulfoxid (DMSO)
10 % (v/v)	Cresol
1x	Polymerase-Puffer
0,1 U	Polymerase

Die PCR-Bedingungen variierten abhängig von den verwendeten DNA-Oligonukleotiden. Dem ersten Denaturierungsschritt für 5 bis 10 min bei 95 °C folgten 25 bis 35 Zyklen

bestehend aus je einem Denaturierungsschritt (95 °C für 30 bis 60 sek), je einem DNA-Oligonukleotid-Anlagerungsschritt bei 55 bis 68 °C (30 sek bis 2 min) und je einem Elongationsschritt bei 68 oder 72 °C (1 bis 2 min). Zu Programmende erfolgte ein Elongationsschritt für 10 min bei 72 °C. Mittels Agarosegelelektrophorese wurde der gesamte Ansatz analysiert.

### **2.15.1.6.1 Polymerase-Kettenreaktion an cDNA**

#### **2.15.1.6.1.1 Reverse Transkription**

Die reverse Transkription von RNA in cDNA erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl. Zwischen 1 und 4 µg RNA wurden mit 250 ng Hexameren versetzt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 5x First Strand Buffer Mix (Endkonzentration 1x), 100 mM DTT (Endkonzentration 10 mM) und dNTPs (Endkonzentration 0,5 mM) erfolgten 10 min Inkubation bei 25 °C und 2 min bei 42 °C. Den cDNA-Proben wurde jeweils 1 µl reverse Transkriptase SuperScript II zugefügt (200 U/µl), die reverse Transkription erfolgte für 60 min bei 42 °C. Anschließend wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 70 °C für 10 min abgestoppt. Zur ungefähren Kalkulation der cDNA-Konzentration wurde angenommen, dass die Effizienz der reversen Transkription von RNA bei ca. 50 % liegt.

#### **2.15.1.6.2 qRT-PCR**

Um Expressionsniveaus eines Gens an cDNA oder die Effizienz nach Cre-Rekombinase-vermittelter Rekombination von gDNA in unterschiedlichen Proben vergleichen zu können, erfolgte eine relative Quantifizierung mittels quantitativer *real-time* PCR. Sowohl TaqMan-Analysen mit fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Sonden als auch die qRT-PCR mit SYBR Green wurden durchgeführt. Da die ermittelten Daten anhand der Standardkurvenmethode errechnet wurden, musste für jede Messung eine entsprechende Standardkurve mit cDNA oder gDNA als Matrize erstellt werden. Für die Erstellung sämtlicher Standardkurven wurde jeweils eine serielle 1:5 Verdünnungsreihe hergestellt und die einzelnen Verdünnungsstufen (S1-S6) amplifiziert. Zur Normalisierung wurde ein geeignetes endogenes Kontrollgen vermessen. Für sämtliche im Folgenden beschriebenen qRT-PCR-Analysen wurde das ABI Prism 7900HT Sequence Detection System verwendet.

### 2.15.1.6.2.1 Durchführung und Aufbau der TaqMan-Analyse zur Quantifizierung der Rekombinationseffizienz nach Aktivierung der Cre-Rekombinase

Die Rekombinationseffizienz des *Ptch*<sup>fllox</sup>-Lokus in *Ptch*<sup>fllox/fllox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Fibroblasten (siehe 2.10.2) nach Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen wurde anhand einer TaqMan-Analyse bestimmt. Dazu wurde jede gDNA-Probe in drei Replikaten je Lauf in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in PCR-384-Loch-Platten (TaqMan-Platten, Applied Biosystems, Darmstadt) vermessen.

Für die Assays zur Quantifizierung und zum Nachweis der *Ptch*<sup>fllox</sup>- und *Ptch*<sup>del</sup>-Allele und des Gens *Pelota* (zur Erstellung der Standardkurve) wurden dieselben PCR-Konditionen eingesetzt. Nach der Aktivierung der DNA-Polymerase für 10 min bei 95 °C folgten 40 Zyklen, jeweils bestehend aus einer Denaturierung bei 95 °C für 15 sek und einem 60 sek langen Anlagerungs-/Elongationsschritt bei 60 °C.

Für die Amplifikation der *Ptch*<sup>fllox</sup>- und *Ptch*<sup>del</sup>-Allele wurden 20 ng gDNA als Matrize eingesetzt. Dazu wurde das QuantiTect PCR Probe Kit nach Herstellerangaben und die unter 2.11.5.2 angegebenen Oligonukleotide und fluoreszenzmarkierten Sonden verwendet.

Zur Normalisierung wurde für jede gDNA-Probe das Haushaltsgen *Pelota* in drei Replikaten pro Lauf vermessen. Als Matrize diente für jede Probe 20 ng gDNA. Für die Erstellung einer Standardkurve bei der Analyse von *Pelota* erfolgte die Amplifikation der Verdünnungsstufen S1-S6, wobei als S1 200 ng gDNA einer Schwanzbiopsie eingesetzt wurden. Dabei wurde das QuantiTect PCR Probe Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben und die unter 2.11.5.2 angegebenen Oligonukleotide und Sonden verwendet.

### 2.15.1.6.2.2 Durchführung und Aufbau der gebrauchsfertigen TaqMan Assays

Anhand von TaqMan-Analysen wurde das Expressionsniveau mehrerer Zielgene (siehe 2.12) an cDNA aus dem Skelettmuskel von B6- oder BALB-Mäusen bestimmt. Die Bestimmung des Expressionsniveaus jedes Gens erfolgte für jede cDNA-Probe in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in PCR-96-Loch-Platten (TaqMan-Platten, Applied Biosystems, Darmstadt) in zwei Replikaten je Lauf. Für die Amplifikation des Zielgens wurden je nach dem Expressionsniveau des Gens in Skelettmuskel 20 bis 200 ng cDNA als Matrize eingesetzt. Die in Tabelle 10 genannten Gen-Expressions Assays und das Reaktionssystem QuantiTect PCR Probe Kit wurden nach Herstellerangaben verwendet. Für die Erstellung einer Standardkurve bei der Messung jedes Gens wurden die im Folgenden genannten Verdünnungsstufen S1 und Matrizen verwendet.

analysiertes Gentranskript	Matrize für S1 Verdünnungsstufe	eingesetzte Menge für S1
<i>Apoptosis inhibitor 5</i>	Nieren-cDNA (murin)	100 ng
<i>Catenin src</i>	Nieren-cDNA (murin)	100 ng
<i>Ets homologous factor</i>	Nieren-cDNA (murin)	20 ng
<i>Midkine</i>	E9,5-cDNA (murin)	200 ng
<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, J</i>	Nieren-cDNA (murin)	100 ng
<i>Tnf receptor-associated factor 6</i>	Nieren-cDNA (murin)	100 ng
<i>Wilms tumor homolog</i>	Nieren-cDNA (murin)	100 ng
<i>ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 2</i>	Nieren-cDNA (murin)	100 ng

Die PCR-Konditionen sind unter 2.15.1.6.2.1 angegeben. Zur Normalisierung wurde für jede cDNA-Probe das Haushaltsgen *18S rRNA* in zwei Replikaten pro Lauf vermessen, dabei dienten jeweils 3,2 pg als Matrize. Als Standard wurde murine Nieren-cDNA in S1-S6 Verdünnungsstufen amplifiziert, wobei für die S1 Verdünnungsstufe 32 pg verwendet wurden. Das gebrauchsfertige Reaktionssystem TaqMan Ribosomal RNA Control Reagent, VIC Probe (Applied Biosystems, Darmstadt) wurde nach Herstellerangaben verwendet, die PCR-Konditionen sind unter 2.15.1.6.2.1 genannt.

### 2.15.1.6.2.3 Durchführung und Aufbau der qRT-PCR mit SYBR Green

Die qRT-PCR mit SYBR Green diente der Bestimmung des Expressionsniveaus verschiedener Gene in Experimenten mit Fibroblasten oder in Gewebeproben von Mäusen. Dazu erfolgte die Messung des jeweiligen Gens in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in PCR-384-Loch-Platten (TaqMan-Platten, Applied Biosystems, Darmstadt) in drei Replikaten für jede cDNA-Probe. Als Matrize wurden für die Amplifikation des Zielgens bei Zellkulturexperimenten 5 ng cDNA und bei Gewebeproben 50 ng cDNA eingesetzt. In Tabelle 7 sind die jeweils verwendeten Oligonukleotide und Temperaturen für den Anlagerungsschritt angegeben.

Für die Erstellung einer Standardkurve für jede Analyse wurden die folgenden Verdünnungsstufen und Matrizen verwendet:



analysiertes Gentranskript	Matrize für S1 Verdünnungsstufe	eingesetzte Menge für S1
<i>Gli1</i>	murine embryonale cDNA 12,5 Tage nach der Befruchtung	40 ng
<i>Gli2</i>	murine embryonale cDNA 12,5 Tage nach der Befruchtung	40 ng
<i>Gli3</i>	murine embryonale cDNA 12,5 Tage nach der Befruchtung	40 ng
<i>K10</i>	murine Basalzellkarzinom-cDNA	10 ng
<i>Ptch</i>	murine embryonale cDNA 12,5 Tage nach der Befruchtung	40 ng
<i>wt Ptch</i>	murine embryonale cDNA 12,5 Tage nach der Befruchtung	40 ng
<i>Ptch<sup>del</sup></i>	RMS einer <i>Ptch<sup>del/+</sup></i> Maus	40 ng

Das Reaktionssystem QuantiTect SYBR Green PCR wurde nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde die DNA-Polymerase für 15 min bei 95 °C aktiviert, anschließend folgten 40 Zyklen bestehend aus einer 15 sek langen Denaturierung, einem Anlagerungsschritt bei 58 °C oder 60 °C für 30 sek und einem Elongationsschritt bei 72 °C für 30 sek.

Für die Normalisierung des Expressionsniveaus von Genen wurde die Expression von *18S rRNA* jeder untersuchten cDNA-Probe in drei Replikaten pro Lauf gemessen. Dabei wurden jeweils 3,3 bis 6,3 pg cDNA (je nach Assay) als Matrize eingesetzt. Als Standard diente murine embryonale cDNA 12,5 Tage nach der Befruchtung mit 250 pg als Verdünnungsstufe S1. Dazu wurden die in Tabelle 7 genannten sequenzspezifischen DNA-Oligonukleotide und das Reaktionssystem QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben benutzt. Die PCR-Konditionen sind unter 2.15.1.6.2.3 genannt, wobei der Anlagerungsschritt bei 60 °C erfolgte.

#### 2.15.1.6.2.4 Auswertung nach der Standardkurvenmethode

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mit den Programmen SDS2.1 (Applied Biosystems, Darmstadt) und Microsoft EXCEL (Microsoft Co., Redmond, USA). Die Standardkurve wurde durch eine serielle 1:5 Verdünnung hergestellt. Durch die 5-fache Verdünnung wird der Schwellenwert, bei dem sich das Fluoreszenzsignal vom Reaktionshintergrund abhebt, jeweils 2,3 Zyklen später erreicht. Eine Standardkurve wurde anhand der Auftragung des Logarithmus der jeweils eingesetzten cDNA-Mengen gegen den Schnittpunkt der Amplifikationskurve mit dem Schwellenwert (Ct-Wert) erstellt. Der Schnittpunkt mit der Amplifikationskurve musste in der exponentiellen Phase des Reaktionsverlaufes liegen. Dabei folgte die resultierende Standardkurve der Gleichung  $y = mx + b$ . Anhand dieser Gleichung wurde die Produktmenge jeder Probe ermittelt. Für eine relative Quantifizierung der Proben untereinander wurden die Proben auf die endogene Kontrolle normalisiert, d. h. auf das Gen *Pelota* oder die Expression von *18S rRNA*. So wurden unterschiedliche Ausgangsmengen der Matrize zwischen

verschiedenen Proben ausgeglichen. Für jede Probe erfolgte die Normalisierung durch die Bildung des Quotienten der Produktmengen Zielgen/endogene Kontrolle. Danach wurde die Probe mit dem niedrigsten Quotienten als sogenannter Kalibrator definiert und gleich 1 gesetzt.

#### **2.15.1.7 Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wurden Gele von 0,7 bis 4 % (w/v) Agaroseanteil in TBE mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Falls die Proben keine Cresollösung (siehe 2.8) enthielten, wurde ihnen vor dem Beladen des Gels 0,2 Vol.-% Ladepuffer zugefügt. Die Auftrennung der Fragmente in einer mit TBE gefüllten Gelelektrophoresekammer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 30 bis 100 V. Ein UV-Transilluminator (Intas, Göttingen) wurde für die Dokumentation verwendet. Durch das gleichzeitige Mitführen eines DNA Längenstandards konnten die Größen und durch vergleichendes Abschätzen mit dem Standard die Konzentration der DNA-Fragmente ermittelt werden.

#### **2.15.1.8 Southern Blot-Analyse zur Detektion der homologen Rekombination des Vektors *pPtch<sup>fllox</sup>***

10 µg genomische DNA wurden bei 37 °C mit einer entsprechenden Restriktionsendonuklease über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 Vol.-% Ladepuffer wurden die DNA-Fragmente über Nacht bei 60-80 V in einem 1 bis 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Nach Dokumentation des Gels neben einem Lineal unter UV-Licht wurde das Gel für 30 min in einer 0,25 N HCl-Lösung geschwenkt. Anschließend wurde es kurz mit MilliQ Wasser gespült, für 30 min in Denaturierungspuffer inkubiert und erneut in MilliQ Wasser geschwenkt. Danach wurde das Gel für 15 min in 20x SSC (pH 7,0) inkubiert. Eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran wurde in 20x SSC (pH 7,0) äquilibriert, luftblasenfrei auf das Gel gelegt und nach Herstellerangaben in ein Blotsystem (Whatman Inc., New Jersey, USA) eingebaut. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurde die Membran getrocknet und die DNA bei 100 mJ/cm<sup>2</sup> im UV-Crosslinker kovalent auf der Membran gebunden. Zusätzlich wurde die Membran bei 80 °C für 2 h im Hybridisierungsöfen gebacken. Die Vorhybridisierung erfolgte in einer Hybridisierungsröhre bei 65 °C im Hybridisierungsöfen für 2 h mit 5 ml Rapid-Hyb Puffer

und 200 µg/ml denaturierter Lachsspermien-DNA (Stratagene, Amsterdam Zuidoost, Niederlande).

Der Hybridisierungsloкус der verwendeten Sonde ist in Abbildung 10 dargestellt. Die 1,2 kb Sonde wurde durch Restriktionshydrolyse des Plasmids *pGEM-T KO#13* mit *EcoRI* hergestellt. Das 1,2 kb DNA-Fragment wurde durch zweifache Agarosegelelektion aufgereinigt und durch Agarosegelelektrophorese 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-dCTP nach Herstellerangaben radioaktiv markiert. Danach wurde die radioaktiv markierte Sonde nach Herstellerangaben mit MicroSpin G-50 Säulchen aufgereinigt. Die aufgereinigte Sonden-DNA wurde 5 min bei 99 °C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Nach dem Abgießen der Vorhybridisierungslösung aus der Hybridisierungsröhre wurden erneut 5 ml 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 abgekippt und die Membran bei 65 °C zunächst mit hoch- und anschließend ggfs. mehrmals mit niedrig-stringentem Waschpuffer für 20 min gewaschen, bis die Restaktivität der Membran 5 Bq/cm<sup>2</sup> nicht überstieg. 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 und anschließend entwickelt.

#### **2.15.1.9 DNA-Sequenzanalyse**

DNA-Sequenzanalysen wurden sowohl mit aufgereinigten PCR-Produkten als auch mit PCR-Produkten durchgeführt, die in das Plasmid *pGEM-Teasy* kloniert wurden (siehe 2.15.1.9.2). Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit nach Herstellerangaben. Anschließend wurden die Proben mit Sephadexg50 in einer MAHV N45-Platte aufgereinigt. Zur Durchführung der Sequenzanalysen wurden der ABI 3100 Genetic Analyser und das zugehörige Programm (ABI 3100 Genetic Analyser Data Collection 1.0, Applied Biosystems, Darmstadt) benutzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Sequencher (Applied Biosystems, Darmstadt).

### **2.15.1.9.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Aufzureinigende DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Für die Aufreinigung wurde das Reaktionssystem Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf, Hamburg) nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.15.1.9.2 Klonierung von PCR-Produkten**

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des pGEM-Teasy TA-Cloning Kits (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Inkubation der Ligationsansätze erfolgte bei 4 °C über Nacht.

### **2.15.1.10 Mikroarray-Analyse**

Mikroarray-Analysen wurden zur Untersuchung des Expressionsprofils von murinen Tumoren (RMS) eingesetzt. RNA wurde wie unter 2.15.1.4.2 beschrieben isoliert. Für die Markierungsreaktion zur Herstellung von Biotin-markierter cRNA wurde das Reaktionssystem One-Cycle Target Labeling and Control Reagents (Affymetrix, High Wycombe, UK) nach Herstellerangaben verwendet. Mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Waldbronn) wurden die RNA-Extrakte auf Integrität überprüft und quantifiziert. Dazu wurde das RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies, Waldbronn) wie vom Hersteller beschrieben benutzt. Die Durchführung der Mikroarray-Analyse mit Affymetrix 430A Mouse Gene Chips (Affymetrix, High Wycombe, UK) erfolgte durch das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD GmbH, Berlin).

## **2.15.2 Histologische Techniken**

### **2.15.2.1 Einbettung von Geweben**

Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurde das Gewebematerial in Cryoblock Einbettmedium auf Trockeneis eingebettet. Am Kryostat wurden Gewebeschnitte von 5 bis 10 µm Dicke angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die zu analysierende Gewebe routinemäßig für zwei Wochen bei 4 °C in Paraformaldehyd fixiert. Vor der Paraffineinbettung wurden die Gewebe und Organe mit Hilfe eines Gewebeeinbett- und

-entwässerungsautomaten entwässert und anschließend manuell in Paraffin eingegossen (Paraffinspender und Ausgießstation Tissue Block Dispenser PAG 12). Paraffinschnitte von ca. 3 µm Dicke wurden am Schlittenmikrotom angefertigt und auf Superfrost Objektträger aufgezogen. Für HE-Färbungen wurden die Paraffinschnitte für 20 min bei 80 °C inkubiert, für immunhistologische Antikörperfärbungen und *in situ*-Hybridisierungen über Nacht bei 37 °C getrocknet.

#### **2.15.2.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung**

Vor einer Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung wurden Paraffinschnitte 2x 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanol-Reihe rehydriert. Getrocknete Kryoschnitte konnten ohne zusätzliche Vorbehandlung verwendet werden. Die Objektträger wurden 8 min in Hämatoxylin-Lösung inkubiert und 5 min in warmem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte 5 min in Eosin-Lösung inkubiert und in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert. Anschließend wurden die Präparate in Xylol überführt und mit Pertex Montagemedium eingedeckt.

#### **2.15.2.3 X-Gal-Färbung an Kryoschnitten**

Die Gewebeschnitte wurden zunächst in 0,2 % Glutaraldehyd /PBS für 10 min auf Eis gelagert und anschließend 3x 10 min in LacZ-Puffer inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte in LacZ-Färbepuffer über Nacht bei 30 °C. Danach wurden die Präparate mit einem DAPI-haltigen (4'6-Diamino-2-phenylindiol) Montagemedium (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) oder Immuno Mount (Shandon Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) eingedeckt.

#### **2.15.2.4 Immunhistologische Antikörperfärbungen**

Zur Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte für 2x 10 min in Xylol gestellt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Demaskierung der Antigene erfolgte durch unterschiedliche Vorbehandlungen, jeweils abhängig vom verwendeten Primärantikörper, siehe Tabelle 14. Danach wurden die Gewebeschnitte in TBS oder TBS/0,1 % Triton X-100 gespült und unspezifische Bindungsstellen mit 0,2 % I-Block/PBS für 15 min blockiert. Der Primärantikörper wurde für 90 min auf die Gewebeschnitte gegeben, das jeweilige Verdünnungsmedium ist Tabelle 14 zu entnehmen. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS oder TBS/0,1 % Triton X-100 gut gespült und der Sekundär-Antikörper für 60 min auf den Schnitten inkubiert. Alle

sekundären Antikörper waren AP-konjugiert und wurden mit Neu-Fuchsin Chromogen nachgewiesen. Nur für die Detektion des Ki-67-Primärantikörpers wurden Reagenzien des En Vision+ System-HRP (DAB) Reaktionssystems (Dako GmbH, Hamburg) verwendet.

Um Kreuzreaktionen des sekundären Antikörpers beim Gebrauch von Primärantikörpern aus der Ratte auszuschließen, wurde der Sekundärantikörper vor der Verwendung für 2 h mit Mausserum (siehe 2.15.4.1.3) in einer Verdünnung von 1:100 bei 4 °C präabsorbiert.

Nach gründlichem Spülen der Schnitte in TBS oder TBS/0,1 % Triton X-100 erfolgte die Farbreaktion für 10 bis 30 min in Neu-Fuchsin Chromogen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in H<sub>2</sub>O überführt, kurz mit Hämalaun gegengefärbt und mit Immuno Mount eingedeckt.

**Tabelle 14: Auflistung der Vorbehandlung der Gewebsschnitte und verwendete Puffer für Primärantikörper.** Spalte 1: Bezeichnung des Antigens; Spalte 2: Antigendemaskierung; Spalte 3: Puffer für den Primärantikörper

1	2	3		
β-Catenin	TE-Puffer	pH 9,0	16 min 100 °C	0,02 % I-Block in TBS
B220	Citratpuffer	pH 6,0	16 min 100 °C	TBS
Bcl-2	0,2 M Borsäure	pH 5,1	30 min 58 °C	0,02 % I-Block in TBS
Caspase 3	Citratpuffer	pH 6,0	16 min 100 °C	0,02 % I-Block in TBS
CD3	Citratpuffer	pH 6,0	16 min 100 °C	TBS
F4/80	entfällt			0,02 % I-Block in TBS
Gli1	0,2 M Borsäure	pH 5,1	30 min 58 °C	0,02 % I-Block in TBS
K1	0,2 M Borsäure	pH 5,1	30 min 58 °C	0,02 % I-Block in TBS
K10	4,9 U/ml Alkaline Protease		10 min 37 °C	0,2 % I-Block in TBS
K17	Citratpuffer	pH 3,0	30 min 37 °C	0,1 % I-Block in TBS
Ki-67	Citratpuffer	pH 6,0	16 min 100 °C	TBS
p53	TE-Puffer	pH 9,0	16 min 100 °C	PBS
p63	Citratpuffer	pH 6,0	16 min 100 °C	0,02 % I-Block in TBS

### 2.15.2.5 *In situ*-Hybridisierung

Zum Nachweis von mRNA-Transkripten in Gewebeschnitten wurde die Methode der *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Mit Ausnahme von 0,1 M Triethanolamin pH 8,0, STE-*in situ*-Puffer, MBSTL-Puffer und NTMTL-Puffer wurden sämtliche für die Herstellung der Sonden (siehe 2.8) und die Durchführung benötigten Lösungen und Puffer vor der Verwendung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, um eine RNA-Degradation zu verhindern. Dazu wurden die Lösungen/Puffer mit 0,03 % DEPC

versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur DEPC-Inaktivierung autoklaviert.

### 2.15.2.5.1 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden für *in situ*-Hybridisierung

Zur Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden zur Detektion von *Gli2* mRNA wurden 10 µg des Plasmids *pmGli2* linearisiert. Als Restriktionsenzyme wurden für die antisense-Sonde HindII und für die sense-Sonde BamHI verwendet. Dazu wurde der Reaktionsansatz für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die DNA mit 99 % Ethanol gefällt. Die Fällung erfolgte für mindestens 30 min bei -20 °C, danach wurde die DNA bei 16000xg für 30 min abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Quantifizierung der DNA-Menge wurden 2 µl mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch vergleichendes Abschätzen mit dem Größenstandard die Konzentration ermittelt.

Für die Markierungsreaktion wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

1 µg	linearisiertes Plasmid
1x	DIG RNA Labeling Mix
1x	Transcription Buffer
10 mM	DTT
1 U	RNA Polymerase (T3 zur Herstellung der antisense-Sonde bzw. T7 zur Herstellung der sense-Sonde)

Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit

1x	DIG RNA Labeling Mix
1x	Transcription Buffer
10 mM	DTT
1 U	RNA Polymerase (T3 oder T7)

für 1 h wiederholt.

Dann wurde die Sonde mit 99 % Ethanol, 5 mM EDTA, 130 mM LiCl bei -20 °C für mindestens 30 min präzipitiert, bei 16000xg für 30 min abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 110 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 99 % Ethanol, 130 mM LiCl, präzipitiert. Die Sonde wurde bei 16000xg für 30 min abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet in 25 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöst.

Zur Überprüfung der Qualität der hergestellten Sonde wurden 1 µl der Sondenlösung sowie ein 1 µl Aliquot, das mit RNaseA verdaut wurde, auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese darf nur bei der unbehandelten Sonde eine Bande im Gel sichtbar sein.

Des Weiteren wurde ein so genannter Dot Blot durchgeführt. Dafür wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe der Sonde in 6x SSC (pH 6,4) hergestellt. 1 µl der 1:10 Verdünnung und jeweils 1 µl der fünf weiteren Verdünnungsstufen wurden auf eine Nitrocellulosemembran pipettiert und mittels Cross-Linker bei 125 mJ auf der Membran fixiert. Anschließend wurden überschüssige Bindungsstellen der Membran für 5 min mit 55 °C warmen 4 % BSA in NT-Puffer blockiert. Die Membran wurde kurz in NT-Puffer gewaschen und für 7 min in die Antikörperlösung (1:5000 anti-Digoxigenin Fab Fragments/AP in NT-Puffer) gelegt. Danach wurde die Membran dreimal kurz in NT-Puffer gewaschen und 3 min mit NTM-Puffer auf einen pH-Wert von 9,5 umgepuffert. Zur Färbung wurde BM-Purple (Roche) auf die Membran gegeben und für 10-20 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde die Membran kräftig mit MilliQ Wasser gespült.

#### **2.15.2.5.2 Durchführung der *in situ*-Hybridisierung**

Für diese Methode wurden auf Superfrost Objektträger aufgezoogene Paraffinschnitte verwendet, die nach Anfertigung über Nacht bei 37 °C getrocknet wurden (siehe 2.15.2.1). Nach einer Inkubation der Objektträger bei 65 °C für 30 min wurden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Es folgten 5 min Inkubation in PBS und 0,83 % NaCl und eine Fixierung in 4 % PFA/PBS für 20 min auf Eis. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte mit Proteinase K-Puffer für 7,5 min permeabilisiert. Die Schnitte wurden kurz in PBS geschwenkt, erneut in 4 % PFA/PBS für 5 min auf Eis fixiert und in 0,1 M Triethanolamin, pH 8,0, überführt. Nach Zugabe von 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid wurden die Schnitte für 10 min inkubiert, mit PBS und 0,83 % NaCl gewaschen und schließlich mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet und am selben Tag für die Hybridisierung verwendet. Die sense- und antisense-Sonden wurden 1:1000 in Hybridisierungspuffer verdünnt, für 2 min bei 80 °C denaturiert und auf Eis gestellt. Zu 1 ml Hybridisierungspuffer wurden 50 µg denaturierte Lachsspermien-DNA zugegeben und gut vermischt. Der Hybridisierungspuffer wurde auf das Gewebe pipettiert und luftblasenfrei mit einem sauberen Deckgläschen abgedeckt. Für die Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte in eine feuchte Kammer mit 50 % Formamid, 5x SSC überführt und über Nacht bei 59 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in eine Küvette mit 5x SSC gestellt, um die Deckgläschen zu entfernen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte für 30 min in 5x SSC (pH 6,4) bei 55 °C inkubiert und für 30 min in 50 % Formamid, 2x SSC (pH 6,4) bei 63 °C gewaschen. Es folgten ein Waschschrift bei Raumtemperatur und 3 Waschschrift bei 37 °C in STE-



*in situ*-Puffer für jeweils 10 min. Nach einer Inkubation mit 8 ng/ml RNase A in STE-*in situ*-Puffer für 30 min bei 37 °C und 15 min Spülen mit STE-*in situ*-Puffer bei 37 °C erfolgte eine erneute Inkubation für 30 min in 50 % Formamid, 2x SSC (pH 6,4) bei 63 °C. Dann wurden die Objektträger für 15 min bei RT in 2x SSC (pH 6,4) und anschließend für 10 min bei RT in NT-Puffer überführt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift eingekreist und 3x 5 min mit MBSTL-Puffer gespült. Danach wurde 0,2 % I-Block/PBS zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf die Gewebeproben gegeben und die Objektträger für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anti-Digoxigenin Fab fragments/AP wurden 1:500 in 0,02 % I-Block in MBSTL-Puffer verdünnt und auf die Gewebeschnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Am folgenden Tag wurden die Objektträger 6x für 20 min bei Raumtemperatur in MBSTL und 3x 5 min in NTMLT-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in eine feuchte Kammer überführt und mit BM-Purple (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bedeckt. Die Objektträger wurden dann bei Raumtemperatur solange im Dunkeln gelagert, bis eine ausreichende Signalintensität erreicht wurde (meist für mehrere Tage). Dabei wurde täglich frisches BM-Purple auf die Gewebeschnitte gegeben. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurden die Objektträger in Stop-Puffer und danach in PBS überführt. Zuletzt wurden sie für 1 h in 4 % PFA/0,2 % Glutaraldehyd in PBS inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Glycergel (Dako GmbH, Hamburg) eingedeckt.

### **2.15.3 Zellbiologische Methoden**

#### **2.15.3.1 Zellkultur eukaryontischer Zellen**

Eukaryontische Zellen wurden 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 kultiviert. Die verwendeten Medien sind unter 2.10.2 angegeben. Abweichende Serumkonzentrationen bzw. Antibiotika bei einzelnen Experimenten sind unter 2.15.3 und bei der Beschreibung der Experimente angegeben.

Die verwendeten eukaryontischen Zelllinien und die Kulturbedingungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Kommerziell erhältliche Zelllinien wurden maximal 20x, selbst hergestellte maximal 30x passagiert.

### 2.15.3.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen mit PBS 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 Abpipettieren eine Einzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden bei 300xg pelletiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und in 10 ml Medium mit 10 % DMSO aufgenommen. Die durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren hergestellte Einzellsuspension wurde zu je 1 ml in Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert. Das Einfrieren der Zelllinien erfolgte zunächst für 1 bis 2 h bei -20 °C und anschließend für 24 h bei -80 °C, bevor sie zur Dauerlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zur Revitalisierung von Zelllinien wurde ein Zellaliquot bei 37 °C aufgetaut und die Zellen in eine Zellkulturschale mit Medium überführt.

### 2.15.3.3 Isolierung und Kultivierung adulter muriner Fibroblasten

Zur Gewinnung von *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>- und *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Fibroblasten (siehe Tabelle 1) wurden zwei 5 Monate alte Mäuse mit den Genotypen *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup> bzw. *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>-/-</sup> mittels CO<sub>2</sub>-Narkose getötet. Dann wurde unter der Sterilbank die Haut vorsichtig vom Rumpf abgetrennt. Mit der behaarten Seite nach unten wurde das Hautstück fixiert, um das Abschaben von Zellen der Dermis mit einer Skalpellklinge zu ermöglichen. Das so gewonnene Gewebe wurde in sterilfiltriertes DMEM mit 3 % PS und 0,25 % Collagenase überführt und für 2 bis 3 h bei 30 °C leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 300xg für 6 min abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml DMEM/10 % FCS/3 % PS auf einer kleinen Petrischale ausplattiert. Die weitere Kultivierung nach der ersten Passage erfolgte mit DMEM/10 % FCS/1 % PS.

### 2.15.3.4 Aktivierung der Cre-Rekombinase in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Zellen durch Tamoxifen

Für die Aktivierung der Cre-Rekombinase in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Zellen wurde 10 µM Tamoxifen (Stammlösung 100 mM in DMSO) ins Kulturmedium gegeben. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,01 % (v/v) DMSO in Medium. Genauere Angaben zur Stimulationsdauer sind in der Beschreibung der jeweiligen Experimente angegeben.

### **2.15.3.5 Herstellung von Shh-konditioniertem Medium**

Hek293 Shh-Zellen wurden in DMEM/10 % FCS/1 % PS/0,4 mg/ml G418 kultiviert. Bei 70 % Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend DMEM/2 % FCS/1 % PS ohne G418 zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgezogen, sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Zur Herstellung von Kontrollmedium ohne Shh dienten Hek293-Zellen, die entsprechend behandelt wurden, allerdings erfolgte bei diesen Zellen die Kultivierung stets ohne den Zusatz von G418.

### **2.15.3.6 Stimulation des Hh/Ptch-Signalweges durch konditioniertes Shh Medium**

Für die Stimulation des Hh/Ptch-Signalweges wurde durch Hek293 Shh-Zellen konditioniertes Medium verwendet. Dazu wurde das konditionierte Medium 1:1 mit DMEM/0,5 % FCS/1 % PS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Als Kontrollmedium wurde konditioniertes Medium von Hek293-Zellen benutzt. Genauere Angaben zur Stimulationsdauer der Zielzellen durch die konditionierten Medien erfolgen in der Beschreibung der jeweiligen Experimente.

### **2.15.3.7 Blockade des Hh/Ptch-Signalweges durch Cyclopamin**

Für eine spezifische Blockade des Hh/Ptch-Signalweges wurde das Alkaloid Cyclopamin verwendet. Cyclopamin bzw. das inaktive Strukturanalogon Tomatidin wurden dem Medium zugefügt. Dabei betrug die maximal eingesetzte Konzentration 5 µM. Um Lösungsmittelleffekte auszuschließen, wurden Zellen mit 0,5 % (v/v) Ethanol in Medium behandelt. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Stimulationsdauer 72 h, wobei die Zellen nach 24 und 48 h mit PBS gewaschen und erneut Cyclopamin, Tomatidin oder Ethanol zum Medium zugegeben wurden.

### **2.15.3.8 Bestimmung der Zellproliferationsrate mittels Inkorporation von 5-Bromo-2-Deoxyuridin**

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden 7000 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h wurde den Zellen 10 µM Bromo-2-Deoxyuridin (BrdU) zugegeben. Nach maximal weiteren 22 h erfolgte die Fixierung der Zellen mit anschließender Antikörperfärbung mit Peroxidase-konjugierten anti-BrdU Fab-Fragmenten. Dabei wurde das Reaktionssystem Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung des BrdU Einbaus erfolgte

nach Zugabe des Peroxidase-Substrates am Luminometer (Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim).

## **2.15.4 Tierexperimentelle Methoden**

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

Die verwendeten Mausstämme 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  $20\pm 2$  °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $50\pm 10$  %. Pelletierte Zuchtdiät (Alleinfutter für Mäuse-Zucht, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser (Leitungswasser) standen den Tieren ständig zur Verfügung.

Für sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Analysen lagen die entsprechenden genehmigten Tierversuchsanträge vor.

#### **2.15.4.1.1 Schwanzbiopsie und Ohrlochmarkierung**

Schwanzbiopsien (ca. 0,2 cm der Schwanzspitze) und gleichzeitige Ohrlochmarkierungen zur Kennzeichnung von vier Wochen alten Mäusen wurden vom Tierstallpersonal im institutseigenen Tierstall vorgenommen.

#### **2.15.4.1.2 Genotypisierung von Mäusen**

Standardmäßig erfolgte die Genotypisierung von Mäusen durch PCR an gDNA aus Schwanzbiopsien. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide und Konditionen sind unter 2.11.1 und 2.15.1.3.2 genannt. Zusätzlich wurden einzelne Genotypisierungen mittels Southern Blot-Analyse (siehe 2.15.1.8) bestätigt.

#### **2.15.4.1.3 Isolierung von Mausserum**

Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen beim Gebrauch von Primärantikörpern aus der Ratte bei immunhistologischen Analysen wurde eine Präabsorption des sekundären Antikörpers mit Mausserum durchgeführt (siehe 2.15.2.4). Zur Herstellung des Mausserums wurden einer Maus nach schmerzfreier Tötung durch CO<sub>2</sub>-Narkose und zervikaler Dislokation mittels Herzpunktion ca. 300 µl Blut entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Eine Inkubation für 2 h bei 4 °C führte zur Koagulation des

Blutes. Anschließend wurde das Blut bei 1500xg für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Serum-Überstand wurde vorsichtig abgezogen, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

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

Um Embryonen eines definierten Stadiums der Embryonalentwicklung zu isolieren, wurden jeden Morgen Weibchen aus Verpaarungen auf eine erfolgte Kopulation untersucht. Das Koagulat des Ejakulats bildet bis zu 24 h nach Ejakulation einen sichtbaren Vaginalplug. Der Zeitpunkt der Vaginalplugsichtung wurde als Tag 0,5 nach erfolgter Kopulation definiert (engl.: *days post coitum; dpc* – Tage nach der Befruchtung). Die tatsächliche Trächtigkeit der vaginalplug-positiven Weibchen konnte visuell erst frühestens nach 9,5 Tagen bestätigt werden. Für die Isolierung bestimmter Embryonalstadien wurden vaginalplug-positive Weibchen am entsprechenden Tag präpariert und die Embryonen isoliert. Die tragenden Weibchen wurden schmerzfrei mittels CO<sub>2</sub>-Narkose und zervikaler Dislokation getötet und der Uterus mit den Embryonen isoliert. Die Embryonen wurden in PBS auf Eis aus dem Uterusgewebe präpariert. Für die Isolierung von embryonaler RNA wurden die Embryonen direkt in TriFast Reagent aufgenommen.

#### **2.15.4.1.5 Narkotisierung von Mäusen**

Zur Narkotisierung wurde den Mäusen intraperitoneal 64 µg Ketanest S und 12 µg Rompun pro 1 g Körpergewicht injiziert. Während der Narkose wurden die Augen mit 0,9 %iger NaCl Lösung bedeckt, um eine Austrocknung zu vermeiden.

#### **2.15.4.1.6 Epilation**

Für die Epilation einer dorsalen, ca. 2 cm<sup>2</sup> großen Fläche wurden die Tiere zunächst wie unter 2.15.4.1.5 beschrieben anästhesiert. Anschließend wurden die narkotisierten Tiere vorsichtig auf einer Unterlage fixiert. Die zu enthaarende Region wurde mit einer Schablone mit einer 2 cm<sup>2</sup>-großen Aussparung markiert. Das Fell in der Aussparung wurde mit einer Mullbinde abgedeckt. Dann wurde eine 1:1 Mischung von heißem Bienenwachs (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim) und Kolophonium (Fluka Chemie GmbH, Buchs) auf die Mullbinde aufgetragen. Nach Erkaltung wurde das mittlerweile feste Bienenwachs/Kolophonium mit der Mullbinde vorsichtig abgezogen und

dabei die am Bienenwachs/Kolophonium festgeklebten Haare mitsamt den Haarwurzeln entfernt. Anschließend wurden die Tiere in Papierhandtücher eingewickelt in den Käfig gelegt, um eine Auskühlung der Tiere zu vermeiden.

#### **2.15.4.1.6.1 Lokale Applikation von Tamoxifen auf die epilierte Haut**

Vor der lokalen Applikation von Tamoxifen wurden die Mäuse wie unter 2.15.4.1.5 beschrieben narkotisiert. Die narkotisierten Tiere wurden vorsichtig auf einer Unterlage fixiert. Auf beide zuvor enthaarte Regionen (siehe 2.15.4.1.6) wurde für 10 min 500 µg Tamoxifen in 20 µl DMSO aufgetragen. Danach wurde den Mäusen vorsichtig mit warmem Wasser und Seife auf der Haut verbliebenes Tamoxifen abgespült. Anschließend wurden die Tiere in Papierhandtücher eingewickelt in den Käfig gelegt. Die Behandlung wurde am selben Tag wie oben beschrieben wiederholt.

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

Um die Cre-ERT2 der verschiedenen Mauskreuzungen (siehe 2.10.3) zu aktivieren, wurde Mäusen intraperitoneal (i.p.) oder intramuskulär (i.m.) Tamoxifen (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim) injiziert. Eine Lösung von 100 mg Tamoxifen pro ml 96 % Ethanol wurde mit sterilem Sonnenblumenöl (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim) 1:10 verdünnt, so dass die Endkonzentration 10 mg/ml betrug. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Für die Verabreichung wurden die Mäuse im Genick fixiert und 100 µl der Tamoxifenemulsion (Dosis 1 mg Tamoxifen) i.p. oder 10 µl (Dosis 100 µg Tamoxifen) i.m. in den *musculus soleus* injiziert. Den Tieren wurde entweder durch i.p. Injektionen an fünf aufeinander folgenden Tagen eine kumulative Dosis von 5 mg Tamoxifen oder durch eine einmalige i.m. Injektion 100 µg Tamoxifen verabreicht. Für die Injektion von Kontrolltieren wurde eine entsprechende Öl-Ethanol-Emulsion ohne Tamoxifen verwendet.

#### **2.15.4.1.8 Perfusion von Mäusen mit Paraformaldehyd**

Die Betäubung der Mäuse erfolgte mit einer letalen Dosis Ketanest S (4 mg) und Rompun (0,9 mg). Zur Freilegung des Herzens wurde der Brustraum geöffnet. Das rechte Atrium wurde zur Eröffnung des Blutkreislaufs punktiert, der linke Ventrikel wurde punktiert, um die Blutgefäße zunächst 10 min mit Ringer-Lactat und danach 10 min mit 4 % Paraformaldehyd zu spülen. Die fixierte Maus wurde bis zur Analyse bei 4 °C in Paraformaldehyd gelagert.

#### 2.15.4.1.9 Sichtung und Präparation von Tumoren

Mäuse mit einer erhöhten Tumorpredisposition wurden engmaschig auf die Entstehung von Tumoren überwacht. Zur Erfassung von Weichteiltumoren wurde der Rumpf zwei- bis dreimal wöchentlich abgetastet. Weiterhin wurden die Tiere auf typische Symptome von Medulloblastomen hin untersucht. Hierzu gehören Ataxie, Abmagerung, Lethargie oder Entwicklung eines Hydrozephalus. Beim Verdacht auf ein Medulloblastom wurden die Tiere umgehend schmerzfrei mittels CO<sub>2</sub>-Narkose getötet.

Beim Vorliegen von Weichteiltumoren wurde das Datum vermerkt und das Tier spätestens nach Erreichen einer Tumorgroße von 1 cm Durchmesser getötet. Hier erfolgte die Tötung der Mäuse schmerzfrei durch CO<sub>2</sub>-Narkose und zervikaler Dislokation.

Nach der Tötung wurde die Maus auf dem Präparationstisch fixiert und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Dann wurde routinemässig bei jeder Maus das Abdomen entlang der Mittellinie eröffnet, die Bauchaorta freigelegt und durchtrennt, um das Tier auszubluten. Für die Entnahme des Kleinhirns wurde die Kopfhaut mit 70 % Ethanol desinfiziert, entfernt, die Schädelkalotte vom *Foramen magnum* ausgehend geöffnet und das Kleinhirn entnommen. Bei Weichteiltumoren wurde der Tumor freipräpariert und auch normales Referenzgewebe (meist Skelettmuskel) isoliert.

Die histologische Abklärung aller Tumoren erfolgte anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten durch einen erfahrenen Pathologen (W. Schulz-Schaeffer).

### 3 Ergebnisse

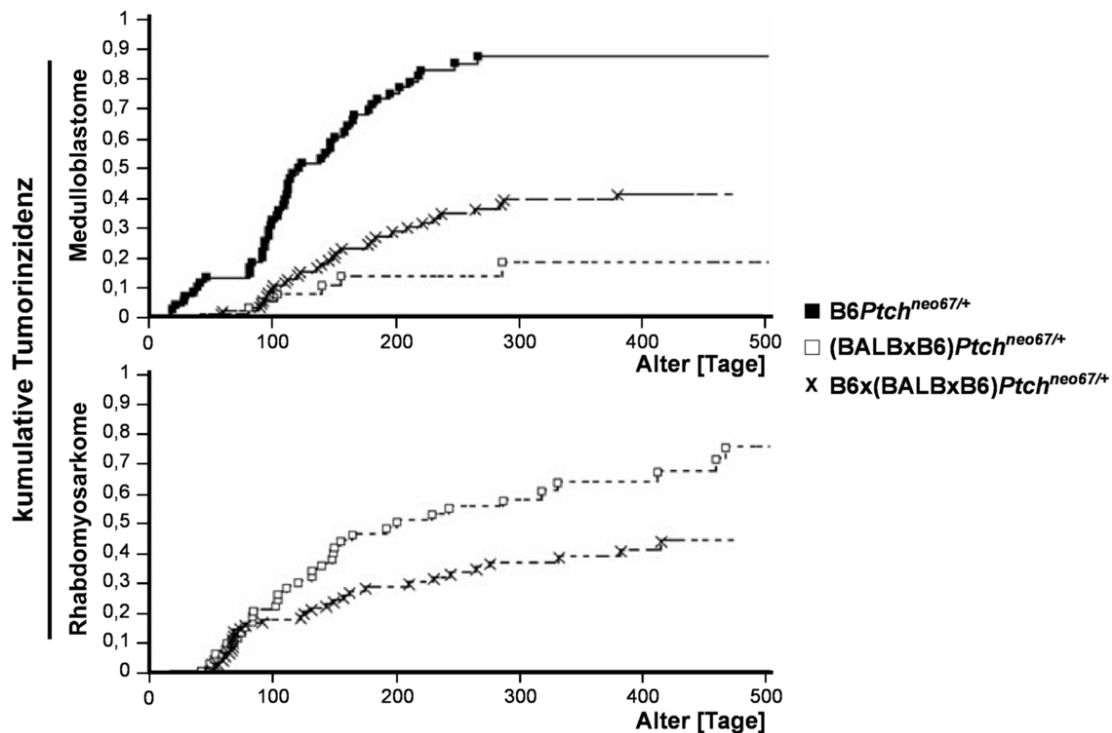
#### 3.1 Abhängigkeit der Tumorinzidenz vom genetischen Hintergrund bei *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen

Die Inzidenz von RMS und MB bei *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen ist vom genetischen Hintergrund abhängig. Während *Ptch*-heterozygote Mäuse auf dem genetischen Hintergrund B6 innerhalb der ersten 200 Tage keine RMS entwickeln, liegt die RMS-Inzidenz beim Hintergrund CD1 bei ca. 15 % (J Calzada-Wack *et al.*, 2002). Dagegen entstehen MB bei 72 % der B6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse und nur bei 8 % der CD1*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse (S Pazzaglia *et al.*, 2002; H Hahn *et al.*, 2004). Somit variiert die Inzidenz von MB und RMS in heterozygoten *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen je nach dem genetischen Hintergrund der Tiere und eine Identifikation der hierfür verantwortlichen Lozi musste möglich sein.

Da es sich bei der CD1-Mauslinie, die für RMS prädisponiert ist, um einen Auszuchtstamm handelt, sind viele genomische Regionen heterozygot und polymorph. Dieser Stamm eignet sich deshalb nicht für Kartierungsexperimente. Daher wurden zunächst B6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse, die ausschließlich MB, jedoch keine RMS entwickeln (siehe Abbildung 3), auf den Inzuchtstamm BALB zurückgekreuzt. In der resultierenden F1-Generation ist die Frequenz von RMS bei bestehender *Ptch*-Heterozygotie stark erhöht, wohingegen MB kaum noch auftreten (siehe Abbildung 3). Insgesamt 62 *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Tiere der (BALBxB6)F1-Generation wurden über 420 Tage auf die Entwicklung von Tumoren hin beobachtet. In diesem Zeitraum erkrankten fünf Tiere (8 %) an MB und 41 Tiere (66 %) entwickelten Weichteiltumoren, von denen 39 (63 %) histologisch abgesicherte RMS waren. Zwei Tiere (3 %) entwickelten beide Tumorentitäten (H Hahn *et al.*, 2004) (siehe auch 3.1.1, Tabelle 15). Daran ist folgendes erkennbar:

- a) BALB besitzt einen oder mehrere dominante Suszeptibilitätslozi für RMS
- b) B6 besitzt einen oder mehrere rezessive Suszeptibilitätslozi für MB





**Abbildung 3: Inzidenzen von Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen bei  $Ptch^{neo67/+}$ -Mäusen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund.** Dargestellt sind die kumulativen Tumorinzidenzen von Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen bei  $B6Ptch^{neo67/+}$  (■),  $(BALBxB6)Ptch^{neo67/+}$  (□) und  $B6x(BALBxB6)Ptch^{neo67/+}$  (x) Mäusen.

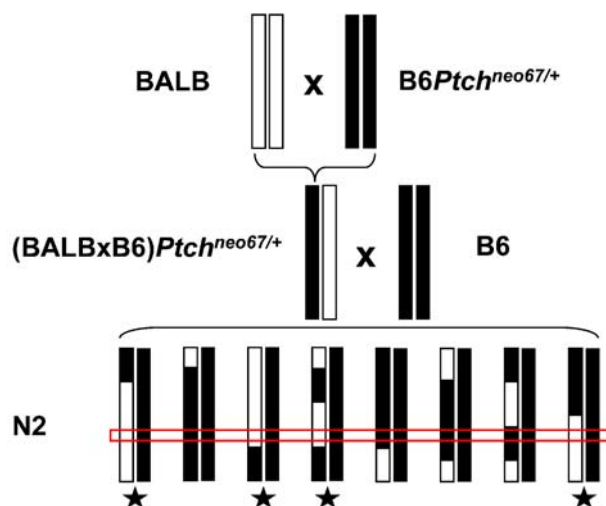
Für die Kartierung von *Lozi*, die Suszeptibilität für die Entwicklung von Tumoren vermitteln, können keine F1-Hybride aus zwei unterschiedlichen Mausstämmen verwendet werden. Diese Tiere sind an jedem genetischen Locus heterozygot für die entsprechenden Allele und unterscheiden sich somit genetisch nicht. Daher wurden männliche  $(BALBxB6)Ptch^{neo67/+}$ -Hybride mit weiblichen B6-Mäusen gekreuzt. Die Tumorinzidenzen bei der resultierenden  $B6x(BALBxB6)Ptch^{neo67/+}$  N2-Generation sind ebenfalls in Abbildung 3 gezeigt (siehe auch 3.1.1, Tabelle 15).

Jedes Tier der  $B6x(BALBxB6)Ptch^{neo67/+}$  N2-Generation verfügt in jedem Chromosomenpaar über maternale B6 Geschwisterchromatiden, während die paternalen Chromatiden entweder aus BALB- oder aus B6-Sequenzen bestehen können. Das Kreuzungsschema für die Generierung der  $B6x(BALBxB6)Ptch^{neo67/+}$  N2-Mäuse und eine vereinfachte Darstellung der möglichen Zusammensetzungen der Chromosomen sind zum besseren Verständnis in Abbildung 4 dargestellt.

Da die männlichen  $(BALBxB6)Ptch^{neo67/+}$ -Hybride ein paternales B6- und ein maternales BALB-Chromosom haben, kann eine Rekombination („Crossing-over“) während der Meiose eine Variabilität der paternalen Chromatiden in den resultierenden  $B6x(BALBxB6)Ptch^{neo67/+}$  N2-Mäusen bewirken. Bei der Meiose der B6-Weibchen ist die

Rekombination irrelevant, da bei dieser Inzuchtlinie ohnehin homologe Chromatiden vorliegen.

B6x(BALBx6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> N2-Tiere, die im Folgenden mit „N2“ bezeichnet werden, können für Kartierungsexperimente verwendet werden, da die Nachkommen aufgrund des Kreuzungsschemas unterschiedliche Genotypen aufweisen und somit die Ausprägung der zu analysierenden Phänotypen variieren sollte. Alle N2-Tiere verfügen an jedem Locus über ein B6-Allel maternaler Herkunft und zusätzlich über ein B6- oder ein BALB-Allel, das paternal vererbt wurde. Grundlegend für die Kartierung von Genen ist die Bestimmung dieser Allele für mehrere Lozi im gesamten Genom. Dies kann z. B. mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern erfolgen, die eine Unterscheidung zwischen B6- und BALB-Allelen ermöglichen. Anhand dieser Daten kann nach Abschluss der Beobachtung – in diesem Fall der Entstehung von RMS oder MB – eine Korrelation zwischen den Genotypen und Phänotypen gesucht werden. Alle Tiere, die z. B. ein RMS entwickelt haben, sollten an den hierfür verantwortlichen Lozi denselben Genotyp besitzen. Genau nach diesen Lozi wird bei einer Kopplungsanalyse gesucht. Unter der Annahme, dass sich im Genom des Mausstammes BALB ein dominanter Suszeptibilitätsloкус für RMS befindet, sollten daher Tiere, die an diesem Locus den Genotyp B6/BALB aufweisen, eine deutlich höhere RMS-Inzidenz zeigen als Tiere mit dem Genotyp B6/B6 (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Generierung der N2-Mäuse zur Kartierung von Tumor-Suszeptibilitätslozi.** Gezeigt ist das Kreuzungsschema für die Etablierung der N2-Mäuse. Weiß dargestellt sind Chromosomenabschnitte mit BALB-Hintergrund und schwarz diejenigen mit B6-Hintergrund. Wenn sich im Genom vom Mausstamm BALB ein dominanter Suszeptibilitätsloкус für RMS befindet, müssen Tiere, die an diesem Locus den Genotyp B6/BALB aufweisen, eine deutlich höhere RMS-Inzidenz zeigen als Tiere mit dem Genotyp B6/B6. Der rote Rahmen markiert einen möglichen dominanten BALB RMS-Suszeptibilitätsloкус. Die Sterne kennzeichnen Tiere, die für den Locus heterozygot sind und RMS entwickeln. Abkürzung: N2, B6x(BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> N2-Tiere

### 3.1.1 Detektion des RMS-Suszeptibilitätslokus *Parms1* auf Chromosom 2

Für die Kopplungsanalyse dienten 89 N2-Mäuse, die über einen Zeitraum von 420 Tagen regelmäßig auf das Auftreten von Tumoren untersucht wurden. Beim Auftreten eines MB oder beim Überschreiten eines Durchmessers von 1 cm von Weichteiltumoren wurden die Tiere vor Ablauf des Zeitraumes getötet und präpariert. Bei 32 Tieren wurden histologisch bestätigte RMS diagnostiziert, 28 entwickelten ein MB, bei sechs dieser Mäuse wurden bei der Präparation zusätzliche RMS gefunden. In Tabelle 15 ist ein Überblick dieser Tumorinzidenzen im Vergleich zu *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen auf einem BALBxB6- und B6-Hintergrund und zu Wildtyp BALB- und B6-Mäusen gezeigt.

**Tabelle 15: Tumoren bei (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>, N2-, B6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und Wildtyp BALB- und B6-Mäusen.** Dargestellt ist die Inzidenz von Medulloblastomen (MB), Rhabdomyosarkomen (RMS) und andere Tumoren. Die Daten für B6 wurden der Datenbank MGI entnommen (<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/C57BL.shtml>).

Phänotyp	(BALBxB6) <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> 62 Mäuse	N2 89 Mäuse	B6 <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> 69 Mäuse	BALB 40 Mäuse	B6
MB	8 % (5 Tiere)	25 % (22 Tiere)	72 % (50 Tiere)	0 %	0 %
RMS	63 % (39 Tiere)	29 % (26 Tiere)	0 %	0 %	0 %
MB + RMS	3 % (2 Tiere)	7 % (6 Tiere)	0 %	0 %	0 %
andere Tumoren	8 % (5 Tiere)	10 % (9 Tiere)	0 %	5 % (2 Tiere)	~ 10 %
tumorfrei	18 % (11 Tiere)	29 % (26 Tiere)	28 % (19 Tiere)	95 % (38 Tiere)	~ 90 %

Für die Durchführung einer genomweiten Kopplungsanalyse wurden mittels PCR 97 polymorphe Mikrosatellitenmarker in den N2-Mäusen analysiert. Die verwendeten Marker sind informativ für die Unterscheidung von B6- und BALB-Genotypen und liegen in einem Abstand von 10 bis 20 centiMorgan (cM). Die möglichen Genotypen für jeden Locus waren B6/B6 oder B6/BALB (siehe auch Abbildung 4).

Eine Kopplungsanalyse (durchgeführt von Michael Rosemann, GSF, Neuherberg) erfolgte durch den Vergleich des Genotyps B6/B6 oder B6/BALB mit dem Phänotyp, d. h. der Entstehung eines RMS, MB oder dem tumorfreien Überleben für jeden Locus. Anhand des berechneten LOD-Scores (engl.: „logarithm of the odds“ – Logarithmus der Wahrscheinlichkeit) konnte die Wahrscheinlichkeit für die Kopplung der Suszeptibilität für RMS, MB oder tumorfreies Überleben mit einem genomischen Locus bzw. Marker

angegeben werden. Die LOD-Scores und jeweiligen p-Werte wurden durch den  $\chi^2$ -Test berechnet.

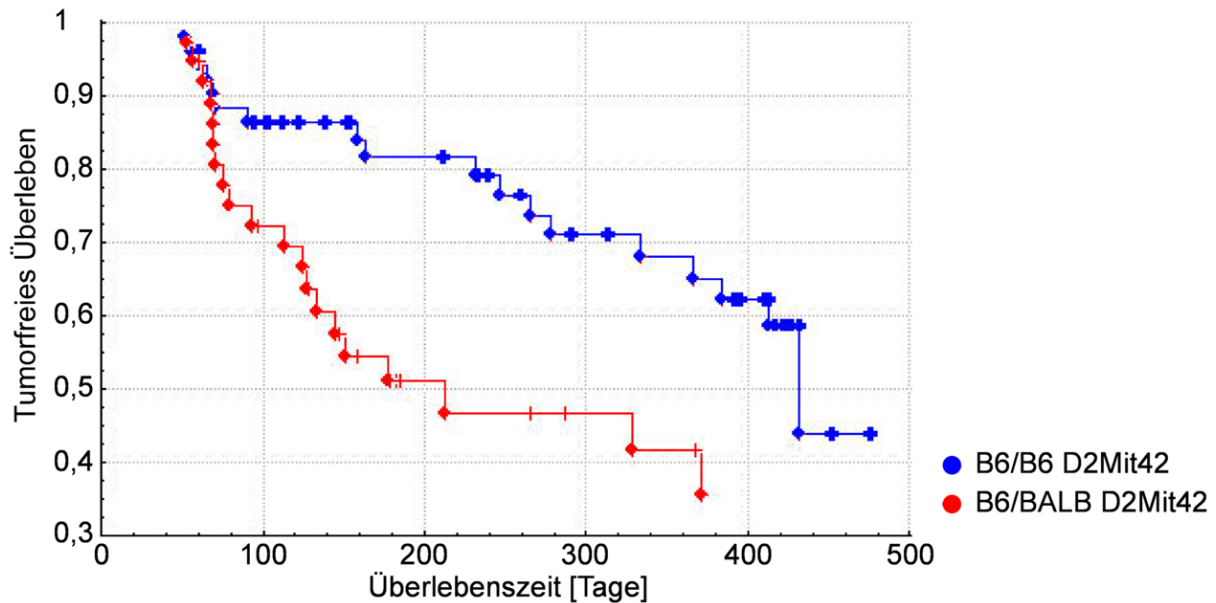
Für die Suszeptibilität von MB wurden mehrere signifikante Lozi identifiziert, an denen BALB-Allele mit einer Resistenz gegenüber MB assoziiert waren (siehe Tabelle 16). Mit Ausnahme des Markers D13Mit151 waren die LOD-Scores jedoch recht niedrig. Der zunächst widersprüchlich erscheinende, mit dem Genotyp B6/B6 und geringer Inzidenz von MB assoziierte hohe LOD-Score am Marker D13Mit151 lässt sich durch die Nähe zum *Ptch*-Lokus erklären.

**Tabelle 16: Mögliche MB-Suszeptibilitätslozi in B6x(BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> N2-Mäusen:** Gezeigt sind die Mikrosatellitenmarker, an denen Kopplung eines Markers mit der Suszeptibilität für MB gefunden wurde. Die Anzahl der Tiere mit oder ohne MB ist nach Genotyp B6/B6 und B6/BALB geordnet. In den Spalten  $\chi^2$ , LOD-Score und p-Wert sind die Ergebnisse der Kopplungsanalyse angegeben.

Marker	Pos. [cM]	Tiere mit MB		Tiere ohne MB		$\chi^2$	LOD-Score	p-Wert
		B6/B6	B6/BALB	B6/B6	B6/BALB			
D4Mit235	1,9	19	9	25	36	5,54	1,21	0,019
D6Mit138	0,68	20	8	25	36	7,12	1,55	0,008
D7Mit259	72	18	10	24	37	4,79	1,04	0,03
D9Mit35	52	10	18	38	23	5,46	1,19	0,02
D13Mit151	71	13	15	49	12	10,44	2,27	0,0012

Anhand der Kopplungsanalyse für RMS-Suszeptibilität wurde hingegen ein signifikanter Locus auf dem 2. Chromosom identifiziert. So ließ sich die Suszeptibilität für histologisch abgesicherte RMS, die durch das BALB-Allel vermittelt wird, zu einem einzigen genomischen Locus kartieren und zeigte eine Kopplung mit dem Marker D2Mit42 mit einem LOD-Score von 2,44 (p-Wert: 0,0048).

Am Locus D2Mit42 waren von den 32 Tieren mit RMS 18 B6/BALB heterozygot und 14 B6/B6 homozygot, während von den 32 Tieren, die lange tumorfrei gelebt hatten, nur sieben B6/BALB heterozygot, aber 25 B6/B6 homozygot waren. Der Vergleich der tumorfreien Überlebenszeit zwischen Tieren mit dem Genotyp B6/BALB oder B6/B6 am Locus D2Mit42 ist in Abbildung 5 anhand einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Der Genotyp B6/B6 zeigt einen weniger steilen Kurvenverlauf als B6/BALB und bestätigt somit das verlängerte tumorfreie Überleben dieser Tiere.



**Abbildung 5: RMS-freie Überlebenszeit von B6x(BALBx6)Ptch<sup>neo67/+</sup> N2-Mäusen.** Dargestellt ist die tumorfreie Überlebenszeit von B6x(BALBx6)Ptch<sup>neo67/+</sup> N2-Mäusen, die homozygot B6/B6 (blau) oder heterozygot B6/BALB (rot) am Marker D2Mit42 waren. Das Auftreten eines RMS ist mit einem Kreis gekennzeichnet. Tiere, die wegen eines Medulloblastoms oder aus anderen Gründen präpariert werden mussten, wurden als zensierte Beobachtungen in die Überlebenskurve einbezogen und sind mit Strichen eingezeichnet.

Für eine bessere Auflösung wurde im Rahmen dieser Arbeit in der Region um den Marker D2Mit42 eine weitere Analyse mit elf zusätzlichen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Anhand dieser Marker konnte die Region für RMS-Suszeptibilität zwischen D2Mit37 und D2Mit102 eingegrenzt werden. Weiterhin zeigen die Daten, dass mehrere Mäuse im Intervall zwischen den an den Marker D2Mit42 angrenzenden Markern D2Mit37 und D2Mit102 (die für die Kopplungsanalyse verwendet wurden) ein Crossing-over aufwiesen (siehe Tabelle 17). Diese Tiere konnten für eine weitere Einengung des Lokus verwendet werden (siehe 3.1).

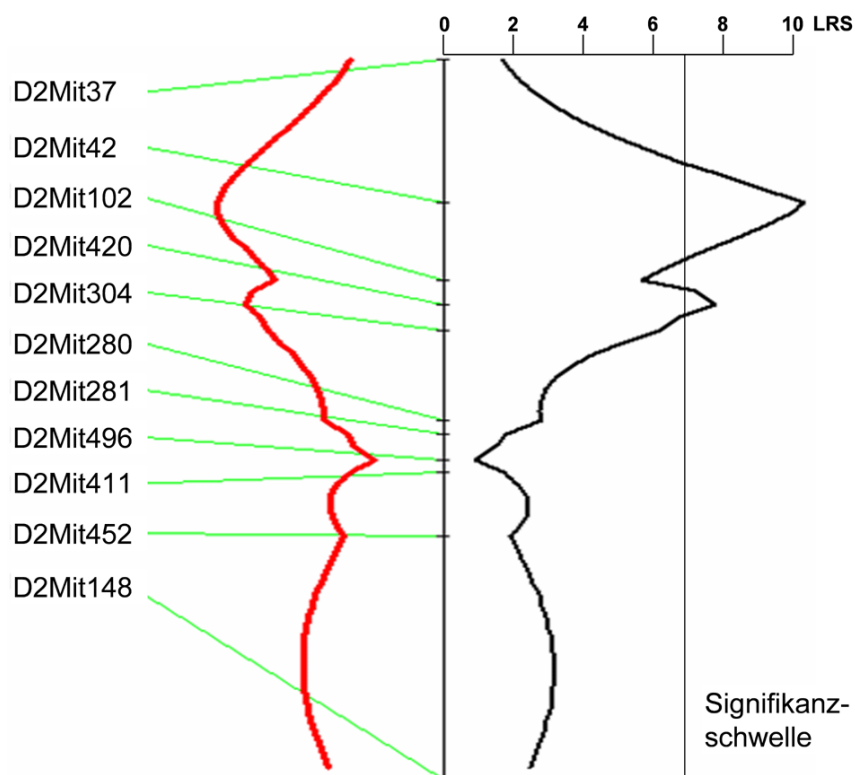
**Tabelle 17: Mäuse mit Crossing-over zwischen den Markern D2Mit37 und D2Mit102.** Gezeigt ist die Anzahl der Tiere mit Crossing over zwischen den Markern D2Mit37 und D2Mit42 bzw. D2Mit42 und D2Mit102. Die Positionen der Marker wurden der Datenbank Ensembl entnommen. Abkürzungen: cM, centiMorgan; Mb, Megabasen.

Intervall	D2Mit37-----D2Mit42-----D2Mit102		
cM	45	47,5	52,5
Mb	74,5	104,5	114,1
		↑	↑
Mäuse mit Crossing-Over		8	5
Abstand		30 Mb	9.6 Mb

Mit den erhobenen Daten wurde ein Permutationstest durchgeführt. Bei diesem Test wird die Wahrscheinlichkeit der gefundenen Kopplung unter der Hypothese, dass der Zusammenhang zufällig ist, berechnet und mit dem LRS-Score (engl.: „likelihood ratio statistic“) angegeben. Mit einem LRS-Score von  $>10$  war die Kopplung zum Marker D2Mit42 signifikant, da die Signifikanzschwelle bei 6,92 lag.

Anhand der erhobenen Daten konnte gezeigt werden, dass ein dominantes BALB-Allel in der Nähe des Markers D2Mit42 im Intervall zwischen D2Mit37 und D2Mit102 die Entstehung von RMS begünstigt. Der Locus wurde mit *Parms1* (*Patched-Associated RMS 1*) bezeichnet und erstreckt sich über 7,5 cM bzw. 40 Megabasen (Mb). In Abbildung 6 ist das Ergebnis des Permutationstests dargestellt.

Aufgrund der Größe des Locus *Parms1* konnte die Möglichkeit, dass sich in diesem Bereich mehrere modifizierende Gene befinden, nicht ausgeschlossen werden. In der Region *Parms1* sind derzeit 571 Gene bekannt, davon sind 55 bisher noch nicht beschrieben und 256 kodieren olfaktorische Rezeptoren. Diese Daten wurden 2004 in der Zeitschrift *Genomics* publiziert (H Hahn *et al.*, 2004).



**Abbildung 6: Position des RMS-Suszeptibilitätslokus *Parms1*.** Anhand eines Permutationstests wurde der 7,5 cM umfassende Locus *Parms1* zwischen D2Mit37 und D2Mit102 identifiziert. In diesem Bereich lag der LRS-Score (schwarze Linie) oberhalb der Signifikanzschwelle. Die rote Linie zeigt den relativen Effekt eines mutmaßlichen RMS-Suszeptibilitäts-Allels auf die Entstehung von RMS. Abkürzung: LRS, likelihood ratio statistic.

### 3.1.1.1 Analyse von Kandidatengenen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden potentielle Kandidatengene untersucht, die die Suszeptibilität von RMS beeinflussen könnten. Da zum Zeitpunkt dieser Analysen die unter 3.1.1 beschriebenen Auswertungen noch nicht abgeschlossen waren, wurden auch Gene in der Region zwischen D2Mit102 und D2Mit304 als Kandidaten in Erwägung gezogen. Für eine Analyse wurden elf Kandidatengene ausgewählt. Von diesen lagen acht zwischen den Markern D2Mit37 und D2Mit102 und drei zwischen den Markern D2Mit102 und D2Mit304 in der Nähe des Markers D2Mit420. Sie wurden entweder mittels SNP-Analysen (engl.: „Single Nucleotide Polymorphism“ – Einzelpunktmutation) oder anhand von Expressionsanalysen an cDNA analysiert.

#### 3.1.1.1.1 SNP-Analysen

Vier Gene wurden einer SNP-Analyse unterzogen. Während das Gen *Wilms tumor homolog (Wt1)* in *Parms1* beim Marker D2Mit42 liegt, befinden sich *Bcl-2 modifying factor (Bmf)*, *Dispatched homolog 2 (Disp2)* und *Delta-like 4 (Dll4)* in der Nähe des Markers D2Mit420.

Unter der Annahme, dass Polymorphismen zwischen B6 und BALB in den untersuchten Kandidatengenen zu den unterschiedlichen RMS-Inzidenzen bei *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen abhängig vom genetischen Hintergrund führen können, wurden Abschnitte dieser Gene sequenziert. Es wurde ausschließlich genomische DNA des Mausstamms BALB sequenziert, da die Gensequenzen der Mauslinie B6 aus der Datenbank Ensembl bekannt waren.

Die Sequenzierungsanalysen beschränkten sich hierbei auf die kodierenden translatierten Regionen der Gene. Dazu wurden die Oligonukleotide so ausgewählt, dass die Anlagerungsstelle im Intron ca. 50 bis 80 Basenpaare vor dem Beginn oder Ende des zu sequenzierenden Exons lag. Für die Amplifikation und Sequenzierung der Fragmente wurden dieselben Oligonukleotide verwendet, daher konnte durch den Abstand zwischen Anlagerungsstelle und Exon die gesamte Sequenz des Exons erfasst werden. Bei großen Exonen wurden zusätzliche, im Exon lokalisierte Oligonukleotide für die Sequenzierung benutzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind Tabelle 4 zu entnehmen.

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Polymorphismen von Einzelbasen (engl.: single nucleotide polymorphism – SNP) in kodierenden Regionen der Gene (sogenannte coding SNP oder cSNP) sind inzwischen auch in der Mouse Phenome Database (MPD)

und anderen Datenbanken zu finden. Darüber hinaus wurden weitere cSNP für den Mausstamm BALB in dieser Arbeit detektiert.

Die bekannten sowie die in dieser Arbeit ermittelten cSNP werden im Folgenden beschrieben und sind zusammengefasst in Tabelle 18 dargestellt.

#### **3.1.1.1.1.1 Detektion von cSNP in *Bmf***

Aufgrund der Interaktion von *Bmf* mit antiapoptotischen B-cell leukemia- (*Bcl-2*) Proteinen und eines möglichen Zusammenhangs mit dem *Gli1*-Zielgen *Bcl-2* wurde eine Sequenzanalyse von *Bmf* durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Analyse lautete die Bezeichnung *Bmf-pending*, und es waren nur drei Exone bekannt. Heute weiß man jedoch, dass das Gen *Bmf* aus fünf Exonen besteht. Die in der vorliegenden Arbeit sequenzierten Regionen entsprechen dabei den heutigen Exonen 3 und 4 sowie den ersten 130 bp des Exons 5. Anhand der Analyse konnten zwei cSNP in den Exonen 3 und 5 gefunden werden (siehe Tabelle 18). Da es sich um synonyme SNP handelt, bewirken sie jedoch keine Veränderung der Aminosäuresequenz.

#### **3.1.1.1.1.2 Detektion von cSNP in *Disp2***

Bei *Disp1*, das in den zellulären Export von modifiziertem Hh involviert ist, und auch bei dem bisher weniger genau charakterisierten *Disp2* handelt es sich um *Ptch*-Homologe (M Evangelista *et al.*, 2006). *Disp2* ist in der Nähe der Region *Parms1* beim Marker D2Mit420 lokalisiert, somit war es aufgrund einer möglichen Funktion in der Modulation der Hh/*Ptch*-Signalkaskade ein interessantes Kandidatengen. Zum Zeitpunkt der Sequenzierung war lediglich ein aus acht Exonen bestehendes Transkript bekannt. Das entsprechende Transkript, das in dieser Arbeit sequenziert wurde, kann in der Ensembl Datenbank unter der Nummer ENSMUST00000037547 abgerufen werden.

Insgesamt wurden 13 cSNP in den Exonen 2 und 8 gefunden (siehe Tabelle 18). Davon waren zwölf synonyme SNP, während eine T-C Transition an der mRNA-Position 3697 in Exon 8 einen Serin-Prolin Austausch in BALB bewirkt.

#### **3.1.1.1.1.3 Detektion von cSNP in *Wt1***

Da die Expression von *Wt1* in RMS beschrieben wurde, war die Analyse dieses Tumorsuppressorgens von Interesse (DF Carpentieri *et al.*, 2002; T Mentzel und C Kuhnen, 2006). Das *Wt1*-Gen, das im Locus *Parms1* liegt, verfügt über zehn Exone, die



alle sequenziert wurden. Dabei wurde ein synonymer cSNP in Exon 6 gefunden (siehe Tabelle 18).

#### 3.1.1.1.4 Detektion von cSNP in *DII4*

Als weiteres Kandidatengen galt *DII4*, da es den Notch-Signalweg aktiviert, dessen Fehlregulation in verschiedenen Tumoren auftritt. Sämtliche elf Exone von *DII4* wurden sequenziert, dabei wurden in den Exonen 8 und 9 insgesamt fünf cSNP identifiziert (siehe Tabelle 18), von denen vier SNP synonym waren. Ein SNP an mRNA-Position 1879 war nicht-synonym, da eine G-A Transition zu einem Glycin-Serin Austausch in BALB führt.

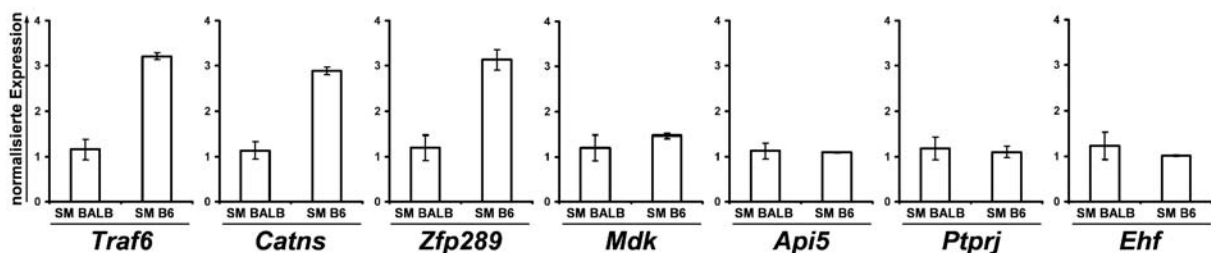
**Tabelle 18: Zusammenstellung der gefundenen cSNP in *Bmf*, *Disp2*, *Wt1* und *DII4*.** Die SNP sind nach den mRNA-Positionen in den jeweiligen Genen sortiert. Für die Nummerierung der Exone wurde die heute bekannte Exon-Intron Struktur der Gene aus der Datenbank Mouse Phenome Database (MPD) verwendet. In der Spalte „SNP #“ findet sich die Bezeichnung des SNP. Die SNP für B6 und BALB aus der MPD sind in der Spalte MPD angegeben, daneben die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen SNP in BALB (in weißer Schrift). Bei weißen Feldern fehlt eine Angabe in der Datenbank MPD. Die letzte Spalte bezeichnet die Art des SNP, dabei steht Cs für einen synonymen und Cn für einen nicht-synonymen SNP.

Gen	Position		SNP #	MPD			Art des SNP
	mRNA			B6	BALB	BALB	
<i>Bmf</i>	437	Exon 3	rs3149883	T		C	Cs
	773	Exon 5	rs3144666	T		C	Cs
<i>Disp2</i>	51	Exon 2	rs3144427	T	C	C	Cs
	87		rs3149637	C		A	Cs
	228		rs3149638	A	G	G	Cs
	1212	Exon 8	rs3149649	T	C	C	Cs
	1566		rs3149651	T	C	C	Cs
	1632		rs3149652	C	T	T	Cs
	1812		rs3144436	C	T	T	Cs
	1995		rs3149653	C	A	A	Cs
	2428		rs3144437	T	C	C	Cs
	2451		rs3149655	T	C	C	Cs
	2874		rs3149656	T		C	Cs
	3697		rs3149657	T	C	C	Cn
	4032		rs3144438	T	C	C	Cs
	<i>Wt1</i>	1284	Exon 6	rs27444886	T		C
<i>DII4</i>	1101	Exon 8	rs27423758	C	T	T	Cs
	1256	Exon 9	rs27423750	A	T	T	Cs
	1419		rs27423749	A	C	C	Cs
	1635		rs27423748	C	G	G	Cs
	1879		rs27423747	G	A	A	Cn

### 3.1.1.1.2 Expressionsanalysen

Neben SNP-Analysen wurden Expressionsanalysen von Kandidatengen der Region *Parms1* durchgeführt. Dies erfolgte an cDNA aus dem Skelettmuskel (SM) von BALB- und B6-Mäusen anhand von gebrauchsfertigen TaqMan-Assays. Für die Normalisierung der Expressionen der untersuchten Gene wurde ein *18s rRNA*-spezifischer Assay der Firma Applied Biosystems verwendet.

Wie Abbildung 7 zeigt, wurden einige der untersuchten Gene unterschiedlich im SM von BALB und B6 exprimiert. Für *Tnf receptor-associated factor 6 (Traf6)*, *Catenin src (Catns)* und *ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 2 (Zfp289)* wurde eine ca. 2-fach höhere Expression in SM von B6 gefunden. Hingegen wiesen *Midkine (Mdk)*, *Apoptosis inhibitor 5 (Api5)*, *Protein tyrosine phosphatase, receptor type, J (Ptrj)* und *Ets homologous factor (Ehf)* gleiche Expressionsniveaus in SM von BALB und B6 auf, während die *Wilms tumor homolog (Wt1)*-Expression im SM zu gering für eine zuverlässige Messung war (nicht gezeigt).



**Abbildung 7: Expressionsanalyse von Kandidatengen in SM von BALB und B6.** Die Expression wurde mittels TaqMan-Analysen an cDNA bestimmt und auf die Expression der *18S rRNA* normalisiert.

### 3.1.1.2 Etablierung einer neuen N2-Mauskolonie zur Eingrenzung von *Parms1*

Da bekannt ist, dass die Auflösung einer genomweit durchgeführten Kartierung von QTL (engl.: quantitative trait locus) nicht besonders gut ist und sich meistens im Bereich von 10 bis 20 cM befindet (KW Hunter und RW Williams, 2002), musste eine zweite N2-Rückkreuzung aufgebaut werden. Von dieser Rückkreuzung sollten dann solche Mäuse für weitere Feinkartierungsuntersuchungen eingesetzt werden, die in der Region zwischen den Markern D2Mit37 bis D2Mit102 (oder nach der zusätzlichen Kartierung eventuell noch enger zusammen liegender Marker) eine Rekombination zeigen. Anhand solcher Tiere wird eine weitere Engrenzung auf eine oder mehrere Kandidatenregionen innerhalb des *Parms1*-Lokus ermöglicht. Dazu benötigt man Mäuse, die in

übereinstimmenden Bereichen von *Parms1* eine Rekombination und gleichzeitig eine veränderte Suszeptibilität für RMS im Vergleich zu Mäusen ohne diese Rekombination aufweisen. Da D2Mit37 und D2Mit102 ca. 40 Mb auseinander liegen, wurde erwartet, dass ca. 25 % aller Nachkommen eine Rekombination in diesem Intervall aufweisen (Mäuse zeigen ca. alle 1,7 cM ein Crossing-over).

Aus der neuen Rückkreuzung gingen 218 N2-Mäuse hervor. Mit Hilfe dieser Tiere sollte zunächst der *Parms1*-Lokus bestätigt, und weiterhin sollten diejenigen Mäuse für weiterführende Analysen eingesetzt werden, welche eine Rekombination zwischen D2Mit37 und D2Mit102 zeigten.

Um die Anzahl der Tiere zu erhöhen, die zur Einengung des Lokus verwendet werden können, wurden auch zusätzlich *Ptch*<sup>+/+</sup>-Wildtyp-Tiere, die rekombinant an diesem Lokus waren, mit B6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen zurückgekreuzt.

### 3.1.1.3 Detektion einer genetischen Kontamination im Mausstamm B6

#### 3.1.1.3.1 Nachweis von auffälligen Genotypen in N2-Mäusen

Zur Bestätigung des *Parms1*-Lokus wurde an der neu aufgebauten N2-Mauskolonie eine zweite genomweite Kopplungsanalyse mit 97 polymorphen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Das Vorgehen ist bereits unter 3.1.1 beschrieben.

Im Verlauf der Datenerhebung wurden vermehrt Genotypen an mehreren Markern nachgewiesen, die scheinbar homozygot für BALB waren. Diese „BALB/BALB“-Genotypen waren zunächst unerklärlich, da sämtliche Tiere Nachkommen einer Rückkreuzung von (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Hybriden auf die Mauslinie B6 waren und somit an keinem Locus das Vorliegen eines „BALB/BALB“-Genotyps bzw. das Fehlen eines B6-Allels möglich schien.

Nach der Genotypisierung von 85 Markern in 57 Mäusen bei 32 verschiedenen Mikrosatellitenmarkern wurden 134 dieser „BALB/BALB“-Genotypen gefunden. Alle analysierten Marker und die Anzahl der Tiere mit diesen Genotypen für den jeweiligen Marker sind in Tabelle 19 angegeben. Diese Ergebnisse wurden durch mehrfache Wiederholungen bestätigt.

Um die Ursache für die „BALB/BALB“-Genotypen in N2-Mäusen zu finden, wurden die Elterngenerationen (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> und B6 überprüft. (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse wurden aus weiblichen BALB-Mäusen, die von Charles River Laboratories (L'Arbresle, Frankreich) erworben wurden, und männlichen B6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Tieren aus der Hauszucht generiert. Sämtliche für die Zucht von N2-Mäusen verwendeten Wildtyp B6-Weibchen

hingegen stammten von Charles River Laboratories (Sulzfeld). Es wurden 17 Mikrosatellitenmarker bei 15 (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Männchen genotypisiert. Alle Tiere zeigten den zu erwartenden heterozygoten Genotyp B6/BALB (siehe Tabelle 19). Dagegen wurde bei acht von zwölf weiblichen Wildtyp B6-Mäusen von Charles River Laboratories mit 18 verschiedenen Mikrosatellitenmarkern tatsächlich eine Heterozygotie festgestellt. Da diese Tiere zur Inzuchtlinie B6 gehörten, waren aber ausschließlich B6/B6-Genotypen zu erwarten. Somit wurde eine genetische Kontamination von B6-Mäusen von Charles River Laboratories festgestellt.

### 3.1.1.3.2 Zeitverlauf der Kontamination von B6-Mäusen

Um die Kontamination zu bestätigen, erfolgten weitere Analysen von B6-Mäusen von Charles River Laboratories. Die zuerst genotypisierten weiblichen Wildtyp B6-Mäuse (siehe oben) waren im Herbst 2003 zugekauft worden. Ebenfalls genotypisiert wurden sieben B6-Mäuse, die im Frühjahr 2004, und zwölf B6-Mäuse, die im Mai 2005 von Charles River Laboratories bezogen wurden. Dabei konnten bei fünf der sieben Mäuse vom Frühjahr 2003 heterozygote Genotypen an sieben verschiedenen Markern nachgewiesen werden. Von den zwölf Tieren vom Mai 2005 zeigten sieben Tiere mit fünf unterschiedlichen Markern Heterozygotie. Wie auf Nachfrage von Charles River Laboratories mitgeteilt wurde, stammten sämtliche im Zeitraum zwischen Herbst 2003 und Mai 2005 erworbenen B6-Mäuse aus demselben Zuchtraum (A).

Zusätzlich wurde eine Analyse von 26 weiteren B6-Mäusen aus einem anderen Zuchtraum (B) desselben Anbieters durchgeführt. Diese Tiere waren im Januar 2005 zugekauft und für ein anderes Kartierungsprojekt verwendet worden. Unter diesen Tieren fanden sich nur zwei Mäuse, die für jeweils einen Marker heterozygot waren. Sämtliche Ergebnisse sind in Tabelle 19 aufgelistet.

**Tabelle 19: Analyisierte Marker bei N2-, (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und B6-Mäusen.** Eine Genotypisierung mit 85 Mikrosatellitenmarkern erfolgte von N2-, (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und zusätzlich von B6-Mäusen, die zu vier verschiedenen Zeitpunkten aus zwei verschiedenen Zuchträumen (Räume A und B) von Charles River Laboratories erworben wurden. B6-Tiere vom Herbst 2003, Frühjahr 2004 und Mai 2005 stammten aus Raum A, die Tiere vom Januar 2005 aus Raum B. Sämtliche 85 Marker wurden bei N2-Mäusen analysiert. Die bei (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> und B6 untersuchten Marker sind mit „+“ markiert. In den Spalten „Tiere mit abweichendem Genotyp“ ist die Anzahl der Mäuse mit fehlendem B6-Allel am jeweiligen Marker angegeben. Die prozentualen Anteile betroffener Marker bzw. Mäuse in den verschiedenen Gruppen finden sich am Tabellenende.

Chromosom	Marker	N2		(BALBxB6) <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup>		B6 Herbst 2003		B6 Frühjahr 2004		B6 Mai 2005		B6 Januar 2005	
		analysiert	Tiere mit abweichendem Genotyp	analysiert	Tiere mit abweichendem Genotyp	analysiert	Tiere mit abweichendem Genotyp	analysiert	Tiere mit abweichendem Genotyp	analysiert	Tiere mit abweichendem Genotyp	analysiert	Tiere mit abweichendem Genotyp
1	D1Mit411	+											
	D1Mit22	+	4	+		+	2	+		+		+	
	D1Mit132	+											
	D1Mit187	+	2	+		+	2	+	3				
	D1Mit399	+											
	D1Mit223	+											
2	D2Mit37	+						+		+		+	
	D2Mit249	+											
	D2Mit452	+											
	D2Mit148	+						+		+		+	
3	D3Mit164	+	1	+		+	2	+		+		+	
	D3Mit6	+	1			+	2	+		+	1	+	
	D3Mit49	+											
	D3Mit318	+											
	D3Mit116	+											
	D3Mit19	+	4			+	4	+					
4	D4Mit235	+	6	+				+		+		+	
	D4Mit286	+											
	D4Mit15	+											
	D4Mit203	+											
	D4Mit170	+											
5	D5Mit386	+											
	D5Mit79	+	5	+		+	2	+		+		+	
	D5Mit197	+											
	D5Mit239	+											
	D5Mit406	+											
	D5Mit95	+											
6	D6Mit138	+											
	D6Mit274	+	1	+		+		+		+		+	
	D6Mit230	+		+		+		+	1	+		+	
	D6Mit36	+											
	D6Mit59	+	3	+		+		+		+		+	1
	D6Mit373	+											
7	D7Mit306	+											
	D7Mit310	+											
	D7Mit96	+											
	D7Mit68	+											
	D7Mit101	+											
8	D8Mit231	+											
	D8Mit49	+											
9	D9Mit328	+	6	+		+		+		+	2	+	
	D9Mit336	+											
	D9Mit35	+											
	D9Mit12	+	9	+		+	2	+		+		+	
	D9Mit125	+											
10	D10Mit213	+											
	D10Mit274	+											
	D10Mit95	+	1	+		+		+		+		+	1

	D10Mit233	+	1			+	2	+		+	1	+	
11	D11Mit231	+											
	D11Mit5	+	7			+		+	1	+	1	+	
	D11Mit333	+	3	+		+		+		+	1	+	
	D11Mit203	+	1	+		+		+		+		+	1
12	D12Mit182	+	15	+		+	3	+	1	+	2	+	
	D12Mit124	+	7	+		+	2	+	1	+			
	D12Mit34	+	10			+	4	+	1	+	1	+	
	D12Mit99	+	3	+		+	2	+		+		+	
	D12Nds2	+	1			+	2	+		+			
13	D13Mit57	+											
	D13Mit250	+				+	2	+		+		+	
	D13Mit13	+											
	D13Mit262	+										+	
	D13Mit78	+											
	D13Mit151	+											
14	D14Mit109	+											
	D14Mit60	+	5	+		+		+		+			
	D14Mit113	+											
	D14Mit265	+											
	D14Mit165	+											
15	D15Mit100	+	2			+	2	+		+		+	
	D15Mit209	+	2			+		+		+		+	
	D15Mit159	+	3			+	4	+		+			
16	D16Mit182	+	2			+		+		+		+	
	D16Mit211	+	7			+		+		+		+	
	D16Mit139	+	1					+		+			
17	D17Mit49	+											
	D17Mit152	+											
	D17Mit39	+	4			+	4	+		+		+	
18	D18Mit110	+	9			+		+	1	+		+	
	D18Mit177	+	1			+		+		+			
	D18Mit186	+	7			+	2	+		+	1		
19	D19Mit68	+				+		+		+	1	+	
	D19Mit19	+											
	D19Mit34	+											
	D19Mit71	+											
Insgesamt betroffene Tiere		26 %	57/218	0 %	0/15	67 %	8/12	71 %	5/7	58 %	7/12	8 %	2/26
Betroffene Marker		38 %	32/85	0 %	0/17	55 %	18/33	19 %	7/37	14 %	5/35	10 %	3/29

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass sich unter allen zu den verschiedenen Zeitpunkten aus zwei verschiedenen Zuchträumen (A und B) erworbenen Tieren B6-Mäuse mit einer genetischen Kontamination befanden. Dabei waren die beiden Zuchträume offensichtlich unterschiedlich stark betroffen. Die für die Generierung der N2-Mäuse verwendeten Tiere stammten aus dem stärker betroffenen Raum A. Innerhalb der Zeit vom Herbst 2003 bis Frühjahr 2005 scheint sich das Ausmaß der Kontamination etwas verringert zu haben, zumindest in den analysierten Tieren.

### 3.1.1.3.3 Identifikation der kontaminierenden Mauslinie

Eine Kontamination mit dem BALB-Mausstamm wäre zunächst denkbar, da die „Kontaminante“ in der PCR stets Fragmente ergab, die auch für die entsprechenden Mikrosatelliten des Mausstamms BALB erwartet wurden. Allerdings ist eine genaue Bestimmung der Mikrosatellitengröße über die PCR-Analyse nicht möglich. Da es weitere, mit BALB verwandte Mauslinien gibt, die mit den verwendeten Markern dieselbe Fragmentgröße wie BALB in der PCR zeigen, wurde eine Analyse von 100 SNP durch

das Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) durchgeführt. Anhand dieser SNP, die jedes Autosom und das X-Chromosom abdecken, wird eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Inzuchtlinien ermöglicht (PM Petkov *et al.*, 2004).

Zwei B6-Mäuse vom Herbst 2003, eine vom Frühling 2004 und sieben vom Mai 2005 wurden mit der SNP-Auswahl des Jackson Laboratories analysiert. Insgesamt 79 der untersuchten SNP zeigten einen homozygoten B6-Genotyp, wohingegen 21 SNP bei jeweils bis zu drei Mäusen heterozygot waren (Tabelle 20). B6-Tiere aus allen untersuchten Zeiträumen zwischen 2003 und 2005 waren betroffen. Alle heterozygoten Genotypen wiesen ein B6-Allel und ein davon abweichendes Allel auf. Um die Herkunft dieser Allele festzustellen, wurden sie mit den Allelen von 103 verschiedenen Inzuchtlinien verglichen (PM Petkov *et al.*, 2004). Dabei stellte sich heraus, dass 20 der 21 von B6 abweichenden Allele in drei von vier DBA-Inzuchtlinien des Jackson Laboratories vorkommen (siehe Tabelle 21). Somit war eine Kontamination der B6-Mäuse mit einer DBA-Inzuchtlinie am wahrscheinlichsten.

**Tabelle 20: Wildtyp B6-Mäuse von Charles River Laboratories zeigen für 21 SNP einer Auswahl von 100 SNP eine Heterozygotie, die die Unterscheidung von verschiedenen Inzuchtlinien ermöglicht.** Von zehn Mäusen (M1 bis M10), die im Zeitraum von 2003 bis 2005 bei Charles River Laboratories zugekauft worden sind, waren jeweils bis zu drei Mäuse für 21 von 100 analysierten SNP heterozygot. Die Bezeichnung der SNP ist unter „SNP #“ angegeben, daneben mit „Allel I“ benannt der Genotyp von B6. Unter „Allel II“ sind die von Allel I, d. h. von B6 abweichenden Allele, in den analysierten Mäusen aufgelistet.

SNP #	Allel I	Allel II (wenn abweichend von Allel I)									
		B6 Herbst 2003		B6 Frühjahr 2004	B6 Mai 2005						
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
01-191804699-M	A			T	T						
02-146910375-M	G					A					
04-068252469-M	C	T	T								
04-151168886-M	G	T	T								
07-135345950-N	A						G				
09-013396060-N	A									G	
09-066767939-N	G									A	
11-041505703-M	T					G					G
11-066278669-N	A			T		T					
12-037298090-M	A			C	C						
12-064212930-N	A			G	G						T
12-112276179-M	A	T	T								
14-016156211-M	G					A					
15-026132801-M	A	G	G								
15-052940678-M	A	T	T								
15-088202966-M	A	G	G								
17-089136255-M	T	C	C								
17-093441700-M	T	C	C								
18-086980249-M	G						A				
19-005218596-N	T					C					
X-143466659-M	A					C					

**Tabelle 21: 20 der 21 „nicht-B6“-Allele (siehe Tabelle 20) stammen aus dem Mausstamm DBA.**  
 Für 103 Inzuchtlinien sind die Allele der 21 SNP aufgelistet, die heterozygot bei B6 waren (siehe Tabelle 20). In den Spalten unter der Bezeichnung der SNP ist der Genotyp in den verschiedenen Mauslinien angegeben. Die Inzuchtlinien samt Bezeichnung vom Jackson Laboratory („JAX Stock #“) sind nach sinkender Wahrscheinlichkeit für die Herkunft der Kontamination von B6 aus diesen Linien sortiert. In der letzten Spalte sind die Unterschiede der Inzuchtlinien zu B6 dargestellt, dabei entspricht 1 der maximalen Diskrepanz zu B6. Lila markiert sind von B6 unterschiedliche, schwarz markiert nicht bestimmte Allele.

Mauslinie	JAX Stock #	01-191804699-M	02-146910375-M	04-068252469-M	04-151168886-M	07-135345950-N	09-013396060-N	09-066767939-N	11-041505703-M	11-066278669-N	12-037298090-M	12-064212930-N	12-112276179-M	14-016156211-M	15-026132801-M	15-052940678-M	15-088202966-M	17-089136255-M	17-093441700-M	18-086980249-M	19-005218596-N	X-143466659-M	keine Übereinstimmung mit B6
DBA/1J	670	T	G	T	T	G	G	A	G	T	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,95
DBA/1LacJ	1140	T	G	T	T	G	G	A	G	T	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,95
DBA/2HaSmnJ	973	T	A	T	T	G	G	A	T	T	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,95
DBA/2J	671	T	G	T	T	G	G	A	T	T	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,90
SENCARA/PtJ	2746	T	A	T	T	G	A	A	G	A	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,90
SENCARB/PtJ	2747	T	A	T	T	G	A	A	G	A	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,90
ST/bj	688	T	A	T	T	G	G	A	T	T	C	G	A	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,90
BALB/cByJ	1026	T	A	T	T	G	G	A	G	T	C	G	T	A	A	A	G	C	T	A	C	C	0,86
BALB/cJ	651	T	A	T	T	G	G	A	G	T	C	G	T	A	A	A	G	C	T	A	C	C	0,86
BUB/BnJ	653	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	A	T	G	C	C	A	C	C	0,86
CBA/CaJ	654	T	A	T	T	G	G	G	A	C	G	T	A	G	T	A	C	C	A	C	C	0,86	
SENCARC/PtJ	2748	T	A	T	T	G	A	A	T	A	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,86
SEC/1ReJ	685	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	■	A	A	■	G	C	T	A	C	C	0,84
C3H/HeJ	659	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	A	T	A	C	C	A	C	C	0,81
C3H/HeN		T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	A	T	A	C	C	A	C	C	0,81
C3H/HeOuj	635	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	A	T	A	C	C	A	C	C	0,81
C3H/HeSnJ	661	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	A	T	A	C	C	A	C	C	0,81
I/LnJ	674	A	A	T	G	G	A	A	T	T	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,81
NONcNZO5		T	A	T	T	G	A	A	G	A	A	G	T	G	G	T	G	C	C	A	C	C	0,81
RIIS/J	683	T	A	T	T	G	A	A	T	T	C	G	T	A	G	T	G	C	C	G	C	A	0,81
SJL/Bm		T	A	T	T	G	G	G	T	T	C	G	T	A	G	T	A	C	T	A	C	C	0,81
C3HeB/FeJ	658	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	A	T	A	C	■	A	C	C	0,80
EL/SuzSeyFrkJ	1956	T	A	T	G	G	G	A	T	T	A	G	A	A	G	■	G	C	■	A	C	C	0,80
NON/LtJ	2423	T	A	T	T	G	A	A	G	A	A	G	T	G	G	T	G	C	C	■	C	C	0,80
SJL/J	686	T	A	T	T	G	G	G	T	T	C	G	■	A	G	T	A	C	T	A	C	C	0,80
A/HeJ	645	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	G	A	A	C	T	A	C	C	0,76
A/J	646	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	G	A	A	C	T	A	C	C	0,76
A/WySnJ	647	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	G	A	A	C	T	A	C	C	0,76
ALR/LtJ	3070	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	G	A	A	C	T	A	C	C	0,76
CBA/J	656	T	A	T	T	G	A	G	G	T	C	G	T	A	G	T	A	C	T	A	C	C	0,76
KK/HIJ	2106	T	G	T	G	G	A	A	T	A	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,76
NOD.NON-H2<nb1>/LtJ	1626	T	A	T	T	G	G	A	T	A	C	G	T	A	A	A	G	C	T	A	C	C	0,76
NOD/LtJ	1976	T	A	T	T	G	G	A	T	A	C	G	T	A	A	A	G	C	T	A	C	C	0,76
PL/J	680	T	G	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	G	A	A	C	C	A	C	C	0,76
RF/J	682	T	A	T	T	G	G	A	T	A	C	G	T	G	A	T	G	C	T	A	C	C	0,76
YBR/EiJ	933	A	A	T	G	G	A	A	T	A	C	G	T	A	G	T	G	C	C	A	C	C	0,76
MRL/MpJ	486	T	A	T	T	G	G	A	G	A	C	■	T	G	A	A	A	C	C	A	C	C	0,75
AKR/J	648	T	G	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	A	A	G	C	C	A	C	C	0,71
BPH/2J	3005	T	G	T	T	G	G	A	G	A	C	G	T	G	G	T	A	C	T	A	C	A	0,71
DDY/JclSidSeyFrkJ	2243	T	A	T	G	G	A	A	T	T	A	G	A	A	G	A	G	C	C	A	C	C	0,71
FVB/NJ	1800	T	A	T	T	G	A	G	T	T	C	G	A	A	G	T	G	T	T	A	C	C	0,71
LG/J	675	T	A	T	T	G	G	A	T	T	C	A	T	G	A	A	A	C	C	A	C	C	0,71
MA/MyJ	677	■	A	T	T	G	G	A	T	T	A	G	T	A	A	T	G	C	C	A	T	C	0,70
SB/LeJ	269	A	■	T	T	G	G	A	G	A	A	G	A	A	G	T	A	C	C	A	C	A	0,70
WSB/EiJ	1145	■	A	T	T	G	A	G	G	T	C	A	T	A	G	T	G	C	T	G	C	A	0,70
ALS/LtJ	3072	A	A	T	T	G	G	A	T	A	C	G	T	G	A	T	G	C	T	A	C	C	0,67
IS/CamRkJ	573	T	A	T	G	G	A	G	G	T	C	G	T	A	G	T	G	T	T	G	C	A	0,67
NONcNZO10		T	A	T	T	G	A	A	T	T	A	G	A	G	T	A	C	C	G	C	C	0,67	
NOR/LtJ	2050	T	G	T	T	G	G	A	T	T	C	G	T	A	A	A	G	C	T	G	C	C	0,67
SWXL4/TyJ	74	A	A	T	T	G	A	A	T	A	C	G	T	G	G	A	A	C	C	A	C	C	0,67
BPL/1J	3006	T	■	T	G	G	G	G	T	C	A	T	A	G	A	A	C	T	G	C	C	0,65	
LEWES/EiJ	2798	T	G	T	G	■	G	G	T	C	A	T	A	A	T	G	C	T	A	C	A	0,65	
PERC/EiJ	1307	T	A	T	G	G	A	G	G	T	C	G	T	A	■	A	G	C	T	G	C	A	0,65



PWK/PhJ	3715	T	G	T	G	G		G	T	T	C	G	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,65
RBF/DnJ	726	T	A	T	T	G	A	G	T	T	C		T	A	G	T	G	T	T	G	C	A	0,65
CE/J	657	T	G	T	G	G	A	A	T	T	C	G	T	G	A	T	G	C		G	C	C	0,63
129S1/SvImJ	2448	T	G	T	T	G	A	A	G	A	A	A	T	A	G	T	G	C	T	G	T	C	0,62
129T2/SvEmsJ	2065	T	G	T	T	G	A	A	G	A	A	A	T	A	G	T	G	C	T	G	T	C	0,62
BDP/J	652	A	G	T	G	A	A	A	T	T	C	G	T	A	A	T	G	C	T	A	C	C	0,62
BPN/3J	3004	T	G	C	G	G	G	A	G	T	C	G	T	A	G	T	A	C	T	G	T	C	0,62
LP/J	676	T	G	T	G	G	A	A	G	A	A	G	A	A	G	T	G	C	C	G	T	C	0,62
P/J	679	A	G	T	G	A	A	A	T	T	C	G	T	A	A	T	G	C	T	A	C	C	0,62
SEA/GnJ	644	A	A	T	G	G	A	A	T	T	C	G	T	A	A	A	G	C	T	A	C	C	0,62
SF/CamEiJ	280	T	A	T	G	G	A	G	T	T	C	A	T	G	G	A	G	C	C	G	C	C	0,62
SWR/J	689	A	A	T	T	G	A	A	T	A	C	G	A	A	G	A	G	T	T	A	C	C	0,62
129P2/OlaHsd		T	G	T	T	G	A	A	G	A	A	A	T	A	G	T	G		T	G	T	C	0,61
CZECHI/EiJ	2799	A	G	T	G	G		G	T	T	C	G	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,60
CZECHII/EiJ	1144	A	G	T	G	G		G	T	T	C	G	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,60
NZW/LacJ	1058	T	G	T	G	G	A	G	T	T	A	G	A	A	A	T	G	C		A	C	C	0,60
SKIVE/EiJ	1393	A	G	T	G	G		G	T	T	C	G	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,60
Pohn1(F?9)			G	T	G	G		G	T	T	C	G	T	G		A	G	T	T	G	C	C	0,59
BTBR T<+> tf/J	2282	T	G	T	G	G	A	A	T	A	C	G	A	A	G	A	A	C	T	G	T	C	0,57
NZB/BINJ	684	T	G	T	G	G	A	A	T	T	C	A	T	A	A	T	G	C	T	G	T	C	0,57
SM/J	687	A	G	T	G	A	A	A	T	T	C	G	A	A	A	A	G	C	C	A	C	C	0,57
WMP/PasDnJ	1746	A	G	T	G	G	A	G	G	T	C	G	T	A	G	A	G	T	T	A	C	A	0,57
SPRET/EiJ	1146	A	G	T	G	G		A			C	G	T	G	G	A	G	C	T	G	C	A	0,56
JF1/Ms	3720	A	G	T	G	A		G	T	T	C	G	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,55
MOLF/EiJ	550	A	G	T	G	A		G	T	T	C	G	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,55
MSM/Ms	3719	A	G	T	G	A		G	T	T	C	G	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,55
PERA/EiJ	930	T	G	T	G	G	A	G	T	A	C	G		A	G	T	G	T	T	A	C	A	0,55
CAST/EiJ	928	A	G	T	G	G	G	G	T	T	C	G	T	G	G	A	G	C	T	G	C	C	0,52
CASA/RkJ	735	A	G	T	G	G		G	T	T	C	G	T	G	A	A	G	C	T	G	C	C	0,50
LT/SvEi male	3588	T	G	T	T	A	A	A	T	T	A	A	T		A	A			T	A	C		0,50
MOLC/RkJ	731	A	G	T	G	A		G	T	T	C	A	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,50
MOLD/RkJ	734	A	G	T	G	A		G	T	T	C	A	T	G	G	T	G	C	T	G	C	C	0,50
PANCEVO/EiJ	1384	A	G	T	G	G		G			T	C	G		G	G	A	G	C	T	G	C	0,50
Pohn2(F?9)		A	G	T	G	G	A	G			T	C	G	T	G	G	A	G	T	T	G	C	0,50
TIRANO/EiJ	929	A	A	T	G	G	A	G	T	T	C	G	T	A	A	A	G	T	T	G	C	A	0,48
NZO/HILtJ	2105	T	G	T	T	G	G	A	T	T	A	A	A	A	A		A	C	T	G	T		0,47
129X1/SvJ	691	T	G	T	T		A	A	G	A	A	A	T	G		T			T	G	T	C	0,47
BXSB/MpJ	740	A	G	T	G	G	G	G	G	A	A	A	A	G	A	T	A	C	C	A	C	A	0,43
C57BR/cdJ	667	T	G	T	G	A	A	A	T	T	A	A	T	G	G	A	G	T	C	G	C	A	0,43
ZALENDE/EiJ		A	G	T	G	G	A	G	T	T	C	G	T	A	A	A	G	T	T	G	C	A	0,43
C57BLKS/J	662	A	G	C	G	G	A	A	T	T	C	G	A	A	A	A	G	T	T	G	T	C	0,38
C57L/J	668	A	G	T	G	A	A	A	T	T	A	A	T	G	G	A	A	C	C	G	C	A	0,38
CALB/RkJ	1489	A	G	T	G	G	A	G	T	A	C	G	T	G	G	A	G	T	T	G	C	A	0,38
C58/J	669	T	G	T	G	A	A	G	T	A	A	A	T	G	A	A	A	T	T	A	C	C	0,29
C57BL/10J	665	A	G	T	G	A	A	A	T	A	A	A	A	G	A	A	A	T	T	G	T	A	0,10
C57BL/10SnJ	666	A	G	T	G	A	A	A	T	A	A	A	A	G	A	A	A	T	T	G	T	A	0,10
C57BL/6ByJ	1139	A	G	C	G	A	A	G	T	A	A	A	A	G	A	A	A	T	T		T	A	0,00
C57BL/6J	664	A	G	C	G	A	A	G	T	A	A	A	A	G	A	A	A	T	T	G	T	A	0,00
C57BL/6N		A	G	C	G	A	A	G	T	A	A	A	A	G	A	A	A	T	T	G	T	A	0,00
MOR/RkJ	1297	A	G	C	G	A	A	G	T					G	A	A			T	G		A	0,00

Zusammenfassend konnte in kommerziell erhältlichen B6-Mäusen eine genetische Kontamination gezeigt werden, die im Rahmen einer genomweiten Kopplungsanalyse aufgefallen war. Diese Kontamination konnte in vier verschiedenen Mauslieferungen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugekauft wurden, nachgewiesen werden. Dabei waren insgesamt zwischen 8 und 71 % der Tiere sowie 10 bis 55 % (siehe Tabelle 19) der analysierten Mikrosatellitenmarker betroffen. Die analysierten Tiere aus drei Lieferungen stammten aus einem einzigen Zuchtraum und wurden im Zeitraum von 2003 bis 2005 erworben. An diesen Tieren war ein leichter Rückgang der Kontamination im Verlauf der Zeit erkennbar. Des Weiteren zeigten auch Mäuse aus einem weiteren Zuchtraum, die im Januar 2005 zugekauft wurden, eine Kontamination. Diese war jedoch etwas geringer als bei Tieren des anderen Raumes.

Diese Daten wurden 2007 in der Zeitschrift *Laboratory Animals* veröffentlicht (F Nitzki *et al.*, 2007).

### 3.1.2 Entwicklung von RMS in *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen mit 50 % DBA2J-, 129Sv- und FVB/N-Hintergrund

Die meisten Inzuchtstämme von Labormäusen stammen von einer kleinen, begrenzten Population von Mäusen aus wenigen Laboratorien ab. Deshalb können die gemeinsamen oder unterschiedlichen Vorfahren zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen anhand der Varianz von SNP festgestellt werden (CM Wade *et al.*, 2002).

Aufgrund dieser Tatsache sollte es auch möglich sein, eine Kartierung der RMS-Suszeptibilität mit Hilfe weiterer Inzuchtmausstämme vorzunehmen. Dies sollte auf der Grundlage der Korrelation von der Segmentidentität, d. h. der Übereinstimmung oder Abweichung von Chromosomenabschnitten, und Phänotyp erfolgen. Wie bereits erklärt, war durch Kreuzungen von *B6Ptch*<sup>neo67/+</sup>- mit BALB-Mäusen erkennbar, dass der BALB-Hintergrund einen Locus auf Chromosom 2 besitzt, der diesen Mausstamm dominant zu RMS prädisponiert (siehe 3.1.1). Zusätzlich wurden Kreuzungen von *B6Ptch*<sup>neo67/+</sup>- Mäusen mit den Inzuchtstämmen 129Sv, DBA2J und FVB/N hergestellt und ebenfalls einem sorgfältigen Tumormonitoring unterzogen. Es wurde erwartet, dass sich die verschiedenen F1-Tiere bei den Tumorzinzenzen abhängig vom genetischen Hintergrund unterscheiden. Je nach Ergebnis sollte die ca. 40 Mb große Region zwischen D2Mit37 und D2Mit102 nach weiterer Einengung (siehe 3.1.1.2) in den entsprechenden Mausstämmen sequenziert werden. Die Sequenzen sollten dann auf konservierte und weniger konservierte Regionen hin untersucht werden. Man würde erwarten, dass Mausstämme mit gleichem Phänotyp (z. B. hohe oder niedrige Tumorzinzenzen) eine oder auch mehrere konservierte Regionen zwischen den Markern D2Mit37 und D2Mit102 auf Chromosom 2 aufzeigen. In diesen konservierten Regionen wären dann die Kandidatengene für die Ausprägung des Phänotyps zu suchen.

Jede Mauskolonie umfasste zwischen 18 und 28 Tiere und wurde über einen Zeitraum von mindestens 430 Tagen sorgfältig auf die Entwicklung von Tumoren überwacht. Beim Verdacht auf MB oder wenn Weichteiltumoren einen Durchmesser von 1 cm überschritten, wurden die Tiere getötet und die entsprechenden Gewebe präpariert. Die Diagnose der Gewebeproben erfolgte mittels HE-Färbungen von Paraffin- oder Kryoschnitten durch einen erfahrenen Pathologen (W. Schulz-Schaeffer). In Tabelle 22 ist ein Überblick sämtlicher Befunde gezeigt.

**Tabelle 22: Tumorzinzidenz bei DBA2JxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-, 129SvxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-, und FVB/NxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-Mäusen.** Gezeigt sind die Befunde der DBA2JxB6-Ptch<sup>neo67/+</sup>-, 129SvxB6-Ptch<sup>neo67/+</sup>- und FVB/NxB6-Ptch<sup>neo67/+</sup>-Mäuse. In der Spalte „Alter“ ist das Alter zum Zeitpunkt der Präparation angegeben, unter „Befund“ findet sich die Diagnose für jedes Tier. Abkürzungen: LMS, Leiomyosarkom; MB, Medulloblastom; RMS, Rhabdomyosarkom.

DBA2JxB6Ptch <sup>neo67/+</sup>	
Alter [Tage]	Befund
149	MB
222	Cyste
231	RMS
268	MB-Vorläufer, RMS
441	Beckencyste, Nierenbeckenerweiterung
441	RMS + 2 Cysten
441	keine Auffälligkeiten
441	RMS
441	Urotheltumor (evtl. LMS)
442	RMS
442	RMS
442	mesenchymaler Tumor
442	RMS
443	Cyste
443	RMS
444	keine Auffälligkeiten
447	Urotheltumor (evtl. LMS)
450	RMS + evtl. LMS
<b>50% (9/18) RMS innerhalb von 450 Tagen</b>	

129SvxB6Ptch <sup>neo67/+</sup>	
Alter [Tage]	Befund
100	MB
125	MB
147	MB
198	MB
198	MB
353	LMS
432	bindegewebige Abkapselung einer Einblutung
443	LMS
443	keine Auffälligkeiten
443	RMS
444	Epidermoid
444	keine Auffälligkeiten
444	Hämangiom (?), 2 LMS (?)
444	keine Auffälligkeiten
444	keine Auffälligkeiten
444	keine Auffälligkeiten
444	RMS
444	LMS
449	LMS
449	LMS
449	Uterusmyom
<b>9 % (2/22) RMS innerhalb von 444 Tagen</b>	

FVB/NxB6Ptch <sup>neo67/+</sup>	
Alter [Tage]	Befund
37	Wasserkopf
42	MB
53	Darmvorfall
86	MB
111	RMS
164	keine Auffälligkeiten
198	degenerierte Niere, RMS
207	MB
214	MB
231	RMS
250	MB
265	RMS
274	2 RMS
313	evtl. venöses LMS
315	RMS
347	Nierenbeckencyste, RMS
400	RMS + LMS
409	MB
441	LMS
441	LMS
443	Cyste
443	RMS
443	keine Auffälligkeiten
443	RMS oder LMS
443	Tumor mit Plasmazellen
444	evtl. LMS
444	Cystenniere
446	Aufstau des Nierenbeckens
<b>32 % (9/28) RMS innerhalb von 443 Tagen</b>	

Von 18 DBA2JxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-Mäusen zeigten zwei Tiere keine Auffälligkeiten. Bei neun Tieren wurden RMS gefunden, drei entwickelten Leiomyosarkome (LMS) und zwei ein MB bzw. MB-Vorläuferläsionen

Bei 129SvxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Tieren waren fünf von 22 am Zeitpunkt der Präparation unauffällig. Von den übrigen Mäusen hatten sechs Tiere ein LMS, zwei ein RMS und fünf ein MB entwickelt.

Zwei der 28 FVB/NxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse zeigten bei der Präparation keine Besonderheiten. Bei neun Tieren wurden RMS, bei fünf Tieren LMS und bei sechs MB gefunden.

Deutliche Unterschiede in der Suszeptibilität für Tumoren zwischen den verschiedenen Hintergründen sind erkennbar. Mit 50 % zeigten DBA2JxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse die höchste Inzidenz von RMS. In der Linie FVB/NxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup> entwickelten 32 % der Tiere RMS, die niedrigste RMS-Inzidenz von 9 % wiesen 129SvxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Tiere auf.

Die Daten zeigen, dass der Mausstamm 129Sv Allele besitzt, die weniger zu RMS prädisponieren als diejenigen des Mausstamms DBA2J oder FVB/N.

Aufgrund der genetischen Kontamination der auch für dieses Projekt zugekauften B6-Mäuse wurde die Analyse jedoch frühzeitig abgebrochen, und es wurden keine weiteren SNP-Analysen der DBA2JxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-, 129SvxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und FVB/NxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse zur Identifikation der Segmente von gemeinsamen oder unterschiedlichen Vorfahren durchgeführt.

### 3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des Kartierungsprojektes

In dieser Arbeit sollte der 7,5 cM bzw. 40 Mb umfassende Lokus *Parms1* genauer analysiert und möglichst auch weiter eingengt werden. Dieser Lokus ist mit der Entstehung von *Ptch*-assoziierten RMS assoziiert. Er wurde in unserer Arbeitsgruppe anhand einer genomweiten Kopplungsanalyse in der Maus identifiziert und liegt auf dem 2. Chromosom im Intervall zwischen dem Mikrosatellitenmarker D2Mit37 und D2Mit102. BALB-Allele in dieser Region begünstigen im Gegensatz zu B6-Allelen die Entstehung von RMS (H Hahn *et al.*, 2004). Elf Gene, die sich in diesem Lokus oder seiner unmittelbaren Umgebung befinden, wurden als Kandidatengene für eine Modifikation der Suszeptibilität für RMS in Erwägung gezogen und anhand von SNP- oder qRT-PCR-Analysen untersucht. Dabei wurde in den Genen *Disp2* und *Dll4* jeweils ein nicht-synonymer cSNP identifiziert. Die Gene *Zfp289*, *Traf6* und *Catns* wiesen im SM von B6-Mäusen im Vergleich zu BALB-Mäusen eine erhöhte Expression auf. Weiterhin wurde zur zusätzlichen Eingrenzung von *Parms1* eine neue N2-Mauskolonie aufgebaut, an der eine zweite genomweite Kopplungsanalyse mit 97 polymorphen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt wurde. Dabei wurde eine genetische Kontamination

bei Wildtyp B6-Mäusen festgestellt. Diese Tiere sind im Zeitraum von Herbst 2003 bis Frühjahr 2005 zur Etablierung der N2-Kolonie von der Firma Charles River Laboratories zugekauft worden. Die Kontamination betraf bis zu 18 Marker und trat bei 8 bis 71 % aller untersuchten Mäuse auf. Eine genauere Analyse erwies einen Rückgang der Kontamination im Zeitraum von 2003 bis 2005. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Tiere aus zwei verschiedenen Zuchträumen des Anbieters unterschiedlich stark kontaminiert waren. Die durch das Jackson Laboratory durchgeführte SNP-Analyse ließ auf eine Kontamination mit einer DBA-Inzuchtlinie schließen (F Nitzki *et al.*, 2007).

Bevor die Kontamination bei N2- bzw. B6-Mäuse festgestellt wurde, waren Kreuzungen von B6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen mit den Inzuchtstämmen 129Sv, DBA2J und FVB/N hergestellt worden. Man würde erwarten, dass Mausstämme mit gleichem Phänotyp (z. B. hohe oder niedrige Tumorzinzidenz) eine oder auch mehrere konservierte Regionen zwischen den Markern D2Mit37 und D2Mit102 auf Chromosom 2 aufzeigen. Auf der Basis der Korrelation von Segmentidentität und Phänotyp sollte eine weitere Einengung des RMS-Suszeptibilitätskandidatenlokus vorgenommen werden. Anhand der Kreuzungen war erkennbar, dass eine hohe RMS-Suszeptibilität nicht nur durch den BALB-, sondern auch durch den DBA2J-Mausstamm vermittelt wurde, eine niedrige hingegen durch den Mausstamm 129Sv. Aufgrund der genetischen Kontamination bei den zugekauften B6-Mäusen waren die Daten jedoch nicht zuverlässig und dieses Teilprojekt wurde daher nicht weiterverfolgt.

### 3.1.4 Mikroarray-basierte Genexpressionsanalysen von RMS aus CD1*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen

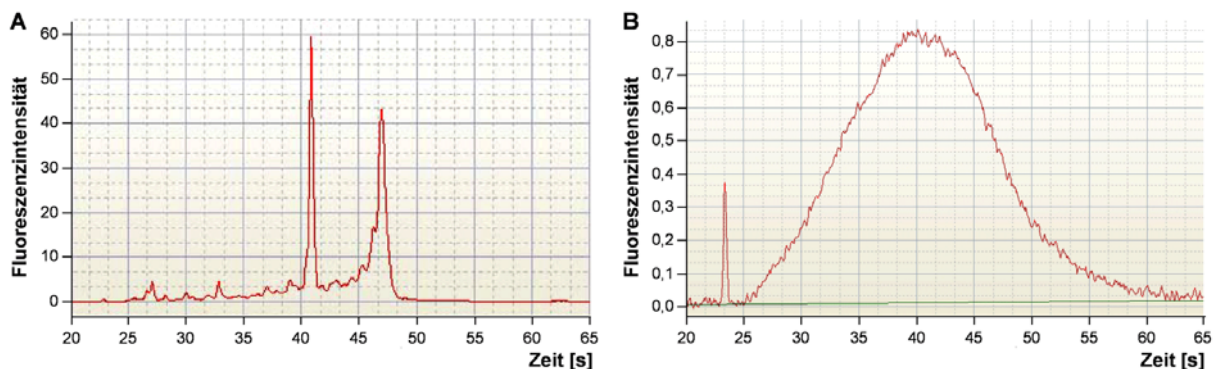
Im Rahmen von Vorarbeiten für einen Antrag bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft wurden Mikroarray-Expressionsanalysen an RMS aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen durchgeführt. Die generierten Daten sollten als Grundlage für ein Projekt dienen, bei dem die Bedeutung der genetischen Tumor-Variabilität im Vergleich zur genetischen Wirts-Variabilität am Therapieerfolg der Behandlung von *Ptch*-assoziierten Tumoren untersucht werden soll. Hierzu sollte das Expressionsmuster von RMS in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund erstellt werden.

Für die Expressionsanalyse von RMS aus *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen wurden jeweils zwei Tumoren aus vier CD1*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und vier (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen analysiert. Somit war ein Vergleich der Expression in RMS aus Mäusen sowohl mit unterschiedlichen (CD1 und gemischter B6xBALB-Hintergrund) und gleichen

genetischen Hintergründen, als auch ein Vergleich zwischen zwei unabhängig voneinander entstandenen Tumoren innerhalb eines Tieres möglich.

In einer ersten Analyse sollte an den erhobenen Daten untersucht werden, ob und wie sich Tumoren einer einzigen Entität (in diesem Fall RMS), die alle durch eine einzige (*Ptch-*) Mutation hervorgerufen wurden, in ihrem Expressionsmuster in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund voneinander unterscheiden.

Vor der Hybridisierung der Proben auf Mikroarray-Chips wurde von jeder RNA-Probe Gesamt-RNA und nach ihrer Fertigstellung die Biotin-markierte cRNA mit Hilfe des RNA 6000 Nano Assay Kits auf eine mögliche Degradation hin untersucht. Anhand der Chromatogramme war erkennbar, dass sämtliche RNA-Proben sowohl vor der Biotin-Markierung als auch danach eine gute Qualität aufwiesen. Abbildung 8 zeigt die erstellten Chromatogramme für eine repräsentative Gesamt-RNA (A) und entsprechende Biotin-markierte cRNA Probe (B). Die Fraktionen der 18S und 28S RNA der Gesamt-RNA sind klar erkennbar und somit ein Hinweis auf nicht-degradierte RNA. Qualitativ hochwertige Biotin-markierte cRNA hingegen zeigt in einem Chromatogramm die Verteilung einer Gaußkurve.

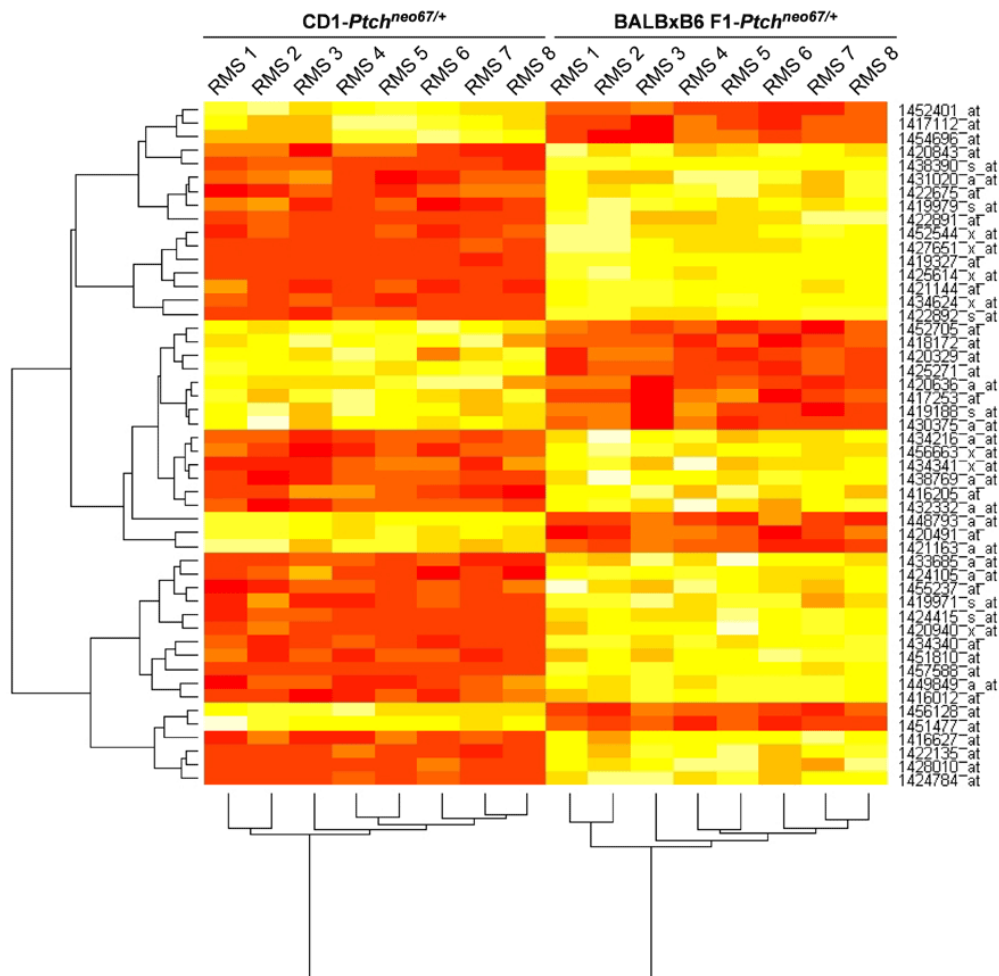


**Abbildung 8: Integrität der RNA-Proben für Mikroarray-Analysen.** Dargestellt sind die mit Hilfe des des RNA 6000 Nano Assay Kits hergestellten Chromatogramme von repräsentativen Gesamt-RNA (A) und Biotin-markierten cRNA Proben (B). Aufgetragen ist jeweils die Fluoreszenzintensität gegen die Laufzeit [s] der Fragmente im Gel.

Sämtliche weiteren Schritte, die vor der Hybridisierung mit Mikroarray Chips notwendig sind, sowie die Hybridisierung der Arrays wurden durch das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung in Berlin (RZPD) durchgeführt.

Die verwendeten Mikroarray-Chips (Affymetrix 430A mouse gene chips) ermöglichen die Analyse von mehr als 22.000 Transkripten. Vom RZPD wurde uns mitgeteilt, dass sowohl das Hintergrundrauschen aller Proben als auch die internen Hybridisierungskontrollen, für die dieselben RNA-Proben zweimal verarbeitet und hybridisiert worden waren, auf eine gelungene Durchführung hinwiesen.

Anschließend wurde eine erste hierarchische Clusteranalyse der Daten von Bettina Kulle (Department of Biostatistics & Department of Mathematics, Oslo, Norwegen) durchgeführt. Dabei wurde die Expression von 50 Transkripten verwendet, welche statistisch die größten Unterschiede zwischen den Tumorproben der beiden genetischen Hintergründe zeigten. Durch die Analyse konnten die RMS eindeutig je nach ihrem genetischen Hintergrund (CD1 und BALBxB6) getrennt werden (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9: Clusteranalyse von RMS aus CD1Ptch<sup>neo67/+</sup>- und (BALBxB6)Ptch<sup>neo67/+</sup>-Mäusen.** Gezeigt ist die Clusteranalyse der 50 Transkripte mit dem jeweils größten signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen in je acht RMS aus CD1Ptch<sup>neo67/+</sup>- und (BALBxB6)Ptch<sup>neo67/+</sup>-Mäusen. Rechts ist die Transkriptnummer von Affymetrix aufgeführt. Dunkelrote Felder repräsentieren stark exprimierte, hellgelbe Felder schwach exprimierte Transkripte. Auf der linken Seite und unterhalb sind Dendrogramme gezeigt, die eine Zuordnung in Gruppen („cluster“) nach Ähnlichkeit der Merkmalsausprägung darstellen.

Ein ebenso eindeutiges Ergebnis, das eine klare Zuordnung zum jeweiligen genetischen Hintergrund ermöglicht, zeigte eine äquivalente Analyse von 250 Transkripten (nicht gezeigt).

Unter den in der Clusteranalyse (Abbildung 9) dargestellten Transkripten, deren Expressionsniveaus sich in RMS von CD1*Ptch*<sup>neo67/+</sup> und (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> unterschieden, finden sich u. a. Transkripte von Genen, die für den Histokompatibilitätskomplex kodieren, für regulatorische Transkriptionsfaktoren oder von Genen, die an Metabolismus oder Signaltransduktion beteiligt sind.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass diese erste Clusteranalyse eine eindeutige Einteilung der Tumoren basierend auf ihrem genetischen Hintergrund ermöglichte.

### 3.2 Analyse von konditionellen *Ptch*<sup>flox</sup>-knockout-Mäusen: Allgemeine Charakterisierung und Induktion von BCC

In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass *Ptch*-Mutationen auch für die Entstehung des sporadischen BCC ursächlich sind. Diese Hypothese wird durch eine erhöhte Expression von *Gli1* und *Ptch* in nahezu allen BCC gestützt, was auf eine generelle Aktivierung des Hh/*Ptch*-Signalweges in diesen Tumoren hinweist (M Evangelista *et al.*, 2006). Tatsächlich haben molekulare Untersuchungen an sporadischen BCC gezeigt, dass in ca. 50 % der Fälle somatische, d. h. erworbene heterozygote oder homozygote *Ptch*-Mutationen in den Tumorzellen vorliegen. BCC entwickeln sich auch in verschiedenen Tiermodellen, bei denen die Hh/*Ptch*-Signalkaskade in der Haut dereguliert ist. So entstehen diese Tumoren bei *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen, dazu müssen die Tiere jedoch bestrahlt werden (M Mancuso *et al.*, 2004; S Pazzaglia *et al.*, 2004). Da durch die Bestrahlung viele unspezifische Veränderungen in der Haut hervorgerufen werden, ist fraglich, inwiefern dieses Modell tatsächlich nur den Effekt von *Ptch*-Mutationen darstellt.

In unserem Labor wurde eine konditionelle *Ptch*<sup>flox</sup>-knockout-Maus generiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Charakterisierung dieser Maus beigetragen und analysiert, ob sich in dieser Maus BCC induzieren lassen.

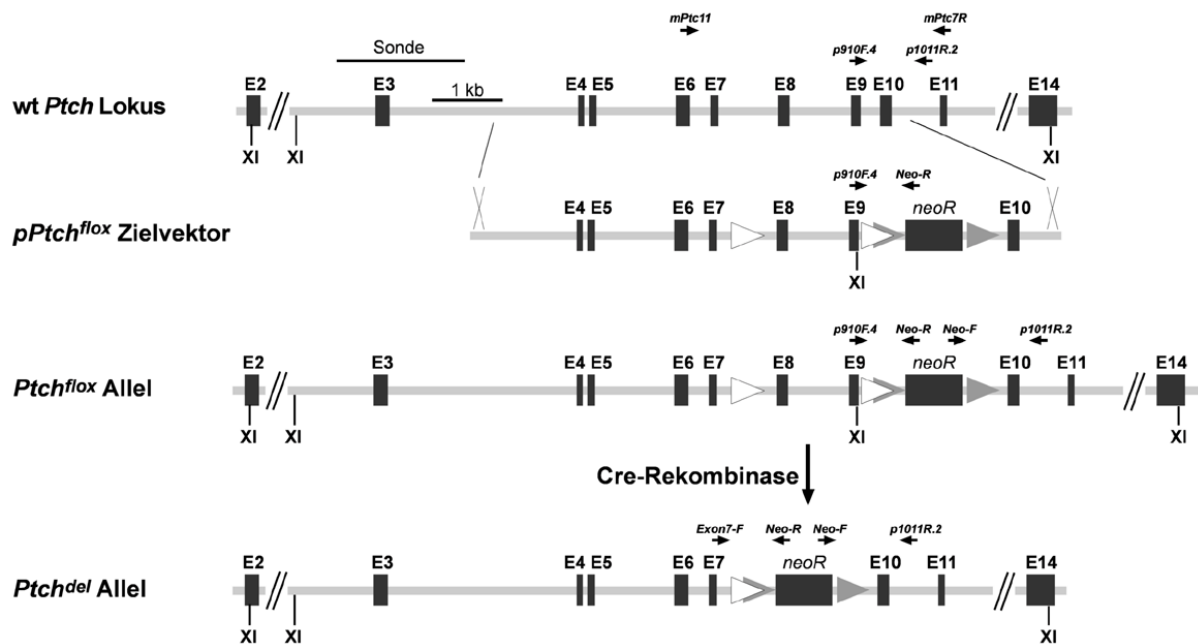
#### 3.2.1 Allgemeine Charakterisierung

##### 3.2.1.1 *Ptch*-Transkription und Spleißen von *Ptch*-Transkripten

In Abbildung 10 sind das wt (Wildtyp) *Ptch*-Allel, der für die Generierung der Mauslinie *Ptch*<sup>flox</sup> verwendete Zielvektor (*pPtch*<sup>NX</sup>) sowie das *Ptch*<sup>flox</sup>- und das *Ptch*<sup>del</sup>-Allel dargestellt. Im *Ptch*<sup>flox</sup>-Lokus befinden sich *loxP*-Sequenzen in Intron 7 und Intron 9. Sie ermöglichen die Deletion der Exone 8 und 9 durch eine Cre-Rekombinase-vermittelte

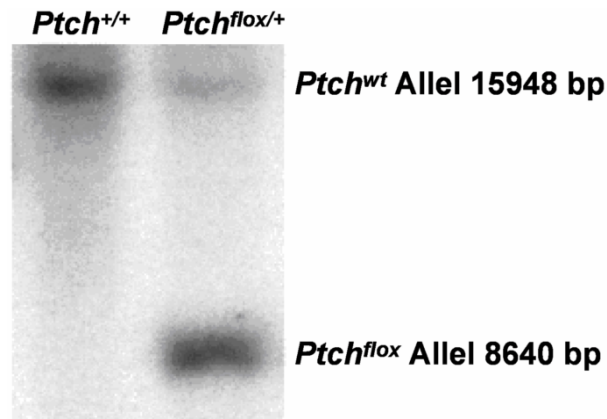


Rekombination, wodurch das *Ptch<sup>del</sup>*-Allel entsteht. Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters und dadurch zum vorzeitigen Abbruch der Translation. Die im Intron 9 liegende Neomycin-Resistenzkassette ist durch *frt*-Konsensussequenzen flankiert, die eine Deletion dieser Resistenzkassette mit Hilfe einer speziellen Rekombinase (FLPase) ermöglichen, falls sie die korrekte Transkription des *Ptch<sup>fllox</sup>*-Allels stören sollte. Der Zielvektor *pPtch<sup>NX</sup>* wurde in unserem Labor von Milena Koleva generiert.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung einer konditionellen *Ptch*-Deletion.** Dargestellt sind die *wt Ptch*-, *Ptch<sup>fllox</sup>*- und *Ptch<sup>del</sup>*-Allele sowie der für die homologe Rekombination verwendete *pPtch<sup>fllox</sup>*-Zielvektor. Das *Ptch<sup>fllox</sup>*-Allel verfügt in den Introns 7 und 9 über je eine *loxP*-Sequenz und in Intron 9 über eine *frt*-Sequenz-flankierte Neomycin-Resistenzkassette (*neoR*). Durch die Cre-Rekombinase-vermittelte Rekombination der *loxP*-Sequenzen erfolgt eine Deletion der Exone 8 und 9 (*Ptch<sup>del</sup>*-Allel). Für Genotypisierungen und RT-PCR-Analysen benutzte Oligonukleotide (Pfeile) und die Lokalisation der für Southern Blot-Analysen verwendeten Sonde sind eingezeichnet. Abkürzungen: E, Exon; XI, *Xho*I

Weiterhin sind in Abbildung 10 die Positionen der im Rahmen dieser Arbeit für Genotypisierungen verwendeten Oligonukleotide und der Sonde für Southern Blot-Analysen zu entnehmen. Die Genotypisierung des *Ptch<sup>fllox</sup>*-Lokus erfolgte mittels PCR und wurde gegebenenfalls anhand von Southern Blot-Analysen durch mich verifiziert (siehe Abbildung 11).

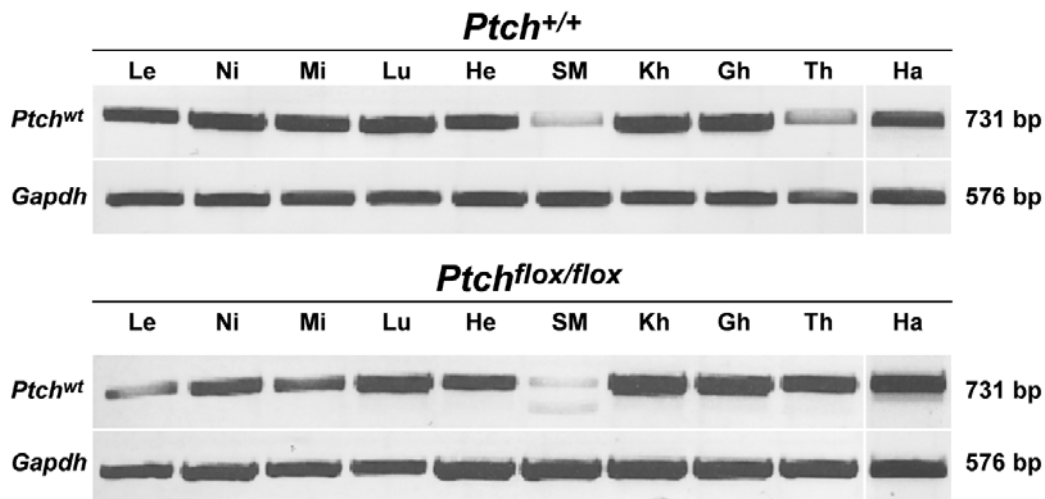


**Abbildung 11: Southern Blot-Analyse von  $Ptch^{+/+}$ - und  $Ptch^{flox/+}$ -Mäusen.** Mit *XhoI* erfolgte die Restriktionshydrolyse der gDNA aus Schwanzbiopsien von  $Ptch^{+/+}$ - und  $Ptch^{flox/+}$ -Mäusen. Die Southern Blot-Analyse wurde mit der in Abbildung 10 eingezeichneten Sonde durchgeführt.

Die Expression von *Ptch*-Transkripten wurde in diversen Organen aus  $Ptch^{+/+}$ - und  $Ptch^{flox/flox}$ -Tieren mittels RT-PCR-Analysen untersucht. Dazu wurden die Oligonukleotide *mPtc11* und *mPtc7R* verwendet (siehe Tabelle 6), die sowohl die Detektion des  $Ptch^{wt}$ -Transkriptes (731 bp) als auch des  $Ptch^{del}$  Transkriptes (451 bp) ermöglichen. Wie in Abbildung 12 gezeigt, wurde in allen analysierten Organen das  $Ptch^{wt}$ -Transkript nachgewiesen. Daher konnte eine Beeinträchtigung des Spleißens durch die *loxP*-Sequenzen oder das Neomycin-Resistenzgen ausgeschlossen werden. In SM von  $Ptch^{+/+}$ -Mäusen wurde eine bekannte Spleißvariante von *Ptch* gefunden, die durch das Spleißen von Exon 9 in Exon 11 entsteht ( $Ptch^{\Delta 10}$ ) und anhand einer Sequenzanalyse bestätigt wurde.

Weder in  $Ptch^{flox/flox}$ - noch in  $Ptch^{flox/+}$ -Tieren wurden in einem Zeitraum von 15 Monaten Tumoren gefunden, die Tiere waren phänotypisch unauffällig, fertil und das  $Ptch^{flox}$ -Allel wurde im Mendelschen Verhältnis vererbt.

Somit konnte gezeigt werden, dass Transkription und Spleißen von *Ptch* in  $Ptch^{flox/flox}$ -Tieren nicht beeinträchtigt sind und die Tiere eine normale Entwicklung aufweisen. Daher war die Deletion des Neomycin-Resistenzgens mit Hilfe einer FLPase-exprimierenden Mauslinie nicht nötig.



**Abbildung 12: *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Mäuse exprimieren *Ptch*<sup>wt</sup>-Transkripte.** Zur Untersuchung der *Ptch*-Expression wurden RT-PCR-Analysen an cDNA von *Ptch*<sup>+/+</sup>- und *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Tieren von verschiedenen Organen durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide *mPtc11* und *mPtc7R* hybridisieren in Exon 6 bzw. Exon 11. Im SM der *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Maus wurde eine Spleißvariante nachgewiesen, die von K. Nagao *et al.* beschrieben wurde (K Nagao *et al.*, 2005a; K Nagao *et al.*, 2005b). Als Kontrolle der cDNA diente die Amplifikation von *Gapdh*-Transkripten. Abkürzungen: Le, Leber; Ni, Niere; Mi, Milz; Lu, Lunge; He, Herz; SM, Skelettmuskel; Kh, Kleinhirn; Gh, Großhirn; Th, Thymus; Ha, Haut.

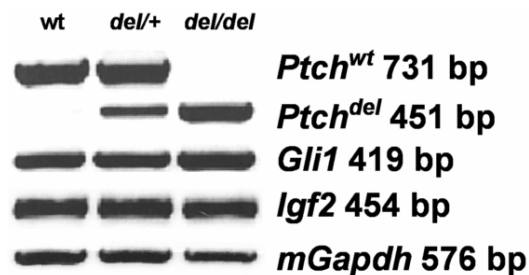
### 3.2.1.2 Deletion von *Ptch* in der Keimbahn

Konventionelle *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse sind für die Entwicklung von RMS und MB prädisponiert. Dagegen sterben homozygot mutante *Ptch*<sup>neo67/neo67</sup>-Embryonen aufgrund von Neuralrohr- und Herzdefekten zwischen 9,0 und 10,5 *dpc in utero* (LV Goodrich *et al.*, 1997; H Hahn *et al.*, 1998).

Um den Phänotyp von *Ptch*<sup>del/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/del</sup>-Tieren mit demjenigen der *Ptch*<sup>neo67</sup>-Nullmutation zu vergleichen, wurden männliche *Ptch*<sup>flox/+</sup>-Mäuse mit weiblichen *Tg(Ella-Cre)*-Mäusen (M Lakso *et al.*, 1996) verpaart. In *Tg(Ella-Cre)*-Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter dem *Ella*-Promotor exprimiert, der ausschließlich während der ersten meiotischen Teilung der Keimbahnzellen aktiv ist. Durch eine Geschwisterverpaarung der resultierenden *Ptch*<sup>del/+</sup>-Mäuse konnten *Ptch*<sup>+/+</sup>-, *Ptch*<sup>del/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/del</sup>-Embryonen generiert und analysiert werden.

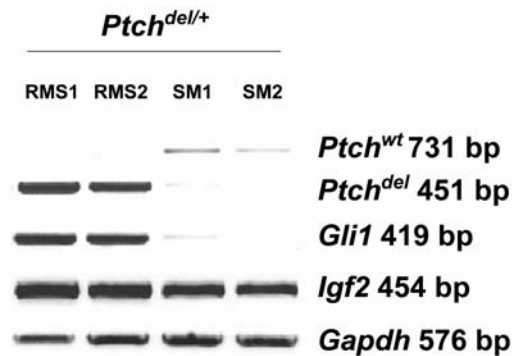
Wie in der Dissertation von Anja Uhmman (2005) bereits beschrieben, ist die homozygote Keimbahnmutation *Ptch*<sup>del/del</sup> embryonal letal, wobei der Phänotyp (Verschlussdefekte des Neuralrohrs) und der Zeitpunkt des Todes zwischen dem Tag 9,0 und 10,5 *dpc in utero* mit dem von *Ptch*<sup>neo67/neo67</sup>-Embryonen übereinstimmen. In adulten *Ptch*<sup>del/+</sup>-Mäusen wurde ebenso wie in *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Tieren die Entwicklung von RMS und MB beobachtet.

Zur Untersuchung der Expression der Hh/Ptch-Zielgene in 9,5 bis 10,5 Tage alten *Ptch*<sup>+/+</sup>-, *Ptch*<sup>del/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/del</sup>-Embryonen wurden *Ptch*, *Gli1* und *Igf2* mittels RT-PCR analysiert. Da für die Amplifikation von *Ptch* die Oligonukleotide *mPtc11* und *mPtc7R* (Tabelle 6) verwendet wurden, konnten *Ptch*<sup>wt</sup>- und *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte unterschieden werden. Wie in Abbildung 13 gezeigt, konnte das *Ptch*<sup>wt</sup>-Transkript ausschließlich in *Ptch*<sup>+/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/+</sup>-Embryonen nachgewiesen werden, während in *Ptch*<sup>del/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/del</sup>-Embryonen das *Ptch*<sup>del</sup>-Transkript exprimiert wurde. Des Weiteren war eine leicht erhöhte Expression von *Gli1* in *Ptch*<sup>del/del</sup>-Embryonen erkennbar, *Igf2* dagegen zeigte eine normale Expression im Vergleich zu *Ptch*<sup>+/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/+</sup>-Embryonen. Sequenzanalysen der amplifizierten Transkripte aus *Ptch*<sup>del/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/del</sup>-Embryonen belegen die Deletion der Exone 8 und 9 des *Ptch*<sup>del</sup>-Transkriptes.



**Abbildung 13:** *Ptch*<sup>del/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/del</sup>-Embryonen exprimieren das *Ptch*<sup>del</sup>-Transkript. Embryonen im Alter von 9,5 und 10,5 dpc wurden isoliert und anhand der gDNA der Dottersäcke genotypisiert. Expressionsanalysen für *Ptch*, *Gli1* und *Igf2* erfolgten mittels RT-PCR an cDNA von *Ptch*<sup>+/+</sup>-, *Ptch*<sup>del/+</sup>- und *Ptch*<sup>del/del</sup>-Embryonen. Für den Nachweis der *Ptch*-Transkripte dienten die Oligonukleotide *mPtc11* und *mPtc7R*. Für die Analyse der Expression von *Gli1* und *Igf2* wurden die Oligonukleotide *mGliF8* und *mGliR9* bzw. *Igf2 TaqManF* und *Igf2 Exon6R* (siehe Tabelle 6) verwendet. Zur Kontrolle der cDNA erfolgte die Amplifikation von *Gapdh*-Transkripten.

Auch in RMS aus adulten *Ptch*<sup>del/+</sup>-Mäusen wurde die Expression von Hh/Ptch-Zielgenen untersucht. Mittels RT-PCR erfolgte die Expressionsanalyse von *Ptch*, *Gli1* und *Igf2*. In Abbildung 14 ist die erhöhte Expression aller drei Transkripte im Vergleich zu SM dieser Tieren erkennbar, wobei die Zunahme bei *Igf2* sehr moderat war. Ausschließlich *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte waren in den untersuchten RMS detektierbar. Die Sequenz der Transkripte wurde anhand einer Sequenzanalyse bestätigt.



**Abbildung 14: Erhöhte Aktivität der Hh/Ptch-Signalkaskade in RMS aus  $Ptch^{del/+}$ -Mäusen.** RT-PCR-Analysen wurden an cDNA von RMS und SM aus  $Ptch^{del/+}$ -Mäusen für  $Ptch$ ,  $Gli1$  und  $Igf2$  durchgeführt. Dabei wurden die Oligonukleotidpaare  $mPtc11 // mPtc7R$ ,  $mGliF8 // mGliR9$  bzw.  $Igf2 TaqManF // Igf2 Exon6R$  verwendet. Zur Kontrolle der cDNA wurden  $Gapdh$ -Transkripte amplifiziert.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Cre-Rekombinase eine effiziente Deletion der geflochtenen  $Ptch$ -Sequenz hervorruft. Der Phänotyp von adulten  $Ptch^{del/+}$ -Mäusen entspricht demjenigen von konventionellen heterozygoten knockout-Mäusen ( $Ptch^{neo67/+}$ ). Diese Analysen weisen somit darauf hin, dass Mäuse mit dem  $Ptch^{flox}$ -Allel ein geeignetes Modell für die Analyse einer gewebs- und/oder zeitspezifischen Deletion von  $Ptch$  sind. Daher sollte mit Hilfe dieser Maus eine konditionelle homozygote Deletion von  $Ptch$  in der Haut und somit die Induktion von BCC möglich sein.

### 3.2.1.3 Deletion von $Ptch$ in adulten $Ptch^{flox}$ -Mäusen und Induktion von BCC-Vorläuferläsionen

Um  $Ptch$  in adulten Mäusen zu deletieren, wurden  $Ptch^{flox/flox}$ -Mäuse mit  $ROSA26ERT2$ -Mäusen, die im Folgenden als  $ERT2$  bezeichnet werden, gekreuzt.  $ERT2$ -Mäuse exprimieren eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase (Cre-ERT2) unter der Kontrolle des endogenen  $ROSA26$ -Promotors (D Hameyer *et al.*, 2007). Durch systemische oder lokale Gabe von Tamoxifen kann die Cre-ERT2 im Tier aktiviert werden.

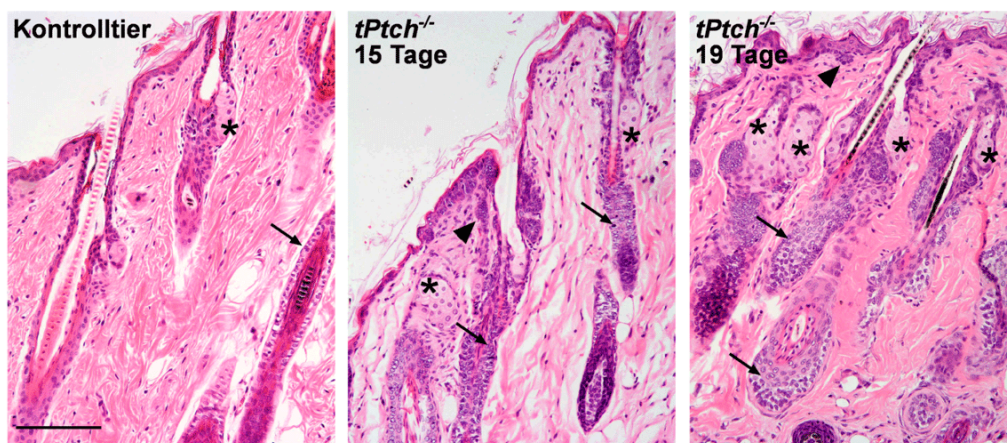
#### 3.2.1.3.1 Deletion von $Ptch$ durch i.p. Gabe von 5 mg Tamoxifen

Die systemische Induktion der Cre-ERT2 erfolgte in sechs bis acht Wochen alten  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäusen durch die Verabreichung einer Gesamtdosis von 5 mg Tamoxifen. Dabei wurde jeweils 1 mg des Medikaments an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die nach diesem Schema i.p. behandelten  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Tiere werden im Folgenden als „ $tPtch^{-/-}$ “-Mäuse bezeichnet.

Kontrolltiere wurden entsprechend mit dem Lösungsmittel für Tamoxifen (Emulsion aus Ethanol und Sonnenblumenöl; siehe 2.15.4.1.7) behandelt. Weiterhin wurden als Kontrollen Tamoxifen-behandelte *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>-/-</sup>*-Mäuse eingesetzt, die keine Cre-ERT2 exprimieren.

### 3.2.1.3.2 BCC-Vorläuferläsionen und andere Anomalien in *tPtch<sup>-/-</sup>*-Mäusen

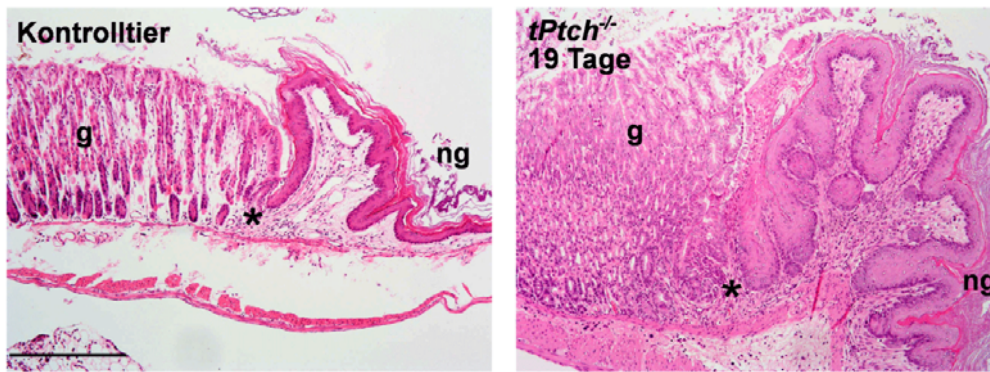
Bereits zehn Tage nach der ersten Injektion zeigten *tPtch<sup>-/-</sup>*-Mäuse phänotypische Veränderungen. Nach 19 Tagen wurde anhand von histologischen Analysen eine Hyperproliferation diverser Gewebe festgestellt. Wie in Abbildung 15 erkennbar, zeigten sich tatsächlich proliferative Veränderungen in der interfollikulären und follikulären Epidermis. Aufgrund einer rapiden Verschlechterung der körperlichen Verfassung mussten die Tiere spätestens 23 Tage nach der ersten Tamoxifen-Injektion getötet werden. Daher konnte nicht untersucht werden, ob sich BCC aus den proliferativen Veränderungen entwickelt hätten.



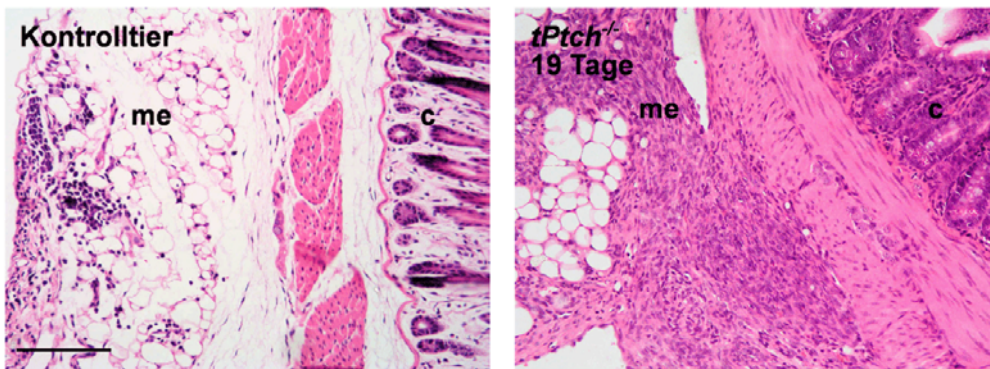
**Abbildung 15: Hyperproliferation der Epidermis in *tPtch<sup>-/-</sup>*-Mäusen.** Gezeigt sind HE-gefärbte Paraffinschnitte der Haut aus *tPtch<sup>-/-</sup>*-Mäusen 15 Tage und 19 Tage nach der ersten Tamoxifen-Injektion und aus einem Lösungsmittel-behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Kontrolltier. Hyperproliferative Bereiche der Epidermis sind mit Pfeilköpfen markiert, Pfeile kennzeichnen die äußere Wurzelscheide der Haarfollikel und Sterne die Talgdrüsen. Der Balken entspricht 2 mm im Präparat.

Dennoch wurden diverse weitere Analysen an diesen Tieren durchgeführt. So zeigten auch die Magenwand (Abbildung 16) und das Mesenterium starke hyperproliferative Veränderungen (Abbildung 17). Herz, Lunge, Leber, Niere, Pankreas und SM waren indes nicht betroffen (nicht gezeigt).





**Abbildung 16: Hyperproliferative Bereiche des Magens aus  $tPtch^{-/-}$ -Mäusen.** Dargestellt sind HE-gefärbte Paraffinschnitte einer  $tPtch^{-/-}$ -Maus 19 Tage nach der ersten Tamoxifen-Injektion und einer Lösungsmittel-behandelten  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Maus. Der Übergang des nicht-glandulären, kutanen (ng) Magens zum glandulären, mukösen Magen (g) ist mit Sternchen markiert. Der Balken entspricht 5 mm im Präparat.

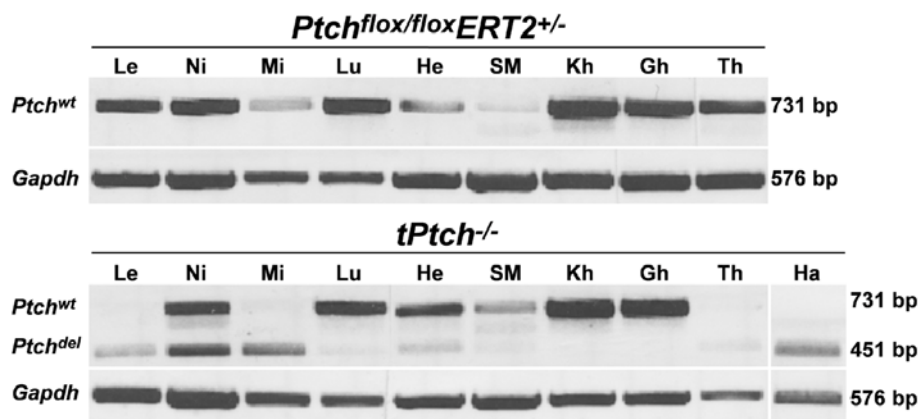


**Abbildung 17: Hyperproliferative Bereiche des Mesenteriums von  $tPtch^{-/-}$ -Mäusen.** Dargestellt sind HE-gefärbte Paraffinschnitte einer  $tPtch^{-/-}$ -Maus 19 Tage nach der ersten Tamoxifen-Gabe im Vergleich zu einer Lösungsmittel-behandelten  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Maus. Der Balken entspricht 2 mm im Präparat. Abkürzungen: c, Magenkorpus, me, Mesenterium.

Des Weiteren zeigten  $tPtch^{-/-}$ -Mäuse im Gegensatz zu Kontrolltieren eine dramatische Verkleinerung des Thymus mit morphologischen Veränderungen und eine starke Verminderung der Thymozytenzahl (Dissertation Anja Uhmann, 2005). Anhand von durchflusszytometrischen Analysen wurde ein Entwicklungsdefekt der Thymozyten in einem frühen Stadium nachgewiesen. Ebenso war in der Milz eine Verringerung der B-Lymphozyten erkennbar, die auf einem Defekt in der frühen Differenzierung dieser Zellen beruht. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die  $Ptch$ -Mutation in  $tPtch^{-/-}$ -Mäusen bereits einen Entwicklungsdefekt der allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark bewirkte. Zellen der myeloischen Linie und deren Entwicklung waren im Gegensatz zu Zellen der lymphoiden Linie nicht gestört.

Im Rahmen der Charakterisierung von *tPtch*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde in dieser Arbeit die Expression von *Ptch*-Transkripten und weiteren Zielgenen des Hh/Ptch-Signalweges in verschiedenen Organen analysiert. Dabei wurde die Expression in Organen einer *tPtch*<sup>-/-</sup>-Maus 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe mit der in Organen unbehandelter *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>- bzw. *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Mäuse verglichen (die Daten für die *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Maus sind in Abbildung 12 dargestellt). Die *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Kontrolle wurde verwendet, um die Grundaktivität der Cre-ERT2 ohne Gabe von Tamoxifen zu charakterisieren.

Die Analysen zeigten, dass unbehandelte *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäuse keine detektierbaren Level an *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripten exprimieren (siehe Abbildung 18). Jedoch konnten *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte in allen analysierten Organen der *tPtch*<sup>-/-</sup>-Maus mit Ausnahme von Klein- und Großhirn nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Dabei variierte die Expression von *Ptch*<sup>wt</sup>- und *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripten in unterschiedlichen Organen z. T. beträchtlich. Aufgrund der geringen Aktivität des *ROSA26*-Promotors in Groß- und Kleinhirn (D Hameyer *et al.*, 2007) wurden in diesen Geweben keine *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte exprimiert. Zusätzlich zu *Ptch*<sup>wt</sup> wurde im SM aller untersuchten Tiere die bereits unter 3.2 beschriebene Spleißvariante *Ptch*<sup>Δ10</sup> detektiert und anhand einer Sequenzanalyse bestätigt.



**Abbildung 18: Expression von *Ptch* in Organen von *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>- und *tPtch*<sup>-/-</sup>-Tieren.** RT-PCR-Analysen für die Expression von *Ptch* wurden an cDNA einer unbehandelten *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>- und einer *tPtch*<sup>-/-</sup>-Maus 15 Tage nach der ersten Tamoxifengabe aus verschiedenen Organen mit den Oligonukleotiden *mPtc11* und *mPtc7R* durchgeführt. Im SM wurde eine von K. Nagao *et al.* beschriebene Spleißvariante nachgewiesen (K Nagao *et al.*, 2005a; K Nagao *et al.*, 2005b). Als Kontrolle der cDNA diente die Amplifikation von *Gapdh*-Transkripten. Abkürzungen: Le, Leber; Ni, Niere; Mi, Milz; Lu, Lunge; He, Herz; SM, Skelettmuskel; Kh, Kleinhirn; Gh, Großhirn; Th, Thymus; Ha, Haut.

Die Analyse der Expression von *Gli1*- und *Igf2*-Transkripten, deren Expressionsstärke zur Bestimmung der Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges nach einer *Ptch*-Mutation herangezogen werden kann, zeigte keine Unterschiede zwischen der Tamoxifen-



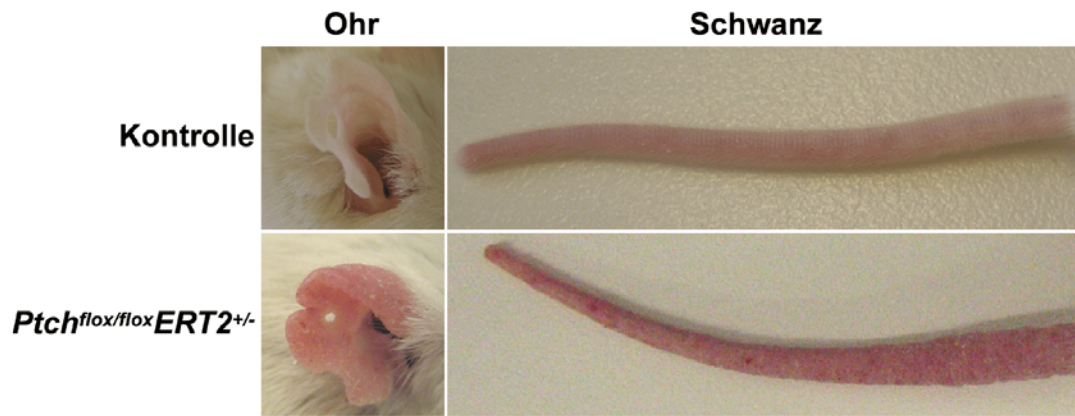
behandelten *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Maus und den beiden untersuchten Kontrolltieren (nicht gezeigt).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Eigenaktivität der Cre-ERT2 *in vivo* unter dem detektierbaren Niveau liegt und dass sich die Cre-ERT2 durch eine i.p. Injektion von 5 mg Tamoxifen sehr gut aktivieren lässt. Durch diese Aktivierung wird *Ptch* in adulten *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen in allen Organen mit der Ausnahme von Klein- und Großhirn mutiert. Obwohl keine Zunahme der Aktivität der Hh/Ptch-Signalkaskade bei RT-PCR-Analysen erkennbar war, führte die Induktion der *Ptch*-Mutation in adulten Mäusen zur Hyperproliferation der Epidermis, der Magenwand und des Mesenteriums sowie zu einem Entwicklungsdefekt der allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen. Die Tiere mussten aufgrund eines sehr schlechten Allgemeinzustandes jedoch 23 Tage nach der ersten Tamoxifen-Injektion abgetötet werden. Diese Daten wurden in der Zeitschrift *Blood* publiziert (A Uhmann *et al.*, 2007).

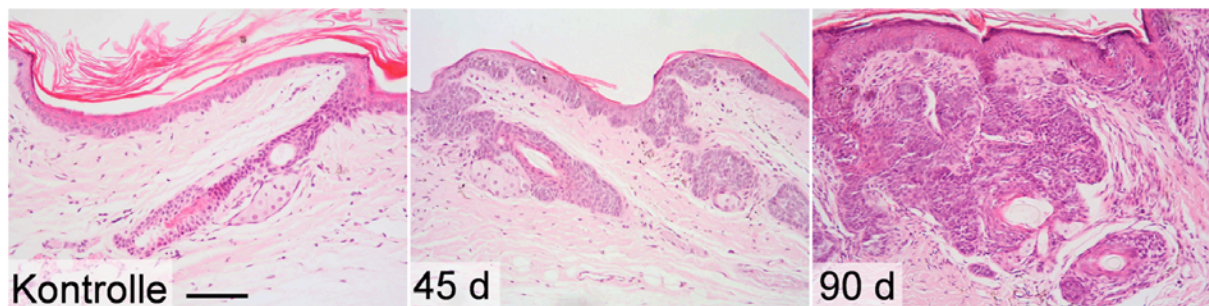
### 3.2.2 Induktion von BCC durch i.m. Gabe von 100 µg Tamoxifen

Wie unter 3.2.1.3.2 erläutert, bewirkte die i.p. Injektion von 5 mg *Tamoxifen* bei *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen eine Hyperproliferation der Haut. Diese Läsionen wurden als Vorläufer von BCC identifiziert. Interessanterweise entwickelten jedoch *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäuse, denen eine Dosis von 100 µg Tamoxifen intramuskulär (i.m.) in den *Musculus soleus* injiziert wurde, BCC an der unbehaarten Haut (siehe Abbildung 19). Da diese Tiere auch im Alter keine weiteren Organveränderungen und keine Entwicklung von RMS zeigten, wurden sie über Zeiträume bis zu 350 Tage nach der Tamoxifen-Injektion beobachtet.

Schon 45 Tage nach der Injektion waren BCC-Vorläuferläsionen an der interfollikulären und follikulären Epidermis histologisch erkennbar (siehe Abbildung 20). Innerhalb von 90 Tagen hatten sich aus diesen Vorläuferläsionen voll-ausgebildete BCC entwickelt.



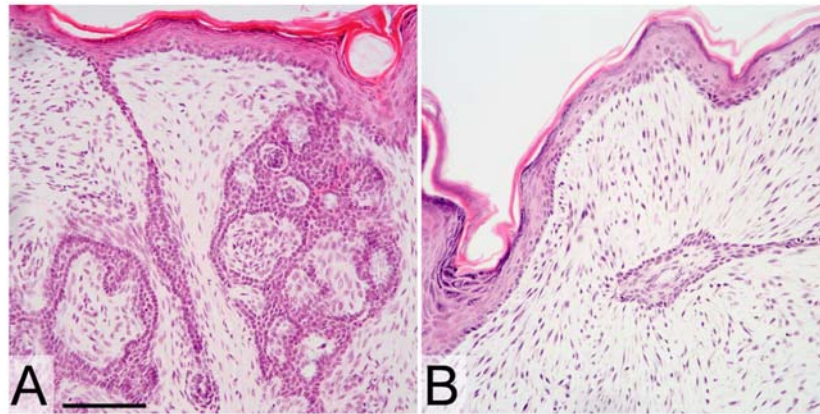
**Abbildung 19:** Induktion von BCC an Ohr- und Schwanzhaut in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen nach i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen. Dargestellt sind die Ohren und Schwänze einer *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Maus zehn Wochen nach der i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen und einer Lösungsmittel-behandelten Kontrollmaus.



**Abbildung 20:** Induktion von BCC in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen nach i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen. Dargestellt sind HE-Färbungen der Schwanzhaut von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen 45 und 90 Tage nach der i.m. Tamoxifen-Injektion und einer Lösungsmittel-behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Maus (Kontrolle). Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

An den Fußsohlen wurden ebenfalls Hauttumoren beobachtet, die als Trichoblastome identifiziert wurden (siehe Abbildung 21). Des Weiteren wurde am Schwanz einer Maus zusätzlich zu BCC ein Bindegewebstumor gefunden (Abbildung 21).

In der behaarten Haut entwickelte sich bei keinem Tier ein BCC, in Einzelfällen waren jedoch Vorläuferläsionen sichtbar. Ansonsten waren die Tiere phänotypisch unauffällig. In keiner der Lösungsmittel-behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*- oder Tamoxifen- oder Lösungsmittel-behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>-/-</sup>*-Mäuse wurden Hauttumoren oder andere Anomalien gefunden.



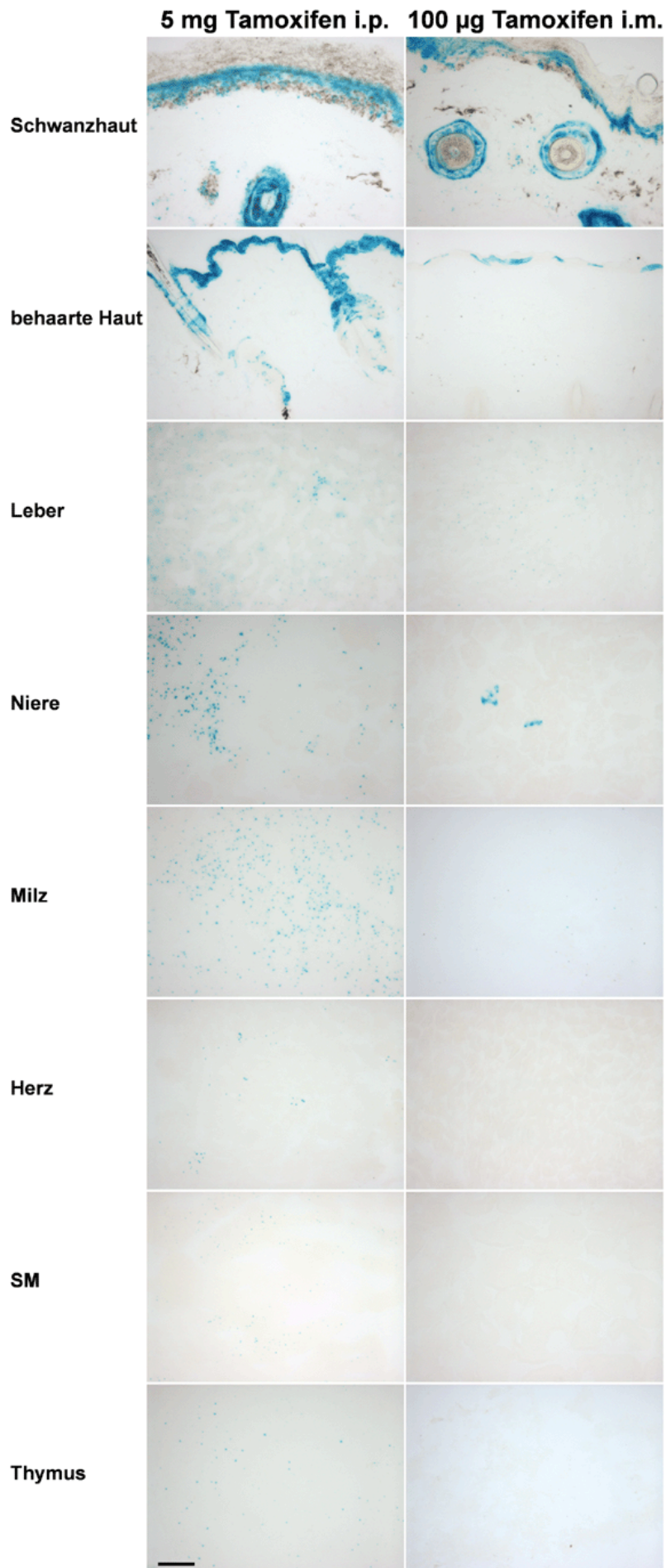
**Abbildung 21: Induktion von Trichoblastomen und eines Bindegewebstumors in  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäusen nach i.m. Injektion von 100  $\mu$ g Tamoxifen.** Gezeigt sind HE-Färbungen eines Trichoblastoms (A) und eines Bindegewebstumors (B) von  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäusen, denen 100  $\mu$ g Tamoxifen i.m. appliziert wurde. Der Balken entspricht 1 mm im Präparat.

### 3.2.2.1 *In vivo*-Analyse der Tamoxifen-induzierten Aktivität der Cre-ERT2 in ROSA26-R-Reporterermäusen

Da eine i.m. Injektion von Tamoxifen in  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Mäuse ausschließlich die Entwicklung von Hauttumoren induzierte und keine weiteren Auffälligkeiten festgestellt wurden, erfolgte eine Analyse der Tamoxifen-induzierten Aktivität der Cre-ERT2 in ROSA26-R-Reporterermäusen. Bei ROSA26-R-Reporterermäusen befindet sich im endogenen ROSA26-Lokus eine *loxP*-Sequenz-flankierte Neomycin-Resistenzkassette mit nachgeschaltetem  $\beta$ -Galaktosidasegen. Durch Cre-ERT2-vermittelte Rekombination der *loxP*-Sequenzen wird die Neomycin-Resistenzkassette deletiert, und es kommt somit zur Expression des  $\beta$ -Galaktosidasegens.

Die Expression des  $\beta$ -Galaktosidasegens wurde in doppelt heterozygoten  $ROSA26ERT2^{+/-};ROSA26-R^{+/-}$ -Mäusen nach der i.m. Injektion von 100  $\mu$ g Tamoxifen in verschiedenen Organen untersucht. Zum Vergleich wurde zusätzlich eine  $ROSA26ERT2^{+/-};ROSA26-R^{+/-}$ -Maus mit 5 mg Tamoxifen (i.p.) behandelt. Fünf Tage nach der ersten Injektion wurden die Organe der Tiere zur Analyse entnommen. Anhand einer X-Gal-Färbung an Kryoschnitten der Organe konnte die Aktivität der Cre-ERT2 festgestellt werden (siehe Abbildung 22).

Dabei zeigte sich, dass eine i.m. Injektion von Tamoxifen die Aktivierung der Cre-ERT2 in der Epidermis, insbesondere in der unbehaarten Haut von Ohren und Schwanz, bewirkt. Eine fokale X-Gal-Färbung wurde in der Niere detektiert, des Weiteren fanden sich schwache Färbungen in Leber, Milz und Lunge. Keinerlei Aktivität war im Herz, Thymus, SM und in Reproduktionsorganen nachweisbar.



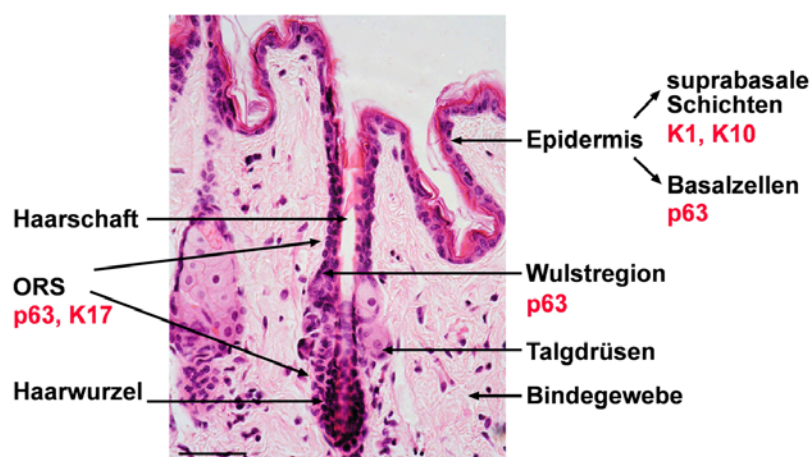
**Abbildung 22: Nachweis der Tamoxifen-induzierten Aktivität der Cre-ERT2 in ROSA26-R-Reportermäusen.** Gezeigt sind X-Gal-Färbungen an Kryoschnitten von Organen aus ROSA26-R-Reportermäusen nach Induktion der Cre-ERT2 durch Tamoxifen. Die Bilder in der linken Spalte stammen aus Organen einer Maus, der 5 mg Tamoxifen i.p. injiziert wurden, rechts finden sich Bilder der Organe einer mit 100 µg Tamoxifen i.m. injizierten Maus. Der Balken entspricht 0,5 mm im Präparat.



Die i.p. Gabe von 5 mg Tamoxifen hingegen führte zur Aktivität der Cre-ERT2 in allen untersuchten Organen. Dabei wurde die stärkste X-Gal-Färbung in der Epidermis, die schwächste in der Lunge gefunden. Diese Daten stimmen mit der Beobachtung überein, dass nach einer i.p. Applikation von 5 mg Tamoxifen hyperproliferative Veränderungen der Epidermis an behaarter und auch unbehaarter Haut bei *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen auftraten, wohingegen eine i.m. Applikation von 100 µg Tamoxifen ausschließlich die Entstehung von BCC in unbehaarter Haut bewirkte. Offensichtlich ist für eine Deletion von *Ptch* in behaarter Haut im Gegensatz zu unbehaarter Haut eine wesentlich höhere Tamoxifen-Dosis nötig.

### 3.2.2.2 Entstehung von BCC aus Basalzellen und der äußeren Wurzelscheide

Wie in Abbildung 20 erkennbar, entstehen Vorläuferläsionen 45 Tage nach der Tamoxifen-Injektion an der interfollikulären Epidermis und den Haarfollikeln. Zu Beginn der Charakterisierung von BCC aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen waren die Zellen, aus denen sich die Tumoren entwickeln, noch nicht genau bekannt. Als Ursprungszellen wurden jedoch die Basalzellen und Zellen des Haarfollikels (siehe Abbildung 23 und 1.4.4) vermutet (K Kruger *et al.*, 1999; JP Lacour, 2002). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression von Proteinen, die spezifisch in verschiedenen Kompartimenten der Haut lokalisiert sind, in BCC aus Tamoxifen-behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen anhand von Immunfärbungen analysiert.

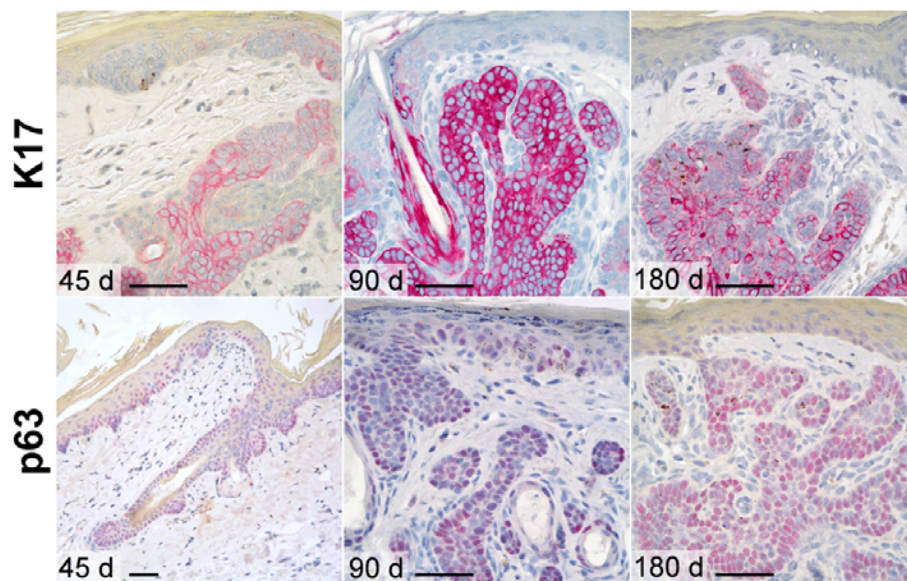


**Abbildung 23: Struktur eines Haarfollikels.** Gezeigt ist der Aufbau eines Haarfollikels anhand einer HE-Färbung eines Paraffinschnittes von normaler muriner Haut. In der Wulstregion sind die Stammzellen des Haarfollikels lokalisiert. Bei einigen Strukturen ist in roter Schrift ein jeweils spezifischer Marker angegeben. Der Balken entspricht 0,5 mm im Präparat. Abkürzungen: K1, Keratin 1; K10, Keratin 10; K17, Keratin 17; ORS, äußere Wurzelscheide.

Als Marker für die Zellen der äußeren Wurzelscheide (engl.: „outer root sheath“ – ORS) dienten Keratin 17 (K17) und p63, wobei p63 in normaler Haut nicht nur in der ORS, sondern auch in Basalzellen exprimiert wird (A Yang *et al.*, 1998). Spezifische Marker für die suprabasalen Schichten der Epidermis und die innere Wurzelscheide (engl.: „inner root sheath“ – IRS) des Haarfollikels sind Keratin 1 (K1) und Keratin 10 (K10) (E Fuchs, 1993).

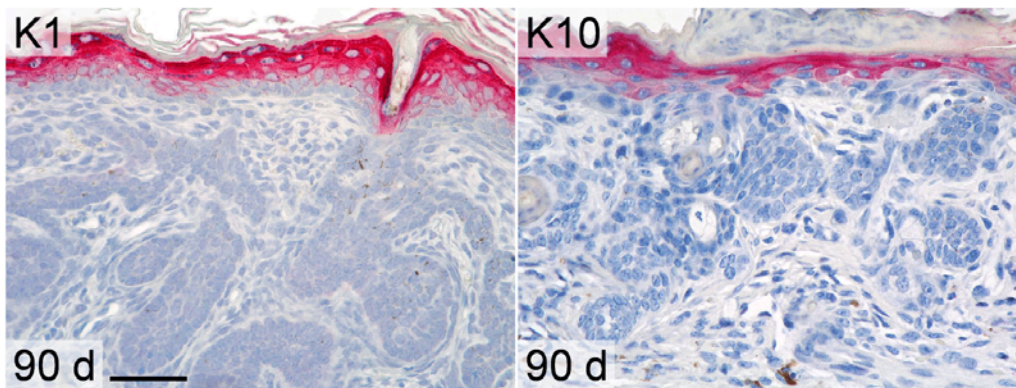
In allen analysierten BCC wurde die Expression von K17 nachgewiesen. Wie in Abbildung 24 erkennbar, wurde K17 sowohl in Vorläuferläsionen als auch in BCC späteren Stadien am Tag 90 und 180 nach der Induktion exprimiert. Weiterhin zeigten sowohl alle untersuchten BCC-Vorläuferläsionen als auch voll-ausgebildeten BCC die Expression von p63 (siehe Abbildung 24). Im Gegensatz zu p63 wurde K17 jedoch nicht in allen Vorläuferläsionen der interfollikulären Epidermis exprimiert (siehe Abbildung 24). Dies betraf insbesondere von Haarfollikeln entfernt liegende Tumorknötchen.

Zusammengefasst könnten diese Daten als Hinweise für die Entstehung von BCC aus Zellen der ORS sowie unabhängig davon aus Basalzellen gewertet werden.



**Abbildung 24: Expression von K17 und p63 in BCC.** Gezeigt sind immunhistochemische Färbungen (Chromogen: Neufuchsin) für K17 und p63 an BCC 45 d, 90 d und 180 d nach der Tamoxifen-Injektion. Die Balken entsprechen 0,5 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

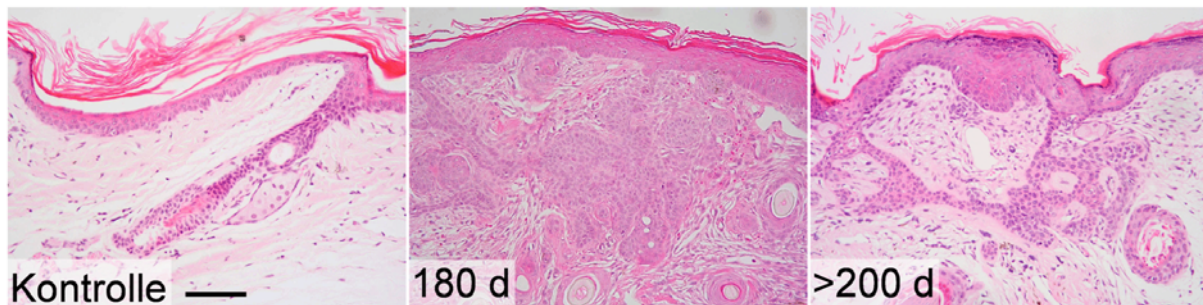
Darüber hinaus wurde untersucht, ob BCC in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen auch aus Zellen der IRS entstehen. Anhand von Immunfärbungen an Vorläuferläsionen (nicht gezeigt) und BCC 90 Tage nach Tamoxifen-Injektion wurde nachgewiesen, dass weder K1 noch K10 von den Tumoren exprimiert wurde (Abbildung 25). Daher wurden Zellen der IRS als Ursprungszellen für BCC ausgeschlossen.



**Abbildung 25: BCC entstehen nicht aus der IRS oder suprabasalen Zellen.** Immunhistochemische Färbungen (Chromogen: Neufuchsin) für K1 und K10 wurden an BCC aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen 90 Tage nach der Tamoxifen-Injektion durchgeführt. Der Balken entspricht 0,5 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

### 3.2.2.3 Spontane Regression von BCC

Einige BCC-tragende Mäuse wurden für Langzeitbeobachtungen der Tumoren über 180 Tage oder länger überwacht. Anschließend wurden die Tumoren histologisch untersucht. Bis zu 90 Tage nach der Injektion zeigte sich eine deutliche Zunahme der Tumorgöße. Danach nahm das Tumolvolumen interessanterweise nicht mehr zu, sondern es zeigte sich vielmehr ein Rückgang des Tumorgewebes (siehe Abbildung 26).



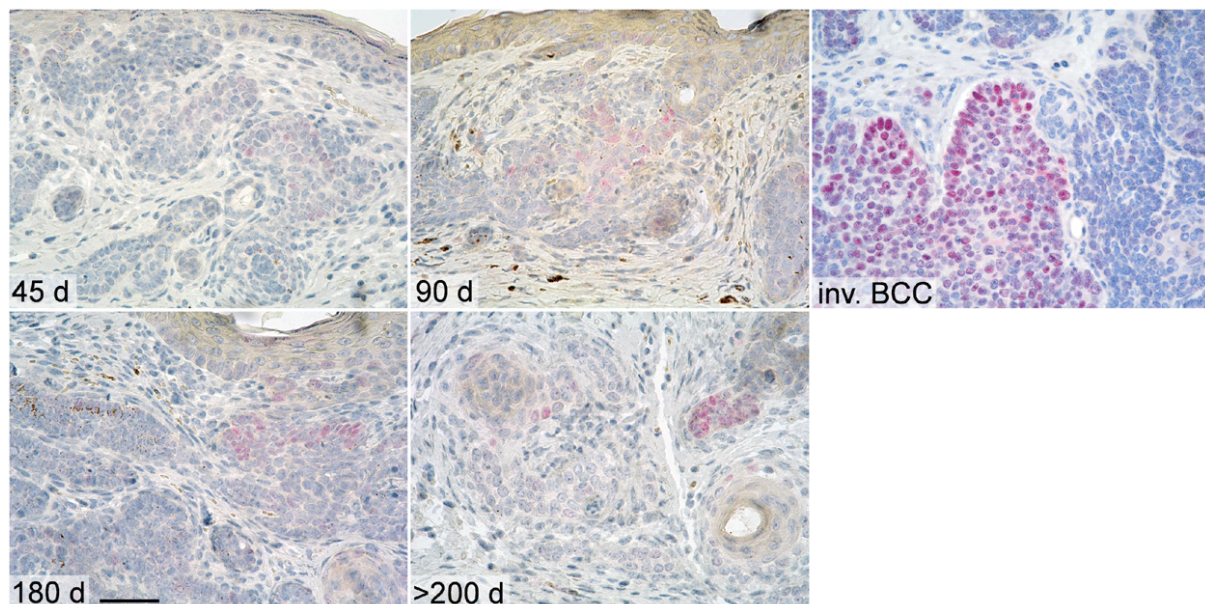
**Abbildung 26: Regression von BCC aus Tamoxifen-behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen in späten Stadien.** Dargestellt sind HE-Färbungen der Schwanzhaut von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen 180 und mehr als 200 Tage nach der i.m. Tamoxifen-Injektion und einer Lösungsmittel-behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Maus (Kontrolle). Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

Acht von zehn untersuchten BCC, die älter als 200 Tage waren, zeigten eine fast vollständige Tumorregression. Zwei weitere BCC bestanden nach 350 Tagen zwar noch aus soliden Tumorknötchen, jedoch waren auch diese Tumoren deutlich kleiner als BCC 90 Tage nach der Induktion. BCC dieser späten Stadien wurden mehreren erfahrenen Pathologen vorgelegt. Ihren Diagnosen zufolge handelt es sich um regrediente BCC, die



einen hohen Differenzierungsgrad zeigen, so dass sie teilweise Ähnlichkeiten zu Trichoepitheliomen (TE) aufwiesen.

Zu keinem Zeitpunkt waren Anzeichen für eine Invasivität der BCC erkennbar. Dies konnte auch mittels p53-spezifischer Immunfärbungen gezeigt werden. So exprimieren invasive BCC, welche durch ionisierende Strahlung in *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen induziert wurden (M Mancuso *et al.*, 2004), sehr stark p53 (Abbildung 27). Wie in Abbildung 27 gezeigt, wurde p53 jedoch nur sehr fokal in BCC von Tamoxifen-induzierten *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen exprimiert und weite Tumorbereiche zeigten überhaupt keine p53-Expression. Daher ist anzunehmen, dass die DNA-Integrität der Tumoren in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen zu allen Zeitpunkten gewährleistet war.

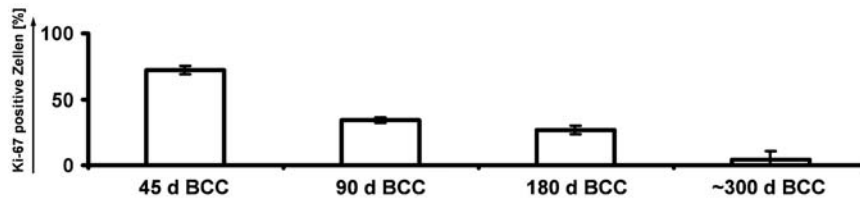


**Abbildung 27: Fokale Expression von p53 in BCC.** Gezeigt sind immunhistochemische Färbungen (Chromogen: Neufuchsin) für p53 an Paraffinschnitten von verschiedenen BCC-Stadien von *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen und von einem invasiven BCC aus einer bestrahlten *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Maus. Der Balken entspricht 0,5 mm im Präparat. Abkürzungen: d, Tage; inv. invasiv.

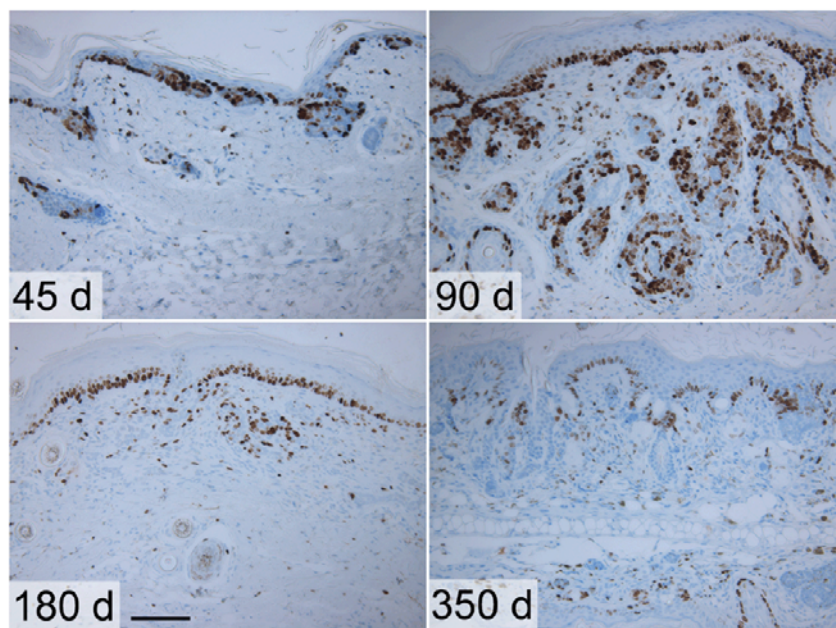
Um die Vorgänge der spontanen Regression der BCC näher zu charakterisieren, wurden Analysen zur Bestimmung der Apoptose- und Proliferationsraten durchgeführt. Zur Bestimmung der Proliferation wurde in den Tumoren die Expression von Ki-67, einem Markerprotein für proliferierende Zellen, bestimmt. Zur Ermittlung des Proliferationsindex wurden für jeden analysierten Zeitpunkt Paraffinschnitte der Schwanzhaut von zwei verschiedenen Tamoxifen-injizierten *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen verwendet. Von jedem Tier wurden zwischen 650 und 2900 Tumorzellen ausgezählt, anhand des Anteils der Ki-67-positiven Zellen an den ausgezählten Tumorzellen wurde der Proliferationsindex berechnet.



Wie in Abbildung 28 dargestellt, nahm der Proliferationsindex mit steigendem Tumoralter deutlich ab. Während BCC nach 45 Tagen ca. 72 % Ki-67 positive Zellen enthielten, sank der Anteil in BCC nach ~300 Tagen auf 5 %. Abbildung 29 zeigt für jeden analysierten Zeitpunkt einen repräsentativen Ausschnitt der immunhistochemischen Färbung von Ki-67.



**Abbildung 28: Abnahme des Proliferationsindex bei zunehmendem Tumoralter.** Gezeigt ist der Proliferationsindex von BCC 45, 90, 180 und 300 Tage nach der Tamoxifen-Injektion. Für jeden Zeitpunkt wurden zwei Tiere analysiert und jeweils zwischen 650 und 2900 Zellen ausgezählt. Abkürzung: d, Tage.



**Abbildung 29: Abnahme der Proliferation bei zunehmendem Tumoralter.** Dargestellt sind immunhistochemische Färbungen (Substrat: DAB) für den Proliferationsmarker Ki-67 an BCC von *Ptch<sup>flx/flx</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen 45, 90, 180 und 350 Tage nach der Tamoxifen-Injektion. Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

Zusätzlich zur Proliferationsrate wurde die Apoptoserate der Tumoren ermittelt. Dies erfolgte durch immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von aktiver Caspase-3, einem zentralen Enzym in der Signaltransduktion der Apoptose, und durch das sogenannte *in situ* end labeling (nicht gezeigt), wodurch die bei der Apoptose vorliegenden DNA-Strangbrüche dargestellt werden können. Für die Bestimmung der Apoptoserate wurden die Caspase-3 positiven Zellen ausgezählt. Anhand dieser

Analysen wurde gezeigt, dass der Anteil Caspase-3 positiver Zellen in allen Tumorstadien zwischen 0 und 3 ‰ lag (nicht gezeigt). Dabei war die Apoptoserate unabhängig vom Tumoralter.

### 3.2.2.4 Expressionsanalysen von *Ptch* in BCC

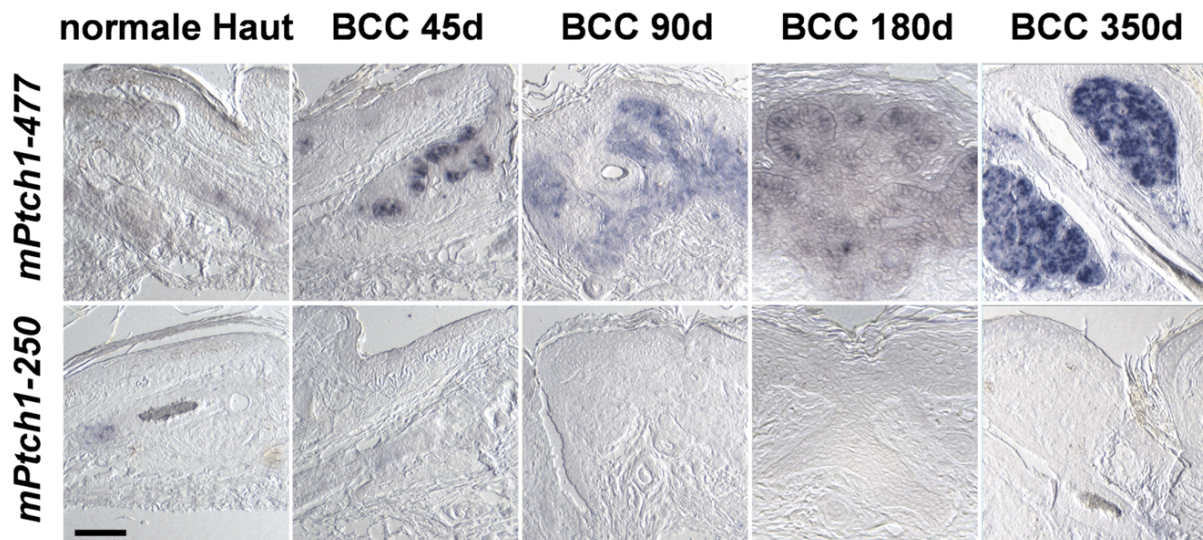
Um zu überprüfen, ob die spontane Regression der BCC mit einer verminderten Aktivität des Hh/*Ptch*-Signalweges einhergehen könnte, wurde die Aktivität des Signalweges analysiert. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen und *in situ*-Hybridisierungen an Paraffinschnitten sowie qRT-PCR-Analysen von Zielgenen des Signalweges in BCC durchgeführt.

Die Expression von *Ptch*<sup>wt</sup>- und *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripten wurde mittels *in situ*-Hybridisierungen mit zwei unterschiedlichen Sonden von Mark Wijgerde (Erasmus Universität, Rotterdam) analysiert. Mit Hilfe der Sonde *Ptch1-259* wurden aufgrund der Hybridisierung mit der Sequenz der Exone 8 und 9 ausschließlich *Ptch*<sup>wt</sup>-Transkripte detektiert. Zum Nachweis einer die Exone 2 bis 6 umfassenden Sequenz wurde die Sonde *Ptch1-472* verwendet. Mit dieser Sonde konnten daher sowohl *Ptch*<sup>wt</sup>- als auch *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte detektiert werden. Daher musste es sich bei Signalen, die mit der Sonde *Ptch1-472*, nicht aber mit Sonde *Ptch1-259* detektiert wurden, um *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte handeln. Die verwendeten Sonden sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30: *Ptch*-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung.** Gezeigt sind die ersten 10 Exone von *Ptch* und die Lage der Sonden *Ptch1-472* und *Ptch1-259* für *in situ*-Hybridisierung. *Ptch1-472* umfasst die Exone 2 bis 6, während *Ptch1-259* mit der Sequenz der Exone 8 und 9 hybridisiert. Die Exone 8 und 9, die durch Cre-ERT2-vermittelte Rekombination in *Ptch*<sup>flx/flx</sup>ERT2<sup>+/-</sup>-Mäusen deletiert werden können, sind farblich hervorgehoben.

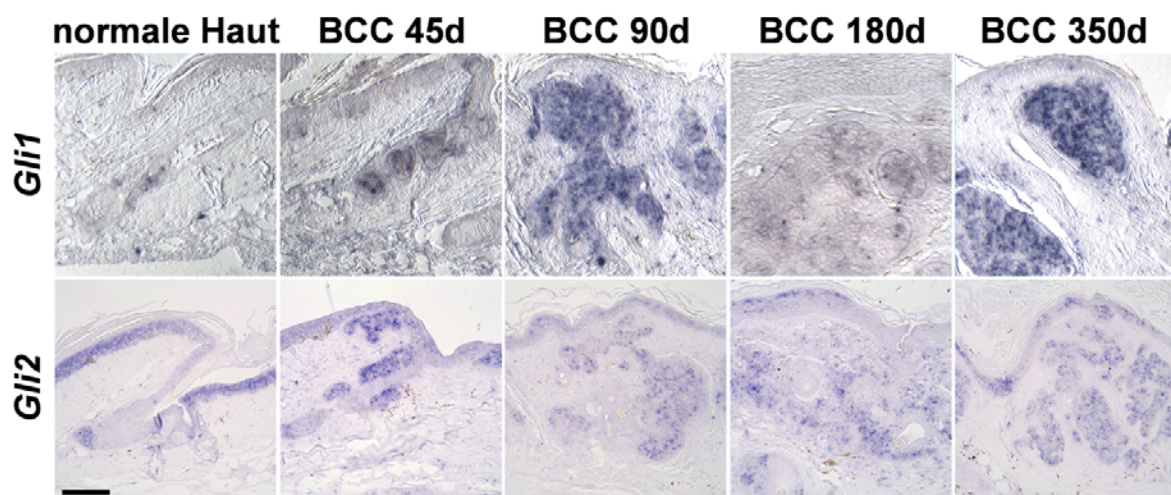
In Haarfollikeln von normaler Haut wurden mit beiden Sonden *Ptch*-Transkripte im unteren Abschnitt des Haarfollikels nachgewiesen. Dagegen wurden *Ptch*-Transkripte in allen analysierten BCC ausschließlich mit der Sonde *Ptch1-472* detektiert (siehe Abbildung 31). Diese Ergebnisse zeigen, dass BCC *Ptch* überexprimieren und dass diese Überexpression ausnahmslos auf *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte zurückzuführen war. Das Fehlen der *Ptch*<sup>wt</sup>-Transkripte zeigte, dass *Ptch* biallelisch in den Tumoren deletiert war.



**Abbildung 31: Biallelische Deletion von *Ptch* in BCC.** Gezeigt sind *in situ*-Hybridisierungen an Paraffinschnitten von verschiedenen alten BCC und an normaler Haut mit den *Ptch*-spezifischen Sonden *mPtch1-250* und *mPtch1-477*. Die Sonde *mPtch1-477* dient dem Nachweis von *Ptch*<sup>wt</sup> und *Ptch*<sup>del</sup>, *mPtch1-250* hingegen ausschließlich der Detektion von *Ptch*<sup>wt</sup> (siehe auch Abbildung 30). Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

### 3.2.2.5 Expressionsanalysen von *Gli1* und *Gli2* in BCC

Die Überexpression von *Ptch* in BCC ließ vermuten, dass die Hh/*Ptch*-Signalkaskade in diesen Tumoren aktiviert ist. Dies wurde durch Expressionsanalysen von *Gli1* und *Gli2* bestätigt (siehe Abbildung 32).



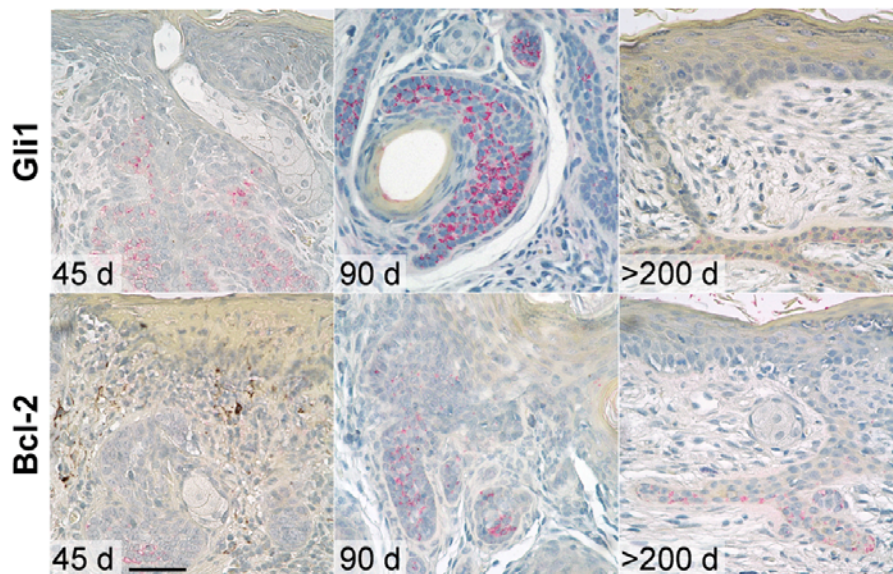
**Abbildung 32: Expression von *Gli1* und *Gli2* in BCC.** *In situ*-Hybridisierungen wurden mit *Gli1*- und *Gli2*-spezifischen Sonden an Paraffinschnitten von normaler Haut und verschiedenen alten BCC durchgeführt. Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

So konnte von Mark Wijgerde (Erasmus Universität, Rotterdam) eine *Gli1*-Expression mittels *in situ*-Hybridisierungen in allen untersuchten Tumorstadien nachgewiesen



werden. Die physiologische Expression von *Gli1* in normaler Haut beschränkt sich auf die Haarfollikel. Auch *Gli2* wurde in allen analysierten BCC überexprimiert. In normaler Haut wurde *Gli2* in den Haarfollikeln und in der Epidermis exprimiert, wobei die Expression schwächer als im Tumorgewebe war.

Die Signalwegsaktivität wurde auch anhand von immunhistochemischen Färbungen für *Gli1* und *Bcl-2*, einem Zielgen von *Gli1*, bestätigt. In allen Tumorstadien war eine zytoplasmatische Expression von *Gli1* und *Bcl-2* nachweisbar (siehe Abbildung 33).

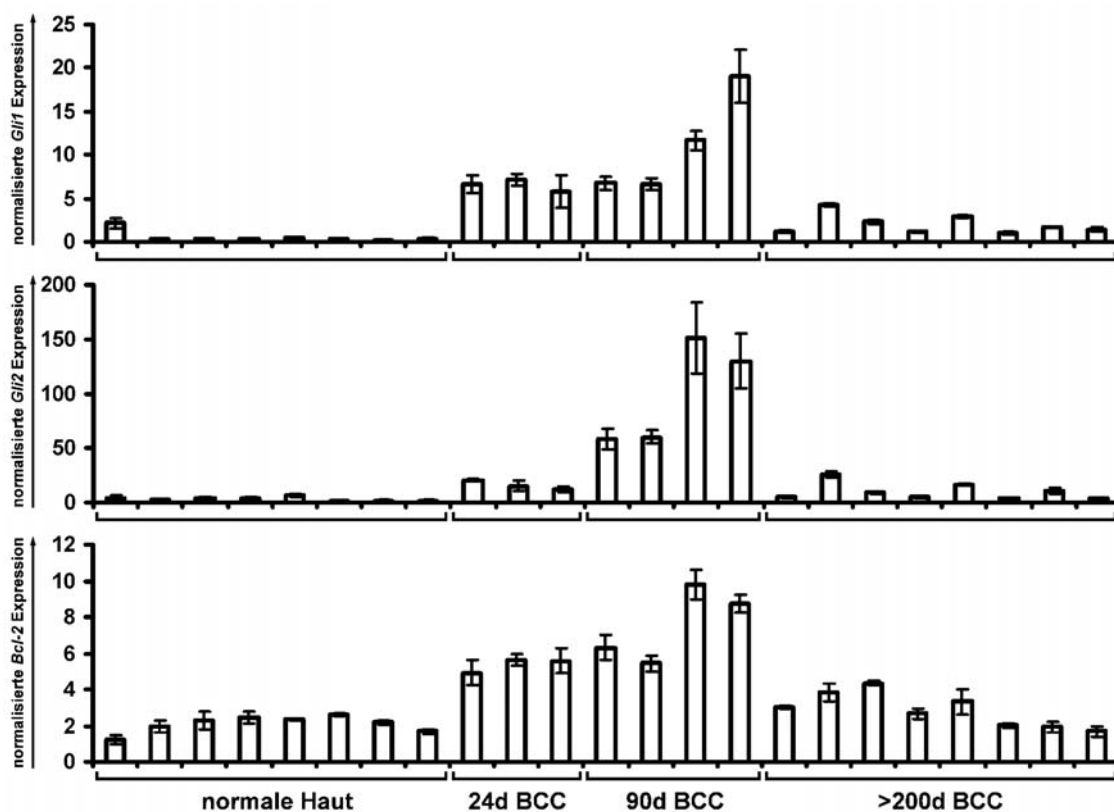


**Abbildung 33: *Gli1* und *Bcl-2* sind in BCC fokal exprimiert.** Gezeigt sind immunhistochemische Färbungen (Chromogen: Neufuchsin) für *Gli1* und *Bcl-2* an Paraffinschnitten von verschiedenen BCC-Stadien. Der Balken entspricht 0,5 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

Die Expression der Zielgene *Gli1*, *Gli2* und *Bcl-2* wurde auch mittels qRT-PCR in der Haut von Mäusen mit BCC-Vorläuferläsionen, voll-ausgebildeten und regredienten BCC analysiert. Dazu wurde RNA aus der Schwanzhaut von drei Tieren mit Vorläuferläsionen (24 Tage nach Tamoxifen-Gabe), vier mit voll-ausgebildeten (90 Tage nach Tamoxifen-Gabe) und acht mit regredienten BCC (>200 Tage nach Tamoxifen-Gabe) isoliert. Als Kontrollen dienten sowohl Lösungsmittel-behandelte *Ptch*<sup>fllox/fllox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäuse als auch Lösungsmittel- oder Tamoxifen-behandelte *Ptch*<sup>fllox/fllox</sup>*ERT2*<sup>-/-</sup>-Tiere, von denen die Hautproben 66 bis 365 Tage nach Tamoxifen-Gabe entnommen wurden.

Während die Expression von *Gli1*, *Gli2* und *Bcl-2* in der Haut von Kontrolltieren, unabhängig von Alter, Genotyp oder Tamoxifen- bzw. Lösungsmittelgabe sehr niedrig war, war sie in der Haut von Tieren mit BCC erhöht (siehe Abbildung 34). Dabei war sie für alle drei Gene in BCC 90 Tage nach Tamoxifen-Injektion am höchsten (siehe Abbildung 34).

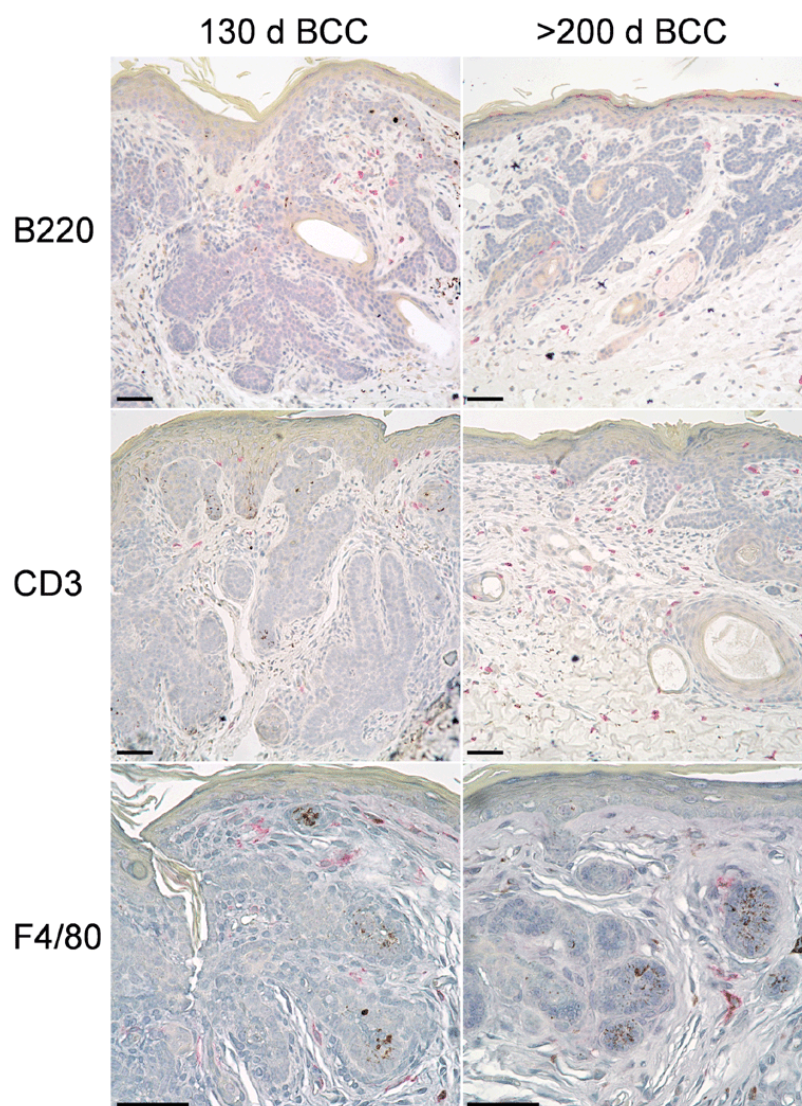
Allerdings muss bei diesen Daten beachtet werden, dass der Anteil von Tumorgewebe in den entnommenen Proben von Tieren mit voll-ausgebildeten BCC wesentlich größer war als bei Mäusen mit Vorläuferläsionen oder regredienten Tumoren. Ein direkter Vergleich der Signalwegsaktivität anhand der Expression von *Gli1*, *Gli2* und *Bcl-2* ist aus diesem Grund nur zwischen Vorläuferläsionen und regredienten BCC möglich, da bei der histologischen Abklärung dieser Stadien anteilig gleichviel Tumorgewebe vorhanden war. Im Vergleich zu regredienten BCC wurden, wie in Abbildung 34 dargestellt, *Gli1*, *Gli2* und *Bcl-2* in sehr viel stärkerem Ausmaß von den Proben mit BCC-Vorläuferläsionen exprimiert. So war die Expression der Gene *Gli1* und *Bcl-2* in Vorläuferläsionen teilweise mit derjenigen in voll-ausgebildeten BCC vergleichbar (siehe Abbildung 34). Dies lässt vermuten, dass die frühen Anfangsstadien von BCC eine hohe Hh/Ptch-Signalwegsaktivität aufweisen, die in voll-ausgebildeten Tumoren und auch im regredienten Stadium der Tumorentwicklung wieder abnimmt.



**Abbildung 34: Verringerte Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges in regredienten BCC.** Mittels qRT-PCR wurde die Expression von *Gli1*, *Gli2* und *Bcl-2* in normaler Haut von Kontrolltieren und in BCC 24, 90 und >200 Tage nach der Tamoxifen-Injektion analysiert. Dazu wurden die Oligonukleotidkombinationen *mGli1-tq-f* // *mGli1-tq-r*, *RT-PCR-F* // *mGli2* *RT-PCR-R* und *Bcl2-F1* // *Bcl2-R1* verwendet und die Expression anhand der *18S rRNA* normalisiert.

### 3.2.2.6 Immunphänotyp von BCC

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Regression der BCC und dem Immunsystem zu untersuchen, erfolgten immunhistochemische Analysen zum Nachweis von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen. Wie in Abbildung 35 erkennbar, konnten die entsprechenden Zellpopulationen vereinzelt im Bindegewebe und in seltenen Fällen direkt im Tumor detektiert werden. In keinem der Tumorstadien bestand eine massive Infiltration von B-Zellen, T-Zellen oder Makrophagen, und es waren auch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien festzustellen. Daher kann eine Korrelation zwischen einer Reaktion des Immunsystems und der Regression von BCC ausgeschlossen werden.

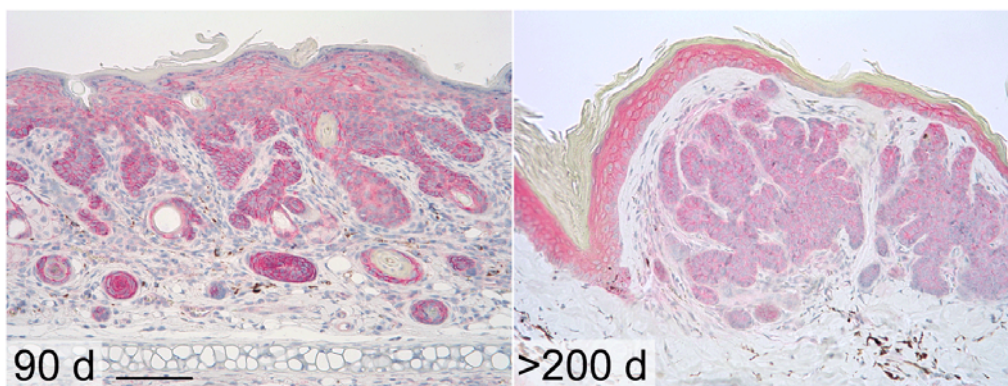


**Abbildung 35: BCC werden nicht durch B-Zellen, T-Zellen oder Makrophagen infiltriert.** Immunhistochemische Färbungen (Chromogen: Neufuchsin) für B220, CD3 und F4/80 zum Nachweis von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen wurden an BCC aus *Ptch<sup>flx/flx</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen 130 Tage und >200 Tage nach der Tamoxifen-Injektion durchgeführt. Die Balken entsprechen 0,5 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.



### 3.2.2.7 Analyse der kanonischen Wnt-Signalkaskade in BCC

In der Literatur gibt es Hinweise, dass eine aktive kanonische Wnt-Signalkaskade in BCC (L Lo Muzio *et al.*, 2002; M El-Bahrawy *et al.*, 2003), die sich durch eine nukleäre Expression von  $\beta$ -Catenin auszeichnet, mit einem erhöhten Proliferationsindex der Tumoren einhergeht (G Saldanha *et al.*, 2004). Daher war ein Zusammenhang zwischen einer Abnahme der Aktivität der kanonischen Wnt-Signalkaskade und der Regression von BCC denkbar. Unter dieser Annahme sollte die Wnt-Signalkaskade in frühen und voll-ausgebildeten BCC Stadien aktiviert sein, wohingegen die Aktivität in regredienten BCC abnehmen müsste. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde die Expression von  $\beta$ -Catenin in den Tumoren untersucht. Erst die nukleäre Translokation dieses Proteins bewirkt die Aktivierung von Zielgenen der kanonischen Wnt-Signalkaskade, deshalb ist die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Catenin essentiell zur Bewertung der Aktivität dieses Signalweges. Wie in Abbildung 36 dargestellt, wurde  $\beta$ -Catenin in der Epidermis, im Haarfollikel und in BCC nachgewiesen. Unabhängig vom Tumoralter exprimierten alle analysierten BCC  $\beta$ -Catenin, das jedoch nicht nukleär, sondern ausschließlich zytoplasmatisch oder membran-assoziiert lokalisiert war. Daher wurde angenommen, dass der kanonische Wnt-Signalweg bei der Genese von BCC keine Rolle spielt und damit ebensowenig mit der beobachteten Tumorregression in Verbindung steht.



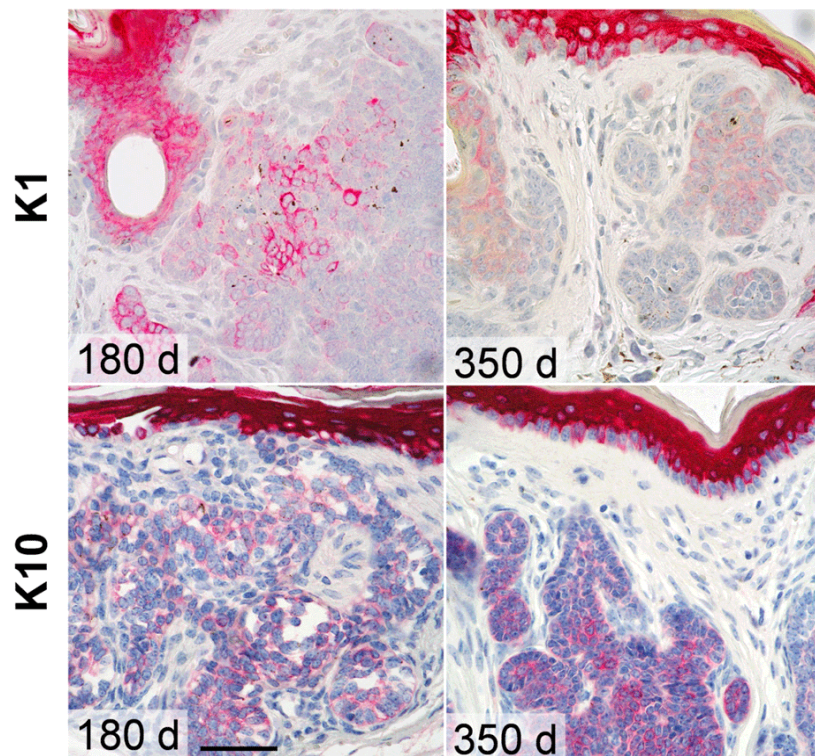
**Abbildung 36: Zytoplasmatische und membranassoziierte Expression von  $\beta$ -Catenin in BCC.** Gezeigt sind immunhistochemische Färbungen für  $\beta$ -Catenin an Paraffinschnitten von BCC aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen 90 Tage und >200 Tage nach der Tamoxifen-Injektion. Der Balken entspricht 1 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

### 3.2.2.8 Expressionsanalysen von Differenzierungsmarkern in regredienten BCC

Da die regredienten BCC histologisch einen wesentlich differenzierteren Phänotyp als Vorläuferläsionen oder voll-ausgebildete BCC aufwiesen (siehe 3.2.2.3 und Abbildung

26), wurde auch bei diesen Tumoren die Expression von K1 und K10 untersucht. Neben der Expression in der IRS werden K1 und K10 auch in suprabasalen, differenzierten Schichten der Epidermis exprimiert und dienen daher als Differenzierungsmarker.

Wie unter 3.2.2.2 beschrieben, wurde keine K1- oder K10-Expression im Tumorgewebe der frühen BCC-Stadien nachgewiesen. Interessanterweise wurde im Gegensatz zu BCC 45 oder 90 Tage nach Tamoxifen-Injektion (siehe Abbildung 25) in regredienten Tumoren die Expression von K1 und K10 im Tumorgewebe detektiert. Abbildung 37 zeigt die K1- und K10-Expression in Tumorzellen und in suprabasalen Schichten der Epidermis von BCC am Tag 180 und 350 nach der Induktion.

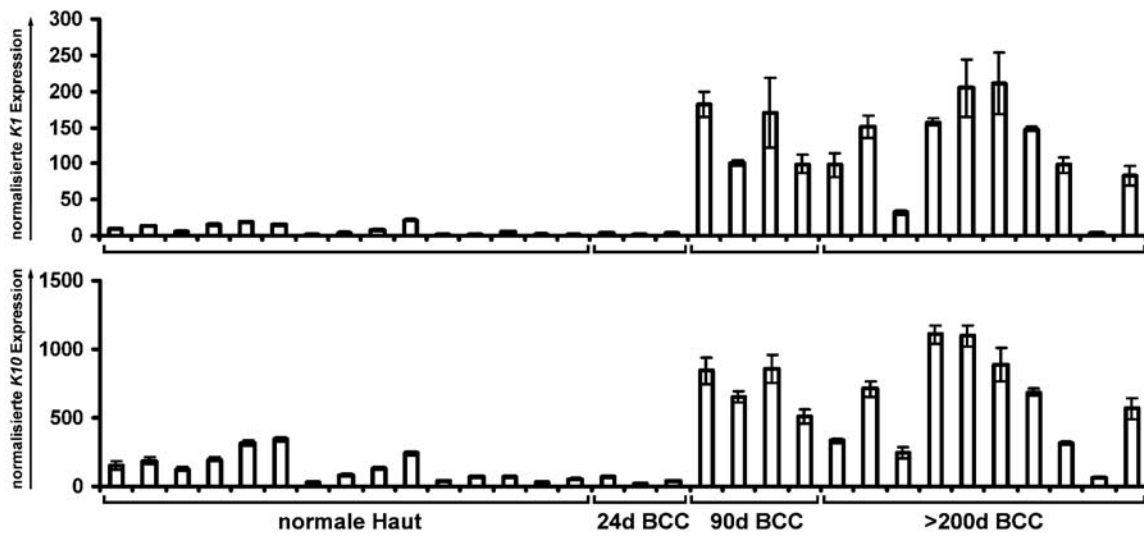


**Abbildung 37: Expression von K1 und K10 in regredienten BCC.** Immunhistochemische Färbungen (Chromogen: Neufuchsin) für die Differenzierungsmarker K1 und K10 wurden an BCC aus *Ptch<sup>flx/flx</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen 180 Tage und 350 Tage nach der Tamoxifen-Injektion durchgeführt. Der Balken entspricht 0,5 mm im Präparat. Abkürzung: d, Tage.

Um die Expression der beiden Differenzierungsmarker in regredienten Tumorstadien zu bestätigen, wurden qRT-PCR-Analysen für *K1* und *K10* an cDNA von Haut von Kontrolltieren, Vorläuferläsionen, voll-ausgebildeten und regredienten BCC durchgeführt. Während in der Haut von Kontrolltieren und Vorläuferläsionen kein wesentlicher Unterschied in der Expression von *K1* und *K10* erkennbar war, zeigten BCC ab einem Tumoralter von 90 Tagen eine deutliche Zunahme, wie in Abbildung 38 dargestellt. Interessanterweise blieb das Expressionsniveau in regredienten Stadien auf diesem



erhöhten Niveau, obwohl diese sehr viel weniger Tumorzellen als BCC nach 90 Tagen aufweisen (siehe oben). Somit ist eine deutliche Steigerung der *K1*- und *K10*-Expression in den Tumorzellen regredienter BCC anzunehmen. Anhand dieser Daten wurden die immunhistochemischen Färbungen an Paraffinschnitten von BCC 180 und 350 Tage nach Induktion, in denen *K1*- und *K10*-Expression erkennbar war, bestätigt. Dies bedeutet, dass die Tumorzellen in regredienten Tumoren tatsächlich einen differenzierteren Phänotyp aufweisen.



**Abbildung 38: Expression von Differenzierungsmarkern in BCC.** Mittels qRT-PCR wurde die Expression von *K1* und *K10* in normaler Haut von Kontrolltieren und in BCC 24, 90 und >200 Tage nach der Tamoxifen-Injektion analysiert. Dazu wurden die Oligonukleotidkombinationen *mK1-F // mK1-R* und *mK10-F // mK10-R* verwendet und die Expression anhand der *18S rRNA* normalisiert. Abkürzung: d, Tage.

### 3.2.2.9 Zusammenfassung der Charakteristika der induzierten BCC

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich in den Ohren und Schwänzen von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen nach i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen innerhalb von 90 Tagen BCC aus Zellen der ORS und aus Basalzellen entwickeln. Überraschenderweise erfolgt eine spontane Regression von BCC nach mehr als 200 Tagen im Anschluss an die Induktion. Dies wird durch den Rückgang des Tumorumfanges mit gleichzeitiger Abnahme des Proliferationsindex und völligem Fehlen von Invasivität deutlich. Die regredienten Tumoren zeigen interessanterweise histologisch eine Trichoblastom-ähnliche Morphologie.

Anhand von *in situ*-Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass *Ptch* biallelisch in allen Tumorstadien deletiert ist. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass sämtliche Tumoren eine aktive Hh/*Ptch*-Signalkaskade aufweisen, wobei die Aktivität jedoch möglicherweise

in den regredienten Stadien abnimmt. Auf eine Reaktion des Immunsystems ist die Regression der BCC nicht zurückzuführen, da keine Infiltration des Tumorgewebes mit Immunzellen vorliegt. Paradoxerweise ist die Apoptoserate der regredienten Tumoren sehr niedrig und auch im Vergleich zu BCC-Vorläufern oder voll-ausgebildeten Tumoren nicht erhöht. Anhand der Expressionsanalyse von  $\beta$ -Catenin in BCC kann zudem ein Zusammenhang zwischen Regression und der kanonischen Wnt-Signalkaskade ausgeschlossen werden. Dagegen ist die Regression mit einer erhöhten K1- und K10-mRNA- und Proteinexpression assoziiert, was auf einen Differenzierungsprozess in regredienten BCC hinweist.

### 3.2.3 Induktion von BCC in unterschiedlichen Phasen des Haarzyklus

Die Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges ist essentiell für die Regulation des Haarzyklus (N Sato *et al.*, 1999). Daher ist die Induktion von BCC im Zusammenhang mit den Haarzyklusphasen von besonderem Interesse. Die physiologische Aktivierung der Signalkaskade in adulter Haut ist im Wesentlichen auf das Anagen beschränkt (AE Oro und K Higgins, 2003). Möglicherweise reagieren die Zellen des Haarfollikels, die wie unter 3.2.2.2 beschrieben an der Ausbildung von BCC beteiligt sind, in verschiedenen Haarzyklusphasen unterschiedlich auf die Aktivität des Signalweges. So wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von *Gli1* in transgenen *K14-Gli1*-Mäusen während des Anagens zur Bildung epithelialer Tumoren führt (AE Oro und K Higgins, 2003). Weiterhin weist Haut von *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen eine hohe Inzidenz von BCC auf, wenn sie während des Anagens bestrahlt wird. In diesen Tieren treten BCC sehr viel seltener auf, wenn die Bestrahlung der Haut während des Telogens erfolgt (M Mancuso *et al.*, 2006).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen dem Haarzyklus und der Induktion von BCC in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen untersucht. Dabei sollte geklärt werden, ob BCC nur in bestimmten Haarzyklusphasen entstehen können bzw. ob sich derart induzierte BCC abhängig von der Haarzyklusphase zum Zeitpunkt der Induktion voneinander unterscheiden.

#### 3.2.3.1 Synchronisierung des Haarzyklus

Grundlegend für ein solches Experiment ist die Synchronisierung des Haarzyklus vor einer Tamoxifen-Induktion der Cre-ERT2. Durch Epilation, d. h. durch die Entfernung des Haares mitsamt Haarwurzel, kann der Eintritt des Haarzyklus in das Anagen hervorgerufen werden. Bei der Maus umfasst der Haarzyklus 25 Tage und kann sehr genau in die einzelnen Phasen Anagen, Katagen und Telogen eingeteilt werden (S

Muller-Rover *et al.*, 2001). Um BCC in einer bestimmten Phase zu induzieren, musste die Haut einer Maus mit Hilfe einer heißen 1:1 Mischung aus Bienenwachs und Kolophonium epiliert werden und die Behandlung mit Tamoxifen, abhängig von der gewünschten Haarzyklusphase, entsprechend später erfolgen.

### 3.2.3.2 Aktivierung der Cre-ERT2

Wie bereits oben beschrieben, bewirkt eine i.m. Injektion von Tamoxifen in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen keine Bildung von BCC in behaarter Haut. Daher wurde untersucht, ob sich BCC überhaupt in behaarter Haut durch Aktivierung der Cre-ERT2 induzieren lassen. Hierfür wurden zunächst doppelt heterozygote *ROSA26ERT2<sup>+/-</sup>*; *ROSA26-R<sup>+/-</sup>*-Mäuse verwendet (siehe 3.2.2.1), denen zwei ca. 2 cm<sup>2</sup> große Hautareale auf dem Rücken epiliert wurden. Anschließend wurden variable Mengen Tamoxifen in Ethanol/Sonnenblumenöl-Emulsion oder in DMSO auf die enthaarten Regionen aufgetragen und nach unterschiedlichen Zeiträumen gründlich mit Seife abgespült. Durch das Abspülen sollte verhindert werden, dass die Mäuse das Medikament während der Fellpflege oral und damit systemisch aufnehmen. Fünf Tage nach Tamoxifen-Applikation wurden die Tiere getötet und die behandelte Haut sowie innere Organe entnommen. Die Aktivität der Cre-ERT2 wurde durch eine X-Gal-Färbung an Kryoschnitten ermittelt. Dabei wurde die Cre-ERT2 mit Tamoxifen in DMSO besser aktiviert als mit Tamoxifen in einer Öl/Ethanol-Emulsion. Die stärkste lokale Blaufärbung ergab eine Applikation von 500 µg Tamoxifen in 20 µl DMSO auf einem 2 cm<sup>2</sup> großen Hautareal für zweimal 10 min, wobei beide Behandlungen mit einem zeitlichen Abstand von ca. 5 h erfolgten. Interessanterweise wurde durch diese lokale Applikation von Tamoxifen die Aktivität der Cre-ERT2 auch in Ohr- und Schwanzhaut, nicht aber in anderen Organen induziert (nicht gezeigt).

### 3.2.3.3 Induktion von BCC in unterschiedlichen Haarzyklusphasen

An *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen wurde nun untersucht, ob BCC nur in bestimmten Haarzyklusphasen entstehen. Bei den untersuchten Haarzyklusphasen handelt es sich um Anagen I, Anagen I-II, Anagen IV, Anagen VI, Katagen und Telogen. Zu diesem Zweck wurde der Haarzyklus im jeweiligen Hautareal 0 (d. h. am Tag der Tamoxifen-Behandlung), 2, 5, 8, 16 bzw. 24 Tage vor der lokalen Applikation von Tamoxifen durch Epilation synchronisiert. In Abbildung 39 ist dargestellt, in welchen Haarzyklusphasen die enthaarten Hautstellen zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Applikation waren.



**Tabelle 23: Entwicklung von BCC nach lokaler Applikation von Tamoxifen in definierten Haarzyklusphasen.** Dargestellt ist ein Überblick der durch die lokale Applikation von Tamoxifen während unterschiedlicher Haarzyklusphasen induzierten BCC. In der linken Spalte ist der Zeitpunkt der Präparation nach der Tamoxifen-Applikation angegeben, die mittlere Spalte zeigt die jeweilige Haarzyklusphase des Hautareals bei der Applikation von Tamoxifen. In der rechten Spalte sind die Tumoren nach ihrer Größe in die Kategorien 1 bis 4 eingeteilt, wobei die Kategorie 1 kleine und die Kategorie 4 große Tumoren umfasst. Jeder analysierte Tumor ist mit einem X eingetragen, XX steht für zwei Tumoren.

Präparation x Tage nach der Tamoxifen-Applikation	Haarzyklusphase zum Zeitpunkt der Tamoxifen-Applikation	Kategorie des Tumors			
		1	2	3	4
72-82 Tage	Anagen I		X		
	Anagen I-II				X
	Anagen IV		X		
	Anagen VI				X
	Katagen				X
	Telogen		X		
114-125 Tage	Anagen I	X			
	Anagen I-II		X		
	Anagen IV				X
	Anagen VI			XX	
	Katagen	X		X	
	Telogen				X
140 Tage	Anagen I				X
	Anagen I-II				X
	Anagen IV	kein Material vorhanden			
	Anagen VI	kein Material vorhanden			
	Katagen	kein Material vorhanden			
	Telogen	kein Material vorhanden			

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Induktion von BCC überraschenderweise zu jeder der analysierten Haarzyklusphasen möglich war. Ebenso wenig beeinflusst die Phase des Haarzyklus zum Zeitpunkt der Mutationsinduktion die Größe der BCC. Allerdings war die Anzahl der Tumorproben für eine Bewertung der Tumorgröße nach unterschiedlichen Zeiträumen sehr gering, so dass eine statistische Auswertung nicht möglich war.

### 3.2.4 Etablierung stabiler *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-, *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>- und *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zelllinien

Um *in vitro*-Analysen des hier beschriebenen konditionellen *Ptch*-knockout zu ermöglichen, wurden stabile Zelllinien aus *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>- und *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Mäusen

etabliert. Mit diesen Zelllinien können Untersuchungen hinsichtlich der Funktion von *Ptch* relativ einfach durchgeführt werden. Dieses Modell bietet im Gegensatz zu *in vivo*-Analysen den Vorteil, dass einheitliche Zellpopulationen durch die direkte Modifikation des Hh/Ptch-Signalweges, beispielsweise mit spezifischen Inhibitoren, unmittelbar analysiert werden können und keine tierexperimentellen Methoden nötig sind.

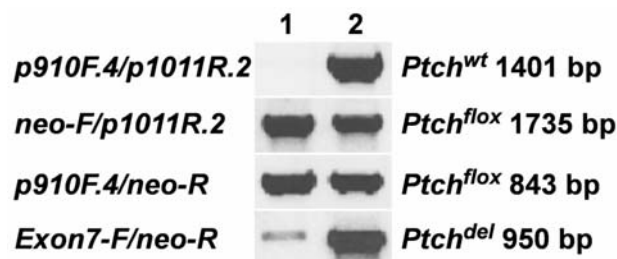
Aus adulten unbehandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*- und *Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Mäusen wurden Fibroblasten zur Herstellung stabiler Zelllinien isoliert. Mittels PCR wurden drei Wochen nach der Isolierung, als stabiles Zellwachstum erreicht war, die Genotypen verifiziert.

### 3.2.4.1 Herstellung der *Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Zelllinie

Für die Etablierung der *Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Zelllinie wurden Fibroblasten aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Mäusen isoliert und kultiviert. Die Analyse der Zellen erfolgte zusammen mit den anderen Zelllinien und ist in den Abschnitten 3.2.4.2 bis 3.2.4.6 detailliert dargestellt.

### 3.2.4.2 Herstellung von fünf monoklonalen *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Zelllinien

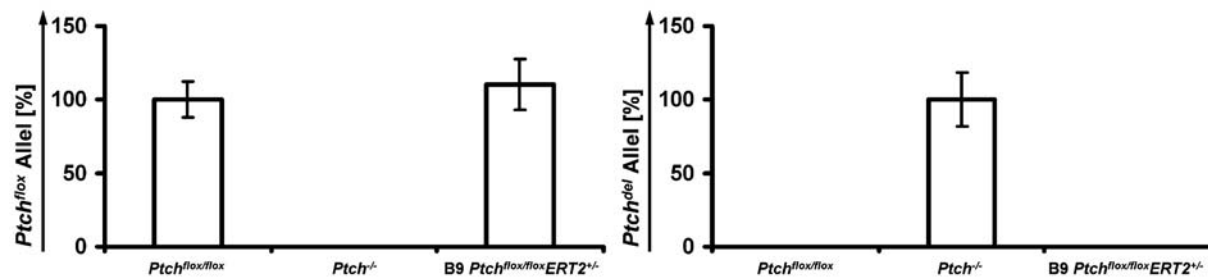
Nach der Isolierung von Fibroblasten aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen wurde in den Zellen mit der Oligonukleotidkombination *Exon7-F // neo-R* ein geringer Anteil des *Ptch<sup>del</sup>*-Allels nachgewiesen (siehe Abbildung 40). Dies beruht auf der gelegentlich auftretenden niedrigen Grundaktivität der Cre-ERT2 auch ohne Aktivierung durch Tamoxifen und führt wie in diesem Fall zur sogenannten „leakiness“.



**Abbildung 40: Genotypisierung der *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Fibroblasten.** Zur Genotypisierung wurden für das *Ptch<sup>wt</sup>*-Allel das Oligonukleotidpaar *p910F.4 // p1011R.2*, für das *Ptch<sup>flox</sup>*-Allel die Oligonukleotidpaare *Neo-F // p1011R.2* und *p910F.4 // Neo-R* sowie für das *Ptch<sup>del</sup>*-Allel das Oligonukleotidpaar *Exon7-F // Neo-R* verwendet. Die Anlagerungsstellen der Oligonukleotide sind Abbildung 10 zu entnehmen. Spur 1: DNA von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Fibroblasten; Spur 2: jeweilige Positivkontrolle für die PCR-Reaktion.

Daher wurden fünf monoklonale *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Zelllinien etabliert, die im Folgenden als B9, C6, D2, F4 und G2 bezeichnet werden. Hierfür wurden einzelne Zellen in einer 96-Loch Platte ausgesät und expandiert. Mittels PCR (nicht gezeigt) und TaqMan-Analysen an gDNA wurde in allen fünf Zelllinien ausschließlich das *Ptch<sup>flox</sup>*-Allel

nachgewiesen. In keinem der Zellklone wurden  $Ptch^{del}$ -Allele detektiert. In Abbildung 41 ist das Ergebnis der TaqMan-Analysen exemplarisch für die Zelllinie B9 im Vergleich zu  $Ptch^{lox/lox}$ - und  $Ptch^{-/-}$ -Fibroblasten (siehe unter 3.2.4.3) dargestellt. Während in  $Ptch^{lox/lox}$ - und B9-Zellen ausschließlich das  $Ptch^{lox}$ -Allel, nicht aber das  $Ptch^{del}$ -Allel detektiert werden konnte, verhielt es sich in der Zelllinie  $Ptch^{-/-}$  umgekehrt (zur Etablierung dieser Zelllinie siehe 3.2.4.3). Daher war in den Zelllinien B9, C6, D2, F4 und G2 keine Grundaktivität der Cre-ERT2 vorhanden.



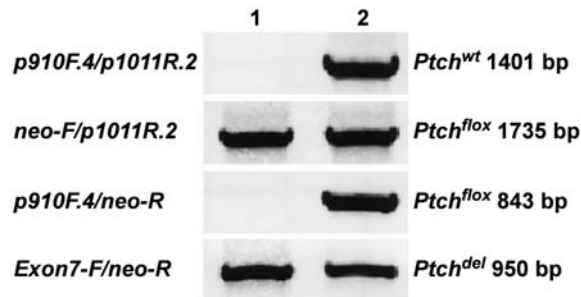
**Abbildung 41: Genotypisierung der Zelllinien  $Ptch^{lox/lox}$ ,  $Ptch^{-/-}$  und B9  $Ptch^{lox/lox} ERT2^{+/-}$ .** Mittels TaqMan-Analysen an gDNA erfolgte die Genotypisierung von  $Ptch^{lox/lox}$ -,  $Ptch^{-/-}$ - und B9- $Ptch^{lox/lox} ERT2^{+/-}$ -Zellen. Der Nachweis des  $Ptch^{lox}$ -Allels und  $Ptch^{del}$ -Allels erfolgte mit den Oligonukleotiden  $mPTCNx_f$  //  $mPTCNx_r$  bzw.  $mPTCdelNx_f$  //  $mPTCNx_r$  und den fluoreszenzmarkierten, spezifischen Sonden  $mPTCNx_S2$  bzw.  $mPTCdelNx_S1$ . Für die Normalisierung wurde ein spezifischer Assay für *Pelota* verwendet.

### 3.2.4.3 Herstellung einer $Ptch^{-/-}$ -Zelllinie

Nach einer Inkubation der  $Ptch^{lox/lox} ERT2^{+/-}$ -Fibroblasten mit 10  $\mu$ M Tamoxifen war noch nach 120 h das  $Ptch^{lox}$ -Allel nachweisbar (siehe 3.2.4.4.1.1, Abbildung 43). Dies bedeutet, dass der Zeitraum von 120 h nicht ausreichte, um eine komplette Rekombination der *loxP*-Sequenzen in sämtlichen Zellen hervorzurufen. Für die Herstellung einer  $Ptch^{-/-}$ -Zelllinie, in der die Exone 8 und 9 von *Ptch* komplett deletiert sind, wurden  $Ptch^{lox/lox} ERT2^{+/-}$ -Fibroblasten für ca. vier Wochen mit 10  $\mu$ M Tamoxifen inkubiert. Da die Zellen bei geringen Zelldichten unter Tamoxifen-Behandlung starben, wurde Tamoxifen nur zugegeben, wenn die Zellen mindestens 50 % konfluent waren. Das tamoxifenhaltige Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert.

Wie in Abbildung 42 gezeigt, konnte in den Zellen nach vier Wochen kein Amplifikat für das  $Ptch^{lox}$ -Allel nachgewiesen werden. Des Weiteren waren weder zu diesem Zeitpunkt noch später  $Ptch^{wt}$ -Transkripte mit Hilfe der Oligonukleotide *Exon7-F* oder *mPtc11* (Vorwärts-Oligonukleotide) und *mPtc-tq Ex8R* (Rückwärts-Oligonukleotid) mittels qRT-PCR detektierbar. Das  $Ptch^{del}$ -Transkript war hingegen nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass wahrscheinlich in allen Zellen eine vollständige Rekombination der *loxP*-

Sequenzen stattgefunden hat. Dies konnte auch in sämtlichen Folgeexperimenten an höheren Passagen der Zelllinie verifiziert werden.



**Abbildung 42: Genotypisierung der *Ptch*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten.** Zur Genotypisierung wurden für das *Ptch*<sup>wt</sup>-Allel das Oligonukleotidpaar *p910F.4* // *p1011R.2*, für das *Ptch*<sup>flox</sup>-Allel die Oligonukleotidpaare *Neo-F* // *p1011R.2* und *p910F.4* // *Neo-R* sowie für das *Ptch*<sup>del</sup>-Allel das Oligonukleotidpaar *Exon7-F* // *Neo-R* verwendet. Die Anlagerungsstellen der Oligonukleotide sind Abbildung 10 zu entnehmen. Spur 1: DNA von *Ptch*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten; Spur 2: jeweilige Positivkontrolle für die PCR-Reaktion.

### 3.2.4.4 Charakterisierung der *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Fibroblasten (B9)

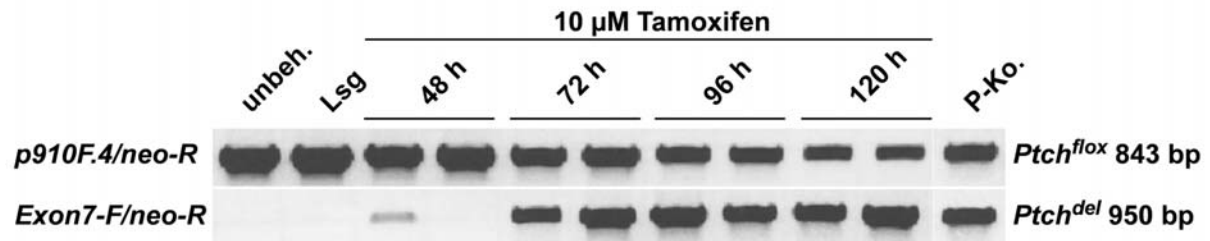
#### 3.2.4.4.1 Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade durch Tamoxifen

##### 3.2.4.4.1.1 Untersuchung der Rekombinationseffizienz am *Ptch*<sup>flox</sup>-Lokus

Zur Aktivierung der Cre-ERT2 wurden *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Fibroblasten unterschiedlich lange mit 10 µM Tamoxifen stimuliert. Trotz „leakiness“ wurde für dieses Vorexperiment die primär isolierte *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Fibroblasten-Zelllinie (siehe 3.2.4.2) verwendet. Die Analyse der Rekombination erfolgte mittels PCR an gDNA mit den Oligonukleotidkombinationen *p910F.4* // *neo-R* und *Exon7-F* // *neo-R* (siehe Tabelle 3). Durch die Cre-ERT2-vermittelte Rekombination erfolgte die Deletion des von *loxP*-Sequenzen flankierten Abschnitts, in dem sich die Hybridisierungssequenz des Oligonukleotids *p910F.4* befand. Somit sollte eine Stimulation mit Tamoxifen eine Abnahme des mit der Oligonukleotidkombination *p910F.4* // *neo-R* amplifizierten Fragmentes (entspricht dem *Ptch*<sup>wt</sup>-Allel) bewirken und gleichzeitig das *Ptch*<sup>del</sup>-Allel (Oligonukleotidpaar *Exon7-F* // *neo-R*) detektiert werden. Abbildung 43 zeigt exemplarisch das Ergebnis der PCR an gDNA der primär isolierten *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Fibroblasten-Zelllinie nach Behandlung mit Tamoxifen oder Lösungsmittel (0,01 % DMSO, v/v). Die Tamoxifen-behandelten Zellen wurden für eine Dauer zwischen 48 h und 120 h mit 10 µM Tamoxifen stimuliert, wobei für jeden Zeitpunkt zwei Petrischalen mit Zellen verwendet wurden. Nach 48 h war nur in den Zellen einer Petrischale das *Ptch*<sup>del</sup>-Allel nachweisbar (siehe Abbildung 43). Dagegen zeigten alle für 72 h, 96 h oder

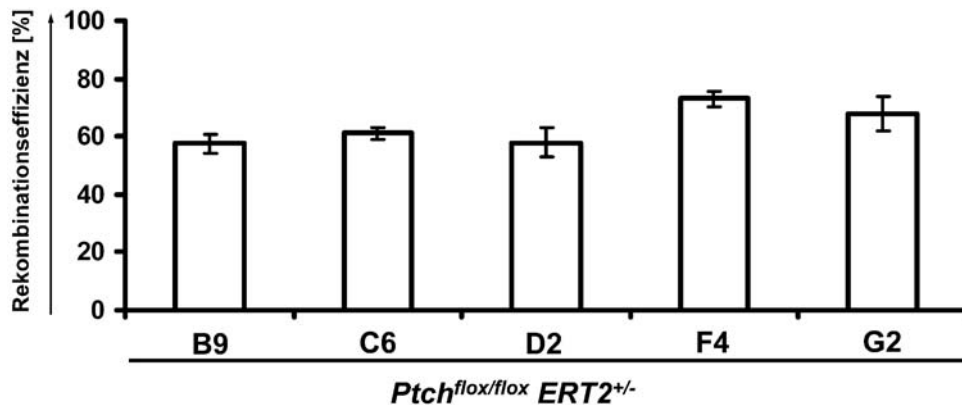


120 h mit Tamoxifen-stimulierten Zellen anhand des *Ptch<sup>del</sup>*-Allels eine deutliche Rekombination. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für weitere Stimulationsexperimente stets eine Stimulationsdauer von 72 h gewählt.



**Abbildung 43: Tamoxifen-vermittelte Rekombination des *Ptch<sup>flox</sup>*-Lokus in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Fibroblasten.** Dargestellt sind die Ergebnisse von PCR-Analysen an unbehandelten, Lösungsmittel-behandelten und Tamoxifen-stimulierten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Fibroblasten. Die Zellen wurden für eine Dauer zwischen 48 h und 120 h mit 10 µM Tamoxifen stimuliert und die Rekombination anhand der Oligonukleotidkombinationen *p910F.4 // neo-R* und *Exon7-F // neo-R* untersucht. Abkürzungen: Lsg, Lösungsmittel; P-Ko, Positivkontrolle; unbeh., unbehandelt.

In weiterführenden Experimenten wurde nun die Effizienz der Cre-ERT2-vermittelten Rekombination quantifiziert. Hierfür wurden die fünf etablierten monoklonalen *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Zelllinien (siehe 3.2.4.2) verwendet. In diesen Zelllinien wurde zunächst die Tamoxifen-induzierte Rekombinationsrate am *Ptch<sup>flox</sup>*-Lokus mittels TaqMan-Analysen ermittelt. Ein *Pelota*-spezifischer Assay diente der Normalisierung, anhand der Standardkurven-Methode erfolgte die Auswertung. Die Rekombinationseffizienz zeigt den Anteil des *Ptch<sup>del</sup>*-Allels von der Summe der detektierten *Ptch<sup>del</sup>*- sowie *Ptch<sup>flox</sup>*-Allele (Abbildung 44). Sie variierte in den fünf Zelllinien zwischen 57 und 73 %. Weder in Lösungsmittel-behandelten noch unbehandelten Zellen oder in *Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Zellen war eine Rekombination nachweisbar (nicht gezeigt).

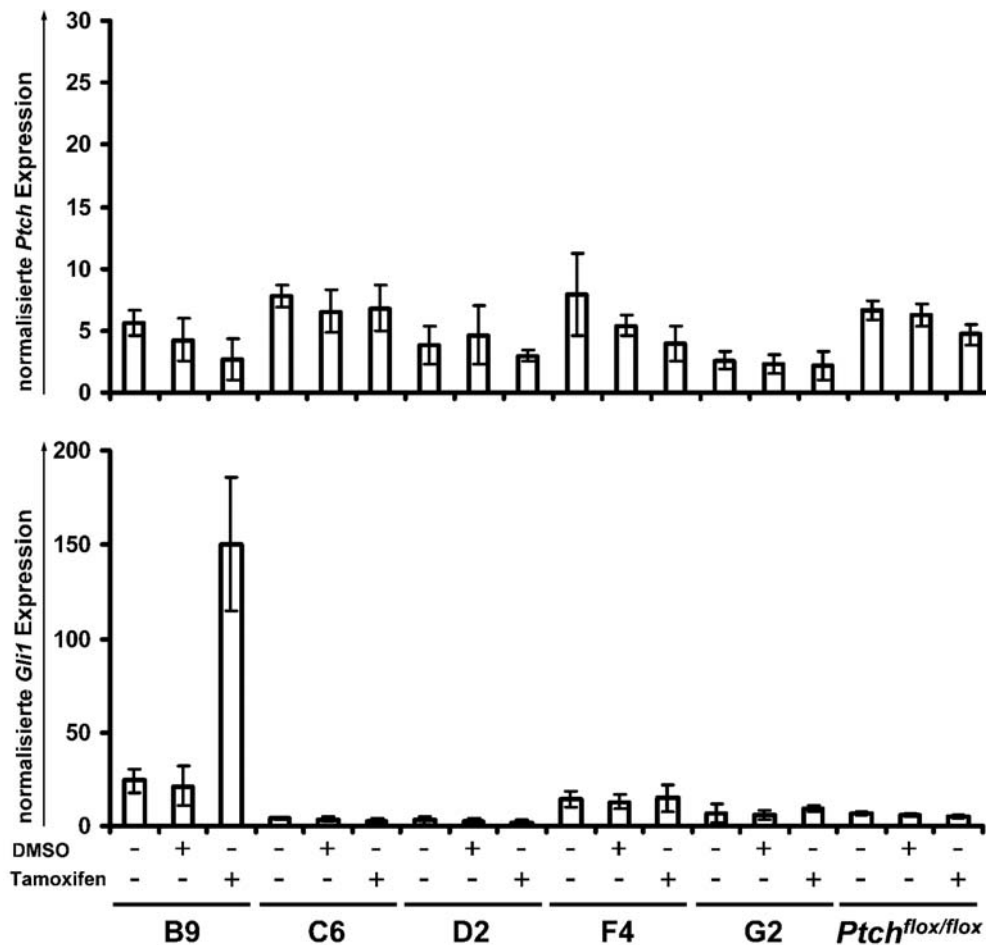


**Abbildung 44: Rekombinationseffizienz am  $Ptch^{flox}$ -Lokus nach Stimulation mit Tamoxifen.** Dargestellt sind die durch TaqMan-Analysen an gDNA ermittelten Rekombinationseffizienzen am  $Ptch^{flox}$ -Lokus in den Zelllinien B9, C6, D2, F4 und G2 nach 72 h Stimulation mit Tamoxifen. Der Nachweis des  $Ptch^{flox}$ -Allels und  $Ptch^{del}$ -Allels erfolgte mit den Oligonukleotiden  $mPTCNx_f // mPTCNx_r$  bzw.  $mPTCdelNx_f // mPTCNx_r$  und den fluoreszenzmarkierten, spezifischen Sonden  $mPTCNx_S2$  bzw.  $mPTCdelNx_S1$ . Die Berechnung der Rekombinationseffizienz in Prozent erfolgte für jede Probe anhand der Formel  $Ptch^{del}/(Ptch^{del} + Ptch^{flox}) * 100 \%$ . Für die Normalisierung wurde ein spezifischer Assay für *Pelota* verwendet.

### 3.2.4.4.1.2 Untersuchung der Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges

Da angenommen wurde, dass die *Ptch*-Deletion zur Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade führt, wurde die Expression der Zielgene *Ptch* und *Gli1* in den Tamoxifen-behandelten Zelllinien B9, C6, D2, F4, G2 und  $Ptch^{flox/flox}$  und den jeweiligen Kontrollen anhand von qRT-PCR quantifiziert (siehe Abbildung 45). Dabei wurden für den Nachweis von *Ptch* Oligonukleotide ( $mPtc10 // mPtc11R$ ) verwendet, die aufgrund ihrer Lokalisation in den Exonen 5 und 6 sowohl  $Ptch^{wt}$ - als auch  $Ptch^{del}$ -Transkripte detektieren. Zum Nachweis von *Gli1* mittels qRT-PCR dienten die Oligonukleotide  $mGli1-tq-f$  und  $mGli1-tq-r$ .

Mit diesen Oligonukleotiden wurde in allen Zellen eine basale *Ptch*-Expression nachgewiesen, und es ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen behandelten oder unbehandelten Zellen. Dagegen war in Tamoxifen-behandelten B9-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollen eine deutlich erhöhte *Gli1*-Expression nachweisbar. Bei den übrigen Zelllinien war keine Änderung des *Gli1*-Expressionsniveaus erkennbar.



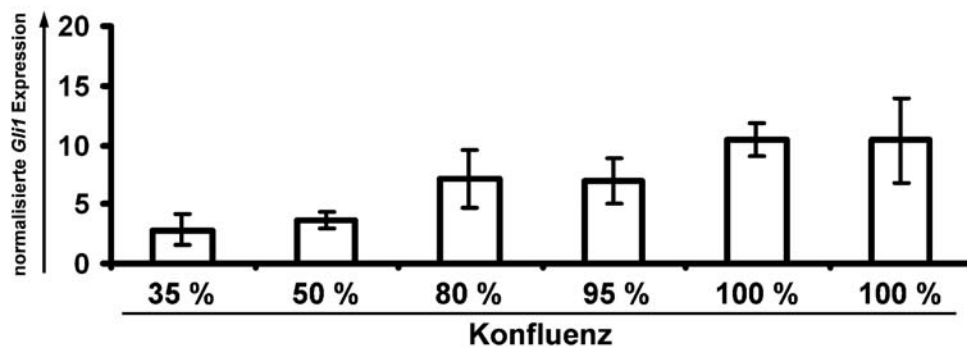
**Abbildung 45: Erhöhte *Gli1*-Expression in B9 nach Stimulation mit Tamoxifen.** Die Expression von *Ptch* und *Gli1* in den *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Fibroblastenzelllinien B9, C6, D2, F4, G2 und *Ptch*<sup>flox/flox</sup> Zellen nach Stimulation mit Tamoxifen und in unbehandelten oder Lösungsmittel-behandelten Zellen wurde mittels qRT-PCR analysiert. Dazu wurden die Oligonukleotidpaare *mPtch10* // *mPtch11R* und *mGli1-tq-f* // *mGli1-tq-r* verwendet und eine Normalisierung anhand der Expression von *18S rRNA* durchgeführt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass keine der fünf monoklonalen Zelllinien B9, C6, D2, F4 und G2 eine Grundaktivität der Cre-ERT2 aufwies. Nach der Stimulation der Cre-ERT2 mit Tamoxifen zeigte sich in keiner Zelllinie eine Änderung der *Ptch*-Expression. Jedoch wurde in der Zelllinie B9 im Vergleich zu allen anderen Zelllinien die Expression von *Gli1* induziert. Dies zeigt, dass sich der Hh/Ptch-Signalweg in B9-Zellen durch das Ausschalten von Ptch aktivieren lässt. Daher wurden weitere Experimente zur Analyse des Hh/Ptch-Signalweges ausschließlich mit dieser Zelllinie durchgeführt.

### 3.2.4.4.2 Untersuchung der Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges in Abhängigkeit von der Konfluenz

Bereits mehrfach wurde eine Korrelation zwischen der Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges und der Zelldichte bei Zellkulturexperimenten gezeigt (J Taipale *et al.*,

2000; WJ Ingram *et al.*, 2002). Daher wurde überprüft, ob dies auch für die Zelllinie B9 zutrifft. Hierfür wurde RNA aus unbehandelten B9-Zellen mit einer Konfluenz zwischen 35 und 100 % isoliert und die *Ptch*- und *Gli1*-Expression mittels qRT-PCR analysiert. Zwischen Zelldichte und *Ptch*-Expression konnte keine Korrelation detektiert werden (nicht gezeigt). Dagegen wiesen Zellen, die zum Zeitpunkt des Aberntens in höherer Konfluenz gewachsen waren, eine gesteigerte Expression von *Gli1* auf (Abbildung 46). Daher wurden die weiteren Versuche bei einer Konfluenz von ca. 80 % durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen.



**Abbildung 46: Dichteabhängige Expression von *Gli1* in B9-Zellen.** Dargestellt ist die *Gli1*-Expression in B9-Zellen mit unterschiedlicher Konfluenz beim Abernten der Zellen. Die Analyse erfolgte mit der Oligonukleotidkombination *mGli1-tq-f* // *mGli1-tq-r* mittels qRT-PCR, die Proben wurden anhand der Expression der *18S rRNA* normalisiert.

### 3.2.4.4.3 Blockade der Hh/Ptch-Signalkaskade durch Cyclopamin

Zur Überprüfung, ob die Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade in Tamoxifen-stimulierten B9-Zellen (siehe 3.2.4.4.1.2) reversibel ist, wurde die Aktivität durch den spezifischen Smo-Inhibitor Cyclopamin (siehe 1.3) blockiert. Hierfür wurden Tamoxifen-behandelte Zellen zusätzlich mit 5  $\mu$ M Cyclopamin oder dem Lösungsmittel Ethanol (0,5 % v/v) inkubiert. Als Kontrollen wurden die Zellen nur mit den entsprechenden Lösungsmitteln DMSO (0,01 % v/v; Lösungsmittel für Tamoxifen), Ethanol (0,5 % v/v, Lösungsmittel für Cyclopamin) oder Cyclopamin behandelt (siehe Abbildung 47).

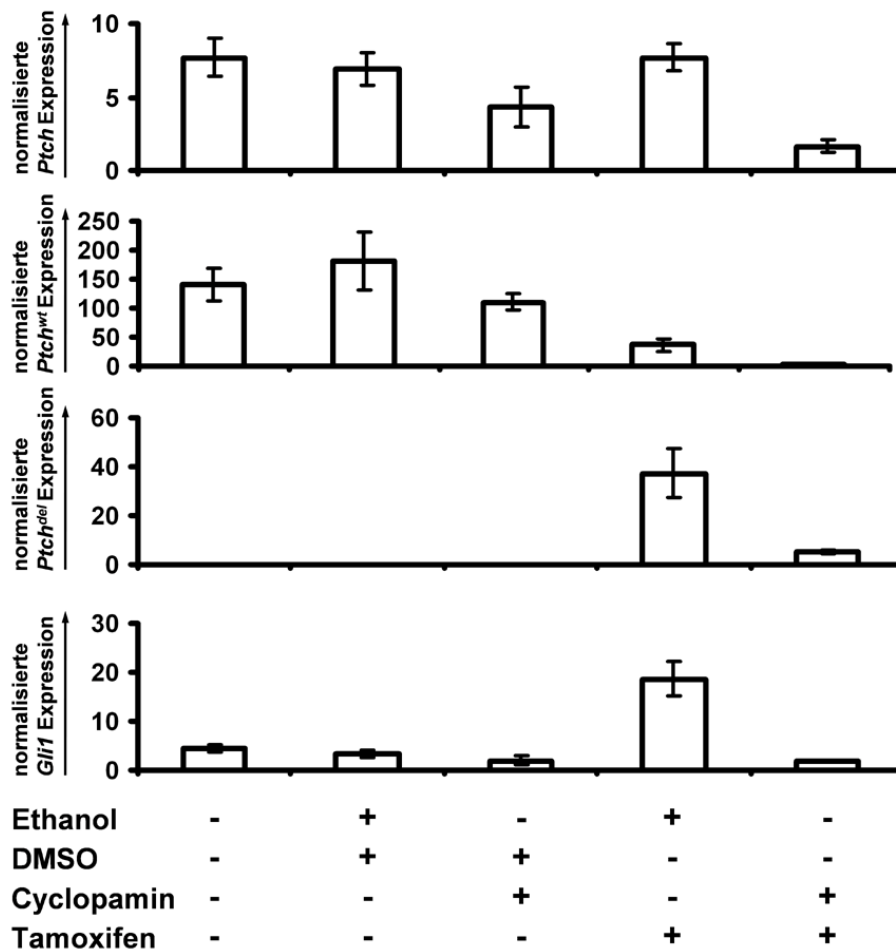
Zur Analyse der Aktivität der Hh/Ptch-Signalkaskade wurde neben der Oligonukleotidkombination *mGli1-tq-f* // *mGli1-tq-r* die Kombination *mPtc10* // *mPtc11R* verwendet, welche sowohl *Ptch<sup>wt</sup>* als auch *Ptch<sup>del</sup>* Transkripte detektiert (siehe 3.2.4.4.1.2). Zusätzlich wurden qRT-PCR Assays eingesetzt, die eine Unterscheidung von *Ptch<sup>wt</sup>*- und *Ptch<sup>del</sup>*-Transkripten ermöglichen. Die Kombination der Oligonukleotide *mPtc-tq-Ex7F* und *mPtc-tq Ex8R* diente aufgrund der Lokalisation des Rückwärtsoligonukleotids in Exon 8 ausschließlich zur Detektion von *Ptch<sup>wt</sup>*, wohingegen

die Verwendung von *mPtc-tq Ex7F* und *mPtc-tq Ex7/10R* durch Hybridisierung des Übergangs von Exon 7 auf 10 den Nachweis des *Ptch<sup>del</sup>*-Transkripts ermöglichte. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen sind in Abbildung 47 gezeigt.

Nach Cyclopamin-Gabe wurde die Expression von Gesamt-*Ptch* (*Ptch<sup>wt</sup>*- und *Ptch<sup>del</sup>*-Transkripte) unabhängig von der Behandlung blockiert. Diese Blockade war auch in Zellen erkennbar, die mit Tamoxifen behandelt wurden. Bei diesen Analysen war anhand der Oligonukleotidkombination *mPtc10 // mPtc11R* jedoch nicht erkennbar, ob es sich bei den nachgewiesenen Transkripten um *Ptch<sup>wt</sup>* oder *Ptch<sup>del</sup>* handelte, wobei *Ptch<sup>del</sup>*-Transkripte ausschließlich in Tamoxifen-behandelten Zellen nachweisbar sein sollten. Analysen mit den Oligonukleotiden *mPtc-tq-Ex7F // mPtc-tq Ex8R* zeigten eine etwas höhere Expression von *Ptch<sup>wt</sup>* in unbehandelten und Lösungsmittel-behandelten Zellen im Vergleich zu Cyclopamin-behandelten Zellen. Eine deutliche Abnahme dieser Transkripte war in Tamoxifen- und Cyclopamin/Tamoxifen-behandelten Zellen erkennbar. Wie erwartet war mit der Oligonukleotidkombination *mPtc-tq Ex7F // mPtc-tq Ex7/10R* in unbehandelten und Lösungsmittel-behandelten Zellen keine Expression von *Ptch<sup>del</sup>* detektierbar. *Ptch<sup>del</sup>*-Transkripte waren ausschließlich in Tamoxifen-behandelten Zellen nachweisbar, wobei die mit Tamoxifen stimulierten Zellen die höchste Expression aufwiesen, die sich durch Cyclopamin blockieren ließ.

Eine erhöhte *Gli1*-Expression wurde nur in Tamoxifen-behandelten Zellen gefunden, sie ließ sich ebenfalls durch die Zugabe von Cyclopamin inhibieren.

Diese Daten zeigen, dass die Tamoxifen-induzierte Mutation von *Ptch* in B9-Zellen eine Induktion der *Gli1*-Expression hervorruft, während die Expression von Gesamt-*Ptch* überraschenderweise unverändert bleibt. Dabei zeigten genauere Analysen eine Reduktion von *Ptch<sup>wt</sup>*- und eine gleichzeitige Zunahme von *Ptch<sup>del</sup>*-Transkripten, was wahrscheinlich für die Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade und damit für die verstärkte *Gli1*-Expression verantwortlich ist. Wie erwartet, bewirkte die Zugabe von Cyclopamin hierbei eine Inhibition der *Ptch*- und *Gli1*-Expression.



**Abbildung 47: Blockade der Tamoxifen-induzierten erhöhten *Gli1*- und *Ptch*-Expression durch Cyclopamin.** Die Expression von *Ptch*, *Ptch<sup>wt</sup>*, *Ptch<sup>del</sup>* und *Gli1* in unbehandelten, Lösungsmittel-behandelten und Cyclopamin- und/oder Tamoxifen-behandelten B9-Zellen wurde durch qRT-PCR an cDNA analysiert und auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert. Dazu wurden die Oligonukleotidkombinationen *mPtc10 // mPtc11R*, *mPtc-tq-Ex7F // mPtc-tq Ex8R*, *mPtc-tq-Ex7F // mPtc-tqEx7/10R* und *mGli1-tq-f // mGli1-tq-r* verwendet.

#### 3.2.4.4.4 Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade durch Shh

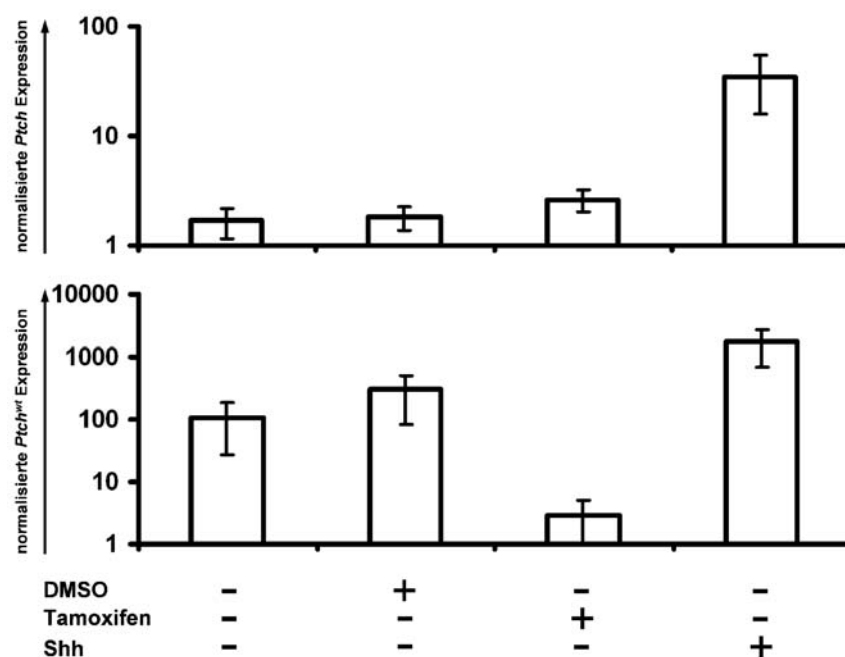
In vorhergegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die Induktion der *Ptch*-Mutation in der *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Fibroblastenzelllinie B9 durch Gabe von Tamoxifen die Aktivierung des Hh/Ptch-Signalweges bewirkt. Analog hierzu wurde nun versucht, die Aktivierung der Signalkaskade mittels Zugabe von Shh für 72 h zu induzieren. Hierfür wurde Überstand von Hek293 Shh-Zellen verwendet, sog. konditioniertes Medium (siehe 2.15.3.5 und 2.15.3.6), das sezerniertes Shh enthält. Als Kontrollmedium diente entsprechend hergestellter Überstand der Zelllinie Hek293.

Die Aktivierung des Hh/Ptch-Signalweges wurde ebenfalls mittels qRT-PCR anhand der Expression von *Gli1* und *Ptch* untersucht. Als Kontrolle wurden Tamoxifen-behandelte B9-Zellen mitgeführt. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Analysen wurde für

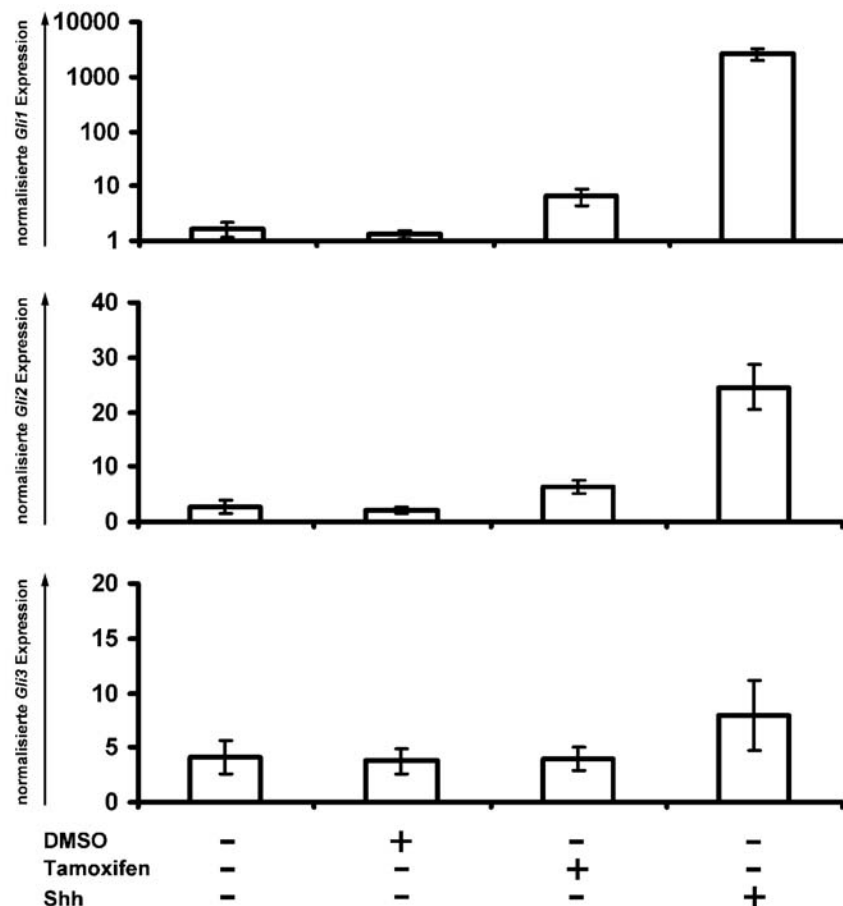
die Expressionsanalyse von *Ptch*<sup>wt</sup> die Oligonukleotidkombination *mPtc11* // *mPtc-tq Ex8R* verwendet, da sich diese bei der qRT-PCR als beständiger als die Kombination *mPtc-tq-Ex7F* // *mPtc-tq Ex8R* erwiesen hatte.

Wie bereits vorher dargestellt, zeigten unbehandelte oder Lösungsmittel-behandelte B9-Zellen (0,01 % DMSO, v/v) eine moderate Expression von *Ptch*<sup>wt</sup> (siehe 3.2.4.4.1.2, Abbildung 45). Nach Shh-Stimulation dagegen war die Expression von *Ptch*<sup>wt</sup> stark erhöht (Abbildung 48). Tamoxifen bewirkte wie erwartet eine deutliche Reduktion von *Ptch*<sup>wt</sup>-Transkripten (siehe Abbildung 48) und einen Anstieg von *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripten (siehe Abbildung 47).

Im Gegensatz zur Tamoxifen-Induktion, durch die sich ausschließlich die Expression von *Gli1* und *Gli2* stimulieren ließ (siehe Abbildung 49), wurde nach Gabe von Shh zusätzlich *Gli3* vermehrt exprimiert. Sowohl nach Stimulation mit Shh als auch nach Zugabe von Tamoxifen war der Effekt auf *Gli1* am größten (4,5-fache bzw. 1800-fache Zunahme nach Tamoxifen- bzw. Shh-Stimulation gegenüber Lösungsmittelzugabe). Tamoxifen bewirkte eine 6,4-fache und Shh eine 25-fache Zunahme der *Gli2*-Expression, wohingegen die *Gli3*-Expression nur nach Zugabe von Shh auf das 2-fache gegenüber Lösungsmittel-behandelten Zellen anstieg.



**Abbildung 48: Erhöhte *Ptch*-Expression in B9-Zellen nach Stimulation mit Shh.** Die Expression von *Ptch* und *Ptch*<sup>wt</sup> in B9-Zellen nach Stimulation für 72 h mit Tamoxifen oder Shh und in unbehandelten oder Lösungsmittel-behandelten Zellen wurde mittels qRT-PCR an cDNA analysiert. Hierzu wurden die Oligonukleotidpaare *mPtc10* // *mPtc11R* und *mPtc11* // *mPtc-tq Ex8R* verwendet und eine Normalisierung anhand der Expression von *18S rRNA* durchgeführt.



**Abbildung 49: Erhöhte Expression von *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* in B9-Zellen nach Stimulation mit Shh.** Gezeigt ist die mittels qRT-PCR an cDNA analysierte Expression von *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* in B9-Zellen nach Stimulation für 72 h mit Tamoxifen oder Shh und in unbehandelten oder Lösungsmittel-behandelten Zellen. Dafür wurden die Oligonukleotidkombinationen *mGli1-tq-f // mGli1-tq-r*, *mGli2 RT-PCR-F // mGli2 RT-PCR-R* und *mGli3 F2 // mGli3-SybrgreenR* verwendet und eine Normalisierung anhand der Expression von *18S rRNA* durchgeführt.

Zusätzlich zu diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Shh-induzierte Expression von *Ptch* und *Gli1* durch gleichzeitige Zugabe von Cyclopamin hemmen lässt (nicht gezeigt).

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass eine Inkubation der B9-Zellen mit Shh nach 72 h zu einer Aktivierung des Hh/Ptch-Signalweges führt, die noch effizienter ist als diejenige, die durch eine Tamoxifen-induzierte Rekombination am *Ptch*-Lokus hervorgerufen wird.

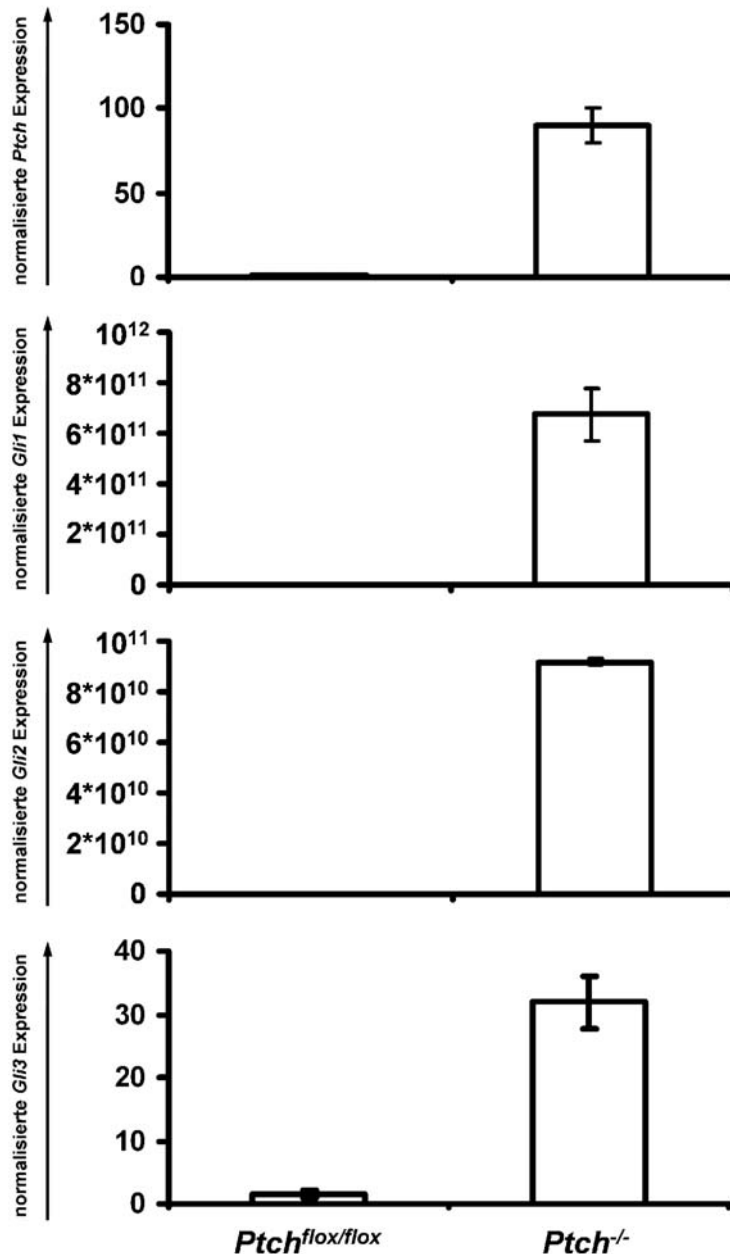
### 3.2.4.5 Charakterisierung der Zelllinien *Ptch*<sup>-/-</sup> und *Ptch*<sup>flox/flox</sup>

#### 3.2.4.5.1 Expressionsprofile

Auch in den Zelllinien *Ptch*<sup>-/-</sup> und *Ptch*<sup>flox/flox</sup> wurde die Aktivität des Hh/Ptch-Signalweges durch qRT-PCR analysiert. Die *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Zelllinie kann als eine „normale“ *Ptch*<sup>wt</sup> Zelllinie



angesehen werden, da sie keine aberranten *Ptch*-Transkripte exprimiert (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 50 gezeigt, ist die Expression von *Ptch*, *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* in der Zelllinie *Ptch*<sup>-/-</sup> im Vergleich zu *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Zellen deutlich erhöht.

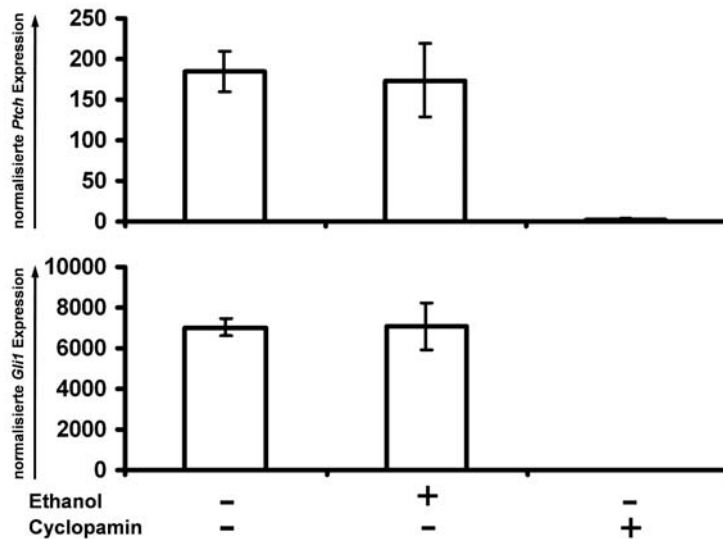


**Abbildung 50: Erhöhte Aktivität der Hh/Ptch-Signalkaskade in *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen.** Mittels qRT-PCR wurde die Expression von *Ptch*, *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>- und *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen analysiert. Hierfür wurden die Oligonukleotidkombinationen *mPtc10 // mPtc11R*, *mGli1-tq-f // mGli1-tq-r*, *RT-PCR-F // mGli2 RT-PCR-R* und *mGli3 F2 // mGli3-SybrgreenR* verwendet und die Expression anhand der *18S rRNA* normalisiert.

Anhand der *Ptch*- und *Gli1*-Expression wurde überprüft, ob sich die Aktivität der Signalkaskade in der Zelllinie *Ptch*<sup>-/-</sup> ebenso wie in B9-Zellen durch die Zugabe von Cyclopamin blockieren lässt. Hierfür wurden die Zellen wie unter 3.2.4.4.3 beschrieben

mit 5  $\mu\text{M}$  Cyclopamin behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte oder mit Lösungsmittel behandelte Zellen (0,5 % v/v). Wie in Abbildung 51 gezeigt, war die Expression von *Ptch* und *Gli1* nach Cyclopamin-Gabe deutlich reduziert.

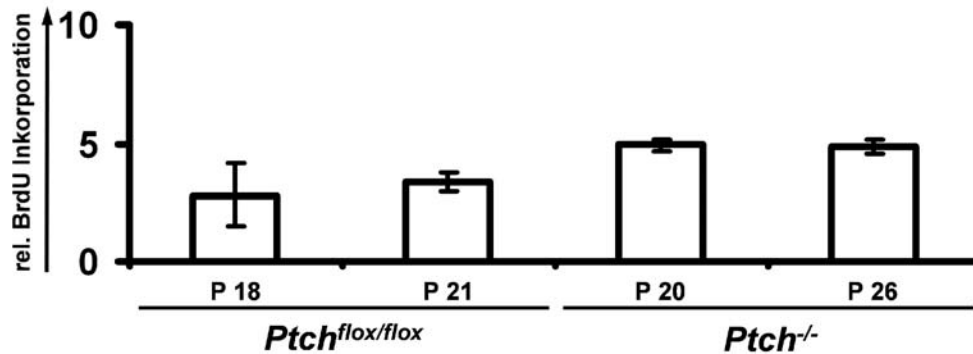
In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass bereits eine Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Cyclopamin ausreichte, um die *Gli1*-Expression zu hemmen (nicht gezeigt).



**Abbildung 51: Blockade der *Ptch*- und *Gli1*-Expression in *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen durch Cyclopamin.** Gezeigt ist die mittels qRT-PCR erhobene Expression von *Ptch* und *Gli1* in Cyclopamin- (5  $\mu\text{M}$ ) und Lösungsmittel- (0,5 % Ethanol v/v) behandelten *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen. Die Oligonukleotidkombinationen *mPtch10 // mPtch11R* und *mGli1-tq-f // mGli1-tq-r* wurden benutzt und die Expression anhand der *18S rRNA* normalisiert.

### 3.2.4.5.2 Untersuchung der Proliferationsraten

Da die Zelllinie *Ptch*<sup>-/-</sup> im Vergleich zur Zelllinie *Ptch*<sup>flox/flox</sup> eine erhöhte Aktivität der Hh/Ptch-Signalkaskade aufwies, wurde die Proliferationsrate der beiden Zelllinien miteinander verglichen. Die Experimente wurden an zwei unterschiedlichen Passagen je Zelllinie durchgeführt. Dazu wurden 7000 Zellen pro Loch einer 96-Loch Platte ausgesät und 24 h später für 22 h mit BrdU inkubiert. Mit Hilfe eines Luminometers wurde die Inkorporation von BrdU gemessen; sie zeigte, wie in Abbildung 52 dargestellt, eine 1,6-fache Erhöhung in *Ptch*<sup>-/-</sup>- gegenüber *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Zellen. Dabei waren keine Unterschiede zwischen verschiedenen Passagen der jeweiligen Zelllinie erkennbar.



**Abbildung 52: Erhöhte Proliferationsrate von *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen.** Dargestellt ist die relative BrdU Inkorporation in *Ptch<sup>flox/flox</sup>*- und *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen nach 22 h Inkubation mit BrdU. Abkürzung: P, Passage.

Zusammenfassend zeigen die Daten eine stark erhöhte Expression von *Ptch*, *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* in *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen gegenüber *Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Zellen. Nach Zugabe von Cyclopamin zu *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen für 72 h wurde eine deutliche Inhibition der *Gli1*-Expression nachgewiesen. Anhand des Vergleiches der Proliferation von *Ptch<sup>-/-</sup>*- und *Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Zellen war eine 1,6-fache Erhöhung der Proliferationsrate der *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen erkennbar.

### 3.2.4.6 Zusammenfassung der Zellkulturexperimente

Um die Funktion von *Ptch* in Zellkulturexperimenten besser analysieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile Zelllinien etabliert. Hierbei handelt es sich zum einen um die Zelllinie B9, die aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen isoliert wurde, und bei der es möglich ist, nach Zugabe von Tamoxifen zum Kulturmedium *Ptch* zu deletieren. Zum anderen wurden die wt *Ptch* Zelllinie *Ptch<sup>flox/flox</sup>* und die *Ptch*-defiziente Zelllinie *Ptch<sup>-/-</sup>* hergestellt.

Die Analyse der Zelllinien zeigt, dass die Zugabe von Tamoxifen zu B9-Zellen innerhalb von 72 h eine deutliche Rekombination des *Ptch<sup>flox</sup>*-Lokus bewirkt. Dennoch bleibt die Expression von *Ptch* unverändert, wobei jedoch wesentlich mehr *Ptch<sup>del</sup>*- als *Ptch<sup>wt</sup>*-Transkripte exprimiert werden. *Gli1* und *Gli2* werden nach Tamoxifen-Gabe vermehrt exprimiert, wohingegen die Expression von *Gli3* konstant bleibt. Durch die gleichzeitige Zugabe von Cyclopamin zu Tamoxifen-behandelten B9-Zellen wird die Tamoxifen-induzierte Erhöhung der *Gli1*-Expression blockiert.

Im Gegensatz zu Tamoxifen bewirkt die Zugabe von Shh zu B9-Zellen eine deutlich stärkere Induktion der *Gli1*- und *Gli2*-Expression sowie eine erhöhte Expression von *Gli3*.

Wie erwartet, weisen *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen im Vergleich zu der Zelllinie *Ptch<sup>flox/flox</sup>*, welche keines der untersuchten Gene exprimiert, eine stark erhöhte Expression von *Ptch*, *Gli1*, *Gli2* und *Gli3* auf. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Zugabe von Cyclopamin zu *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen

eine deutliche Reduktion der *Ptch<sup>del</sup>*- und der *Gli1*-Expression bewirkt. Die Gegenüberstellung der Proliferationsraten von *Ptch<sup>flox/flox</sup>*- und *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen anhand der BrdU-Inkorporation zeigt eine erhöhte Proliferationsrate der Zelllinie *Ptch<sup>-/-</sup>*.

## 4 Diskussion

### 4.1 BALB-Allele des Lokus *Parms1* vermitteln Suszeptibilität für RMS

Ein Funktionsverlust von *Ptch* oder andere Störungen des Hh/*Ptch*-Signalweges bewirken die Entwicklung diverser Tumoren, wie beispielsweise Rhabdomyosarkome (RMS), Medulloblastome (MB) und Basalzellkarzinome (BCC). Wie Vorarbeiten gezeigt haben, entwickeln *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse diese Tumoren abhängig vom genetischen Hintergrund (J Calzada-Wack *et al.*, 2002). Diese Daten belegen, dass es neben dem *Ptch*-Lokus, der aufgrund seiner Schlüsselrolle bei Zellwachstum und -differenzierung den hauptsächlichen Tumorsuszeptibilitätslokus darstellt, weitere Genlozi geben muss, die die Suszeptibilität für *Ptch*-assoziierte Tumoren beeinflussen.

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war die Kartierung solcher Gene. Für das Kartierungsprojekt wurden 89 B6x(BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> N2-Mäuse verwendet, die aufgrund der *Ptch*-Defizienz mit hoher Wahrscheinlichkeit entweder RMS oder MB entwickeln. Für eine initiale genomweite Analyse wurden 97 Mikrosatellitenmarker verwendet. Der Abstand der Marker lag durchschnittlich bei 14 cM, was für eine erste genomweite Analyse genügt (A Darvasi *et al.*, 1993). Anhand der Daten war erkennbar, dass multiple Lozi die MB-Suszeptibilität beeinflussen. Allerdings waren die entsprechenden LOD-Scores sowie die p-Werte sehr niedrig und konnten daher nur als „hinweisend“ gewertet werden. Deshalb erfolgte keine detaillierte Analyse dieser Lozi.

Dagegen wiesen die Ergebnisse auf einen einzigen RMS-Suszeptibilitätslokus (*Parms1*) auf dem 2. Chromosom hin, der zwischen den Mikrosatellitenmarkern D2Mit37 und D2Mit102 lokalisiert ist. Aufgrund des signifikanten LOD-Scores von 2,44 für den Marker D2Mit42 erfolgte eine Analyse von elf weiteren Mikrosatellitenmarkern in der Umgebung dieses Markers. Die Auswertung einer Permutationsanalyse (GA Churchill und RW Doerge, 1994; RW Doerge und GA Churchill, 1996) zeigte eine signifikante Korrelation zwischen dem Genotyp B6/BALB in dieser Region und der Suszeptibilität für RMS. Durch das BALB Suszeptibilitäts-Allel verkürzt sich die Latenzzeit für RMS. Da sich weder Morphologie noch Differenzierung der RMS aus Tieren mit dem Genotyp B6/B6 oder B6/BALB an diesem Lokus unterscheiden, beeinflusst *Parms1* vor allem die Tumorentstehung, nicht aber die Progression.

Der Abschnitt zwischen D2Mit37 und D2Mit102 ist synten zu den humanen Chromosomen 2q31-33, 11p11-p13 und 15q14-q15, die mit der Entwicklung von RMS

assoziiert wurden. So wurde gezeigt, dass in humanen RMS der Verlust oder Zugewinn von chromosomalem Material in diesen Bereichen vorkommt (JA Bridge *et al.*, 2002).

In der Region *Parms1*, die 7,5 cM umfasst, sind 571 Gene lokalisiert, von denen einige (z. B. *Wt1*) tatsächlich als Kandidaten für eine Modifikation der RMS-Suszeptibilität in Betracht kommen. Wie unter 3.1.1.1 beschrieben, erfolgte eine SNP- und Expressionsanalyse verschiedener Kandidatengene, die in oder unmittelbar neben *Parms1* lokalisiert sind.

Zusammengefasst weisen diese Daten auf die Existenz eines oder auch mehrerer Gene auf dem 2. Chromosom bei Mäusen hin, die die Tiere gegenüber RMS prädisponieren. Aufgrund dieser Daten sollte der Locus *Parms1* in dieser Arbeit mit einer größeren Anzahl an B6x(BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> N2-Mäusen genauer analysiert und möglichst weiter eingengt werden. Hierzu wurde eine Kolonie von 218 Tieren etabliert und auf die Entwicklung von RMS überwacht. Währenddessen erfolgte die Analyse von elf Kandidatengenen, die in oder unmittelbar neben der Region *Parms1* lokalisiert sind.

#### **4.1.1 Analyse von potenziellen RMS-modifizierenden Genen im Locus *Parms1***

Unter der Annahme, dass Polymorphismen in den zu untersuchenden Kandidatengenen abhängig vom genetischen Hintergrund zu den unterschiedlichen Inzidenzen von RMS in *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen führen können, wurden die kodierenden Regionen dieser Gene zwischen den Mausstämmen BALB und B6 miteinander verglichen. Neben SNP-Analysen erfolgte die Untersuchung der Expression von Kandidatengenen der Region *Parms1* anhand von TaqMan-Analysen.

SNP-Analysen wurden für die Gene *Wt1*, *Bmf*, *Disp2* und *Dll4* durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Analyse waren nur wenige Polymorphismen in diesen Genen bekannt. Mittlerweile sind sämtliche im Rahmen dieser Arbeit gefundenen SNP für den Mausstamm BALB und B6 in verschiedenen Datenbanken angegeben.

Im Mausstamm BALB wurden im Vergleich zu B6 in den Genen *Bmf* und *Wt1* synonyme SNP gefunden, die ohne Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz sind. Dagegen wurde in den Genen *Disp2* und *Dll4* neben synonymen SNP jeweils ein SNP detektiert, der eine Änderung der Aminosäuresequenz bewirkt. Dabei führt eine T-C Transition an der mRNA-Position 3697 im Exon 8 von *Disp2* im Mausstamm BALB zu einem Serin-Prolin Austausch. *Disp1* und *Disp2* sind Homologe von *Ptch*, wobei *Disp1* am zellulären

Export von Hh beteiligt ist (M Evangelista *et al.*, 2006). Laut Literaturangaben spielt *Disp2* keine essentielle Rolle in der Hh/*Ptch*-Signalkaskade (Y Ma *et al.*, 2002; Y Nakano *et al.*, 2004). Dies schließt allerdings eine Funktion bei der Suszeptibilität für RMS nicht aus.

Bei *Dll4* findet im Mausstamm BALB durch eine G-A Transition in Exon 9 an der mRNA-Position 1879 ein Glycin-Serin Austausch statt. *Dll4* ist ein Aktivator des Notch-Signalweges und in der Lage, das Wachstum von Tumoren zu fördern (JR Shutter *et al.*, 2000; JL Li *et al.*, 2007).

Sowohl bei *Disp2* als auch *Dll4* könnte der Austausch der jeweiligen Aminosäure einen Einfluss auf die entsprechende Proteinfunktion und -struktur nehmen. *Disp2* verfügt wahrscheinlich wie *Ptch* über zwölf transmembrane Domänen (Y Ma *et al.*, 2002). Der nicht-synonyme SNP ist nicht in einer dieser Domänen, sondern in der Nähe des C-Terminus lokalisiert. Der Austausch von Serin (hydrophile Aminosäure) durch Prolin (hydrophobe Aminosäure) könnte zu Veränderungen der Proteinfunktion führen.

Bei *Dll4* liegt der nicht-synonyme SNP auch in der C-terminalen Region. Interessanterweise verfügt *Dll4* über eine PDZ-Domäne (von PSD95/SAP90, Discs large und Zonula occludentes-1) (CP Ponting *et al.*, 1997) am C-Terminus (A Pintar *et al.*, 2007). PDZ-Domänen sind für die Interaktion von Proteinen wichtig (P Jemth und S Gianni, 2007). Ein Funktionsverlust kann gravierende Folgen haben. So verliert z. B. das Gen „*Tumor suppressor gene in lung cancer*“ nach einer Deletion der PDZ-Domäne seine Tumorsuppressoraktivität (X Mao *et al.*, 2003). Der Austausch von Glycin durch Serin bei *Dll4* könnte daher durchaus Auswirkungen auf dessen Funktion haben und möglicherweise eine erhöhte RMS-Suszeptibilität bewirken.

Zur weiteren Charakterisierung der Effekte der Kandidatengene *Disp2* und *Dll4* können auch andere im Rahmen dieser Arbeit erhobene Ergebnisse berücksichtigt werden. Wie im Ergebnisteil dargestellt, wurden Kohorten von *DBA2JxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-*, *129SvxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-* und *FVB/NxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-*-Mäusen etabliert. Diese Tiere sollten für eine weitere Eingrenzung des Locus *Parms1* herangezogen werden. Wie bereits unter 3.1.2 beschrieben, wurde erwartet, dass sich die verschiedenen F1-Tiere in den Tumorzinzen unterscheiden. Tatsächlich entwickelten 9 % der *129SvxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-*, 32 % der *FVB/NxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-* und 50 % der *DBA2JxB6Ptch<sup>neo67/+</sup>-*-Mäuse RMS. Im Vergleich dazu soll an dieser Stelle nochmals hervorgehoben werden, dass 63 % der *(BALBxB6)Ptch<sup>neo67/+</sup>-*-Mäuse, aber keine der *B6Ptch<sup>neo67/+</sup>-*-Mäuse ein RMS entwickelten. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte der Mausstamm 129Sv auf Chromosom 2 Allele aufweisen, die im Vergleich zu B6 konserviert sind, d. h. mit B6 übereinstimmen. Dies

resultiert aus der Tatsache, dass die RMS-Inzidenz sowohl bei 129SvxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup> - als auch bei B6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen sehr niedrig ist. Dagegen wäre anzunehmen, dass DBA2J-Allele in der Kandidatenregion denjenigen von BALB entsprechen, da beide Mausstämmen eine hohe RMS Frequenz aufweisen. Falls kodierende Polymorphismen der Gene *Disp2* und *Dll4* die BALB-vermittelte erhöhte RMS-Suszeptibilität verursachen, würde man annehmen, dass die cSNP von B6 und 129Sv bzw. BALB und DBA2J übereinstimmen.

Daher wurden die cSNP der Gene *Disp2* und *Dll4* aus der Datenbank MPD für die Mausstämmen B6, 129, BALB und DBA2J verglichen. Für *Disp2* sind lediglich zwei cSNP bekannt. Bei den Mausstämmen BALB und DBA2J, aber auch bei 129, sind die beiden cSNP gleich und kodieren für die Aminosäuren Prolin und Histidin. Dagegen kodieren diese SNP bei B6 für die Aminosäuren Serin und Arginin. Bei *Dll4* existiert nur ein cSNP. Dieser kodiert in den Mausstämmen BALB, DBA2J und in 129 für die Aminosäure Serin, bei B6 dagegen für Glycin. Daher unterscheiden sich die Mauslinien 129 und B6 in der Aminosäuresequenz in *Disp2* und *Dll4*. Die niedrige Inzidenz für RMS in diesen beiden Mausstämmen sollte somit eher nicht auf funktionelle Unterschiede dieser Proteine zurückzuführen sein. Dennoch könnten unterschiedliche Expressionslevel von *Disp2* oder *Dll4* im SM der vier Mauslinien vorliegen und die RMS-Suszeptibilität beeinflussen.

Die Expression von acht weiteren Kandidatengenen aus der Region *Parms1* wurde anhand von TaqMan-Analysen an cDNA aus SM von BALB- und B6-Mäusen untersucht. Während die *Wt1*-Expression zu gering für eine zuverlässige Messung war, zeigten *Mdk*, *Api5*, *Ptprj* und *Ehf* gleiche Expressionsniveaus in SM von BALB und B6. Hingegen wurde eine ca. 2-fach höhere Expression von *Zfp289*, *Traf6* und *Catns* im SM von B6 gefunden. Die Expressionsunterschiede dieser Gene könnten daher mit der unterschiedlichen RMS-Suszeptibilität beider Mausstämmen in Verbindung stehen.

Über das Gen *Zfp289* ist bisher wenig bekannt. Möglicherweise besitzt es eine Funktion in der S-Phase des Zellzyklus, da es bei *in vitro* Experimenten zu einem erhöhten S-Phase Index führt (J Singh *et al.*, 2001). Somit wäre eine erhöhte Proliferation durch die Expression von *Zfp289* denkbar. Allerdings wird im SM des Mausstammes BALB weniger *Zfp289* als in B6 exprimiert.

*Traf6* wird unter anderem in Zellen des Immunsystems exprimiert und dient bei der Signaltransduktion verschiedener Signalwege als Adapterprotein (T Kobayashi *et al.*, 2004; LV Pham *et al.*, 2008). Ein Signalweg, in den *Traf6* integriert ist, wurde mit Tumorwachstum, -progression und -metastasierung assoziiert (J Inoue *et al.*, 2007). Auch dieses Gen wird im SM des Mausstammes BALB weniger als in B6 exprimiert.



Aufgrund der höheren Expression der Gene *Zfp289* und *Traf6* im SM des Mausstamms B6, der nicht zu RMS prädisponiert, ist ein Zusammenhang dieser Gene mit einer erhöhten RMS-Suszeptibilität unwahrscheinlich.

Die Defizienz von *Catns* ist mit der Progression von Tumoren assoziiert, und es gibt Hinweise, dass es als Tumorsuppressorgen wirken könnte (MA Davis und AB Reynolds, 2006). Weiterhin wurde sowohl der Verlust von *Catns* als auch eine verminderte oder anomale Expression in verschiedenen humanen Tumoren beobachtet (MA Thoreson und AB Reynolds, 2002). Daher könnte es als Tumorsuppressorgen durch eine geringere Expression im Mausstamm BALB im Vergleich zu B6 zur erhöhten RMS-Inzidenz beitragen.

Verminderte Expressionslevel von *Catns* im SM von BALB könnten demnach einen Effekt auf die Suszeptibilität ausüben. Die höhere Expression im SM von B6-Tieren überstieg jedoch nie das 2,5-fache. Trotz dieses geringen Unterschieds könnte *Catns* durchaus an der erhöhten *Parms1*-assoziierten RMS-Suszeptibilität beteiligt sein.

Aufgrund der RMS-Resistenz von 129Sv bzw. der RMS-Suszeptibilität von DBA2J hätte man zusätzlich noch die Expression des Gens *Catns* in diesen Mauslinien untersuchen können. Wenn es tatsächlich die RMS-Suszeptibilität beeinflusst, sollte die Expression im SM von DBA2J – analog zur Expression bei BALB und B6 – niedriger sein als bei 129Sv.

Leider wurden diese Daten jedoch nicht weiter verfolgt. Dies basiert auf der Tatsache, dass die B6-Mäuse für die Zucht der 129SvxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-, DBA2JxB6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und FVB/NxB6*Ptch*<sup>neo67</sup>-Mäuse und für die in 4.2 (s. u.) genannte B6x(BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-N2-Kolonie genetisch kontaminiert waren. Die Generierung der entsprechenden Mauslinien mit neuen, nicht-kontaminierten B6-Mäusen hätte weitere ein bis zwei Jahre gedauert und damit den zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit überschritten.

#### 4.1.2 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der genetische Hintergrund die Suszeptibilität für *Ptch*-assoziierte Tumoren stark beeinflusst. Durch eine Kopplungsanalyse wurde der *Parms1*-Lokus identifiziert, der eines oder mehrere RMS-modifizierende Gene umfasst. Aufgrund der genetischen Kontamination der B6-Mäuse (siehe 4.2) wurde dieses Projekt allerdings nicht abgeschlossen. Es soll an dieser Stelle jedoch festgehalten werden, dass es bei B6-Mäusen, die für die initiale genomweite Analyse benutzt wurden und zur Identifikation des *Parms1*-Lokus beigetragen haben, keinerlei Hinweise auf eine

genetische Kontamination gab. Daher wäre es sinnvoll, bei zukünftigen Analysen zu *Parms1* an nicht-kontaminierten Mausekreuzungen die Gene *Catns*, *Disp2* und *Dll4* weiterhin als Kandidatengene in Erwägung zu ziehen und zu analysieren.

#### 4.2 Detektion und Charakterisierung der genetischen Kontamination im Mausstamm B6

Während der Analyse von 97 Mikrosatellitenmarkern in 218 B6x(BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-N2-Mäusen wurde bei 26 % der Tiere eine genetische Kontamination festgestellt. Dabei wiesen die betroffenen Tiere bei einzelnen Markern scheinbar eine Homozygotie für BALB auf. Da N2-Mäuse aus einer Rückkreuzung von (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Männchen mit B6-Weibchen stammten, hätten ausschließlich B6/B6- oder BALB/B6-Genotypen auftreten dürfen, keinesfalls jedoch der Genotyp BALB/BALB. Dennoch wurde eine scheinbare Homozygotie für BALB bei 38 % der untersuchten 85 Marker gefunden.

Der Ursprung der scheinbaren BALB/BALB-Genotypen konnte auf eine genetische Kontamination von B6 von Charles River Laboratories zurückgeführt werden. Die Kontamination der B6-Mäuse trat wahrscheinlich im Frühjahr 2003 bei dieser Firma auf. Diese Annahme basiert auf unserer Beobachtung, dass (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse, die vor dem Frühjahr 2003 generiert wurden, keine Kontamination aufwiesen. Alternativ wäre denkbar, dass die Kontamination bei Charles River Laboratories sogar schon früher auftrat, jedoch die für die Generierung der (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> Hybriden aus einem nicht kontaminierten Raum stammten.

Der Kontaminationsgrad zwischen verschiedenen Zuchträumen von Charles River Laboratories war unterschiedlich. So waren von den beiden Lieferungen von 2005 58 % der Tiere aus Zuchtraum A kontaminiert, wohingegen Tiere des Zuchtraums B nur eine 8 %ige Kontamination aufzeigten. Weiterhin war im Vergleich zwischen den Kohorten desselben Zuchtraumes ein Rückgang der Kontamination zwischen 2003 und 2005 erkennbar. So zeigten 67 % der Tiere, die im Jahr 2003 erworben wurden, bei 55 % der analysierten Marker eine Kontamination. Dagegen wurde bei 58 % der Tiere, die 2005 erworben wurden, nur bei 14 % der Marker eine Kontamination festgestellt.

Insgesamt zeigen die Daten, dass die Kontamination über mindestens zwei Jahre sehr hoch gewesen ist.

#### **4.2.1 Identifikation von DBA-Inzuchtlinien als Ursprung der Kontamination**

Zur Bestimmung der kontaminierenden Mauslinie wurde eine SNP-Analyse durchgeführt. Anhand von 100 analysierten SNP wurde ein Vergleich zwischen 102 verschiedenen Inzuchtlinien ermöglicht.

Dabei stellte sich heraus, dass eine Kontamination der B6-Mäuse mit einer DBA-Inzuchtlinie am wahrscheinlichsten war. So stimmten 20 der 21 von B6 abweichenden Allele mit den Mausstämmen DBA/1J, DBA/1LacJ und DBA/2HaSmnJ des Jackson Laboratory überein. Das Allel, das nicht eindeutig einer dieser DBA-Inzuchtlinien zugeordnet werden konnte, könnte auf einem Gendrift zwischen den DBA-Inzuchtlinien des Jackson Laboratories und der kontaminierenden DBA-Mauslinie von Charles River Laboratories beruhen.

Aufgrund dieser Daten kam die Kontamination bei Charles River höchstwahrscheinlich durch eine Verpaarung von B6- und DBA-Mäusen zustande. Wahrscheinlich blieb dieser Zuchtfehler unerkannt, da die resultierende F1-Generation äußerlich wegen der schwarzen Fellfarbe nicht von der Linie B6 zu unterscheiden ist.

Wie uns Charles River Laboratories mitgeteilt hat, wurde die Reinheit der B6-Mäuse lediglich mit sechs Mikrosatellitenmarkern überprüft, dabei wurden keine Auffälligkeiten gefunden. Diese Daten zeigen, dass diese Anzahl von Markern keinesfalls ausreicht, um eine ausreichende Kontrolle von Inzuchtlinien zu gewährleisten.

#### **4.2.2 Ausblick**

Bei tierexperimentellen Arbeiten mit Mäusen erlauben Inzuchtlinien die Durchführung von Kartierungsexperimenten. Wie unsere Analysen zeigen, ist die hierfür essentielle Authentizität der Inzuchtlinien nicht immer gegeben. Dabei können spontane Neumutationen, Gendrift oder Zuchtfehler die Ursache sein, wobei letzteres die gravierendsten Auswirkungen haben dürfte. Durch die versehentliche, unbemerkte Verpaarung mit einer anderen Mauslinie kommt es jedoch zu wesentlichen Veränderungen der Eigenschaften der betroffenen Mauslinie. So ist es möglich, dass Experimente scheinbar unerklärlicherweise nicht mehr reproduzierbar sind. Diese Problematik zeigt die Notwendigkeit einer regelmäßigen und ausreichend detaillierten Überwachung der verwendeten Inzuchtlinien. Im vorliegenden Fall wurde die B6-Inzuchtlinie vom Anbieter durch die Analyse von sechs Mikrosatellitenmarkern überprüft, wobei keine Auffälligkeiten festgestellt wurden. Erst durch die Analyse von 29 bis 37 Markern in den betroffenen B6-Tieren im Rahmen dieser Arbeit wurde eine

Kontamination bei bis zu 18 Markern gefunden. Diese Resultate weisen somit auf die Dringlichkeit einer besseren Überwachung der Erhaltung eines genetischen Hintergrundes, insbesondere bei darauf basierenden Experimenten, hin.

### **4.3 Unterschiedliche Expressionsmuster von RMS aus CD1*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen**

Wie oben ausführlich diskutiert, nimmt der genetische Hintergrund Einfluss auf die Tumorprädisposition. Es ist daher zu erwarten, dass sich das Genexpressionsprofil einer Tumorentität unterscheidet, wenn der Tumor auf unterschiedlichem genetischen Hintergrund propagiert wird. Eine Mikroarray-Expressionsanalyse an RMS aus CD1*Ptch*<sup>neo67/+</sup>- und (BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen zeigt, dass das tatsächlich der Fall ist. Eine erste hierarchische Clusteranalyse erlaubte eine eindeutige Zuordnung der Tumoren zum genetischen Hintergrund (CD1 und BALBxB6). Dagegen unterscheiden sich die Expressionsprofile von syn- oder metachronen Tumoren so stark voneinander, dass sie über die Clusteranalyse nicht einem Tier zugeordnet werden konnten.

Diese Daten sollen nun in ein Projekt einfließen, bei dem untersucht werden soll, ob die genetische Ausstattung eines Patienten den wichtigeren Aspekt bei einer Tumorthherapieantwort ausmacht oder aber die somatischen, genetischen Veränderungen im Tumor den wichtigeren Aspekt darstellen. Hierzu sollen die RMS mit dem Anthrazyklin Doxorubicin behandelt werden. Wie aus anderen Vorversuchen bekannt ist, bleiben einige RMS gegenüber der Behandlung mit Doxorubicin resistent. Eine solche Therapieresistenz auf genetisch-identischem Hintergrund muss auf die genetische Tumorvariabilität zurückgeführt werden. Sollte die Variabilität beim Vergleich zweier Mausstämme weiter ansteigen, spielt das Wirtsgenom bei der Therapieantwort auf Doxorubicin eine Rolle. Über den Vergleich von Genexpressionsprofilen sollen der Anteil der genetischen Tumor-Variabilität sowie der genetischen Wirts-Variabilität am Therapieerfolg bestimmt werden. Zusätzlich sollen Gene identifiziert und charakterisiert werden, die beim Ansprechen der Tumoren auf Doxorubicin mitwirken.

### **4.4 Charakterisierung der *Ptch*<sup>flox</sup>-knockout-Maus und Induktion von BCC**

BCC sind die häufigsten Tumoren des Menschen und die Rate der Neuerkrankungen nimmt weiterhin zu. Eine Fehlregulation der Hh/*Ptch*-Signalkaskade in der Haut bewirkt auch in verschiedenen Mausmodellen die Bildung von BCC. So entstehen BCC in *Shh* transgenen Mäusen, die dieses Gen unter der Kontrolle des hautspezifischen *K14*-

Promotors exprimieren (AE Oro *et al.*, 1997). Ebenso entstehen BCC in *K5 GLI-1*-, *K5-tTA;TRE-Gli2*- und *Krt6a-Cre:Ptch<sup>neo/neo</sup>*-Mäusen (M Nilsson *et al.*, 2000; ME Hutchin *et al.*, 2005; C Adolphe *et al.*, 2006).

In heterozygoten *Ptch<sup>neo67/+</sup>*-Mäusen dagegen können BCC erst durch eine Bestrahlung der Tiere hervorgerufen werden (M Mancuso *et al.*, 2004; S Pazzaglia *et al.*, 2004). Hierdurch werden natürlich viele unspezifische, strahlungsbedingte molekulare Veränderungen in der Haut verursacht. Die Entwicklung von BCC in diesen Tieren kann daher nicht unbedingt alleinig auf den Effekt einer *Ptch*-Mutation zurückgeführt werden. Um die exakte Rolle von *Ptch* bei der Initiation und Progression von BCC untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst an der Analyse eines konditionellen *Ptch<sup>flox</sup>*-knockout mitgewirkt und dann untersucht, ob sich in diesem Tiermodell BCC induzieren lassen.

#### 4.4.1 Phänotyp- und Transkriptanalysen

*Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Tiere sind fertil und phänotypisch normal. Weiterhin entwickeln sie keine Tumoren. In allen untersuchten Organen wurden ausschließlich *Ptch<sup>wt</sup>*-Transkripte nachgewiesen, dementsprechend sind Transkription und Spleißen von *Ptch* mRNA nicht beeinträchtigt. Dies bedeutet, dass die *loxP*-Sequenzen in Intron 7 und 9 sowie die neo-Kassette keine Auswirkung auf das resultierende Ptch-Protein haben können.

Wird das *Ptch<sup>flox</sup>*-Allel jedoch in der Keimbahn deletiert, weisen sowohl die resultierenden *Ptch<sup>del/+</sup>*-Mäuse als auch *Ptch<sup>del/del</sup>*-Embryonen denselben Phänotyp wie Mäuse mit *Ptch<sup>neo67</sup>*- oder *Ptch<sup>neo12</sup>*-Mutation auf (LV Goodrich *et al.*, 1997; H Hahn *et al.*, 1998). So entwickeln adulte *Ptch<sup>del/+</sup>*-Tiere RMS und MB, *Ptch<sup>del/del</sup>*-Embryonen sterben zwischen 9,0 und 10,5 dpc nach der Befruchtung *in utero* aufgrund von Neuralrohrdefekten ab.

Transkriptanalysen an RMS von *Ptch<sup>del/+</sup>*-Mäusen und an *Ptch<sup>del/del</sup>*-Embryonen am Tag 9,5 bis 10,5 dpc zeigen, dass im *Ptch<sup>del</sup>*-Transkript Exon 7 in Exon 10 gespleißt wurde. Hierdurch entsteht eine Leserasterverschiebung, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führt. Das postulierte *Ptch<sup>del</sup>*-Protein sollte gegenüber dem aus 1093 Aminosäuren bestehenden *Ptch<sup>wt</sup>*-Protein nur aus 341 Aminosäuren bestehen. Daher fehlt diesem Protein, das ein molekulares Gewicht von 38 kDa aufweisen sollte, die SSD, die zweite extrazelluläre Schleife und der C-Terminus. Obwohl der Nachweis eines solchen Proteins aufgrund des Fehlens eines geeigneten Antikörpers nicht möglich war, kann man anhand des Phänotyps von *Ptch<sup>del/+</sup>*-Mäusen annehmen, dass das *Ptch<sup>del</sup>*-Protein keine Funktion mehr hat.

#### 4.4.2 Induktion von BCC

Um eine Deletion von *Ptch* in der Haut zu ermöglichen, wurden *Ptch<sup>flox/flox</sup>*-Mäuse mit *ROSA26ERT2*-Mäusen, die eine Tamoxifen-induzierbare Cre-ERT2 exprimieren, verpaart. *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Nachkommen wurde zunächst eine kumulative Dosis von 5 mg Tamoxifen i.p. injiziert. Die als *tPtch<sup>-/-</sup>* bezeichneten Tiere konnten aufgrund einer rapiden Verschlechterung der körperlichen Verfassung über höchstens 23 Tage beobachtet werden.

Wie molekulare Analysen zeigten, war *Ptch* in *tPtch<sup>-/-</sup>*-Mäusen in vielen der untersuchten Organe mit Ausnahme von Groß- und Kleinhirn deletiert (A Uhmann *et al.*, 2007). Die fehlende Deletion von *Ptch* in Groß- und Kleinhirn beruht auf einer mangelnden oder geringen Expression der Cre-ERT2 in diesen Geweben (D Hameyer *et al.*, 2007).

In den *tPtch<sup>-/-</sup>*-Mäusen wurde eine Hyperproliferation der Magenwand und des Mesenteriums festgestellt. Daher könnte *Ptch* an der Entstehung von Magentumoren oder mesenterialen Tumoren beteiligt sein. Tatsächlich wurde in Tumoren des Verdauungstraktes (DM Berman *et al.*, 2003), z. B. des Ileums (V Fendrich *et al.*, 2007), sowie in kolorektalen Tumoren (R Douard *et al.*, 2006; YH Bian *et al.*, 2007) eine erhöhte Aktivität des Hh/*Ptch*-Signalweges nachgewiesen. Bisher wurde jedoch nicht gezeigt, ob *Ptch*-Mutationen an der Ausbildung dieser Tumoren beteiligt sind. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten an *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen lassen dies aber vermuten.

Der Entwicklungsdefekt der allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark bei diesen Mäusen wurde bereits in der Dissertation von Anja Uhmann (2005) ausführlich diskutiert.

Weiterhin wurden in *tPtch<sup>-/-</sup>*-Mäusen proliferative Veränderungen in der interfollikulären und follikulären Epidermis detektiert, bei denen es sich um Vorläuferläsionen von BCC handelte.

##### 4.4.2.1 Entstehung von BCC nach i.m. Applikation von 100 µg Tamoxifen

Wie bereits erwähnt, mussten *tPtch<sup>-/-</sup>*-Tiere am Tag 23 nach der Applikation von 5 mg Tamoxifen abgetötet werden (siehe 3.2.1.3.2). Die Progression der Vorläuferläsionen zu voll-ausgebildeten BCC war in diesem Modell daher nicht zu verfolgen. Interessanterweise war dies jedoch in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen nach einer einmaligen i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen möglich.

Etwa 45 Tage nach der Tamoxifen-Applikation waren hyperproliferative Veränderungen der Ohr- und Schwanzhaut erkennbar, die sich 90 Tage nach der Injektion zu massiven BCC ausgebildet haben. Zusätzlich wurden an den Fußsohlen Trichoblastome

festgestellt. In der behaarten Haut entwickelten sich in Einzelfällen BCC-Vorläuferläsionen, aber keine BCC.

Die mit 100 µg Tamoxifen behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Tiere zeigten neben Hauttumoren keine weiteren Organveränderungen, obwohl in Experimenten mit *ROSA26ERT2<sup>+/-</sup>;ROSA26-R<sup>+/-</sup>*-Reportermausen eine schwache Aktivierung der Cre-ERT2 in Leber, Milz und Lunge detektiert wurde. Es kann daher angenommen werden, dass in diesen Organen die *Ptch*-Inaktivierung bei i.m. behandelten *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen für eine pathologische Aktivierung der Signalkaskade nicht ausreichend ist. Überraschenderweise entwickeln sich in diesen Tieren keine RMS. Wie Daten von Arne Zibat (AG Hahn) zeigen, wird *Ptch* jedoch effektiv durch die i.m. Gabe im injizierten Muskel deletiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ursprungszellen für RMS nicht im adulten Muskel zu suchen sind.

Das Ausbleiben von BCC in behaarten Hautregionen lässt sich möglicherweise mit Hilfe der Reportermause erklären. In diesen Mäusen ließ sich die Cre-ERT2 durch eine i.m. Injektion von 100 µg Tamoxifen sehr viel besser in Ohren und Schwänzen der Tiere, d. h. in unbehaarter Haut, als an behaarten Körperstellen aktivieren. Ursache dafür war jedoch nicht eine fehlende Expression oder fehlende Aktivierbarkeit der Cre-ERT2 in behaarter Haut. Eine mögliche Erklärung für die stärkere Cre-ERT2-Aktivität in unbehaarter Haut ist eine höhere Durchblutung der Ohren und Schwänze im Vergleich zu behaarten Hautarealen. Faktoren wie der Kontakt mit Einstreu könnten hierbei auch eine Rolle spielen. Durch eine bessere Durchblutung könnte mehr Tamoxifen anfluten und die Cre-ERT2 besser aktiviert werden.

Jedoch könnte auch ein Unterschied der BCC-Suszeptibilität zwischen behaarter und unbehaarter Haut vorliegen. So entwickeln beispielsweise *ΔK5-M2SMO*- und *K5-Gli2*-Mäuse, in denen mutantes *SMO* bzw. *Gli2* unter der Kontrolle eines hautspezifischen Promotors exprimiert wird (M Grachtchouk *et al.*, 2000; V Grachtchouk *et al.*, 2003), BCC vorwiegend an der Schwanzhaut. Der *K5*-Promotor ist jedoch sowohl in unbehaarter als auch behaarter Haut aktiv (H Sheng *et al.*, 2002). Weiterhin wird er nicht durch die i.p. oder i.m. Gabe von Induktoren aktiviert. Diese Daten sprechen für die Existenz von Faktoren, die eine erhöhte BCC-Suszeptibilität von unbehaarter Haut gegenüber behaarter Haut verursachen.

#### 4.4.2.2 Initiation und Progression von BCC

Aufgrund der Analysen von BCC aus *K14-Shh*-, *K5-tTA;TRE-Gli2*- und *Krt6a-Cre:Ptch<sup>neo/neo</sup>*-Mäusen wurde bisher angenommen, dass BCC aus Zellen des Haarfollikels (ME Hutchin *et al.*, 2005), aus Basalzellen der Epidermis (AE Oro *et al.*, 1997) oder aus beiden Strukturen entstehen (C Adolphe *et al.*, 2006). In letzteren Tiermodellen wurde die Induktion von BCC durch eine gewebs- bzw. zellspezifische Fehlregulation des Hh/Ptch-Signalweges durch den *K14*-, *K5*- oder den *Keratin 6a (K6a)*-Promotor bewirkt. Im *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mausmodell hingegen sollte die Fehlregulation nicht auf einzelne Zelltypen der Haut beschränkt sein, obwohl dies bislang nicht explizit nachgewiesen wurde.

Zur Untersuchung, ob BCC aus der ORS des Haarfollikels oder aus Basalzellen der Epidermis entstehen, wurden in dieser Arbeit p63- und K17-Antikörperfärbungen an BCC-Vorläuferläsionen und späteren Stadien durchgeführt.

In der Epidermis werden p63 und K17 in der ORS exprimiert. Zudem wird p63 auch in den Basalzellen exprimiert. Falls BCC nun aus der ORS entstehen, würde man erwarten, dass BCC beide Marker exprimieren. Falls BCC nur aus Basalzellen entstehen, sollten BCC jedoch nur p63 exprimieren. Unsere Daten in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen weisen darauf hin, dass alle voll-ausgebildeten BCC sowohl p63 als auch K17 exprimieren. Weiterhin war p63 stets in sämtlichen interfollikulären Vorläuferläsionen exprimiert, wohingegen nicht alle dieser Läsionen K17 exprimierten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich BCC neben der ORS auch aus Basalzellen entwickeln können.

Dagegen wurde die IRS als Ursprung für BCC ausgeschlossen, da weder K1 noch K10 in 45 oder 90 Tage alten BCC exprimiert wurden.

Die Initiation von BCC scheint in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen durch die biallelische Deletion von *Ptch* ausgelöst zu werden. Dies wurde zunächst anhand von Tamoxifen-behandelten *Ptch<sup>flox/+</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen festgestellt. Diese Tiere zeigten zu keinem Zeitpunkt Hautveränderungen oder andere Anomalien. Somit scheint eine monoallelische Inaktivierung von *Ptch* nicht für eine Induktion von BCC auszureichen.

BCC ließen sich dagegen in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen induzieren und die durchgeführten *in situ*-Hybridisierungen zeigten, dass diese Tumoren keine *Ptch<sup>wt</sup>*-Transkripte mehr exprimierten. Daher scheint eine biallelische Deletion von *Ptch* für die Initiation von BCC notwendig zu sein.



Während ihrer Progression zu voll-ausgebildeten BCC zeigten die Tumoren von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen nur eine schwache, lokal begrenzte Expression von p53. Da die Expression von p53 durch genomische Instabilität aktiviert wird (DM Shin *et al.*, 2001), bedeutet dies, dass in den Tumoren keine dramatischen somatischen Veränderungen stattgefunden haben können. Letzteres wird auch dadurch deutlich, dass die BCC zu keinem Zeitpunkt einen invasiven Charakter zeigten und regredient waren. Die Initiation sowie die Progression der BCC bei *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen verläuft daher völlig anders als bei bestrahlten *Ptch<sup>neo67/+</sup>*-Mäusen.

In *Ptch<sup>neo67/+</sup>*-Mäusen werden durch die Bestrahlung natürlich viele Mutationen in den verschiedensten Genen hervorgerufen, was zur Aktivierung und damit zur Expression von p53 führt (M Mancuso *et al.*, 2004). Eine verstärkte Expression von p53 kann aber auch durch einen gestörten Abbau dieses Proteins beim Vorliegen von Mutationen hervorgerufen werden (J Gu *et al.*, 2001). Tatsächlich wurden in 40 % der BCC aus bestrahlten *Ptch<sup>neo67/+</sup>*-Mäusen *p53*-Mutationen gefunden (M Aszterbaum *et al.*, 1999). Daher wird p53 sowohl in voll-ausgebildeten als auch infiltrativen BCC von bestrahlten *Ptch<sup>neo67/+</sup>*-Mäusen deutlich exprimiert (M Mancuso *et al.*, 2004). Interessanterweise ist ein aggressiveres Wachstumsmuster dieser BCC nicht mit der Expression von p53, sondern mit dem *Ptch*-Status assoziiert. So zeigen ausschließlich invasive BCC einen biallelischen Verlust von *Ptch* (LOH des *Ptch*-Lokus), wohingegen noduläre BCC lediglich einen monoallelischen *Ptch*-Verlust aufweisen. In diesem Modell wurde daher postuliert, dass ein biallelischer Verlust von *Ptch* nicht mit der Initiation, sondern mit der Tumorprogression und der Entstehung von aggressiven BCC in Verbindung steht.

Aufgrund der Daten von BCC in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen kann diese Aussage nun nicht mehr gehalten werden. So scheint in *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen die biallelische *Ptch*-Inaktivierung die Voraussetzung für die BCC Initiation zu sein. Sie scheint aber nicht mit dem aggressiven Charakter der Tumoren in Verbindung zu stehen.

#### 4.4.2.3 Spontane Regression und Differenzierung von BCC

BCC zeigten  $\geq 200$  Tage nach ihrer Induktion eine spontane Regression, die sich durch eine Trichoblastom-ähnliche Morphologie, durch einen differenzierteren Phänotyp und in den meisten Fällen durch einen dramatischen Rückgang des Tumorumfanges auszeichnete. Wie bereits erörtert, erfolgte diese Regression, obwohl *Ptch* im Tumorgewebe in allen untersuchten Tumorstadien biallelisch deletiert war.

Bisher wurde die Regression von Hh/Ptch-assoziierten BCC nur in *K5-tTA;TRE-Gli2*-Mäusen beschrieben (ME Hutchin *et al.*, 2005). In diesen Tieren entstehen BCC durch die Expression von *Gli2*, welches unter einem aktivierbaren *K5*-Promotor exprimiert wurde. Eine Regression der Tumoren erfolgt nach Inaktivierung des Promotors und damit der Inaktivierung der *Gli2*-Expression. In diesem Modell korreliert die Regression mit einer Inaktivierung der Aktivität der Hh/Ptch-Signalkaskade, was durch eine verminderte Expression von *Ptch* und *Gli1* deutlich wird, sowie mit einer Abnahme der Proliferation und einer erhöhten Apoptoserate.

Im Gegensatz hierzu wiesen regrediente BCC aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen eine konstitutiv aktive Hh/Ptch-Signalkaskade auf. Möglicherweise erfolgte eine leichte Aktivitätsabnahme in den regredienten Stadien. Weiterhin korrelierte die Regression der BCC von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen zwar mit einem Rückgang der Proliferation, nicht jedoch mit einer Zunahme der Apoptoserate. Letzteres wurde nicht nur durch fehlende Caspase-3-Aktivierung, sondern auch durch eine hohe Expression des antiapoptotischen Bcl-2 deutlich. An der Regression der BCC könnte natürlich auch ein Caspase- oder Bcl2-unabhängiger programmierter Zelltod beteiligt sein (G Kroemer und SJ Martin, 2005). Weiterhin sollte man Autophagie in Erwägung ziehen (Y Tsujimoto und S Shimizu, 2005), zumal kürzlich gezeigt wurde, dass der autophagische Zelltod auch in Zellen erfolgt, die eine Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 aufweisen (S Shimizu *et al.*, 2004).

Aufgrund verschiedener Publikationen ist auch ein Zusammenhang zwischen der Regression von BCC und der kanonischen Wnt-Signaltransduktion denkbar (F Yamazaki *et al.*, 2001; G Saldanha *et al.*, 2004; M Salto-Tellez *et al.*, 2006). Demnach hätte eine Abnahme der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs eine Regression bewirkt. Eine Beteiligung dieses Signalweges bei der BCC Regression konnte jedoch eindeutig ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob regrediente BCC eine vermehrte Infiltration mit Zellen des Immunsystems aufweisen. Diese Untersuchung basierte auf den folgenden Sachverhalten: i) Es ist bekannt, dass eine Immunsuppression nach Organtransplantationen das Risiko für BCC erhöht (V Madan *et al.*, 2006; J Rawlins *et al.*, 2006). ii) Zu den wesentlichen BCC Risikofaktoren gehört UV-Strahlung, die neben der Induktion von Mutationen auch eine Suppression des Immunsystems bewirkt (S Beissert *et al.*, 2001). iii) Weiterhin sind BCC mit dem Immunmodulator Imiquimod therapierbar (D Bilu und DN Sauder, 2003). iv) Bei humanen BCC wird eine spontane

Regression mit einer Reaktion des Immunsystems assoziiert. Häufig werden hierbei inflammatorische Infiltrate von Lymphozyten (P Kaur *et al.*, 2006) bzw. T-Zellen gefunden (PJ Lespi und SD Gregorini, 2000; HG Kaporis *et al.*, 2007). v) Der Haarfollikel verfügt als einzige Struktur der Haut über ein Immunprivileg, das auf den Zeitraum des Anagens beschränkt ist. Dieses Immunprivileg äußert sich unter anderem durch eine niedrige Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes I, die Beeinträchtigung Antigen-präsentierender Zellen und die lokale Produktion von immunsupprimierenden Substanzen (R Paus *et al.*, 2005). Möglicherweise kann daher das Immunsystem die Entstehung von Tumoren, die aus diesen Zellen zum Zeitpunkt des Anagens entstehen können (wie z. B. auch das BCC), nicht verhindern.

Die Analyse von BCC der *Ptch<sup>flx/flx</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäuse zeigte, dass die Regression von BCC unabhängig von einer vermehrten Infiltration mit Immunzellen (einschließlich B- und T-Zellen sowie Makrophagen) stattfindet. Diese Analysen lassen jedoch keine Aussage zu, ob die infiltrierenden Immunzellen der regredierenden BCC vermehrt anti-tumorale Zytokine, wie beispielsweise Gamma-Interferon, Interleukin-2 und Tumornekrosefaktor- $\beta$ , ausschütten. Für diese Zytokine ist ein erhöhter Expressionslevel in regredierenden BCC gezeigt worden (DA Wong *et al.*, 2000). Auch eine vermehrte Sekretion von Interleukin-12 käme in Betracht, weil im Mausmodell eine komplette Remission von Tumormetastasen durch dieses Zytokin gezeigt wurde (M Zabala *et al.*, 2004).

Interessanterweise zeigten regredierende BCC der *Ptch<sup>flx/flx</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäuse einen differenzierteren Phänotyp als voll-ausgebildeten BCC 90 Tage nach der Induktion. Dies war sowohl histologisch als auch molekular durch die Expression von K1 und K10 offensichtlich.

Bisher wurde über eine Expression von K1 oder K10 in BCC nur selten berichtet. Dabei wurden die Marker höchstens lokal sehr begrenzt oder in keratinhaltigen Zysten im Tumorgewebe exprimiert (O Yamamoto und M Asahi, 1999; F Remotti *et al.*, 2001; ME Hutchin *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu werden beide Marker in Plattenepithelkarzinomen (engl.: „squamous cell carcinoma“ – SCC) exprimiert (BK Bloor *et al.*, 2001). SCC sind maligne Tumoren, die im Gegensatz zu den semimaligen BCC häufiger metastasieren. Daher wurde eine Metaplasie von BCC zu SCC angesichts der K1- und K10-Expression in späten Stadien in Erwägung gezogen. Die Histologie der Tumoren von *Ptch<sup>flx/flx</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen spricht jedoch eindeutig dagegen.

Der Auslöser für die Expression von K1 und K10 in den regredienten BCC der *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäuse ist momentan unbekannt. Da jedoch eine inaktive Hh/Ptch-Signalkaskade die Expression von *K10* aktiviert (G Regl *et al.*, 2004; S Tamiji *et al.*, 2005), könnte eine Aktivitätsabnahme des Hh/Ptch-Signalwegs in den BCC der *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäuse direkt mit der vermehrten *K10*-Expression in Verbindung stehen. Ob die Aktivität des Hh/Ptch-Signalwegs in regredienten BCC tatsächlich abnimmt, ist – wie bereits beschrieben – bisher nicht eindeutig bewiesen.

Weiterhin ist unbekannt, ob K1 oder K10 die Proliferation von BCC Tumorzellen hemmen. Dies ist jedoch für Keratinozyten gezeigt worden, deren Proliferation durch K10 gehemmt wird (JM Paramio *et al.*, 1999; JM Paramio *et al.*, 2001). Auch weisen transgene Mäuse, die *K10* in der proliferativen Basalzellschicht exprimieren, nicht nur eine verminderte Proliferation von Keratinozyten auf, sondern zeigen ein erniedrigtes Risiko für Hauttumoren (M Santos *et al.*, 2002). Weiterhin wurde spekuliert, dass K1 und/oder K10 den Prozess der Differenzierung von Keratinozyten beschleunigen, indem die Apoptose verhindert wird (J Chen *et al.*, 2006). Aufgrund dieser Daten könnte man vermuten, dass es sich bei *K10* um ein Tumorsuppressorgen handelt. Daher könnte die *K10*-Expression in BCC von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen direkt mit der Regression, oder auch mit der fehlenden Apoptose in den Tumoren (siehe oben) in Zusammenhang stehen.

Gegen die „Tumorsuppressorgen-Hypothese“ sprechen jedoch Analysen von *K10<sup>-/-</sup>*-knockout-Mäusen. Mit Hilfe dieser Mäuse wurde gezeigt, dass *K10* zwar die Proliferation von Basalzellen hemmt, die Prädisposition zu chemisch-induzierten Papillomen jedoch heraufsetzt (J Reichelt und TM Magin, 2002; J Reichelt *et al.*, 2004). Weiterhin gibt es Mutmaßungen, dass *K10* in Signaltransduktionsprozesse involviert ist. So wurde eine Inhibition des Notch-Signalweges durch *K10* beschrieben (M Santos *et al.*, 2005). Es ist daher möglich, dass die Regression der BCC von *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen auch mit einem solchen Signaltransduktionsprozess in Verbindung steht.

Bei voll-ausgebildeten BCC am Tag 90 nach der Induktion kann der mRNA Level von *K1* und *K10* nicht mit der *K1*- und *K10*-Proteinexpression korreliert werden. In diesem Stadium wurde zwar *K1* und *K10* mRNA exprimiert, jedoch war kein Protein detektierbar. Möglicherweise lagen in den voll-ausgebildeten BCC Proteinmodifikationen von *K1* und *K10* vor, die eine Bindung der verwendeten Antikörper verhinderten. Weiterhin könnte die Translation der mRNA in diesem BCC-Stadium verhindert sein. Beide Möglichkeiten müssten jedoch zeitlich auf 90 Tage alte BCC beschränkt sein, da in späteren Stadien eine Proteinexpression von *K1* und *K10* nachgewiesen wurde.

Neben K1 oder K10 könnte auch p63 mit dem erhöhten Differenzierungsstaus und der niedrigeren Proliferationsrate der regredienten BCC in Verbindung gebracht werden. So wurde beschrieben, dass p63 für eine Differenzierung von Keratinozyten notwendig ist (AB Truong *et al.*, 2006; MI Koster *et al.*, 2007). Andererseits wurde jedoch gezeigt, dass p63 die Differenzierung von Keratinozyten blockiert (KE King *et al.*, 2003; BC Nguyen *et al.*, 2006). Diese unterschiedlichen Funktionen von p63 scheinen auf den verschiedenen p63-Isoformen zu beruhen (C Bamberger *et al.*, 2005). So ist vor allem die  $\Delta$ Np63-Isoform – und weniger die TAp63-Isoform – an der Differenzierung und verminderten Proliferation von Keratinozyten beteiligt (AB Truong und PA Khavari, 2007). Nun wurde in BCC aus *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen in jedem Stadium das p63-Protein nachgewiesen. Da der verwendete Antikörper alle p63-Isoformen erkennt, ist unklar, ob sich das Expressionsniveau der p63-Isoformen in BCC aus *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen im Verlauf der Progression und Differenzierung zugunsten der  $\Delta$ Np63-Isoformen verschiebt. Dies könnte eine Änderung des Differenzierungsgrades sowie einen Rückgang der Proliferationsrate bewirken. Zukünftige Analysen könnten sich anhand von mRNA-Expressionsanalysen an mikrodisektiertem Material mit dieser Fragestellung befassen.

Auch ist es möglich, dass Faktoren aus dem Tumorstroma eine Rolle bei Differenzierung und Proliferation der BCC in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen spielen. So ist seit langer Zeit bekannt, dass Interaktionen zwischen BCC und dem assoziierten Bindegewebe bestehen, die beispielsweise eine Stimulation der Proliferation von stromalen Zellen bewirken. Weiterhin exprimieren stromale Zellen von BCC im Vergleich zu stromalen Zellen aus gesunder Haut vermehrt *GREMLIN1*, einen Antagonisten des „Bone morphogenic protein“ (BMP)-Signalweges. Interessanterweise wird durch *GREMLIN1* die Proliferation der Tumorzellen gefördert (JB Sneddon *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Ko-Kultivierung von Keratinozyten und Fibroblasten aus BCC-Stroma in den Keratinozyten BCC-ähnliche Eigenschaften hervorruft (L Lacina *et al.*, 2007). Daher ist es möglich, dass auch das BCC-Stroma in *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen Faktoren abgibt, die bei der Regression dieser Tumoren eine Rolle spielen könnten.

#### 4.4.3 Entstehung von BCC möglicherweise unabhängig vom Haarzyklus

In der Haut ist die Hh/Ptch-Signalkaskade essentiell für die Regulation des Haarzyklus. Bereits mehrfach wurden Zusammenhänge zwischen der Entstehung von BCC und den Haarzyklusphasen beschrieben. So entstehen epitheliale Tumoren in *K14-Gli1*-Mäusen

erst während des ersten Anagens in 25 Tage alten Mäusen (AE Oro und K Higgins, 2003). Ebenso wird die BCC-Inzidenz und Latenzzeit in bestrahlten *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen in Abhängigkeit des Haarzyklus moduliert (M Mancuso *et al.*, 2006).

Auch in dieser Arbeit wurde untersucht, ob BCC nur in bestimmten Haarzyklusphasen entstehen können. Dazu wurde die Cre-ERT2 in behaarter Haut mit einem synchronisierten Haarzyklus zu verschiedenen Zeitpunkten des Haarzyklus induziert.

Interessanterweise konnten BCC unabhängig von der Haarzyklusphase induziert werden. Dies war aufgrund der oben genannten Ergebnisse von Mancuso *et al.* (M Mancuso *et al.*, 2006) an bestrahlten *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen ein unerwartetes Resultat. In letzterem Modell entwickelten sich BCC häufiger und schneller, wenn die *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäuse während des Anages bestrahlt wurden. Zudem exprimierten einige dieser Tumoren glattes Muskel-Aktin und K14. Solche molekularen Veränderungen sind bei den BCC aus *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-Mäusen nicht auszuschließen, da sie nicht analysiert wurden. Aufgrund unserer Versuchsplanung war es leider auch nicht möglich, die Latenzzeit der BCC zu analysieren. So wurde in unserer Studie eine Endpunktanalyse vom 72. Tag an bis 140 Tage nach Tamoxifengabe durchgeführt. Innerhalb dieser Zeiträume hatten sich bereits in sämtlichen Mäusen BCC gebildet. Nichtsdestotrotz wurden in dieser Arbeit die Tumorgöße und, wenn möglich, die Tumormultiplizität analysiert. Die Analysen zeigen, dass sich diese Parameter zwischen den einzelnen Kohorten nicht unterscheiden. So waren sowohl Größe als auch Frequenz der BCC einheitlich und unabhängig davon, ob die Tumoren im Anagen oder aber im Telogen induziert wurden.

Natürlich sollte das Experiment mit einer größeren Anzahl an Tieren wiederholt werden. Um den Einfluss der jeweiligen Haarzyklusphase auf die Latenzzeit der BCC zu untersuchen, sollten sequenzielle Hautanalysen durchgeführt werden, die sofort nach der Induktion der Tumoren begonnen werden.

#### 4.4.4 Etablierung stabiler Zelllinien für *in vitro*-Analysen der *Ptch*-Funktion

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Zelllinien zur Analyse der Funktion von *Ptch*. Vorteile von Zelllinien gegenüber tierexperimentellen Arbeiten sind die einfache Manipulierbarkeit, die Arbeit mit homogenem Material und die Möglichkeit der Durchführung diverser Experimente innerhalb kurzer Zeit.

Die Zelllinien wurden aus Fibroblasten der murinen Dermis von *Ptch*<sup>flox/flox</sup>*ERT2*<sup>+/-</sup>-, *Ptch*<sup>flox/flox</sup>- und *Ptch*<sup>wt</sup>-Mäusen hergestellt. Es wurden keine embryonalen Fibroblasten

isoliert, da die Gefahr der Selektion von Zellklonen mit *per se* aktiver oder inaktiver Hh/Ptch-Signalkaskade bestanden hätte.

In der primär isolierten  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Zelllinie wurde zunächst das  $Ptch^{del}$ -Allel nachgewiesen. Dies wurde auf eine basale Grundaktivität der Cre-ERT2 in den Zellen zurückgeführt, obwohl diese *in vivo* nicht aufgetreten ist (siehe 3.2.1.3.2). Um Zellen ohne Cre-ERT2-Aktivität zu gewinnen, wurden Einzelzellklone isoliert. Hierdurch konnten fünf monoklonale  $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ -Zelllinien ohne Basalaktivität der Cre-ERT2 hergestellt werden. In allen fünf Zelllinien konnte aber eine Rekombination des  $Ptch^{flox}$ -Lokus nach Stimulation der Cre-ERT2 mit Tamoxifen induziert werden. Nur in einer der Zelllinien („B9“) ließ sich durch die  $Ptch$ -Mutation eine Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade hervorrufen. Die übrigen vier Zelllinien hatten diese Eigenschaft im Laufe der Kultivierung (möglicherweise durch Mutationen oder epigenetische Veränderungen) verloren.

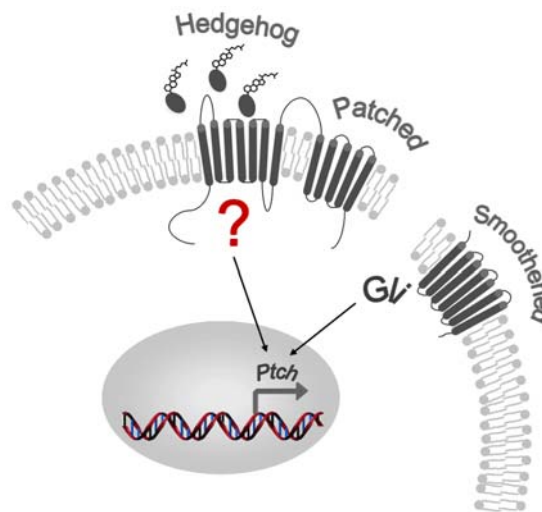
Genauere Analysen der  $Ptch$ -Transkripte in B9-Zellen nach Tamoxifengabe zeigten einen deutlichen Rückgang von  $Ptch^{wt}$  sowie die Zunahme von  $Ptch^{del}$ -Transkripten. Da das postulierte  $Ptch^{del}$ -Protein wegen eines vorzeitigen Abbruchs der Translation auf 341 Aminosäuren verkürzt ist, sollte es keine Inhibition von Smo bewirken können und dadurch die Hh/Ptch-Signalkaskade aktivieren (RL Johnson *et al.*, 2000; S Makino *et al.*, 2001). Dies war tatsächlich der Fall und neben  $Gli1$  wurde auch  $Gli2$  nach Stimulation mit Tamoxifen exprimiert. Weiterhin konnte die Erhöhung der  $Gli1$ -Expression durch den spezifischen Smo-Inhibitor Cyclopamin blockiert werden.

Obwohl es unter Tamoxifen-Behandlung in B9-Zellen zu einem Wechsel der Expression von  $Ptch^{wt}$ - zu  $Ptch^{del}$ -Transkripten kam, wurde die  $Ptch$ -Expression (d. h. Summe aus  $Ptch^{wt}$ - und  $Ptch^{del}$ -Transkripten) durch Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade nicht erhöht. Wie auch  $Gli1$  ist  $Ptch$  ebenfalls ein Zielgen des Hh/Ptch-Signalweges (siehe Abbildung 1). Daher würde man annehmen, dass der Funktionsverlust von Ptch nicht nur zur Induktion der  $Gli1$ -Expression, sondern auch zu einem starken Anstieg von  $Ptch$ -Transkripten führen sollte.

Die fehlende Zunahme der  $Ptch$ -Expression in Tamoxifen-behandelten B9-Zellen könnte ein Anzeichen für eine nicht vollständig funktionierende Signalkaskade sein oder auf epigenetische Veränderungen am  $Ptch$ -Promotor hinweisen. Dagegen spricht jedoch, dass sich die  $Ptch$ -Expression durch die Zugabe von Shh in den B9-Zellen aktivieren ließ. Durch Shh-Stimulation wurde im Vergleich zu Tamoxifen-behandelten Zellen nicht nur vermehrt  $Ptch$ , sondern auch vermehrt  $Gli1$  und  $Gli2$  und  $Gli3$  exprimiert.

Zusammengefasst kann man nun Folgendes festhalten: Sowohl Mutationen in  $Ptch$  als auch die Shh-Stimulation führen in B9-Zellen zur Aktivierung der  $Gli1$ -Expression.

Begleitet wird dies in Shh-stimulierten Zellen durch eine Aktivierung der *Ptch*-Transkription. Die Aktivierung der *Ptch*-Transkription bleibt dagegen in den *Ptch*-mutanten B9-Zellen aus. Diese Daten könnten für eine alternative Signaltransduktion durch Shh sprechen. Dieser alternative Weg könnte z. B. über Gli2 oder Gli3 laufen, da diese beiden Faktoren in Shh-stimulierten Zellen heraufreguliert werden. Alternativ dazu könnten weitere Faktoren durch Shh stimuliert werden, die für eine Gli-unabhängige *Ptch*-Transkription verantwortlich sind. Ein solcher alternativer, nicht-kanonischer Signalweg ist in Abbildung 53 dargestellt.



**Abbildung 53: Modell einer nicht-kanonischen Hh/Ptch-Signaltransduktion.** Gezeigt ist ein Modell für einen nicht-kanonischen Hh/Ptch-Signalweg. Die Aktivierung durch die Bindung des Liganden Hh führt zur Aktivierung von Gli oder anderen Faktoren (?) in den Nucleus. Dort wird die Transkription von *Ptch* ausgelöst.

Es gibt jedoch noch eine weitere Erklärungsmöglichkeit. Nach Shh-Stimulation kann die erhöhte *Ptch*-Expression in B9-Zellen nur durch *Ptch*<sup>wt</sup>-Transkripte bedingt sein. Im Gegensatz dazu werden nach Tamoxifen-Behandlung in den Zellen aufgrund der unvollständigen Rekombinationseffizienz (ca. 60 %) sowohl *Ptch*<sup>wt</sup>- als auch *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte exprimiert.

Nun ist bekannt, dass bereits ein *Ptch*<sup>wt</sup>-Molekül die Aktivität von 45 *Smo*-Molekülen um fast 80 % hemmen kann (J Taipale *et al.*, 2002). Daher ist es möglich, dass der Level an *Ptch*<sup>wt</sup>-Transkripten in Tamoxifen-behandelten B9-Zellen nicht hoch genug ist, um die *Smo*-Aktivität vollständig zu inhibieren. Dies resultiert in einer Restaktivität der Signalkaskade, die gerade ausreicht, um eine vermehrte *Gli1*-Expression auszulösen. Die Aktivierung der Kaskade reicht jedoch nicht aus, um eine Deregulation der *Ptch*-Expression hervorzurufen. Eine solche Hypothese wird auch durch Expressionsanalysen von *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen gestützt. Im Gegensatz zu Tamoxifen-behandelten B9-Zellen



exprimieren *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen nur mutante *Ptch*<sup>del</sup>-Transkripte, die keinerlei blockierende Wirkung auf Smo haben. Hierdurch ist die Signalkaskade hochaktiv, was in einer sehr starken Transkription sowohl von *Gli1* als auch von *Ptch* resultiert.

Wie soeben beschrieben, zeigen B9-Zellen einen Anstieg der *Gli3*-Expression nach Shh-Stimulation. Auch *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen exprimieren sehr stark *Gli3*. Heutzutage besteht jedoch die Auffassung, dass die *Gli3*-Transkription durch eine aktive Hh/Ptch-Signalkaskade negativ reguliert wird. Die negative Regulation der *Gli3*-Transkription durch Hh wurde jedoch während der Embryonalentwicklung beschrieben (V Marigo *et al.*, 1996b; A Ruiz i Altaba, 1999). Bei B9- und *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen dagegen handelt es sich um adulte Fibroblasten.

Es ist daher möglich, dass adulte Zellen im Gegensatz zu embryonalen Zellen in der Lage sind, *Gli3* nach Stimulation der Hh/Ptch-Signalkaskade zu exprimieren. Eine solche Beobachtung wurde auch schon von anderen Gruppen gemacht (J Motoyama *et al.*, 1998).

Schließlich sei noch angemerkt, dass die Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade in *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen in einer erhöhten Proliferationsrate resultiert. Dies zeigt ein Vergleich zu *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Zellen. Die erhöhte Proliferationsrate der *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen ist darauf zurückzuführen, dass inaktivierende *Ptch*-Mutationen über die konstitutiv aktive Hh/Ptch-Signalkaskade eine Progression des Zellzyklus hervorrufen (EA Barnes *et al.*, 2005).

#### 4.4.5 Ausblick

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Zelllinien B9 und *Ptch*<sup>-/-</sup> für Analysen der Ptch-Funktion *in vitro* hervorragend geeignet sind. B9- können genauso wie *Ptch*<sup>flox/flox</sup>-Zellen als „Wildtyp *Ptch*-Zelllinien“ verwendet werden. In B9-Zellen kann der Hh/Ptch-Signalweg durch Zugabe von Shh oder von Tamoxifen ins Kulturmedium aktiviert werden. In *Ptch*<sup>-/-</sup>-Zellen ist der Signalweg aufgrund von mutiertem *Ptch per se* aktiv.

Diese Zelllinien können in der Zukunft für verschiedene Experimente benutzt werden. So wird heute vermutet, dass Ptch als Pumpe für den Transport von Cholesterolderivaten fungieren könnte (MF Bijlsma *et al.*, 2006). Es ist jedoch nicht bekannt, um welche Derivate es sich hierbei handelt.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass es sich bei Ptch um einen so genannten „Dependence“ Rezeptor handelt (C Thibert *et al.*, 2003; P Mehlen *et al.*, 2005), der in Gegenwart seines Liganden Shh ein Überleben von Zellen ermöglicht. Durch Abwesenheit von Shh wird

dagegen der programmierte Zelltod induziert (P Mehlen und DE Bredesen, 2004). Die genauen molekularen Abläufe, die sich nach Bindung von Shh an Ptch abspielen, sind unbekannt.

Ferner wurde gezeigt, dass Ptch als Lipoproteinrezeptor fungieren kann. Was hierbei auf molekularer Ebene genau passiert und welche Rolle diese Bindung für die Zelle spielt, ist ebenfalls unklar (TE Willnow *et al.*, 2007; A Callejo *et al.*, 2008). Solche Fragestellungen können nun anhand dieser Zelllinien überprüft werden.

Auch können diese Zelllinien zur Analyse der Tumor-Stroma Interaktion beim BCC verwendet werden. Unter der Annahme, dass stromale Faktoren tatsächlich eine Rolle bei der Regression von BCC spielen (siehe 4.4.2.3), könnte man BCC-Zelllinien mit *Ptch*<sup>flox/flox</sup>- bzw. B9-Zellen kokultivieren und die molekularen Veränderungen sowohl in Tumorzellen (z. B. Kontrolle des Differenzierungsstatus über *K1*- und *K10*-Analysen; Untersuchung des Proliferationsverhaltens über BrdU Assays etc.) als auch den „stromalen“ Fibroblasten (z. B. über Mikroarrayanalysen) untersuchen.

## 5 Zusammenfassung

Mutationen im *Patched*-Gen (*Ptch*), welches für eine Komponente der Hedgehog (Hh)/Ptch-Signalkaskade kodiert, werden häufig bei Basalzellkarzinomen (BCC), Medulloblastomen (MB) und Rhabdomyosarkomen (RMS) gefunden. Wie Daten aus dem *Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Tiermodell zeigen, ist die Tumorzinzidenz vom genetischen Hintergrund abhängig. Der Hintergrund C57BL/6N (B6) prädisponiert die Tiere zu MB, wohingegen der BALB/c (BALB)-Hintergrund zu RMS prädisponiert. Dies weist auf die Existenz von Modifikatorgenen hin. Ein Ziel dieser Arbeit war die Kartierung und Identifikation dieser Gene.

Im Rahmen dieses Projektes wurde an der Charakterisierung des RMS-Suszeptibilitäts-Lokus *Parms1* (*Patched-Associated RMS 1*) mitgewirkt. Dieser Locus liegt auf Chromosom 2 im Intervall zwischen den Mikrosatellitenmarkern D2Mit37 und D2Mit102. In dieser Region begünstigen dominante BALB-Allele die Entstehung von RMS. Diese Daten wurden in der Zeitschrift *Genomics* publiziert (H Hahn *et al.*, 2004).

In den Mauslinien B6 und BALB wurden für elf Kandidatengene SNP- oder Genexpressions-Analysen durchgeführt. Aufgrund der Überexpression von *Catenin src* im Skelettmuskel von B6-Mäusen und seiner tumorsuppressorischen Funktion könnte dieses Gen in die Modulation der RMS-Suszeptibilität involviert sein.

Zusätzlich wurde für Feinkartierungsuntersuchungen des Locus *Parms1* in 218 B6x(BALBxB6)*Ptch*<sup>neo67/+</sup> N2-Mäusen eine genomweite Kopplungsanalyse mit 97 polymorphen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Weiterhin wurden Nachkommen aus Kreuzungen von B6*Ptch*<sup>neo67/+</sup>-Mäusen mit den Inzuchtstämmen 129Sv, DBA2J und FVB/N generiert und auf die Entwicklung von Tumoren untersucht. In den F1-Generationen sollte dann auf der Basis der Korrelation von Segmentidentität und Phänotyp eine weitere Kartierung der RMS-Suszeptibilität durchgeführt werden.

Im Laufe der Untersuchungen wurde eine genetische Kontamination bei B6-Mäusen, die im Zeitraum von Herbst 2003 bis Frühjahr 2005 von der Firma Charles River Laboratories zur Etablierung der entsprechenden Kreuzungen zugekauft worden waren, festgestellt. Die SNP-Analyse ließ auf eine Kontamination mit einer DBA-Inzuchtlinie schließen (F Nitzki *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Tatsache wurde das Kartierungsprojekt abgebrochen.

In einem zweiten Projekt wurde die in unserem Labor generierte Mauslinie *Ptch*<sup>flox/flox</sup> charakterisiert. Mittels einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Rekombinase wurde in diesem konditionellen *Ptch*-knockout-Mausmodell eine *Ptch*-Mutation induziert. Neben

hyperproliferativen Veränderungen der Magenwand und des Mesenteriums sowie einem Entwicklungsdefekt der allgemeinen lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark konnten in diesen Mäusen BCC hervorgerufen werden (A Umann *et al.*, 2007).

Die BCC wurden durch eine biallelische Deletion von *Ptch* initiiert und entstehen wahrscheinlich unabhängig von der Haarzyklusphase aus sowohl Basalzellen der Epidermis als auch der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels.

Interessanterweise wurden die BCC nach 200 Tagen regredient, zeigten einen differenzierteren Phänotyp und eine verminderte Proliferation. Da in jedem BCC-Stadium die Hh/Ptch-Signalkaskade aktiv war, kann die Regression nicht durch eine Inaktivierung des Signalweges bedingt sein. Von regredienten Tumorstadien wurden die Differenzierungsmarker Keratin 1 (K1) und Keratin 10 (K10) exprimiert, wohingegen K1 und K10 in den frühen Tumorstadien nicht detektiert wurden. Daher steht die Expression von K1 und K10 vermutlich im direkten Zusammenhang mit der Regression der BCC. Diese Daten leisten einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathogenese dieser Tumorentität und könnten in der Zukunft eventuell zur Etablierung neuer Therapieansätze beisteuern.

Schließlich wurde die Zelllinie B9 aus *Ptch<sup>flox/flox</sup>ERT2<sup>+/-</sup>*-Mäusen generiert. In diesen Zellen lässt sich eine *Ptch*-Mutation durch Behandlung mit Tamoxifen induzieren. Die resultierende *Ptch*-Deletion bewirkt eine Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade, was auch durch Inkubation der Zellen mit Shh hervorgerufen werden kann. Zusätzlich wurden die *Ptch*-defiziente Zelllinie *Ptch<sup>-/-</sup>*, die eine pathologisch aktivierte Hh/Ptch-Signalkaskade aufweist, und die Wildtyp-*Ptch* Zelllinie *Ptch<sup>flox/flox</sup>* etabliert. *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen zeigen im Vergleich zur Zelllinie *Ptch<sup>flox/flox</sup>* eine stark erhöhte Aktivität der Hh/Ptch-Signalkaskade sowie eine erhöhte Proliferationsrate. Sowohl in B9- als auch *Ptch<sup>-/-</sup>*-Zellen lässt sich die physiologisch bzw. pathologisch aktivierte Hh/Ptch-Signalkaskade durch die Zugabe von Cyclopamin inhibieren. Diese Zelllinien können dazu beitragen, die Funktion von *Ptch* besser zu verstehen.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

<sup>32</sup> P	radioaktives Phosphorisotop
6-FAM	6-Carboxyfluoreszein
AP	alkalische Phosphatase
<i>Api5</i>	<i>Apoptosis inhibitor 5</i>
B6	C57BL/6N
BCC	Basal cell carcinoma – Basalzellkarzinom
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2
<i>Bmf</i>	<i>Bcl-2 modifying factor</i>
<i>BMP/Bmp</i>	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
Bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin
BSA	bovine serum albumine – Rinderserumalbumin)
C	Nukleinsäure-spezifischer Koeffizient
c	Konzentration von Nukleinsäuren
c	cortex (Kortex)
<i>Catns</i>	<i>Catenin src</i>
CD	cluster of differentiation
cDNA	copyDNA
Chr.	Chromosom
<i>Ci</i>	<i>Cubitus interruptus (D. Melanogaster Gli-Homolog)</i>
cM	centiMorgan
Cre-ERT2	Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase
cRNA	copy RNA
cSNP	coding single nucleotide polymorphism – kodierende Einzelpunktmutation
C-terminal	carboxyterminal
Ct-Wert	cycle threshold (Schwellenwert)
d	days – Tage
DAB	Diamino-Benzidin
Db	Dot blot
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>DISP/Disp</i>	<i>Dispatched</i>
<i>Disp2</i>	<i>Dispatched homolog 2</i>
<i>Dll4</i>	<i>Delta-like 4</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	N.N.-Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
<i>dpc</i>	<i>days post coitum</i> (Tage nach der Kopulation)
DTT	Dithiothreitol
<i>E</i>	<i>Extinktion</i>
E	Exon
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat

<i>Ehf</i>	<i>Ets homologous factor</i>
<i>ERT2</i>	Mauslinie <i>ROSA26CreERT2</i>
<i>f</i>	Verdünnungsfaktor
Fab	antigenbindendes Fragment
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
<i>frt</i>	<i>frt</i> Sequenz (DNA-Konsensussequenz zur Bindung der FLPase)
<i>Fu/FU</i>	<i>Fused</i>
g	granulärer, musköser Magen
G418	Geneticinsulfat
<i>Gapdh</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphatase-dehydrogenase</i>
gDNA	genomische DNA
Gh	Großhirn
Ha	Haut
He	Herz
HE	Hämatoxylin/Eosin
<i>Hh</i>	<i>Hedgehog</i>
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
I	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
<i>Igf2</i>	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IHC	Immunhistochemie
inv.	invasiv
IRS	inner root sheath – innere Wurzelscheide
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
K1	Keratin 1
K10	Keratin 10
K14	Keratin 14
K17	Keratin 17
K6a	Keratin 6a
kDa	Kilodalton
Kh	Kleinhirn
KI	knockin-Allel
Kif7	<i>Kinesin family member 7</i>
LacZ	β-Galactosidase
LB-Medium	lysogeny broth Medium
Le	Leber
LMS	Leiomyosarkom
LOD-Score	logarithm of the odds – Logarithmus der Wahrscheinlichkeit
LOH	loss of heterozygosity (Verlust beider Genallele)
<i>loxP</i>	<i>loxP</i> Sequenz (DNA-Konsensussequenz zur Bindung der Cre-Rekombinase)
LRS	likelihood ratio statistic
Lsg.	Lösungsmittel
Lu	Lunge
MB	Medulloblastom
Mb	Megabasen

MBSTL	Maleinsäure/Natriumchlorid/Levamisol/Tween-20-haltiger Puffer
<i>Mdk</i>	<u>M</u> id <u>k</u> ine
me	<u>M</u> esenterium
Mi	<u>M</u> ilz
MPD	<u>M</u> ouse <u>P</u> henome <u>D</u> atabase
M-Phase	Mitose
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA
N2	B6x(BALBxB6) <i>Ptch</i> <sup>neo67/+</sup> N2
NBCCS	<u>N</u> evoid <u>B</u> asal <u>C</u> ell <u>C</u> arcinoma <u>S</u> ndrome
<i>neoR</i>	<u>N</u> eomycin- <u>R</u> esistenzgen
ng	<u>n</u> icht- <u>g</u> randulärer, kutaner Mage
Ni	<u>N</u> iere
NT	<u>N</u> atriumchlorid/ <u>T</u> ris-haltiger Puffer
N-terminal	aminoterminal
NTMLT	<u>N</u> atriumchlorid/ <u>T</u> ris/ <u>M</u> agnesiumchlorid/ <u>L</u> evamisol/ <u>T</u> ween-20-haltiger Puffer
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
ORS	<u>o</u> uter <u>r</u> oot <u>s</u> heath – äußere Wurzelscheide
P	<u>P</u> assage
<i>p53</i>	<u>T</u> ransformation related <u>p</u> rotein <u>53</u>
<i>p63</i>	<u>T</u> ransformation related <u>p</u> rotein <u>63</u>
<i>Parms1</i>	<u>P</u> atched- <u>a</u> ssociated <u>R</u> MS <u>1</u>
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Phoshat-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction – Polymerasekettenreaktion
PDZ-Domäne	abgeleitet von <u>P</u> SD95/ <u>S</u> AP90, <u>D</u> iscs large und <u>Z</u> onula occludentes-1
P-Ko.	<u>P</u> ositiv <u>k</u> ontrolle
PS	<u>P</u> enicillin/ <u>S</u> treptomycin
<i>Ptch</i>	<u>P</u> atched
<i>Ptch<sup>del</sup></i>	<i>Ptch</i> Allel mit Cre-vermittelter Deletion der Exone 8 und 9
<i>Ptch<sup>fox</sup></i>	<i>Ptch</i> Allel zur Cre-vermittelten Deletion der Exone 8 und 9
<i>Ptch<sup>neo12</sup></i>	<i>Ptch</i> Allel mit der Deletion der Exone 1 und 2
<i>Ptch<sup>neo67</sup></i>	<i>Ptch</i> Allel mit Deletion der Exone 6 und 7
<i>Ptch<sup>wt</sup></i>	Wildtyp <i>Ptch</i> Allel
<i>Ptch<sup>Δ10</sup></i>	<i>Ptch</i> -Spleißvariante ohne Exon 10
<i>Ptprj</i>	<u>P</u> rotein <u>t</u> yrosine <u>p</u> hosphatase, <u>r</u> eceptor type, <u>j</u>
qRT-PCR	<u>q</u> uantitative <u>r</u> eal <u>t</u> ime <u>P</u> CR
QTL	<u>q</u> uantitative <u>t</u> rait <u>l</u> ocus
RMS	<u>R</u> habdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
RZPD	Ressourcenzentrum für Genomforschung
SCC	<u>S</u> quamous <u>c</u> ell <u>c</u> arcinoma – Plattenepithelkarzinom
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat
<i>Shh</i>	<u>S</u> onic <u>h</u> edge <u>h</u> og
SM	<u>S</u> kelett <u>m</u> uskel
<i>Smo</i>	<u>S</u> moothened
SNP	<u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism – Einzelpunktmutation
S-Phase	<u>S</u> ynthese <u>p</u> hase

SSC	<u>s</u> tandard <u>s</u> aline <u>c</u> itrate (Standard Natriumcitrat Lösung)
SSD	<u>s</u> terol <u>s</u> ensing <u>d</u> omain
STE	SDS/Tris/EDTA-haltiger Puffer
Sufu	<u>S</u> uppressor of <u>f</u> used
T	<u>t</u> ransgenes Allel
Taq	<u>T</u> hermus <u>a</u> quaticus
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orsäure- <u>E</u> DTA Lösung
TBS	<u>t</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Tris-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
Th	<u>T</u> hymus
<i>tPtc<sup>-/-</sup></i>	Tamoxifen-induzierte <i>Ptc<sup>delN<sup>X</sup></sup></i> Mutation
Traf6	<u>T</u> nf <u>r</u> eceptor- <u>a</u> ssociated <u>f</u> actor <u>6</u>
U	<u>u</u> nit (Enzymaktivitätseinheit)
UV-Licht	<u>U</u> ltraviolette Licht
v/v	<u>v</u> olume/ <u>v</u> olume (Volumen/Volumen)
Vol	<u>V</u> olumen
w/v	<u>w</u> eight/ <u>v</u> olume (Gewicht/Volumen)
Wnt/WNT	<u>W</u> ingless
wt	<u>W</u> ildtyp
Wt1	<i>W</i> ilms <i>t</i> umor <i>h</i> omolog
xg	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-Galaktosid
XI	<u>X</u> hoI
YYE	<u>Y</u> akima <u>Y</u> ellow
Zfp289	<i>A</i> DP- <i>r</i> ibosylation <i>f</i> actor <i>G</i> TPase <i>a</i> ctivating <i>p</i> rotein <i>2</i>



## 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.

Alcedo J, Ayzenzon M, Von Ohlen T, Noll M und Hooper JE, 1996. '*The Drosophila smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal.*' *Cell* 86(2): 221-32.

Aszterbaum M, Epstein J, Oro A, Douglas V, LeBoit PE, Scott MP und Epstein EH, Jr., 1999. '*Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice.*' *Nat Med* 5(11): 1285-91.

Bamberger C, Hafner A, Schmale H und Werner S, 2005. '*Expression of different p63 variants in healing skin wounds suggests a role of p63 in reepithelialization and muscle repair.*' *Wound Repair Regen* 13(1): 41-50.

Barnes EA, Heidtman KJ und Donoghue DJ, 2005. '*Constitutive activation of the shh-ptc1 pathway by a patched1 mutation identified in BCC.*' *Oncogene* 24(5): 902-15.

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.

Beissert S, Ruhlemann D, Mohammad T, Grabbe S, El-Ghorr A, Norval M, Morrison H, Granstein RD und Schwarz T, 2001. '*IL-12 prevents the inhibitory effects of cis-urocanic acid on tumor antigen presentation by Langerhans cells: implications for photocarcinogenesis.*' *J Immunol* 167(11): 6232-8.

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.

Bian YH, Huang SH, Yang L, Ma XL, Xie JW und Zhang HW, 2007. '*Sonic hedgehog-Gli1 pathway in colorectal adenocarcinomas.*' *World J Gastroenterol* 13(11): 1659-65.

Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F und Peppelenbosch MP, 2006. '*Repression of smoothed by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion.*' *PLoS Biol* 4(8): e232.

Bilu D und Sauder DN, 2003. '*Imiquimod: modes of action.*' *Br J Dermatol* 149 Suppl 66: 5-8.

Bloor BK, Seddon SV und Morgan PR, 2001. '*Gene expression of differentiation-specific keratins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma.*' *Oral Oncol* 37(3): 251-61.

- Botchkarev VA, Botchkareva NV, Nakamura M, Huber O, Funa K, Lauster R, Paus R und Gilchrist BA, 2001. '*Noggin is required for induction of the hair follicle growth phase in postnatal skin.*' *Faseb J* 15(12): 2205-14.
- Bridge JA, Liu J, Qualman SJ, Suijkerbuijk R, Wenger G, Zhang J, Wan X, Baker KS, Sorensen P und Barr FG, 2002. '*Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes.*' *Genes Chromosomes Cancer* 33(3): 310-21.
- 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.
- Bukhardt Perez MP, Ruiz-Villaverde R, Naranjo Diaz MJ, Blasco Melguizo J und Naranjo Sintes R, 2007. '*Basal cell carcinoma: treatment with imiquimod.*' *Int J Dermatol* 46(5): 539-42.
- 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.
- Callejo A, Culi J und Guerrero I, 2008. '*Patched, the receptor of Hedgehog, is a lipoprotein receptor.*' *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(3): 912-7.
- 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.
- Carpentieri DF, Nichols K, Chou PM, Matthews M, Pawel B und Huff D, 2002. '*The expression of WT1 in the differentiation of rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors.*' *Mod Pathol* 15(10): 1080-6.
- Chen J, Cheng X, Merched-Sauvage M, Caulin C, Roop DR und Koch PJ, 2006. '*An unexpected role for keratin 10 end domains in susceptibility to skin cancer.*' *J Cell Sci* 119(Pt 24): 5067-76.
- Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T und Beachy PA, 2002. '*Small molecule modulation of Smoothed activity.*' *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14071-6.
- Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T und Konishi I, 2007. '*Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis.*' *Cancer Sci* 98(1): 68-76.
- Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M, Bolinger M, Litingtung Y, Robertson EK, Cooper MK, Gaffield W, Westphal H, Beachy PA und Dlugosz AA, 1999. '*Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis.*' *Dev Biol* 205(1): 1-9.

- Churchill GA und Doerge RW, 1994. '*Empirical threshold values for quantitative trait mapping.*' Genetics 138(3): 963-71.
- Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I und Ruiz i Altaba A, 2007. '*HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity.*' Curr Biol 17(2): 165-72.
- Cohen MM, Jr., 2003. '*The hedgehog signaling network.*' Am J Med Genet A 123(1): 5-28.
- Coventry S, Kapur RP und Siebert JR, 1998. '*Cyclopamine-induced holoprosencephaly and associated craniofacial malformations in the golden hamster: anatomic and molecular events.*' Pediatr Dev Pathol 1(1): 29-41.
- Crowson AN, 2006. '*Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications.*' Mod Pathol 19 Suppl 2: S127-47.
- 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.
- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI und Soller M, 1993. '*Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map.*' Genetics 134(3): 943-51.
- Davis MA und Reynolds AB, 2006. '*Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland.*' Dev Cell 10(1): 21-31.
- Daya-Grosjean L und Couve-Privat S, 2005. '*Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas.*' Cancer Lett 225(2): 181-92.
- de Vries E, van de Poll-Franse LV, Louwman WJ, de Gruijl FR und Coebergh JW, 2005. '*Predictions of skin cancer incidence in the Netherlands up to 2015.*' Br J Dermatol 152(3): 481-8.
- Doerge RW und Churchill GA, 1996. '*Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character.*' Genetics 142(1): 285-94.
- Douard R, Moutereau S, Pernet P, Chimingqi M, Allory Y, Manivet P, Conti M, Vaubourdolle M, Cugnenc PH und Loric S, 2006. '*Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer.*' Surgery 139(5): 665-70.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA und McMahon AP, 1993. '*Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity.*' Cell 75(7): 1417-30.
- El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, Poulson R und Fallowfield M, 2003. '*Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma.*' Br J Dermatol 148(5): 964-70.

- Endo H, Oikawa A, Utani A und Shinkai H, 2004. '*Plexiform neurofibromas express the transcription factor Gli1.*' *Dermatology* 209(4): 284-7.
- Evangelista M, Tian H und de Sauvage FJ, 2006. '*The hedgehog signaling pathway in cancer.*' *Clin Cancer Res* 12(20 Pt 1): 5924-8.
- Evans DG, Farndon PA, Burnell LD, Gattamaneni HR und Birch JM, 1991. '*The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma.*' *Br J Cancer* 64(5): 959-61.
- Fan H und Khavari PA, 1999. '*Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest.*' *J Cell Biol* 147(1): 71-6.
- Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, Bedja D, Beaty R, Mullendore M, Karikari C, Alvarez H, Iacobuzio-Donahue C, Jimeno A, Gabrielson KL, Matsui W und Maitra A, 2007. '*Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers.*' *Cancer Res* 67(5): 2187-96.
- Fendrich V, Waldmann J, Esni F, Ramaswamy A, Mullendore M, Buchholz M, Maitra A und Feldmann G, 2007. '*Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum.*' *Endocr Relat Cancer* 14(3): 865-74.
- Frohlich L, Liu Z, Beier DR und Lanske B, 2002. '*Genomic structure and refined chromosomal localization of the mouse Ptch2 gene.*' *Cytogenet Genome Res* 97(1-2): 106-10.
- Fuchs E, 1993. '*Epidermal differentiation and keratin gene expression.*' *J Cell Sci Suppl* 17: 197-208.
- Gailani MR, Bale SJ, Leffell DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Poliak S, Drum MA, Pastakia B, McBride OW, Kase R und et al., 1992. '*Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9.*' *Cell* 69(1): 111-7.
- 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.
- Giglia-Mari G und Sarasin A, 2003. '*TP53 mutations in human skin cancers.*' *Hum Mutat* 21(3): 217-28.
- 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.
- Grachtchouk M, Mo R, Yu S, Zhang X, Sasaki H, Hui CC und Dlugosz AA, 2000. '*Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin.*' *Nat Genet* 24(3): 216-7.

- Grachtchouk V, Grachtchouk M, Lowe L, Johnson T, Wei L, Wang A, de Sauvage F und Dlugosz AA, 2003. '*The magnitude of hedgehog signaling activity defines skin tumor phenotype.*' *Embo J* 22(11): 2741-51.
- Gu J, Kawai H, Wiederschain D und Yuan ZM, 2001. '*Mechanism of functional inactivation of a Li-Fraumeni syndrome p53 that has a mutation outside of the DNA-binding domain.*' *Cancer Res* 61(4): 1741-6.
- 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, Miller G und Zimmer A, 1999. '*The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models [In Process Citation].*' *J Mol Med* 77(6): 459-68.
- 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.
- Hameyer D, Loonstra A, Eshkind L, Schmitt S, Antunes C, Groen A, Bindels E, Jonkers J, Krimpenfort P, Meuwissen R, Rijswijk L, Bex A, Berns A und Bockamp E, 2007. '*Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues.*' *Physiol Genomics* 31(1): 32-41.
- Hanahan D und Weinberg RA, 2000. '*The hallmarks of cancer.*' *Cell* 100(1): 57-70.
- Hooper JE und Scott MP, 2005. '*Communicating with Hedgehogs.*' *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4): 306-17.
- Huang S, He J, Zhang X, Bian Y, Yang L, Xie G, Zhang K, Tang W, Stelter AA, Wang Q, Zhang H und Xie J, 2006. '*Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas.*' *Carcinogenesis* 27(7): 1334-40.

Huangfu D und Anderson KV, 2006. '*Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates.*' *Development* 133(1): 3-14.

Humphreys RP, 1982. '*Posterior cranial fossa brain tumors in children.*' In: J. R. Youmans (ed), *Neurological Surgery*. W. B. Saunders, Philadelphia: pp. 2733-2752.

Hunter KW und Williams RW, 2002. '*Complexities of cancer research: mouse genetic models.*' *Ilar J* 43(2): 80-8.

Hutchin ME, Kariapper MS, Grachtchouk M, Wang A, Wei L, Cummings D, Liu J, Michael LE, Glick A und Dlugosz AA, 2005. '*Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle.*' *Genes Dev* 19(2): 214-23.

Ingham PW und McMahon AP, 2001. '*Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles.*' *Genes Dev* 15(23): 3059-87.

Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR und Wainwright BJ, 2002. '*Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells.*' *Oncogene* 21(53): 8196-205.

Inoue J, Gohda J, Akiyama T und Semba K, 2007. '*NF-kappaB activation in development and progression of cancer.*' *Cancer Sci* 98(3): 268-74.

Jemth P und Gianni S, 2007. '*PDZ domains: folding and binding.*' *Biochemistry* 46(30): 8701-8.

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.

Kaporis HG, Guttman-Yassky E, Lowes MA, Haider AS, Fuentes-Duculan J, Darabi K, Whynot-Ertelt J, Khatcherian A, Cardinale I, Novitskaya I, Krueger JG und Carucci JA, 2007. '*Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3+ T cells in a Th2 dominant microenvironment.*' *J Invest Dermatol* 127(10): 2391-8.

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.

Karagas MR, Stukel TA, Greenberg ER, Baron JA, Mott LA und Stern RS, 1992. '*Risk of subsequent basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin among patients with prior skin cancer. Skin Cancer Prevention Study Group.*' *Jama* 267(24): 3305-10.

- Karhadkar SS, Steven Bova G, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM und Beachy PA, 2004. '*Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis.*' Nature.
- Kasper M, Regl G, Frischauf AM und Aberger F, 2006. '*GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling.*' Eur J Cancer 42(4): 437-45.
- Katoh Y und Katoh M, 2004. '*KIF27 is one of orthologs for Drosophila Costal-2.*' Int J Oncol 25(6): 1875-80.
- Katoh Y und Katoh M, 2006. '*Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review).*' Int J Mol Med 18(6): 1019-23.
- Kaur P, Mulvaney M und Carlson JA, 2006. '*Basal cell carcinoma progression correlates with host immune response and stromal alterations: a histologic analysis.*' Am J Dermatopathol 28(4): 293-307.
- Kawakami T, Kawcak T, Li YJ, Zhang W, Hu Y und Chuang PT, 2002. '*Mouse dispatched mutants fail to distribute hedgehog proteins and are defective in hedgehog signaling.*' Development 129(24): 5753-65.
- Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, Yang ML, Kase R, DiGiovanna JJ, Bale AE und Bale SJ, 1997. '*Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome.*' Am J Med Genet 69(3): 299-308.
- King KE, Ponnampertuma RM, Yamashita T, Tokino T, Lee LA, Young MF und Weinberg WC, 2003. '*deltaNp63alpha functions as both a positive and a negative transcriptional regulator and blocks in vitro differentiation of murine keratinocytes.*' Oncogene 22(23): 3635-44.
- Knudson AG, Jr., 1971. '*Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.*' Proc Natl Acad Sci U S A 68(4): 820-3.
- Kobayashi T, Walsh MC und Choi Y, 2004. '*The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response.*' Microbes Infect 6(14): 1333-8.
- Koster MI, Dai D, Marinari B, Sano Y, Costanzo A, Karin M und Roop DR, 2007. '*p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis.*' Proc Natl Acad Sci U S A 104(9): 3255-60.
- Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD und Lambert WC, 1994. '*The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm.*' Arch Dermatol 130(8): 1018-21.
- Kraemer KH, Lee MM und Scotto J, 1987. '*Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases.*' Arch Dermatol 123(2): 241-50.
- Kroemer G und Martin SJ, 2005. '*Caspase-independent cell death.*' Nat Med 11(7): 725-30.

- Kruger K, Blume-Peytavi U und Orfanos CE, 1999. '*Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle.*' Arch Dermatol Res 291(5): 253-9.
- Kuwabara PE und Labouesse M, 2002. '*The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role?*' Trends Genet 18(4): 193-201.
- Lacina L, Smetana K, Jr., Dvorankova B, Pytlik R, Kideryova L, Kucerova L, Plzakova Z, Stork J, Gabius HJ und Andre S, 2007. '*Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes.*' Br J Dermatol 156(5): 819-29.
- Lacour JP, 2002. '*Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms.*' Br J Dermatol 146 Suppl 61: 17-9.
- 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.
- Lespi PJ und Gregorini SD, 2000. '*Folliculotropic T cells in regressive basal cell carcinoma of skin.*' Am J Dermatopathol 22(1): 30-3.
- Li J, Meyer AN und Donoghue DJ, 1997. '*Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation.*' Proc Natl Acad Sci U S A 94(2): 502-7.
- Li JL, Sainson RC, Shi W, Leek R, Harrington LS, Preusser M, Biswas S, Turley H, Heikamp E, Hainfellner JA und Harris AL, 2007. '*Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo.*' Cancer Res 67(23): 11244-53.
- Lindstrom E, Shimokawa T, Toftgard R und Zaphiropoulos PG, 2006. '*PTCH mutations: distribution and analyses.*' Hum Mutat 27(3): 215-9.
- Lo Celso C, Prowse DM und Watt FM, 2004. '*Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours.*' Development 131(8): 1787-99.
- Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Grieco M, Ramires P, Romito AM, De Rosa G und Piattelli A, 2002. '*WNT-1 expression in basal cell carcinoma of head and neck. An immunohistochemical and confocal study with regard to the intracellular distribution of beta-catenin.*' Anticancer Res 22(2A): 565-76.



- Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K und Beachy PA, 2002. '*Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched.*' Cell 111(1): 63-75.
- Madan V, Hoban P, Strange RC, Fryer AA und Lear JT, 2006. '*Genetics and risk factors for basal cell carcinoma.*' Br J Dermatol 154 Suppl 1: 5-7.
- Makino S, Masuya H, Ishijima J, Yada Y und Shiroishi T, 2001. '*A spontaneous mouse mutation, mesenchymal dysplasia (mes), is caused by a deletion of the most C-terminal cytoplasmic domain of patched (ptc).*' Dev Biol 239(1): 95-106.
- Maloney ME, 1995. '*Histology of basal cell carcinoma.*' Clin Dermatol 13(6): 545-9.
- Mancuso M, Leonardi S, Tanori M, Pasquali E, Pierdomenico M, Rebessi S, Di Majo V, Covelli V, Pazzaglia S und Saran A, 2006. '*Hair cycle-dependent basal cell carcinoma tumorigenesis in Ptc1neo67/+ mice exposed to radiation.*' Cancer Res 66(13): 6606-14.
- 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.
- Mao X, Seidlitz E, Ghosh K, Murakami Y und Ghosh HP, 2003. '*The cytoplasmic domain is critical to the tumor suppressor activity of TSLC1 in non-small cell lung cancer.*' Cancer Res 63(22): 7979-85.
- 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.
- McFerren MA, 2006. '*Useful plants of dermatology. VIII. The false hellebore (Veratrum californicum).*' J Am Acad Dermatol 54(4): 718-20.
- Mehlen P und Bredesen DE, 2004. '*The dependence receptor hypothesis.*' Apoptosis 9(1): 37-49.
- Mehlen P, Mille F und Thibert C, 2005. '*Morphogens and cell survival during development.*' J Neurobiol 64(4): 357-66.
- Mentzel T und Kuhnen C, 2006. '*Spindle cell rhabdomyosarcoma in adults: clinicopathological and immunohistochemical analysis of seven new cases.*' Virchows Arch 449(5): 554-60.
- Millar SE, 2002. '*Molecular mechanisms regulating hair follicle development.*' J Invest Dermatol 118(2): 216-25.
- Miller DL und Weinstock MA, 1994. '*Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence.*' J Am Acad Dermatol 30(5 Pt 1): 774-8.

- Mizuno T, Tokuoka S, Kishikawa M, Nakashima E, Mabuchi K und Iwamoto KS, 2006. '*Molecular basis of basal cell carcinogenesis in the atomic-bomb survivor population: p53 and PTCH gene alterations.*' Carcinogenesis 27(11): 2286-94.
- Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M und Hui CC, 1998. '*Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus.*' Nat Genet 20(1): 54-7.
- Muller-Rover S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmuller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS und Paus R, 2001. '*A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages.*' J Invest Dermatol 117(1): 3-15.
- 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.
- Nakano Y, Kim HR, Kawakami A, Roy S, Schier AF und Ingham PW, 2004. '*Inactivation of dispatched 1 by the chameleon mutation disrupts Hedgehog signalling in the zebrafish embryo.*' Dev Biol 269(2): 381-92.
- Nguyen BC, Lefort K, Mandinova A, Antonini D, Devgan V, Della Gatta G, Koster MI, Zhang Z, Wang J, Tommasi di Vignano A, Kitajewski J, Chiorino G, Roop DR, Missero C und Dotto GP, 2006. '*Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation.*' Genes Dev 20(8): 1028-42.
- Nilsson M, Uden AB, Krause D, Malmquist U, Raza K, Zaphiropoulos PG und Toftgard R, 2000. '*Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1 [In Process Citation].*' Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3438-43.
- Nitzki F, Kruger A, Reifenberg K, Wojnowski L und Hahn H, 2007. '*Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers.*' Lab Anim 41(2): 218-28.
- 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.
- Oro AE und Higgins K, 2003. '*Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception.*' Dev Biol 255(2): 238-48.

- 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.
- Paladini RD, Saleh J, Qian C, Xu GX und Rubin LL, 2005. '*Modulation of hair growth with small molecule agonists of the hedgehog signaling pathway.*' J Invest Dermatol 125(4): 638-46.
- Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, Mitnacht S, Lane EB und Jorcano JL, 1999. '*Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16.*' Mol Cell Biol 19(4): 3086-94.
- Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S und Jorcano JL, 2001. '*Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest.*' Mol Cell Biol 21(21): 7449-59.
- Paus R und Cotsarelis G, 1999. '*The biology of hair follicles.*' N Engl J Med 341(7): 491-7.
- Paus R, Nickoloff BJ und Ito T, 2005. '*A 'hairy' privilege.*' Trends Immunol 26(1): 32-40.
- Pazzaglia S, Mancuso M, Atkinson MJ, Tanori M, Rebessi S, Majo VD, Covelli V, Hahn H und Saran A, 2002. '*High incidence of medulloblastoma following X-ray-irradiation of newborn Ptc1 heterozygous mice.*' Oncogene 21(49): 7580-4.
- Pazzaglia S, Mancuso M, Tanori M, Atkinson MJ, Merola P, Rebessi S, Di Majo V, Covelli V, Hahn H und Saran A, 2004. '*Modulation of patched-associated susceptibility to radiation induced tumorigenesis by genetic background.*' Cancer Res 64(11): 3798-806.
- Petkov PM, Ding Y, Cassell MA, Zhang W, Wagner G, Sargent EE, Asquith S, Crew V, Johnson KA, Robinson P, Scott VE und Wiles MV, 2004. '*An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships.*' Genome Res 14(9): 1806-11.
- Pham LV, Zhou HJ, Lin-Lee YC, Tamayo AT, Yoshimura LC, Fu L, Darnay BG und Ford RJ, 2008. '*Nuclear Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 in Lymphoid Cells Negatively Regulates c-Myb-mediated Transactivation through Small Ubiquitin-related Modifier-1 Modification.*' J Biol Chem 283(8): 5081-9.
- 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.
- Pintar A, De Biasio A, Popovic M, Ivanova N und Pongor S, 2007. '*The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference?*' Biol Direct 2: 19.
- Ponting CP, Phillips C, Davies KE und Blake DJ, 1997. '*PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites.*' Bioessays 19(6): 469-79.

- Pritchard JI und Olson JM, 2008. '*Methylation of PTCH1, the Patched-1 gene, in a panel of primary medulloblastomas.*' Cancer Genet Cytogenet 180(1): 47-50.
- Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW und James CD, 1997. '*Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations.*' Cancer Res 57(5): 842-5.
- Rawlins J, Platt A und Gowda P, 2006. '*Regression of BCC following immunosuppression withdrawal in a renal transplant recipient.*' Clin Exp Dermatol 31(5): 717-8.
- Regl G, Kasper M, Schnidar H, Eichberger T, Neill GW, Ikram MS, Quinn AG, Philpott MP, Frischauf AM und Aberger F, 2004. '*The zinc-finger transcription factor GLI2 antagonizes contact inhibition and differentiation of human epidermal cells.*' Oncogene 23(6): 1263-74.
- Reichelt J, Furstenberger G und Magin TM, 2004. '*Loss of keratin 10 leads to mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, increased keratinocyte turnover, and decreased tumor formation in mice.*' J Invest Dermatol 123(5): 973-81.
- Reichelt J und Magin TM, 2002. '*Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice.*' J Cell Sci 115(Pt 13): 2639-50.
- Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Kohler B, Schonicke A, Scharwachter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T und Reifenberger G, 2005. '*Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas.*' Br J Dermatol 152(1): 43-51.
- Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P und Reifenberger G, 1998. '*Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system.*' Cancer Res 58(9): 1798-803.
- Remotti F, Fetsch JF und Miettinen M, 2001. '*Keratin 1 expression in endothelia and mesenchymal tumors: an immunohistochemical analysis of normal and neoplastic tissues.*' Hum Pathol 32(8): 873-9.
- 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.
- Robinson JK und Dahiya M, 2003. '*Basal cell carcinoma with pulmonary and lymph node metastasis causing death.*' Arch Dermatol 139(5): 643-8.
- Rossi A, Caracciolo V, Russo G, Reiss K und Giordano A, 2008. '*Medulloblastoma: From Molecular Pathology to Therapy.*' Clin Cancer Res 14(4): 971-976.
- Rubin AI, Chen EH und Ratner D, 2005. '*Basal-cell carcinoma.*' N Engl J Med 353(21): 2262-9.
- Ruiz i Altaba A, 1999. '*Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer.*' Trends Genet 15(10): 418-25.

- Saldanha G, Ghura V, Potter L und Fletcher A, 2004. '*Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation.*' Br J Dermatol 151(1): 157-64.
- Salto-Tellez M, Peh BK, Ito K, Tan SH, Chong PY, Han HC, Tada K, Ong WY, Soong R, Voon DC und Ito Y, 2006. '*RUNX3 protein is overexpressed in human basal cell carcinomas.*' Oncogene 25(58): 7646-9.
- Santos M, Paramio JM, Bravo A, Ramirez A und Jorcano JL, 2002. '*The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis.*' J Biol Chem 277(21): 19122-30.
- Santos M, Rio P, Ruiz S, Martinez-Palacio J, Segrelles C, Lara MF, Segovia JC und Paramio JM, 2005. '*Altered T cell differentiation and Notch signaling induced by the ectopic expression of keratin K10 in the epithelial cells of the thymus.*' J Cell Biochem 95(3): 543-58.
- Sato N, Leopold PL und Crystal RG, 1999. '*Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog.*' J Clin Invest 104(7): 855-64.
- Sheng H, Goich S, Wang A, Grachtchouk M, Lowe L, Mo R, Lin K, de Sauvage FJ, Sasaki H, Hui CC und Dlugosz AA, 2002. '*Dissecting the oncogenic potential of Gli2: deletion of an NH(2)-terminal fragment alters skin tumor phenotype.*' Cancer Res 62(18): 5308-16.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB und Tsujimoto Y, 2004. '*Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes.*' Nat Cell Biol 6(12): 1221-8.
- Shin DM, Charuruks N, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Hong WK und Hittelman WN, 2001. '*p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis.*' Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 10(6): 603-9.
- Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, Kintner CR und Stark KL, 2000. '*Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium.*' Genes Dev 14(11): 1313-8.
- Sidransky D, 1996. '*Is human patched the gatekeeper of common skin cancers? [news; comment].*' Nat Genet 14(1): 7-8.
- Singh J, Itahana Y, Parrinello S, Murata K und Desprez PY, 2001. '*Molecular cloning and characterization of a zinc finger protein involved in Id-1-stimulated mammary epithelial cell growth.*' J Biol Chem 276(15): 11852-8.
- Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C und Wainwright BJ, 1999. '*Isolation and characterization of human Patched 2 (PTCH2), a putative tumor suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32.*' Hum Mol Gen 6(2): 291-297.

- Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE und Brown PO, 2006. '*Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation.*' Proc Natl Acad Sci U S A 103(40): 14842-7.
- Soriano P, 1999. '*Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain.*' Nat Genet 21(1): 70-1.
- St-Jacques B, Dassule HR, Karavanova I, Botchkarev VA, Li J, Danielian PS, McMahon JA, Lewis PM, Paus R und McMahon AP, 1998. '*Sonic hedgehog signaling is essential for hair development.*' Curr Biol 8(19): 1058-68.
- Strutt H, Thomas C, Nakano Y, Stark D, Neave B, Taylor AM und Ingham PW, 2001. '*Mutations in the sterol-sensing domain of Patched suggest a role for vesicular trafficking in Smoothed regulation.*' Curr Biol 11(8): 608-13.
- Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, Scott MP und Beachy PA, 2000. '*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.
- Tamiji S, Beauvillain JC, Mortier L, Jouy N, Tual M, Delaporte E, Formstecher P, Marchetti P und Polakowska R, 2005. '*Induction of apoptosis-like mitochondrial impairment triggers antioxidant and Bcl-2-dependent keratinocyte differentiation.*' J Invest Dermatol 125(4): 647-58.
- 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.
- Thoreson MA und Reynolds AB, 2002. '*Altered expression of the catenin p120 in human cancer: implications for tumor progression.*' Differentiation 70(9-10): 583-9.
- Tian H, Jeong J, Harfe BD, Tabin CJ und McMahon AP, 2005. '*Mouse Disp1 is required in sonic hedgehog-expressing cells for paracrine activity of the cholesterol-modified ligand.*' Development 132(1): 133-42.
- Tiet TD, Hopyan S, Nadesan P, Gokgoz N, Poon R, Lin AC, Yan T, Andrulis IL, Alman BA und Wunder JS, 2006. '*Constitutive hedgehog signaling in chondrosarcoma up-regulates tumor cell proliferation.*' Am J Pathol 168(1): 321-30.

- Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R und Unden 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.
- Truong AB und Khavari PA, 2007. '*Control of keratinocyte proliferation and differentiation by p63.*' Cell Cycle 6(3): 295-9.
- Truong AB, Kretz M, Ridky TW, Kimmel R und Khavari PA, 2006. '*p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes.*' Genes Dev 20(22): 3185-97.
- Tsujimoto Y und Shimizu S, 2005. '*Another way to die: autophagic programmed cell death.*' Cell Death Differ 12 Suppl 2: 1528-34.
- Uhmann A, Dittmann K, Nitzki F, Dressel R, Koleva M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Nitsche M, Heller T, Armstrong V, Schulz-Schaeffer W, Wienands J und Hahn H, 2007. '*The hedgehog receptor patched controls lymphoid lineage commitment.*' Blood 110(6): 1814-23.
- 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.
- Unden AB, Zaphiropoulos PG, Bruce K, Toftgard R und Stahle-Backdahl M, 1997. '*Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma.*' Cancer Res 57(12): 2336-40.
- Vorechovsky I, Tingby O, Hartman M, Stromberg B, Nister M, Collins VP und Toftgard R, 1997a. '*Somatic mutations in the human homologue of Drosophila patched in primitive neuroectodermal tumours.*' Oncogene 15(3): 361-6.
- Vorechovsky I, Unden AB, Sandstedt B, Toftgard R und Stahle-Backdahl M, 1997b. '*Trichoepitheliomas contain somatic mutations in the overexpressed PTCH gene: support for a gatekeeper mechanism in skin tumorigenesis.*' Cancer Res 57(21): 4677-81.
- Wade CM, Kulbokas EJ, 3rd, Kirby AW, Zody MC, Mullikin JC, Lander ES, Lindblad-Toh K und Daly MJ, 2002. '*The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome.*' Nature 420(6915): 574-8.
- Wang LC, Liu ZY, Gambardella L, Delacour A, Shapiro R, Yang J, Sizing I, Rayhorn P, Garber EA, Benjamin CD, Williams KP, Taylor FR, Barrandon Y, Ling L und Burkly LC, 2000. '*Regular articles: conditional disruption of hedgehog signaling pathway defines its critical role in hair development and regeneration.*' J Invest Dermatol 114(5): 901-8.
- 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, 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.
- Willnow TE, Hammes A und Eaton S, 2007. '*Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance.*' *Development* 134(18): 3239-49.
- Wolter M, Reifenberger J, Sommer C, Ruzicka T und Reifenberger G, 1997. '*Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system.*' *Cancer Res* 57(13): 2581-5.
- Wong DA, Bishop GA, Lowes MA, Cooke B, Barnetson RS und Halliday GM, 2000. '*Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas.*' *Br J Dermatol* 143(1): 91-8.
- Xie J, Johnson RL, Zhang X, Bare JW, Waldman FM, Cogen PH, Menon AG, Warren RS, Chen LC, Scott MP und Epstein EH, Jr., 1997. '*Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors.*' *Cancer Res* 57(12): 2369-72.
- Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH, Jr. und de Sauvage FJ, 1998. '*Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma.*' *Nature* 391(6662): 90-2.
- Yamamoto O und Asahi M, 1999. '*Cytokeratin expression in trichoblastic fibroma (small nodular type trichoblastoma), trichoepithelioma and basal cell carcinoma.*' *Br J Dermatol* 140(1): 8-16.
- Yamazaki F, Aragane Y, Kawada A und Tezuka T, 2001. '*Immunohistochemical detection for nuclear beta-catenin in sporadic basal cell carcinoma.*' *Br J Dermatol* 145(5): 771-7.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D und McKeon F, 1998. '*p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities.*' *Mol Cell* 2(3): 305-16.
- Yoon JW, Kita Y, Frank DJ, Majewski RR, Konicek BA, Nobrega MA, Jacob H, Walterhouse D und Iannaccone P, 2002. '*Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation.*' *J Biol Chem* 277(7): 5548-55.
- Zabala M, Wang L, Hernandez-Alcoceba R, Hillen W, Qian C, Prieto J und Kramer MG, 2004. '*Optimization of the Tet-on system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors.*' *Cancer Res* 64(8): 2799-804.
- Zhang H, Ping XL, Lee PK, Wu XL, Yao YJ, Zhang MJ, Silvers DN, Ratner D, Malhotra R, Peacocke M und Tsou HC, 2001. '*Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma.*' *Am J Pathol* 158(2): 381-5.



Zurawel RH, Allen C, Chiappa S, Cato W, Biegel J, Cogen P, de Sauvage F und Raffel C, 2000a. '*Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma.*' Genes Chromosomes Cancer 27(1): 44-51.

Zurawel RH, Allen C, Wechsler-Reya R, Scott MP und Raffel C, 2000b. '*Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice.*' Genes Chromosomes Cancer 28(1): 77-81.

## 8 Danksagung

Diese Arbeit wurde an der Universität Göttingen am Institut für Humangenetik (Leitung Prof. Dr. W. Engel) angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. H. Hahn für die Bereitstellung der interessanten Themen, der intensiven Betreuung und Unterstützung sowie für die vielen Gespräche und Anregungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. Engel für die Übernahme des Referats und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Humangenetik anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. R. Hardeland danke ich für die sofortige Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Bei Herrn PD Dr. W. Schulz-Schaeffer bedanke ich mich für viele wertvolle Ratschläge und die Unterstützung zur Durchführung und Interpretation von histologischen Färbungen.

Für die umfassende Einweisung in die Methode der *in situ*-Hybridisierung, die Hilfestellung und die Durchführung von Färbungen danke ich Herrn Dr. M. Wijgerde.

Herr Dr. M. Rosemann, der die statistische Auswertung der Kopplungsanalysen durchgeführt hat, hatte auch bei Fragen zu diesen Analysen stets ein offenes Ohr. Für die Auswertung und viele einleuchtende Erklärungen möchte ich ihm herzlich danken.

Frau Dr. B. Kulle danke ich für die Clusteranalyse.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. F. Brembeck sowie allen anderen, die mir freundlicherweise Antikörper zur Verfügung gestellt haben, herzlich danken.

Danke auch an Tatjana Pfander, die mich in immunhistochemische Methoden eingearbeitet hat.

An unsere gesamte Arbeitsgruppe vielen Dank für die angenehme Atmosphäre. Besonders möchte ich mich bei Ina Heß, Astrid Herwig und Anke Frommhold für die großartige technische Unterstützung und Zusammenarbeit bedanken. Außerdem möchte ich Ines Ecke, Dr. Arne Zibat und ganz besonders meiner lieben Dr. Anja Uhmann für ihre Unterstützung und viele gute Ratschläge danken. Es ist toll, mit Euch allen zu arbeiten.

Auch den Mitarbeitern der Tierhaltung, insbesondere Kerstin Beyer und Stefan Wolf, gilt mein besonderer Dank.

Schließlich möchte ich mich auch bei meiner Familie, Dennis, Anneliese und allen anderen bedanken, die mich während der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

geboren am 04. Dezember 1978 in Hannover  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Ausbildung

Juli 2003 bis März 2008 **Promotion** am Institut für Humangenetik, Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Hahn, Universität Göttingen  
,Patched-assoziierte Tumoren: Modifikatorgene und Pathogenese'

Juli 2003 **Diplom in Biologie** (Note: sehr gut)

2002-2003 **Diplomarbeit** in der Abteilung für Immunologie, Prof. Dr. O. Götze, Universität Göttingen  
'Expressionsregulation des Komplementproteins Faktor H in Kupferzellen durch das C5a-Anaphylatoxin'

Okt 2000 **Vordiplom** in Biologie (Note: sehr gut)

1998-2002 **Studium der Biologie**, Universität Göttingen

Juni 1998 **Abitur** (Note: gut), Johannes-Kepler-Gymnasium Garbsen

### Berufserfahrung und Praktika

Mai-Sept 2001 **Studentische Hilfskraft** am Zoologischen Institut in den Abteilungen  
März-Mai 2002 Morphologie und Neurobiologie: Betreuung von Praktika  
Sept-Nov 2002

Aug-Okt 2001 **Praktikum** beim US Fish and Wildlife Service im National Wildlife Refuge  
Bosque del Apache, New Mexico

Aug 2000 **Praktikum** beim Verein Jordsand zum Schutze der Seevögel und der  
Natur e.V., Ahrensburg im Vogelschutzgebiet Oehe-Schleimünde

### Publikationen

Uhmann A und Dittmann K, Nitzki F, Dressel R, Koleva M, Frommhold A, Zibat A, Binder C, Adham I, Nitsche M, Heller T, Armstrong V, Schulz-Schaeffer W, Wienands J und Hahn H. *The hedgehog receptor patched controls lymphoid lineage commitment*. Blood. 2007 Sep 15;110(6):1814-23.

Nitzki F, Kruger A, Reifenberg K, Wojnowski L und Hahn H. *Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers*. Lab Anim. 2007 Apr;41(2):218-28.

Hahn H, Nitzki F, Schorban T, Hemmerlein B, Threadgill D und Rosemann M. *Genetic mapping of a Ptc1-associated rhabdomyosarcoma susceptibility locus on mouse chromosome 2*. Genomics. 2004 Nov;84(5):853-8.

Schlaf G und Nitzki F, Heine I, Hardeland R, Schieferdecker HL, Götze O. *C5a anaphylatoxin as a product of complement activation up-regulates the complement inhibitory factor H in rat Kupffer cells*. Eur J Immunol. 2004 Nov;34(11):3257-66.

Burkhardt S, Poeggeler B, Tan D-X, Rosner C, Gruetzner T, Nitzki F, Schoenke M, Thuermann S, Reiter RJ, Hardeland R. *Oxidation products formed from melatonin in various radical-generating systems*. In: Hardeland R., editor. *Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites*, Göttingen: Cuvillier, 2001. pp. 9-22.

## Poster und Präsentationen

- Sept 2007                      Horizons in Molecular Biology 2007, Göttingen  
Posterpräsentation: *„Interaction between Hedgehog/Patched and Wnt5a Signalling in BCC“*
- Sept 2006                      Horizons in Molecular Biology 2006, Göttingen  
Vortrag und Posterpräsentation: *„Induction of Basal Cell Carcinoma by conditional Ptch ablation“*, Auszeichnung mit dem Student talk Preis
- März 2005                      Horizons in Molecular Biology 2005, Göttingen  
Posterpräsentation: *„Genetic mapping of rhabdomyosarcoma susceptibility loci in Ptch1-deficient mice“*
- Juni 2004                      Europäische Humangenetikerkonferenz (ESHG), München  
Posterpräsentation: *„Genetic mapping of a Ptch1-associated rhabdomyosarcoma susceptibility locus on mouse Chromosome 2“*

