

Heterogenität humaner SHH-assoziierter Medulloblastome:

Identifizierung möglicher Ursprungszellen und der Einfluss von *CBP*-Mutationen auf die Pathogenese

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)



vorgelegt von Daniel Grammel

aus München

2013

Aus dem
Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans Kretzschmar

Dissertation eingereicht am: 24.09.2013

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Boyan

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Benedikt Grothe

Sondergutachter: PD Dr. Ulrich Schüller

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der entsprechenden Literaturzitate gekennzeichnet.

Die vorliegende Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, den 24.09.2013

Daniel Grammel

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Georg Boyan für die Übernahme des Erstgutachtens und die hilfreiche Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Benedikt Grothe danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. Ulrich Schüller bedanken, der mir während meiner gesamten Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand, mir bei vielen Diskussionen den Spaß an der wissenschaftlichen Arbeit näher gebracht hat und geholfen hat, die vielen großen und kleinen Probleme des wissenschaftlichen Alltags zu meistern.

Besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Monika Warmuth-Metz und Dr. Marcel Kool für die fruchtbare Kollaboration während der Zeit meiner Promotion bedanken.

In diesem Sinne möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für eine schöne Zeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei Silvia Occhionero für ihre ständige Mitarbeit bei meinen Projekten.

Ich möchte mich bei meiner Mutter bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zuletzt möchte ich ganz besonders meiner Freundin Natalie danken, die mich stets daran erinnert, dass das Leben nicht nur aus Wissenschaft besteht.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht als:

**Sonic hedgehog-associated medulloblastoma arising from
the cochlear nuclei of the brainstem**

D.Grammel, M. Warmuth-Metz, A. O. von Bueren, M. Kool, T. Pietsch, H. A.
Kretzschmar, D. H. Rowitch, S. Rutkowski, S. M. Pfister, U. Schüller

Acta Neuropathologica April 2012, Volume 123, Issue 4, pp 601 – 614

(<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00401-012-0961-0>)

Für Natalie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	4
1 Einleitung	6
1.1 Funktion und Gliederung des Kleinhirns.....	6
1.2 Embryonale und frühe postnatale Entwicklung des Cerebellums.....	7
1.3 Das Medulloblastom.....	8
1.3.1 Klassifizierung des Medulloblastoms	8
1.3.2 Symptome, Diagnostik und Therapie des Medulloblastoms.....	12
1.3.3 Veränderte Signalwege beim Medulloblastom	13
1.3.4 Mausmodelle des Medulloblastoms	15
1.4 Der transkriptionelle Ko-Aktivator CBP.....	17
1.4.1 Physiologische Bedeutung von CBP	17
1.4.2 Onkologische Bedeutung von CBP	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2 Material und Methoden	23
2.1 Allgemeine molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden.....	23
2.1.1 RNA-Isolation.....	23
2.1.2 cDNA Synthese	23
2.1.3 Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR.....	23
2.1.4 Isolation von Gesamtprotein aus Gewebe	25
2.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.1.6 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.1.7 Spezifischer Nachweis von Protein durch Western Blot.....	25
2.1.8 Produktion retroviraler Partikel.....	26
2.2 Tierexperimentelle Arbeiten.....	27
2.2.1 Genotypisierung der verwendeten Mauslinien	27
2.2.2 Primärzellkultur	28

2.2.3	Tamoxifen-Induktion und BrdU-Puls.....	29
2.2.4	Hörschwellenbestimmung mittels akustisch evozierter Signale	30
2.3	Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Microarrayanalyse	31
2.4	Histologische Methoden	31
2.4.1	Allgemeine Gewebepreparation und Gewebeanalyse.....	31
2.4.2	<i>in situ</i> Hybridisierung.....	32
2.4.3	Immunhistochemie	33
2.4.4	X-Gal Färbung.....	33
2.5	Humane Daten	34
2.5.1	Lokalisation humaner SHH-assoziierter Medulloblastome	34
2.5.2	Microarraydaten humaner SHH-assoziierter Medulloblastome	35
2.6	Statistische Auswertungen	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Identifizierung möglicher Ursprungszellen für Shh-abhängige Medulloblastome im dorsalen Hirnstamm	36
3.1.1	Eine Vielzahl neuronaler Populationen im dorsalen Hirnstamm stammt von <i>hGFAP</i> ⁺ und <i>Math1</i> ⁺ Vorläuferzellen ab.....	36
3.1.2	Konstitutive Aktivierung des Shh-Signalwegs in <i>hGFAP</i> ⁺ und <i>Math1</i> ⁺ Vorläuferzellen führt zur Tumorentstehung im dorsalen Hirnstamm	39
3.1.3	Die Entstehung Shh-abhängiger Medulloblastome im Nucleus cochlearis der Maus beeinträchtigt das Hörvermögen	42
3.1.4	Körnerzellvorläufer des Nucleus cochlearis als Ursprungszellen für murine Shh-abhängige Medulloblastome	43
3.1.5	Körnerzellvorläufer des Nucleus cochlearis als mögliche Ursprungszellen für humane SHH-assozierte Medulloblastome.....	47
3.2	Der Einfluss von <i>CBP</i> -Mutationen auf die Entwicklung SHH-assoziierter Medulloblastome.....	51
3.2.1	Der chronische Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellen führt zu erhöhter Apoptose und Migrationsdefekten.....	51

3.2.2	Cbp reguliert die Expression von Bdnf in cerebellären Körnerzellvorläufern	59
3.2.3	Der akute Verlust von Cbp in postnatalen Körnerzellvorläufern führt zur Steigerung der Proliferation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	62
3.2.4	Der Verlust von Cbp verstärkt die pathologische Proliferation cerebellärer Körnerzellvorläufer nach Shh-Aktivierung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	65
3.2.5	Cbp reguliert die Expression von Bdnf in Shh-assoziierten Medulloblastomen und nimmt so Einfluss auf deren Prognose.....	70
4	Diskussion	74
4.1	Unterschiedliche Ursprungszellen als Erklärung für die Heterogenität SHH-assoziiierter Medulloblastome.....	74
4.2	<i>CBP</i> -Mutationen identifizieren eine Untergruppe SHH-assoziiierter Medulloblastome mit schlechter Prognose.....	78
4.2.1	Zelluläre Funktion von <i>CBP</i>	78
4.2.2	Bedeutung von <i>CBP</i> -Mutationen für die Entstehung und Progression SHH-assoziiierter Medulloblastome	79
5	Ausblick	85
6	Appendix	87
	Bibliographie.....	94
	Lebenslauf.....	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Aufbau des cerebellären Cortex.....	7
Abbildung 1.2 Radiologie und Histologie des humanen Medulloblastoms.....	10
Abbildung 1.3 Vergleich molekularer Subgruppen von Medulloblastomen.....	11
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von CBP mit ausgewählten Proteindomänen.....	18
Abbildung 3.1 <i>hGFAP</i> - und <i>Math1</i> -Promotorsequenzen ermöglichen Cre-Expression in Vorläuferzellen verschiedener Neurone des dorsalen Hirnstamms.....	37
Abbildung 3.2 Medulloblastomentwicklung im Cerebellum und Nucleus cochlearis durch konstitutive Aktivierung des Shh-Signalwegs.....	40
Abbildung 3.3 Medulloblastome im Nucleus cochlearis repräsentieren unabhängige Neoplasien.....	41
Abbildung 3.4 Die Entstehung Shh-abhängiger Medulloblastome im Nucleus cochlearis ist mit einer Verminderung des Hörvermögens assoziiert.....	43
Abbildung 3.5 Körnerzellvorläufer des Nucleus cochlearis sind der Ursprung für Shh-abhängige Medulloblastome.....	44
Abbildung 3.6 Shh-abhängige Medulloblastome unterschiedlichen Ursprungs zeigen distinkte Genexpressionsprofile.....	46
Abbildung 3.7 Lokalisation humaner desmoplastischer Medulloblastome. Die.....	48
Abbildung 3.8 Chronischer Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern führt zu cerebellärer Hypoplasie.....	52
Abbildung 3.9 Gleichbleibende Proliferation und erhöhte Apoptose nach chronischem Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern.....	55
Abbildung 3.10 Chronischer Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern führt zu Migrationsdefekten.....	57
Abbildung 3.11 Cbp reguliert die Expression des Neurotrophins Bdnf in cerebellären Körnerzellvorläufern.....	60
Abbildung 3.12 Der akute Verlust von Cbp in postnatalen Körnerzellvorläufern führt zu erhöhter Proliferation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	64

Abbildung 3.13 Der Verlust von Cbp steigert die Shh-induzierte pathologische Proliferation von cerebellären Körnerzellvorläufern <i>in vitro</i>	66
Abbildung 3.14 Der Cbp-Knockout beschleunigt das Wachstum von Shh-abhängigen Medulloblastomen <i>in vivo</i>	68
Abbildung 3.15 Die erhöhte Proliferationsrate Cbp-defizienter Tumorzellen wird durch eine negative Regulation von Bdnf ausgelöst.....	71
Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der embryonalen Rautenlippe mit nachgewiesenen Ursprungszellen für Medulloblastome.....	76
Abbildung 6.1 Klinische Parameter humaner desmoplastischer Medulloblastome...	89
Abbildung 6.2 Übersicht identifizierter <i>CBP</i> -Mutationen in humanen SHH-Medulloblastomen.	90
Abbildung 6.3 Der Cbp-Knockout in frühen neuronalen Vorläuferzellen führt zu cerebellärer Hypoplasie.....	91
Abbildung 6.4 Erweiterte Analyse der Mauslinien <i>Math1-cre::Cbp^{F1/+}</i> und <i>Math1-cre::CBP^{F1/F1}</i>	92
Abbildung 6.5 Kaplan-Meier Analyse für Tiere des Genotyps <i>Math1-creER^{T2}</i> und <i>Math1-creER^{T2}::Cbp^{F1/F1}</i>	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Primersequenzen für qRT-PCR.....	24
Tabelle 2.2 Programm für qRT-PCR	24
Tabelle 2.3 Primereffizienzen für qRT-PCR	24
Tabelle 2.4 Auflistung aller verwendeten Genotypisierungsprimer.....	28
Tabelle 2.5 PCR-Programm für die Genotypisierungen.....	28
Tabelle 2.6 Liste aller genutzten primären Antikörper.	33
Tabelle 6.1 Übersicht aller 205 differentiell exprimierten Gene in murinen Shh-Medulloblastomen des Cerebellums und des Nucleus cochlearis.....	87
Tabelle 6.2 Übersicht aller Patienten aus der Tumorkohorte zur Tumorlokalisierung mit klinischen Parametern.	88
Tabelle 6.3 Übersicht der identifizierten <i>CBP</i> -Mutationen in 130 humanen SHH-Medulloblastomen hinsichtlich ihrer Altersverteilung.	90
Tabelle 6.4 Tumorinduktion in <i>Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F/+}</i> und <i>Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/F}SmoM2-YFP^{F/+}</i> Mäusen und Analyse der Latenzzeit.....	93

Zusammenfassung

Das Medulloblastom ist ein maligner Hirntumor, welcher vornehmlich im Kindesalter auftritt und in der hinteren Schädelgrube mit starkem Bezug zum Kleinhirn entsteht. Basierend auf variierenden globalen Expressionsprofilen wird das humane Medulloblastom in vier verschiedene molekulare Subgruppen eingeteilt. Während eine dieser Subgruppen durch eine pathologische Aktivierung des Sonic hedgehog (SHH)-Signalwegs charakterisiert ist, weisen trotz dieser Gemeinsamkeit auch die Tumore innerhalb dieser Subgruppe ein beträchtliches Maß an Heterogenität bezüglich molekularer und klinischer Parameter auf.

In einem ersten Teilprojekt sollten mögliche Ursprungszellen für Shh-abhängige Medulloblastome in einem Mausmodell identifiziert werden, da verschiedene Ursprungszellen ein Grund für die Heterogenität dieser molekularen Subgruppe der Medulloblastome sein könnten. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass cerebelläre Körnerzellvorläufer aus der oberen Rautenlippe eine mögliche Ursprungszelle für die Subgruppe darstellen, welche sich durch eine pathologische Aktivierung des Shh-Signalwegs auszeichnet. Ebenso weiß man seit kurzem, dass Vorläuferzellen aus der unteren Rautenlippe der Ursprung für eine weitere Subgruppe des Medulloblastoms im dorsalen Hirnstamm sind, welche eine pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs aufweist (Wnt-Medulloblastome). Um die Frage zu beantworten, ob Shh-abhängige Medulloblastome auch von Zellen des dorsalen Hirnstamms abstammen können, haben wir Mäuse mit einer konstitutiven Aktivierung des Shh-Signalwegs in *hGFAP*- und *Math1*-positiven Zellen des dorsalen Hirnstamms analysiert. Wir konnten zeigen, dass es nach Aktivierung des Shh-Signalwegs in Körnerzellvorläufern des Nucleus cochlearis tatsächlich zur Ausbildung von Tumoren im dorsalen Hirnstamm kommt. Diese Vorläuferzellen entstammen der unteren Rautenlippe und stellen somit eine von cerebellären Körnerzellvorläufern (GCPs) unabhängige Zellpopulation dar. Dementsprechend konnten wir auch zeigen, dass sich Shh-abhängige Tumore im Kleinhirn und im dorsalen Hirnstamm nicht nur in Bezug auf ihre Lokalisation, sondern auch in Bezug auf ihre globale Genexpression unterscheiden. Hinsichtlich der Histologie und des Genexpressionsprofils zeigten Shh-abhängige Tumore des murinen Nucleus cochlearis starke Ähnlichkeiten zu humanen Shh-assoziierten Medulloblastomen. Zusätzlich konnte mit Hilfe von MRT Daten von 63 humanen desmoplastischen Medulloblastomen gezeigt werden, dass 21 Tumore (33%) einen engen Kontakt zum

Nucleus cochlearis aufwiesen. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass zwei verschiedene Vorläuferpopulationen der Rautenlippe, welche sich entweder zu Körnerzellen des Kleinhirns oder des Nucleus cochlearis entwickeln, in der Lage sind, Shh-abhängige Medulloblastome zu bilden. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass eine Fraktion humaner Shh-assoziiierter Medulloblastome von cochleären Körnerzellvorläufern des dorsalen Hirnstamms abstammt.

In einem zweiten Teilprojekt sollte der Einfluss von Mutationen im Gen *CBP* auf die Entwicklung Shh-abhängiger Medulloblastome genauer untersucht werden. Eine Keimbahnmutation des für CBP (CREB-Bindeprotein) kodierenden Gens *CBP* in Menschen führt zur Ausprägung des Rubinstein-Taybi Syndroms, welches neben Fehlbildungen des Skeletts und mentaler Retardierung auch eine Prädisposition für Tumore im zentralen Nervensystem einschließlich Medulloblastome aufzeigt. Zusätzlich wurden in humanen Medulloblastomen vermehrt somatische, potentiell inaktivierende Mutationen in *CBP* mit einem klaren Inzidenzmaximum in adulten SHH-Medulloblastomen nachgewiesen. Nach Deletion des murinen *Cbp* *in vivo* in cerebellären Körnerzellvorläufern während der embryonalen Entwicklung konnten wir eine signifikante Verkleinerung des Cerebellums beobachten, welche durch erhöhte Apoptose in der GCP Population verursacht wurde. Außerdem trat eine offensichtliche Störung der laminaren Struktur des Cerebellums auf, während die Proliferationsrate von GCPs nicht signifikant verändert wurde im Vergleich zu Kontrolltieren. Zusätzlich führte ein Migrationsdefekt in der GCP Population zur Ausbildung von ektopischen Körnerzellinseln in der Molekularschicht des Kleinhirns. Zumindest zum Teil wurde dieser Phänotyp durch die Herabregulation des Wachstumsfaktors *Bdnf* verursacht. In starkem Kontrast zu diesen ersten Ergebnissen führte die akute Deletion von *Cbp* während der postnatalen Entwicklung zu einer signifikant erhöhten Proliferation von GCPs *in vitro* und *in vivo*. Darüber hinaus konnte die durch pathologische Aktivierung des Shh-Signalwegs hervorgerufene Proliferation von Körnerzellvorläufern *in vitro* durch eine gleichzeitige Deletion von *Cbp* noch verstärkt werden. Die *in vivo* postnatal induzierte Ausbildung von Shh-Medulloblastomen wurde durch einen gleichzeitigen Knockout von *Cbp* beschleunigt und hatte einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der Tumormäuse, welche zum Teil durch die reduzierte Expression von *Bdnf* hervorgerufen wird. Darüber hinaus konnte für humane SHH-assoziierte Medulloblastome gezeigt werden, dass eine niedrige Expression sowohl von *CBP* als

auch von *BDNF* mit einer signifikant schlechteren Prognose korreliert und *CBP*-Mutationen zu einer verringerten Expression von *BDNF* führen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *CBP*-Mutationen eine Untergruppe SHH-assoziiierter Medulloblastome mit schlechter Prognose identifizieren und die gestörte Expression von *BDNF* eine Folge des *CBP*-Verlust ist.

Summary

Medulloblastoma is the most common malignant brain tumor of childhood that comprises at least four molecularly distinct subgroups based on global gene expression profiles. One subgroup is characterized by aberrant Sonic hedgehog (SHH) signaling. Despite the ubiquitous activation of the SHH pathway within this subgroup, there is clear evidence that tumors with a SHH profile may vary in certain molecular and clinical aspects.

In a first project, we aimed to identify novel cells of origin for murine Shh-associated medulloblastomas as an explanation for the diversity within this subgroup. We have previously described that cerebellar granule cell precursors (GCPs) may give rise to the subgroup with a molecular fingerprint of Shh signaling. Other recent data indicate that precursor cells within the dorsal brain stem may serve as cellular origins for Wnt-associated medulloblastomas. In order to see whether Shh-associated medulloblastomas are also able to develop in the dorsal brainstem, we analyzed two lines of transgenic mice with constitutive Shh signaling in *hGFAP*- and *Math1*-positive brainstem precursor populations, respectively. Our results show that in both of these lines, medulloblastomas arise from granule neuron precursors of the cochlear nuclei, a derivative of the auditory lower rhombic lip. This region is distinct from derivatives of precerebellar lower rhombic lip where medulloblastoma arise in mice with constitutive-active Wnt signaling. With respect to their histology and the expression of appropriate markers, Shh tumors from the murine cochlear nucleus perfectly resemble human SHH-associated medulloblastomas. Moreover, we find that in a series of 63 human desmoplastic medulloblastomas, 21 (33%) have a very close contact to the cochlear nuclei on MRI imaging. In conclusion, we demonstrate that precursors of the murine rhombic lip which may either develop into cerebellar or into cochlear granule neurons, may give rise to Shh-associated medulloblastoma, and this may have important implications for the cellular origin of human medulloblastomas.

In a second project, we aimed to investigate the role of mutations within the *CBP* gene and their influence on the development of Shh-associated medulloblastomas. Recent studies have identified recurrent mutations within this gene that codes for the transcriptional co-activator CBP (CREB-binding protein). Interestingly, these mutations seem to preferentially occur in adult medulloblastoma cases with a SHH

profile. In order to investigate these findings in a mouse model, we deleted murine Cbp in GCPs that may represent a possible cell of origin for Shh-associated medulloblastomas. After the *in vivo* deletion of Cbp in GCPs during early embryonic development, we found a significant reduction in cerebellar size due to an increased apoptosis and an apparent failure in cerebellar foliation, while proliferative activity was unchanged in this setting as compared to control mice. Furthermore, GCPs were impaired in their migration with remnants of granule cells forming ectopia in the molecular layer of the cerebellum. At least to some extent, these effects were mediated by a downregulation of Bdnf, a growth factor that is essential for survival and differentiation of GCPs. In contrast to these results, the deletion of Cbp in GCPs during postnatal development significantly increased proliferation in the GCP population *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, pathological proliferation of GCPs that is induced by aberrant Shh signaling and mimics the growth of medulloblastoma cells was significantly enhanced by Cbp ablation. Furthermore, a Cbp knockout in an inducible tumor mouse model for Shh-associated medulloblastoma significantly enhanced tumor growth, most likely by the downregulation of Bdnf expression. In humane SHH-associated medulloblastoma expression of both *CBP* and *BDNF* significantly correlated with poor outcome. Additionally, *CBP*-deficient tumors showed significantly reduced levels of *BDNF* expression. Together, *CBP* mutations identify a subgroup of human SHH-associated medulloblastoma with poor prognosis that seems to be related to the lower expression of the neurotrophin BDNF.

1 Einleitung

1.1 Funktion und Gliederung des Kleinhirns

Das Kleinhirn (Cerebellum) ist Teil des motorischen Systems. Es erhält sensorische Informationen vom Hirnstamm und dem Rückenmark. Das Cerebellum ist selbst nicht in der Lage Bewegungen auszulösen, sondern ist für die Koordination und Feinabstimmung von Bewegungsabläufen zuständig. In diesem Zusammenhang ist es verantwortlich für stützmotorische Anteile von Haltung und Bewegung, die vom Großhirn gesteuerte Zielmotorik und die Blickmotorik. Außerdem steuert es den Muskeltonus und die Einhaltung des Gleichgewichts.

Das Cerebellum befindet sich in der hinteren Schädelgrube und liegt dem Hirnstamm (*Mesencephalon, Pons, Medulla oblongata*) dorsal auf. Zwischen dem Cerebellum und dem Hirnstamm befindet sich der mit Liquor gefüllte IV. Ventrikel. Die drei Kleinhirnstiele (*Pedunculus cerebellaris superior, medius, inferior*) verbinden das Kleinhirn mit dem Hirnstamm und beherbergen sowohl afferente als auch efferente Fasern. Deutlich sichtbar ist die Gliederung des Cerebellums in den Kleinhirnwurm (*Vermis cerebelli*) und die sich nach lateral ausbreitenden Hemisphären (*Hemispheria cerebelli*). Eine feine Oberflächengliederung, welche sich als Furchen (*Fissurae cerebelli*) und Blätter (*Folia cerebelli*) darstellt, überzieht das gesamte Kleinhirn. Ebenso wie im Großhirn (*Telencephalon*) bezeichnet man die nach außen gelagerte, nervenzellreiche Schicht als Rinde (*Cortex cerebelli*), die innere, faserreiche weiße Substanz als Markkörper (*Corpus medullare cerebelli*).

Der cerebelläre Cortex wird im adulten Zustand in drei Schichten untergliedert: die Molekularschicht (molecular layer, ML), die Purkinjezellschicht (Purkinje cell layer, PCL) und die innere Körnerzellschicht (inner granule cell layer, IGL) (Abbildung 1.1A). Hierbei enthält die ML vor allem Korb- und Sternzellen, die PCL Purkinjezellen und Bergman Gliazellen und die IGL reife Körnerzellen, Golgizellen und Astrozyten (Abbildung 1.1B). Die weiße Substanz mit Nervenzellfasern sowie Astrozyten, Oligodendrozyten und den tiefen Kleinhirnkernen vervollständigen die Struktur des Cerebellums (Altmann and Bayer, 1997).

1.2 Embryonale und frühe postnatale Entwicklung des Cerebellums

Die Entwicklung des Cerebellums in der Maus beginnt etwa an Embryonaltag 9 (E9) mit Ausbildung der cerebellären Anlage und ist etwa mit dem Postnataltag 20 (P20) abgeschlossen (Hatten and Heintz, 1995). Hierbei stammt das Cerebellum vom Rhombomer r1 ab, dem rostralen Anteil der Rautenlippe, welches durch die Expression der zwei Transkriptionsfaktoren Otx2 und Hoxa2 begrenzt wird und auch als obere Rautenlippe bezeichnet wird (Joyner, 1996; Joyner et al., 2000; Wingate and Hatten, 1999). Die Rhombomere r2-r8 bilden in ihrer Gesamtheit die untere Rautenlippe (Landsberg et al., 2005). Im Detail stammen alle Zellen des Kleinhirns von zwei unterschiedlichen Keimepithelien ab. Purkinjezellen, Zellen der tiefen Kleinhirnkerne und mehr als 6 verschiedene Arten von inhibitorischen Interneuronen wie zum Beispiel Golgi-, Korb- und Sternzellen entstammen der dorsomedial-gelegenen Ventrikulärzone entlang des IV. Ventrikel (Dino et al., 2000; Hallonet and Le Douarin, 1993; Hoshino et al., 2005). Das zweite Keimepithel, die Rautenlippe, ist sowohl der Entstehungsort der cerebellären Körnerzellen als auch einer Subpopulation der tiefen Kleinhirnkerne und Neurone verschiedener prä-cerebellärer Nuclei im Hirnstamm (Machold and Fishell, 2005; Wang et al., 2005; Wingate, 2001; Wingate and Hatten, 1999).

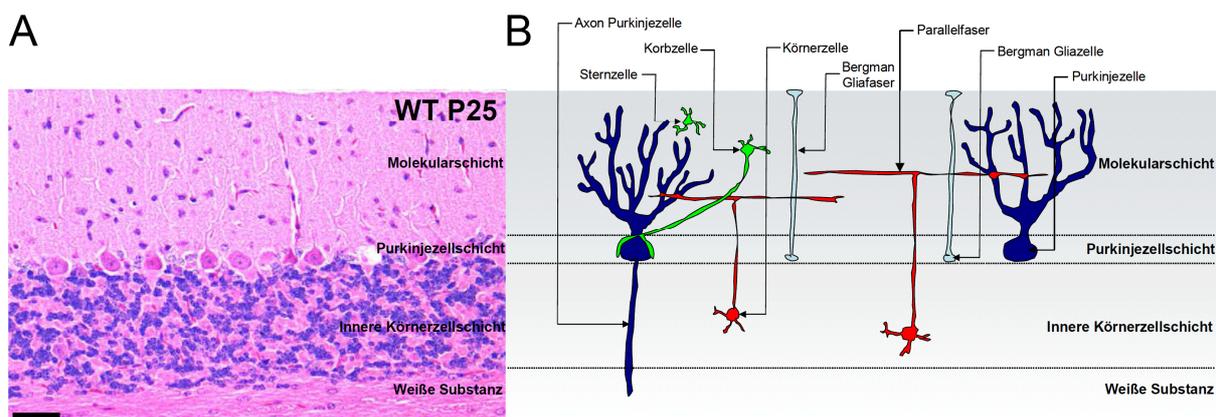


Abbildung 1.1 Aufbau des cerebellären Cortex. (A) Corticale Schichtung des murinen Cerebellums an P25 in einer H&E-Färbung. (B) Schematische Darstellung des cerebellären Cortex mit Nomenklatur der corticalen Schichten und ausgewählten Zelltypen. Messbalken: 50 μ m (A).

Purkinjezellen, als ein Beispiel für Zellen aus der Ventrikulärzone, proliferieren in ihrer Keimzone nur etwa zwischen Embryonaltag 11 - 14 (E11 - E14). Während diese Zellen nach dem Verlassen des Zellzyklus radial in das sich entwickelnde

Cerebellum einwandern, migrieren die Körnerzellvorläufer aus der oberen Rautenlippe ab E13 - E15 tangential über die Oberfläche der cerebellären Anlage und bilden dort eine sekundäre Proliferationszone aus, die äußere Körnerzellschicht (external granule cell layer, EGL) (Hatten et al., 1997; Hatten and Heintz, 1995). Durch das Mitogen Sonic hedgehog (Shh), welches von Purkinjezellen gebildet wird, kommt es in der äußeren Körnerzellschicht zwischen E13 und Postnataltag 15 (P15) zu einer massiven Expansion der Körnerzellpopulation (Wechsler-Reya and Scott, 1999b). Hierbei kann die EGL in eine oberflächliche Zone proliferierender Zellen und eine innere Zone differenzierender Zellen untergliedert werden. Diese Unterteilung wird evident durch die Expression verschiedener Markergene (RU-49, NeuN, etc.), welche während der cerebellären Entwicklung differentiell exprimiert werden (Hatten and Heintz, 1995; Weyer and Schilling, 2003). Die Lokalisation dieser Markergene hat aufgezeigt, dass die Entwicklung cerebellärer Körnerzellen in mindestens vier Phasen untergliedert werden kann: Neurogenese, Beginn der Differenzierung, Migration und die Bildung synaptischer Verbindungen. Nachdem sie den Zellzyklus verlassen haben, migrieren die Körnerzellen radial entlang der Fortsätze der Bergman Gliazellen in das Cerebellum hinein und bilden dort die innere Körnerzellschicht (internal granule cell layer, IGL) (Rakic and Sidman, 1973).

1.3 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom wurde erstmals 1925 als Gliom des mittleren Cerebellums beschrieben, wobei die Namensgebung auf die damalige Annahme zurückzuführen ist, der Tumor würde aus sogenannten Medulloblasten, also undifferenzierten Vorläuferzellen des Gehirns entstehen (Bailey and Cushing, 1925). Medulloblastome sind die häufigsten malignen Hirntumore im Kindesalter. Trotz Therapieansätzen mit Kombinationen aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie zeigen neuere Untersuchungen eine Fünf-Jahres-Überlebensrate von nur 66% (Gatta et al., 2009). Medulloblastome treten vornehmlich im Kindesalter auf und zeigen ein Inzidenzmaximum zwischen 7 und 9 Jahren, wobei es auch im Säuglings- und Erwachsenenalter zum Krankheitsausbruch kommen kann (Brandes et al., 2009; Louis et al., 2007; Packer and Vezina, 2008).

1.3.1 Klassifizierung des Medulloblastoms

Medulloblastome zählen histologisch zu den primitiv neuroektodermalen Tumoren und entstehen in der hinteren Schädelgrube (Abbildung 1.2A). Typischerweise sind

Medulloblastome in der Mittellinie des Cerebellums lokalisiert und weisen einen Kontakt zum IV. Ventrikel auf. Hierbei können Medulloblastome lokal infiltrierend wachsen oder über den Liquorraum metastasieren. Aufgrund des histologischen Erscheinungsbildes kann das Medulloblastom in vier Subgruppen unterteilt werden: „klassisch“ (Abbildung 1.2B), „nodulär/desmoplastisch“ (Abbildung 1.2C), „anaplastisch“ (Abbildung 1.2D) und „großzellig“ (Abbildung 2E) (Gilbertson and Ellison, 2007). Da der Übergang zwischen anaplastischem und großzelligem Medulloblastom fließend ist, werden diese zwei Subtypen häufig als großzellig/anaplastische (LC/A) Medulloblastome zusammengefasst. Aufgrund der fortschreitenden Möglichkeiten der Molekularbiologie und der beschränkten Aussagekraft des histopathologischen Phänotyps geht man jedoch zunehmend dazu über, Medulloblastome auf der Basis ihrer molekularen Charakteristika zu klassifizieren. Hierbei werden die Tumore abhängig von ihrem globalen Genexpressionsprofil in Gruppen unterteilt. Mehrere Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Kohorten von humanen Medulloblastomen hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils untersucht und konnten unabhängig voneinander vier eigenständige Gruppen nachweisen (Al-Halabi et al., 2011; Cho et al., 2011; Fattet et al., 2009; Kool et al., 2008a; Northcott et al., 2011b; Northcott et al., 2009; Pomeroy et al., 2002; Taylor et al., 2012; Thompson et al., 2006). Diese werden wie folgt benannt: WNT-, Sonic hedgehog (SHH)-, Gruppe 3- und Gruppe 4-Subtyp.

Die WNT- und SHH-Subgruppen sind durch eine konstitutive Aktivierung unterschiedlicher, hoch konservierter Signalwege (WNT- und SHH-Signalweg) charakterisiert (Abbildung 1.3). Die WNT-Gruppe zeichnet sich durch eine verhältnismäßig gute Langzeitprognose aus (Clifford et al., 2006; Ellison et al., 2011; Ellison et al., 2005; Rogers et al., 2009). Diese Tumore, welche fast ausschließlich eine klassische Histologie aufweisen, sind durch eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin charakterisiert (Rogers et al., 2009). Weitere häufige Merkmale der WNT-Subgruppe sind Monosomie für Chromosom 6 und Expression des WNT-Zielgens *DKK1* (Northcott et al., 2011b; Thompson et al., 2006). Analog zu der WNT-Subgruppe zeichnen sich Medulloblastome des SHH-Subtyps durch eine charakteristische Aktivierung des Sonic hedgehog-Signalwegs aus (Kool et al., 2012; Kool et al., 2008b; Northcott et al., 2011b; Schwalbe et al., 2011). Medulloblastome des SHH-Subtyps sind die am besten untersuchte Untergruppe und stellen circa 25% der Medulloblastome dar (Hatten and Roussel, 2011). Neben somatische Mutationen

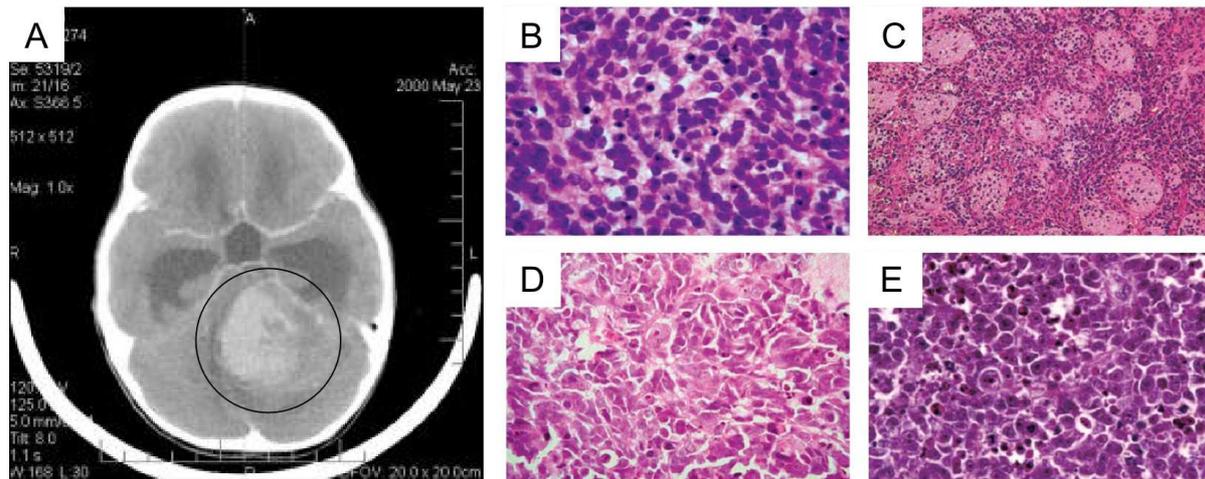


Abbildung 1.2 Radiologie und Histologie des humanen Medulloblastoms. Axiale Magnetresonanztomographie eines Medulloblastoms (A). Der Tumor in der Mittellinie des Cerebellums (Kreis) erscheint durch seine höhere Zelldichte heller als das umgebende Gewebe. Klassisches Medulloblastom mit kleinen uniformen Zellen und großem Nukleus/Cytoplasma-Verhältnis (B). Nodulär/desmoplastisches Medulloblastom mit knotigen Bereichen differenzierter Zellen und Bereichen pleomorpher Zellen mit hohem Proliferationsindex (C). Anaplastisches Medulloblastom mit polyedrischen Zellen (D). Großzelliges Medulloblastom mit uniformen Zellen, welche einen vesikulären Zellkern und einen einzigen Nukleolus aufweisen (E). Verändert aus Gilbertson und Ellison (2008).

in Genen des SHH-Signalwegs wie *PTCH1*, *SMO* und *SUFU* finden sich auch Amplifikationen der SHH-Zielgene *GLI1* und *GLI2* in sporadischen Medulloblastomen (Adamson et al., 2010; Hahn et al., 1999; Johnson et al., 1996; Northcott et al., 2011a; Northcott et al., 2009). Zusätzlich findet sich häufig eine für diesen Subtyp des Medulloblastoms einzigartige Deletion des Chromosoms 9q, auf dem sich unter anderem das Gen *PTCH1* befindet (Northcott et al., 2011b; Pietsch et al., 1997). Zur genauen Identifizierung dieses Subtyps werden immunhistochemische Marker wie SFRP1 und GAB1 herangezogen (Al-Halabi et al., 2011; Ellison et al., 2011; Thompson et al., 2006). Ein charakteristisches Merkmal der SHH-Subgruppe ist die auffallende Altersverteilung, da diese Medulloblastom-Subgruppe vornehmlich in Säuglingen oder Erwachsenen, seltener aber in Kindern auftritt. Diese Altersverteilung lässt vermuten, dass innerhalb dieser Subgruppe eine größere Heterogenität hinsichtlich klinischer und molekularer Parameter besteht, was auch bereits gezeigt werden konnte (Northcott et al., 2011a). Die verbleibenden zwei Gruppen, als Gruppe 3- und Gruppe 4-Subtypen bezeichnet, sind nicht durch eine Deregulierung eines bestimmten Signalwegs gekennzeichnet. Als standardisierte Diagnostikmethode für Tumore der Gruppe 3 wird die Genexpressionanalyse und der

Vergleich mit etablierten Profilen der Gruppe 3-Tumoren empfohlen (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008a; Northcott et al., 2011b).

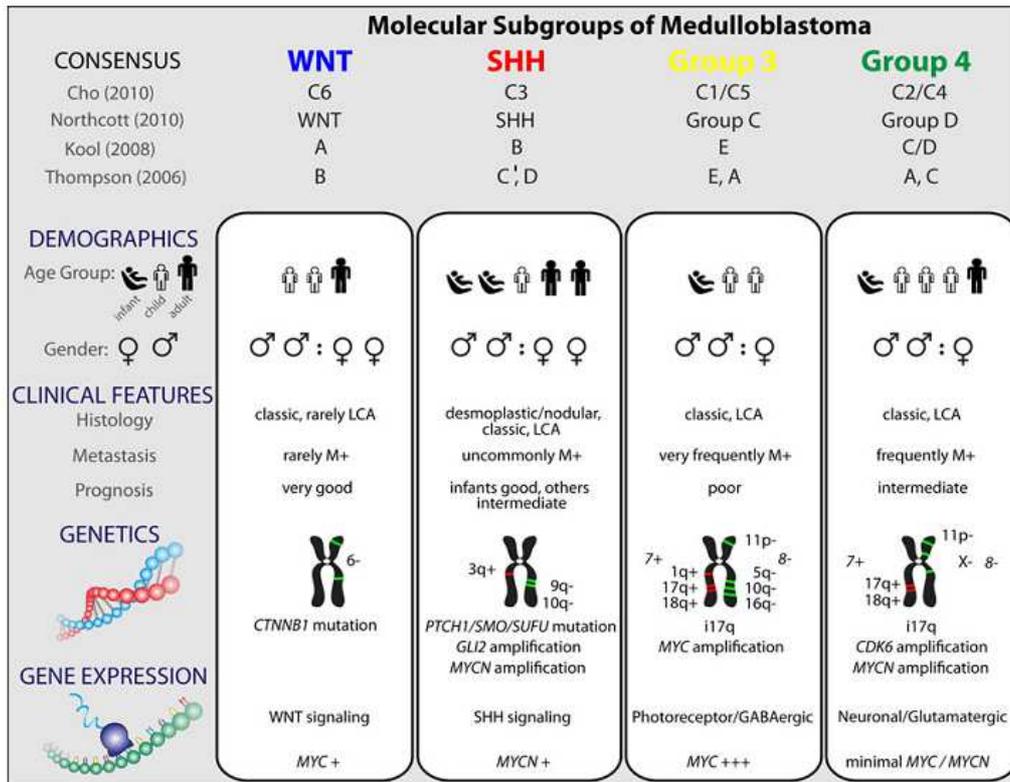


Abbildung 1.3 Vergleich molekularer Subgruppen von Medulloblastomen. Aktuelle Klassifizierung unter Einbeziehung veralteter Gruppennomenklaturen und demografischer, klinischer und genetischer Charakteristika. Aus Taylor et al. (2012).

Gruppe 3-Tumore zeigen immunhistochemische Reaktivität für den Marker NPR3 (Northcott et al., 2011b). Wegen der Überexpression des Gens *MYC* wird für diesen Subtyp auch der Name MYC-Gruppe diskutiert (Hatten and Roussel, 2011). Passend dazu sind Genamplifikationen von *MYC* praktisch auf Medulloblastome der Gruppe 3 beschränkt (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008a; Northcott et al., 2011b). Gruppe 3-Tumore zeigen ebenso wie Gruppe 4-Medulloblastome Genamplifikationen und entsprechende Überexpression für *OTX2* (Adamson et al., 2010; de Haas et al., 2006; Di et al., 2005; Northcott et al., 2011b) sowie eine Überexpression verschiedener Gene, welche für die Entwicklung der Retina wichtig sind. Deren Einfluss auf die Entwicklung des Medulloblastoms ist jedoch noch nicht geklärt (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008a; Northcott et al., 2011b). Medulloblastome der Gruppe 3 weisen häufig eine großzellig/anaplastische Histologie auf, neigen zur Metastasierung und stellen deswegen die Subgruppe mit der schlechtesten Prognose dar (Northcott et al., 2011b).

Alle Tumore, die nicht den vorher genannten Gruppen zugeordnet werden können, werden laut jetziger Nomenklatur als Gruppe 4-Tumore bezeichnet, wobei deren molekulare Pathogenese bisher nicht klar definiert ist. Als möglicher immunhistochemischer Marker wird KCNA1 diskutiert, dies muss jedoch noch weiter validiert werden (Cho et al., 2011; Northcott et al., 2011b). Mehrere Publikationen haben für diesen Subtyp eine Überexpression von Genen gezeigt, welche mit neuronaler Entwicklung und Differenzierung zusammenhängen (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008a; Northcott et al., 2011b). Aufgrund des Fehlens adäquater Mausmodelle und des breiten Spektrums genetischer Veränderungen innerhalb des Gruppe 4-Subtyps ist dies der am schlechtesten charakterisierte Subtyp des Medulloblastoms.

1.3.2 Symptome, Diagnostik und Therapie des Medulloblastoms

Erste klinische Symptome werden vornehmlich durch den erhöhten Hirndruck ausgelöst und umfassen Kopfschmerzen, Sehstörungen, morgendliche Übelkeit und Erbrechen (Alston et al., 2003). Da der Tumor die Zirkulation der Cerebrospinalflüssigkeit beeinträchtigen kann, kommt es bei Medulloblastompatienten im Kindesalter häufig zur Bildung eines Hydrocephalus. Bedingt durch die primäre Lokalisation des Medulloblastoms im Bereich des Cerebellums kommt es im weiteren Verlauf der Krankheit vermehrt zur Beeinträchtigung der Motorik, was sich durch Schwindel und Koordinationsprobleme (Ataxie) äußert. Die Diagnose wird auf Basis bildgebender Verfahren (Magnetresonanztomographie) erstellt, wobei hier Lokalisation, Größe und Ausdehnung des Tumors genau beurteilt werden kann. Zur Absicherung der Diagnose und für gerichtete Therapieansätze wird das operativ entfernte Tumorgewebe immunhistochemisch untersucht. Unabhängig von der Subgruppenzugehörigkeit umfasst die Behandlung eine Kombination aus operativer Resektion, Bestrahlung und Chemotherapie (Evans et al., 1990; Kortmann et al., 2000; Tait et al., 1990; Taylor et al., 2003). Trotz großer Fortschritte weisen heutige Therapieansätze dennoch eine signifikante Sterberate auf und rufen unerwünschte Sekundäreffekte hervor wie Hörverlust durch ototoxische Medikamente und Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten (Gajjar et al., 2006). Dies betrifft vor allem Kinder, bei denen die Therapie die normale postnatale Entwicklung des Cerebellums beeinträchtigt. Aufgrund des guten Kenntnisstands des Einflusses des SHH-Signalwegs bei der Medulloblastomentstehung wurden verschiedene

niedermolekulare Verbindungen entdeckt, welche als Inhibitoren von Smoothed die Aktivität des SHH-Signalwegs reprimieren. Diese Inhibitoren konnten ihre Wirksamkeit bereits in Allografts und Mausmodellen für Medulloblastoma zeigen (Berman et al., 2002; Romer and Curran, 2005; Romer et al., 2004) und werden gegenwärtig in klinischen Studien auf ihren Nutzen im humanen System untersucht. Die fortschreitende molekulare Analyse von primären Medulloblastomen verspricht große Fortschritte im Hinblick auf gezielte Krebstherapien, welche die biologischen und zytologischen Eigenschaften der jeweiligen Tumore als Basis haben.

1.3.3 Veränderte Signalwege beim Medulloblastom

Die Fehlregulation zweier evolutionär hoch konservierter Signalwege kann zu Störungen der postnatalen Entwicklung der Kleinhirnrinde und zur Entstehung von Medulloblastomen führen. Diese Signalwege sind der WNT- und der Sonic hedgehog (SHH)-Signalweg.

Im inaktiven Zustand des WNT-Signalwegs liegt β -Catenin, welches durch das Gen *CTNNB1* kodiert wird, phosphoryliert im Zytoplasma der Zelle vor (Amit et al., 2002). β -Catenin wird durch einen Proteinkomplex aus APC, Axin, Ck1 α und der Kinase GSK-3 β ubiquitiniert und dadurch über den proteasomalen Abbauweg degradiert (Aberle et al., 1997; Behrens et al., 1998; Itoh et al., 1998). Nach Bindung eines WNT-Agonisten an den Transmembranrezeptor Frizzled führt eine intrazelluläre Signalkaskade zur Inaktivierung der Proteinkinase GSK-3 β , wodurch β -Catenin nicht mehr phosphoryliert wird (Bhanot et al., 1996; Salic et al., 2000). β -Catenin kann daher nicht mehr ubiquitiniert werden und wird folglich nicht mehr abgebaut. In der Folge gelangt β -Catenin in den Nukleus, wo es als primärer Effektor des WNT-Signalwegs fungiert und zur Transkription von Zielgenen wie *Dkk1*, *MYC*, *Axin2* und *CD44* führt (Chamorro et al., 2005; He et al., 1998; Jho et al., 2002; Wielenga et al., 1999). Der WNT-Signalweg ist in 10%-15% aller Medulloblastomfälle pathologisch verändert, was aufgrund der charakteristischen Aktivierung dieses Signalwegs zur Namensgebung der WNT-Subgruppe geführt hat (Roussel and Hatten, 2011). Erste Hinweise für eine Beteiligung dieses Signalwegs bei der Medulloblastomentstehung ergaben sich aus der Tatsache, dass Patienten mit dem Turcot-Syndrom, welches durch Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC* verursacht wird, neben dem Kolonkarzinom auch zur Ausbildung von neuroepithelialen Gehirntumoren einschließlich dem Medulloblastom neigen (Hamilton et al., 1995; Marino, 2005). Zudem sind in dieser Subgruppe häufig sporadische Mutationen im *CTNNB1* Gen zu

finden, welche zur Stabilisierung von β -Catenin führen und somit den WNT-Signalweg aktivieren (Zurawel et al., 1998).

Im inaktivierten Zustand des Hedgehog-Signalwegs inhibiert der Transmembranrezeptor Patched (*PTCH1*) den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Smoothened (*SMO*), was zur Inhibierung des gesamten Signalwegs führt. Als Ligand für den Patched-Rezeptor dienen in Säugetieren drei verschiedene Proteine (sonic hedgehog, indian hedgehog, desert hedgehog) (Echelard et al., 1993). Bindet einer der SHH-Liganden an die extrazelluläre Domäne des Patched-Rezeptors, wird die Inhibierung von Smoothened durch Patched aufgehoben und das Signal kann übertragen werden. Hierfür wandert Smoothened in das primäre Cilium der Zelle und bewirkt die Dissoziation des Proteinkomplexes aus SuFu (*Suppressor of fused homolog*) und den Transkriptionsfaktoren der Gli2 und Gli3 (Corbit et al., 2005; Huangfu and Anderson, 2006; Wang et al., 2009). Nach Dissoziation von SuFu wandern die Transkriptionsfaktoren in den Zellkern und regulieren dort die Genexpression (Aza-Blanc et al., 1997; Bai et al., 2002). Der Sonic hedgehog-Signalweg beeinflusst maßgeblich die Entwicklung des Cerebellums. Während der frühen postnatalen Entwicklung des Cerebellums wandern Körnerzellvorläufer aus der oberen rhombischen Lippe transversal über die Oberfläche des Kleinhirns und bilden dort die äußere Körnerzellschicht (external granular layer, EGL) (Altmann and Bayer, 1997). Sonic hedgehog, welches von Purkinjezellen gebildet wird, dient als Wachstumsfaktor für diese Körnerzellvorläufer und führt zur raschen Expansion dieser Zellpopulation während der postnatalen Entwicklung (Hatten, 1999; Wechsler-Reya and Scott, 1999b). In diesem Zusammenhang ist es nicht überraschend, dass Mutationen in Genen dieses für die Proliferation der Körnerzellvorläufer wichtigen Signalwegs schon früh mit der Entstehung des Medulloblastoms in Verbindung gebracht wurden. So manifestiert sich in Patienten mit Keimbahnmutationen im SHH-Rezeptor *PTCH1* das Gorlin-Syndrom, welches sich unter anderem durch eine Prädisposition für Medulloblastome auszeichnet (Bale et al., 1998; Taylor et al., 2000). Auf ähnliche Weise führen Keimbahnmutationen im SHH-Inhibitor *SUFU* ebenfalls zu einer vermehrten Bildung von Medulloblastomen (Brugieres et al., 2010; Pastorino et al., 2009; Taylor et al., 2002). Somatische Mutationen in Genen des SHH-Signalwegs wie *PTCH*, *SMO* und *SUFU*, als auch Amplifikationen der SHH-Zielgene *GLI1* und *GLI2* konnten in sporadischen Medulloblastomen identifiziert werden und gelten als Ursache für die konstitutive Aktivierung dieses Signalwegs

(Adamson et al., 2010; Hahn et al., 1999; Johnson et al., 1996; Northcott et al., 2011a; Northcott et al., 2009). Dieses Mutationsspektrum zusammen mit der Tatsache, dass eine Subgruppe des Medulloblastoms eine pathologische Aktivierung des SHH-Signalwegs aufzeigt, lässt vermuten, dass eine Fehlregulation dieses Signalwegs bei der Entstehung des Medulloblastoms eine wichtige Rolle spielt.

1.3.4 Mausmodelle des Medulloblastoms

Analog zu den humanen Tumoren konnten verschiedene Mausmodelle für das Medulloblastom erstellt werden, die, abhängig von der Subgruppe, welche das Mausmodell imitieren soll, auf verschiedenen Mutationen und genetischen Systemen beruhen.

Eines der ersten genetisch veränderten Mausmodelle für das Medulloblastom basiert auf einem konventionellen Knockout des Shh-Repressors Patched (*Ptch1*). Während Mäuse mit einem homozygoten *Ptch1*-Knockout (*Ptch1*^{-/-}) während der embryonalen Entwicklung versterben, sind heterozygote Mäuse (*Ptch1*^{+/-}) lebensfähig und entwickeln zu etwa 20% cerebelläre Tumore, die humanen Medulloblastomen ähneln (Goodrich et al., 1997; Hahn et al., 2000). Ein Nachteil dieses Mausmodells ist die gleichzeitige Entstehung anderer Krebsarten, vornehmlich Weichteiltumore (Lee et al., 2006; Wetmore et al., 2000). Ein gleichzeitiger Verlust des Tumorsuppressors p53 (*Tp53*^{-/-}) führt zu einer Tumorpenetranz von 100% und verdeutlicht kooperative funktionale Mechanismen bei der Tumorentstehung (Wetmore et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse wurden beim Knockout der Zellzyklusregulatoren p18-Ink4c und p27-Kip1 in *Ptch*^{+/-}-Mäusen beobachtet (Ayrault et al., 2009; Uziel et al., 2006; Uziel et al., 2005). Die Aktivierung anderer Komponenten des Shh-Signalwegs führt auch zur Ausbildung von Medulloblastomen. So konnte mit Hilfe des RCAS/TVA-Systems gezeigt werden, dass Nestin-positive Vorläuferzellen nach Transduktion mit RCAS-basierten Retroviren, welche für Shh kodieren, in 10%-15% zur Ausbildung von Medulloblastomen in der Lage sind (Binning et al., 2008; Broderick et al., 2004; Browd et al., 2006; Rao et al., 2003). Hierbei können die RCAS (Replication Competent ASLV long terminal repeat with Splice acceptor)-basierten Retroviren nur Zellen transduzieren, die unter dem Nestin-Promotor TVA (avian retrovirus receptor) exprimieren und erlauben somit eine zellspezifische Aktivierung des Shh-Signalwegs. Ein besonders robustes Mausmodell für Shh-assoziierte Medulloblastome wurde durch Expression einer konstitutiv aktiven Form des *Smoothed* Gens (*SmoA1*) unter dem Körnerzellvorläufer-spezifischen Promotor ND2 generiert (Hallahan et al.,

2004; Hatton et al., 2008). Annähernd 100 % der Tiere entwickeln einen Tumor, welcher auch in den leptomeningealen Bereich metastasiert, ein Charakteristikum, welches die humanen Tumore häufig zeigen. Wie im oben genannten RCAS-basierten Mausmodell können auch hier Tumore außerhalb des Zentralen Nervensystems vermieden werden. Die im Moment gängigsten Mausmodelle für Shh-assoziierte Medulloblastome basieren auf konditionellen Systemen wie dem Cre/loxP-Rekombinationssystem, welches eine gewebe- und zelltypspezifische Rekombination und somit Manipulation erlaubt. Die zelltypspezifische Aktivierung des Shh-Signalwegs mit Hilfe spezieller Cre-Mauslinien (*Math1-cre*, *hGFAP-cre*, *Tlx3-cre*, *Olig2-cre*) hat die Tumورpenetranz ohne gleichzeitigen Knockout weiterer Tumorsuppressoren auf 100 % steigern können. Hierbei wird promotor-spezifisch der Shh-Repressor *Ptch1* deletiert oder eine konstitutiv-aktive Form des Gens *Smoothened* (SmoM2-YFP) transkribiert, was in beiden Fällen zu einer Aktivierung des Shh-Signalwegs und der anschließenden Ausbildung von Medulloblastomen führt (Mao et al., 2006; Schüller et al., 2008; Yang et al., 2008).

Während alle bisher genannten Mausmodelle humane SHH-assoziierte Medulloblastome imitieren, ist die Anzahl der Mausmodelle für Medulloblastome der WNT-, Gruppe 3- und Gruppe 4-Subgruppen sehr beschränkt. Erst kürzlich wurde ein Mausmodell für humane WNT-assoziierte Medulloblastome beschrieben (Gibson et al., 2010). Hierbei konnten durch die Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Zellpopulationen des dorsalen Hirnstamms mit gleichzeitigem Knockout des Tumorsuppressors p53 Tumore erzeugt werden, die auf molekularer Ebene humanen WNT-Medulloblastomen ähneln. Diese Ergebnisse rückten zum ersten Mal Zellpopulationen außerhalb des Kleinhirns in den Fokus der Medulloblastomforschung. Limitierte Daten aus zwei verschiedenen Mausmodellen für Gruppe 3-Medulloblastome konnten durch Expression von *c-MYC* in cerebellären Vorläuferzellen und gleichzeitigem Knockout von p53 generiert werden (Kawauchi et al., 2012; Pei et al., 2012). Die Tatsache, dass Gruppe 3-Medulloblastome die aggressivste Subgruppe mit der geringsten Überlebensrate darstellen, verdeutlicht die Notwendigkeit, im Hinblick auf präklinische Studien neue und geeignete Mausmodelle für diese Subgruppe zu generieren. Für Gruppe 4-Medulloblastome steht zur Zeit kein verlässliches Mausmodell zur Verfügung.

1.4 Der transkriptionelle Ko-Aktivator CBP

1.4.1 Physiologische Bedeutung von CBP

CBP, oder auch CREB (cyclic AMP-responsive element binding protein) - bindendes Protein (CREBBP) genannt, wurde initial als Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors CREB beschrieben (Chrivia et al., 1993). Das entsprechende Gen *CBP* (*CREBBP*) befindet sich auf Chromosom 16p13.3 und überspannt etwa 190 kb (Giles et al., 1997). In den vergangenen Jahren wurden intensive Studien an diesem 265 kDa großen Protein durchgeführt, wodurch die Proteindomänen und deren Funktionalität gut beschrieben sind. Als funktionelle Proteindomänen sind unter anderem zu nennen: N-terminale Bindungsstelle für nukleäre Rezeptoren, CREB-Bindungsdomäne, Bromodomäne, Histonacetyltransferase-Domäne (HAT-Domäne) und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (Abbildung 1.4) (Giles et al., 1997). Als augenscheinlichste Domäne stellt sich die HAT-Domäne dar, von der schon früh gezeigt werden konnte, dass sie eine funktionale Acetyltransferase-Aktivität aufweist (Bannister and Kouzarides, 1996). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CBP mit einer erstaunlichen Anzahl an Transkriptionsfaktoren interagieren kann. Diese Interaktion wird vermittelt durch die CREB-Bindungsdomäne, welche neben CREB (Chrivia et al., 1993) unter anderem auch c-Jun (Arias et al., 1994), c-Fos (Bannister and Kouzarides, 1995), Stat2 (Bhattacharya et al., 1996) bindet. Des Weiteren bindet CBP verschiedene nukleäre Rezeptoren (Chakravarti et al., 1996; Kamei et al., 1996) mit der N-terminal gelegenen Bindungsstelle. Die beobachteten Eigenschaften von CBP führten schon früh zu der Annahme, dass CBP als transkriptioneller Ko-Aktivator aktiv ist, indem es mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert und mittels Übertragung von Acetylgruppen auf N-terminal gelegene Aminosäurereste von Histonen die Struktur des Chromatins modifiziert. Diese Chromatinalterationen wiederum sind durch die Aufhebung der positiven Ladung an Lysinresten von Histonen und der daraus resultierenden geringeren elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Histonen und DNA ein entscheidender Schritt bei der Regulation der Transkriptionsaktivität der entsprechenden DNA-Abschnitte. Viele Erkenntnisse über die Funktion von CBP wurden durch die Analyse des Rubinstein-Taybi Syndroms (RTS) gewonnen. Hierbei handelt es sich um eine erblich bedingte Entwicklungsstörung, welche in einem Großteil der dokumentierten Fälle durch eine Keimbahnmutation von *CBP* verursacht wird (Bartsch et al., 2005; Blough et al., 2000; Kalkhoven et al., 2003; Lopez-Atalaya

et al., 2012; Roelfsema et al., 2005). Diese identifizierten Mutationen umfassen ein breites Spektrum an Deletionen, Gentranslokationen und einer ganzen Reihe verschiedener Punktmutationen (Petrij et al., 1995).

Humanes CBP Protein

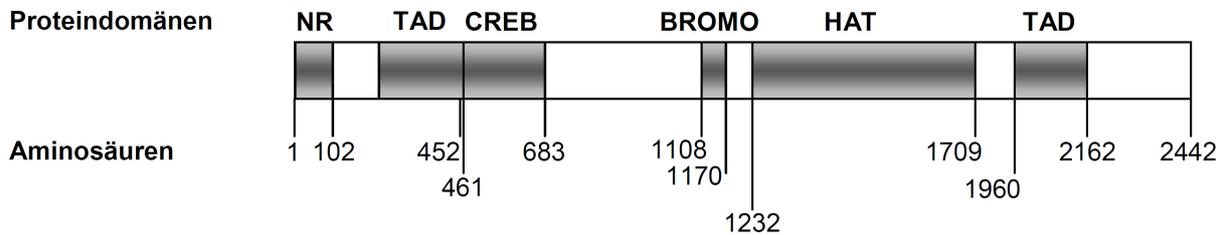


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von CBP mit ausgewählten Proteindomänen. NR: Bindungsstelle für nukleäre Rezeptoren; CREB: CREB-Bindungsdomäne; BROMO: Bromodomäne; HAT: Acetyltransferase-Domäne; TAD: Transaktivierungsdomäne.

Obwohl manche dieser Mutationen möglicherweise zu einer dominant-negativen Isoform des Proteins führen, geht man davon aus, dass CBP haploinsuffizient wirkt und somit der heterozygote Verlust von CBP bereits zur Ausprägung des RTS führen kann (Oike et al., 1999a; Tanaka et al., 1997). Merkmale des Rubinstein-Taybi Syndroms umfassen eingeschränktes Körperwachstum, Abnormalitäten der Finger, Zehen und des Gesichts, kognitive Einschränkungen und eine Prädisposition für eine Reihe verschiedener Neoplasien (Iyer et al., 2004; Miller and Rubinstein, 1995; Rubinstein and Taybi, 1963). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass der Verlust der Acetyltransferaseaktivität von CBP vor allem neuronale Vorläuferzellen und deren Differenzierung maßgeblich beeinflusst, was als wahrscheinlichster Grund für die kognitiven Einschränkungen bei RTS-Patienten angesehen wird (Wang et al., 2010).

In Mausmodellen konnten bisher nur beschränkte Erkenntnisse zur Funktion von CBP gewonnen werden. Dies liegt hauptsächlich daran, dass der konventionelle Knockout von CBP aufgrund einer Vielzahl an Entwicklungsdefekten wie fehlendes Schließen des Neuralrohrs, Proliferationsdefekten und gestörte Herzentwicklung zur Letalität während der frühen embryonalen Entwicklung führt (Kung et al., 2000; Oike et al., 1999b; Yao et al., 1998). Mäuse mit einem konventionellen heterozygoten Knockout von CBP rekapitulieren eine Reihe phänotypischer Charakteristika von RTS Patienten (Oike et al., 1999a; Tanaka et al., 1997). Darüber hinaus zeigen diese Mäuse Differenzierungsdefekte in verschiedensten hämatopoetischen Zellpopulationen (Kung et al., 2000; Oike et al., 1999b) Ebenso besitzen diese Mäuse eine deutlich erhöhte Insulinsensitivität und Glucosetoleranz, was sie vor

Gewichtszunahme auch nach hochkalorischer Diät schützt (Yamauchi et al., 2002). Für detaillierte Analysen der Funktion von CBP geht man zusehends dazu über, konditionelle Knockouts mit Hilfe des Cre/loxP-Systems heranzuziehen (Zhang et al., 2004). In der Folge konnte bereits gezeigt werden, dass CBP essentiell für die Histonacetylierung in Neuronen des Großhirns ist und die fehlende Acetylierung zu Störungen der Gedächtnisleistung führt (Valor et al., 2011). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CBP in vielen, wenn nicht den meisten Entwicklungssignalwegen eine Rolle spielt und eine genetische Alteration im *CBP*-Gen zu einer Fülle von Entwicklungsstörungen führt, die sich im humanen System in der Entwicklungsstörung Rubinstein-Taybi Syndrom äußern.

1.4.2 Onkologische Bedeutung von CBP

Schon früh wurde für den transkriptionellen Ko-Aktivator CBP eine Funktion als Tumorsuppressor vermutet. Erste Erkenntnisse dazu stammten aus der Analyse von RTS-Patienten, die im Kindesalter eine deutliche Prädisposition für bestimmte maligne Tumore vor allem im zentralen Nervensystem aufzeigen (Inzidenz bei etwa 5%) (Miller and Rubinstein, 1995). Ein weiteres Indiz für die Tumorsuppressoraktivität von CBP ist die Entdeckung, dass virale Onkogene wie E1A und SV40 LT offensichtlich an CBP binden können und somit ihre transformierenden Eigenschaften vermitteln können (Dyson and Harlow, 1992; Moran, 1993). Darüber hinaus ist bekannt, dass seltene chromosomale Translokationen, welche das Gen *CREBBP* unterbrechen, mit verschiedenen hämatopoetischen Malignitäten zusammenhängen wie akuter myeloischer Leukämie, chronischer myeloischer Leukämie und dem myelodysplastischen Syndrom (Borrow et al., 1996; Panagopoulos et al., 2001; Rowley et al., 1997; Sobulo et al., 1997). Erst kürzlich konnte auch für Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie und B-Zell-Lymphom ein breites Spektrum an Mutationen nachgewiesen werden, welche sich hauptsächlich in der Acetyltransferase-Domäne von CBP oder in Domänen befinden, welche für die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind (Mullighan et al., 2011; Pasqualucci et al., 2011). Zahlreiche Hinweise bringen CBP Alterationen aber auch mit soliden Tumoren in Verbindung. So konnte gezeigt werden, dass fast 15% der untersuchten Lungenkarzinom-Zelllinien und 5% der primären Lungentumore CBP genetisch alteriert waren (Kishimoto et al., 2005). Darüber hinaus weiß man seit kurzem, dass kleinzellige Lungentumore, welche einen aggressiven Tumorsubtyp mit schlechter Prognose repräsentieren, vermehrt

Mutationen in Genen tragen, welche für Histon-modifizierende Enzyme wie zum Beispiel CBP kodieren (Peifer et al., 2012). Auch für einen Tumor des Zentralen Nervensystems, das humane Medulloblastom, wurden mittlerweile wiederkehrende Mutationen im *CBP* Gen entdeckt worden (Jones et al., 2012; Robinson et al., 2012). Dies deckt sich mit Erkenntnissen von RTS-Patienten, bei denen man eine erhöhte Inzidenz von Tumoren vor allem in der Kopfregion vorfindet. So wurden in RTS-Patienten unter anderen bereits Fälle von Oligodendrogliomen, Neuroblastomen und Medulloblastomen dokumentiert (Evans et al., 1993; Miller and Rubinstein, 1995; Skousen et al., 1996; Taylor et al., 2001).

Da *CBP*-Mutationen insgesamt gesehen relativ selten sind, besteht für das humane System weiterhin Unklarheit, ob CBP tatsächlich die Funktion eines klassischen Tumorsuppressors erfüllt. Insbesondere konnte noch nicht explizit dargelegt werden, ob bereits ein heterozygoter Verlust von CBP im humanen System zur Ausbildung von Tumoren führt, oder ob dafür ein homozygoter Knockout erforderlich ist. Transgene Mausmodelle stellen eine gute Möglichkeit dar, die Funktion eines Zielgens während der Pathogenese bestimmter Krankheiten zu verfolgen. In Mäusen mit einem konventionellen Knockout eines *Cbp*-Allels kommt es zusätzlich zu den oben erwähnten Differenzierungsdefekten zur Ausbildung von malignen Neoplasien innerhalb des hämatopoetischen Systems (Kung et al., 2000; Oike et al., 1999a). Wichtig ist hierbei, dass die Ausbildung dieser hämatopoetischen Neoplasien von einer somatischen Inaktivierung des zweiten *Cbp*-Allels begleitet wurde. Dies belegt, dass zumindest in der Maus *Cbp* als klassischer Tumorsuppressor aktiv ist. Ein auffällender Unterschied zwischen dem murinen und dem humanen System ist die Tatsache, dass ein heterozygoter Verlust von *Cbp* in der Maus zu einer Häufung von malignen Neoplasien des hämatopoetischen Systems führt, humane Patienten mit RTS aber eine auffallende Prädisposition von Tumoren im zentralen Nervensystem aufweisen. Eine Erklärung für diesen offensichtlichen Unterschied steht bisher noch aus. Obwohl dies darauf hindeutet, dass die Funktion von *Cbp* im murinen und humanen System nicht exakt gleich ist, stellt das Mausmodell dennoch ein wertvolles System für die Untersuchung der Funktion von *Cbp* während der Entstehung verschiedener Tumorarten dar.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die molekularen Mechanismen, welche der Entstehung humaner SHH-assoziiierter Medulloblastome zugrunde liegen,

genauer zu verstehen. Während allen Medulloblastomen dieser molekularen Subgruppe eine pathologische Aktivierung des SHH-Signalwegs gemeinsam ist, zeichnet sich ab, dass Tumore innerhalb dieser Subgruppe eine beträchtliche Heterogenität bezüglich klinischer Parameter und genetischer Alterationen aufzeigen (Northcott et al., 2011a). In Anbetracht dieser Heterogenität sollten in dieser Arbeit zwei Fragestellungen für die Entstehung Shh-abhängiger Medulloblastome erörtert werden.

Als Ursprungszellen für die SHH-Subgruppe des Medulloblastoms werden seit längerer Zeit undifferenzierte Vorläuferzellen der Körnerzellen des Kleinhirns gehandelt (Schüller et al., 2008; Yang et al., 2008). Seit kurzem weiß man aber, dass zumindest Medulloblastome der Wnt-Subgruppe ihren Ursprung in Zellen des dorsalen Hirnstamms haben (Gibson et al., 2010). In einem ersten Projekt sollte geklärt werden, ob Zellen des dorsalen Hirnstamms auch als Ursprungszellen für Shh-abhängige Medulloblastome in Betracht kommen und somit einen Beitrag zur Divergenz in dieser Subgruppe beitragen. Hierfür wurden zuerst in Fate Mapping-Experimenten verschiedene Cre-Mauslinien auf ihre Fähigkeit hin untersucht, eine Cre-vermittelte Aktivierung des Shh-Signalwegs über die Einführung einer konstitutiv aktiven Mutante des *Smoothed Gens* (*SmoM2-YFP*) in Zellen des dorsalen Hirnstamms zu gewährleisten. Die Auswirkungen der Aktivierung des Shh-Signalwegs *in vivo* durch ausgewählte Cre-Linien in Zellen des dorsalen Hirnstamms wurden eingehend untersucht.

In einem zweiten Projekt sollte untersucht werden, welche Rolle der transkriptionelle Co-Aktivatoren CBP (CREB-binding protein) in der Pathogenese von SHH-abhängigen Medulloblastomen spielt. Eine Keimbahnmutation des für CBP kodierenden Gens *CBP* (*CREBBP*) in Menschen führt zur Ausprägung des Rubinstein-Taybi Syndroms, welches neben Fehlbildungen des Skeletts und mentaler Retardierung auch eine Prädisposition für Tumore im zentralen Nervensystem einschließlich Medulloblastome aufzeigt (Bartsch et al., 2005; Taylor et al., 2001). Durch die vermehrte Sequenzierung klinischer Proben wurde mittlerweile ein breites *CBP*-Mutationsspektrum in unterschiedlichen Tumorarten aufgedeckt (Mullighan et al., 2011; Pasqualucci et al., 2011; Peifer et al., 2012). Analog dazu wurden inaktivierende *CBP*-Mutationen auch in Medulloblastomen identifiziert (Jones et al., 2012; Robinson et al., 2012). Interessanterweise scheinen inaktivierende *CBP*-Mutationen vor allem in adulten SHH-assoziierten Medulloblastomen aufzutreten

(Kool M., Schüller U., unpublizierte Daten). Im Hinblick auf den Mutationsstatus von CBP in humanen Medulloblastomen sollte in diesem Projekt untersucht werden, welche Rolle das murine Cbp bei der Entwicklung Shh-assoziiierter Medulloblastome in der Maus spielt. Hierfür wurde Cbp mit Hilfe des Cre-loxP-Systems *in vivo* zellspezifisch während verschiedener Entwicklungsstadien in Körnerzellvorläufern des murinen Kleinhirns deletiert. Zusätzlich wurde ein Cbp-Knockout in einem Mausmodell für Shh-assoziierte Medulloblastome generiert und die Auswirkungen auf die Tumorentwicklung untersucht. Des Weiteren wurde Cbp *in vitro* in primären Körnerzellvorläufern deletiert und das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht. Zuletzt wurden die im Mausmodell gewonnenen Daten mit Expressionsprofilen humaner SHH-assoziiierter Medulloblastome verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

2.1.1 RNA-Isolation

RNA-Isolierung erfolgte nach der sauren Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski, 1993). Zur Isolierung von cerebellärer RNA wurden die Cerebella der Mäuse präpariert, in Trizol aufgenommen (1ml/100mg Gewebe) und mittels eines Douncers homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) wurden 0,2ml 1-Bromo-3-chloro-Propan pro ml Trizol zugegeben und das Gefäß kurz geschüttelt. Die Proben wurden für 3 Minuten bei RT inkubiert und zur anschließenden Phasentrennung bei 12000 x g, 4°C für 15min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde überführt und mit 0,5 ml Isopropanol/ml Trizol Anfangsvolumen vermengt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben zur RNA-Präzipitation bei 12000 x g, 4°C für 10min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit kaltem 75% Ethanol-DEPC gewaschen und wieder für 5 min bei 7500 x g, 4°C zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet für 10 Minuten bei RT getrocknet, in 50 µl H₂O-DEPC aufgenommen und bei 60°C für 10 min gelöst. Die Konzentration wurde anschließend in einem Spektrophotometer (Nanodrop 1000) bestimmt. RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.1.2 cDNA Synthese

Vor Durchführung der cDNA Synthese wurden alle RNA-Proben einem DNase-Verdau unterzogen (RNase-freie DNase, Promega). Nach photometrischer Bestimmung der RNA Konzentration nach DNase-Verdau wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Zur Verbesserung der Effizienz wurde hierbei mit einer Kombination aus oligo(dT)₂₀- und random hexamer-Primern gearbeitet. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.1.3 Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR

Mit der gewonnenen cDNA wurde die Expression der Zielgene durch relative Quantifizierung bestimmt. Hierfür wurde das LightCycler 480-System mit dem LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics GmbH) verwendet.

Die Prozedur wurde nach Herstellerangaben in Triplikaten durchgeführt. Alle Primer aus Tabelle 2.1 für die qRT-PCR wurden mit dem öffentlich verfügbaren Programm Primer-BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) generiert und von Eurofins MWG GmbH bezogen. Die PCR-Reaktionen wurden wie in Tabelle 2.2 dargestellt durchgeführt.

Tabelle 2.1 Primersequenzen für qRT-PCR

Primername	Sequenz 5' - 3'
mCbp-Fw	AGTCATCACAGCAGCAACCA
mCbp-Rv	GCACCTCTGTCTTCATTTCCA
mBdnf-Fw	ACAAGGCAACTTGGCCTACC
mBdnf-Rv	TCGTCAGACCTCTCGAACCT
mβ2m-Fw	CCTGGTCTTTCTGGTGCTTG
mβ2m-Rv	TATGTTCTGGCTTCCCATTCT

Tabelle 2.2 Programm für qRT-PCR

Schritt	Detektionsmodus	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Vorinkubation		95	300	
Amplifikation	einfach	95	10	45 Zyklen
		60	10	
		72	20	
Schmelzkurvenanalyse	fortlaufend	40 - 95	300	
Stop		4	∞	

Die relative Quantifizierung wurde mittels der Normalisierung des Zielgens auf das Housekeeper-Gen *β2m* vollzogen. Durch den Einsatz einer konstanten Probe, des Kalibrators, konnten unterschiedliche PCR-Läufe miteinander verglichen werden. Für alle Proben wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Reaktion zu bestätigen. Eine Effizienzkorrektur für jedes Primerpaar wurde anhand einer Standardkurve durchgeführt. Die bestimmten Effizienzen für die verschiedenen Primerpaare sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3 Primereffizienzen für qRT-PCR

Primerpaar	Effizienz
Cbp	1.877
Bdnf	2.343
β2m	2.23

Die relativen Expressionwerte wurden wie folgt berechnet:

$$nEx = E_T^{[CpT(K) - CpT(P)]} \times E_H^{[CpH(P) - CpH(K)]}$$

Hierbei stehen nEx für den normalisierten Expressionswert, E für die Effizienz, T für Zielgen, H für Housekeeper-Gen, K für Kalibrator, P für Probe und Cp beschreibt die

jeweilige Zyklusanzahl, bei der es zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität kam.

2.1.4 Isolation von Gesamtprotein aus Gewebe

Zur Isolation von Gesamtprotein wurde das entsprechende Gewebe präpariert und in gleichem Volumen eiskaltem Lysepuffer (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.5 % Natriumdeoxycholat, 0.5 % Triton X-100, Protease Inhibitor Cocktail Complete) resuspendiert. Die Proben wurden anschließend für 30 min auf 4 °C auf einem Thermomixer geschüttelt. Nach Inkubation wurden die Proben bei 16100 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neue Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proben wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode bestimmt. Hierfür wurden Bicinchoninsäure und 4 % (w/v) CuSO₄ im Verhältnis 50:1 gemischt. Jeweils 10 µl der Proteinprobe wurden mit 140 µl des BCA-Gemisches versetzt und mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionsrate des entstehenden violetten Farbstoffes (Molybdänblau) wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem Photometer (FLUOstar Optima, BMG Labtech) bestimmt und mit der Absorption einer Standardreihe von BSA (bovines Serumalbumin) verglichen.

2.1.6 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Hierfür wurden die Proben unter reduzierenden Bedingungen mit SDS (Natriumdodecylsulfat) versetzt, was zur Denaturierung der Proteine und einem konstanten Ladungs-Mass-Verhältnis negativ geladener Protein-SDS-Komplexe führt. Abhängig von der molekularen Masse der zu untersuchenden Proteine kamen in dieser Arbeit Trenngele mit 7.5 % bis 15 % Acrylamid zur Anwendung. Von jeder zu untersuchenden Probe wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. SDS-Gele wurden für etwa 1 Stunde bei konstant 140 V gefahren. Der Gellauf wurde anhand eines aufgetragenen Proteinmarkers verfolgt.

2.1.7 Spezifischer Nachweis von Protein durch Western Blot

Nach erfolgtem Gellauf wurden die Gele für 20 min in Towbin Puffer (48 mM Tris, 38 mM Glycin) äquilibriert und anschließend die Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Für Proteine mit einem

Molekulargewicht unter 100 kDa wurde dafür eine SemiDry-Blot verwendet. Hierfür wurde dem Towbin Puffer 30 % Methanol zugesetzt. SemiDry-Blots wurden bei konstant 60 mA/Gel über eine Dauer von zwei Stunden durchgeführt. Für Proteine mit einem Molekulargewicht über 100 kDa wurde der Proteintransfer in einem Blottank durchgeführt. Hierbei wurde dem Towbin Puffer 0.1 % SDS hinzugefügt. Transfers in einem Blottank wurden über Nacht bei konstant 30 V verwirklicht. Membranen wurden nach dem Transfer für zwei Stunden in Blockpuffer (2 % bovines Serumalbumin in PBS/0.1 % Tween 20) inkubiert. Nachfolgend wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (Cbp, LS-B3360, Biozol; Bdnf, ab108319, Abcam; β -Tubulin, T4026, Sigma Aldrich) in Blockpuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal je 5 min in PBST gewaschen. Die Blots wurden in der Folge mit alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Goat anti-Mouse IgG (H + L), 115-055-003, Jackson ImmunoResearch; Goat anti Rabbit IgG (H + L), 111-055-003; Jackson ImmunoResearch) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBST erfolgte die Visualisierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase mit dem Substrat CDP-Star (Roche Applied Science) und dem ChemoCam Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH). Die densitometrische Analyse der Banden und nachfolgende Abschätzung der Proteinlevel erfolgte mit dem Programm ImageJ (NIH).

2.1.8 Produktion retroviraler Partikel

Retrovirale Partikel zur Transduktion von primären Mauszellen wurden durch Transfektion von humanen HEK293T-Zellen produziert. Diese wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Die Arbeiten mit eukaryotischen Zellen erfolgten mit sterilen Gefäßen und Lösungen in einer sterilen Umgebung (HERAsafe, Thermo). Die HEK293T-Zellen wurden in Brutschränken bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Produktion retroviraler Partikel wurden HEK293T-Zellen in einer Triple-Transfektion mit zwei Helferplasmiden (pCMV-VsVg und pCMV-gag-pol) und jeweils einem retroviralen Konstrukt mit entweder nur einer IRES (internal ribosome entry site)-GFP oder einer Cre (Cre-Rekombinase)-IRES-GFP Sequenz mit Hilfe des Transfektionsreagenz X-tremeGENE HP (Roche) nach Herstellerangaben transfiziert. Das Medium wurde 24 Stunden nach Transfektion durch normales Kulturmedium (DMEM Medium, 10 % fötales Kälberserum, 1 % Glutamax) ersetzt.

Retroviraler Mediumüberstand wurde bis zu 4 Tage nach Transfektion abgenommen, mit Hilfe von 0.45 mm-Filtern von Zellschrott gesäubert und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit folgenden transgenen Mausmodellen gearbeitet: *ROSA26lacZ^{F1/F1}* (Soriano, 1999), *SmoM2-YFP^{F1/F1}* (Mao et al., 2006), *hGFAP-cre* (Zhuo et al., 2001), *Math1-cre* (Matei et al., 2005; Schüller et al., 2007), *Math1-creER^{T2}* (Machold and Fishell, 2005), *Cbp^{F1/F1}* (Zhang et al., 2004) und *ptch1^{+/-}* (Goodrich et al., 1997). Alle durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes und wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Tiere wurden in geschlossenen Käfigsystemen mit einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden gehalten. Zur Entnahme des Gehirns wurden adulte Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Tiere mit einem Alter von weniger als 14 Tagen wurden durch Dekapitierung getötet.

2.2.1 Genotypisierung der verwendeten Mauslinien

Zur Genotypisierung wurde von den Mäusen an P3 eine Schwanzbiopsie genommen. Das Gewebe wurde mit 500 µl Lysepuffer (200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 µg/ml Proteinase K in ddH₂O) versetzt und mindestens 2 Stunden bei 56 °C auf dem Thermomixer verdaut. Anschließend wurden die Proben bei 16100 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt. Durch Schütteln kam es zum Ausfallen der genomischen DNA, welche abermals bei 16100 g für 5 min zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde anschließend in TE-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 1 mM EDTA in ddH₂O) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

Die genomische DNA diente als Ausgangsmaterial für die Genotypenbestimmung. Hierfür wurden mittels PCR (Tabelle 2.5) genotyp-spezifische Regionen des Genoms amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer sind in Anlehnung an die Originalpublikationen (vergleiche Kapitel 2.2) in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4 Auflistung aller verwendeten Genotypisierungsprimer.

Primername	Sequenz 5' - 3'
Cre-Fw	TCCGGGCTGCCACGACCAA
Cre-Rv	GGCGCGGCAACACCATTTT
SmoM2-YFP Mut-Fw	GAACGGCATCAAGGTGAA
SmoM2-YFP Mut-Rv	CGATGGGGGTGTTCTGCT
SmoM2-YFP WT-Fw	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
SmoM2-YFP WT-Rv	CGTGATCTGCAACTCCAGTC
ROSA26lacZ WT-Fw	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
ROSA26lacZ WT-Rv	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
ROSA26lacZ Mut-Fw	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
ROSA26lacZ Mut-Rv	GCGAAGAGTTTGCCTCAACC
Cbp-Fw	CCTCTGAAGGAGAAACAAGCA
Cbp-Rv	ACCATCATTTCATCAGTGGACT

Tabelle 2.5 PCR-Programm für die Genotypisierungen.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Vorinkubation	95	120
	95	30
Amplifikation	60	30
	72	60
Stop	4	∞

35 Zyklen

Die Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch 1 %-ige Agarosegele und einem Syngene Geldokumentationssystem (Synoptics Limited).

2.2.2 Primärzellkultur

Für alle Primärzellkulturen wurde das Großhirn der Tiere unter sterilen Bedingungen präpariert und das Cerebellum beziehungsweise das Tumorgewebe vom restlichen Hirn entfernt und in HBSS-Puffer (Hank's buffered saline solution, 1 mg/l Glucose) gewaschen. Anschließend wurden die Meningen vom Cerebellum entfernt.

2.2.2.1 Kulturen von cerebellären Körnerzellen und Tumorzellen

Für die selektive Kultivierung von cerebellären Körnerzellen wurden die Cerebella in Lysepuffer (200 U/ml Papain, 5 mM EDTA in DMEM-F12) bei 37 °C für 15 min inkubiert, anschließend durch FCS (10 % fötales Kälberserum in DMEM-F12) inaktiviert und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Gewebe in 5 ml HBSS-Puffer resuspendiert. Nach abermaliger Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml HBSS-Puffer mit einer 1 ml Pipette vereinzelt und abzentrifugiert. In der Folge wurden die Zellen in Kulturmedium (DMEM-F12, 1x N2 neuronales Supplement, 1x Penicillin/Streptomycin, 0.25 mM KCl) mit 10 % FCS resuspendiert und zu 750.000 Zellen/cm² auf poly-L-Ornithin (20 µg/ml in PBS)

beschichtete 24 Well Schalen ausgesät. Nach einer Ruhephase von 6 bis 12 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch Kulturmedium mit Shh (3 µg/ml) ersetzt. Durch die Kultivierung in diesem Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden verlassen alle Zellen außer den cerebellären Körnerzellen den Zellzyklus. Für die Transduktion der Körnerzellen mit IRES-GFP und Cre-IRES-GFP Viren wurde das Medium abgenommen und Virusüberstand für vier Stunden auf die Zellen gegeben. Da die hier genutzten Retroviren lediglich proliferierende Zellen transduzieren, konnte durch die Kultivierung in selektivem Shh-Medium verhindert werden, dass andere Zelltypen als Körnerzellen von den Viren transduziert werden und somit die Ergebnisse verfälschen würden. Nach der Virus-Transduktion wurden die Zellen abermals für 24 Stunden in Kulturmedium mit Shh kultiviert. Zur Analyse der Proliferationsrate wurde dem Medium Bromodesoxyuridin (BrdU, 25 µg/ml) zugebenen und die Zellen nach weiteren zwei Stunden mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Kultivierung und Proliferationsanalyse von Tumorzellen wurde in Anlehnung an das eben beschriebene Protokoll durchgeführt. Hierbei wurden die Tumorzellen jedoch in einem anderen Medium (Neurobasal Medium, 1x B27 neuronales Supplement, 1x Penicillin/Streptomycin, 20 ng/ml humanes FGF, 20 ng/ml humanes EGF, 2 mM Glutamin) kultiviert.

2.2.2.2 Cerebelläre Explantatkulturen

Explantatkulturen wurden mit folgenden Änderungen wie bereits beschrieben durchgeführt (Koscheck et al., 2003). Cerebella von drei Tage alten Tieren wurden nach Präparation zur Bildung von kleinen Explantaten durch ein Nylonnetz (Maschendurchmesser 300 µm) pipettiert. 24 Well Schalen wurden mit poly-L-Ornithin (20 µg/ml in PBS) und Laminin (20 µg/ml in PBS) über Nacht beschichtet. Die cerebellären Explantate wurden auf die Wells ausgesät und in Kulturmedium (DMEM-F12, 1x N2 neuronales Supplement, 1x Penicillin/Streptomycin, 0.25 mM KCl, 10 % FCS) kultiviert, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde. Für BDNF-Versuche wurde dem Medium bei Aussaat 100 ng/ml zugesetzt. Nach fünf Tagen wurden die Explantate in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend gefärbt. Tamoxifeninduktion und BrdU Puls

2.2.3 Tamoxifen-Induktion und BrdU-Puls

Das Tamoxifen-induzierbare Mausmodell *Math1-creER^{T2}* ermöglichte es, die Cre-Rekombinase spezifisch während der postnatalen Entwicklung in Math1-positiven

Körnerzellvorläufern des Kleinhirns zu aktivieren. Das in dieser Mauslinie exprimierte Fusionprotein aus der Cre-Rekombinase und einer mutierten Form des humanen Östrogen-Rezeptors wird zwar unter dem *Math1*-Promotor exprimiert, aber im Zytoplasma der Zelle gehalten und kann erst nach Induktion durch Tamoxifen in den Zellkern gelangen und aktiv werden (Feil et al., 1997; Helms et al., 2000; Machold and Fishell, 2005). Tiere mit diesem induzierbaren Cre-System wurden an Postnataltag 5 durch Gabe von Tamoxifen (Sigma Aldrich) induziert. Hierfür wurde den Tieren intraperitoneal 1 mg Tamoxifen (in Maisöl) verabreicht.

Zur Analyse der Proliferationsrate der cerebellären Körnerzellen *in vivo* in verschiedenen Mausmodellen wurde ein Bromodesoxyuridin (BrdU)-Puls durchgeführt und die Tiere nach weiteren zwei Stunden getötet. Hierfür wurde den Tieren 25 µg BrdU/g Gesamtgewicht intraperitoneal verabreicht. BrdU wird als chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin in die DNA eingebaut und kann in der Folge immunhistochemisch nachgewiesen werden. Nach einem zweistündigen BrdU-Puls können so immunhistochemisch Zellen nachgewiesen werden, die sich in diesem Zeitraum in der S-Phase des Zellzyklus befunden haben.

2.2.4 Hörschwellenbestimmung mittels akustisch evozierter Signale

Der physiologische Vorgang des Hörens hat eine Vielzahl von bioelektrischen Potentialänderungen in der Cochlea, im Hörnerv und im ZNS zur Folge. Diese Potentialänderungen können zu einer objektiven Funktionsprüfung des Gehörs verwendet werden, da die Hirnstammpotentiale auch im Schlaf, in Narkose und an Versuchstieren nachgewiesen werden können. Die auditorisch evozierten Potentiale (AEPs) werden hierbei an der Schädeloberfläche mit Hilfe von Nadel- oder Oberflächenelektroden abgeleitet. Zur Generierung der akustischen Stimuli und Messung der Hörschwelle am kontralateralen Ohr wurde für die Versuche ein System zur Bestimmung von AEPs (GSI Audera, VIASYS NEuro Care, Inc., USA) verwendet. Zur Messung der AEPs wurden den Tieren Messelektroden angelegt. Die Negativelektrode wurde subdermal am linken Proccus mastoideus platziert, die Positivelektrode über dem Vertex. Die Referenzelektrode wurde ebenfalls subdermal im zervikalen Muskel unter der Nackenhaut positioniert und alle Elektroden wurden an das Messgerät über einen Vorverstärker angeschlossen. Zur cochleären Stimulation wurde bei diesen Versuchen ein Sinuston mit einer Frequenz von 8 kHz und einer Dauer von etwa 50 ms verwendet. Für die Ableitung der AEPs müssen die Stimuli 1000 bis 2000 mal wiederholt werden und die nachfolgende Antwort gemittelt

werden. Die Hörschwelle wurde durch die schrittweise Reduktion der Lautstärke ausgehend von 75 dB und Mittelung der elektrischen Potentiale nach jeweils 1200 aufgezeichneten Reizantworten ermittelt. Während Potentiale, die weit über der Hörschwelle lagen, ausgehend von 75 dB in 10 dB Schritten aufgezeichnet wurden, wurden Potentiale nahe der Hörschwelle in 5 dB Schritten dargestellt. Die Messungen wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die in dieser Arbeit gezeigten Hörschwellenbestimmungen wurden von Frau Dr. med. Catalina Meßmer (Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Universitätsklinikum Großhadern) durchgeführt.

2.3 Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Microarrayanalyse

Für die Analyse verschiedener Tumorgewebe mittels Microarray wurde das entsprechende Gewebe präpariert und die RNA isoliert (vergleiche Kapitel 2.1.1). Die Microarrayanalyse der gewonnenen Tumore wurde von Dr. Marcel Kool am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Für die Analyse muriner Tumore wurde das Gewebe auf einem Affymetrix mouse Genome 430 2.0 Genchip hybridisiert. Für die Analyse humaner Medulloblastome wurde der Affymetrix HG U133 Plus 2.9 Genchip benutzt. Zur Normalisierung der Expressionsdaten wurde der MAS5.0 Algorithmus des GCOS Programms (Affymetrix) angewendet. Zur Sicherung der Qualität der Arraydaten wurde das 5`-3` Verhältnis von *Beta-Actin* und *GAPDH* und der Prozentsatz der detektierten Fluoreszenzsignale aus dem MAS5.0 Algorithmus herangezogen.

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Allgemeine Gewebepreparation und Gewebeanalyse

Gewebe für Hämatoxylin/Eosin (H&E) Färbungen und Immunhistochemie wurde präpariert und in 4 % Paraformaldehyd in PBS über Nacht fixiert und nachfolgend in Paraffin eingebettet. Gewebe für Kryoschnitte wurde nach Fixierung in 20 % Glucose/PBS dehydriert und in OCT (TissueTek) eingefroren. Paraffinschnitte wurden in 5 µm und Kryoschnitte in 8 µm Dicke geschnitten und auf Superfrost Plus Objektträgern (Fisher) aufgebracht. Paraffinschnitte wurden vor Gebrauch in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Allgemeine Morphologie des Gewebes wurde anhand von H&E Färbungen analysiert. H&E Färbungen wurden nach einem Standardprotokoll angefertigt. Alle Bilder chromogener

histologischer Präparate wurden mit einem Olympus Bx50 Mikroskop mit Hilfe des ColorView Soft imaging Systems (Olympus) angefertigt.

2.4.2 *in situ* Hybridisierung

Die Synthese der Sonden für die *in situ* Hybridisierung erfolgte mittels *in vitro*-Transkription von PCR-basierten linearen Matrizen. Für die Erstellung der cRNA-Sonden standen Plasmide zur Verfügung, welche das offene Leseraster des jeweiligen Gens enthielten. Die Plasmide erlaubten eine Amplifikation des jeweiligen Gen-Inserts mittels PCR mit Primern spezifisch für die Promotoren der T7- bzw. T3-RNA-Polymerase. Für die Erstellung von Digoxigenin-markierten antisense cRNA-Sonden wurde das *in vitro* Transkriptions Kit (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Die *in situ* Hybridisierung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Weisheit et al., 2002). Kryoschnitte wurden vor der Hybridisierung mit Proteinase K (10 µg/ml in BPS) für 10 min bei Raumtemperatur behandelt, um eine bessere Demaskierung der mRNA zu gewährleisten. In der Folge wurden die Schnitte mit der cRNA-Sonde in Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 5x SSC pH 4.5, 100 µg/ml Hefe tRNA, 100 µg/ml Heparin, 100 µg/ml DNA aus Lachshoden, 5x Denhardt-Lösung, 0.1 % Tween 20, 0.5 % CHAPS, 5 mM EDTA) in verschließbaren Gefäßen über Nacht inkubiert. Hierbei variierten die Temperaturen abhängig von der verwendeten cRNA-Sonde zwischen 55 °C und 65 °C. Nach Hybridisierung wurden die Schnitte in 50 % Formamid (in 1x SSC; 3 °C unter Hybridisierungstemperatur) gewaschen, in RNase A (2 µg/ml) bei 37 °C für 15 min inkubiert und in der Folge in absteigenden Konzentrationen von SSC-Lösung (2x SSC bis 0.2x SSC; 3 °C unter Hybridisierungstemperatur) für eine Stunde gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend in MBST (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.1 % Tween 20) gewaschen und für zwei Stunden mit 2 % Boehringer Blockreagenz (Roche) in MBST blockiert. In der Folge wurden die Schnitte über Nacht mit einem an alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) in Blockreagenz inkubiert und anschließend mehrfach in MBST gewaschen. Vor Visualisierung der AP-Aktivität wurden die Schnitte in NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 0.5 % Tween 20, 2 mM Levamisole) für 15 min inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mittels BM Purple (Roche) durchgeführt.

2.4.3 Immunhistochemie

Paraffinschnitte wurden entparaffiniert und rehydriert. Antigendemaskierung erfolgte über mehrmaliges Kochen der Schnitte in Citratpuffer (pH 6). Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden alle Schnitte in 5 % H₂O₂ in Methanol inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen, für 30 min in I-Block Blockingreagenz (Invitrogen) blockiert und über Nacht mit den primären Antikörpern bei 4 °C inkubiert. Alle verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6 Liste aller genutzten primären Antikörper.

Antigen	Katalognummer	Firma
NeuN	MAB377	Chemicon
Ki67	M7249	Dako
Pax6	Pax6	Developmental Studies Hybridoma Bank
GFP	sc-8334	Santa Cruz
Zic1	-	Labor Rosalind Segal, Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA
Cbp	LS-B3360	Biozol
BrdU	10198	Bio-Sceince Products
Gfap	Z0334	Dako
Bdnf	ab108319	Abcam
phospho-Histon H3 (Ser10)	9701	Cell Signaling Technology
cleaved Caspase3 (Asp175)	9664	Cell Signaling Technology

Anschließend wurden die Schnitte mit dem System-HRP (DAB)-Kit (Dako) nach Herstellerangaben entwickelt. Für die Visualisierung apoptotischer Zellen wurde das In situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Bei allen chromogenen Färbungen wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun als Gegenfärbung durchgeführt. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Schnitte nach Inkubation mit den primären Antikörpern in PBS gewaschen und für eine Stunde mit Spezies-spezifischen, Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern (Alexa 488 und Alexa 546, Invitrogen) inkubiert. Die Kerngegenfärbung erfolgte hierbei mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI; Roth). Für fluoreszente Färbungen von Zellkulturen kam das gleiche Protokoll wie für die Immunfluoreszenzfärbungen zum Einsatz, wobei hier die Entparaffinierung und Rehydrierung entfiel. Aufnahmen von Fluoreszenzfärbungen wurden mit einem Olympus IX50 Mikroskop oder mit einem Zeiss LSM 510 konfokalem Lasermikroskop mit dem ColorView Soft imaging System angefertigt.

2.4.4 X-Gal Färbung

Für den Nachweis der Cre-vermittelten Expression der β -Galactosidase wurde die enzymatische Katalyse von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid;

Peqlab) in ein blaues Produkt herangezogen. Für die X-Gal Färbung von intaktem Gewebe wurde das Gewebe frisch präpariert, für 20 min in PBS gewaschen und in X-Gal Lösung (2 mg/ml X-Gal, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 0.02% NP40 and 0.1% Natriumdeoxycholat in PBS) bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Nach Färbung wurde das Gewebe in 4 % Paraformaldehyd fixiert. X-Gal Färbungen auf Gewebeschnitten wurden auf Kryoschnitten von unfixiertem Gewebe durchgeführt. X-Gal Lösung wurde dafür auf die Schnitte aufgebracht, für drei Stunden inkubiert und anschließend eine Gegenfärbung mit Kernechtrot durchgeführt. Zur Kolorisierung des X-Gal Signals mit fluoreszenten Farbstoffen wurde das chromogene X-Gal Signal aus der Hellfeldaufnahme mit Hilfe der Photoshop Software (Adobe) pseudo-kolorisiert.

2.5 Humane Daten

2.5.1 Lokalisation humaner SHH-assoziiertes Medulloblastome

63 Patienten aus der HIT 2000 Studie (ClinicalTrials.gov/NCT00303810) mit einem histopathologisch bestätigtem desmoplastischen Medulloblastom und dazugehörigen Magnetresonanzenaufnahmen wurden für die Untersuchung der Tumorlokalisierung und klinischer Parameter herangezogen. Alter, Tumorlokalisierung, Metastasen- und Resektionsstatus sowie Überlebensdaten sind in Appendix Tabelle 6.2 zusammengefasst. Alle Magnetresonanzenaufnahmen wurden am Nationalen Referenzzentrum für Neuroradiologie pädiatrischer Hirntumoren (Universitätskrankenhaus Würzburg, Deutschland) von Professor Monika Warmuth-Metz gesichtet. Alle gestellten histopathologischen Diagnosen wurden am Referenzzentrum für Hirntumoren (Institut für Neuropathologie, Universitätskrankenhaus Bonn, Deutschland) von Professor Torsten Pietsch bestätigt und nach den neuesten Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert (Louis et al., 2007). Die Aufnahmen wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewertet: Lokalisation des Medulloblastoms im Hinblick auf die cerebellären Hemisphären, die Vermis, den Kleinhirnbrückenwinkel und den 4. Ventrikel, Kontakt zum Hirnstamm und hierbei vor allem zum Bereich des Nucleus cochlearis. Es wurde versucht, zwischen der Hauptlokalisierung und lokaler Ausbreitungen der Tumore zu unterscheiden. Die Magnetresonanzenaufnahmen enthielten sowohl axiale als auch sagittale T1- und T2-gewichtete Schnittfolgen, welche auf 1.5 Tesla (T) und selten auch 3 T Tomographen erstellt wurden.

2.5.2 Microarraydaten humaner SHH-assoziiierter Medulloblastome

In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg konnte unsere Arbeitsgruppe in einer Kohorte von 130 humanen Medulloblastomen mit gesicherter pathologischer Aktivierung des SHH-Signalwegs mittels genomweiter Sequenzierungen in 11 Fällen eine *CBP*-Mutation nachweisen (Appendix Abbildung 6.2, Tabelle 6.3; Kool M., Schüller U., unpublizierte Daten). Globale Genexpressionsprofile einer unabhängigen Kohorte von 122 humanen SHH-assoziierten Medulloblastomen standen über die öffentlich zugängliche R2-Datenbank (R2: microarray analysis and visualization platform) zur Verfügung (<http://r2.amc.nl>). Diese beinhaltet neben den Microarraydaten auch Überlebensdaten zu 103 der 122 Patienten mit SHH-assoziiertem Medulloblastom. Zur weiteren Analyse konnten von 5 adulten Patienten mit gesicherter *CBP*-Mutation (Appendix Abbildung 6.2) über die R2-Datenbank die globalen Genexpressionsprofile dieser Tumore herangezogen werden. Als Kontrolle dienten 15 Tumore aus adulten Patienten mit SHH-assoziiertem Medulloblastom, für die mittels genomweiter Sequenzierungen belegt werden konnte, dass sie keine *CBP*-Mutation tragen (Kool M., Schüller U., unpublizierte Daten).

2.6 Statistische Auswertungen

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Prism5.02 Software (Graphpad) durchgeführt. Zum Vergleich von Parametern zwischen Gruppen wurden die Stichprobenmengen zuerst auf Normalverteilung getestet. Folgten die Werte der Gaußschen Normalverteilung wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test durchgeführt. Lag keine Gaußsche Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Um Verteilungen zwischen zwei Gruppen auf ihre Signifikanz hin zu testen, wurde der Pearson's χ^2 Test angewendet. Überlebensraten von Mäusen und Patienten wurden mittels Kaplan-Meier Kurven analysiert. Mit Hilfe des Log-Rank-Tests wurden Überlebenskurven auf ihre Signifikanz hin untersucht. Für alle statistischen Tests wurde das Signifikanzniveau auf 5 % festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung möglicher Ursprungszellen für Shh-abhängige Medulloblastome im dorsalen Hirnstamm

3.1.1 Eine Vielzahl neuronaler Populationen im dorsalen Hirnstamm stammt von *hGFAP*⁺ und *Math1*⁺ Vorläuferzellen ab

Als Ursprungszellen für humane Medulloblastome wurden aufgrund der Lokalisation der Tumore Zellpopulationen innerhalb des Kleinhirns vermutet. Tatsächlich stammen nach derzeitigem Wissensstand Shh-abhängige Medulloblastome mit großer Wahrscheinlichkeit von Körnerzellvorläufern des Kleinhirns ab (Schüller et al., 2008). Neuere Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass das Spektrum möglicher Ursprungszellen für unterschiedliche Subgruppen des Medulloblastoms hinsichtlich Art und Lokalisation dieser Ursprungszellen breiter ist als bisher angenommen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs in neuronalen Vorläuferzellen des dorsalen Hirnstamms unter gleichzeitiger Deletion des Tumorsuppressors p53 in der Maus zu Tumoren führt, welche auf molekularer Ebene den humanen WNT-assoziierten Medulloblastomen ähneln (Gibson et al., 2010). In diesem Projekt sollte die Frage beantwortet werden, inwiefern Vorläuferpopulationen im dorsalen Hirnstamm bei der Ausbildung Shh-abhängiger Medulloblastome beteiligt sind und somit empfänglich für maligne Transformation nach konstitutiver Aktivierung des Shh-Signalwegs sind. Um diese konstitutive Aktivierung zu gewährleisten, haben wir mit dem Cre/loxP-Rekombinationssystem gearbeitet. Hierbei ist das Enzym Cre-Rekombinase *in vivo* in der Lage, von loxP-Sequenzen eingefasste, sogenannte „geflochte“ Sequenzabschnitte im Genom einer Maus auszuschneiden. Für die konstitutive Aktivierung des Shh-Signalwegs stand eine geflochte Mauslinie zur Verfügung, welche eine Cre-vermittelte, konditionelle Expression eines mutierten *Smo*-Allels (*SmoM2-YFP*) zusammen mit *YFP*-Sequenzen erlaubt (Mao et al., 2006). Die Transkription dieser Mutante wird in den geflochten Tieren durch eine von loxP-Stellen eingefasste polyA-Stopsequenz verhindert. Nach Cre-vermittelter Exzision dieser Stopsequenz kann das aktive *SmoM2*-Allel transkribiert werden, was zu einer Aktivierung des Shh-Signalwegs führt. Um die Shh-Aktivierung in geeigneten Zellpopulationen des dorsalen Hirnstamms zu ermöglichen, mussten in einem ersten Schritt Cre-Mauslinien ermittelt werden, welche die Cre-Rekombinase in Vorläuferzellen

exprimieren, die sich zu Neuronen möglichst vieler, verschiedener Kerngebiete im dorsalen Hirnstamm entwickeln.

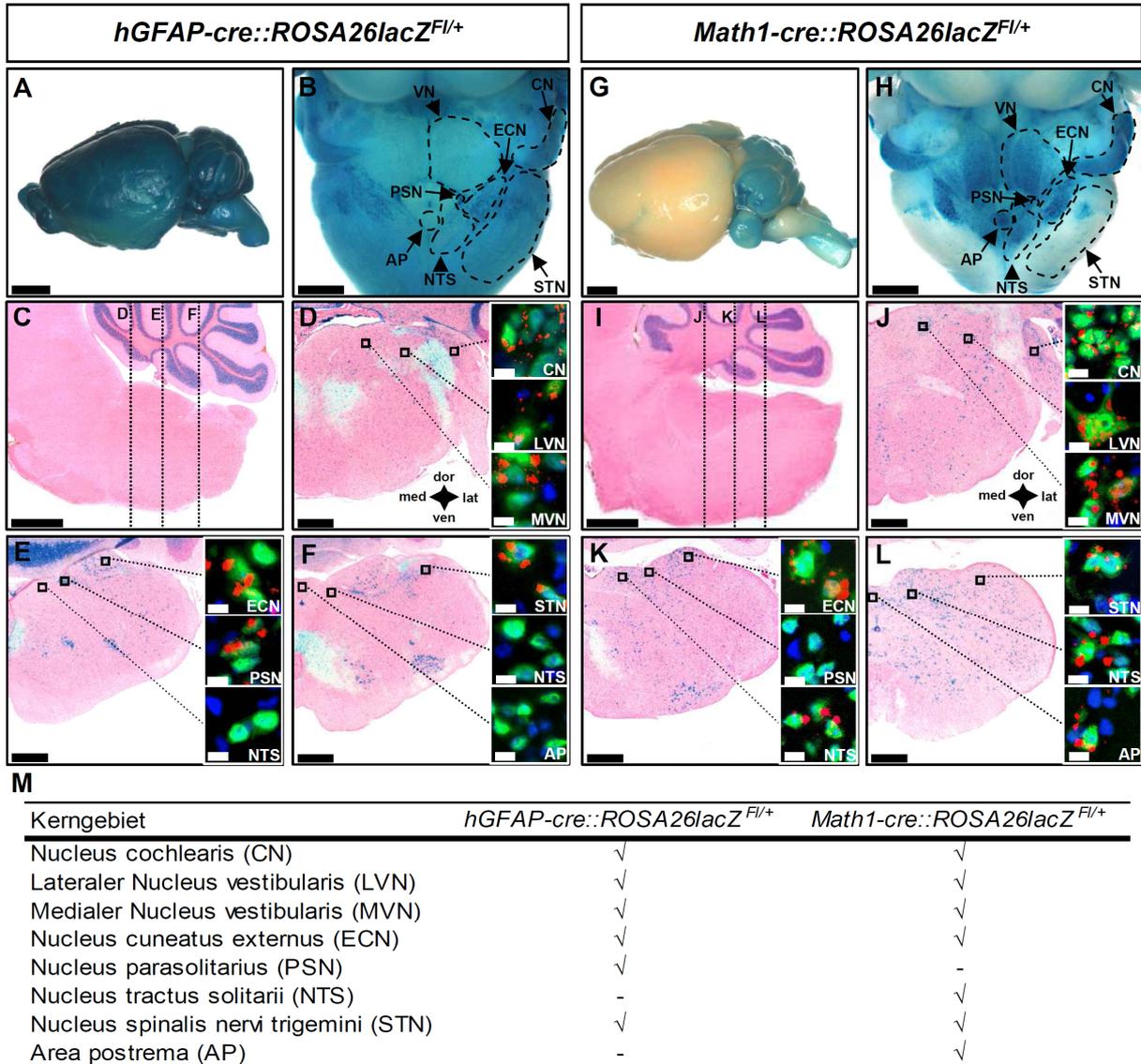


Abbildung 3.1 *hGFAP*- und *Math1*-Promotorsequenzen ermöglichen Cre-Expression in Vorläuferzellen verschiedener Neurone des dorsalen Hirnstamms. X-Gal-Färbung bestätigt erfolgreiche Rekombination an P21 in weiten Teilen des Hirns unter beiden Promotoren (A, G). Aufsicht auf den dorsalen Hirnstamm mit X-Gal-Färbung (B, H). Sagittale H&E-Schnitte im Bereich des Mittelhirns/Hirnstamms zur Orientierung (C, I). X-Gal-Färbung auf sagittalen Schnitten bestätigt erfolgreiche Rekombination durch *hGFAP*-Promotorsequenzen in Vorläuferzellen, welche Neurone in folgenden Kerngebieten bilden: dorsaler und ventraler Nucleus cochlearis (CN), Nucleus vestibularis (VN; lateral: LVN; medial: MVN), Nucleus cuneatus externus (ECN), Nucleus parasolarius (PSN) und Nucleus spinalis nervi trigemini (STN) (D - F). Ausschnitte mit Doppelfärbung bestätigen neuronalen Charakter (X-Gal: rot; NeuN: grün). (J - L) X-Gal-Färbung auf Schnitten von *Math1-cre::ROSA26lacZ^{F/+}*-Mäusen bestätigen zusätzliche Rekombination in Neuronen der Kerngebiete Nucleus tractus solitarii (NTS) und Area postrema (AP), aber fehlende Rekombination im PSN. Ausschnitte mit Doppelfärbung bestätigen neuronalen Charakter (X-Gal: rot; NeuN: grün). (M) Übersicht rekombinierter Vorläuferzellen/Neurone unter *hGFAP*- und *Math1*-Promotorsequenzen. Messbalken: 2000 μ m (A, G), 1000 μ m (B, C, H, I), 500 μ m (D-F, J-L), 5 μ m (Ausschnitte in D-F, J-L).

Hierfür wurden in einem ersten Schritt Cre-Mauslinien mit *ROSA26lacZ^{F1/F1}*-Reportermausen verpaart, deren Nachkommen nach erfolgreicher Rekombination durch die Cre-Rekombinase promotor-spezifisch das Enzym β -Galactosidase exprimieren (Soriano, 1999). Die Aktivität von β -Galactosidase konnte histologisch mittels X-Gal (5-Brom-4-chlor-indoxyl- β -D-galactopyranosid)-Färbung nachgewiesen werden. Eine Besonderheit dieses Experiments ist, dass die Rekombination am *ROSA26lacZ*-Lokus irreversibel ist, also auch alle Tochterzellen einer rekombinierten Vorläuferzelle β -Galactosidase exprimieren. Deshalb spricht man hier auch von einem „Fate mapping“-Experiment. Als erstes wurden *hGFAPcre::ROSA26lacZ^{F1/+}* Tiere generiert, da bekannt ist, dass der hGFAP-Promotor in frühen Vorläuferzellen aktiv ist, die sich zu Gliazellen und Neuronen im ganzen Hirn entwickeln (Zhuo et al., 2001). Tatsächlich zeigte die X-Gal-Färbung von Gehirnen aus *hGFAPcre::ROSA26lacZ^{F1/+}* Mäusen an P21 Cre-vermittelte Rekombination in weiten Teilen des Gehirns (Abbildung 3.1A, B). Eine detaillierte Analyse der X-Gal-Färbung offenbarte, dass es in folgenden Kerngebieten zu Cre-vermittelter Rekombination gekommen sein muss: medialer (MVN) und lateraler (LVM) Nucleus vestibularis, dorsaler und ventraler Anteil des Nucleus cochlearis (CN), Nucleus parasolarius (PSN), Nucleus cuneatus externus (ECN) und Nucleus spinalis nervi trigemini (STN) (Abbildung 3.1D – F). Mittels Co-Färbung mit NeuN, einem Marker für differenzierte Neurone, konnten wir sicherstellen, dass die rekombinierten Zellen tatsächlich Neurone waren (Abbildung 3.1D - F, Insets). Es zeigte sich jedoch, dass nur ein Teil der Neurone in einem gegebenen Kerngebiete rekombiniert waren und manche Kerngebiete wie zum Beispiel die Area postrema (AP) keine rekombinierten Zellen aufwiesen. Um weitere Zellpopulationen des dorsalen Hirnstamms abzudecken, analysierten wir eine weitere Cre-Mauslinie, welche die Cre-Rekombinase unter *Math1*-Promotorsequenzen exprimiert. Von dieser Linie war bereits bekannt, dass es zu Cre-vermittelter Rekombination in verschiedenen Kerngebieten des Hirnstamms kommt (Fujiyama et al., 2009; Landsberg et al., 2005; Machold and Fishell, 2005; Wang et al., 2005). In adulten *Math1-cre::ROSA26lacZ^{F1/+}* zeigten neben den in *hGFAPcre::ROSA26lacZ^{F1/+}* Mäusen rekombinierten Kerngebieten auch Zellen der Area postrema und der Nucleus tractus solitarii (NTS) rekombinierte Zellen, wohingegen der Nucleus parasolarius keine positiven Zellen mehr zeigte (Abbildung 3.1G – L). Auch für diese Cre-Mauslinie haben wir gezeigt, dass es sich bei den rekombinierten Zellen tatsächlich um differenzierte Neurone handelt (Abbildung 3.1J - L, Insets).

Während manche Zelltypen wie die Körnerzellen des Nucleus cochlearis in beiden Cre-Linien rekombiniert wurden, zeigten sich zwischen den von uns genutzten Cre-Mauslinien offensichtliche Unterschiede innerhalb einzelner Kerngebiete hinsichtlich der Anzahl und Gestalt der rekombinierten Zellen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *hGFAP*- und *Math1*-Promotorsequenzen Cre-vermittelte Rekombination in einer Vielzahl unterschiedlicher Neurone aller Hauptkerngebiete des dorsalen Hirnstamms ermöglichen.

3.1.2 Konstitutive Aktivierung des Shh-Signalwegs in *hGFAP*⁺ und *Math1*⁺ Vorläuferzellen führt zur Tumorentstehung im dorsalen Hirnstamm

Nachdem wir sichergestellt hatten, dass sowohl *hGFAP-cre*- als auch *Math1-cre*-Mauslinien Cre-vermittelte Rekombination in Zellen des dorsalen Hirnstamms vermitteln, sollte in einem weiteren Schritt in diesen Zellen der Shh-Signalweg konstitutiv aktiviert werden. Hierfür wurden *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{F/+}* und *Math1-cre::SmoM2-YFP^{F/+}* Mäuse generiert, in denen es in den jeweiligen Vorläuferpopulationen zur Expression einer konstitutiv aktiven Form des *Smoothed* Allels (*SmoM2-YFP*) kommt (Mao et al., 2006). Da beide hier verwendeten Cre-Mauslinien Rekombination in cerebellären Körnerzellvorläufern vermitteln, war zu erwarten, dass die Tiere Tumore entwickeln würden, die wie beschrieben von diesen Vorläuferzellen im Kleinhirn ausgehen (Heine et al., 2010; Pöschl et al., 2011; Schüller et al., 2008). Tatsächlich waren diese cerebellären Tumore in H&E-Färbungen von *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{F/+}* und *Math1-cre::SmoM2-YFP^{F/+}* Mäuse von P0 bis P21 gut sichtbar, während Kontrolltiere kein Tumore aufwiesen (Abbildung 3.2A – R; cMB: cerebelläres Medulloblastom). Interessanterweise stellten wir an P0 auch Hyperplasien im Bereich des Nucleus cochlearis im dorsalen Hirnstamm fest (Abbildung 3.2B, C, E, F; siehe auch Abbildung 1.5K). Diese Zellen schienen vermehrt zu proliferieren und nahmen einen großen Teil des Nucleus cochlearis der Tumortiere an P5 ein (Abbildung 3.2H, I, K, L; hMB: Hirnstamm Medulloblastom). In adulten Tumortieren war der Hirnstammtumor signifikant größer und infiltrierte bereits angrenzende Bereiche des Hirnstamms (Abbildung 3.2N, O, Q, R). Die Tumore zeigten in H&E-Färbungen dicht gepackte Zellen mit einem klein-, blau-, und rundzelligem Erscheinungsbild, was dem Phänotyp humaner SHH-Medulloblastome ähnelt (Vergrößerungen in Abbildung 3.2Q, R). Hinsichtlich der Lokalisation und Histologie konnten keine Unterschiede zwischen den Hirnstammtumoren ausgehend

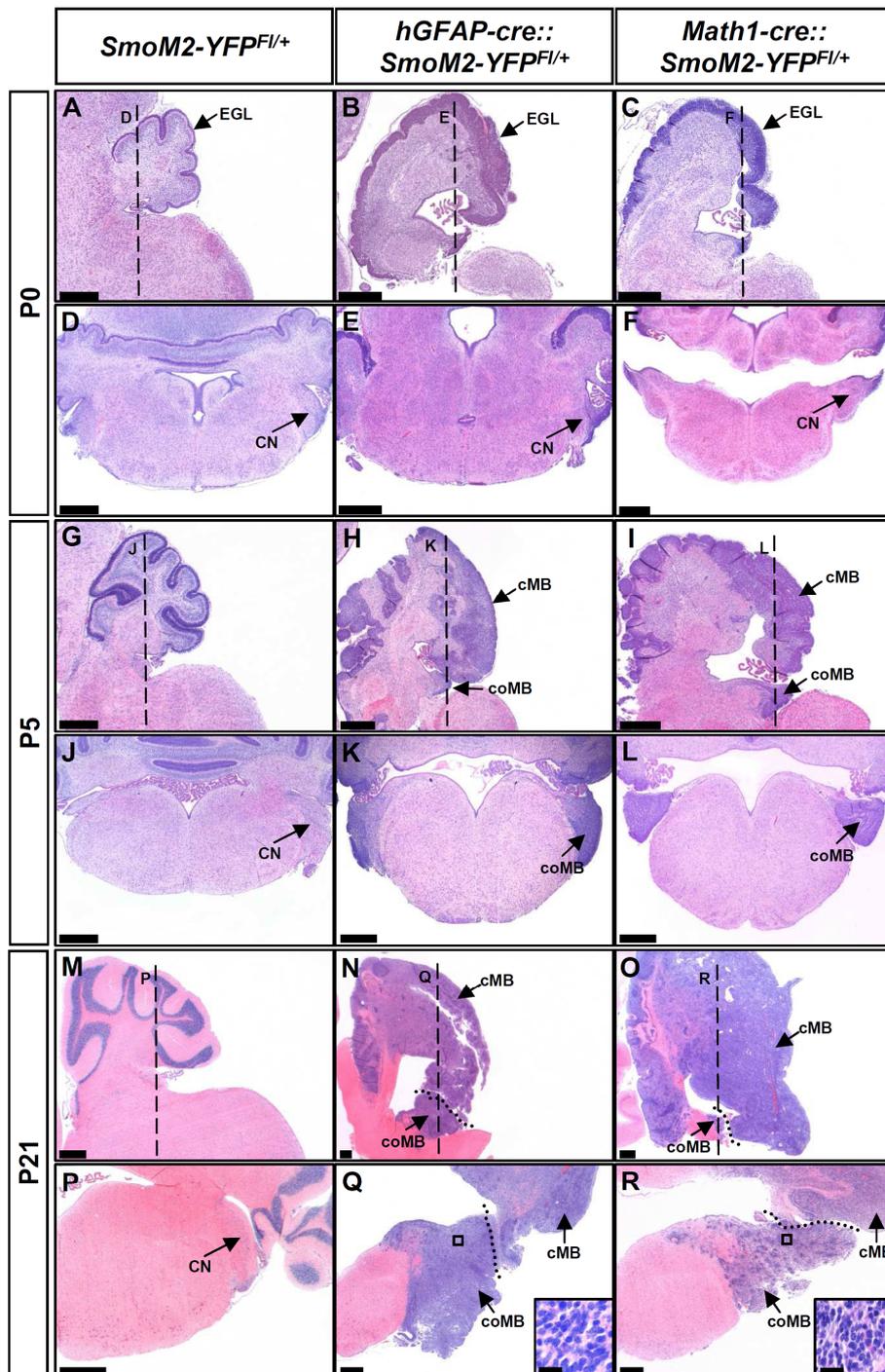


Abbildung 3.2 Medulloblastomentwicklung im Cerebellum und Nucleus cochlearis durch konstitutive Aktivierung des Shh-Signalwegs. *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{Fl/+}* und *Math1-cre::SmoM2-YFP^{Fl/+}* Mäuse zeigen an P0 Hyperzellularität im Bereich der cerebellären äußeren Körnerzellschicht (EGL) und im Nucleus cochlearis (CN) im Vergleich zu Kontrolltieren (**A - F**). An P5 sind cerebelläre (cMB) und cochleäre Medulloblastome (coMB) in beiden Tumorausmodellen gut zu unterscheiden (**G - L**). An P21 zeigen die Tumore eine klare Raumforderung und diffuse Infiltration des umliegenden Gewebes (**M - R**). Alle Bilder zeigen H&E-Färbungen von sagittalen (**A - C, G - I, M - O**) oder horizontalen (**D - F, J - L, P - R**) Gewebeschnitten. Gestrichelte Linien in **A - C, G - I, M - O** verdeutlichen die Ebene des darunterliegenden Horizontalschnitts. Gepunktete Linien in **N, O, Q, und R** stellen die Grenzlinie zwischen cerebellären und cochleären Tumoren dar. **P, Q und R** zeigen Halbschnitte des Hirnstamms (lateral auf der rechten Bildseite). Messbalken: 500 μ m (**A - R**), 5 μ m (Inset in **Q, R**).

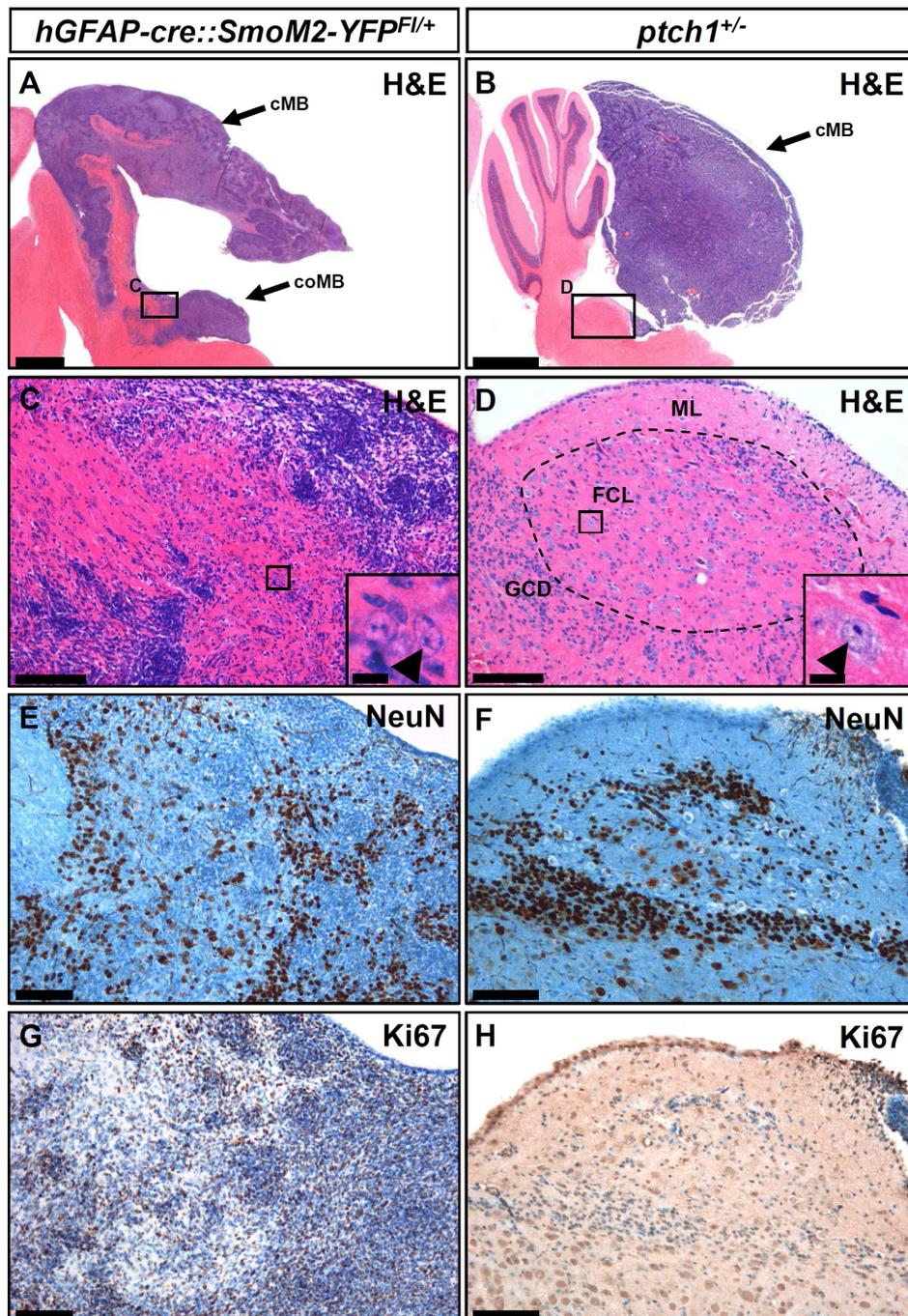


Abbildung 3.3 Medulloblastome im Nucleus cochlearis repräsentieren unabhängige Neoplasien. H&E-Färbungen von Sagittalschnitten von adulten *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{Fl/+}* und *ptch1^{+/-}* Mäusen zeigen massive Tumore im Cerebellum beider Tumormausmodelle (A - B). Tumorentstehung im Nucleus cochlearis (CN) ist jedoch nur in *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{Fl/+}* Mäusen zu beobachten, während die Struktur des CN in *ptch1^{+/-}* Mäusen einschließlich der Molekularschicht (ML), der Pyramidenschicht (FCL) und der Körnerzelldomäne (GCD) unauffällig erscheint (C - D). Pfeilspitzen zeigen Golgizellen zwischen Tumorzellen im CN (C) und die FCL (D), welche mit einer gestrichelten Linie eingerahmt wurde. Die Expression von NeuN verdeutlicht die Störung der Struktur in *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{Fl/+}* Mäusen, während die laminare Struktur in *ptch1^{+/-}* Mäusen erhalten ist (E - F). Ki67-Färbung zeigt eine hohe Proliferationsrate im CN von *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{Fl/+}* Mäusen (G). Im Gegensatz dazu kann keine Proliferation im CN von *ptch1^{+/-}* Mäusen nachgewiesen werden (H). Messbalken: 1000 μm (A, B), 100 μm (C - H), 10 μm (Inset in C, D).

von *hGFAP*⁺ oder *Math1*⁺ Vorläuferzellen ausgemacht werden. Obwohl wir zeigen konnten, dass die von uns genutzten Cre-Mauslinien eine Rekombination in Neuronen des Nucleus cochlearis vermitteln, erschien es aufgrund der anatomischen Lage möglich, dass die beobachteten Tumore im dorsalen Hirnstamm lediglich von Infiltrationen der cerebellären Tumormasse abstammen. Um diese Möglichkeit auszusräumen, haben wir Gehirne von adulten *hGFAP-cre::SmoM2-YFP*^{F/+} und *ptch1*^{+/-} Mäusen verglichen. *Ptch*^{+/-} Mäuse stellen ein gut etabliertes Mausmodell für Shh-abhängige Medulloblastome dar (Goodrich et al., 1997). In diesem Mausmodell kommt es aufgrund des spontanen Verlustes des zweiten *ptch1* Allels in Körnerzellvorläufern zur Ausbildung von Medulloblastomen mit einem Shh Profil. Da diese Tumorbildung spontan abläuft und nicht Promotor-spezifisch in allen *Math1*⁺ Zellen induziert wird, sollten in diesen Mäusen nur lokal begrenzte Tumore entstehen. Es sollte nun untersucht werden, ob *ptch*^{+/-} Mäuse mit einer großen Tumormasse im Kleinhirn mit Kontakt zum Hirnstamm eine Infiltration des Nucleus cochlearis aufweisen. Obwohl sowohl *hGFAP-cre::SmoM2-YFP*^{F/+} als auch *ptch1*^{+/-} Mäuse große Tumore im Cerebellum aufzeigten (Abbildung 3.3A, B), konnten wir nur in *hGFAP-cre::SmoM2-YFP*^{F/+} Tieren Tumorzellen im Nucleus cochlearis identifizieren (Abbildung 3.3C). Während die cochleäre Struktur in *hGFAP-cre::SmoM2-YFP*^{F/+} Tieren durch die Tumorbildung massiv gestört war, konnten wir in *ptch1*^{+/-} Mäusen die normale Struktur des Nucleus cochlearis identifizieren (Abbildung 3.3D). Weiterführende Färbungen differenzierter Neurone mit NeuN bestätigten die Störung der laminaren Struktur des Nucleus cochlearis in unserem Tumormodell im Gegensatz zu dem *ptch1*^{+/-} Tumormodell (Abbildung 3.3E, F) (Browner and Baruch, 1982). Ebenso konnten wir eine große Anzahl Ki67⁺ proliferierender Zellen im Nucleus cochlearis von *hGFAP-cre::SmoM2-YFP*^{F/+} Tieren detektieren (Abbildung 3.3G), während keine Teilungsaktivität im Nucleus cochlearis des *ptch1*^{+/-} Tumormodells beobachtet wurde (Abbildung 3.3H). Wir schließen daraus, dass die konstitutive Aktivierung des Shh-Signalwegs sowohl in Körnerzellvorläufern des Cerebellums als auch in *hGFAP*⁺/*Math1*⁺ Vorläuferzellen des Nucleus cochlearis zur Ausbildung von Medulloblastomen führt.

3.1.3 Die Entstehung Shh-abhängiger Medulloblastome im Nucleus cochlearis der Maus beeinträchtigt das Hörvermögen

Da durch die Tumorentstehung im dorsalen Hirnstamm die Struktur des Nucleus cochlearis massiv gestört wird und dieses Kerngebiet ein Teil der Hörbahn ist, haben

wir in einem nächsten Schritt überprüft, inwiefern die Tumorentstehung die auditorische Wahrnehmung der Mäuse beeinträchtigt. Dafür haben wir mittels Hirnstammaudiometrie das Hörvermögen adulter Tumortiere mit Kontrolltieren verglichen. Als Maß für das Hörvermögen der Tiere wurde hierbei der Schalldruckpegel bestimmt, der für die Induktion eines akustisch evozierten Potentials (AEP) ausreichend war. Wie in Abbildung 3.4 gezeigt war in *Math1-cre::SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren (n = 3) im Vergleich zu Kontrolltieren (n = 3) ein signifikant höherer Schalldruckpegel erforderlich, um ein AEP auszulösen. Wir schließen daraus, dass die Entstehung Shh-abhängiger Medulloblastome im Nucleus cochlearis die Funktionalität dieses Kerngebiets beeinträchtigt und dadurch das Hörvermögen dieser Tumortiere signifikant vermindert wird.

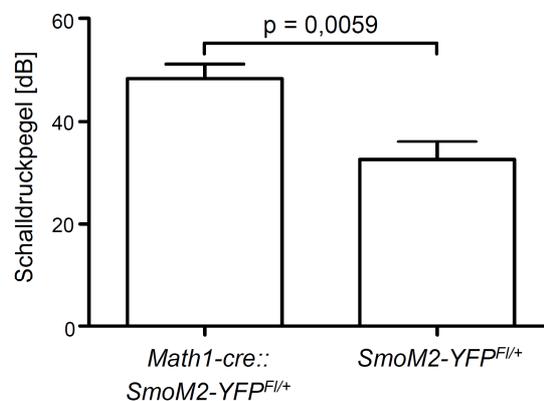


Abbildung 3.4 Die Entstehung Shh-abhängiger Medulloblastome im Nucleus cochlearis ist mit einer Verminderung des Hörvermögens assoziiert. Der für ein akustisch evoziertes Potential im Hirnstamm erforderliche Schalldruckpegel ist in *Math1-cre::SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren (n = 3) im Vergleich zu Kontrolltieren (n = 3) signifikant erhöht. Die Hörschwellenbestimmung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Catalina Meßmer (Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Universitätsklinikum Großhadern) durchgeführt.

3.1.4 Körnerzellvorläufer des Nucleus cochlearis als Ursprungszellen für murine Shh-abhängige Medulloblastome

Da der Nucleus cochlearis aus mehreren Neuronentypen besteht (Browner and Baruch, 1982), sollte nun die genaue Ursprungszelle für die von uns beobachteten Shh-abhängigen Medulloblastome im dorsalen Hirnstamm bestimmt werden. Hierfür haben wir im Detail den Nucleus cochlearis von neugeborenen (P0) *hGFAP-cre::ROSA^{lacZ}^{F/+}* Mäusen mittels Fate mapping-Experimenten und der Kombination verschiedener zell-spezifischer Marker analysiert. In *hGFAP-cre::ROSA^{lacZ}^{F/+}* Mäusen kolokalisierte X-Gal mit dem Transkriptionsfaktor Pax6 (Abbildung 3.5A – D),

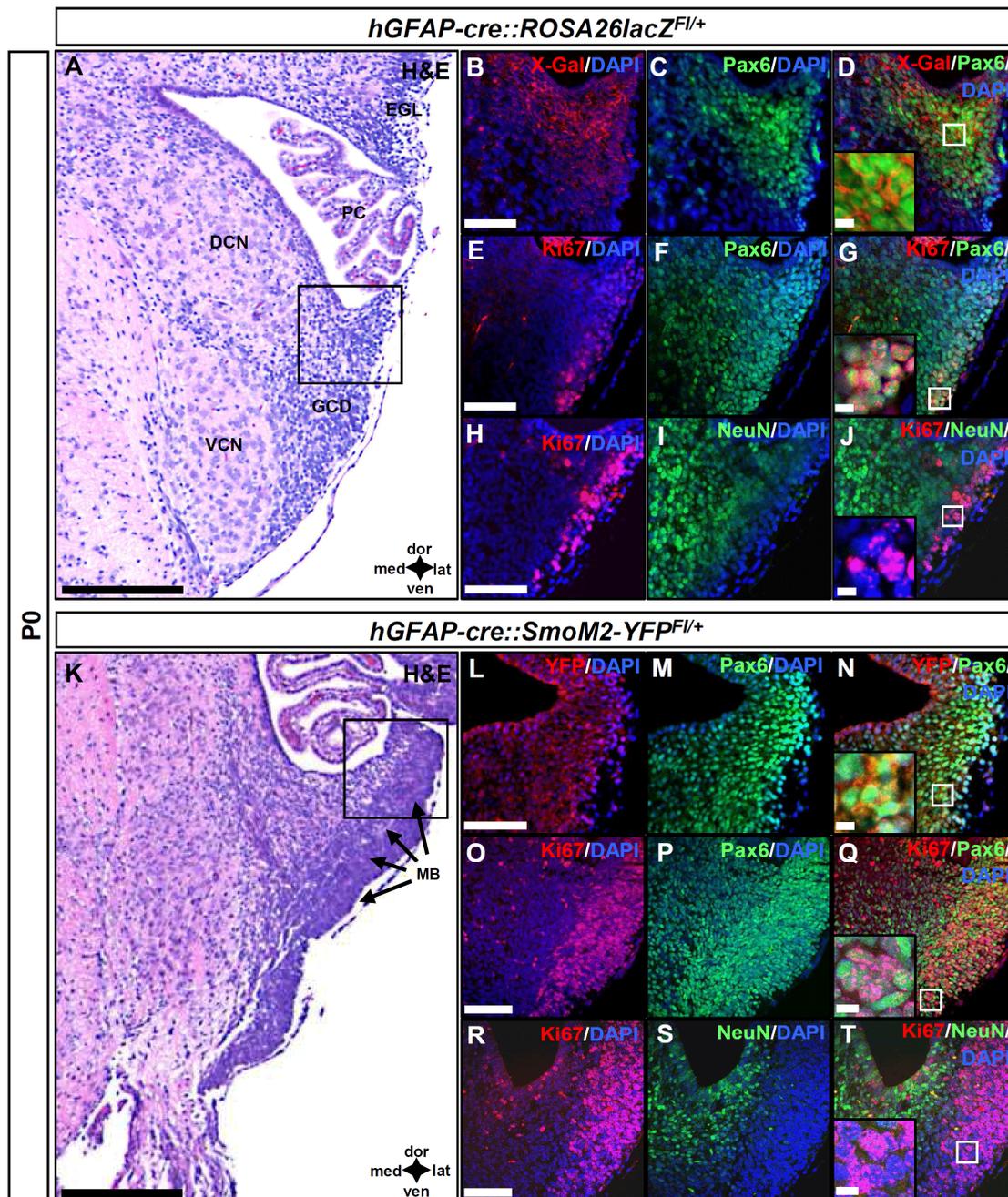


Abbildung 3.5 Körnerzellvorläufer des Nucleus cochlearis sind der Ursprung für Shh-abhängige Medulloblastome. H&E-Färbung eines Horizontalschnittes auf Höhe des Nucleus cochlearis (CN) an P0 zeigt Körnerzellvorläufer, die von der unteren Rautenlippe abstammen und die Körnerzelldomäne (GCD) bilden, welche den dorsalen (DCN) vom ventralen Nucleus cochlearis (VCN) trennt (A). Diese Körnerzellen sind lokal klar abgegrenzt von cerebellären Körnerzellen in der äußeren Körnerzellschicht (EGL). Eine X-Gal-Färbung in *hGFAP-cre::ROSA26lacZ^{Fl/+}* Mäusen zeigt, dass Körnerzellen des CN von *hGFAP⁺* Vorläufern abstammen (B, D), positiv für Pax6 sind (C, D, F, G) und zu einem geringen Anteil Ki67 exprimieren (E, G). Wie erwartet zeigen reife, NeuN⁺ Zellen innerhalb des CN keine Proliferation (H - J). Im Gegensatz dazu zeigt der CN von *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{Fl/+}* Mäusen eine stark erhöhte Zellzahl in der GCD (K). Diese Tumorzellen (Medulloblastom MB) exprimieren alle Pax6 (M, N) und weisen eine Aktivierung des Shh-Signalwegs auf, was durch die Visualisierung der eingeführten *Smoothened* Mutante (SmoM2-YFP) gezeigt ist (L, N). Tatsächlich exprimiert die absolute Mehrheit der proliferierenden Zellen Pax6 (O - Q), jedoch kein NeuN (R - T). Messbalken: 250 μ m (A, K), 100 μ m (B - D, E - G, H - J, L - N, O - Q, R - T), 5 μ m (Insets in G, G, J, N, Q, T).

von welchem bekannt ist, dass er in Körnerzellen des Nucleus cochlearis exprimiert wird (Fujiyama et al., 2009). Dies zeigt, dass Körnerzellen des Nucleus cochlearis von *hGFAP*⁺ Vorläuferzellen abstammen und somit in unserem Mausmodell der Ursprung für die Shh-abhängigen Tumore sein können. In diesem Entwicklungsstadium proliferierte in *hGFAP-cre::ROSAlacZ^{F/+}* Mäusen nur eine geringe Anzahl Pax6⁺ Zellen, was durch Kolo-kalisation mit Ki67 gezeigt werden konnte (Abbildung 3.5E – G). Im Gegensatz dazu waren die meisten Zellen NeuN⁺ und exprimierten kein Ki67, was deren erfolgreiche Differenzierung zeigte (Abbildung 3.5H – J). Es lässt sich zusammenfassen, dass mit dem *hGFAP*-Promotor Körnerzellvorläufer des Nucleus cochlearis getroffen werden und die daraus entstehenden Körnerzellen an P0 zu einem großen Teil bereits ausdifferenziert sind. Im Vergleich dazu wurde der Nucleus cochlearis von *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren während der frühen Tumorentwicklung an P0 analysiert (Abbildung 3.5K – T). Hierbei konnte zuerst bestätigt werden, dass der Tumor im Nucleus cochlearis keinen Kontakt zur Tumormasse im Cerebellum hatte, was den unabhängigen Ursprung dieses Tumors verifizierte (Abbildung 3.5K). In einem weiteren Schritt konnten wir durch die Visualisierung des mutierten Smoothened Proteins (SmoM2-YFP) nachweisen, dass der Shh-Signalweg in Pax6⁺ Körnerzellen der Körnerzell-domäne des Nucleus cochlearis tatsächlich aktiviert ist (Abbildung 3.5L – N). Zuletzt war die frühe Tumorentstehung in *hGFAP-cre::SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren durch einen starken Proliferationsanstieg von Pax6⁺ Zellen und einer massiven Expansion der Pax6⁺ Zellpopulation charakterisiert (Abbildung 3.5O – Q). Im Gegensatz dazu war die Anzahl NeuN⁺/Ki67⁻ Zellen im medial-liegenden Bereich des Nucleus cochlearis im Vergleich zu Kontrolltieren stark vermindert (Abbildung 3.5R – T). Wir schließen daraus, dass die Entstehung Shh-abhängiger Medulloblastome im dorsalen Hirnstamm ihren Ursprung in Pax6⁺ Vorläufern der Körnerzellen des Nucleus cochlearis hat.

In den bisher beschriebenen Experimenten konnten wir zeigen, dass die konstitutive Aktivierung des Shh-Signalwegs in Körnerzellvorläufern sowohl des Cerebellums als auch des Nucleus cochlearis zur Bildung von Medulloblastomen führt. Dies wirft die Frage auf, inwieweit sich diese zwei verschiedenen Tumortypen unterscheiden. Um diese Frage zu beantworten, haben wir in einem ersten Schritt die Expression verschiedener Marker für beide von uns genutzten Tumormausmodelle sowohl in cerebellärem als auch cochleärem Tumorgewebe analysiert. Alle genannten Tumore

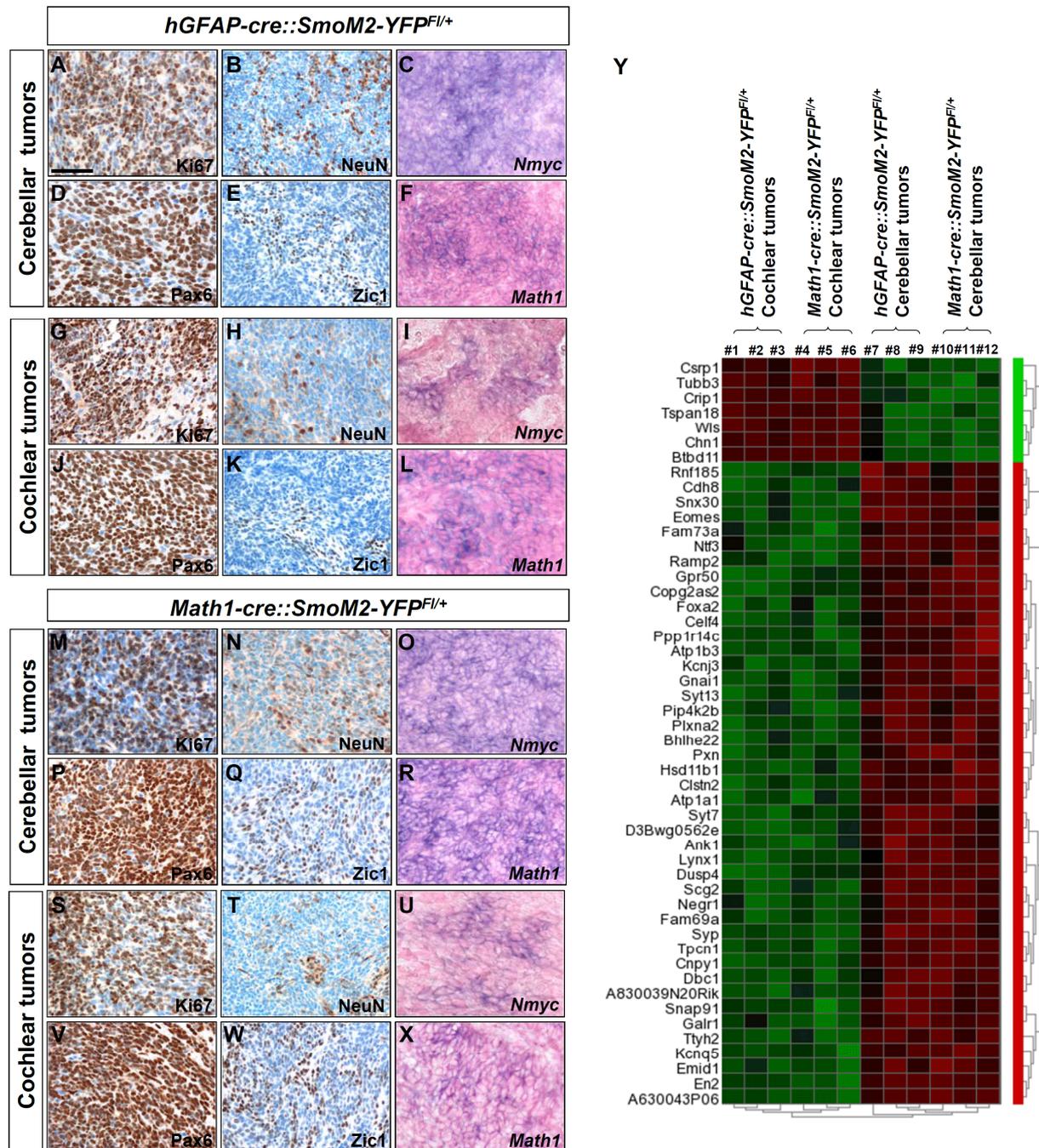


Abbildung 3.6 Shh-abhängige Medulloblastome unterschiedlichen Ursprungs zeigen distinkte Genexpressionsprofile. Alle untersuchten Tumore weisen eine vergleichbare Proliferationsrate von etwa 50% auf (A, G, M, S) und zeigen ein ähnliches Maß an neuronaler Differenzierung was durch Färbung neuronaler Marker wie NeuN (B, H, N, T), Pax6 (D, J, P, V) und Zic1 (E, K, Q, W) illustriert ist. Die Expression von *Nmyc* lässt eine Aktivierung des Shh-Signalwegs in allen Tumoren vermuten (C, I, O, U). Als letztes ist auch die Expression von *Math1*, welche einen Ursprung in der Rautenlippe belegt, in allen Tumoren zu beobachten (F, L, R, X). Während die Analyse dieser Marker keinen Unterschied vermuten lässt, zeigt die Microarray Untersuchung unterschiedliche globale Genexpressionsprofile in cerebellären und cochleären Medulloblastomen (Y). Die 50 am signifikantesten differentiell exprimierten Gene sind in einer Heatmap dargestellt. Die Microarrayanalyse und deren Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Marcel Kool vom Deutschen Krebsforschungszentrum (Heidelberg) durchgeführt. Messbalken: 50 µm (in A, gültig für A - X).

zeigten eine vergleichbare Expression an Markern für Proliferation (Ki67 in Abbildung 3.6A, G, M, S), neuronale Abstammung (NeuN in Abbildung 3.6B, H, N, T; Pax6 in Abbildung 3.6D, J, P, V; Zic1 in Abbildung 3.6E, K, Q, W) und Shh Aktivität (*Nmyc* in Abbildung 3.6C, I, O, U). Außerdem zeigten alle Tumore ein vergleichbares Level an *Math1* mRNA, was für alle Tumore einen Ursprung in der Rautenlippe nahelegt (Abbildung 3.6F, L, R, X). Da die Expressionslevel der genannten Marker keine offensichtlichen Unterschiede für die verschiedenen Tumorgewebe offenbarten, haben wir in einem Folgeschritt mittels Microarray-Analyse die globalen Genexpressionsprofile der beiden Tumortypen untersucht. Hierbei konnten wir zeigen, dass unabhängig vom genutzten Tumormausmodell im Vergleich zwischen cerebellären und cochleären Tumorgewebe insgesamt 205 Gene signifikant ($p < 0.01$) differentiell exprimiert wurden (Heatmap der Top 50 signifikant regulierten Gene in Abbildung 3.6Y; Übersicht aller 205 Gene in Appendix Tabelle 6.1). Die klare Einteilung der cerebellären und cochleären Shh-abhängigen Tumore anhand der differentiell exprimierten Gene zeigt nochmals, dass zwei verschiedene Arten von Vorläuferzellen in der Rautenlippe, nämlich für cerebelläre Körnerzellen und für Körnerzellen des Nucleus cochlearis, empfänglich für onkogene Transformation nach konstitutiver Aktivierung des Shh-Signalwegs sind.

3.1.5 Körnerzellvorläufer des Nucleus cochlearis als mögliche Ursprungszellen für humane SHH-assozierte Medulloblastome

In einem nächsten Schritt sollte die Bedeutung der von uns im Mausmodell erhobenen Daten für humane SHH-assozierte Medulloblastome genauer untersucht werden. Hierfür wurde für eine Kohorte von humanen SHH-assozierten Medulloblastomen mittels Magnetresonanztomographie-Aufnahmen die genaue Lokalisation innerhalb der hinteren Schädelgrube in Bezug auf das Kleinhirn und die Nähe zum Nucleus cochlearis bestimmt. Die Analyse wurde hierbei auf Medulloblastome mit desmoplastischer Histologie beschränkt, da in dieser histologischen Subgruppe Medulloblastome mit einem SHH-Profil stark überrepräsentiert sind (Cho et al., 2011; Kool et al., 2008a; Northcott et al., 2011b; Remke et al., 2011; Thompson et al., 2006). In der von uns untersuchten Kohorte humaner desmoplastischer Medulloblastome ($n = 63$) wuchsen 25 Tumore (40%) in den cerebellären Hemisphären und 30 Tumore (41.5%) in der cerebellären Mittellinie (Vermis) (Abbildung 3.7A; Appendix Tabelle 6.2). Die übrigen untersuchten Tumore (12%) beinhalteten sowohl Strukturen der Mittellinie als auch der Hemisphären des

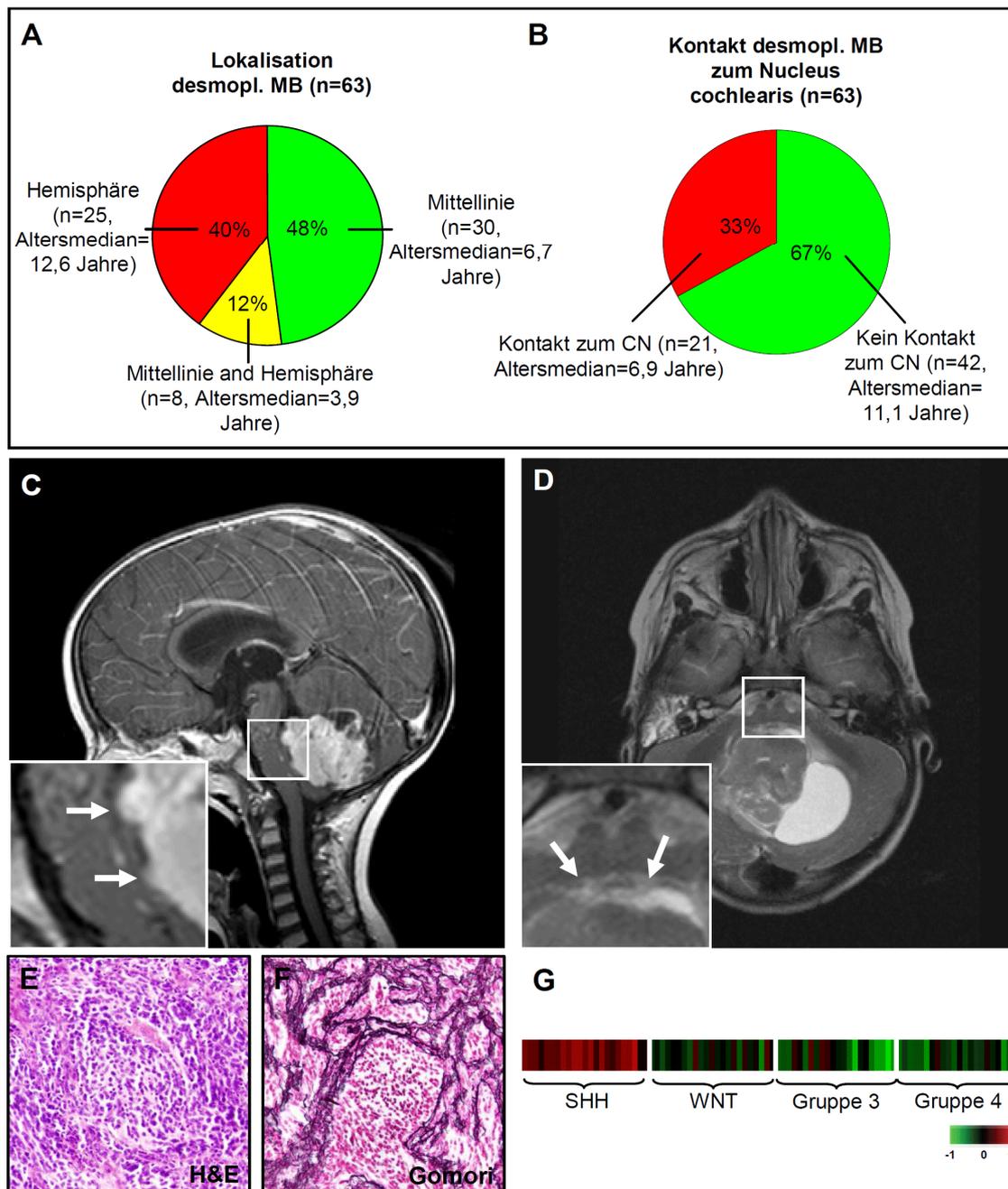


Abbildung 3.7 Lokalisation humaner desmoplastischer Medulloblastome. Die Neuroradiologie belegt unterschiedliche Hauptlokalisationen innerhalb unserer Tumorkohorte (n = 63): 40% in cerebellären Hemisphären, 48% in der Mittellinie und 12% sowohl in Mittellinie als auch in den Hemisphären (A). Während für 67% (n = 42) der Tumore kein Kontakt zum Nucleus cochlearis (CN) ausgemacht werden konnte, haben 33% (n = 21) der desmoplastischen Medulloblastome einen klaren Kontakt zum CN (B). Als repräsentatives Beispiel sind Magnetresonanztomographie-Aufnahmen eines 2 Jahre alten Jungen gezeigt (C, D). Hierbei hat der Tumor einen klaren Kontakt zum CN (Pfeile in C, D). H&E-Färbungen und Gomori-Versilberungen belegen die typische desmoplastische Struktur mit intratumoralen Noduli und internodulären Reticulinfasern (E, F). Das globale Genexpressionsprofil dieses Tumors zeigt konstitutive Aktivierung des SHH-Signalwegs (G). Die Begutachtung und Auswertung der Magnetresonanzaufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Frau Professor Monika Warmuth-Metz vom Nationalen Referenzzentrum für pädiatrische Hirntumoren (Abteilung für Neuroradiologie, Universitätskrankenhaus Würzburg, Deutschland) durchgeführt. Die Bestätigung eines SHH-Profiles mittels Microarrayanalyse für den in C - G gezeigten Tumor wurde in Zusammenarbeit mit dem DKFZ (Heidelberg) durchgeführt.

Kleinhirns (Abbildung 3.7A; Appendix Tabelle 6.2). Patienten, deren Tumore auf die cerebellären Hemisphären beschränkt waren, hatten einen Altersmedian von 12,6 Jahren, wohingegen Patienten mit einem Mittellinien-Medulloblastom einen Altersmedian von 6,7 Jahren und Patienten mit einem Mittellinien/Hemisphären-Medulloblastom einen Altersmedian von 3,9 Jahren hatten (Abbildung 3.7A). In der gesamten Tumorkohorte konnte in 21 Patienten (33%) ein Kontakt des Medulloblastoms zum Nucleus cochlearis festgestellt werden, während die Tumore von 42 Patienten (67%) keinen Kontakt zum Areal des Nucleus cochlearis aufwiesen (Abbildung 3.7B, Appendix Tabelle 6.2). Innerhalb der Tumorgruppe mit Kontakt zum Nucleus cochlearis (n = 21) zeigten 19 Tumore eine Hauptlokalisation ausschließlich in der Mittellinie oder in der Mittellinie mit Anteilen der cerebellären Hemisphären auf. Nur 2 Medulloblastome mit cochleärem Kontakt waren hauptsächlich in den Hemisphären lokalisiert. Darüber hinaus zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung der Patienten, wenn diese anhand des Kriteriums des cochleären Kontakts des Medulloblastoms in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Während die Patientengruppe mit Nucleus cochlearis-assoziierten Tumoren einen Altersmedian von 6,9 Jahren hatte, lag dieser bei der Vergleichsgruppe bei 11,1 Jahren. Folglich zeigte die Gesamtaltersverteilung in diesen beiden Gruppen einen hoch-signifikanten Unterschied ($p \leq 0,0001$). Hierbei lag das Inzidenzmaximum für Tumore mit Kontakt zum Nucleus cochlearis im Kindesalter, während im Gegensatz dazu Tumore ohne Kontakt zum Nucleus cochlearis meistens bei jungen Erwachsenen vorkamen (Appendix Abbildung 6.1A). Die Analyse weiterer klinischer oder pathologischer Parameter wie Überleben, Metastasen- und Resektionsstatus konnte keine weiteren signifikanten Unterschiede in den zwei definierten Patientengruppen aufzeigen (Appendix Abbildung 6.1B - D). In Abbildung 3.7 sind exemplarisch sagittale (Abbildung 3.7C) und axiale (Abbildung 3.7D) Magnetresonanztomographie-Aufnahmen eines Medulloblastompatienten gezeigt, in welchen der Tumor hauptsächlich in der Mittellinie des Kleinhirns lokalisiert war und einen klaren Kontakt zum Nucleus cochlearis aufgewiesen hat. Die histologische Analyse des Tumorgewebes dieses Patienten bestätigte in H&E-Färbungen das typische desmoplastische Erscheinungsbild mit Inseln differenzierter Zellen mit geringem Proliferationspotential und Reticulin-reiche, internoduläre Bereiche (Abbildung 3.7E, F). Darüber hinaus bestätigten verfügbare Microarray-Daten für dieses Medulloblastom, dass es sich hierbei tatsächlich um ein Medulloblastom mit SHH-

Profil handelte. Dies konnte im Speziellen durch die Hochregulation von 25 Markergenen bestätigt werden, deren spezifische Expression für humane SHH-assoziierte Medulloblastome beschrieben wurde (Abbildung 3.7G) (Kool et al., 2008a). Im Gegensatz dazu zeigte der Tumor keine signifikante Hochregulation von Markergenen für die restlichen drei Subgruppen humaner Medulloblastome. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine Subgruppe humaner SHH-assoziiierter Medulloblastome einen klaren Kontakt zum Nucleus cochlearis aufzeigt. Dies lässt vermuten, dass zusätzlich zu cerebellären Körnerzellvorläufern auch Körnerzellvorläufer des Nucleus cochlearis im dorsalen Hirnstamm als Ursprungszellen für humane SHH-assoziierte Medulloblastome fungieren können.

3.2 Der Einfluss von *CBP*-Mutationen auf die Entwicklung SHH-assoziiierter Medulloblastome

3.2.1 Der chronische Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellen führt zu erhöhter Apoptose und Migrationsdefekten

Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen belegen, dass CBP im humanen Medulloblastom vermehrt potentiell inaktivierende Mutationen aufweist (Jones et al., 2012; Robinson et al., 2012). Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zeigen, dass innerhalb der SHH-assoziierten Medulloblastome *CBP*-Mutationen fast ausschließlich in erwachsenen Patienten auftreten (Appendix Abbildung 6.2A, Tabelle 6.3). Zumindest für Medulloblastome der SHH-Subgruppe vermutet man, dass sie unter anderem von cerebellären Körnerzellvorläufern abstammen (Schüller et al., 2008) (vergleiche hierzu Kapitel 3.1). In diesem Projekt sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit der Verlust von murinem Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern bei der Entwicklung von Shh-abhängigen Medulloblastomen in der Maus eine Rolle spielt. Hierfür haben wir mit dem Cre/loxP-Rekombinationssystem gearbeitet, da ein Mausmodell zur Verfügung steht, welches eine konditionelle Deletion von Cbp ermöglicht (Zhang et al., 2004). In diesem Mausmodell wurde das Exon 2 der CREB-Bindungsdomäne von loxP-Sequenzen eingeschlossen, was eine Cre-vermittelte Exzision dieses DNA-Fragments erlaubt. Die Deletion von Exon 2 führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon im offenen Leseraster am Anfang von Exon 3. In der Folge wird nur noch ein N-terminales Fragment des Cbp-Proteins translatiert, welches C-terminal mit zwei für Cbp neuen Aminosäuren an Position 523 endet (auch bezeichnet als Cbp^{stop523}; in dieser Arbeit als Cbp-Knockout bezeichnet). Das entstehende verkürzte Cbp-Protein hat wichtige Proteindomänen wie die CREB-Bindungsdomäne, die Bromodomäne und die Acetyltransferase-Domäne verloren und weist Ähnlichkeiten mit in RTS-Patienten und Medulloblastompatienten gefundenen *CBP*-Allelen auf (Jones et al., 2012; Petrij et al., 1995; Robinson et al., 2012) (Appendix Abbildung 6.2B). Insofern ist es vermutlich in der Lage, die in diesen Patienten vorhandenen pathologischen Mechanismen zu imitieren.

Um die Bedeutung der Cbp Expression für die Entwicklung der cerebellären Körnerzellen zu untersuchen, haben wir in einem ersten Schritt untersucht, zu welchen Zeitpunkten während der murinen Entwicklung Cbp in diesem neuronalen

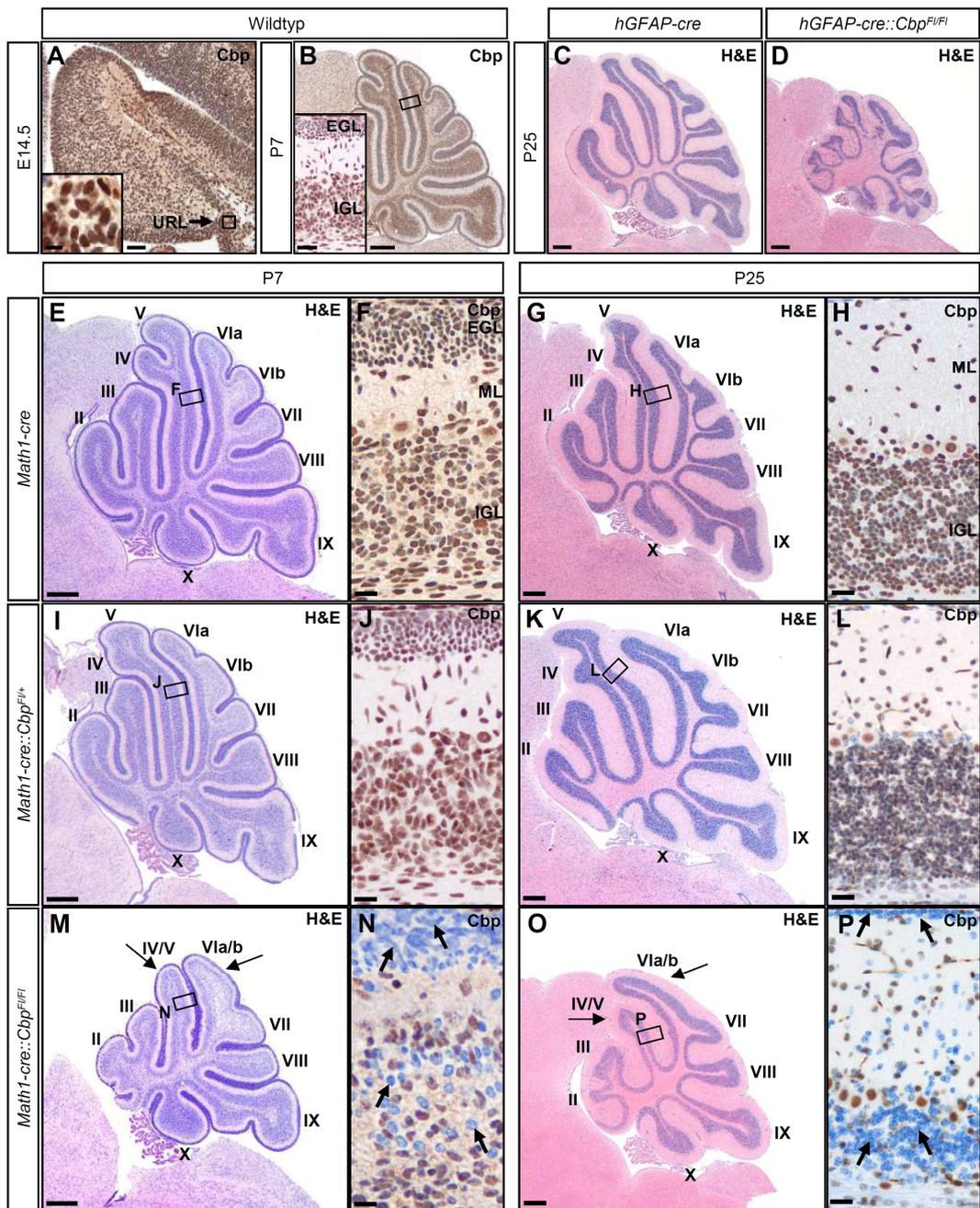


Abbildung 3.8 Chronischer Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern führt zu cerebellärer Hypoplasie. Cbp wird in Vorläuferzellen der oberen Rautenlippe und der äußeren Körnerzellschicht und in reifen Körnerzellen des Cerebellums exprimiert (A, B). Deletion von Cbp in frühen Vorläuferzellen mittels *hGFAP*-Promotorsequenzen führt zu einer Verkleinerung des Kleinhirns (C, D). Analyse H&E-gefärbter Sagittalschnitte an P7 und P25 bestätigt cerebelläre Hypoplasie und eine Störung der Lobulierung des cerebellären Kortex in *Math1-cre::CBP^{F1/F1}* im Vergleich zu *Math1-cre::CBP^{F1/+}* und *Math1-cre* Kontrolltieren (E, G, I, K, M, O; Pfeile in M und O verdeutlichen fehlende Fissuren und daraus folgende Fusion verschiedener Lobuli). Die Immunhistochemie für Cbp bestätigt den erfolgreichen Knockout von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern (F, H, J, L, N, P; Pfeile in N und P zeigen CBP-negative Körnerzellen) in *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren. EGL: äußerer Körnerzellschicht, IGL: innere Körnerzellschicht, ML: Molekularschicht, PCL: Purkinje-Zellschicht, URL: obere Rautenlippe, WM: weiße Substanz. V - IX: Lobuli V - IX. Messbalken: 500 μ m (B, C, D, E, G, I, K; M, O), 100 μ m (A), 50 μ m (Inset in B), 25 μ m (F, J, N), 15 μ m (H, L; P), 10 μ m (Inset in A).

Zelltyp exprimiert wird. Hierfür wurden Sagittalschnitte von Wildtyp-Mäusen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien mittels Immunhistochemie auf die Expression von Cbp hin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Cbp zu allen ausgewählten Zeitpunkten während der Entwicklung der Körnerzellen von frühen Stadien in der oberen Rautenlippe, über den Zeitpunkt der höchsten Proliferation in der äußeren Körnerzellschicht bis zur reifen Körnerzelle in der inneren Körnerzellschicht exprimiert wurde (Abbildung 3.8A, B). Um die Funktion von Cbp während der cerebellären Entwicklung genauer zu untersuchen, wurden zunächst *hGFAP-cre::Cbp^{F/FI}* Tiere generiert, welche einen Cbp-Knockout in frühen Vorläuferzellen des Cerebellums mit Ausnahme der Purkinjezellen erlauben (Zhuo et al., 2001). Die Deletion von Cbp in *hGFAP-cre::Cbp^{F/FI}* Tiere führte zu einem sichtbar kleineren Cerebellum mit einer dünneren Körnerzellschicht und einer Störung der laminaren Schichtung des cerebellären Kortex (Abbildung 3.8C, D; Appendix Abbildung 6.3). Da die beobachtete cerebelläre Hypoplasie vermutlich ihren Ursprung in einer Störung der Körnerzellvorläufer hat, wurde in einem nächsten Schritt Cbp konditionell in frühen Körnerzellvorläufern des Kleinhirns deletiert. Hierfür wurden *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tiere generiert, in denen es zu einem chronischen Knockout von Cbp in *Math1⁺* Körnerzellvorläufern ab Embryonaltag 12.5 (E12.5) kommt (Machold and Fishell, 2005). *Math1-cre::Cbp^{F/+}* Tiere mit einem heterozygoten Cbp-Knockout wurden in die Analyse mit aufgenommen, da bisher angenommen wurde, dass Cbp haploinsuffizient wirkt (Tanaka et al., 1997). Die nach unserem Verpaarungsschema zu erwartende Verteilung der erzielten Genotypen ließ vermuten, dass der mit *Math1*-Promotorsequenzen getriebene Knockout von Cbp nicht zu embryonaler Letalität führte (Appendix Abbildung 6.4A). Alle generierten Tiere erreichten die postnatale Phase, doch etwa die Hälfte der Tiere mit dem Genotyp *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* verstarb während der dritten Woche postnatal (Appendix Abbildung 6.4B). *Math1* wird unter anderem auch in sekretorischen Zellen des Intestinaltraktes exprimiert (Shroyer et al., 2005), was die Vermutung zuließ, dass diese Tiere durch Veränderungen des Verdauungssystems zu Tode kamen. Dies wurde durch die Beobachtung gestützt, dass *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tiere eine signifikant geringere Zunahme des Körpergewichts während der postnatalen Entwicklung aufwiesen als *Math1-cre::Cbp^{F/+}* und *Math1-cre* Kontrolltiere (Appendix, Abbildung 6.4C). Eine eingehende Untersuchung von Organpräparaten verschiedener Gewebe einschließlich des Intestinaltraktes von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren durch die German

Mouse Clinic zeigte jedoch keine Auffälligkeiten im Vergleich zu Kontrolltieren. Somit ist die Ursache für das partielle Versterben von Tieren dieses Genotyps noch ungeklärt.

Eine erste makroskopische Analyse adulter Tiere zeigte, dass das Cerebellum von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren deutlich kleiner war als das von Kontrolltieren (Appendix Abbildung 6.4D, E). Bereits in der Aufsicht war deutlich zu erkennen, dass die charakteristische Furchung des Cerebellums verändert war. Makroskopisch waren im Gegensatz zu Kontrolltieren nicht alle Lobuli (V – IX) zu erkennen oder zu unterscheiden (Appendix Abbildung 6.4E). Dieser Eindruck konnte durch den Vergleich von H&E-Färbungen von Sagittalschnitten von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* im Vergleich zu *Math1-cre::Cbp^{F/+}* und *Math1-cre* Tieren sowohl an P7 als auch an P25 bestätigt werden (Abbildung 3.8E, G, I, K, M, O). Während die Cerebella der Tiere mit homozygotem Cbp-Knockout augenscheinlich kleiner waren als Kontrollkleinhirne, war vor allem das Fehlen der Fissuren zwischen Lobuli IV/V und VI/VII zu beobachten, was zu einer Fusion der jeweiligen Lobuli führte (Pfeile in Abbildung 3.8M, O). Wie zu erwarten ergab die Analyse des Gewichts der Kleinhirne von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren im Vergleich zu *Math1-cre::Cbp^{F/+}* und *Math1-cre* Tieren eine signifikante Verringerung des cerebellären Gewichts in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren (Appendix Abbildung 6.4F). Mittels Immunhistochemie konnte der Cbp-Knockout in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren im Vergleich zu *Math1-cre::Cbp^{F/+}* Tieren und Kontrolltieren in Körnerzellvorläufern in der äußeren Körnerzellschicht und reifen Körnerzellen der inneren Körnerzellschicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.8F, H, J, L, N, P; Pfeile in N und P zeigen Cbp-defiziente Zellen). Aus diesen ersten Untersuchungen schließen wir, dass lediglich der homozygote Knockout von Cbp in Körnerzellvorläufern zu einem cerebellären Phänotyp führt. In der Folge beschränkten wir uns, wenn nicht anders beschrieben, auf die Analyse von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren im Vergleich zu *Math1-cre* Tieren.

Da *Math1*-Promotorsequenzen im Kleinhirn spezifisch für Körnerzellvorläufer sind und Körnerzellen die zahlreichste Population im Kleinhirn darstellen, war zu vermuten, dass entweder ein gestörtes Proliferationsverhalten oder eine erhöhte Apoptoserate in der Population der Körnerzellvorläufer der Grund für die cerebelläre Hypoplasie in *Math1-cre::CBP^{F/FI}* Tieren war. In einem nächsten Schritt wurde deswegen das Proliferationsverhalten von Körnerzellvorläufern in der äußeren Körnerzellschicht (EGL) von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren und Kontrolltieren (*Math1-cre*)

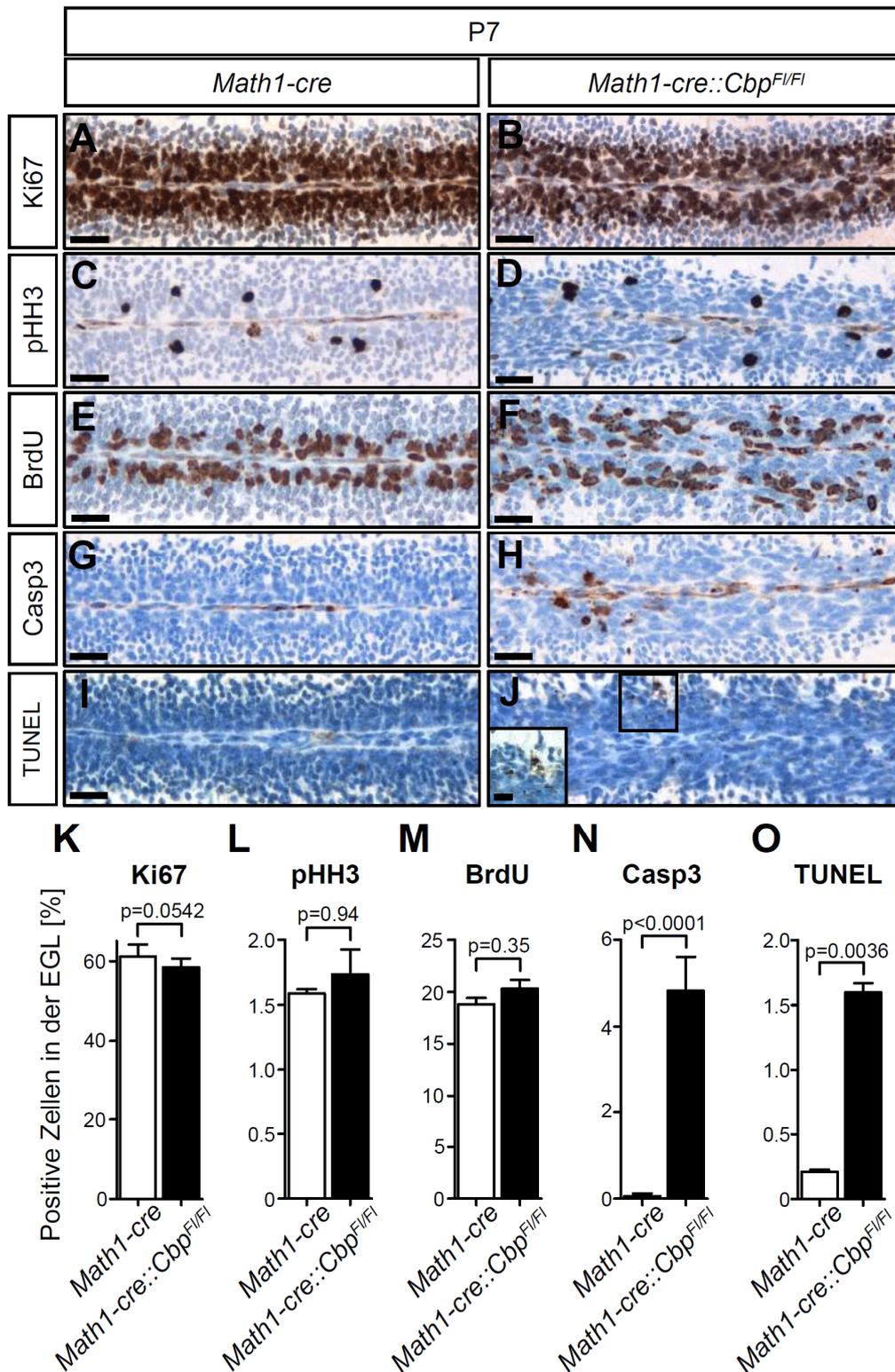


Abbildung 3.9 Gleichbleibende Proliferation und erhöhte Apoptose nach chronischem Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern. Die Quantifizierung von Ki67⁺ und pHH3⁺ Zellen in der EGL zeigt keinen Unterschied zwischen *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren und Kontrolltieren (**A, B, K, L**). Die Markierung proliferierender Zellen in S-Phase mittels BrdU Puls an P7 zeigt ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* und Kontrolltieren (**E, F, M**). Körnerzellvorläufer in der EGL zeigen einen signifikanten Anstieg an apoptotischer Aktivität wie durch aktive Caspase3 und TUNEL-Färbung gezeigt (**L – Q**). EGL: äußere Körnerzellschicht. Messbalken: 25 µm (A - J), 10 µm (Inset in J).

an P7 mittels Färbung für die Proliferationsmarker Ki67 und phospho-Histon H3 (pHH3) analysiert. Hierbei konnte kein Unterschied hinsichtlich der proliferativen Aktivität der Körnerzellpopulation in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* und *Math1-cre* Tieren beobachtet werden (Abbildung 3.9A – D; K, L). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde an *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* und *Math1-cre* Tieren ein BrdU-Puls durchgeführt und der Anteil BrdU-positiver Zellen nach 2 Stunden Inkorporationszeit in der EGL ermittelt (Abbildung 3.9E, F, M). Auch hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferation der Körnerzellvorläufer in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren. Während also die Proliferation der Körnerzellvorläufer in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren nicht verändert war, konnten wir in der Tat einen signifikanten Anstieg der Expression der aktiven Form von Caspase3 ($p < 0.0001$) und TUNEL-Reaktivität ($p = 0.0036$) in der EGL dieser Tiere nachweisen (Abbildung 3.9G – J, N, O). Wir schließen daraus, dass der Knockout von Cbp in Körnerzellvorläufern während der embryonalen Entwicklung zu einer erhöhten Apoptoserate führt, die Proliferation aber nicht signifikant beeinträchtigt wird.

Bei genauerer Analyse der Cerebella von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren konnten wir in adulten Stadien ektopische Zellcluster auf der cerebellären Oberfläche und innerhalb der Molekularschicht identifizieren (Abbildung 3.10A, B, D, E). Da diese Zellen den Körnerzellmarker Pax6 exprimierten, war davon auszugehen, dass es sich hierbei um Körnerzellen handelte, die nicht korrekt in die innere Körnerzellschicht migriert waren (Abbildung 3.10C, F). Obwohl man in Kontrolltieren selten einzelne Pax6⁺ Zellen in der Molekularschicht identifizieren konnte, gab es in Cbp-Knockout Tieren eine hoch signifikante Anhäufung dieser Zellen in der Molekularschicht zu verschiedenen Entwicklungsstadien (Abbildung 3.10G; P18: $p < 0.0001$; P25: $p < 0.0001$; P42: $p = 0.0001$). Die Tatsache, dass auch in späteren adulten Stadien diese ektopischen Zellcluster zu sehen waren, deutete darauf hin, dass es sich hierbei um eine dauerhafte Störung und nicht nur um eine verzögerte Migration der Körnerzellvorläufer handelte. Tatsächlich wurde Cbp in ektopischen Körnerzellen in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren nicht exprimiert, während vereinzelt ektopische Körnerzellen in Kontrolltieren weiterhin ein immunhistochemisches Signal für Cbp zeigten (Abbildung 3.10H, I). Somit ist der Cbp-Verlust als Grund für die Migrationsstörung in den mutanten Tieren anzusehen. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurden *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* und Kontrolltiere an P7 einem BrdU-Puls unterzogen. Dadurch werden Körnerzellvorläufer in der äußeren Körnerzellschicht

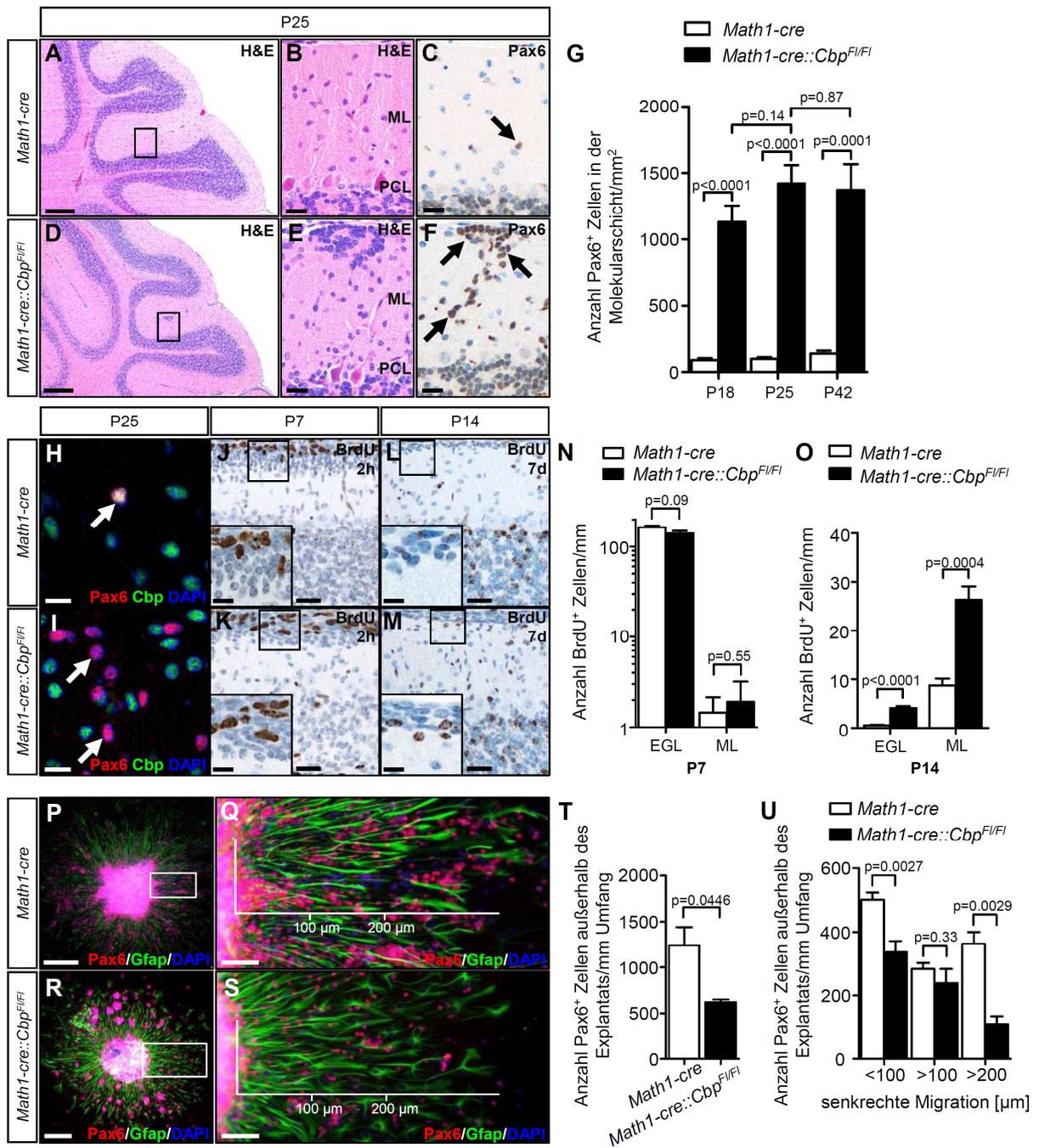


Abbildung 3.10 Chronischer Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern führt zu Migrationsdefekten. Körnerzellvorläufer bilden auf der cerebellären Oberfläche und in der Molekularschicht ektopische Zellcluster in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren im Gegensatz zu Kontrolltieren (A - F). Die Quantifizierung dieser ektopischen Körnerzellen zeigt einen hoch signifikanten Unterschied (G). Während das Vorkommen ektopischer Körnerzellen in Kontrolltieren ein seltenes Ereignis ist, welches nicht mit einem Verlust von CBP einhergeht (H), zeigen ektopische Körnerzellen in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren kein Cbp-Expression (I). Der BrdU-Puls proliferierender Körnerzellvorläufer an P7 (J, K, N) und die Analyse der Migration der markierten Zellen nach einer Woche verdeutlichen den Migrationsdefekt (L, M, O). *In vitro* Versuche mit cerebellären Explantatkulturen bestätigen das eingeschränkte Migrationsverhalten von Körnerzellen aus *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren im Vergleich zu Kontrollkörnerzellen (P - U). Messbalken: 250 µm (P, R), 200 µm (A, D), 50 µm (Q, S), 20 µm (B, C, E, F, J, K, L, M), 10 µm (H, I, Insets in J, K, L, M).

markiert, die zu diesem Zeitpunkt proliferieren (Abbildung 3.10J, K). Wie bereits aus vorangegangenen Experimenten zu erwarten war (Abbildung 3.9E, F, M), gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* und Kontrolltieren hinsichtlich der Anzahl proliferierender Zellen weder in der EGL noch in der Molekularschicht (ML) (Abbildung 3.10N). Während in Kontrolltieren diese markierten Zellen über einen Zeitraum von einer Woche größtenteils in die innere Körnerzellschicht (IGL) gewandert waren und praktisch keine Zellen in der EGL verblieben, war im Vergleich dazu die Anzahl BrdU-positiver Körnerzellen in der EGL und der ML in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren signifikant erhöht (Abbildung 3.10L, M, O). Dies belegte, dass cerebelläre Körnerzellvorläufer nach Verlust von Cbp in ihrer Migration von der äußeren in die innere Körnerzellschicht des cerebellären Kortex beeinträchtigt waren. Um diese Migrationsstörung in einem *in vitro* System verfolgen zu können, wurden cerebelläre Explantatkulturen von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* und Kontrolltieren angefertigt, welche ein gutes Versuchssystem für die Analyse der postnatalen Migration von Körnerzellen darstellen (Koscheck et al., 2003; Nagata and Nakatsuji, 1990). Nach der Aussaat der Explantate konnte über einen Zeitraum von 5 Tagen das Auswachsen der Gfap-positiven Gliafortsätze und das Migrationsverhalten der Pax6-positiven Körnerzellen entlang dieser Fortsätze beobachtet werden. (Abbildung 3.10P, R), was dem beschriebenen Verhalten von cerebellären Explantaten *in vitro* entsprach und merkliche Ähnlichkeiten zur Migration *in vivo* aufwies (Sidman and Rakic, 1973). Zur Quantifizierung des Migrationsverhaltens wurde sowohl die relative Anzahl an Körnerzellen außerhalb der Explantate als auch deren Migrationsstrecke bestimmt (Abbildung 3.10Q, S). Hierbei zeigte sich, dass in Explantaten von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant weniger Körnerzellen in der Lage waren, aus den Explantaten heraus zu wandern (Abbildung 3.10T; $p=0.0446$). Die Zellen, die das Explantat verlassen konnten, migrierten außerdem im Mittel eine deutlich kürzere Strecke als Kontrollzellen (Abbildung 3.10U). Dies belegt, dass Körnerzellen von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren auch *in vitro* in ihrer Migration eingeschränkt sind.

Zusammengenommen schließen wir daraus, dass der chronische Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern zu einer erhöhten Apoptoserate und einer gestörten Migration führt.

3.2.2 Cbp reguliert die Expression von Bdnf in cerebellären Körnerzellvorläufern

Um den genauen Mechanismus zu verstehen, der nach Cbp-Knockout zu dem oben beschriebenen Phänotyp führt, haben wir im Folgenden die Expression von verschiedenen Neurotrophinen im Cerebellum von *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren untersucht. Die Familie der Neurotrophine, einer Gruppe strukturell und funktionell verwandter Wachstumsfaktoren, besteht aus den Proteinen Bdnf (brain derived neurotrophic factor), Neurotrophin-3 (NT-3) und den Neurotrophinen-4/5 (Levi-Montalcini, 1987). Neurotrophine spielen eine essentielle Rolle bei der Differenzierung und dem Überleben verschiedener neuronaler Subgruppen (Bibel and Barde, 2000; Huang and Reichardt, 2001; Lessmann et al., 2003), was die Vermutung zulässt, dass eine Änderung der Expression dieser Wachstumsfaktoren zumindest beteiligt ist an der Ausbildung des hier beschriebenen cerebellären Phänotyps. Tatsächlich zeigen zahlreiche Untersuchungen, dass sowohl Bdnf als auch Neurotrophin-3 wichtig für die normale Entwicklung des Kleinhirns sind (Bates et al., 1999; Carter et al., 2002; Lindholm et al., 1997; Schwartz et al., 1997). Von besonderem Interesse hierbei ist, dass Mäuse mit einem genetischen Knockout von Bdnf einen cerebellären Phänotyp aufzeigen, welcher den hier beschriebenen cerebellären Abnormalitäten in *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren wie erhöhter Apoptose, unvollständige Lobulierung und gestörte Migration von Körnerzellvorläufern in vielerlei Hinsicht stark ähnelt (Bates et al., 1999; Borghesani et al., 2002; Schwartz et al., 1997).

In einem ersten Schritt wurde mittels quantitativer Real time-PCR (qRT-PCR) das Expressionslevel der mRNAs des Neurotrophins *Bdnf* in Cerebella von *Math1-cre::CBP^{F1/+}* und *Math1-cre::CBP^{F1/F1}* Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren an P14 untersucht. In diese Analyse wurden *Math1-cre::CBP^{F1/+}* Tiere miteinbezogen, da diese aufgrund eines fehlenden cerebellären Phänotyps als weitere Kontrolle geeignet waren. Hierfür wurde Gesamt-RNA aus Kleinhirnen von Tieren mit genannten Genotypen isoliert und anschließend mit spezifischen Primern analysiert. Als interne Kontrolle wurde zuerst das mRNA Level von *Cbp* in den hier generierten Mausmodellen analysiert. Wie zu erwarten war, wurde sowohl in Mäusen mit einem heterozygoten Knockout (*Math1-cre::Cbp^{F1/+}*; $p=0.0029$) als auch mit einem homozygoten Knockout (*Math1-cre::Cbp^{F1/F1}*; $p=0.0009$) eine signifikante Abnahme des mRNA Levels von *Cbp* im Vergleich zu Kontrolltieren (*Math1-cre*) nachgewiesen,

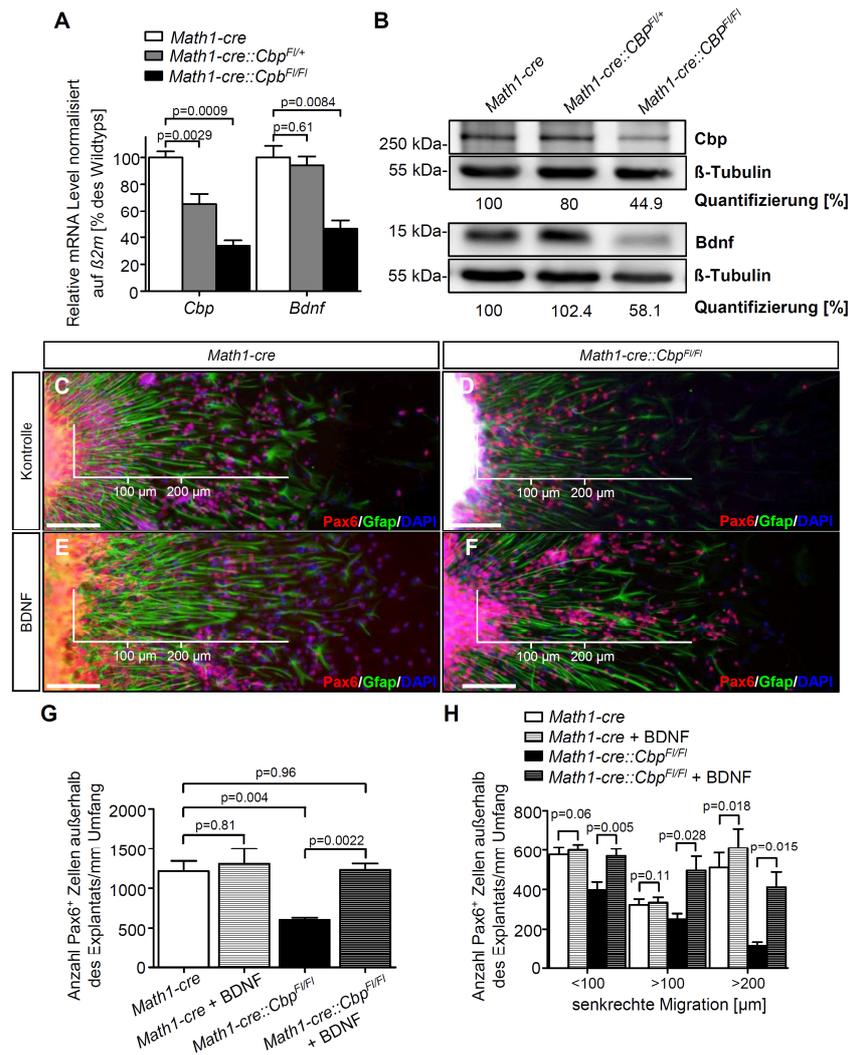


Abbildung 3.11 Cbp reguliert die Expression des Neurotrophins Bdnf in cerebellären Körnerzellvorläufern. Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) zeigt wie zu erwarten einen signifikanten Rückgang an mRNA von *Cbp* in *Math1-cre::Cbp^{F1/+}* (n=6; p=0.0029) und *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren (n=5; p=0.0009) im Vergleich zu *Math1-cre* Kontrolltieren (n=6) (A). Während Tiere mit einem heterozygoten Knockout von Cbp keine Beeinträchtigung des Neurotrophinsystems zeigen (*Bdnf* p=0.6057), wird eine deutliche Verminderung des mRNA Levels an *Bdnf* (p=0.0084) in *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren deutlich. Die Western Blot Analyse cerebellärer Proteinlysate weist den Cbp Knockout in *Math1-cre::Cbp^{F1/+}* und *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren auch auf Proteinebene nach (B). Ebenso konnte ein spezifischer Knockdown von Bdnf in *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren mittels Western Blot nachgewiesen werden, der in *Math1-cre::Cbp^{F1/+}* Tieren nicht zu beobachten war (B). Humanes rekombinantes BDNF ist in der Lage, das normale Migrationsverhalten von Körnerzellvorläufern aus *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren *in vitro* wiederherzustellen (C - F). Die Quantifizierung der relativen Anzahl an Körnerzellvorläufern außerhalb der Explantate zeigt keinen Anstieg der Migration von Kontrollzellen nach BDNF-Behandlung (100 ng/ml; p=0.81), einen signifikanten Rückgang der Migration von Cbp-defizienten Körnerzellen in Kontrollmedium (p=0.004) und eine Wiederherstellung des normalen Migrationsverhaltens Cbp-defizienter Körnerzellen im Vergleich zu Kontrollzellen durch BDNF-Behandlung (p=0.96) (G). Die Quantifizierung der Migrationstrecken von Kontrollzellen zeigt nach BDNF-Behandlung einen leichten Anstieg der Zellen, die mehr als 200 μ m gewandert sind (p=0.018) (H). Im Gegensatz dazu kommt es nach BDNF-Behandlung Cbp-defizienter Körnerzellen zu einem signifikanten Anstieg der Migrationstrecken in allen ausgewerteten Bereichen im Vergleich zu Cbp-defizienten Zellen ohne BDNF-Behandlung. Messbalken: 100 μ m (C - F).

wobei homozygote Tiere erwartungsgemäß einen stärkeren Rückgang zeigten (Abbildung 3.11A). Da das mittlere mRNA Level von *Cbp* aller Kontrolltiere als 100 % definiert wurde, konnte für *Math1-cre::Cbp^{F/+}* Tiere eine mittlere Abnahme auf etwa 65 % und für *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tiere eine mittlere Abnahme auf etwa 33 % des Kontrollniveaus nachgewiesen werden. Hierbei ist zu bedenken, dass die von uns genutzten *Math1*-Promotorsequenzen eine Cre-Expression im Kleinhirn lediglich in Körnerzellvorläufern vermittelt (Wang et al., 2005). Folglich wird in *Math1-cre::Cbp^{F/+}* bzw. *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren *Cbp* lediglich in Körnerzellvorläufern deletiert, weswegen in der qRT-PCR Analyse der cerebellären Gesamt-RNA weiterhin eine Expression von *Cbp* mRNA zu detektieren war. Diese stammt von nicht rekombinierten Zellen wie Purkinjezellen oder Gliazellen. Bei der Analyse von Mäusen mit einem heterozygoten Knockout von *Cbp* wurde keine signifikante Abnahme des mRNA Levels des Neurotrophins *Bdnf* ($p=0.6057$) im Vergleich zu Kontrolltieren detektiert (Abbildung 3.11A). *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tiere wiesen jedoch eine signifikante reduzierte Expression an mRNA des Neurotrophins *Bdnf* auf (Abbildung 3.11A; $p=0.0084$). In Prozent ergab dies eine mittlere Verminderung des mRNA Levels auf etwa 46 % für *Bdnf* im Vergleich zum mittleren Kontrolllevel. Dies bestätigt die Vermutung, dass eine verminderte Expression des Wachstumsfaktors *Bdnf* eine Folge des homozygoten *Cbp* Knockouts ist und erklärt die phänotypische Ähnlichkeit zu den erwähnten Knockout-Mausmodellen für *Bdnf*. Um den Verlust auf Proteinebene zu zeigen, wurde das Gesamtlevel an *Cbp* und *Bdnf* in cerebellären Proteinlysaten von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren mittels Western Blot bestimmt. Der für das mRNA Level gezeigte Rückgang von *Cbp* konnte auch auf Proteinebene für *Math1-cre::Cbp^{F/+}* und *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tiere gezeigt werden (Abbildung 3.11B). Ebenso bestätigte sich der spezifische Knockdown von *Bdnf* in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren auch auf Proteinebene (Abbildung 3.11B). Das gleichbleibende Proteinlevel von *Bdnf* in *Math1-cre::Cbp^{F/+}* Tieren erklärt deren Unauffälligkeit hinsichtlich ihrer Histologie und anderer Parameter wie das Körpergewicht und bekräftigt die Annahme, dass *Cbp* in cerebellären Körnerzellvorläufern nicht haploinsuffizient wirkt. Um die Regulation von *Bdnf* durch *Cbp* in cerebellären Körnerzellvorläufern zu beweisen, wurden nochmals cerebelläre Explantatkulturen angefertigt und diesmal mit humanem BDNF-Protein behandelt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Körnerzellen von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren nach Zugabe von exogenem BDNF (100 ng/ml) wieder ihr normales

Migrationsverhalten zeigen würden. Wie erwartet zeigten Körnerzellen von *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren, welche in Kontrollmedium gehalten wurden, im Vergleich zu Kontrollzellen erneut eine signifikante Inhibition der Migration (Abbildung 3.11C, D, G, H). Auch nach Zugabe von humanem BDNF zeigten Kontrollzellen keine relative Zunahme an migrierenden Körnerzellen (Abbildung 3.11E, G). Lediglich bei der Quantifizierung der gewanderten Strecken zeigten BDNF-behandelte Kontrollzellen eine leichte Tendenz für eine gesteigerte Migrationsleistung (Abbildung 3.11H). Im Gegensatz dazu konnte die Zugabe von humanem BDNF die Migration von Körnerzellen aus *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren wieder auf das gleiche Maß der Kontrollzellen anheben (Abbildung 3.11F). Dies zeigte sich sowohl bei der Quantifizierung der relativen Anzahl an Körnerzellen außerhalb der Explantate (Abbildung 3.11G) als auch bei der Analyse der zurückgelegten Migrationsstrecken (Abbildung 3.11H). Wir schließen daraus, dass der homozygote Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern zu einer negativen Regulation und somit zu einer verminderten Expression von Bdnf führt und dass dieser Verlust von Bdnf zumindest für die gestörte Migration der Körnerzellvorläufer verantwortlich ist.

3.2.3 Der akute Verlust von Cbp in postnatalen Körnerzellvorläufern führt zur Steigerung der Proliferation *in vitro* und *in vivo*

Da Cbp übereinstimmend als Tumorsuppressor angesehen wird, war die Tatsache, dass der Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern während des Embryonalstadiums zu einer erhöhten Apoptose führt, sehr überraschend. Die kontinuierliche Expression von Cbp in der Körnerzellpopulation während der gesamten Entwicklung (Abbildung 3.8A, B) lässt vermuten, dass der Verlust von Cbp zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Auswirkungen nach sich ziehen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einem nächsten Schritt Cbp in postnatalen Körnerzellvorläufern *in vitro* deletiert. Der Cbp-Knockout in kultivierten Körnerzellen von *Cbp^{F/FI}* Tieren wurde hierbei mittels retroviraler Transduktion mit einem Konstrukt herbeigeführt, welches die kodierende Sequenz für die Cre-Rekombinase und GFP (green fluorescent protein) enthielt. Als Kontrolle wurden retrovirale Partikel benutzt, welche nur für GFP kodierten. In der Folge wurde zur Bestimmung der Proliferationsrate 24 Stunden nach Virusapplikation der Anteil transduzierter Zellen ermittelt, welcher nach einem zweistündigen BrdU-Puls das Thymidinanalogon inkorporiert hatte. Hierbei konnte in Zellen, die mit dem Cre-Virus behandelt wurden, ein signifikanter Anstieg der Proliferation im Vergleich zu

Kontrollzellen ermittelt werden (Abbildung 3.12A – G; $p=0.0041$). Diese Ergebnisse zeigen, dass der akute Verlust von Cbp in kultivierten, postnatalen Körnerzellvorläufern zu einer Steigerung der Proliferation führt und Cbp hier als klassischer Tumorsuppressor fungiert.

Um in der Folge Cbp auch in postnatalen Körnerzellvorläufern *in vivo* zu deletieren, wurde eine induzierbare Cre-Mauslinie benutzt (*Math1-creER^{T2}*), welche es ermöglichte, die Cre-Rekombinase spezifisch während der postnatalen Entwicklung in Math1-positiven Körnerzellvorläufern des Kleinhirns zu aktivieren. Das in der *Math1-creER^{T2}* Mauslinie exprimierte Fusionsprotein aus der Cre-Rekombinase und einer mutierten Form des humanen Östrogen-Rezeptors wird zwar unter dem *Math1*-Promotor exprimiert, aber im Zytoplasma der Zelle gehalten und kann erst nach Induktion durch Tamoxifen in den Zellkern gelangen und aktiv werden (Feil et al., 1997; Helms et al., 2000; Machold and Fishell, 2005). Um einen Knockout von Cbp in postnatalen Körnerzellvorläufern zu erhalten, haben wir *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}* Tiere generiert und diese an P5 mit Tamoxifen behandelt. Im Gegensatz zu Tieren mit einem chronischen Cbp-Knockout ist von den Tamoxifen-behandelten *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}* Tieren ($n=10$) in einem Zeitraum von 180 Tagen nach Induktion kein Tier verstorben (Appendix Abbildung 6.5). Die Analyse sagittaler Gewebeschnitte dieser Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifenbehandlung bestätigte die erfolgreiche Deletion von Cbp in einer Fraktion der Körnerzellpopulation im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 3.12H - S; Pfeile in Insets in K, O, S zeigen auf Cbp-defiziente Zellen in der EGL). Nachdem sichergestellt wurde, dass der akute Verlust von Cbp in postnatalen Körnerzellvorläufern in *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}* Tieren erfolgreich war, wurde zuerst die apoptotische Aktivität in der EGL analysiert, da der chronische Verlust von Cbp in *Math1-cre::Cbp^{F/FI}* Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate in Körnerzellvorläufern führte (vergleiche Abbildung 3.9). Im Gegensatz zum chronischen Verlust von Cbp konnte jedoch in *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}* Tieren zu mehreren Zeitpunkten nach der Induktion des Cbp-Knockouts an P5 keine Steigerung der Apoptoserate detektiert werden (Abbildung 3.12T - Y, AF). Analog dazu wurde das Proliferationsverhalten der Körnerzellvorläufer in der EGL zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion mittels BrdU-Puls untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der akute Verlust von Cbp wie schon in primären Körnerzellkulturen auch *in vivo* zu einem signifikanten Anstieg der

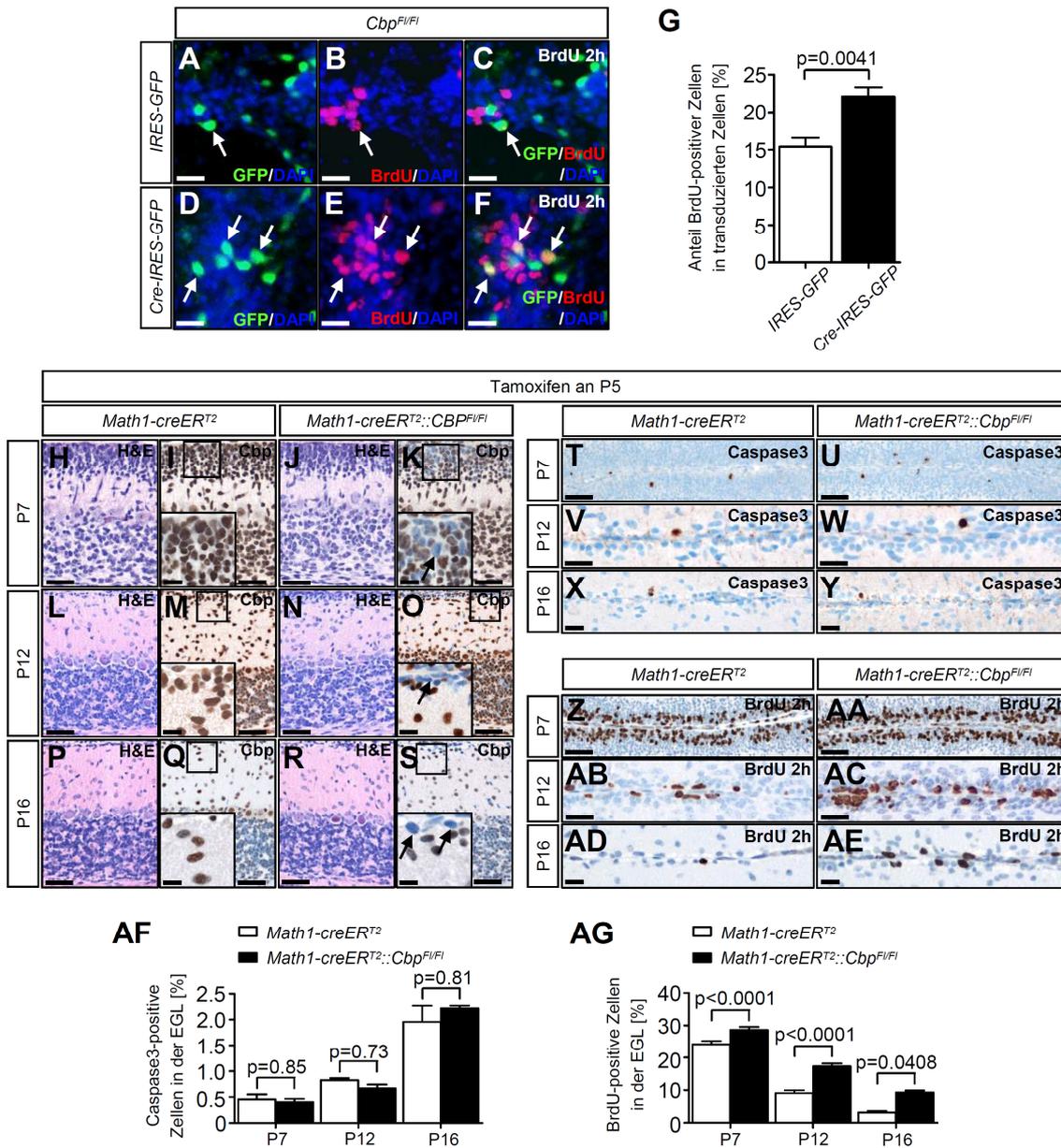


Abbildung 3.12 Der akute Verlust von Cbp in postnatalen Körnerzellvorläufern führt zu erhöhter Proliferation *in vitro* und *in vivo*. Primäre Körnerzellkulturen von *Cbp^{F/FI}* Tieren wurden *in vitro* mit Kontrollvirus (IRES-GFP; **A**, **B**, **C**) oder Cre-Virus (Cre-IRES-GFP; **D**, **E**, **F**) behandelt und 24 Stunden nach Virusbehandlung einem 2-stündigen BrdU Puls ausgesetzt. Die Quantifizierung zeigt einen signifikanten Anstieg der Proliferation der Cre-behandelten Körnerzellvorläufer, in denen Cbp deletiert wurde ($p=0.0041$) (**G**). Erfolgreicher Cbp-Knockout *in vivo* in Körnerzellvorläufern in *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}* Tieren, welche an P5 mit Tamoxifen behandelt wurden (**H** – **S**; Pfeile in Insets in **K**, **O**, **S** zeigen auf Cbp-defiziente Zellen in der äußeren Körnerzellschicht). Analyse der Apoptoserate mittels Caspase3-Färbung und des Proliferationsstatus mittels BrdU Puls zu verschiedenen Zeitpunkten während der postnatalen Entwicklung der Körnerzellvorläufer in der EGL von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}* und *Math1-creER^{T2}* Kontrolltieren (**T** - **AE**). Die Quantifizierung Caspase3-positiver Zellen in der EGL zeigt zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifengabe keinen Anstieg der Apoptoserate (**AF**). Quantifizierung BrdU-positiver Zellen in der EGL zeigt zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifengabe jeweils einen signifikanten Anstieg der Proliferation der Körnerzellvorläufer (P7 $p<0.0001$; P12 $p<0.0001$; P16 $p=0.0408$) (**AG**). EGL: äußere Körnerzellschicht. Messbalken: 25 μm (H - L), 15 μm (Q - T), 10 μm (A - F, Inset in L).

Proliferation im Vergleich zu Kontrolltieren führte (Abbildung 3.12Z – AE, AG). Zusammengenommen schließen wir daraus, dass, im Gegensatz zum embryonalen Verlust von Cbp, die akute Deletion von Cbp in späten Körnerzellvorläufern nicht zu einer erhöhten Apoptoserate, sondern zu einer verlängerten Proliferation dieser Zellen führt.

3.2.4 Der Verlust von Cbp verstärkt die pathologische Proliferation cerebellärer Körnerzellvorläufer nach Shh-Aktivierung *in vitro* und *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der akute Verlust von Cbp in postnatalen Körnerzellvorläufern deren Proliferation steigert, sollte in weiteren Versuchen analysiert werden, ob dieser potentiell pathogene Prozess auch die Tumorentstehung von Shh-assoziierten Medulloblastomen, die von Körnerzellvorläufern abstammen, beschleunigen kann. Diese Frage sollte zunächst in primären Zellkulturen von postnatalen Körnerzellvorläufern (P5) *in vitro* beantwortet werden. Hierfür wurde mit Kontrollzellen und Zellen von *Cbp^{F1/F1}* Spendertieren gearbeitet, die alle einen *SmoM2-YFP^{F1/+}* Hintergrund hatten und somit eine Cre-vermittelte Aktivierung des Shh-Signalwegs und eine daraus folgende pathologische Proliferation ermöglichten (Mao et al., 2006; Schüller et al., 2008). Sowohl für die Kontrollzellen als auch Zellen mit *Cbp^{F1/F1}* Hintergrund wurde für die mit dem Kontrollvirus (*IRES-GFP*) behandelten Kulturen eine Grundproliferation von je etwa 17% an BrdU-positiven Zellen (Zellen in S-Phase) errechnet (Abbildung 3.13A - C, G - I, M). Wurden die Kontrollzellen mit *SmoM2-YFP^{F1/+}* Hintergrund mit Cre-Virus (*Cre-IRES-GFP*) behandelt, stieg der Anteil BrdU-positiver Zellen wie erwartet auf etwa 24% an (Abbildung 3.13D - F, M; $p < 0.0001$), da durch den Cre-Virus der Shh-Signalweg über die *SmoM2-YFP* Mutante aktiviert wurde. Körnerzellvorläufer, in denen jedoch zusätzlich zur Shh-Aktivierung ein Knockout von Cbp induziert wurde, zeigten einen weiteren signifikanten Anstieg der BrdU-positiven Zellen auf etwa 29% (Abbildung 3.13J - L, M; $p < 0.0001$). Im Vergleich zu den Cre-behandelten Kontrollzellen entsprach dies einem signifikanten Anstieg der Proliferation ($p = 0.0012$). Dies belegt, dass der akute Verlust von Cbp in Körnerzellvorläufern des postnatalen Cerebellums nicht nur die Proliferation während der normalen Entwicklung steigert, sondern auch bei der pathologischen Proliferation dieser Zellen *in vitro* nach Shh-Aktivierung eine Proliferations-fördernde Rolle spielt. In einem nächsten Schritt wurde analysiert, inwiefern diese Tumor-fördernde des Cbp Verlustes in der Lage ist, das Wachstum

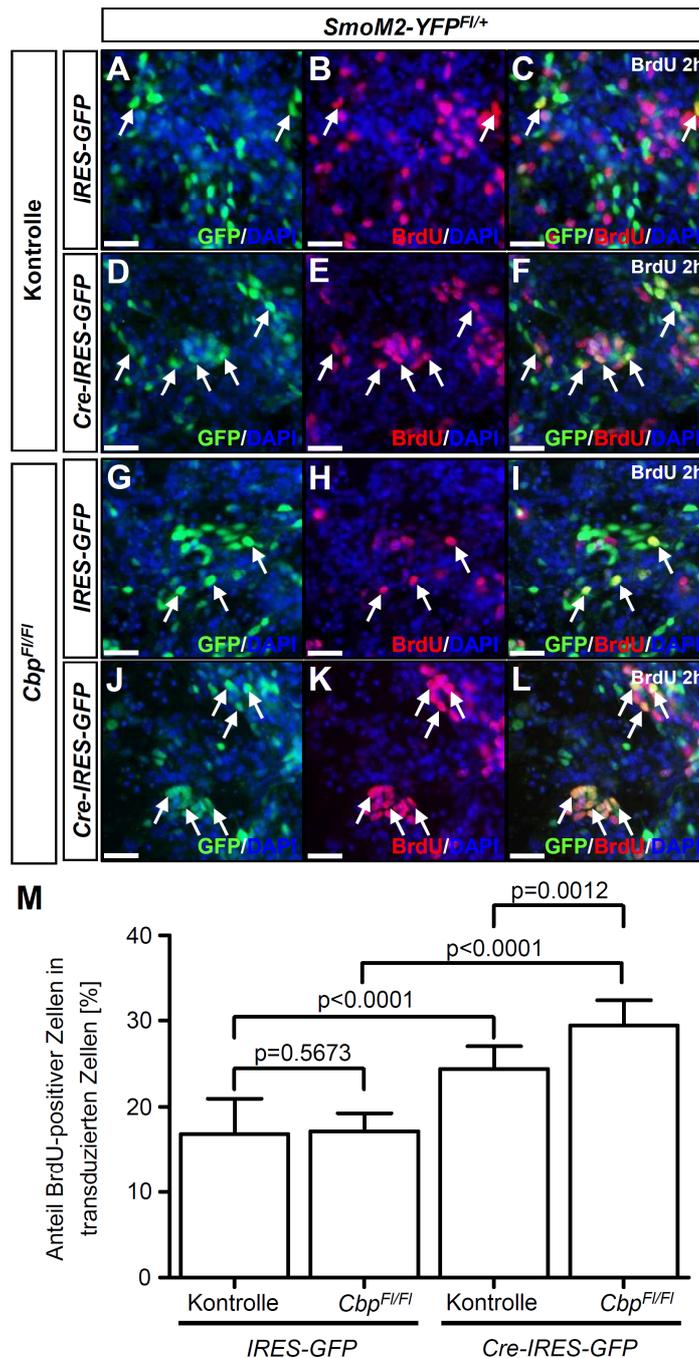


Abbildung 3.13 Der Verlust von Cbp steigert die Shh-induzierte pathologische Proliferation von cerebellären Körnerzellvorläufern *in vitro*. Primäre Körnerzellkulturen mit *SmoM2-YFP^{Fl/+}* Hintergrund von Kontrollzellen und *Cbp^{F/FI}* Zellen und deren Behandlung mit Kontroll-GFP-Viren oder Cre-GFP-Viren (A - L). Pfeile zeigen exemplarisch transduzierte, GFP-positive Zellen, die gleichzeitig BrdU-positiv sind. Quantifizierung aller unabhängig voneinander durchgeführter Experimente (n=4) (M). Messbalken: 25 μ m (A - L).

von *in vivo* induzierten Shh-Medulloblastomen zu beeinflussen. Hierfür wurden *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Mäuse generiert, die nach Tamoxifengabe einen homozygoten Knockout von Cbp und eine gleichzeitige pathologische Aktivierung des Shh-Signalwegs in *Math1⁺* Körnerzellvorläufern ermöglichten. Als

Kontrolltiere wurden *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F/+}* Mäuse generiert. Wie in den vorherigen Experimenten (vergleiche Abbildung 3.12) wurden beide Mausmodelle während der frühen Postnatalphase an P5 mit Tamoxifen induziert. Eine erste Analyse des cerebellären Kortex wurde eine Woche nach Tamoxifeninduktion durchgeführt. Hierbei wurde offensichtlich, dass die EGL von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren im Vergleich zu *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F/+}* Kontrollmäuse bereits deutlich zeldichter erschien (Abbildung 3.14A, B). Mittels BrdU-Puls konnte bestätigt werden, dass die Körnerzellvorläufer von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikant höhere Proliferationsrate aufwiesen (Abbildung 3.14C - E).

Die Analyse beider Tumormausmodelle zu späteren Zeitpunkten ließ erkennen, dass sich die Tumore in *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren im Gegensatz zu den Kontrolltieren augenscheinlich durch ein schnelleres Tumorstadium auswiesen (Abbildung 3.14F - I). Die Tumore beider Mausmodelle wiesen eine ähnliche Histologie mit kleinen, runden, blauen und dicht gepackten Zellen auf. Während praktisch alle Tumorzellen in *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F/+}* Kontrollmäusen Cbp exprimierten, war in Tumoren von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren eine heterogene Cbp Expression zu beobachten (Abbildung 3.14F - I, Insets). Dies ließ vermuten, dass es zu einer insuffizienten Rekombination des *Cbp*-Allels in Tumorzellen kam, die aber offensichtlich eine erfolgreiche Rekombination des *SmoM2-YFP*-Allels durchlaufen hatten. Da es trotz dieser insuffizienten Rekombination des *Cbp*-Allels zu einer deutlichen Steigerung der Proliferationsrate der Tumorzellen kam, sollte überprüft werden, ob durch nachträgliche Rekombination des *Cbp*-Allels *in vitro* die Proliferation der Tumorzellen von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren noch weiter gesteigert werden konnte, was die Tumor-fördernde Eigenschaft des Cbp-Verlustes noch einmal unterstreichen würde. Hierfür wurden Tumorzellen von *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F/+}* und *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren isoliert, *in vitro* kultiviert, mit Kontrollviren (*IRES-GFP*) oder Cre-Viren (*Cre-IRES-GFP*) behandelt und nach 24 Stunden einem BrdU-Puls unterzogen. Tumorzellen von *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F/+}* Tieren zeigten wie erwartet nach Behandlung mit Cre-Viren im Vergleich zur Behandlung mit Kontrollviren keinen Anstieg der Proliferation, da in der absoluten Mehrheit Tumorzellen isoliert wurden und diese bereits eine Rekombination des *SmoM2-YFP*-Allels durchlaufen hatten (Abbildung 3.14J, L, N; p=0.66).

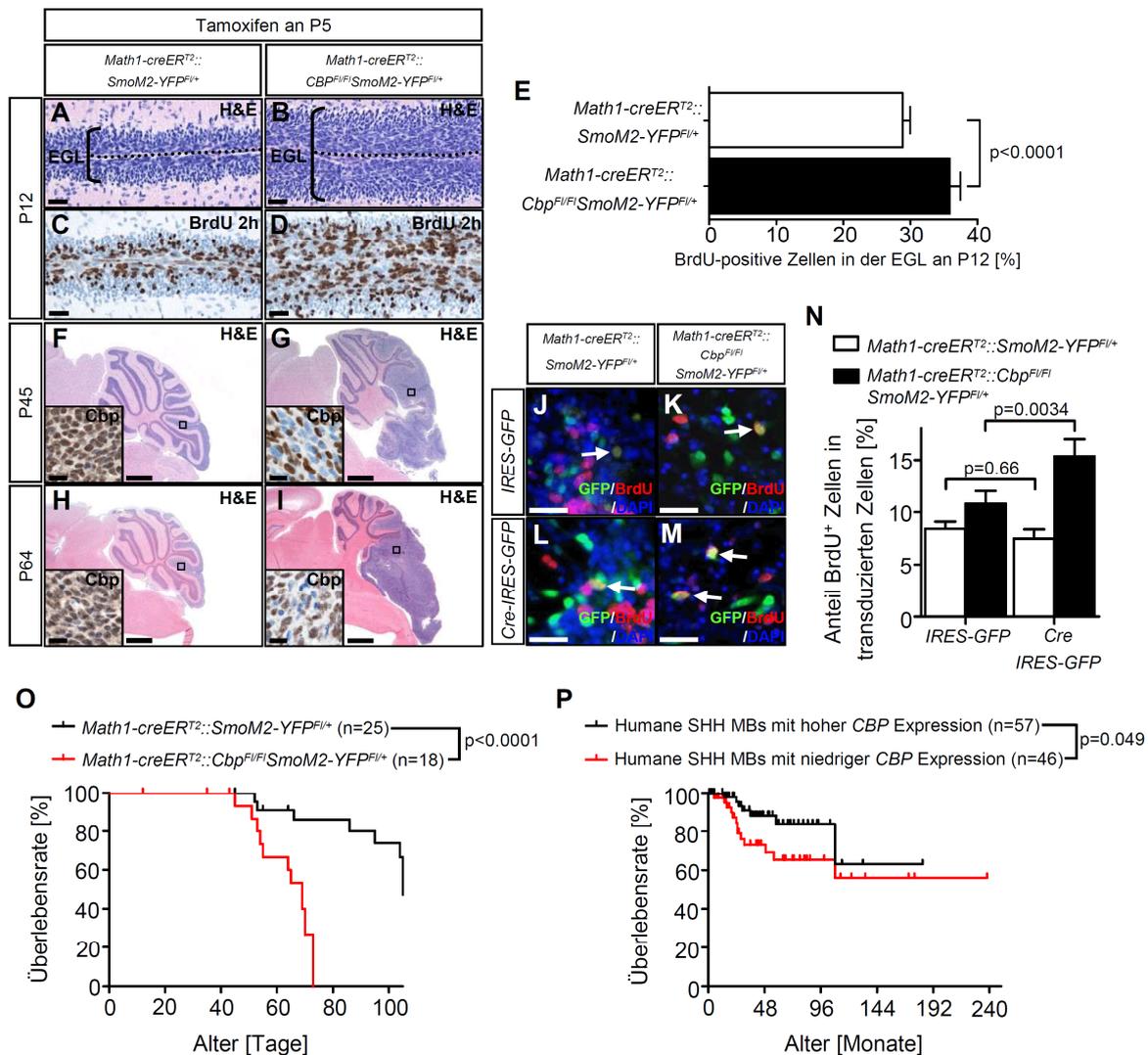


Abbildung 3.14 Der Cbp-Knockout beschleunigt das Wachstum von Shh-abhängigen Medulloblastomen *in vivo*. Analyse der äußeren Körnerzellschicht (EGL) von *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{Fl/+}* und *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tumortieren eine Woche nach Tamoxifeninduktion mittels H&E-Färbung (A, B; punktierte Linie stellt die Grenzfläche zwischen der EGL von Lobulus V und VI dar) und Überprüfung des Proliferationsstatus mittels BrdU Puls (C, D). Quantifizierung BrdU-positiver Zellen in der EGL zeigt einen signifikanten Anstieg proliferativer Zellen in *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tumortieren im Vergleich zu Kontrolltumortieren (E). Repräsentative Sagittalschnitte von Gehirnen von *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{Fl/+}* und *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tumortieren zu verschiedenen Zeitpunkten während der Tumorentwicklung (F - I). Insets in F - I zeigen immunohistochemische Reaktionen für Cbp. Tumorzellen von *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{Fl/+}* und *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tumortieren wurden nachträglich *in vitro* mit IRES-GFP und Cre-IRES-GFP Viren behandelt (J - M). Die Behandlung von Tumorzellen von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tumortieren mit Cre-Virus zeigt einen signifikanten Anstieg der Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen (N). Die Kaplan-Meier Analyse der *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{Fl/+}* und *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tumortiere über einen Zeitraum von 100 Tagen nach Tamoxifeninduktion zeigt eine signifikant niedrigere Überlebensrate für Tumortiere mit Cbp-Verlust (O). Die Kaplan-Meier Analyse von Patienten mit SHH-assoziiertem Medulloblastom (n=103) belegt eine schlechtere Überlebensrate für Patienten mit niedriger CBP-Expression (p=0.049). Expressions- und Überlebensdaten wurden aus der R2-Datenbank (<http://r2.amc.nl>) bezogen. Der Schwellenwert für die CBP-Expression wurde von R2 automatisch berechnet (Min-Expression: 222.1; Max-Expression: 1639.6; errechneter Schwellenwert: 731.9). MBs: Medulloblastome. Messbalken: 1 mm (F - I), 25 µm (A - D), 15 µm (F - M).

Im Gegensatz dazu zeigten Cre-behandelte Tumorzellen von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F1/F1}SmoM2-YFP^{F1/+}* Tieren im Vergleich zum Kontrollvirus einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate (Abbildung 3.14K, M, N; $p=0.0034$). Dies legt die Vermutung nahe, dass in einem Teil der Cbp-positiven Tumorzellen aus diesem Tumormausmodell nachträglich *in vitro* das Cbp-Allel rekombiniert wurde und dies der Grund für die zusätzliche Proliferationssteigerung war.

Um letztlich zu bestätigen, dass das initial schnellere Wachstum der Cbp-defizienten Tumore tatsächlich einen Einfluss auf die Überlebensrate der Tiere hat, wurden Tiere aus beiden Tumormausmodellen für einen Zeitraum von 100 Tagen nach Induktion überwacht und Kaplan-Meier Kurven für beide Genotypen generiert. Die Deletion von Cbp resultierte in einer signifikant reduzierten Überlebensrate der *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F1/F1}SmoM2-YFP^{F1/+}* Tiere (n=18) im Vergleich zu *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F1/+}* Tieren (n=25) (Abbildung 3.14O; $p<0.0001$). Die mittlere Dauer des symptomfreien Intervalls bei den *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F1/+}* Tieren lag bei 98 Tagen und bei den *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F1/F1}SmoM2-YFP^{F1/+}* Tieren bei nur 61 Tagen (Appendix Tabelle 6.4). Interessanterweise führte die Tamoxifenbehandlung innerhalb von 100 Tagen nur in 13 von 16 (81.25 %) der *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{F1/+}* Tieren zu einem Tumor, während 12 von 12 (100 %) der *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F1/F1}SmoM2-YFP^{F1/+}* Tiere innerhalb des Überwachungszeitraums einen Tumor entwickelten. Da die Expression von Cbp in dem hier vorgestellten Tumormodell offensichtlich mit der Prognose der Tumortiere korreliert, sollte in einem nächsten Schritt die Überlebensrate von Patienten mit Bezug auf die Expression von *CBP* in humanen SHH-assoziierten Medulloblastomen untersucht werden. Hierfür wurden Überlebens- und Expressionsdaten von 103 SHH-assoziierten Medulloblastomen aus der R2-Datenbank herangezogen (<http://r2.amc.nl>). Bei Festlegung des Schwellenwerts der *CBP*-Expression für einen minimalen p-Wert ergab sich hierbei, dass Patienten mit einer niedrigen *CBP*-Expression eine signifikant schlechtere Prognose hatten ($p=0.049$) als Patienten mit einer hohen *CBP*-Expression (Abbildung 3.14P). Die hier vorgestellten Mausdaten in Kombination mit der Überlebensstatistik von Patienten zeigen, dass die *CBP*-Expression in SHH-assoziierten Medulloblastomen positiv mit der Überlebensrate korreliert und *CBP* daher als prognostischer Marker geeignet zu sein scheint.

3.2.5 Cbp reguliert die Expression von Bdnf in Shh-assoziierten Medulloblastomen und nimmt so Einfluss auf deren Prognose

Um die mechanistischen Grundlagen aufzudecken, welche zur signifikant schlechteren Prognose von Cbp-defizienten Shh-Medulloblastomen beziehungsweise Medulloblastomen mit niedriger *CBP*-Expression führten, wurde überprüft, ob Cbp wie in normalen cerebellären Körnerzellen (vergleiche Abbildung 3.11) auch in entarteten Körnerzellen die Expression von Bdnf reguliert. Hierfür wurde zuerst das Proteinlevel an Cbp und Bdnf in *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{Fl/+}* und *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tieren mittels Western Blot untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Tumore aus *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tieren ein im Mittel um etwa 60 % des Kontrolllevels reduziertes Proteinlevel an Cbp aufweisen (Abbildung 3.15A). Dies deckt sich mit den bereits gezeigten immunhistologischen Färbungen, welche nur einen insuffizienten Cbp-Knockout in unserem Tumormausmodell vermuten ließen (vergleiche Abbildung 3.14F - I, Insets). Für diese Tumore mit niedriger Cbp-Expression konnte ein Rückgang des Proteinlevels an Bdnf im Mittel um etwa 50 % gezeigt werden (Abbildung 3.15A). Dies ließ vermuten, dass Cbp auch während der Shh-getriebenen Tumorausbildung aus cerebellären Körnerzellvorläufer die Expression des Neurotrophins Bdnf positiv reguliert. In einem nächsten Versuch sollte untersucht werden, ob die exogene Applikation von humanem BDNF *in vitro* in der Lage ist, die höhere Proliferationsrate von Cbp-defizienten Tumorzellen zu reduzieren, welche zumindest in frühen Stadien der Tumorentstehung bereits gezeigt wurde (Abbildung 3.14E). Hierfür wurden Tumorzellen aus *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{Fl/+}* und *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tieren während später Stadien der Tumorentwicklung isoliert und *in vitro* für 24 Stunden in Kontrollmedium oder Medium mit humanem BDNF (100 ng/ml) kultiviert (Abbildung 3.15B - E). Wie erwartet wiesen die in Kontrollmedium kultivierten Tumorzellen von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tieren eine signifikant höhere Proliferationsrate auf als Tumorzellen aus *Math1-creER^{T2}::SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tieren (Abbildung 3.15F). Durch die Zugabe von BDNF-Medium wurde die Proliferation von Kontrolltumorzellen nicht signifikant eingedämmt (Abbildung 3.15F). Tumorzellen von *Math1-creER^{T2}::Cbp^{Fl/Fl}SmoM2-YFP^{Fl/+}* Tieren waren jedoch sensitiv für das BDNF-Medium und zeigten eine signifikant niedrigere Proliferationsrate als Zellen gleichen Genotyps in Kontrollmedium ($p < 0.0001$), aber auch als Kontrolltumorzellen in BDNF-Medium

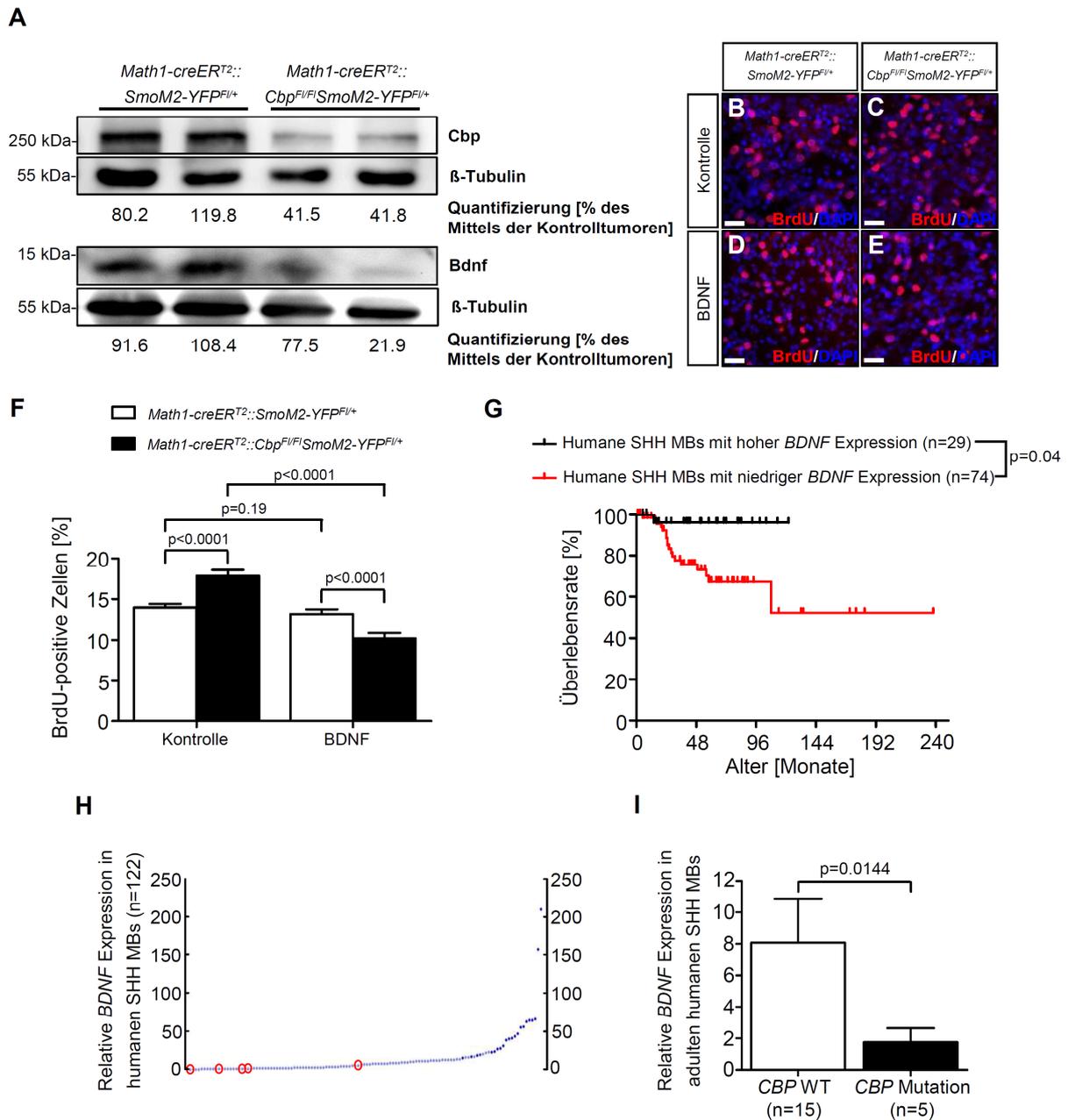


Abbildung 3.15 Die erhöhte Proliferationsrate Cbp-defizienter Tumorzellen wird durch eine negative Regulation von Bdnf ausgelöst. Nachweis reduzierter Proteinlevel an Cbp und Bdnf in Tumoren von *Math1-creERT²::Cbp^{F1/F1}SmoM2-YFP^{F1/+}* Mäusen im Vergleich zu Kontrolltumoren (A). Während Cbp-defiziente Tumorzellen im Vergleich zu Kontrolltumorzellen eine signifikant erhöhte Proliferationsrate aufweisen, kann diese durch Behandlung mit humanem BDNF (100 ng/ml) signifikant reduziert werden (B - F). Kaplan-Meier Analyse von Patienten mit SHH-assoziiertem Medulloblastom (n=103) mit hoher oder niedriger BDNF-Expression (G). Niedrige BDNF-Expression korreliert signifikant mit einer schlechteren Überlebensrate (p=0.04). Expressions- und Überlebensdaten wurden aus der R2-Datenbank bezogen. Der Schwellenwert für die BDNF-Expression wurde von R2 automatisch berechnet (Min-Expression: 0.4; Max-Expression: 209.7; errechneter Schwellenwert: 11.5). Graphische Darstellung aller BDNF-Expressionswerte von 122 humanen SHH-assoziierten Medulloblastomen mit Hervorhebung von 5 Medulloblastomfällen mit gesicherter CBP-Mutation (H). Vergleich der BDNF-Expression in adulten SHH-assoziierten Medulloblastomen mit gesichertem CBP-Wildtypstatus (n=15) oder gesicherter CBP-Mutation (n=5) (I). MBs: Medulloblastome. Messbalken: 10 µm (B - E).

($p < 0.0001$) (Abbildung 3.15F). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass *Cbp*-defiziente Tumorzellen aus *Shh*-abhängigen Medulloblastomen deutlich reduzierte *Bdnf*-Proteinlevel aufwiesen und die erhöhte Proliferation dieser Tumorzellen im Vergleich zu Kontrolltumoren durch die Zugabe von BDNF *in vitro* signifikant reduziert werden konnte. Um die *CBP*-regulierte Expression von *BDNF* auch im humanen System zu untersuchen, wurde die Überlebensrate von Patienten ($n=103$) mit Bezug auf die Expression von *BDNF* in humanen *SHH*-assoziierten Medulloblastomen analysiert. Hierbei konnte zuerst bestätigt werden, dass humane *SHH*-assoziierte Medulloblastome mit niedriger *BDNF*-Expression eine signifikant schlechtere Prognose aufweisen als Tumore mit hoher *BDNF*-Expression (Abbildung 3.15G; $p=0.04$). Insofern scheinen sowohl im murinen als auch im humanen System *SHH*-assoziierte Medulloblastome mit niedriger *BDNF*-Expression eine geringere Überlebensrate aufzuweisen. In der Folge stellte sich die Frage, in welchem Maß humane *CBP*-Mutationen verantwortlich für die verringerte Expression von *BDNF* in *SHH*-assoziierten Medulloblastomen sind. Hierfür wurde die *BDNF*-Expression in einer Kohorte von 122 humanen *SHH*-assoziierten Medulloblastomen untersucht, von denen durch genomweite Sequenzierung für 5 adulte Tumore eine gesicherte Mutation im *CBP*-Gen nachgewiesen werden konnte (Appendix Abbildung 6.2). Es stellte sich heraus, dass alle *CBP*-mutierten Medulloblastome eine verhältnismäßig niedrige *BDNF*-Expression aufweisen (Abbildung 3.15H; rote Kreise). Hierbei lag der relative Wert der *BDNF*-Expression bei 4 von 5 der *CBP*-mutierten adulten Medulloblastome innerhalb des unteren Quartils und 1 von 5 noch unter dem Median der *BDNF*-Expressionswerte aller übrigen Kontrolltumore ohne gesicherter *CBP*-Mutation ($n=117$). Allerdings konnte nicht für alle Kontrolltumore mit Sicherheit eine *CBP*-Mutation ausgeschlossen werden. Außerdem beinhalteten die Kontrolltumore pädiatrische Fälle, während alle 5 *CBP*-mutierten Medulloblastome von adulten Patienten stammten. Um eine Fehlinterpretation durch nicht erkannte *CBP*-mutierte Fälle oder allgemeine Unterschiede im Expressionsprofil adulter und pädiatrischer Medulloblastome auszuschließen, wurden in einer weiteren Analyse die *BDNF*-Expressionswerte der 5 *CBP*-mutierten adulten Medulloblastome nur mit Expressionswerten von adulten Medulloblastomen verglichen, bei denen man durch genomweite Sequenzierung eine Mutation des *CBP*-Gens ausschließen konnte ($n=15$). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Medulloblastome mit *CBP*-Mutation im Vergleich zu Tumoren mit Wildtyp-*CBP*-Allelen eine signifikant niedrigere *BDNF*-

Expression aufweisen (Abbildung 3.8|; $p=0.0144$). Diese Datenanalyse lässt vermuten, dass der hier gezeigte *CBP*-regulierte *BDNF*-Knockdown und die daraus folgende Steigerung des onkogenen Potentials SHH-assoziiierter Medulloblastome im murinen und humanen System ähnlichen Mechanismen folgt.

4 Diskussion

4.1 Unterschiedliche Ursprungszellen als Erklärung für die Heterogenität SHH-assoziiierter Medulloblastome

In diesem Projekt haben wir mit Hilfe von *hGFAP-cre* und *Math1-cre* Mauslinien den Shh-Signalweg in verschiedenen Zellpopulationen des dorsalen Hirnstamms der Maus konstitutiv aktiviert und hierbei neue Einblicke hinsichtlich der Ursprungszellen von Shh-abhängigen Medulloblastomen gewonnen. Zuerst konnte gezeigt werden, dass *hGFAP⁺/Math1⁺* Körnerzellvorläuferzellen des Nucleus cochlearis empfänglich für onkogene Transformation nach konstitutiver Aktivierung des Shh-Signalwegs sind. Hierbei repräsentiert diese Vorläuferpopulation einen bis dato unbekanntem Ursprung für Shh-abhängige Medulloblastome, da man bisher nur erkannt hatte, dass diese Subgruppe des Medulloblastoms von Körnerzellvorläufern des Cerebellums ausgeht (Goodrich et al., 1997; Schüller et al., 2008; Yang et al., 2008). Darüber hinaus konnten wir belegen, dass eine Fraktion humaner Medulloblastome mit einem SHH-Profil tatsächlich in engem Kontakt zum Nucleus cochlearis im dorsalen Hirnstamm wuchs.

Die Rautenlippe ist ein Keimepithel am dorsalen Rand des Rautenhirns, dessen Derivate sowohl Teile des Cerebellums als auch des Hirnstamms bilden (Funfschilling and Reichardt, 2002; Wang et al., 2005; Wingate, 2001). Dieses Keimepithel wird, abhängig von der anatomischen Zugehörigkeit der gebildeten Zellen, in zwei unterschiedliche Hauptbereiche eingeteilt. Während die obere Rautenlippe (URL, upper rhombic lip) verschiedene Zelltypen des Kleinhirns wie die Körnerzellen generiert, stammen von der unteren Rautenlippe (LRL, lower rhombic lip) diverse Zelltypen des Hirnstamms ab (Abbildung 4.1) (Farago et al., 2006; Landsberg et al., 2005; Machold and Fishell, 2005; Ray and Dymecki, 2009). Hierbei kann die untere Rautenlippe weiter in den auditorischen und präcerebellären Bereich eingeteilt werden. Bisher konnte für zwei verschiedene Zellpopulationen aus der Rautenlippe eine Beteiligung bei der Entstehung von Medulloblastomen gezeigt werden. Während Shh-assoziierte Medulloblastome von Körnerzellvorläufern des Cerebellums aus der oberen Rautenlippe abstammen (Schüller et al., 2008), ist eine Vorläuferpopulation in der präcerebellären Rautenlippe, deren Abkömmlinge in die Grey Brückenkerne im ventralen Hirnstamm wandern, der zelluläre Ursprung für Wnt-assoziierte Medulloblastome (Gibson et al., 2010). Die Arbeit von *Gibson et al.* hat

zum ersten Mal einen experimentellen Beweis erbracht, dass Medulloblastome, die sich in ihrem globalen Expressionsprofil unterscheiden, von unterschiedlichen Ursprungszellen abstammen. Nichts desto trotz waren zu diesem Zeitpunkt noch zwei entscheidende Fragestellungen unbeantwortet. Zum einen gibt es basierend auf dem globalen Genexpressionprofil vier Subgruppen des Medulloblastoms (SHH, WNT, Gruppe 3 und Gruppe 4) (Taylor et al., 2012). Jedoch sind bisher nur Ursprungszellen für die SHH- und WNT-assoziierten Medulloblastome identifiziert worden. Mögliche Ursprungszellen für die Gruppe 3 und Gruppe 4 Medulloblastome sind bisher unbekannt. Zum anderen war bisher unklar, ob verschiedene Zellpopulationen als Ursprung für Medulloblastome einer molekularen Subgruppe fungieren können. Die Identifizierung von möglichen Ursprungszellen für Gruppe 3 und Gruppe 4 Tumore ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Wir zeigen in dieser Arbeit, dass Medulloblastome einer molekularen Subgruppe (Shh-Subgruppe) zumindest in der Maus von zwei unterschiedlichen Körnerzellvorläuferpopulationen im Cerebellum oder im dorsalen Hirnstamm abstammen (Abbildung 4.1). Zusätzlich zu unseren Ergebnissen in transgenen Mäusen konnten wir zeigen, dass humane SHH-assoziierte Medulloblastome nicht notwendigerweise in den cerebellären Hemisphären lokalisiert sein müssen, wie das in einer kürzlich publizierten Arbeit angedeutet wurde (Gibson et al., 2010). Tatsächlich beweisen unsere Daten, dass Medulloblastome mit desmoplastischer Histologie, welche normalerweise ein SHH-Profil aufweisen, auch in der cerebellären Mittellinie (60 % aller Tumore) lokalisiert sein können. Dies untermauert vorherige Ergebnisse, nach denen 64 % desmoplastischer Medulloblastome in der Mittellinie lokalisiert sind (Rutkowski et al., 2010). Interessanterweise war die Fraktion von desmoplastischen Mittellinien-Medulloblastomen in einer weiteren Kohorte deutlich geringer (Bühren et al., 2000). Hier lag der Altersmedian der Patienten jedoch bei über 20 Jahren, wohingegen der Altersmedian in der Kohorte von *Rutkowski et al.* bei 1,8 Jahren und in unserer Kohorte bei 8,5 Jahren lag. Offensichtlich zeigen desmoplastische Medulloblastome in jungen Patienten vermehrt eine Lokalisation in der cerebellären Mittellinie, was auch in Abbildung 3.7A zum Ausdruck kommt. In der uns zur Verfügung stehenden Tumorkohorte konnten wir darüber hinaus jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Überlebensstatistik der Patienten identifizieren, wenn diese basierend auf der Lokalisation der Tumore in Relation zum Nucleus cochlearis (Kontakt oder kein Kontakt) in zwei Gruppen eingeteilt wurden

(Appendix Abbildung 6.1B - D). Die Tatsache, dass desmoplastische Medulloblastome im Kindesalter vermehrt einen klaren Kontakt zum Nucleus cochlearis aufweisen, sollte bei der chirurgischen Resektion dieser Tumore das Augenmerk speziell auf den dorsalen Hirnstamm und hier auf den Nucleus cochlearis lenken.

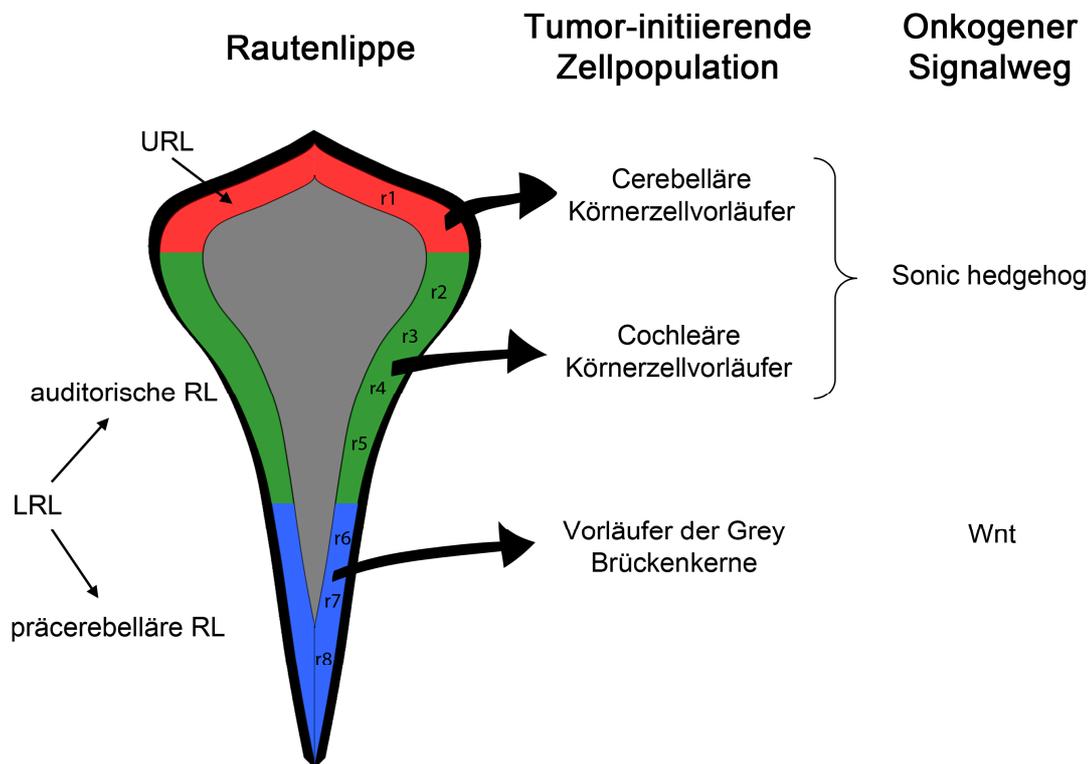


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der embryonalen Rautenlippe mit nachgewiesenen Ursprungszellen für Medulloblastome. Shh-assoziierte Medulloblastome stammen entweder von cerebellären Körnerzellvorläufern der oberen Rautenlippe (URL, upper rhombic lip) oder cochleären Körnerzellvorläufern der auditorischen Rautenlippe (RL) im Bereich der unteren Rautenlippe (LRL, lower rhombic lip) ab. Wnt-assoziierte Medulloblastome haben ihren Ursprung in Vorläuferzellen der präcerebellären Rautenlippe. r1 - r8 (Rhombomer 1 - 8).

Eine Limitierung unserer Auswertung stellt die Tatsache dar, dass wir unsere Tumorkohorte basierend auf histologischen Befunden ausgewählt haben, da für eine Vielzahl von humanen Tumorgeweben keine globalen Genexpressionsprofile zur Verfügung stehen. Es ist also theoretisch möglich, dass die von uns beschriebenen 21 Fälle von desmoplastischen Medulloblastomen mit Kontakt zum Nucleus cochlearis (Abbildung 3.7B) in Wahrheit keine Aktivierung des SHH-Signalwegs aufweisen. Dies erscheint aber äußerst unwahrscheinlich, da in einer kürzlich untersuchten Kohorte von 29 desmoplastischen Medulloblastomen 20 Tumore (69%) tatsächlich ein SHH-Profil aufwiesen (Cho et al., 2011). Zusätzlich konnten wir

exemplarisch für einen Tumor aus unserer Kohorte mit Kontakt zum Nucleus cochlearis zeigen, dass dieser tatsächlich eine pathologische Aktivierung des SHH-Signalwegs besaß (Abbildung 3.7E). Insofern gehen wir davon aus, dass zumindest ein Teil der von uns untersuchten Tumore mit Kontakt zum Hirnstamm zur Subgruppe des SHH-assoziierten Medulloblastome gehört.

Die augenscheinliche Ähnlichkeit Shh-abhängiger Medulloblastome des Kleinhirns mit denen des Hirnstamms in der Maus in Bezug auf das histologische Erscheinungsbild und die Expression allgemeiner Tumormarker (Abbildung 3.6) scheint die Analogie von cerebellären und cochleären Körnerzellvorläufern widerzuspiegeln (Bahn et al., 1997; Mugnaini et al., 1980; Varecka et al., 1994). Interessant ist jedoch, dass diese Tumorentitäten unterschiedlichen zellulären Ursprungs sich in Bezug auf ihr globales Expressionsprofil signifikant unterscheiden. In diesem Bezug sollte erwähnt werden, dass, obwohl humane Medulloblastome basierend auf ihrem Genexpressionsprofil mittlerweile in vier molekulare Subgruppen eingeteilt werden (Taylor et al., 2012), dies nur eine sehr grobe Einteilung ist und bereits ein beträchtliches Maß an Heterogenität innerhalb einzelner molekularer Subgruppen beschrieben wurde. Im Besonderen wurden für humane SHH-assoziierte Medulloblastome zwischen Fällen im Kindesalter und in erwachsenen Patienten bereits Unterschiede auf molekularer Ebene und in Bezug auf klinische Parameter beschrieben (Northcott et al., 2011a). Die von uns gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass Unterschiede in SHH-assoziierten Medulloblastomen in Bezug auf Lokalisation, Symptomatik und molekularen Expressionsprofilen durch unterschiedliche zelluläre Ursprünge hervorgerufen werden.

4.2 CBP-Mutationen identifizieren eine Untergruppe SHH-assoziierter Medulloblastome mit schlechter Prognose

4.2.1 Zelluläre Funktion von CBP

In diesem Projekt konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Expression des transkriptionellen Ko-Aktivators Cbp essentiell für die normale Entwicklung des murinen Cerebellums ist. Interessanterweise scheint Cbp während verschiedener Entwicklungsstadien der cerebellären Körnerzellen unterschiedliche Aufgaben zu übernehmen. So scheint die kontinuierliche Cbp-Expression von der frühen embryonalen bis in die postnatale Entwicklung wichtig für das Überleben der Körnerzellvorläufer und die Migration aus der äußeren in die innere Körnerzellschicht von entscheidender Bedeutung zu sein. Eine wichtige Rolle nimmt hierbei offensichtlich die Cbp-regulierte Expression des Neurotrophins Bdnf ein. Bdnf wird während der postnatalen Entwicklung in Körnerzellvorläufern und reifen Körnerzellen exprimiert (Borghesani et al., 2002; Rocamora et al., 1993; Wetmore et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, dass die Bdnf-Expression im cerebellären Kortex einen chemotaktischen Gradient bildet und somit die Migration von Körnerzellvorläufern im Kleinhirn reguliert (Zhou et al., 2007). In der Tat zeigen Bdnf-Knockout Mausmodelle, dass Bdnf-defiziente cerebelläre Körnerzellen neben einer erhöhten Apoptoserate auch ein gestörtes Migrationsverhalten aufweisen (Borghesani et al., 2002; Sadakata et al., 2007; Schwartz et al., 1997). Die Ähnlichkeiten dieser Mausmodelle mit unserem Modell zusammen mit dem hier beschriebenen Cbp-regulierten Bdnf-Knockdown belegen, dass Cbp in cerebellären Körnerzellvorläufern für die Expression von Bdnf verantwortlich ist und somit die postnatale Migration reguliert. Dies wird durch die Tatsache bestätigt, dass das normale Migrationsverhalten Cbp-defizienter Körnerzellen durch die Zugabe von BDNF *in vitro* wieder hergestellt werden konnte. Des Weiteren konnte die Regulation der Bdnf-Expression durch Cbp in Neuronen bereits an anderer Stelle gezeigt werden und untermauert somit die hier präsentierten Daten (Caccamo et al., 2010).

Neben der Tatsache, dass der frühe, embryonale Verlust von Cbp die proliferative Aktivität von Körnerzellen nicht zu beeinträchtigen scheint, konnte in dieser Arbeit weiterhin gezeigt werden, dass Cbp zeitspezifisch während der postnatalen Entwicklung der cerebellären Körnerzellvorläufer deren Proliferation reguliert. So führt der Verlust von Cbp sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer gesteigerten

beziehungsweise verlängerten Proliferation dieser neuronalen Vorläuferpopulation. Interessanterweise bewirkt der induzierte Cbp-Verlust während der postnatalen Entwicklung keine erhöhte Apoptoserate, wie das nach einem frühen Verlust von Cbp der Fall ist. Dies lässt abermals vermuten, dass Cbp verschiedenste Aufgaben während der Entwicklung cerebellärer Körnerzellen in einer definierten zeitlichen Abfolge ausführt und somit eine Cbp-Mutation in verschiedenen Stadien der Körnerzellentwicklung unterschiedliche Auswirkungen nach sich zieht. Frühere Studien an *Bdnf*-Knockout Tieren haben gezeigt, dass der chronische Verlust von *Bdnf* in Körnerzellvorläufern aufgrund der gestörten Migration zu einer verlängerten Proliferation in der äußeren Körnerzellschicht führt (Choi et al., 2005). Der Grund für das Ausbleiben dieser verlängerten Proliferation in unserem Mausmodell mit chronischem Cbp-Verlust ist bisher unklar.

4.2.2 Bedeutung von *CBP*-Mutationen für die Entstehung und Progression SHH-assoziiierter Medulloblastome

Ausgehend von den Auswirkungen des Cbp-Verlusts während der normalen Entwicklung der cerebellären Körnerzellen können verschiedene Theorien abgeleitet werden, inwiefern die inaktivierenden *Cbp*-Mutationen die Entstehung von Shh-abhängigen Medulloblastomen beeinflussen können. So ist bekannt, dass Körnerzellvorläufer in der äußeren Körnerzellschicht, welche als proliferative Nische ein besonderes Milieu für die Zellen darstellt, stark proliferieren und in der Folge in die innere Körnerzellschicht einwandern (Wechsler-Reya and Scott, 1999a). Können die Körnerzellen aufgrund eines genetischen Defekts diese Nische durch radiale Migration nicht verlassen, kommt es zu einer verlängerten Proliferation (Choi et al., 2005). Dies führt zu einem längeren Verbleiben der Zellen in einer proliferativen Nische, in der die Differenzierung der Zellen verhindert wird. Somit bleiben die Zellen vermutlich empfänglicher für potentiell transformierende Ereignisse wie zum Beispiel Mutationen in Komponenten des Shh-Signalwegs. In der Tat konnte gezeigt werden, dass Genmutationen, welche die normale Migration der cerebellären Körnerzellen behindern, im Zusammenspiel mit einer onkogenen Transformation einen positiven Einfluss auf die Tumorzinzidenz und Malignität der entstehenden Tumoren haben (Farioli-Vecchioli et al., 2012; Garcia et al., 2013). Vor diesem Hintergrund ist denkbar, dass allein die Cbp-vermittelte Migrationsstörung in *Math1-cre::Cbp^{F/F}* Tieren mit chronischem Cbp-Verlust einen positiven Effekt auf die Ausbildung Shh-assoziiierter Medulloblastome hätte. Inwieweit hier die Tatsache, dass CBP-

Mutationen hauptsächlich in adulten SHH-assoziierten Medulloblastomen auftauchen, eine Rolle spielt, ist weiterhin unklar. Es ist bereits bekannt, dass die Mutationsrate in Tumoren von adulten Patienten höher liegt als bei jungen Patienten (Pugh et al., 2012). Die Theorie dahinter ist, dass Tumore in jungen Patienten von Vorläuferpopulationen abstammen, die einen geringen Differenzierungsgrad aufweisen und in denen möglicherweise eine einzige onkogene Mutationen bereits zur Tumorbildung führen kann. Dies konnte für die Entstehung von Shh-abhängigen Medulloblastomen durch eine konstitutive Aktivierung des Shh-Signalwegs aus cerebellären Körnerzellen bereits gezeigt werden (Schüller et al., 2008). In adulten Patienten hingegen nimmt, abgesehen von etwaigen Stammzellpopulationen, der Differenzierungsgrad zu, weshalb unter Umständen eine einzige onkogene Mutation nicht mehr suffizient für die Tumorentwicklung ist. So ist es ab einem bestimmten Punkt während der postnatalen Entwicklung von cerebellären Körnerzellen nicht mehr möglich, durch eine Aktivierung des Shh-Signalwegs einen Tumor zu induzieren (Yang et al., 2008). BDNF ist essentiell für die Differenzierung verschiedener neuronaler Vorläuferpopulationen (Ahmed et al., 1995; Chen et al., 2013; Ventimiglia et al., 1995; Waterhouse et al., 2012). Es ist vorstellbar, dass eine *CBP*-Mutation über den Knockdown von BDNF adulte cerebelläre Körnerzellen in ein Stadium geringerer Differenzierung versetzt oder zumindest Vorläuferzellen für längere Zeit in einem unreifen Stadium hält, in dem die Zellen empfänglich für eine Mutation des SHH-Signalwegs bleiben. Dies würde durch die Beobachtung gestützt werden, dass in unserem Tumormodell der *Cbp*-Knockout zu einer erhöhten Tumorzinzidenz im Gegensatz zu Kontrolltieren führte. Es ist zu vermuten, dass in den Kontrolltumortieren ein großer Anteil der Körnerzellvorläufer in ihrer Differenzierung schon zu weit fortgeschritten war und deswegen nicht mehr empfänglich für die Aktivierung des Shh-Signalwegs war. Dies führte dazu, dass nicht alle Kontrolltumortiere einen Tumor entwickelten. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Tumorzinzidenz in Tumortieren mit *Cbp*-Knockout könnte sein, dass der Verlust von *Cbp* die Körnerzellvorläufer in einem unreifen Entwicklungsstadium hält und die Zellen deswegen empfänglicher für die Aktivierung des Shh-Signalwegs bleiben. Jedoch muss diese Theorie im Detail überprüft werden.

Eine weitere Möglichkeit der positiven Regulation der Tumorentstehung wäre, dass der *Cbp*-Verlust in cerebellären Körnerzellvorläufern direkt oder indirekt den Zellzyklus der Zellen reguliert und somit deren Proliferationsrate ansteigen lässt. In

der Tat lassen die hier vorgestellten Ergebnisse vermuten, dass der akute Verlust von Cbp in postnatalen Körnerzellen, möglicherweise über den Knockdown von Bdnf, indirekt zu einer gesteigerten Proliferation führt. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für *Math1-creER^{T2}::Cbp^{F/FI}* Tiere nach dem Tamoxifen-vermitteltem Verlust von Cbp an P5 belegt werden. Um den Einfluss des akuten Cbp-Verlusts vor dem Hintergrund einer onkogenen Transformation zu untersuchen, wurde ein induzierbares Tumormodell entwickelt, welches die konditionelle Aktivierung des Shh-Signalwegs in postnatalen Körnerzellvorläufern und einen gleichzeitigen Knockout von Cbp ermöglichte. Hier zeigte sich, dass die Proliferations-steigernde Wirkung des Cbp-Verlusts auch in der tumorigenen Situation zum Tragen kommt und die Proliferationsrate von Tumorzellen, welche aus postnatalen cerebellären Körnerzellvorläufern hervorgehen, signifikant gesteigert wird. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass die gesteigerte Proliferation während der Tumorigenese sowohl in der Maus als auch im Menschen durch eine negative Regulation der Bdnf-Expression ausgelöst wird und somit signifikant zur schlechteren Prognose der Tiere beziehungsweise der Patienten beiträgt. Die Tatsache, dass es in unserem Mausmodell nur zu einem insuffizienten Verlust des Cbp-Proteins gekommen ist, dies aber dennoch zu einem signifikant schlechteren Überleben der Tiere führte, bekräftigt nochmals die massiv tumorigene Wirkung des Cbp-Verlusts.

Neurotrophine und ihre Rezeptoren spielen während der normalen Entwicklung des Cerebellums eine entscheidende Rolle und wurden deshalb vielfach mit der Entstehung des Medulloblastoms in Verbindung gebracht. Das zeitliche Expressionsmuster lässt vermuten, dass Bdnf und sein Rezeptor TrkB (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2) eine Funktion während der Proliferationsphase der cerebellären Körnerzellen in der EGL einnehmen, während Neurotrophin-3 (NT-3) und sein Rezeptor TrkC (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3) eine Rolle bei der terminalen Differenzierung dieser Zellen einzunehmen scheinen (Rocamora et al., 1993; Segal et al., 1992). Die Expression von Neurotrophinen im Medulloblastom scheint von besonderer Bedeutung zu sein, da die Expression des NT-3 Rezeptors TrkC mit einer signifikant besseren Prognose für Patienten einhergeht (Grotzer et al., 2000; Segal et al., 1994). Eine mögliche Interpretation dieses Zusammenhangs wäre, dass Medulloblastome mit einer besseren Prognose von differenzierteren Körnerzellvorläufern abstammen (Pomeroy et al., 1997). Insofern würde TrkC lediglich als Marker dienen und hätte keine signifikante biologische Funktion für die

Tumorzellen. Die Expression von Neurotrophinen könnte jedoch einen direkten Einfluss auf die Tumorzellen haben, indem sie ein weniger aggressives Wachstum des Tumors induzieren. Tatsächlich lassen die hier gezeigten Daten vermuten, dass die niedrige Expression des Neurotrophins Bdnf einen direkten Einfluss auf das Wachstum von Medulloblastomzellen hat und dass diese niedrige Expression maßgeblich durch den Verlust von Cbp reguliert wird.

Bisher unklar ist, inwieweit die tatsächlichen Proteinlevel an funktionellem Cbp die Tumorigenese beeinflussen. Heterozygote Mutationen von *CBP* in Patienten mit Rubinstein-Taybi Syndrom (RTS) haben zu der Annahme geführt, dass reduzierte Proteinlevel an CBP die Ursache für die Ausbildung von RTS im Menschen sind (Petrij et al., 1995). Mäuse mit einem konventionellen homozygoten Verlust von beiden *CBP*-Allelen versterben embryonal (Oike et al., 1999a; Tanaka et al., 1997). Im Gegensatz dazu führt der Verlust von einem *CBP*-Allel zur Ausbildung von verschiedenen Phänotypen, die dem humanen RTS sehr ähnlich sind (Tanaka et al., 1997). Dies belegt den Mechanismus der Haploinsuffizienz, also die Tatsache, dass zwei funktionelle *CBP*-Allele für die normale Entwicklung benötigt werden. Interessanterweise präsentieren Mäuse, welche heterozygot eine verkürzte Form des CBP-Proteins exprimieren, einen deutlich auffälligeren Phänotyp als Tiere mit einer heterozygoten Null-Mutation (Oike et al., 1999a). Dies legt die Vermutung nahe, dass bestimmte CBP-Mutationen auch dominant-negativ wirken und somit die Funktionsfähigkeit des verbleibenden CBP-Proteins beeinträchtigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer heterozygoten Null-Mutation von *Cbp* eine erhöhte Tumorinzidenz im hämatopoetischen System aufweisen, wobei es in diesen Tumoren aber zum spontanen Verlust des zweiten CBP-Allels kommt (Kung et al., 2000). Während also in der Maus ein heterozygoter Verlust von Cbp zur Ausbildung RTS-ähnlicher Phänotypen führt, ist die Tumorigenese in diesen Tieren jedoch mit einem kompletten Funktionsverlust beider *Cbp*-Allele verbunden. Dieser Zusammenhang konnte für das humane System bisher nicht bestätigt werden. So zeigen RTS-Patienten zwar eine klare Prädisposition für bestimmte maligne Tumore des Zentralen Nervensystems (Miller and Rubinstein, 1995), jedoch konnte für diese Fälle bisher keine Bestätigung des Verlusts des zweiten *CBP*-Allels demonstriert werden. Die hier vorgestellten Daten lassen vermuten, dass lediglich der homozygote Verlust von Cbp in cerebellären Körnerzellen eine Rolle bei der Entstehung Shh-assoziiertes Medulloblastome spielt. So handelt es sich bei der in

unserem Mausmodell generierten Cbp-Mutante zwar um eine verkürzte Form des Wildtyp-Cbp-Proteins, welche potentiell dominant-negativ wirken könnte. Hierfür konnten aber weder in der normalen Entwicklung des Cerebellums noch während der Entstehung Shh-assoziiierter Medulloblastome Beweise gefunden werden. Im klaren Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse, dass die hier gezeigten *CBP*-Mutationen aus humanen SHH-assoziierten Medulloblastomen jeweils nur ein *CBP*-Allel betreffen und somit kein homozygoter Funktionsverlust von CBP in diesen Tumoren zu erwarten ist. Wir schließen daraus, dass bei der Entstehung humaner SHH-abhängiger Medulloblastome CBP im Gegensatz zum murinen System entweder haploinsuffizient wirkt oder die hier gezeigten CBP-Mutationen dominant-negativ die Funktion des verbleibenden CBP-Proteins beeinträchtigen.

CBP-Mutationen scheinen eine Untergruppe von SHH-assoziierten Medulloblastomen mit schlechter Prognose zu identifizieren. In Anbetracht dessen könnte das Wissen über die molekularen Mechanismen dieser Mutationen eine Reihe neuer therapeutischer Ansatzpunkte hervorbringen. Die hier gezeigten Daten zeigen, dass die *CBP*-Mutationen über eine negative Regulation der *BDNF*-Expression wirken. Dies lässt den Einsatz von BDNF als therapeutisches Mittel möglich erscheinen. Tatsächlich wurden die therapeutischen Effekte von BDNF im Zusammenhang verschiedenster neurodegenerativer Erkrankungen bereits in mehreren klinischen Studien untersucht. So konnte ein möglicher Nutzen von BDNF beziehungsweise BDNF-induzierender Chemikalien in der Therapie der Alzheimer Krankheit (Blurton-Jones et al., 2009; Nagahara et al., 2009; Tuszynski et al., 2005), der Parkinson Krankheit (Marks et al., 2008; Tsukahara et al., 1995), der Huntington Krankheit (Simmons et al., 2009) und der amyotrophen Lateralsklerose (Massa et al., 2010) gezeigt werden. Die hier generierten Daten zeigen, dass *in vitro* die im Vergleich zu Kontrolltumorzellen gesteigerte Proliferation Cbp-defizienter Tumorzellen mittels Zugabe von BDNF reduziert werden kann. Es kann spekuliert werden, ob BDNF oder BDNF-induzierende Agenzien wie Ampakine oder Lithium (Leyhe et al., 2009; Simmons et al., 2009) in der Lage sind, die Proliferationsrate und somit die Malignität CBP-defizienter Medulloblastome einzuschränken. Als weiterer therapeutischer Ansatz wären Inhibitoren von Histon-Deacetylasen (HDACs) denkbar. Da CBP als Histonacetylase wirkt und der Verlust von CBP zu einer Hypoacetylierung des Chromatin führt (Valor et al., 2011), könnte man dieser Hypoacetylierung zumindest in frühen Stadien mit der Inhibition von HDACs

entgegenwirken. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine hohe Aktivität von verschiedensten HDACs essentiell für die Entstehung Shh-abhängiger Medulloblastome ist und deren Inhibition das Wachstums dieser Tumore massiv einschränkt (Lee et al., 2013). Analog dazu belegen weitere Studien einen anti-tumorigenen Effekt von HDAC-Inhibitoren (Lee et al., 2011; Li et al., 2005). Erste Versuche eines kombinatorischen Therapieansatzes an einer humanen Medulloblastomzelllinie mit BDNF und einem HDAC-Inhibitor konnten vielversprechende Ergebnisse erzielen (Nör et al., 2011).

5 Ausblick

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Hirntumor im Kindesalter. Noch immer versterben viele Patienten an dieser Krankheit oder werden in ihrer Lebensqualität durch Nebenwirkungen der Therapieansätze massiv eingeschränkt. Für die Entwicklung personalisierter Therapieformen ist es notwendig, die molekularen Mechanismen zu verstehen, welche zu unterschiedlichen Ausprägungen dieser Krankheit führen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass SHH-assoziierte Medulloblastome aus verschiedenen Ursprungszellen der hinteren Schädelgrube hervorgehen können. Dies hat vornehmlich Auswirkungen auf die operative Entfernung des Tumorgewebes. Hierbei belegen die hier generierten Daten, dass bei der Entfernung SHH-assoziiierter Medulloblastome besonderes Augenmerk auf den dorsalen Hirnstamm gerichtet werden sollte. Während immer mehr spezialisierte Therapieformen wie etwa Smoothed-Inhibitoren zum Einsatz kommen, sollte aufgrund der molekularen Unterschiede Shh-abhängiger Medulloblastome des Cerebellums und des Nucleus cochlearis sichergestellt werden, dass die jeweilige Therapie für den vorhandenen Tumor-Subtyp einen Nutzen vermuten lässt. Als Letztes könnte die hier gezeigte Einschränkung des Hörvermögens von Tumortieren als diagnostisches Mittel in der Humanmedizin Anwendung finden. Da im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen U-Untersuchungen für Kinder auch Hörtests durchgeführt werden, sollte bei Auffälligkeit des Hörvermögens als Differenzialdiagnose das Medulloblastom in Betracht gezogen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten *CBP*-Mutationen als prognostischer Marker identifiziert werden. Die hier generierten Daten legen nahe, Patienten mit einem SHH-assoziierten Medulloblastom mit *CBP*-Mutation als Hochrisikopatienten einzuordnen und dementsprechend eine angepasste Therapieform zu wählen. Darüber hinaus können die vorliegenden Ergebnisse als Grundlage zukünftiger klinischer Studien dienen. Der Nutzen einer spezifischen Behandlung von Shh-abhängigen Medulloblastomen mit *Cbp*-Mutation sollte zuerst im Tumormodell überprüft werden. Hierbei sollten Histon-Deacetylase Inhibitoren und Bdnf-stimulierende Agenzien verwendet werden. Von besonderem Interesse wäre hier die Wirkung von Lithium als Bdnf-stimulierendes Agens, da es bereits als Medikament für die Humanmedizin zugelassen ist. Da *CBP*-Mutationen nicht exklusiv in SHH-

assozierten Medulloblastomen auftreten, sollten weitere Untersuchungen im Mausmodell durchgeführt werden, um die Auswirkungen von *Cbp*-Mutationen auch in weiteren Ursprungszellen des Medulloblastoms genauer zu verstehen.

6 Appendix

Tabelle 6.1 Übersicht aller 205 differentiell exprimierten Gene in murinen Shh-Medulloblastomen des Cerebellums und des Nucleus cochlearis.

Übersicht signifikant differentiell exprimierter Gene in cerebellären und cochleären Shh-Tumoren								
Gen	p-Wert	Hochregulation	Gen	p-Wert	Hochregulation	Gen	p-Wert	Hochregulation
A630043P06	0.00020535	Cerebellärer Tumor	3110082D06Rik	0.00450337	Cerebellärer Tumor	Kcna1	0.00870753	Cerebellärer Tumor
Cnpy1	0.00019784	Cerebellärer Tumor	Mmp24	0.00446164	Cerebellärer Tumor	Calm3	0.00870942	Cerebellärer Tumor
En2	0.00044836	Cerebellärer Tumor	Ano4	0.00464512	Cerebellärer Tumor	Atp1a3	0.00882753	Cerebellärer Tumor
Cln2	0.00038859	Cerebellärer Tumor	Edaradd	0.00475388	Cerebellärer Tumor	Gaa	0.00866238	Cerebellärer Tumor
Snx30	0.001169	Cerebellärer Tumor	Lgr5	0.00484621	Cerebellärer Tumor	Slc7a14	0.00880483	Cerebellärer Tumor
D3Bwg0562e	0.00129157	Cerebellärer Tumor	Lrrc3b	0.00492414	Cerebellärer Tumor	BC030308	0.00877671	Cerebellärer Tumor
Ttyh2	0.00141334	Cerebellärer Tumor	Nr3c1	0.0048835	Cerebellärer Tumor	9530028C05	0.00867614	Cerebellärer Tumor
Tpcn1	0.00150332	Cerebellärer Tumor	Gabrg2	0.00510356	Cerebellärer Tumor	Pdlim4	0.00891251	Cerebellärer Tumor
Kcnj3	0.00147457	Cerebellärer Tumor	Bbox1	0.00510528	Cerebellärer Tumor	Pcdh17	0.00895546	Cerebellärer Tumor
Kcnq5	0.00170513	Cerebellärer Tumor	Cacng5	0.00546338	Cerebellärer Tumor	Serpini1	0.00914548	Cerebellärer Tumor
Gnai1	0.0016671	Cerebellärer Tumor	Pid1	0.00544546	Cerebellärer Tumor	Cplx1	0.00914922	Cerebellärer Tumor
Syp	0.0015411	Cerebellärer Tumor	Car10	0.00587712	Cerebellärer Tumor	Syt2	0.0092412	Cerebellärer Tumor
Scg2	0.0016857	Cerebellärer Tumor	Unc5d	0.0058296	Cerebellärer Tumor	Kcnab1	0.00924931	Cerebellärer Tumor
Bhlhe22	0.00162918	Cerebellärer Tumor	Cux2	0.00584468	Cerebellärer Tumor	Vsnl1	0.00955388	Cerebellärer Tumor
Pip4k2b	0.00171758	Cerebellärer Tumor	Nap113	0.00607891	Cerebellärer Tumor	2810011L19Rik	0.00978681	Cerebellärer Tumor
Hsd11b1	0.00171845	Cerebellärer Tumor	Parva	0.00602101	Cerebellärer Tumor	Phlpp1	0.00984703	Cerebellärer Tumor
Plxna2	0.00164316	Cerebellärer Tumor	2510002D24Rik	0.00597843	Cerebellärer Tumor	4932438A13Rik	0.00984662	Cerebellärer Tumor
Atp1a1	0.00228895	Cerebellärer Tumor	Appl2	0.00625222	Cerebellärer Tumor	Mfng	0.00988975	Cochleärer Tumor
Foxa2	0.00227871	Cerebellärer Tumor	Gabrd	0.00620125	Cerebellärer Tumor	Mthfd2l	0.00995012	Cochleärer Tumor
Snap91	0.00234016	Cerebellärer Tumor	Syt4	0.00632304	Cerebellärer Tumor	Adarb2	0.00923452	Cochleärer Tumor
Ramp2	0.00227009	Cerebellärer Tumor	Arhgap20	0.00631224	Cerebellärer Tumor	Casp4	0.00909366	Cochleärer Tumor
Pxn	0.00254417	Cerebellärer Tumor	Gjd2	0.0063006	Cerebellärer Tumor	Hdac9	0.00875274	Cochleärer Tumor
Ank1	0.00242287	Cerebellärer Tumor	Tll1	0.00636147	Cerebellärer Tumor	Mab21l2	0.00868135	Cochleärer Tumor
Eomes	0.00235391	Cerebellärer Tumor	Cttnbp2	0.00628983	Cerebellärer Tumor	Shkbp1	0.00870054	Cochleärer Tumor
A830039N20Rik	0.00248905	Cerebellärer Tumor	Grid2	0.0063027	Cerebellärer Tumor	Hmxo1	0.00846856	Cochleärer Tumor
Dusp4	0.00242937	Cerebellärer Tumor	Grin2b	0.00625184	Cerebellärer Tumor	Rasd2	0.00820887	Cochleärer Tumor
Gpr50	0.00247663	Cerebellärer Tumor	Hivep3	0.00625616	Cerebellärer Tumor	Map2k6	0.00792267	Cochleärer Tumor
Syt13	0.00254079	Cerebellärer Tumor	Spock1	0.00639135	Cerebellärer Tumor	F13a1	0.00780569	Cochleärer Tumor
Galr1	0.00247155	Cerebellärer Tumor	Rasgef1a	0.00638015	Cerebellärer Tumor	9430085L16Rik	0.00785352	Cochleärer Tumor
Lynx1	0.00255723	Cerebellärer Tumor	Ephb1	0.0063964	Cerebellärer Tumor	Mtap1b	0.00759968	Cochleärer Tumor
Emid1	0.00247645	Cerebellärer Tumor	Chrb4	0.00642186	Cerebellärer Tumor	Msi2	0.00749988	Cochleärer Tumor
Dbc1	0.00253883	Cerebellärer Tumor	Ddah1	0.00651781	Cerebellärer Tumor	Armc10	0.00631754	Cochleärer Tumor
Copg2as2	0.00252479	Cerebellärer Tumor	Rscn1	0.00652884	Cerebellärer Tumor	Fcna	0.00627201	Cochleärer Tumor
Atp1b3	0.00273818	Cerebellärer Tumor	Kcnp4	0.00638274	Cerebellärer Tumor	Epha3	0.00624643	Cochleärer Tumor
Cdh8	0.00305915	Cerebellärer Tumor	Hook1	0.00652068	Cerebellärer Tumor	Sars	0.00629198	Cochleärer Tumor
Celf4	0.00310864	Cerebellärer Tumor	6330509M05Rik	0.00652229	Cerebellärer Tumor	Sgpl1	0.00602842	Cochleärer Tumor
Negr1	0.00293077	Cerebellärer Tumor	Pitpnm3	0.00656364	Cerebellärer Tumor	Pdzr4	0.00584186	Cochleärer Tumor
Rnf185	0.00298337	Cerebellärer Tumor	Stxbp1	0.00682326	Cerebellärer Tumor	C1q3	0.00541211	Cochleärer Tumor
Syt7	0.00299095	Cerebellärer Tumor	Gfra2	0.00687928	Cerebellärer Tumor	P2rx3	0.00548778	Cochleärer Tumor
Ppp1r14c	0.00296015	Cerebellärer Tumor	Slc13a5	0.00683285	Cerebellärer Tumor	Smo	0.00543834	Cochleärer Tumor
Fam69a	0.00290157	Cerebellärer Tumor	Mapt	0.00710654	Cerebellärer Tumor	Itgb2	0.00511552	Cochleärer Tumor
Fam73a	0.00289797	Cerebellärer Tumor	Egfr	0.00719565	Cerebellärer Tumor	Mbnl3	0.00471701	Cochleärer Tumor
Ntf3	0.00313777	Cerebellärer Tumor	Cldn11	0.00733742	Cerebellärer Tumor	Peli1	0.00456018	Cochleärer Tumor
Fstl5	0.00349833	Cerebellärer Tumor	Dlgap1	0.00724053	Cerebellärer Tumor	Chodl	0.00455077	Cochleärer Tumor
Sez6l	0.00348924	Cerebellärer Tumor	Prkce	0.00726984	Cerebellärer Tumor	Vim	0.00443891	Cochleärer Tumor
Fbll1	0.00352275	Cerebellärer Tumor	Eef1a2	0.00739352	Cerebellärer Tumor	Akt1	0.00443027	Cochleärer Tumor
Zfp385b	0.00363896	Cerebellärer Tumor	Ccbe1	0.00757886	Cerebellärer Tumor	Dach1	0.00436269	Cochleärer Tumor
Kcnk1	0.00363459	Cerebellärer Tumor	Pde7b	0.0075431	Cerebellärer Tumor	9630023C09Rik	0.0044187	Cochleärer Tumor
Rimk1a	0.00377529	Cerebellärer Tumor	Ubl3	0.00761641	Cerebellärer Tumor	Odz3	0.00438017	Cochleärer Tumor
Slc19a1	0.00397024	Cerebellärer Tumor	Dos	0.0076039	Cerebellärer Tumor	Lgals1	0.00439471	Cochleärer Tumor
Opcml	0.00403073	Cerebellärer Tumor	Ltp2	0.00772812	Cerebellärer Tumor	Robo3	0.00421079	Cochleärer Tumor
Hhip	0.00411552	Cerebellärer Tumor	Schip1	0.00768174	Cerebellärer Tumor	9430081I23Rik	0.00421019	Cochleärer Tumor
Elmo1	0.00424202	Cerebellärer Tumor	Mbnl2	0.00783921	Cerebellärer Tumor	Rcan2	0.00407404	Cochleärer Tumor
Lgi2	0.00440291	Cerebellärer Tumor	BC034090	0.00784131	Cerebellärer Tumor	6030458A19Rik	0.00401945	Cochleärer Tumor
Kctd8	0.00444818	Cerebellärer Tumor	Ppm1h	0.0077026	Cerebellärer Tumor	Igf2bp3	0.00400519	Cochleärer Tumor
Kank2	0.00444509	Cerebellärer Tumor	Sobp	0.00781686	Cerebellärer Tumor	Lrba	0.00366526	Cochleärer Tumor
Camk2b	0.00436853	Cerebellärer Tumor	Spock2	0.00783632	Cerebellärer Tumor	5730446D14Rik	0.00350869	Cochleärer Tumor
Cadm3	0.00437082	Cerebellärer Tumor	Raly1	0.00784028	Cerebellärer Tumor	Pgm2	0.00349982	Cochleärer Tumor
Anks1b	0.00441149	Cerebellärer Tumor	Slc6a2	0.00790825	Cerebellärer Tumor	Msn	0.00342793	Cochleärer Tumor
Sv2a	0.00436038	Cerebellärer Tumor	C1qtnf4	0.00806986	Cerebellärer Tumor	4833428M15Rik	0.00345131	Cochleärer Tumor
Vldlr	0.00435316	Cerebellärer Tumor	Btbd3	0.00824138	Cerebellärer Tumor	Tubb3	0.00294096	Cochleärer Tumor
Ero1b	0.00433809	Cerebellärer Tumor	Dcaf12l1	0.00823249	Cerebellärer Tumor	Csrp1	0.00247387	Cochleärer Tumor
Sema3e	0.00440223	Cerebellärer Tumor	Cacna2d2	0.00820036	Cerebellärer Tumor	Chn1	0.00234343	Cochleärer Tumor
Ppp2r2b	0.00439881	Cerebellärer Tumor	Diras2	0.00825587	Cerebellärer Tumor	Btbd11	0.00230869	Cochleärer Tumor
Dnajc6	0.00439138	Cerebellärer Tumor	Dner	0.00846515	Cerebellärer Tumor	Tspan18	0.00230393	Cochleärer Tumor
Wbp2	0.00439188	Cerebellärer Tumor	1190002N15Rik	0.00847285	Cerebellärer Tumor	Crip1	0.00165215	Cochleärer Tumor
Csdc2	0.00443403	Cerebellärer Tumor	Pura	0.00850579	Cerebellärer Tumor	Wls	0.00142748	Cochleärer Tumor
Fry	0.00451418	Cerebellärer Tumor	Camta1	0.00850549	Cerebellärer Tumor			
Nhs1l	0.00452269	Cerebellärer Tumor	Neurod2	0.00870907	Cerebellärer Tumor			

Appendix

Tabelle 6.2 Übersicht aller Patienten aus der Tumorkohorte zur Tumorlokalisierung mit klinischen Parametern. Tumorlokalisierung: 1=Hemisphäre, 2=Hemisphäre und Wurm, 3=Wurm, 4=nur 4. Ventrikel. M0=keine Metastasen, M2/M3=makroskopische Metastasen. R0=mikroskopisch tumorfreier Rand, R1=mikroskopisch nachweisbarer Tumorrest, R2=makroskopisch nachweisbarer Tumorrest.

Patient	Alter [Jahre]	Tumorlokalisierung		Metastasen	Resektion	Status	Begutachtungszeitraum [Jahre]
		Hemisphäre/Mittellinie	Cochlearis-Kontakt				
1	3.82	3	ja	M0	R1	lebend	3.26
2	6.93	1	ja	unklar	RO	tot	1.21
3	6.25	3	ja	M2/M3	R2	lebend	7.59
4	2.01	2	ja	M2/M3	RO	tot	0.1
5	0.83	3	nein	M0	R1	lebend	0.97
6	20.94	3	nein	M0	RO	lebend	1.27
7	7.57	3	ja	M0	RO	lebend	2.89
8	16.08	1	nein	M0	RO	lebend	3.83
9	1.11	3	ja	M0	RO	lebend	2.43
10	11.16	3	nein	M2/M3	R1	lebend	1.96
11	4.18	3	nein	M0	RO/R1	lebend	2.72
12	15.11	1	nein	M0	RO	lebend	2.11
13	7.18	1	nein	M0	RO	tot	2.34
14	1.98	3	nein	M0	unklar	lebend	3.47
15	1.43	3	nein	M2/M3	unklar	tot	0.75
16	3.55	4	ja	M0	unklar	tot	1.24
17	15.78	1	nein	M0	unklar	lebend	2.71
18	16.17	2	nein	M2/M3	R2	tot	1.42
19	18.6	1	nein	M0	unklar	lebend	4.04
20	10.32	3	ja	M0	RO	lebend	0.23
21	18.99	1	nein	M0	RO	lebend	6.44
22	3.2	2	nein	M2/M3	RO	lebend	7.07
23	15.58	1	nein	M0	R2	tot	1.69
24	16.59	1	nein	M0	RO	lebend	0.48
25	9.21	3	nein	M0	R1	tot	4.13
26	7.15	3	ja	M0	RO	lebend	6.37
27	7.5	2	nein	M0	R1	lebend	3.48
28	1.55	3	nein	M0	RO	lebend	4.1
29	4.12	4	ja	M2/M3	R1	lebend	2.29
30	13.23	1	nein	unklar	R2	lebend	0.19
31	11.01	1	nein	M0	RO	lebend	5.22
32	4.47	1	nein	M2/M3	R2	tot	1.48
33	10.17	1	nein	unklar	unklar	tot	0.48
34	19.78	1	nein	M0	RO	lebend	2.84
35	11.35	1	nein	M2/M3	RO	lebend	3.89
36	11.58	1	nein	M0	RO	lebend	4.2
37	16.05	3	nein	unklar	RO	lebend	2.68
38	5.59	4	ja	M2/M3	RO	lebend	5.35
39	3.49	1	ja	M2/M3	R2	lebend	3.43
40	2.19	2	nein	M0	RO	lebend	2.43
41	16.26	1	nein	M0	RO	lebend	3.99
42	10.88	4	ja	M0	R2	lebend	3.6
43	15.95	1	nein	M0	RO	lebend	3.32
44	4.11	1	nein	M0	RO	tot	0.99
45	13.51	3	nein	M2/M3	RO	tot	3.17
46	12.59	1	nein	unklar	unklar	lebend	1.09
47	4.47	2	nein	M2/M3	RO	lebend	5.53
48	1.99	3	nein	M2/M3	RO	lebend	0.9
49	8.46	3	ja	M2/M3	RO	lebend	6.42
50	6.71	1	nein	M2/M3	RO	lebend	7.03
51	8.73	4	ja	M0	R1	lebend	1.24
52	8.72	3	ja	M0	RO	lebend	0.98
53	2.72	2	nein	M0	R2	lebend	2.68
54	18.91	3	ja	M2/M3	RO	lebend	7.29
55	9.08	3	ja	M2/M3	R1	lebend	2.5
56	3.42	1	nein	M0	RO	lebend	4.01
57	19.01	2	nein	M0	RO	tot	5.1
58	1.13	3	nein	M0	R1	lebend	5.43
59	14.79	3	ja	M2/M3	RO	lebend	5.19
60	1.57	1	nein	M0	unklar	lebend	4.07
61	3.15	3	ja	M0	RO	lebend	5.86
62	2.74	4	ja	M2/M3	unklar	lebend	0.77
63	13.07	1	nein	M2/M3	unklar	tot	4.63

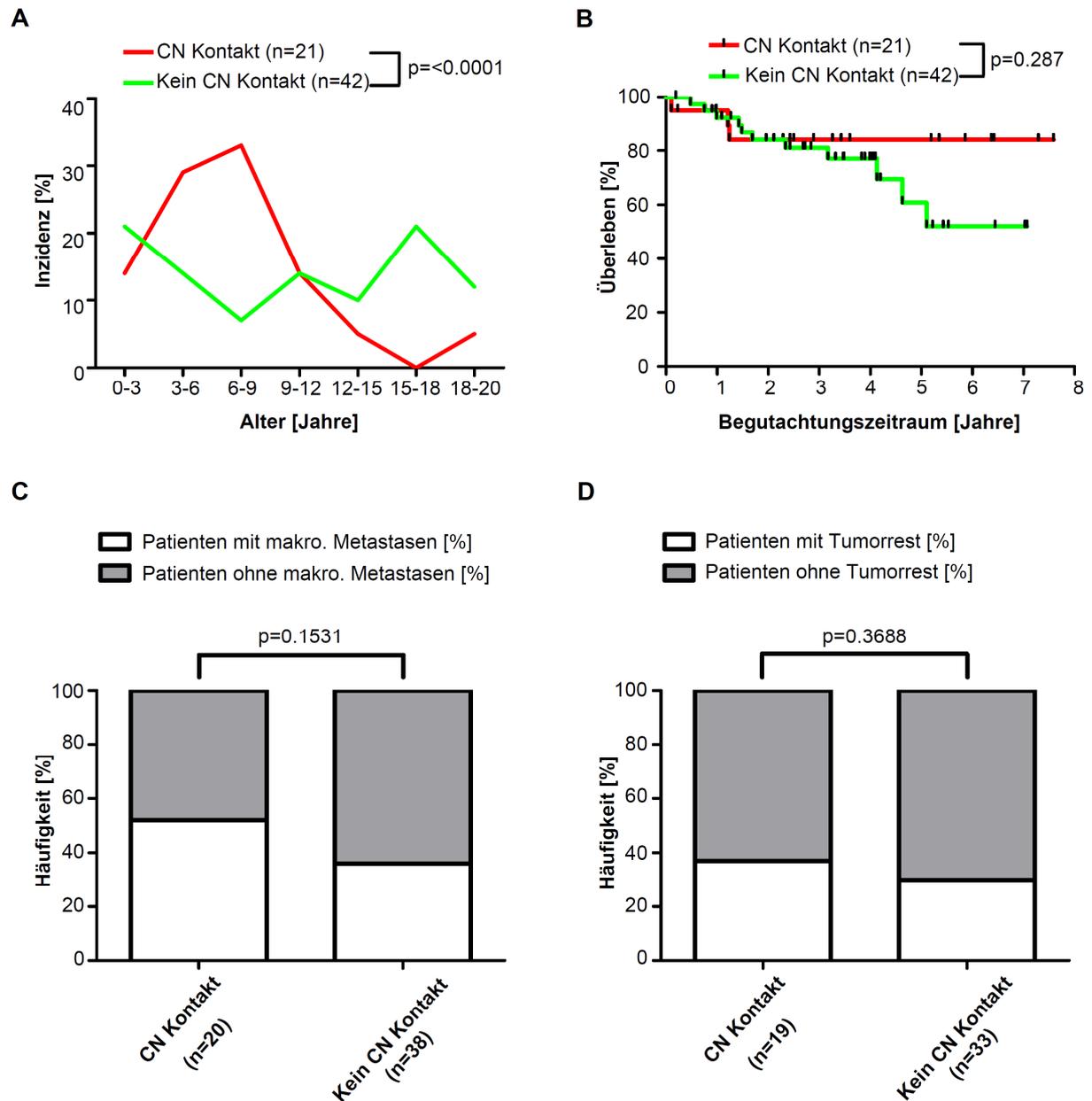


Abbildung 6.1 Klinische Parameter humaner desmoplastischer Medulloblastome. Altersverteilung von Medulloblastompatienten aus unserer Tumorkohorte mit oder ohne Kontakt zum Nucleus cochlearis (A). Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier eingeteilt nach der Lokalisation des Tumors (B). Metastasenstatus (C) und Resektionsstatus (D) von Patienten mit Medulloblastomen mit oder ohne Kontakt zum Nucleus cochlearis. Nicht für alle Patienten standen die entsprechenden Daten zur Verfügung, was zu einer Verringerung der Fallzahlen bei Metastasen- und Resektionsanalyse führte.

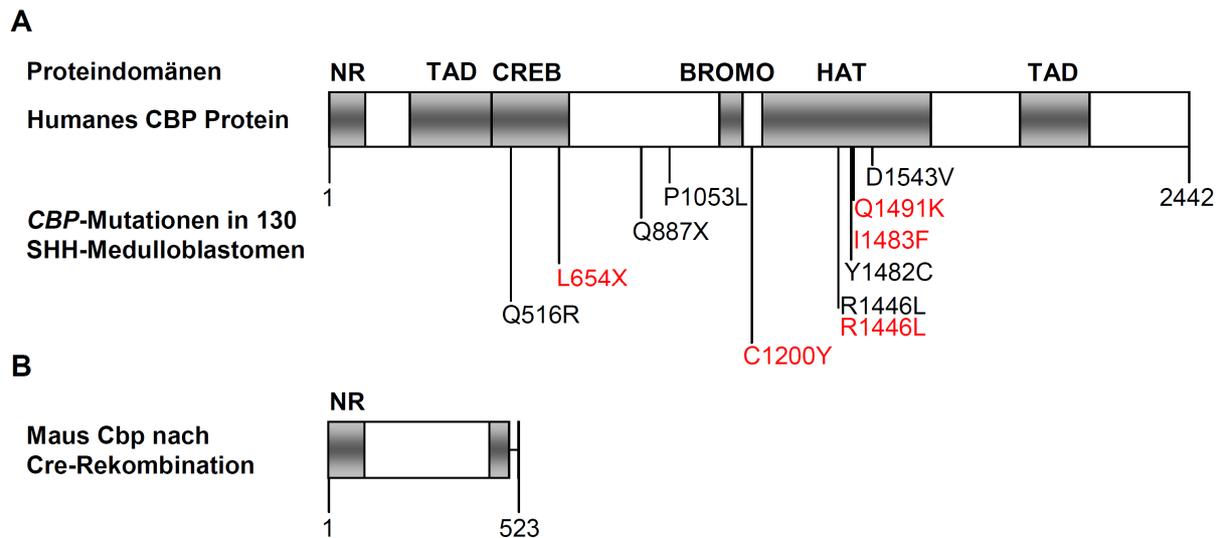


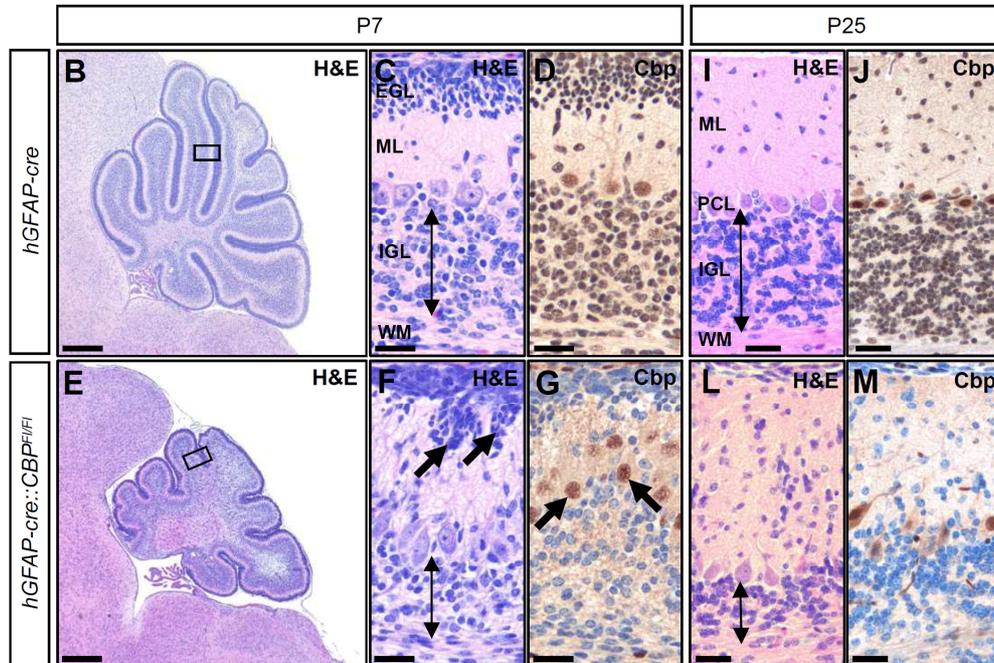
Abbildung 6.2 Übersicht identifizierter *CBP*-Mutationen in humanen SHH-Medulloblastomen. Schematische Darstellung des humanen *CBP*-Proteins mit angezeigten Mutationen (A). Die in rot dargestellten Mutationen stammen von Medulloblastomen aus adulten Patienten, von denen Genexpressionsprofile im Rahmen der R2-Datenbank zur Verfügung standen. Darstellung des verkürzten *Cbp*-Proteins, welches nach Cre-Rekombination in den von uns genutzten Mausmodellen translatiert wird (B).

Tabelle 6.3 Übersicht der identifizierten *CBP*-Mutationen in 130 humanen SHH-Medulloblastomen hinsichtlich ihrer Altersverteilung.

Altersgruppe	Säuglinge (≤3 Jahre)	Kinder (4 - 17 Jahre)	Erwachsene (≥18 Jahre)
Anzahl sequenzierter Tumorproben	49	32	49
Anzahl nachgewiesener <i>CBP</i> -Mutationen	1	1	9
Prozent	2.04%	3.13%	18.37%

A

Verpaarungsstrategie $hGFAP\text{-}cre::CbP^{F/+} \times Cbp^{F/F}$				
Genotyp Nachkommen	$hGFAP\text{-}cre::CbP^{F/+}$	$hGFAP\text{-}cre::CbP^{F/F}$	$Cbp^{F/+}$	$Cbp^{F/F}$
Erwartung	25%	25%	25%	25%
Tatsächlicher Wert	28.57% (20/70)	20.00% (14/70)	28.57% (20/70)	22.86% (16/70)



N

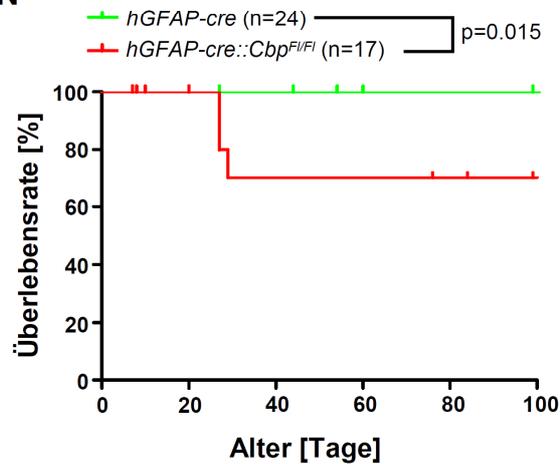
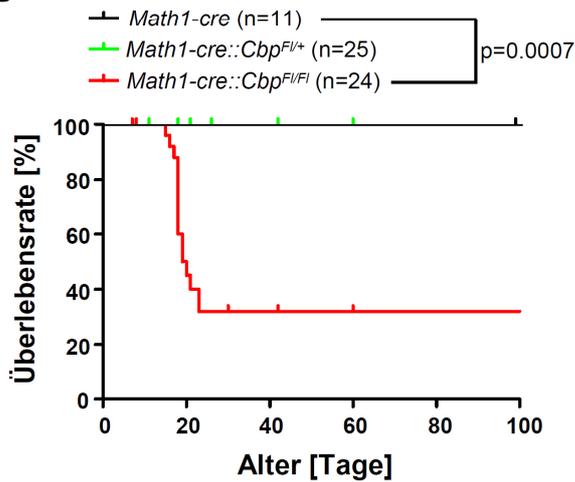


Abbildung 6.3 Der *Cbp*-Knockout in frühen neuronalen Vorläuferzellen führt zu cerebellärer Hypoplasie. Die bei der Verpaarung von $hGFAP\text{-}cre::CbP^{F/+}$ mit $Cbp^{F/F}$ Tieren nach Mendel erwartete Verteilung an angegebenen Genotypen (je 25%) des Nachwuchses wurde erreicht (A). $hGFAP\text{-}cre::CbP^{F/F}$ Tiere besitzen ein deutlich kleineres Cerebellum mit schmalere innerer Körnerzellschicht und offensichtlicher Störung der laminaren Struktur des cerebellären Kortex (B, C, I, E, F; L). Doppelpfeile in C, I, F, L verdeutlichen die Ausdünnung der inneren Körnerzellschicht. Pfeile in F zeigen Störung der laminaren Struktur des Kortex. *Cbp* wurde erfolgreich in allen Zellen des Cerebellums mit Ausnahme der Purkinjezellen deletiert (D, J, G, M). Pfeile in G zeigen Purkinjezellen, die weiterhin *Cbp* exprimierten. Während offenbar alle $hGFAP\text{-}cre::CbP^{F/F}$ Tiere die postnatale Phase erreichten, verstarben etwa 18 % in der 4. Woche postnatal (N).

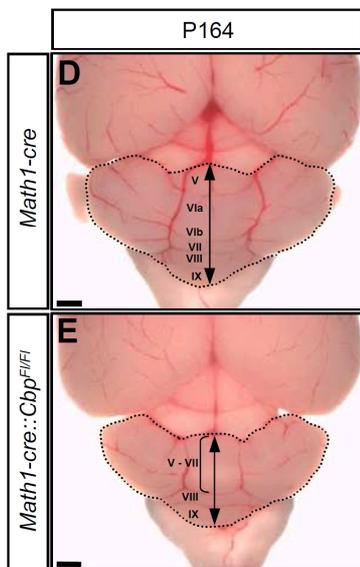
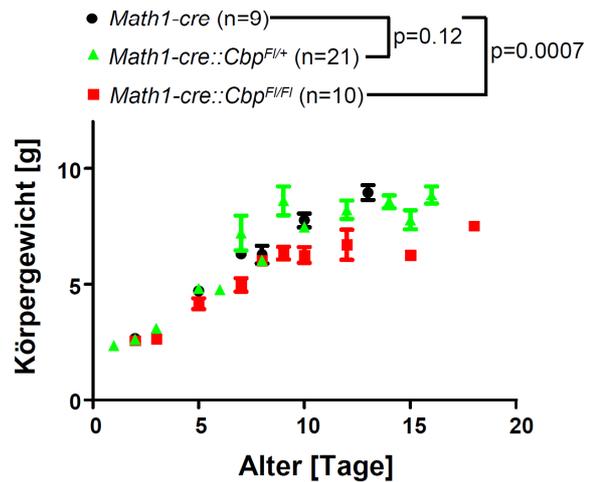
A

Verpaarungsstrategie <i>Math1-cre::Cbp^{F1/+}</i> x <i>Cbp^{F1/F1}</i>				
Genotyp Nachkommen	<i>Math1-cre::Cbp^{F1/+}</i>	<i>Math1-cre::Cbp^{F1/F1}</i>	<i>Cbp^{F1/+}</i>	<i>Cbp^{F1/F1}</i>
Erwartung	25%	25%	25%	25%
Tatsächlicher Wert	27.16% (22/81)	25.92% (21/81)	24.69% (20/81)	22.23% (18/81)

B



C



F

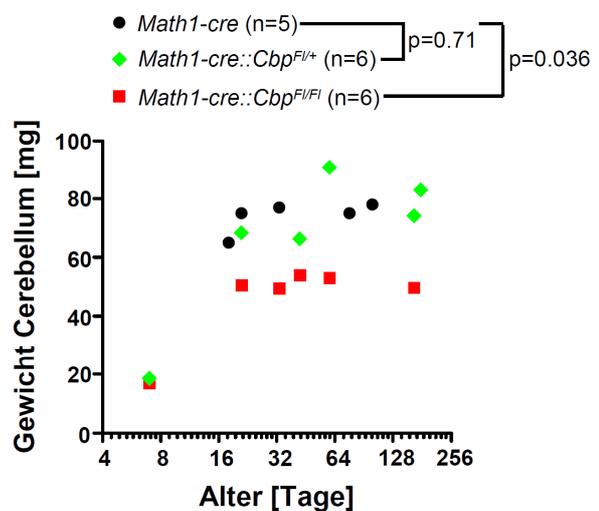


Abbildung 6.4 Erweiterte Analyse der Mauslinien *Math1-cre::Cbp^{F1/+}* und *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}*. Die bei der Verpaarung von *Math1-cre::Cbp^{F1/+}* mit *Cbp^{F1/F1}* Tieren nach Mendel erwartete Verteilung an angegebenen Genotypen (je 25%) des Nachwuchses wurde erreicht (A). Etwa 30% der *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tiere versterben während der dritten Woche postnatal (B). *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tiere zeigen eine normale Zunahme des Körpergewichts in der Postnatalphase (C). Die Cerebella von *Math1-cre::Cbp^{F1/F1}* Tieren sind signifikant kleiner im Vergleich zu *Math1-cre::Cbp^{F1/+}* Tieren (D).

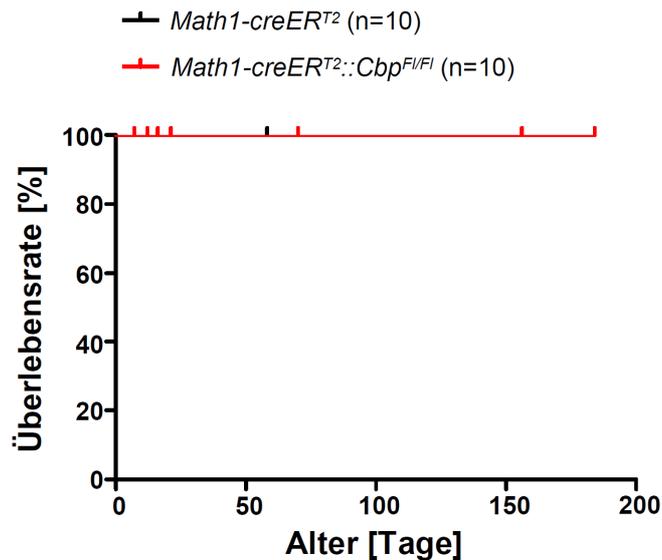


Abbildung 6.5 Kaplan-Meier Analyse für Tiere des Genotyps *Math1-creERT²* und *Math1-creERT²::Cbp^{F/FI}*. Tiere wurden an P5 mit Tamoxifen induziert und für 180 Tage überwacht. Kein Tier ist im Überwachungszeitraum verstorben.

Tabelle 6.4 Tumorinduktion in *Math1-creERT²::SmoM2-YFP^{F/+}* und *Math1-creERT²::Cbp^{F/FI}SmoM2-YFP^{F/+}* Mäusen und Analyse der Latenzzeit. Tiere wurden an P5 mit Tamoxifen induziert und über einen Zeitraum von 100 Tagen überwacht. Tiere wurden bei Entwicklung von klinischen Symptomen getötet. Tiere ohne Symptome wurden 100 Tage nach Induktion getötet und die Gehirne histologisch aufgearbeitet.

Genotyp	Tiere behandelt mit Tamoxifen an P5	Tumorinzidenz	Mittleres Alter bei Symptomatik (Tage)
<i>Math1-creERT²::SmoM2-YFP^{F/+}</i>	16	81.25% (13/16)	98
<i>Math1-creERT²::CBP^{F/FI}SmoM2-YFP^{F/+}</i>	12	100% (12/12)	61

Bibliographie

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16(13):3797-804.
- Adamson DC, Shi Q, Wortham M, Northcott PA, Di C, Duncan CG, Li J, McLendon RE, Bigner DD, Taylor MD and others. 2010. OTX2 is critical for the maintenance and progression of Shh-independent medulloblastomas. *Cancer Res* 70(1):181-91.
- Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S. 1995. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J Neurosci* 15(8):5765-78.
- Al-Halabi H, Nantel A, Klekner A, Guiot MC, Albrecht S, Hauser P, Garami M, Bogнар L, Kavan P, Gerges N and others. 2011. Preponderance of sonic hedgehog pathway activation characterizes adult medulloblastoma. *Acta Neuropathol* 121(2):229-39.
- Alston RD, Newton R, Kelsey A, Newbould MJ, Birch JM, Lawson B, McNally RJ. 2003. Childhood medulloblastoma in northwest England 1954 to 1997: incidence and survival. *Dev Med Child Neurol* 45(5):308-14.
- Altmann J, Bayer SA. 1997. *Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure and Functions*. New York: CRC Press.
- Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. 2002. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 16(9):1066-76.
- Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M. 1994. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370(6486):226-9.
- Ayrault O, Zindy F, Rehg J, Sherr CJ, Roussel MF. 2009. Two tumor suppressors, p27Kip1 and patched-1, collaborate to prevent medulloblastoma. *Mol Cancer Res* 7(1):33-40.
- Aza-Blanc P, Ramirez-Weber FA, Laget MP, Schwartz C, Kornberg TB. 1997. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89(7):1043-53.
- Bahn S, Jones A, Wisden W. 1997. Directing gene expression to cerebellar granule cells using gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha6 subunit transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17):9417-21.
- Bai CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. 2002. Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development* 129(20):4753-61.
- Bailey P, Cushing H. 1925. Medulloblastoma cerebelli - A common type of midcerebellar glioma of childhood. *Archives of Neurology and Psychiatry* 14(2):192-224.
- Bale SJ, Falk RT, Rogers GR. 1998. Patching together the genetics of Gorlin syndrome. *J Cutan Med Surg* 3(1):31-4.
- Bannister AJ, Kouzarides T. 1995. CBP-induced stimulation of c-Fos activity is abrogated by E1A. *EMBO J* 14(19):4758-62.
- Bannister AJ, Kouzarides T. 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384(6610):641-3.

- Bartsch O, Schmidt S, Richter M, Morlot S, Seemanova E, Wiebe G, Rasi S. 2005. DNA sequencing of CREBBP demonstrates mutations in 56% of patients with Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS) and in another patient with incomplete RSTS. *Hum Genet* 117(5):485-93.
- Bates B, Rios M, Trumpp A, Chen C, Fan G, Bishop JM, Jaenisch R. 1999. Neurotrophin-3 is required for proper cerebellar development. *Nat Neurosci* 2(2):115-7.
- Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280(5363):596-9.
- Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM and others. 2002. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 297(5586):1559-1561.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382(6588):225-30.
- Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, Oldread E, Arany Z, D'Andrea A, Livingston DM. 1996. Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature* 383(6598):344-7.
- Bibel M, Barde YA. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14(23):2919-37.
- Binning MJ, Niazi T, Pedone CA, Lal B, Eberhart CG, Kim KJ, Laterra J, Fults DW. 2008. Hepatocyte growth factor and sonic Hedgehog expression in cerebellar neural progenitor cells costimulate medulloblastoma initiation and growth. *Cancer Res* 68(19):7838-45.
- Blough RI, Petrij F, Dauwerse JG, Milatovich-Cherry A, Weiss L, Saal HM, Rubinstein JH. 2000. Variation in microdeletions of the cyclic AMP-responsive element-binding protein gene at chromosome band 16p13.3 in the Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* 90(1):29-34.
- Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, Muller FJ, Loring JF, Yamasaki TR, Poon WW, Green KN, LaFerla FM. 2009. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(32):13594-9.
- Borghesani PR, Peyrin JM, Klein R, Rubin J, Carter AR, Schwartz PM, Luster A, Corfas G, Segal RA. 2002. BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development* 129:1435-1442.
- Borrow J, Stanton VP, Jr., Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Disteche C, Dube I, Frischauf AM and others. 1996. The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet* 14(1):33-41.
- Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Reni M, Gatta G, Vecht C, Kortmann RD. 2009. Adult neuroectodermal tumors of posterior fossa (medulloblastoma) and of supratentorial sites (stPNET). *Crit Rev Oncol Hematol* 71(2):165-79.
- Broderick DK, Di C, Parrett TJ, Samuels YR, Cummins JM, McLendon RE, Fults DW, Velculescu VE, Bigner DD, Yan H. 2004. Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res* 2004Aug1;64(15):5048-50 64:5048-5050.

- Browd SR, Kenney AM, Gottfried ON, Yoon JW, Walterhouse D, Pedone CA, Fults DW. 2006. N-myc can substitute for insulin-like growth factor signaling in a mouse model of sonic hedgehog-induced medulloblastoma. *Cancer Res* 66(5):2666-72.
- Browner RH, Baruch A. 1982. The cytoarchitecture of the dorsal cochlear nucleus in the 3-month- and 26-month-old C57BL/6 mouse: a Golgi impregnation study. *J Comp Neurol* 211(2):115-38.
- Brugieres L, Pierron G, Chompret A, Paillerets BB, Di Rocco F, Varlet P, Pierre-Kahn A, Caron O, Grill J, Delattre O. 2010. Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germ-line SUFU mutations. *J Med Genet* 47(2):142-4.
- Bühren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S, Wiestler OD, Pietsch T. 2000. Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct histological and clinical features: evidence for a medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *JNeuropatholExpNeurol* 59(3):229-240.
- Caccamo A, Maldonado MA, Bokov AF, Majumder S, Oddo S. 2010. CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(52):22687-92.
- Carter AR, Chen C, Schwartz PM, Segal RA. 2002. Brain-derived neurotrophic factor modulates cerebellar plasticity and synaptic ultrastructure. *J Neurosci* 22(4):1316-27.
- Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Juguilon H, Montminy M, Evans RM. 1996. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383(6595):99-103.
- Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, Varmus HE. 2005. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J* 24(1):73-84.
- Chen BY, Wang X, Wang ZY, Wang YZ, Chen LW, Luo ZJ. 2013. Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Neurosci Res* 91(1):30-41.
- Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG and others. 2011. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol* 29(11):1424-30.
- Choi Y, Borghesani PR, Chan JA, Segal RA. 2005. Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit. *J Neurosci* 25(45):10437-10445.
- Chomczynski P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15(3):532-4, 536-7.
- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. 1993. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365(6449):855-9.
- Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, Ellison DW. 2006. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss

- characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle* 5(22):2666-70.
- Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF. 2005. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437(7061):1018-21.
- de Haas T, Oussoren E, Grajkowska W, Perek-Polnik M, Popovic M, Zdravec-Zaletel L, Perera M, Corte G, Wirths O, van Sluis P and others. 2006. OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas. *JNeuropatholExpNeurol* 65:176-186.
- Di C, Liao S, Adamson DC, Parrett TJ, Broderick DK, Shi Q, Lengauer C, Cummins JM, Velculescu VE, Fults DW and others. 2005. Identification of OTX2 as a Medulloblastoma Oncogene Whose Product can be Targeted by All-Trans Retinoic Acid. *Cancer Research* 65(3):919-924.
- Dino MR, Schuerger RJ, Liu Y, Slater NT, Mugnaini E. 2000. Unipolar brush cell: a potential feedforward excitatory interneuron of the cerebellum. *Neuroscience* 98(4):625-36.
- Dyson N, Harlow E. 1992. Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv* 12:161-95.
- Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, 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.
- Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, Fraga C, Neale G, Kenney AM, Brat DJ, Perry A, Yong WH and others. 2011. Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol* 121(3):381-96.
- Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, Pearson AD, Clifford SC. 2005. beta-catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: The United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *J Clin Oncol* 23(31):7951-7957.
- Evans AE, Jenkin RD, Sposto R, Ortega JA, Wilson CB, Wara W, Ertel IJ, Kramer S, Chang CH, Leikin SL. 1990. The treatment of medulloblastoma. Results of a prospective randomized trial of radiation therapy with and without CCNU, vincristine, and prednisone. *J Neurosurg* 72(4):572-582.
- Evans G, Burnell L, Campbell R, Gattamaneni HR, Birch J. 1993. Congenital anomalies and genetic syndromes in 173 cases of medulloblastoma. *Med Pediatr Oncol* 21(6):433-4.
- Farago AF, Awatramani RB, Dymecki SM. 2006. Assembly of the brainstem cochlear nuclear complex is revealed by intersectional and subtractive genetic fate maps. *Neuron* 50(2):205-18.
- Farioli-Vecchioli S, Cina I, Ceccarelli M, Micheli L, Leonardi L, Ciotti MT, De Bardi M, Di Rocco C, Pallini R, Cavallaro S and others. 2012. Tis21 knock-out enhances the frequency of medulloblastoma in Patched1 heterozygous mice by inhibiting the Cxcl3-dependent migration of cerebellar neurons. *J Neurosci* 32(44):15547-64.
- Fattet S, Haberler C, Legoix P, Varlet P, Lellouch-Tubiana A, Lair S, Manie E, Raquin MA, Bours D, Carpentier S and others. 2009. Beta-catenin status in paediatric medulloblastomas: correlation of immunohistochemical expression with mutational status, genetic profiles, and clinical characteristics. *J Pathol* 218(1):86-94.

- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237(3):752-7.
- Fujiyama T, Yamada M, Terao M, Terashima T, Hioki H, Inoue YU, Inoue T, Masuyama N, Obata K, Yanagawa Y and others. 2009. Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, Ptf1a and Atoh1. *Development* 136(12):2049-58.
- Funfschilling U, Reichardt LF. 2002. Cre-mediated recombination in rhombic lip derivatives. *Genesis* 33(4):160-9.
- Gajjar A, Chintagumpala M, Ashley D, Kellie S, Kun LE, Merchant TE, Woo S, Wheeler G, Ahern V, Krasin MJ and others. 2006. Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma (St Jude Medulloblastoma-96): long-term results from a prospective, multicentre trial. *Lancet Oncol* 7(10):813-20.
- Garcia I, Crowther AJ, Gama V, Ryan Miller C, Deshmukh M, Gershon TR. 2013. Bax deficiency prolongs cerebellar neurogenesis, accelerates medulloblastoma formation and paradoxically increases both malignancy and differentiation. *Oncogene* 32(18):2304-14.
- Gatta G, Zigon G, Capocaccia R, Coebergh JW, Desandes E, Kaatsch P, Pastore G, Peris-Bonet R, Stiller CA. 2009. Survival of European children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *Eur J Cancer* 45(6):992-1005.
- Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Curre DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J and others. 2010. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature* 468(7327):1095-9.
- Gilbertson RJ, Ellison DW. 2007. The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annu Rev Pathol*.
- Giles RH, Petrij F, Dauwerse HG, den Hollander AI, Lushnikova T, van Ommen GJ, Goodman RH, Deaven LL, Doggett NA, Peters DJ and others. 1997. Construction of a 1.2-Mb contig surrounding, and molecular analysis of, the human CREB-binding protein (CBP/CREBBP) gene on chromosome 16p13.3. *Genomics* 42(1):96-114.
- Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP. 1997. Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* 277:1109-1113.
- Grotzer MA, Janss AJ, Fung K, Biegel JA, Sutton LN, Rorke LB, Zhao H, Cnaan A, Phillips PC, Lee VM and others. 2000. TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J Clin Oncol* 18(5):1027-35.
- Hahn H, Wojnowski L, Miller G, Zimmer A. 1999. The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *J Mol Med* 77:459-468.
- Hahn H, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, Potter D, Zimmer A, Muller U, Samson E, Quintanilla-Martinez L. 2000. Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem* 275(37):28341-28344.
- Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA, Russell TL, Ellenbogen RG, Bernstein ID, Beachy PA and others. 2004. The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival

- of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Research* 64(21):7794-7800.
- Hallonet ME, Le Douarin NM. 1993. Tracing neuroepithelial cells of the mesencephalic and metencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimaeras. *Eur J Neurosci* 5(9):1145-55.
- Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B and others. 1995. The Molecular-Basis of Turcots-Syndrome. *N Engl J Med* 332(13):839-847.
- Hatten ME. 1999. Expansion of CNS precursor pools: a new role for Sonic Hedgehog. *Neuron* 22(1):2-3.
- Hatten ME, Alder J, Zimmerman K, Heintz N. 1997. Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr Opin Neurobiol* 7(1):40-7.
- Hatten ME, Heintz N. 1995. Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 18:385-408.
- Hatten ME, Roussel MF. 2011. Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci* 34(3):134-42.
- Hatton BA, Villavicencio EH, Tsuchiya KD, Pritchard JI, Ditzler S, Pullar B, Hansen S, Knoblauch SE, Lee D, Eberhart CG and others. 2008. The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res* 68(6):1768-76.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281(5382):1509-12.
- Heine VM, Priller M, Ling J, Rowitch DH, Schiller U. 2010. Dexamethasone Destabilizes Nmyc to Inhibit the Growth of Hedgehog-Associated Medulloblastoma. *Cancer Research* 70:5220-5225.
- Helms AW, Abney AL, Ben Arie N, Zoghbi HY, Johnson JE. 2000. Autoregulation and multiple enhancers control Math1 expression in the developing nervous system. *Development* 127(6):1185-1196.
- Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawachi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M and others. 2005. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron* 47:201-213.
- Huang EJ, Reichardt LF. 2001. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Huangfu D, Anderson KV. 2006. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development* 133(1):3-14.
- Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY. 1998. Axis determination in Xenopus involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Curr Biol* 8(10):591-4.
- Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. 2004. p300/CBP and cancer. *Oncogene* 23(24):4225-31.
- Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. 2002. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol* 22(4):1172-83.
- Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Jr. and others. 1996. Human homolog of

- patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272:1668-1671.
- Jones DT, Jager N, Kool M, Zichner T, Hutter B, Sultan M, Cho YJ, Pugh TJ, Hovestadt V, Stutz AM and others. 2012. Dissecting the genomic complexity underlying medulloblastoma. *Nature* 488(7409):100-5.
- Joyner AL. 1996. Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain--hindbrain development. *Trends Genet* 12(1):15-20.
- Joyner AL, Liu A, Millet S. 2000. Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr Opin Cell Biol* 12(6):736-41.
- Kalkhoven E, Roelfsema JH, Teunissen H, den Boer A, Ariyurek Y, Zantema A, Breuning MH, Hennekam RC, Peters DJ. 2003. Loss of CBP acetyltransferase activity by PHD finger mutations in Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Mol Genet* 12(4):441-50.
- Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK and others. 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85(3):403-14.
- Kawauchi D, Robinson G, Uziel T, Gibson P, Rehg J, Gao C, Finkelstein D, Qu C, Pounds S, Ellison DW and others. 2012. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer Cell* 21(2):168-80.
- Kishimoto M, Kohno T, Okudela K, Otsuka A, Sasaki H, Tanabe C, Sakiyama T, Hiramata C, Kitabayashi I, Minna JD and others. 2005. Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin Cancer Res* 11(2 Pt 1):512-9.
- Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, Cho YJ, Koster J, Schouten-van Meeteren A, van Vuurden D and others. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol* 123(4):473-84.
- Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J and others. 2008a. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One* 3:e3088.
- Kool M, Koster J, Bunt J, Troost D, Meeteren NSV, Ylstra B, Graikowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D and others. 2008b. Identification of medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures, and clinicopathological features. *Neuro-Oncology* 10(3):384-384.
- Kortmann RD, Kuhl J, Timmermann B, Mittler U, Urban C, Budach V, Richter E, Willich N, Flentje M, Berthold F and others. 2000. Postoperative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of the German prospective randomized trial HIT '91. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46(2):269-79.
- Koscheck T, Weyer A, Schilling RL, Schilling K. 2003. Morphological development and neurochemical differentiation of cerebellar inhibitory interneurons in microexplant cultures. *Neuroscience* 116(4):973-84.
- Kung AL, Rebel VI, Bronson RT, Ch'ng LE, Sieff CA, Livingston DM, Yao TP. 2000. Gene dose-dependent control of hematopoiesis and hematologic tumor suppression by CBP. *Genes Dev* 14(3):272-7.

- Landsberg RL, Awatramani RB, Hunter NL, Farago AF, DiPietrantonio HJ, Rodriguez CI, Dymecki SM. 2005. Hindbrain rhombic lip is comprised of discrete progenitor cell populations allocated by Pax6. *Neuron* 48(6):933-47.
- Lee SJ, Krauthauser C, Maduskuie V, Fawcett PT, Olson JM, Rajasekaran SA. 2011. Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 11:144.
- Lee SJ, Lindsey S, Graves B, Yoo S, Olson JM, Langhans SA. 2013. Sonic hedgehog-induced histone deacetylase activation is required for cerebellar granule precursor hyperplasia in medulloblastoma. *PLoS One* 8(8):e71455.
- Lee Y, Miller HL, Russell HR, Boyd K, Curran T, McKinnon PJ. 2006. Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice. *Cancer Res* 66(14):6964-71.
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 69(5):341-74.
- Levi-Montalcini R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237(4819):1154-62.
- Leyhe T, Eschweiler GW, Stransky E, Gasser T, Annas P, Basun H, Laske C. 2009. Increase of BDNF serum concentration in lithium treated patients with early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 16(3):649-56.
- Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. 2005. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther* 4(12):1912-22.
- Lindholm D, Hamner S, Zirrgiebel U. 1997. Neurotrophins and cerebellar development. *Perspect Dev Neurobiol* 5(1):83-94.
- Lopez-Atalaya JP, Gervasini C, Mottadelli F, Spena S, Piccione M, Scarano G, Selicorni A, Barco A, Larizza L. 2012. Histone acetylation deficits in lymphoblastoid cell lines from patients with Rubinstein-Taybi syndrome. *J Med Genet* 49(1):66-74.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2):97-109.
- Machold R, Fishell G. 2005. Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* 48:17-24.
- Mao J, Ligon KL, Rakhlin EY, Thayer SP, Bronson RT, Rowitch D, McMahon AP. 2006. A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res* 66:10171-10178.
- Marino S. 2005. Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med* 11(1):17-22.
- Marks WJ, Jr., Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, Taylor R, Cahn-Weiner DA, Stoessl AJ, Olanow CW and others. 2008. Safety and tolerability of intraputaminally delivered CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol* 7(5):400-8.
- Massa SM, Yang T, Xie Y, Shi J, Bilgen M, Joyce JN, Nehama D, Rajadas J, Longo FM. 2010. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. *J Clin Invest* 120(5):1774-85.

- Matei V, Pauley S, Kaing S, Rowitch D, Beisel KW, Morris K, Feng F, Jones K, Lee J, Fritzscht B. 2005. Smaller inner ear sensory epithelia in Neurog 1 null mice are related to earlier hair cell cycle exit. *DevDyn* 234:633-650.
- Miller RW, Rubinstein JH. 1995. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* 56(1):112-5.
- Moran E. 1993. DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 3(1):63-70.
- Mugnaini E, Warr WB, Osen KK. 1980. Distribution and light microscopic features of granule cells in the cochlear nuclei of cat, rat, and mouse. *J Comp Neurol* 191(4):581-606.
- Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, Heatley SL, Holmfeldt L, Collins-Underwood JR, Ma J and others. 2011. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 471(7337):235-9.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM and others. 2009. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med* 15(3):331-7.
- Nagata I, Nakatsuji N. 1990. Granule cell behavior on laminin in cerebellar microexplant cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 52(1-2):63-73.
- Nör C, de Farias CB, Abujamra AL, Schwartzmann G, Brunetto AL, Roesler R. 2011. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in combination with brain-derived neurotrophic factor reduces the viability of DAOY human medulloblastoma cells. *Childs Nerv Syst* 27(6):897-901.
- Northcott PA, Hielscher T, Dubuc A, Mack S, Shih D, Remke M, Al-Halabi H, Albrecht S, Jabado N, Eberhart CG and others. 2011a. Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta Neuropathol* 122(2):231-40.
- Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P and others. 2011b. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol* 29(11):1408-14.
- Northcott PA, Nakahara Y, Wu X, Feuk L, Ellison DW, Croul S, Mack S, Kongkham PN, Peacock J, Dubuc A and others. 2009. Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nat Genet* 41(4):465-72.
- Oike Y, Hata A, Mamiya T, Kaname T, Noda Y, Suzuki M, Yasue H, Nabeshima T, Araki K, Yamamura K. 1999a. Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum Mol Genet* 8(3):387-96.
- Oike Y, Takakura N, Hata A, Kaname T, Akizuki M, Yamaguchi Y, Yasue H, Araki K, Yamamura K, Suda T. 1999b. Mice homozygous for a truncated form of CREB-binding protein exhibit defects in hematopoiesis and vasculo-angiogenesis. *Blood* 93(9):2771-9.
- Packer RJ, Vezina G. 2008. Management of and prognosis with medulloblastoma: therapy at a crossroads. *Arch Neurol* 65(11):1419-24.
- Panagopoulos I, Fioretos T, Isaksson M, Samuelsson U, Billstrom R, Strombeck B, Mitelman F, Johansson B. 2001. Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16)(q22;p13). *Hum Mol Genet* 10(4):395-404.

- Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, Kasper LH, Lerach S, Tang H, Ma J and others. 2011. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 471(7337):189-95.
- Pastorino L, Ghorzo P, Nasti S, Battistuzzi L, Cusano R, Marzocchi C, Garre ML, Clementi M, Scarra GB. 2009. Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *Am J Med Genet A* 149A(7):1539-43.
- Pei Y, Moore CE, Wang J, Tewari AK, Eroshkin A, Cho YJ, Witt H, Korshunov A, Read TA, Sun JL and others. 2012. An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell* 21(2):155-67.
- Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, Plenker D, Leenders F, Sun R, Zander T and others. 2012. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat Genet* 44(10):1104-10.
- Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ and others. 1995. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376(6538):348-51.
- Pietsch T, Waha A, Koch A, Kraus J, Albrecht S, Tonn J, Sørensen N, Berthold F, Henk B, Schmandt N and others. 1997. Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of *Drosophila* patched. *Cancer Res* 57:2085-2088.
- Pomeroy SL, Sutton ME, Goumnerova LC, Segal RA. 1997. Neurotrophins in cerebellar granule cell development and medulloblastoma. *J Neurooncol* 35(3):347-52.
- Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C and others. 2002. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415:436-442.
- Pöschl J, Lorenz A, Hartmann W, von Bueren AO, Kool M, Li S, Peraud A, Tonn JC, Herms J, Xiang M and others. 2011. Expression of BARHL1 in medulloblastoma is associated with prolonged survival in mice and humans. *Oncogene*.
- Pugh TJ, Weeraratne SD, Archer TC, Pomeranz Krummel DA, Auclair D, Bochicchio J, Carneiro MO, Carter SL, Cibulskis K, Erlich RL and others. 2012. Medulloblastoma exome sequencing uncovers subtype-specific somatic mutations. *Nature* 488(7409):106-10.
- Rakic P, Sidman RL. 1973. Weaver mutant mouse cerebellum: defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(1):240-4.
- Rao G, Pedone CA, Coffin CM, Holland EC, Fults DW. 2003. c-Myc enhances sonic hedgehog-induced medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice. *Neoplasia* 5(3):198-204.
- Ray RS, Dymecki SM. 2009. Rautenlippe Redux -- toward a unified view of the precerebellar rhombic lip. *Curr Opin Cell Biol* 21(6):741-7.
- Remke M, Hielscher T, Northcott PA, Witt H, Ryzhova M, Wittmann A, Benner A, von Deimling A, Scheurlen W, Perry A and others. 2011. Adult medulloblastoma comprises three major molecular variants. *J Clin Oncol* 29(19):2717-23.

- Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, Phoenix TN, Hedlund E, Wei L, Zhu X and others. 2012. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma. *Nature* 488(7409):43-8.
- Rocamora N, Garcia-Ladona FJ, Palacios JM, Mengod G. 1993. Differential expression of brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and low-affinity nerve growth factor receptor during the postnatal development of the rat cerebellar system. *Brain Res Mol Brain Res* 17(1-2):1-8.
- Roelfsema JH, White SJ, Ariyurek Y, Bartholdi D, Niedrist D, Papadia F, Bacino CA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Breuning MH and others. 2005. Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. *Am J Hum Genet* 76(4):572-80.
- Rogers HA, Miller S, Lowe J, Brundler MA, Coyle B, Grundy RG. 2009. An investigation of WNT pathway activation and association with survival in central nervous system primitive neuroectodermal tumours (CNS PNET). *Br J Cancer* 100(8):1292-302.
- Romer J, Curran T. 2005. Targeting medulloblastoma: small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. *Cancer Res* 65(12):4975-8.
- Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL and others. 2004. Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in *Ptc1(+/-)p53(-/-)* mice. *Cancer Cell* 6(3):229-240.
- Roussel MF, Hatten ME. 2011. Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol* 94:235-82.
- Rowley JD, Reshmi S, Sobulo O, Musvee T, Anastasi J, Raimondi S, Schneider NR, Barredo JC, Cantu ES, Schlegelberger B and others. 1997. All patients with the T(11;16)(q23;p13.3) that involves MLL and CBP have treatment-related hematologic disorders. *Blood* 90(2):535-41.
- Rubinstein JH, Taybi H. 1963. Broad thumbs and toes and facial abnormalities. A possible mental retardation syndrome. *Am J Dis Child* 105:588-608.
- Rutkowski S, von Hoff K, Emser A, Zwiener I, Pietsch T, Figarella-Branger D, Giangaspero F, Ellison DW, Garre ML, Biassoni V and others. 2010. Survival and prognostic factors of early childhood medulloblastoma: an international meta-analysis. *J Clin Oncol* 28(33):4961-8.
- Sadakata T, Kakegawa W, Mizoguchi A, Washida M, Katoh-Semba R, Shutoh F, Okamoto T, Nakashima H, Kimura K, Tanaka M and others. 2007. Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. *J Neurosci* 27(10):2472-82.
- Salic A, Lee E, Mayer L, Kirschner MW. 2000. Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 5(3):523-32.
- Schüller U, Heine VM, Mao J, Kho AT, Dillon AK, Han YG, Huillard E, Sun T, Ligon AH, Qian Y and others. 2008. Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer Cell* 14(2):123-34.
- Schüller U, Zhao Q, Godinho SA, Heine VM, Medema RH, Pellman D, Rowitch DH. 2007. Forkhead transcription factor FoxM1 regulates mitotic entry and

- prevents spindle defects in cerebellar granule neuron precursors. *Mol Cell Biol* 27(23):8259-70.
- Schwalbe EC, Lindsey JC, Straughton D, Hogg TL, Cole M, Megahed H, Ryan SL, Lusher ME, Taylor MD, Gilbertson RJ and others. 2011. Rapid diagnosis of medulloblastoma molecular subgroups. *Clin Cancer Res* 17(7):1883-94.
- Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA. 1997. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron* 19(2):269-81.
- Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL. 1994. Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26):12867-71.
- Segal RA, Takahashi H, McKay RD. 1992. Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron* 9(6):1041-52.
- Shroyer NF, Wallis D, Venken KJ, Bellen HJ, Zoghbi HY. 2005. Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev* 19(20):2412-7.
- Sidman RL, Rakic P. 1973. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* 62(1):1-35.
- Simmons DA, Rex CS, Palmer L, Pandeyarajan V, Fedulov V, Gall CM, Lynch G. 2009. Up-regulating BDNF with an ampakine rescues synaptic plasticity and memory in Huntington's disease knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(12):4906-11.
- Skousen GJ, Wardinsky T, Chenaille P. 1996. Medulloblastoma in patient with Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* 66(3):367.
- Sobulo OM, Borrow J, Tomek R, Reshmi S, Harden A, Schlegelberger B, Housman D, Doggett NA, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. 1997. MLL is fused to CBP, a histone acetyltransferase, in therapy-related acute myeloid leukemia with a t(11;16)(q23;p13.3). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16):8732-7.
- Soriano P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21(1):70-71.
- Tait DM, Thornton-Jones H, Bloom HJ, Lemerle J, Morris-Jones P. 1990. Adjuvant chemotherapy for medulloblastoma: the first multi-centre control trial of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP I). *Eur J Cancer* 26(4):464-9.
- Tanaka Y, Naruse I, Maekawa T, Masuya H, Shiroishi T, Ishii S. 1997. Abnormal skeletal patterning in embryos lacking a single Cbp allele: a partial similarity with Rubinstein-Taybi syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19):10215-20.
- Taylor MD, Liu L, Raffle C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A and others. 2002. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet* 31(3):306-10.
- Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT. 2000. Molecular insight into medulloblastoma and central nervous system primitive neuroectodermal tumor biology from hereditary syndromes: a review. *Neurosurgery* 47(4):888-901.
- Taylor MD, Mainprize TG, Rutka JT, Becker L, Bayani J, Drake JM. 2001. Medulloblastoma in a child with Rubenstein-Taybi Syndrome: case report and review of the literature. *Pediatr Neurosurg* 35(5):235-8.

- Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A and others. 2012. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 123(4):465-72.
- Taylor RE, Bailey CC, Robinson K, Weston CL, Ellison D, Ironside J, Lucraft H, Gilbertson R, Tait DM, Walker DA and others. 2003. Results of a randomized study of preradiation chemotherapy versus radiotherapy alone for nonmetastatic medulloblastoma: The International Society of Paediatric Oncology/United Kingdom Children's Cancer Study Group PNET-3 Study. *J Clin Oncol* 21(8):1581-91.
- Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ and others. 2006. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol* 24(12):1924-1931.
- Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O, Hashimoto N. 1995. Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery* 37(4):733-9; discussion 739-41.
- Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G and others. 2005. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11(5):551-5.
- Uziel T, Zindy F, Sherr CJ, Roussel MF. 2006. The CDK inhibitor p18Ink4c is a tumor suppressor in medulloblastoma. *Cell Cycle* 5(4):363-5.
- Uziel T, Zindy F, Xie S, Lee Y, Forget A, Magdaleno S, Rehg JE, Calabrese C, Solecki D, Eberhart CG and others. 2005. The tumor suppressors Ink4c and p53 collaborate independently with Patched to suppress medulloblastoma formation. *Genes Dev* 19(22):2656-67.
- Valor LM, Pulopulos MM, Jimenez-Minchan M, Olivares R, Lutz B, Barco A. 2011. Ablation of CBP in forebrain principal neurons causes modest memory and transcriptional defects and a dramatic reduction of histone acetylation but does not affect cell viability. *J Neurosci* 31(5):1652-63.
- Varecka L, Wu CH, Rotter A, Frosthalm A. 1994. GABAA/benzodiazepine receptor alpha 6 subunit mRNA in granule cells of the cerebellar cortex and cochlear nuclei: expression in developing and mutant mice. *J Comp Neurol* 339(3):341-52.
- Ventimiglia R, Mather PE, Jones BE, Lindsay RM. 1995. The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur J Neurosci* 7(2):213-22.
- Wang J, Weaver IC, Gauthier-Fisher A, Wang H, He L, Yeomans J, Wondisford F, Kaplan DR, Miller FD. 2010. CBP histone acetyltransferase activity regulates embryonic neural differentiation in the normal and Rubinstein-Taybi syndrome brain. *Dev Cell* 18(1):114-25.
- Wang VY, Rose MF, Zoghbi HY. 2005. Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron* 48:31-43.
- Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, McMahon AP. 2009. Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(8):2623-8.

- Waterhouse EG, An JJ, Orefice LL, Baydyuk M, Liao GY, Zheng K, Lu B, Xu B. 2012. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci* 32(41):14318-30.
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP. 1999a. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22(1):103-14.
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP. 1999b. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 22:103-114.
- Weisheit G, Mertz D, Schilling K, Viebahn C. 2002. An efficient in situ hybridization protocol for multiple tissue sections and probes on miniaturized slides. *Dev Genes Evol* 212(8):403-6.
- Wetmore C, Eberhart DE, 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.
- Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. 2001. Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer Research* 61(2):513-516.
- Wetmore C, Ernfors P, Persson H, Olson L. 1990. Localization of brain-derived neurotrophic factor mRNA to neurons in the brain by in situ hybridization. *Exp Neurol* 109(2):141-52.
- Weyer A, Schilling K. 2003. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73(3):400-409.
- Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST. 1999. Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 154(2):515-23.
- Wingate RJ. 2001. The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol* 11(1):82-8.
- Wingate RJ, Hatten ME. 1999. The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development* 126(20):4395-404.
- Yamauchi T, Oike Y, Kamon J, Waki H, Komeda K, Tsuchida A, Date Y, Li MX, Miki H, Akanuma Y and others. 2002. Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nat Genet* 30(2):221-6.
- Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schuller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH and others. 2008. Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14(2):135-45.
- Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM, Eckner R. 1998. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93(3):361-72.
- Zhang Z, Hofmann C, Casanova E, Schutz G, Lutz B. 2004. Generation of a conditional allele of the CBP gene in mouse. *Genesis* 40(2):82-9.
- Zhou P, Porcionatto M, Pilapil M, Chen Y, Choi Y, Toliaas KF, Bikoff JB, Hong EJ, Greenberg ME, Segal RA. 2007. Polarized signaling endosomes coordinate BDNF-induced chemotaxis of cerebellar precursors. *Neuron* 55(1):53-68.
- Zhuo L, Theis M, Alvarez-Maya I, Brenner M, Willecke K, Messing A. 2001. hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis* 31:85-94.

Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C. 1998. Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer Res* 58(5):896-9.