

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Sox2 für die Entwicklung des Kleinhirns und die Entstehung von Medulloblastomen

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



Julia Ahlfeld

München

2014

**Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Sox2 für die Entwicklung des Kleinhirns
und die Entstehung von Medulloblastomen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Julia Ahlfeld
aus Langen

2014

Aus dem
Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hans Kretzschmar, FRCPath †
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. med. Armin Giese

Dissertation eingereicht am: 17. April 2014

Erster Berichterstatter: Herr Prof. Dr. rer. nat. George Boyan

Zweiter Berichterstatter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Anja Horn-Bochtler

Sondergutachter: Herr PD Dr. med. Ulrich Schüller

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 2014

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Sox2 Requirement in Sonic Hedgehog-Associated Medulloblastoma

Ahlfeld J, Favaro R, Pagella P, Kretschmar HA, Nicolis S, and Schüller U.

Cancer Research, June 2013

Volume 73, Issue 12, pages 3796-3807

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23596255>)

Papa



Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildungsverzeichnis..... | 1 |
| Tabellenverzeichnis..... | 3 |
| Abkürzungsverzeichnis..... | 5 |
| Zusammenfassung..... | 7 |
| Summary | 9 |
| 1. Einleitung..... | 11 |
| 1.1 Aufbau und Funktion des Cerebellums | 11 |
| 1.2 Ontogenese des Cerebellums..... | 16 |
| 1.3 Das Medulloblastom..... | 19 |
| 1.3.1 Ursprung und Klassifikation des Medulloblastoms..... | 19 |
| 1.3.2 Symptome, Diagnostik und Therapie des Medulloblastoms | 22 |
| 1.3.3 Signalwege der Medulloblastomentwicklung..... | 23 |
| 1.3.4 Mausmodelle des Medulloblastoms..... | 26 |
| 1.4 Sox Gene | 29 |
| 1.4.1 Der Transkriptionsfaktor Sox2..... | 30 |
| 1.4.2 Physiologische Bedeutung von Sox2 im Cerebellum | 32 |
| 1.4.3 Bedeutung von SOX2 in der Onkologie | 33 |
| 1.4.4 Sox2 in neuronalen Stammzellen..... | 34 |
| 1.5 Zielsetzung des Projekts | 35 |
| 2. Material und Methoden..... | 37 |
| 2.1 Humanes Gewebe..... | 37 |
| 2.1.1 Eigene Kohorte | 37 |
| 2.1.2 Microarray Daten | 37 |
| 2.2 Tierexperimentelle Arbeiten | 38 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.2.1 | Transgene Tiere | 38 |
| 2.2.1.1 | Konditionelle Knockouts | 38 |
| 2.2.1.2 | Induzierbare Knockouts | 39 |
| 2.2.2 | Genotypisierung | 39 |
| 2.2.3 | Primärzellkultur | 41 |
| 2.2.4 | Intraperitoneale Injektionen | 43 |
| 2.3 | Histologische Methoden..... | 44 |
| 2.3.1 | Allgemeine Gewebepreparation und Analyse | 44 |
| 2.3.2 | Immunhistochemie | 44 |
| 2.3.2.1 | DAB..... | 45 |
| 2.3.2.2 | Immunfluoreszenz | 45 |
| 2.3.3 | BrdU-Färbung | 46 |
| 2.3.4 | X-Gal Färbung | 46 |
| 2.4 | Molekularbiologische Methoden | 47 |
| 2.4.1 | RNS-Isolation | 47 |
| 2.4.2 | cDNS Synthese..... | 47 |
| 2.4.3 | Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR..... | 48 |
| 2.4.4 | Proteinexpression und Konzentrationsbestimmung | 49 |
| 2.4.4.1 | Transformation und Proteinexpression..... | 49 |
| 2.4.4.2 | Proteinextraktion und Konzentration..... | 50 |
| 2.4.4.3 | Proteinkonzentrationsbestimmung..... | 50 |
| 2.4.4.4 | Spezifitätsbestimmung und Funktionalität..... | 50 |
| 2.4.5 | Klonierung von Expressionsvektoren | 51 |
| 2.4.6 | Produktion retroviraler Partikel | 52 |
| 2.5 | Statistische Analysen | 53 |
| 3. | Ergebnisse | 55 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.1 | Die Expression von SOX2 in humanen Medulloblastomen | 55 |
| 3.1.1 | Immunhistochemie | 55 |
| 3.1.2 | SOX2 in RNS-Expressionsdaten | 56 |
| 3.2 | Sox2 in der frühen Kleinhirnentwicklung | 58 |
| 3.2.1 | Histologie..... | 58 |
| 3.2.2 | <i>Fate-mapping</i> | 59 |
| 3.3 | Sox2 im Mausmodell für Medulloblastome | 63 |
| 3.3.1 | Immunhistochemie | 63 |
| 3.3.2 | Tumorentstehung..... | 64 |
| 3.4 | Funktionelle Aspekte von Sox2 in Tumorzellen | 66 |
| 3.4.1 | Knockout von Sox2 in Körnerzellvorläufern..... | 66 |
| 3.4.1.1 | Knockout von Sox2..... | 66 |
| 3.4.1.2 | Primäre Körnerzellkultur..... | 70 |
| 3.4.2 | Überexpression von Sox2 in Tumorzellen..... | 74 |
| 3.5 | Sox2 im adulten Kleinhirn..... | 76 |
| 3.5.1 | Sox2-positive neuronale Vorläufer im murinen cerebellären Cortex..... | 76 |
| 3.5.1.1 | Histologie | 76 |
| 3.5.1.2 | <i>Fate-mapping</i> | 82 |
| 3.5.2 | SOX2-positive Vorläufer im humanen cerebellären Cortex..... | 86 |
| 3.5.2.1 | Normalgewebe..... | 86 |
| 3.5.2.2 | Infarktgewebe | 86 |
| 4. | Diskussion..... | 89 |
| 4.1 | Sox2 in der Entstehung von Medulloblastomen | 89 |
| 4.2 | Sox2 im adulten Kleinhirn..... | 96 |
| 5. | Ausblick für weitere Arbeiten | 101 |
| 6. | Anhang..... | 103 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 6.1 | SOX2 in humanen Medulloblastomen..... | 103 |
| 6.2 | Sox2 in der Kleinhirnentwicklung | 105 |
| 6.3 | Sox2 im Mausmodell für Medulloblastome | 106 |
| 6.4 | Funktionelle Aspekte von Sox2 in Tumorzellen | 108 |
| 6.5 | Standardreagenzien..... | 112 |
| 7. | Literatur..... | 113 |
| 8. | Lebenslauf | 131 |
| 9. | Dank..... | 135 |
| 10. | Eidesstattliche Erklärung..... | 137 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1-1 Historische Zeichnung von Santiago Ramon y Cajal (1894) | 12 |
| Abbildung 1.1-2 Übersicht über den Aufbau des cerebellären Cortex..... | 13 |
| Abbildung 1.2-1 Schema der embryonalen Bildung der äußeren Körnerzellschicht..... | 17 |
| Abbildung 1.3-1 Vergleich molekularer Subgruppen von Medulloblastomen. | 20 |
| Abbildung 1.3-2 Schematische Darstellung von Shh- und Wnt-Signalweg..... | 24 |
| Abbildung 1.4-1 Sox2-Färbung am adulten Maus Cerebellum. | 32 |
| Abbildung 3.1-1 SOX2 Expression in humanen Medulloblastomen | 57 |
| Abbildung 3.2-1 Sox2 wird in frühen Körnerzellvorläufern exprimiert | 59 |
| Abbildung 3.2-2 Sox-positive Körnerzellvorläufer tragen zum Aufbau des reifen Cerebellums bei..... | 62 |
| Abbildung 3.3-1 Onkogenes Potential Sox2-positiver Körnerzellvorläufer während der Kleinhirnentwicklung..... | 64 |
| Abbildung 3.4-1 Früher Verlust von Sox2 in Körnerzellvorläufern | 67 |
| Abbildung 3.4-2 Früher Verlust von Sox2 in murinen Shh-assoziierten Medulloblastomen... | 69 |
| Abbildung 3.4-3 Konstitutive Aktivierung des Shh-Signalweges treibt die Expression von Sox2 <i>in vitro</i> | 71 |
| Abbildung 3.4-4 Sox2 ist notwendig, um die Proliferation von Medulloblastomzellen zu modulieren. | 73 |
| Abbildung 3.4-5 Sox2 ist ausreichend, um die Proliferation von Medulloblastomzellen zu modulieren | 75 |
| Abbildung 3.5-1 Charakterisierung von Sox2-positiven Zellen in der Purkinjzellschicht..... | 77 |
| Abbildung 3.5-2 Sox2-Expression im adulten gesunden Cerebellum | 79 |
| Abbildung 3.5-3 Proliferation im adulten cerebellären Cortex..... | 81 |
| Abbildung 3.5-4 Vorläufereigenschaften von Sox2-positiven Zellen des adulten Cerebellums | 83 |
| Abbildung 3.5-5 Neurogenese aus Sox2-positiven Stammzellen des Cerebellums..... | 85 |
| Abbildung 3.5-6 SOX2-positive Zellen in reaktiven Gliosen in humanem Gewebe | 87 |
| Abbildung 4.2-1 Zusammenfassung der neurogenen Prozesse aus Sox2-positiven Zellen in der Kleinhirnentwicklung | 99 |

| | |
|--|-----|
| Abbildung 6.1-1 Patientendaten | 103 |
| Abbildung 6.1-2 SOX2-Expression in humanen Medulloblastomen | 104 |
| Abbildung 6.2-1 Sox2-Expression in der murinen Kleinhirnentwicklung..... | 105 |
| Abbildung 6.3-1 Sox2-Expression in Mausmodell für Medulloblastome..... | 106 |
| Abbildung 6.3-2 Induktion von Shh-assoziierten Medulloblastomen aus Sox2-positiven Zellen | 107 |
| Abbildung 6.4-1 Verlust von Sox2 in neuronalen Vorläuferzellen | 108 |
| Abbildung 6.4-2 Kompensation des frühen Verlustes von Sox2 in der Tumorentwicklung .. | 109 |
| Abbildung 6.4-3 Transduzierte Zellen in Körnerzellkulturen sind neuronalen Ursprungs | 110 |
| Abbildung 6.4-4 Sox2-positive Zellen exprimieren neuronale Marker nach Aktivierung des Shh-Signalweges..... | 111 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 2.2-1 Primerpaare für die Genotypisierung | 40 |
| Tabelle 2.2-2 PCR-Bedingungen für die Genotypisierung..... | 40 |
| Tabelle 2.3-1 Primäre Antikörper für die Immunhistochemie und der Immunzytochemie.... | 44 |
| Tabelle 2.4-1 Primerpaare für die qRT-PCR | 48 |
| Tabelle 2.4-2 Bedingungen für die qRT-PCR | 49 |



Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------|---|
| β2M | beta-2-Mikroglobulin |
| BLBP | <i>brain lipid binding protein</i> |
| BMP | <i>bone morphogenetic protein</i> |
| BrdU | 5-Bromo-2'-deoxyuridin |
| cMB | Medulloblastom des klassischen histologischen Subtyps |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-phenylindol |
| DCX | Doublecortin |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DG | Gyrus dentatus |
| dMB | Medulloblastom des desmoplastischen histologischen Subtyps |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| ex.5 | Tag x der Embryonalentwicklung |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| EGL | <i>external granule cell layer</i> ; äußere Körnerzellschicht |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FGF | <i>fibroblast growth factor</i> |
| G0 | G0-Phase des Zellzyklus |
| GFAP | <i>glial fibrillary acidic protein</i> |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> |
| H&E | Hämatoxilin-Eosin-Färbung |
| HBSS | Hanks buffered Saline Solution |
| HCl | Salzsäure |
| HEK | <i>human embryonic kidney cells</i> |
| IGL | <i>internal granule cell layer</i> ; innere Körnerzellschicht |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| bp | Basenpaare |
| KCl | Kaliumchlorid |
| Da | Dalton |
| LB | <i>lysogeny broth</i> |
| MB | Medulloblastom |
| MBEN | Medulloblastom mit extensiver Nodularität |
| ML | <i>molecular layer</i> ; Molekularschicht |
| NaCl | Natriumchlorid |
| OCT | Optimum cutting temperature |
| pX | postnataler Tag X |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PC | Plexus chorioideus |
| PCL | <i>purkinje cell layer</i> ; Purkinjezellschicht |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PKA | Proteinkinase A |

| | |
|-----|---|
| RFP | <i>red fluorescent protein</i> |
| RL | rhombische Lippe (Rautenlippe) |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SGZ | Subgranulärzone |
| SHH | Sonic Hedgehog |
| SOX | <i>sex determining region Y-box-genes</i> |
| SVZ | Subventrikulärzone |
| TE | Tris-EDTA |
| TMA | <i>tissue micro array</i> |
| VZ | Ventrikulärzone |
| WM | <i>white matter</i> ; weiße Substanz |

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor Sox2 spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung des zentralen Nervensystems und in verschiedenen Tumorarten des Gehirns. Um die Biologie dieser Tumorentstehung besser zu verstehen und um eventuelle therapeutisch wertvolle Ziele zu identifizieren, habe ich die Expression und Funktion von Sox2 im Medulloblastom untersucht. Das Medulloblastom ist der häufigste bösartige, frühkindliche Hirntumor. Medulloblastome entstehen in der hinteren Schädelgrube und metastasieren häufig entlang des Rückenmarks. Ich konnte zeigen, dass cerebelläre Körnerzellvorläufer, die eine Ursprungspopulation der Shh-assoziierten Gruppe von Medulloblastomen darstellen, in frühen Stadien Sox2 exprimieren, und dass aus genau diesen Zellen auch bis in postnatale Stadien Shh-abhängige Medulloblastome erzeugt werden können. Mir stand eine Stichprobe von humanem Tumormaterial zur Verfügung (n = 188), bei deren Analyse sich zeigte, dass SOX2 spezifisch in jener Subgruppe von Medulloblastomen überexprimiert wird, die von einer Aktivierung des Sonic Hedgehog (SHH)-Signalweges abhängt. Innerhalb dieser SHH-Gruppe wiederum, ließ sich die stärkste Überexpression von SOX2 in den Patienten feststellen, die Medulloblastome im jugendlichen oder erwachsenen Alter entwickelt hatten. Unabhängig von ihrer endogenen Sox2-Expression, bewirkt eine konstitutive Aktivierung des Shh-Signalweges sowohl eine Erhöhung der Proliferation und der ektopen Sox2-Expression in Körnerzellvorläufern *in vitro*, als auch die Ausbildung von Medulloblastomen mit erhöhter Sox2-Expression *in vivo*. Der frühe Verlust von Sox2 im Mausmodell für Medulloblastome hatte jedoch keinen Einfluss auf die Tumorentwicklung und das Überleben der Tiere. Durch Untersuchung der Expression anderer Sox-Gene nach dem Verlust von Sox2 konnte gezeigt werden, dass eine regulatorisch erhöhte Expression von Sox3 für den Verlust von Sox2 kompensiert. Eine akute Deletion von Sox2 in primären Kulturen von Medulloblastomzellen, resultierte in einer verringerten Proliferationsrate, während eine Überexpression von Sox2 zu einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen führte. Daraus konnte ich schließen, dass Sox2 notwendig für die Proliferation in murinen Shh-assoziierten Medulloblastomen ist und auch alleine ausreicht, um die Proliferation zu modulieren.

Um die physiologische Funktion und Verteilung Sox2-positiver Zellen und ihrer Nachkommen während der cerebellären Entwicklung und im adulten Kleinhirn zu untersuchen, habe ich Zellschicksalsuntersuchungen (*fate-mapping*) durchgeführt. Hierbei konnte ich zeigen, dass Sox2-positive Körnerzellvorläufer Nachkommen erzeugen, die zeitpunktspezifisch in

bestimmten Regionen der inneren Körnerzellschicht von adulten Tieren zu finden sind. Im adulten Kleinhirn sollte untersucht werden, ob weiterhin einzelne Sox2-positve Vorläufer erhalten bleiben, die neuronale Nachkommen erzeugen können. Bei der Suche nach dieser Population konnte ich eine bisher unbekante Population undifferenzierter, Sox2-positiver Zellen zwischen der Bergmann Glia in der Purkinjezellschicht von adulten Mäusen identifizieren. In Zellteilungs-Assays konnte ich zeigen, dass diese Zellen auch im reifen Kleinhirn proliferieren. In einer Kombination von Proliferations- und *fate-mapping* Untersuchungen ist es mit gelungen zum ersten Mal adulte Neurogenese aus Sox2-positiven Zellen im murinen Kleinhirn nachzuweisen.

Summary

The transcription factor Sox2 has been demonstrated to play essential roles during the embryonic development as well as in cancer of the central nervous system. In order to understand tumor biology more precisely and to identify potential therapeutical targets I thoroughly investigated the expression and function of Sox2 in medulloblastoma, a malignant embryonic brain tumor that initiates in the posterior fossa and eventually spreads throughout the entire cerebrospinal axis. I was able to demonstrate that cerebellar granule neuron precursors (CGNPs), which are believed to serve as the cell of origin for the Shh-pathway associated medulloblastoma subgroup, express Sox2 in early stages. I therefore examined a large series of human tumor samples (n=188) to show that SOX2 is specifically expressed in Sonic Hedgehog (SHH)-associated medulloblastoma with a striking preponderance in adolescent and adult cases. Furthermore, Shh-associated medulloblastoma can be initiated from Sox2-positive CGNPs in mice up to early postnatal stages. Independent of their endogenous Sox2 expression, constitutive activation of Shh-signaling in CGNPs results in significantly enhanced proliferation and ectopic expression of Sox2 *in vitro* and Sox2-positive medulloblastoma *in vivo*. Genetic ablation of Sox2 from murine medulloblastoma does not affect survival of the mice, most likely due to a compensatory overexpression of Sox3 over time. However, acute deletion of Sox2 from primary cultures of CGNPs with constitutive Shh-signaling significantly decreases proliferation whereas overexpression of Sox2 enhances proliferation of murine medulloblastoma cells. I conclude that Sox2 is a marker for Shh-dependent medulloblastoma, where it is both required and sufficient to drive tumor cell proliferation.

To investigate the physiological function and distribution of Sox2-positive cells and their progeny during cerebellar development and within the adult cerebellum I performed fate mapping experiments. I demonstrate here that Sox2-positive precursors give rise to a significant proportion of cerebellar granule neurons that show a time-point specific regionalization within the adult cerebellum. With these results in mind I tried to elucidate the existence of single Sox2-positive precursors that may retain the potential to generate neuronal progeny even after cerebellar development is complete. In the search of this neurogenic population I was able to identify a previously unknown subset of undifferentiated Sox2-positive cells among the Bergmann Glia of the mature cerebellar cortex. In an effort to further characterize these cells I performed BrdU-incorporation assays and found that these

cells retain the potential to proliferate and possibly pass the BrdU-label on to neuronal progeny. In a combination of BrdU-assays and fate-mapping studies I proved the existence of adult neurogenesis from Sox2-positive progenitors within the murine cerebellum for the first time.

1. Einleitung

1.1 AUFBAU UND FUNKTION DES CEREBELLUMS

Das Kleinhirn (*Cerebellum*) ist das höchste Integrationszentrum für die Koordination und Feinabstimmung von Bewegungsabläufen. Es lagert sich bei allen Wirbeltieren dorsal an den Hirnstamm an und liegt in der hinteren Schädelgrube caudal des Okzipitallappens des Großhirns (*Telencephalon*). Die enge Assoziation der caudalsten Anteile des Kleinhirns mit dem Hinterhauptsloch (*Foramen magnum*) spielt eine besondere Rolle bei der terminalen Symptomatik verschiedener Krankheitskomplexe. Bei ansteigendem Hirndruck oder Tumorbildung kann das Kleinhirn reaktiv in das *Foramen* hineingepresst werden und so das Rückenmark (*Medulla*) komprimieren, was zum Versagen des Atemzentrums und anderer lebenswichtiger basaler Strukturen und folglich zum Tode führt. Das Cerebellum bildet zusammen mit dem darunterliegenden Hirnstamm einen mit Liquor gefüllten Hohlraum des cerebralen Ventrikelsystems, den vierten Ventrikel. Drei Kleinhirnstiele verbinden das Cerebellum mit dem Hirnstamm (*Pedunculus cerebellaris superior, medius und inferior*) und dienen so auch als Bahnen für die afferenten und efferenten Verbindungen zum restlichen Gehirn. In der groben Anatomie ist deutlich die Furchung der cerebellären Oberfläche zu sehen. Die *Fissurae cerebelli* und die *Foliae cerebelli* gliedern das Kleinhirn in den zentral gelegenen Kleinhirnwurm (*Vermis cerebelli*) und die beiden lateral liegenden Kleinhirnhemisphären (*Hemispheria cerebelli*). Wie im Telencephalon bezeichnet man die oberflächliche, nervenzellreiche graue Schicht als Rinde (*Cortex*) und die innen liegende, faserreiche weiße Substanz als Mark (*Corpus medullare cerebelli*). Wie im Großhirn dient auch im Cerebellum die Furchung der Oberflächenvergrößerung. Im Querschnitt ähnelt diese aufgefaltete Anordnung einem Baum (*Arbor vitae*, Lebensbaum), entsprechend bezeichnet man einen zwischen zwei Furchen vorgewölbten Rindenabschnitt als *Folium* (lat. Blatt). Um die regulativen und integrativen Funktionen erfüllen zu können, enthält das Kleinhirn mehr als die Hälfte aller Neurone des gesamten Gehirns. Der häufigste neuronale Zelltyp des zentralen Nervensystems von Säugetieren ist die cerebelläre Körnerzelle. Die Körnerzellen bilden die innerste Schicht des adulten cerebellären Cortex, die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum* – engl. internal granule cell layer, IGL).

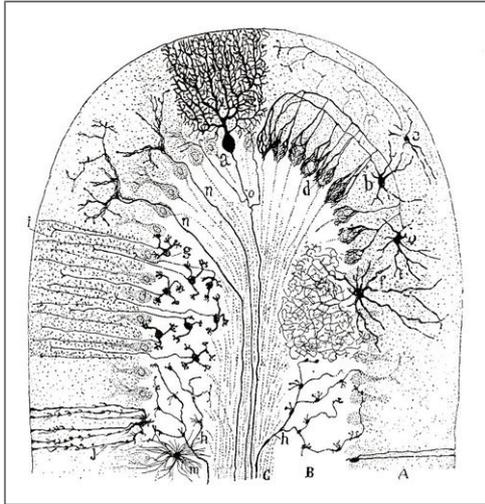


Abbildung 1.1-1 Historische Zeichnung von Santiago Ramon y Cajal (1894). Transversaler Schnitt durch den cerebellären Cortex eines Säugetiers. A: Molekularschicht; B: Körnerzellschicht; C: Weiße Substanz. a: Frontalansicht einer Purkinjezelle; b: Sternzelle in der Molekularschicht; d: Purkinjezelle mit absteigendem Axon und terminaler Arborisation einer Sternzelle, die einen Korb um das Soma der Purkinjezelle formt; e: oberflächliche Sternzelle; f: Sternzelle in der Körnerzellschicht; g: Körnerzelle mit langem aufsteigendem Axon, das sich in der Molekularschicht spaltet; h: Moosfasern; j: Bergmann Gliazelle; m: Neurogliazellen der Körnerzellschicht; n: Kletterfaser; o: Aufsteigendes Kollateral eines Purkinjezellaxons. *Im Original im Instituto Cajal, Madrid, Spanien.*

Nach außen folgen die einschichtige Purkinjezellschicht (*Stratum purkinjense* – engl. Purkinje cell layer, PCL) und die zellkörperarme Molekularschicht (*Stratum moleculare* – engl. molecular layer, ML). Die ML enthält Korb- und Sternzellen, die PCL enthält neben den Purkinjezellen auch die entwicklungsbiologisch wichtigen Bergman Gliazellen und die IGL enthält neben reifen Körnerzellen auch Golgizellen und Astrozyten. Die weiße Substanz im inneren des Cerebellums besteht hauptsächlich aus Nervenzellfasern sowie Astrozyten und Oligodendrozyten. Abbildung 1.1-1 zeigt eine historische Zeichnung von Santiago Ramon y Cajal, in der der zelluläre Aufbau des cerebellären Cortex zu sehen ist.

Zwei Zelltypen spielen eine besondere Rolle in der Funktionsweise des Kleinhirns: Purkinjezellen und Körnerzellen. Purkinjezellen gehören zu den am frühesten entdeckten (1837 durch den tschechischen Physiologen Jan Evangelista Purkyně) und auch den markantesten Neuronen des gesamten Gehirns. Besonders charakteristisch ist das große Soma und der breite Dendritenbaum, der sich nach apikal in Richtung der Molekularschicht ausbreitet. Jede einzelne Zelle kann so bis zu 300000 Synapsen bilden. Viele dieser Synapsen werden mit Parallelfasern gebildet, die ihren Ursprung in den Körnerzellen haben. Purkinjezellen sind die einzigen efferenten Neurone des Kleinhirns und projizieren über ihr langes absteigendes Axon in die tiefen Kleinhirnerne, wo sie über ihren Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und durch 1000 zelluläre Kontakte ihre hemmende Wirkung auf die nukleären Neurone ausüben.

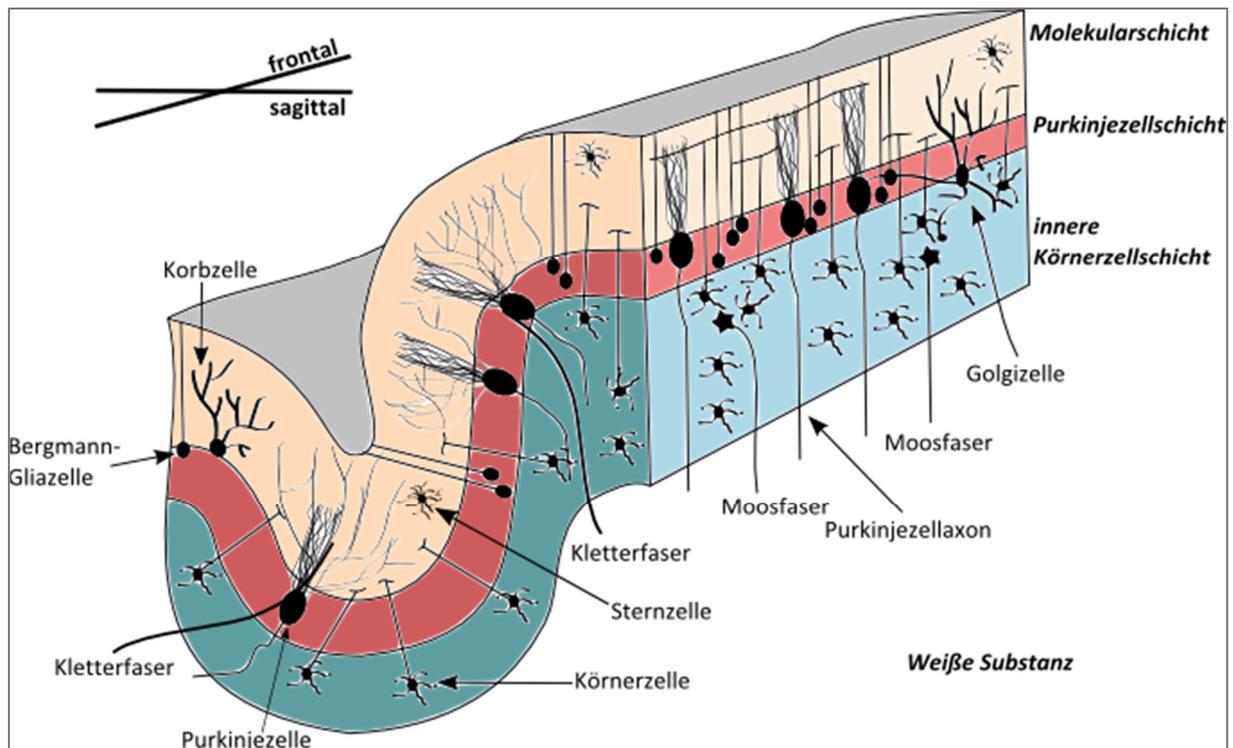


Abbildung 1.1-2 Übersicht über den Aufbau und die Zytoarchitektur des cerebellären Cortex. Sagittaler und frontaler Anschnitt eines cerebellären Folioms mit allen relevanten Zelltypen und Fasern des Kleinhirns.

Cerebelläre Körnerzellen sind im Vergleich zu den riesigen Purkinjellen (40 μm) winzig, nur 10 μm beträgt ihre durchschnittliche Größe. Allerdings stellen die Körnerzellen die zahlreichste Population von Neuronen im gesamten Gehirn dar. Beim Menschen wird ihre Zahl auf rund 50 Milliarden Zellen geschätzt, was bedeutet, dass grob 75% der Nervenzellen im Gehirn cerebelläre Körnerzellen sind. Die dicht gepackte Körnerzellschicht schließt sich der Purkinjellschicht im voll entwickelten Gehirn nach innen an und sendet durch den Neurotransmitter Glutamat exzitatorische Afferenzen in die Molekularschicht. Das Axon spaltet sich dort T-förmig auf und verläuft als Parallelfaser längs der Kleinhirnwindungen und somit senkrecht durch die Dendritenbäume der Purkinjellen, wo es 80-100 synaptische Verbindungen bilden kann. Die ungewöhnliche Form des Körnerzellaxons ist durch die Migrationsbewegung während der postnatalen Kleinhirnentwicklung bedingt, auf die später eingegangen wird. Die basalen Dendriten der multipolaren Körnerzellen bilden mit den Axonen der Golgizellen kleine Geflechte (*Glomeruli cerebellares*), an denen auch die Moosfasern enden. Moosfasern, die ihre Afferenzen hauptsächlich vom Rückenmark und anderen Hirnstammkernen bekommen, sowie auch Kletterfasern, die die Efferenzen der inferioren Olive ins Cerebellum darstellen, erreichen das Kleinhirn von außen und projizieren direkt, aber auch über Verschaltung mit anderen apikal gelegenen cerebellären Neuronen in

die tiefen Kleinhirnkern. Die tiefen Kleinhirnkern sind zellreiche Gebiete innerhalb der weißen Substanz des Kleinhirns. Sie sind die einzige Ausgangsstation für Efferenzen aus dem Cerebellum. Die jeweils paarig vorliegenden *Nuclei dentati*, die *N. emboliformes* und *globosus* (oft zusammen als *N. interpositus*) und *N. fastigii* (von lateral nach medial) erhalten direkte excitatorische Eingänge von Moos- und Kletterfasern, sowie inhibitorische Eingänge von den Purkinjezellen. In Abbildung 1.1-2 ist ein schematischer Schaltkreis mit allen Zell- und Fasertypen des cerebellären Cortex gezeigt.

In den tiefen Kleinhirnkernen werden also Informationen aus basalen Hirnstrukturen integriert und unter anderem via Thalamus zu den motorischen Cortexarealen des Großhirns weitergeleitet. Hier werden funktionell drei Bereiche des Cerebellums unterschieden. Das Vestibulocerebellum erhält aus dem Gleichgewichtsorgan Information über Körperlage und -bewegung zur Steuerung der Halte- und Stützmotorik. Zum anderen ist es verantwortlich für die Feinabstimmung fast aller Augenbewegungen, die von den verschiedenen okulomotorischen Zentren im Hirnstamm generiert werden. Das Spinocerebellum erhält Afferenzen aus dem Rückenmark, die Informationen über die Stellung von Gelenken und Muskeln geben. Außerdem erhält es kontinuierliche Rückmeldung über die zum Rückenmark und damit in die Peripherie gesendeten Bewegungssignale, was zur Sicherung dient, dass eine Bewegung wie geplant abläuft. Hierunter fällt auch die für das Sprechen notwendige außerordentlich feine Abstimmung der beteiligten mimischen und Kehlkopfmuskulatur. Das Pontocerebellum (auch Cerebrocerebellum) ist funktionell mit dem telencephalen Cortex assoziiert. Es integriert Signale aus vielen Bereichen, vor allem den prämotorischen Zentren im Frontallappen, wo die Planung von Bewegungen stattfindet. Diese eher groben Entwürfe werden zu den lateralen Kleinhirnhemisphären gesendet, wo sie weiter entwickelt, fein abgestimmt, moduliert, korrigiert, mit aus Vorerfahrungen gewonnenen internen Modellen abgeglichen werden, und die geplante Aktivität der beteiligten Muskeln koordiniert wird. Hierbei hilft auch der Rückkopplungskreis über den *Nucleus ruber* und die Olive zurück zum Kleinhirn. Die Ergebnisse dieser Berechnungen gehen zum Thalamus, wo sie (mit den Ergebnissen des anderen großen subkortikalen motorischen Zentrums, der Basalganglien) integriert und zum motorischen Cortex weitergeleitet werden.

Neben der bekannten Rolle des Kleinhirns für Planung, Koordination und Feinabstimmung von Bewegungen, wird zunehmend auch eine Funktion bei kognitiven und Lernprozessen im Cerebellum diskutiert. Automatisierte Bewegungsabläufe, also Inhalte des prozeduralen

Gedächtnisses, wie Koordination der Gesichtsmuskulatur beim Sprechen oder erlerntes koordiniertes Zusammenspiel von Körperteilen (Klavierspielen, Fahrradfahren) sind im Kleinhirn gespeichert. Außerdem ist das Kleinhirn beteiligt an der Pawlow'schen Konditionierung des Lidschlussreflexes, also auch Ort assoziativen Lernens. Übersichtsliteratur über die Grob- und Feinanatomie des Cerebellums gibt es von Mitchell Glickstein und Kollegen (Voogd *et al.*, 1998, Sultan *et al.*, 2007).

Die Auswirkungen und deutliche Außenwirkung der Funktion des Cerebellums sind wichtige Indikatoren für Erkrankungen, die das motorische Zentrum des Zentralnervensystems betreffen.

1.2 ONTOGENESE DES CEREBELLUMS

Das Kleinhirn entsteht ontogenetisch aus dem vierten Hirnbläschen zwischen Metencephalon und Myelencephalon. Die Entwicklung dieser Struktur beginnt in der Maus embryonal mit Ausbildung der cerebellären Anlage und der Bildung der rhombischen Lippe (Rautenlippe) etwa an Embryonaltag 9 (e9) und endet erst um den postnatalen Tag 20 (p20) mit der Bildung der charakteristischen Schichtung des cerebellären Cortex. Das Cerebellum stammt vom Rhombomer r1 ab, dem rostralen Anteil der Rautenlippe, welcher durch die Expression der zwei Transkriptionsfaktoren *Otx2* und *Hoxa2* begrenzt wird und auch als obere Rautenlippe bezeichnet wird (Joyner 1996, Joyner *et al.*, 2000). Die Rhombomere r2-r8 bilden in ihrer Gesamtheit die untere Rautenlippe (Landsberg *et al.*, 2005). Alle Zellen des Kleinhirns gehen von zwei unterschiedlichen Keimepithelien aus. Purkinjezellen, Zellen der tiefen Kleinhirnerne 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 (Hallonet *et al.*, 1993, Dino *et al.*, 2000, Hoshino *et al.*, 2005). Das zweite Keimepithel, die Rautenlippe, ist sowohl der Entstehungsort der cerebellären Körnerzellen als auch einer Subpopulation der tiefen Kleinhirnerne und Neurone verschiedener präcerebellärer Nuclei im Hirnstamm (Wingate 2001, Machold *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2005). Im Detail beginnt die Kleinhirnentwicklung, wie bei allen Chordaten mit der Neurulation, also der Bildung des Neuralrohrs, als Anlage des späteren Zentralnervensystems (ZNS). Von den drei embryonalen Keimblättern (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) trägt nur der zentrale Anteil des Ektoderms zur Bildung der Neuralplatte und der anschließenden Faltung zum Neuralrohr bei. Die Auffaltung erfolgt von der Neuralplatte, über die Bildung der Neuralrinne und des dorsalen Abschlusses zu einer rohrförmigen Struktur, die das frühe Rückenmark darstellt. Im Inneren des Neuralrohrs befindet sich der *Liquor cerebrospinalis*, der den Hohlraum zur Anlage des Gehirns offen hält. Die Neurulation wird durch lösliche Wachstumsfaktoren der Chorda dorsalis und der Dachplatte induziert, die durch dorso-ventrale Gradienten von BMP-4 und SHH eine Kompartimentalisierung des embryonalen ZNS herbeiführen (Watanabe *et al.*, 1998). Das Kleinhirn Primordium entsteht aus einer Lücke im dorsalen Neuralrohr, was zu einer lateralen Ausstülpung auf Höhe der pontinen Beuge führt. Die dorsolateralen Bereiche der Flügelplatte krümmen sich nach medial und bilden so die rhombische Lippe (RL). Durch Wachstumsbewegungen und Vorwölbung der rhombischen Lippe nach dorsal bildet sich eine transversal gestellte Platte, die Kleinhirnplatte

(Duband 2010). Die rhombische Lippe stellt eine der beiden Keimzonen des sich entwickelnden Kleinhirns dar. Hier entstehen Körnerzellvorläufer, die zunächst von der RL tangential nach anterior auswandern und dann durch klonale Expansion bis in frühe postnatale Phasen die äußere Körnerzellschicht bilden (*Stratum granulosum externum* - engl. external granule cell layer, EGL) (Hatten *et al.*, 1997). Die frühe Entwicklung der Kleinhirnanlage ist in Abbildung 1.2-1 schematisch dargestellt.

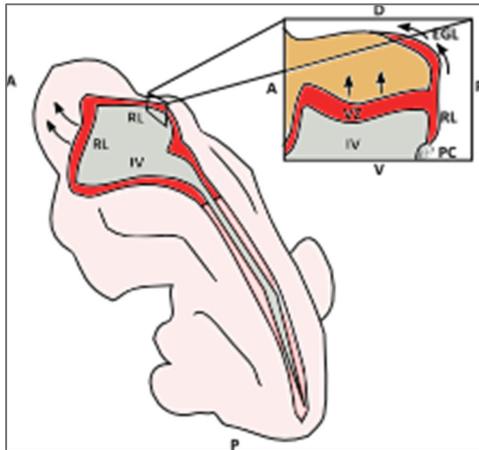


Abbildung 1.2-1 Schema der embryonalen Bildung der äußeren Körnerzellschicht aus der rhombischen Lippe. Dorsale Ansicht eines Mausembryos an Embryonaltag 13.5 mit einem Anschnitt der migrierenden Körnerzellvorläufern entlang der rhombischen Lippe. A, anterior; D, dorsal; EGL, äußere Körnerzellschicht; P, posterior; PC, Plexus choroideus, PCL, Purkinjezellschicht; RL, rhombische Lippe, V, ventral; VZ, Ventrikulärzone; IV, vierter Ventrikel.

Zwischen Tag 13 der Embryonalentwicklung (e13) und Tag 15 *post partum* (p15) kann die EGL in eine oberflächliche Zone proliferierender Zellen und eine innere Zone differenzierender Zellen untergliedert werden. Diese Unterteilung wird durch die Expression verschiedener entwicklungsabhängiger und funktioneller Marker deutlich (RU-49, NeuN, Ki67 etc.), welche während der cerebellären Entwicklung differentiell exprimiert werden (Hatten *et al.*, 1995, Weyer *et al.*, 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. Im Gegensatz zu dieser langen Entwicklungsperiode entstehen Purkinjezellen embryonal nur etwa zwischen Embryonaltag e11 bis e14 aus der Ventrikulärzone (VZ) und sind schon früh ausdifferenziert. Postmitotische Purkinjezellvorläufer migrieren radial von der Ventrikulärzone bis an den inneren Rand der EGL. Durch das mitogene Protein Sonic Hedgehog (Shh), das von den Purkinjezellen sezerniert wird, werden die Körnerzellvorläufer in der EGL zur Proliferation angeregt. 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 (Wechsler-Reya *et al.*, 1999). Durch diese im Gesamthirn spezielle Histogenese von außen nach innen, ist auch die besondere Form des

Körnerzellaxons zu erklären. Zu Beginn ihrer Wanderung von der EGL bilden die Körnerzellen auf beiden Seiten einen Fortsatz aus, der parallel zum Folium, also senkrecht zum Dendritenbaum der Purkinjezellen ausgerichtet ist (die zukünftigen Parallelfasern). Für die Migrationsbewegung nach innen gehen die Körnerzellen eine Verbindung mit den radialen Fortsätzen der Bergmann Gliazellen ein, an denen sie bis unter die PCL wandern, wobei sich die beiden Fortsätze der Körnerzelle zu einem Axon vereinigen und so die apikale T-Form erhält (Powell *et al.*, 1997).

1.3 DAS MEDULLOBLASTOM

Das Medulloblastom ist der häufigste maligne Hirntumor im Kindesalter, und nach den Leukämien das häufigste pädiatrische Malignom überhaupt. 1925 wird in der Literatur zum ersten Mal das *Medulloblastoma cerebelli* erwähnt (Bailey *et al.*, 1925). Bailey und Cushing beschrieben hier ein Gliom des mittleren Cerebellums, das seinen Ursprung in sogenannten Medulloblasten, undifferenzierten Vorläuferzellen des Gehirns, nehmen sollte. Bis heute ist der genaue zelluläre und anatomische Ursprung der Medulloblastome nicht endgültig geklärt. Diese Tatsache ist auch ein Grund dafür, dass trotz breit angelegter Therapieansätze aus Operation, Bestrahlung und Chemotherapie nur von einer Fünf-Jahres-Überlebensrate von 66% ausgegangen wird (Gatta *et al.*, 2009). Medulloblastome treten vornehmlich im frühen Kindesalter mit einem Inzidenzmaximum zwischen sieben und neun Jahren auf. Allerdings gibt es auch Fälle im Säuglings- und Erwachsenenalter, die zwar selten, aber nicht minder aggressiv sind (Zeltzer *et al.*, 1999, Packer *et al.*, 2008, Brandes *et al.*, 2009).

1.3.1 Ursprung und Klassifikation des Medulloblastoms

Medulloblastome zählen zu den primitiven neuroektodermalen Tumoren (PNET) mit Ursprung in der hinteren Schädelgrube. Typischerweise sind Medulloblastome in der Mittellinie des Cerebellums lokalisiert und weisen Kontakt zum IV. Ventrikel auf. Aufgrund dieser Lokalisation können sie schnell und invasiv wachsen und können durch das Liquorsystem in andere Teile des Gehirns oder bis in die Wirbelsäule metastasieren. „Das Medulloblastom“ als eine einheitliche Gruppe von Tumoren anzusehen, ist eine Sichtweise, die lange überholt ist. Histologisch kann man Medulloblastome in vier Subgruppen einteilen: „klassisch“, „extensiv nodulär/desmoplastisch“, „anaplastisch“ und „großzellig“, wobei letztere häufig als *large cell/anaplastic (LCA) medulloblastoma* zusammengefasst werden (Gilbertson *et al.*, 2008). Da die Aussagekraft des histologischen Phänotyps häufig beschränkt ist, wird mit den fortschreitenden Möglichkeiten der Molekularbiologie dazu übergegangen, Medulloblastome auf Grund ihrer molekularen Profile zu klassifizieren. Das globale Genexpressionsprofil dient so als Einteilungskriterium in molekulare Subgruppen. Mittlerweile wurden mehrere Kohorten von humanen Medulloblastomen auf ihr Genexpressionsprofil untersucht. So hat sich ein System von vier eigenständigen molekularen Gruppen als aktueller Konsens etabliert: WNT-

assoziierte Gruppe, Sonic Hedgehog (SHH)-assoziierte Gruppe, Gruppe 3 und Gruppe 4 Medulloblastome (Kool *et al.*, 2008a, Northcott *et al.*, 2011b, Taylor *et al.*, 2012). Die aktuelle Einteilung der Subgruppen des Medulloblastoms ist in Abbildung 1.3-1 mit zugehörigen klinischen Parametern und der zugrunde liegenden Genetik dargestellt. Die WNT- und SHH-Gruppe sind durch eine konstitutive Aktivierung der jeweils namensgebenden hochkonservierten Signalwege charakterisiert. Häufig lässt sich eine Korrelation zwischen molekularer Subgruppe mit einer histologischen Subgruppe feststellen, so dass bei Tumoren der WNT-Gruppe ein klassischer histologischer Befund vorliegt und man andererseits bei einem desmoplastischen Befund meist von einer Einteilung in die SHH-Gruppe ausgehen kann (Kool *et al.*, 2008b).

Bei der WNT-Gruppe geht man von einer relativ guten Langzeitprognose aus (Ellison *et al.*, 2005, Clifford *et al.*, 2006, Ellison *et al.*, 2011). Neben der klassischen Histologie sind WNT-Tumore auch durch nukleäre Akkumulation von β -Catenin charakterisiert (Rogers *et al.*, 2009). Weitere Merkmale dieser Gruppe sind Monosomien bezogen auf Chromosom 6 und Expression des WNT-Zielgens *DKK1* (Thompson *et al.*, 2006, Northcott *et al.*, 2011b).

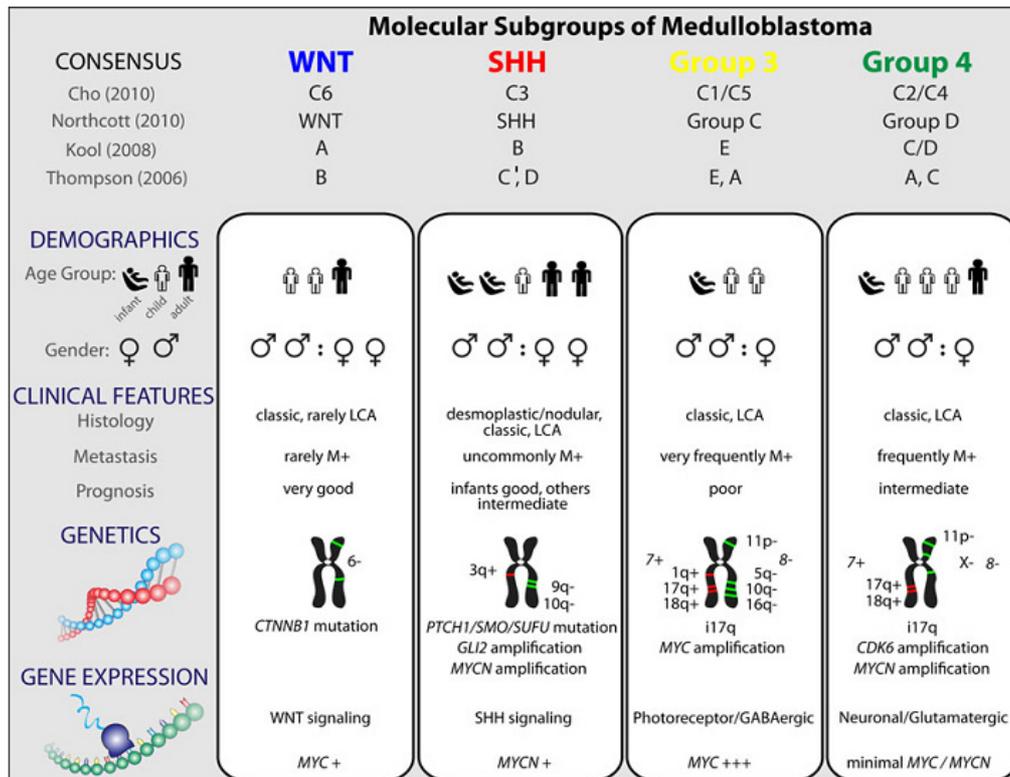


Abbildung 1.3-1 Vergleich molekularer Subgruppen von Medulloblastomen. Aktuelle Klassifizierung unter Einbeziehung veralteter Gruppennomenklaturen und demographischer, klinischer und genetischer Charakteristika. (Taylor *et al.*, 2012)

Wie bei der WNT-Gruppe ist das zentrale Charakteristikum der SHH-Gruppe eine pathologische Aktivierung des namensgebenden Signalweges (Northcott *et al.*, 2011b, Schwalbe *et al.*, 2011, Kool *et al.*, 2012). Häufig sind somatische Mutationen in den Genen für die Signalwegskomponenten PTCH1, SMO und SUFU, aber auch Amplifikationen der SHH-Zielgene *GLI1* und *GLI2* können zur konstitutiven Aktivierung des Signalweges führen (Johnson *et al.*, 1996, Hahn *et al.*, 1999, Northcott *et al.*, 2009, Adamson *et al.*, 2010, Northcott *et al.*, 2011a). Zusätzlich findet man in Tumoren dieses Subtyps häufig eine Deletion des q-Arms von Chromosom 9, auf dem das *PTCH1*-Gen lokalisiert ist (Pietsch *et al.*, 1997, Northcott *et al.*, 2011b). Typischerweise weisen diese Tumore Immunpositivität für GLI1, GAB1 und SFRP1 auf (Thompson *et al.*, 2006, Al-Halabi *et al.*, 2011, Ellison *et al.*, 2011). SHH-assoziierte Medulloblastome machen etwa 25% aller Medulloblastome aus (Hatten *et al.*, 2011), wobei die Altersverteilung in dieser Gruppe eine Besonderheit darstellt. Vornehmlich Säuglinge und Erwachsene entwickeln Medulloblastome der SHH-Gruppe, Kinder sind nur sehr selten betroffen (Northcott *et al.*, 2011a). Diese biphasische Altersverteilung lässt vermuten, dass eine große Heterogenität hinsichtlich klinischer, molekularer und entwicklungsbiologischer Parameter innerhalb dieser Gruppe besteht. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung des Shh-Signalweges in Körnerzellvorläufern der rhombischen Lippe und der äußeren Körnerzellschicht zur Entstehung von Shh-assoziierten Medulloblastomen führen kann (Schüller *et al.*, 2008).

Die verbleibenden Subgruppen 3 und 4 sind nicht durch die Dysregulation eines bestimmten Signalweges gekennzeichnet.

Die Diagnose von Tumoren der dritten Subgruppe ist momentan noch nicht durch eine einfache Analyse eines charakteristischen Markers möglich. Empfohlen wird, dass ein molekularer Abgleich mit etablierten Tumoren der Gruppe 3 durchgeführt wird und so auch eine gleichzeitige Aktivierung des WNT- und SHH-Signalweges ausgeschlossen wird (Kool *et al.*, 2008a, Cho *et al.*, 2011). Ferner zeigen Gruppe 3-Tumoren immunhistochemische Reaktivität für den Marker NPR3 (Northcott *et al.*, 2011b). Diskutiert wird aktuell, ob die Gruppe 3, aufgrund der praktisch exklusiven Amplifikation des Gens *MYC*, den Namen MYC-Gruppe tragen sollte (Cho *et al.*, 2011, Hatten *et al.*, 2011). Medulloblastome der Gruppe 3 weisen häufig eine großzellig/anaplastische Histologie auf und haben aufgrund der hohen Metastasierungsneigung die schlechteste Prognose aller molekularen Subgruppen (Northcott *et al.*, 2011b).

Die Tumoren der Gruppe 4 werden von der klinischen, als auch von der histologischen Seite als die prototypischen Medulloblastome gesehen. Dennoch erfolgt die Klassifizierung unter anderem durch Ausschluss der anderen Subgruppen, bzw. durch Abgleich mit bereits klassifizierten Tumoren der Gruppe 4 (Taylor *et al.*, 2012). Obwohl die molekulare Pathogenese bisher noch ungeklärt ist, gibt es einige Charakteristika, die Tumoren der Gruppe 4 gemeinsam haben. Dieser Subtyp scheint durch eine Überexpression von Genen charakterisiert zu sein, die eine Rolle in der neuronalen Entwicklung und neuronaler Differenzierung spielen (Kool *et al.*, 2008a, Cho *et al.*, 2011). Ferner ist der häufige Verlust des X-Chromosoms exklusiv dieser Gruppe zuzuordnen (Taylor *et al.*, 2012). Obwohl mittlerweile auch der spannungsgesteuerte Kaliumkanal KCNA1 als spezifischer histologischer Marker diskutiert wird (Northcott *et al.*, 2011b), stellt die molekulare Subgruppe 4 den am schlechtesten charakterisierten Subtyp des Medulloblastoms dar.

1.3.2 Symptome, Diagnostik und Therapie des Medulloblastoms

Erste klinische Symptome sind typischerweise die zunächst unspezifischen Symptome eines erhöhten Hirndrucks: Kopfschmerzen, Sehstörungen sowie morgendliche Übelkeit und Erbrechen (Alston *et al.*, 2003). Durch die Blockade der Zirkulation der Cerebrospinalflüssigkeit kann es bei sehr jungen Patienten zur Ausbildung einer Hydrocephalus kommen, d. h. der erhöhte Flüssigkeitsdruck im Ventrikelsystems des Gesamthirns führt zu einer Verformung der noch weichen Schädelkalotte. Die primäre Lokalisation des Medulloblastoms im Cerebellum bedingt die im Verlauf der Krankheit vermehrt auftretende Ataxie. Schwindel und Koordinationsprobleme, sowie eine allgemeine Beeinträchtigung der Motorik sind typisch für ein fortschreitendes Tumorwachstum. Bei infiltrativem Wachstum und Metastasierung sind auch Ausfallerscheinungen zu beobachten, die spezifisch für die sekundär befallenen Hirnstrukturen sind. Die Diagnose wird auf Basis bildgebender Verfahren (z. B. Magnetresonanztomographie) erstellt, wobei hier Lokalisation, Größe und Ausdehnung des Tumors genau beurteilt werden können. Zur Absicherung der Diagnose und für spezifische Therapieansätze, wie zum Beispiel aufgrund der histologischen oder molekularen Gruppe des Tumors, wird operativ entferntes Tumorgewebe immunhistochemisch und evtl. molekularbiologisch untersucht. Unabhängig von der Eingruppierung umfasst die Behandlung eine Kombination aus operativer Resektion, Bestrahlung und systemischer Chemotherapie

(Evans *et al.*, 1990, Tait *et al.*, 1990, Kortmann *et al.*, 2000, Taylor *et al.*, 2003, Gerber *et al.*, 2014). Bei den häufig sehr jungen Patienten muss genau zwischen den Erfolgsaussichten der Bestrahlung und den zu erwartenden psychomotorischen und kognitiven Beeinträchtigungen in der frühkindlichen Entwicklung und der damit koinzidierenden postnatalen Entwicklung des Kleinhirns abgewogen werden (Duffner *et al.*, 1993). Trotz großer Fortschritte weisen die aktuellen Therapieansätze immer noch unerwünschte Sekundäreffekte und eine daraus resultierende signifikante Sterberate auf. Durch die genaue Charakterisierung der Subgruppen des Medulloblastoms und die Untersuchung des zellulären Ursprungs der verschiedenen Subtypen, können Therapien spezifisch auf beteiligte Proteine oder Zellpopulationen zugeschnitten werden. In der SHH-Gruppe sind viele Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren bekannt, die, auch wenn sie nicht selber mutiert sind, trotzdem eine pathogene Überaktivierung abfangen können. So wurden niedermolekulare Substanzen entdeckt, die als Inhibitoren des Transmembranrezeptors Smoothed die Aktivität des SHH-Signalweges reprimieren können (Berman *et al.*, 2002, Romer *et al.*, 2004, Romer *et al.*, 2005). Diese Inhibitoren wurden bereits in Mausmodellen für Medulloblastome getestet und werden aktuell in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit im humanen System untersucht (Coon *et al.*, 2010). Die molekulare Analyse von primären Medulloblastomen verspricht große Fortschritte im Hinblick auf gezielte Krebstherapien, welche die molekularen, zytologischen und entwicklungsbiologischen Eigenschaften der Tumoren als Grundlage haben.

1.3.3 Signalwege der Medulloblastomentwicklung

Zwei evolutionär hochkonservierte entwicklungsbiologische Signalwege spielen eine besondere Rolle bei der frühen Entwicklung des Cerebellums und auch bei der Entstehung von Medulloblastomen. Eine Fehlregulation des WNT- oder Sonic Hedgehog (SHH)-Signalweges (Abbildung 1.3-2) kann zu einer Hyperproliferation der cerebellären Körnerzellen und so zur Tumorformation führen.

Der WNT-Signalweg ist in etwa 15% aller Medulloblastome pathologisch verändert (Roussel *et al.*, 2011). Im Grundzustand des WNT-Signalweges liegt β -Catenin, das durch das *CTNNB1*-Gen kodiert wird, phosphoryliert im Zytoplasma der Zelle vor. β -Catenin wird durch einen Proteinkomplex aus APC, Axin, Ck1 α und der Kinase GSK-3 β ubiquitiniert und so durch das Proteasom geregelt degradiert (Aberle *et al.*, 1997, Behrens *et al.*, 1998, Amit *et al.*, 2002). Die

Aktivierung des WNT-Signalwegs erfolgt durch einen Agonisten an den Transmembranrezeptor Frizzled. Diese Bindung setzt eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang, die zur Inaktivierung der Proteinkinase GSK-3 β führt, was wiederum zur Dephosphorylierung von β -Catenin führt (Bhanot *et al.*, 1996, Salic *et al.*, 2000, Dann *et al.*, 2001). β -Catenin wird folglich nicht mehr abgebaut und gelangt in den Nukleus, wo es als primärer Effektor des WNT-Signalweges die Transkription der Zielgene DKK1, MYC, Axin2 und CD44 führt (He *et al.*, 1998, Wielenga *et al.*, 1999, Jho *et al.*, 2002, Tolwinski *et al.*, 2004, Chamorro *et al.*, 2005). Das Turcot-Syndrom, bei dem Mutationen im Tumorsuppressorgen APC Kolonkarzinome und neuroepitheliale Gehirntumoren einschließlich dem Medulloblastom auslösen, gab erste Hinweise auf eine Beteiligung des WNT-Signalweges an der Medulloblastomentstehung (Hamilton *et al.*, 1995). Zusätzlich stellte sich bei weiteren Untersuchungen heraus, dass auch sporadische Mutationen im *CTNNB1*-Gen, welche zur Stabilisierung von β -Catenin führen und somit auch den WNT-Signalweg aktivieren, häufig in der Gruppe der WNT-assoziierten Tumoren vorkommen (Zurawel *et al.*, 1998).

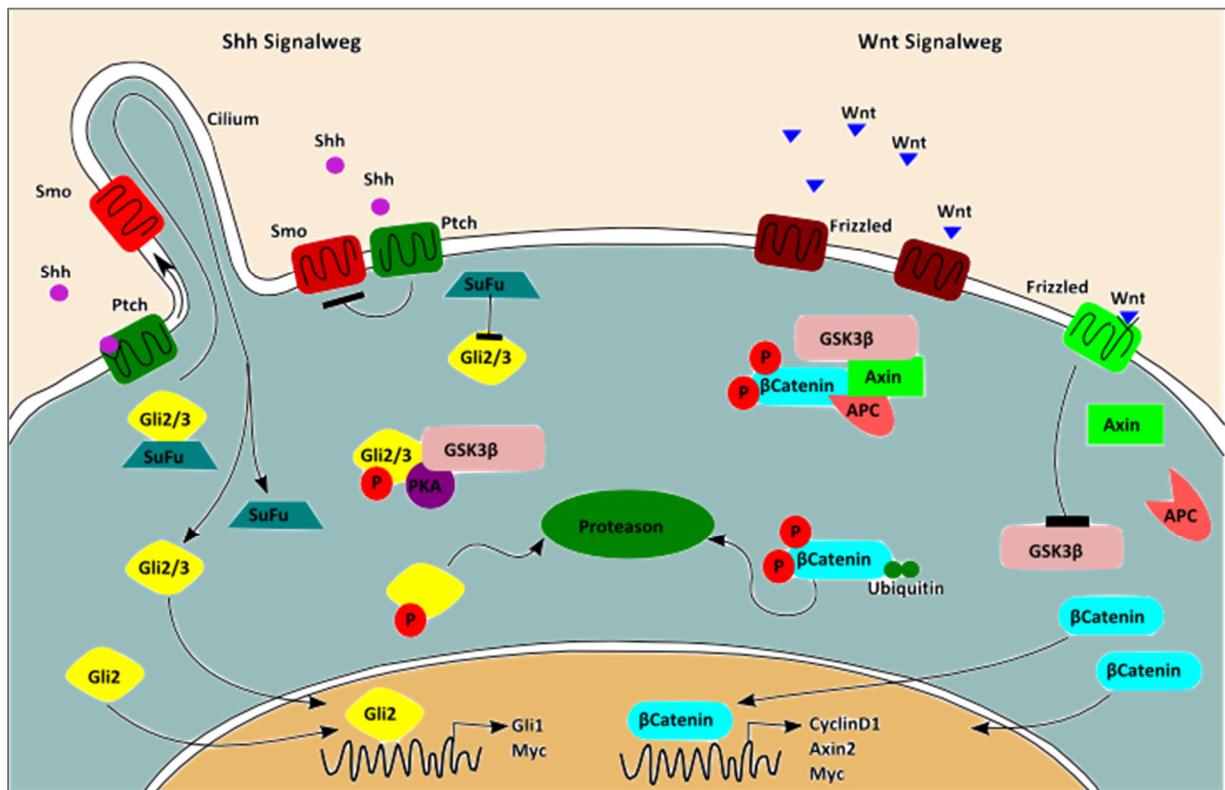


Abbildung 1.3-2 Schematische Darstellung von Shh- und Wnt-Signalweg Bei inaktivem Shh-Signalweg inhibiert der Transmembranrezeptor Patched (Ptch) den Smoothened-Rezeptor (Smo), da er die Translokation von Smo in das primäre Cilium verhindert. Suppressor of Fused (SuFu) inhibiert die Zielgene des Shh-Signalweges Gli2 und Gli3 im Cytoplasma und im primären Cilium. Gli2 und Gli3 werden ohne stabilisierende Komplexierung mit zytosolischen Proteinen durch das Proteasom abgebaut. Bei Bindung von Shh-Protein dissoziiert Ptch von Smo, welches in das primäre Cilium wandert. SuFu bindet nicht länger Gli2 und Gli3, die in den Zellkern translozieren und als Transkriptionsfaktoren wirken. Während des inaktiven Wnt-Signalwegs ist β -Catenin phosphoryliert und wird proteasomal abgebaut. Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs zerstört den Proteinkomplex, so dass β -Catenin dephosphoryliert wird und in den Nucleus gelangen kann. Dort wirkt es als transkriptionaler Aktivator. Modifiziert nach Ellison (Ellison 2010).

Der zweite relevante Signalweg ist im Grundzustand ebenso inaktiv. Das bedeutet in diesem Fall, dass der Transmembranrezeptor Patched (PTCH1) den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Smoothed (SMO) inhibiert, was zur Blockade des gesamten Signalweges führt. Bei Säugetieren gibt es drei verschieden aktivierende Liganden, die alle aus der Familie der Hedgehog Proteine stammen, Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog und Desert Hedgehog (Echelard *et al.*, 1993). Der Hedgehog-Signalweg wurde zum ersten Mal in *Drosophila melanogaster* nachgewiesen, wobei mittlerweile bekannt ist, dass er bereits in Nematoden eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielt (Jenkins 2009). Bei Insekten spielt der Hedgehog-Signalweg eine Schlüsselrolle bei der Segmentierung des Embryos, bei Säugetieren ist er in die Induktion der Bilateralsymmetrie involviert (Fietz *et al.*, 1994). Die Funktionsweise ist jedoch hochkonserviert: Bindet einer der Hedgehog-Liganden an die extrazelluläre Domäne des Patched-Rezeptors, wird die Inhibierung von Smoothed durch Patched aufgehoben und die intrazelluläre Signalkaskade läuft an. Smoothed wandert in das primäre Cilium der Zelle und induziert die Dissoziation des Proteinkomplexes aus SuFu (Suppressor of fused homolog) und den Transkriptionsfaktoren Gli2 und Gli3 (Corbit *et al.*, 2005, Huangfu *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2009). Die freigesetzten Transkriptionsfaktoren wandern daraufhin in den Zellkern und regulieren dort die Genexpression. Gli3 wirkt als Transkriptionssuppressor, Gli2 als Transkriptionsaktivator auf die Hh-Zielgene *GLI1*, *CCND1*, *CCNE1*, *PTCH1* und *MYC* (Aza-Blanc *et al.*, 1997, Bai *et al.*, 2002, Persson *et al.*, 2002). Für die Entwicklung des Cerebellums ist der Sonic Hedgehog (SHH)-Signalweg von besonderer Bedeutung. Während der frühen Embryonalentwicklung des Cerebellums wandern Körnerzellvorläufer aus der oberen rhombischen Lippe transversal über die Oberfläche der Kleinhirnanlage und bilden dort die äußere Körnerzellschicht (*external granule cell layer*, EGL) (Altmann *et al.*, 1997). Die Purkinjezellen bilden und sezernieren Sonic Hedgehog Protein, welches als Wachstumsfaktor für die Körnerzellvorläufer dient und zur raschen Expansion der Körnerzellpopulation während der frühen postnatalen Entwicklung führt (Hatten 1999, Wechsler-Reya *et al.*, 1999). Bei diesem massiven Einfluss, den der SHH-Signalweg auf die Expansion und Proliferation der größten neuronalen Population des Gehirns hat, ist es nicht verwunderlich, dass bereits kleinste Störungen zur Tumorentstehung führen können. Die Assoziation mit der Medulloblastomentstehung wird bei Patienten mit Gorlin-Syndrom deutlich: Patienten haben durch einen heterozygoten Verlust des SHH-Rezeptors *PTCH1* eine Prädisposition für die Entstehung von Medulloblastomen (Bale *et al.*, 1998, Taylor *et al.*, 2000). Auf ähnliche Weise

führen Keimbahnmutationen im SHH-Inhibitor *SUFU* ebenfalls zu einer vermehrten Inzidenz von Medulloblastomen (Taylor *et al.*, 2002, Pastorino *et al.*, 2009, Brugieres *et al.*, 2010). Auch somatische Mutationen in den Genen des SHH-Signalwegs (*PTCH1*, *SMO* und *SUFU*), aber auch Amplifikationen in Zielgenen des Signalwegs (*MYCN* und *GLI2*) konnten in sporadischen Medulloblastomen identifiziert werden und gelten daher als ursächlich für die konstitutive Aktivierung des Signalweges, was zu überschießender Proliferation in betroffenen Zellen führt (Johnson *et al.*, 1996, Hahn *et al.*, 1999, Northcott *et al.*, 2009, Adamson *et al.*, 2010, Northcott *et al.*, 2011a, Roussel *et al.*, 2013). Dieses breite und potente Mutationspektrum gepaart mit der Tatsache, dass eine Subgruppe von Medulloblastomen eine pathologischen Aktivierung des SHH-Signalwegs aufweist, lassen vermuten, dass eine Fehlregulation im SHH-Signalweg bei der Entstehung von Medulloblastomen eine Schlüsselrolle spielt. In tierexperimentellen Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass die konstitutive Aktivierung des Shh-Signalweges in Körnerzellvorläufern zur Entstehung von Medulloblastomen führt (Goodrich *et al.*, 1997, Oliver *et al.*, 2005, Mao *et al.*, 2006, Schüller *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2008).

1.3.4 Mausmodelle des Medulloblastoms

Um genetische, molekulare und zytologische Einflüsse auf die Medulloblastomentstehung besser verstehen und untersuchen zu können, gibt es verschiedene Mausmodelle, die abhängig von der Gruppe von Tumoren, die abgebildet werden soll, auf verschiedenen Mutationen und genetischen Systemen beruhen.

Eines der ersten und am häufigsten verwendeten genetisch veränderten Mausmodelle für das Shh-assoziierte Medulloblastom basiert auf einem konventionellen Knockout des Shh-Repressors *Patched* (*Ptch1*). Während ein homozygoter Verlust von *Ptch1* (*Ptch1*^{-/-}) embryonal letal ist, entwickeln 20% der Mäuse mit heterozygotem *Ptch1*-Knockout (*Ptch1*^{+/-}) cerebelläre Tumore, die humanen Medulloblastomen molekular sehr ähnlich sind (Goodrich *et al.*, 1997, Hahn *et al.*, 2000). Ein gleichzeitiger Verlust des Tumorsuppressors *p53* (*Tp53*^{-/-}) führt zu einer Tumorinzidenz von 100% und verdeutlicht so kooperative funktionale Mechanismen bei der Tumorentstehung (Wetmore *et al.*, 2001). Ähnliche, sich gegenseitig verstärkenden Effekte konnten durch den Knockout von anderen Zellzyklusregulatoren gefunden werden (*p18-Ink4c* und *p27-Kip1*) (Uziel *et al.*, 2005, Uziel *et al.*, 2006, Ayrault *et al.*, 2009). Ein erheblicher Nachteil des Ptch-Modells ist das zur Medulloblastomentstehung

simultane Auftreten von Weichteiltumoren (Wetmore *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2006). Neben den Modellen, die auf *Ptch1*-Mutationen basieren, gibt es auch zahlreiche Modelle, die auf einer mutierten Form des *Smoothed (Smo)* Gens beruhen (Mao *et al.*, 2006). Durch eine Aminosäuresubstitution in der Transmembrandomäne des Proteins, kann die inhibitorische Bindung von *Ptch1* nicht mehr stattfinden, wodurch der Shh-Signalweg konstitutiv aktiv ist (Xie *et al.*, 1998). Spezifischere und robustere Modelle für die Tumorentwicklung von Shh-assoziierten Medulloblastomen stellen die Modelle dar, die durch Kopplung einer aktivierenden Mutation an einen zelltypspezifischen Promotor mittels Cre/loxP-Rekombinationssystem, einen konstitutiv aktiven Shh-Signalweg zur Folge haben. So können einzelne Zellpopulationen und Gewebe auf das Potential untersucht werden, Medulloblastome zu formen. Die Aktivierung des Shh-Signalwegs mit Hilfe spezifischer muriner Cre-Treiberlinien (*Math1-cre* für Körnerzellvorläufer, *hGFAP-cre* für neurale Vorläufer) hat die Tumorinzidenz ohne gleichzeitige *Bystander*-Mutation von Tumorsuppressoren auf 100% steigern können (Schüller *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2008). Hilfreich ist unter Umständen auch die Zeitpunkt-spezifische Einführung einer Mutation, was mittels induzierbarer Cre/loxP-Systeme möglich ist. Hier wird unabhängig von der zeitlichen Aktivität des Promotors, wohl aber gebunden an dessen Zelltypspezifität durch Gabe eines Östrogenanalogons (Tamoxifen) die Mutation aktiviert (Leone *et al.*, 2003, Erdmann *et al.*, 2007, Arnold *et al.*, 2011). So könnten zum Beispiel mit geeigneten Mutationen die Entstehung von adulten Tumoren, wie sie in der SHH-assoziierten Subgruppe vorkommen, modelliert werden.

Wie bereits erwähnt, ist die SHH-assoziierte Gruppe von Medulloblastomen die am besten untersuchte der vier molekularen Subgruppen. Das liegt mitunter auch daran, dass sich so viele spezifische Modelle für diesen Tumortyp für Analysen verwenden lassen. Die Anzahl der Mausmodelle für die verbleibenden Subgruppen ist beschränkt. Für die WNT-Gruppe gibt es seit einigen Jahren auch ein Mausmodell, bei dem β -Catenin durch Mutation im Exon3 des *Ctnnb1*-Gens immer unphosphoryliert vorliegt (*BLBP-cre::Ctnnb1^{+/lox(Ex3)}*) und den Wnt-Signalweg in neuronalen Vorläufern so konstitutiv aktiv hält. Bei gleichzeitigem *p53*-Knockout führt dieser Genotyp zu murinen Tumoren, die anatomisch den humanen Medulloblastomen der WNT-Gruppe sehr ähnlich sind (Gibson *et al.*, 2010). Hierbei kommt es auch zur Aktivierung des Wnt-Signalweges in Zellpopulationen des dorsalen Hirnstamms, was zusammen mit der *p53*-Mutation zu Tumoren führt, die auf molekularer Ebene den humanen

WNT-assoziierten Medulloblastomen ähneln. Zum ersten Mal konnte so gezeigt werden, dass die Ursprungszelle für Medulloblastome nicht notwendigerweise im Cerebellum liegen muss. Interessanterweise hat sich beim Vergleich der Modelle für Shh- und Wnt-assoziierte Medulloblastome herausgestellt, dass diese tatsächlich aus unterschiedlichen Ursprungszellen hervorzugehen scheinen (Gibson *et al.*, 2010). Shh-Medulloblastome entstehen aus dem oberen Teil der rhombischen Lippe, oder im auditorischen Teil der unteren rhombischen Lippe, während Wnt-Tumoren im präcerebellären Teil der unteren rhombischen Lippe ihren Ursprung nehmen (Grammel *et al.*, 2012).

Bis jetzt liegen nur begrenzte Daten aus verschiedenen Mausmodellen für Gruppe 3-Medulloblastome vor. Es scheint jedoch möglich zu sein, durch Überexpression von *c-Myc* in cerebellären Vorläuferzellen bei gleichzeitigem *p53*-Knockout Tumore zu generieren, die den Gruppe 3-Tumoren ähnlich sind (Kawauchi *et al.*, 2012, Pei *et al.*, 2012). Da humane Gruppe 3-Medulloblastome die aggressivste Subgruppe mit der schlechtesten Prognose darstellen, ist es dringend notwendig, im Hinblick auf präklinische Studien neue und geeignete Mausmodelle für diese Subgruppe zu generieren.

Für Gruppe 4-Medulloblastome steht zu Zeit kein verlässliches Mausmodell zur Verfügung.

1.4 SOX GENE

Die Familie der Sox-Gene (*SRY (sex determining region Y)-box-genes*) ist eine hochkonservierte Superfamilie von Genen bei Säugern, die aber bereits in Nematoden, Insekten, Amphibien, Reptilien und Vögeln zu finden ist (Phochanukul *et al.*, 2010). Erst 1990 wurde das erste „Sox-Gen“, nämlich der *SRY*-Abschnitt, auf dem Y-Chromosom entdeckt (Sinclair *et al.*, 1990). Nur kurz danach wurde bereits bekannt, dass *SRY* zu einer größeren Genfamilie gehört (Gubbay *et al.*, 1990), die daraufhin *SRY-related box genes*, kurz Sox-Gene, benannt wurde. Bei *Drosophila* sind 8 Sox-Gene bekannt (Wilson *et al.*, 2008), bei Mäusen und Menschen gibt es mittlerweile 20 bekannte Sox-Gene (Castillo *et al.*, 2012). Sox-Gene definieren sich nach der Verwandtschaft mit der geschlechtsbestimmenden *high-mobility group (HMG) Box* auf dem Y-Chromosom. Die Familie wird gemäß Homologien innerhalb der HMG Domäne, nach strukturellen Motiven und funktionellen Assays bei Menschen und Mäusen in neun Untergruppen unterteilt: *SoxA* bis *SoxH*, wobei *SoxA* der *SRY* selbst entspricht und *SoxB* nochmals in *SoxB1 (Sox1, 2, 3)* und *SoxB2 (Sox14 und 21)* unterteilt ist (Bowles *et al.*, 2000, Schepers *et al.*, 2002). Welche Charakteristika haben die verschiedenen Gruppen gemeinsam und in welchen unterscheiden sie sich? Sox-Gene tragen alle ein konserviertes Motiv in der HMG-Domäne: RPMNAFMVW (Bowles *et al.*, 2000). Interessanterweise bildet gleich das Gründungsmitglied der Superfamilie eine Ausnahme: *SRY* enthält nur einen Ausschnitt des Motivs (RPMNAF). Sox-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die die DNS-Sequenz (A/T)(A/T)CAA(A/T)G binden, wobei einige dabei aktivierend und andere repressiv auf die Transkription wirken (Chew *et al.*, 2009). Häufig üben Sox-Proteine ihre Funktion nur in Kooperation mit einem Co-Aktivatoren aus, z. B. aktiviert Sox2 nur zusammen mit Pax6 die Crystallin Expression bei der Linsenentwicklung des Säugetierauges (Kamachi *et al.*, 2001). Sox-Proteine haben eine 80 Aminosäuren lange DNS-Bindungsdomäne, die an Motive in der kleinen Furche der DNS bindet, diese beugt und durch diese Konformationsänderung Promotoren, *Enhancer* und andere Proteine des Transkriptionskomplexes näher zusammen bringt. Sox-Gene spielen alle eine wichtige entwicklungsbiologische Rolle, wobei man nicht pauschal jedem Gen seine singuläre Funktion zuordnen kann, eher haben viele Mitglieder der Sox-Familie unterschiedliche Funktionen, die abhängig von der Umgebung oder dem Zeitpunkt unterschiedliche Aspekte der Entwicklung regulieren (Chew *et al.*, 2009). Durch

differentielle Expression sind Sox-Gene häufig an der Etablierung von Zellidentität bei diversen Entwicklungsprozessen beteiligt. Sox-Gene regulieren die Darm-, Muskel- und Blutgefäßentwicklung, aber auch B-Zellentwicklung und die Geschlechtsbestimmung (Prior *et al.*, 1996, Schepers *et al.*, 2002). Sox-Gene spielen aber auch eine am Beispiel der Linsenentwicklung bereits erwähnte Rolle bei neuronalen Entwicklungsprozessen (Bergsland *et al.*, 2011). Bei einem so breiten Expressions- und Interaktionsspektrum ist es nicht verwunderlich, dass Sox-Gene in der Ätiologie vieler Erkrankungen zu finden sind (Gracz *et al.*, 2011, Chatterjee *et al.*, 2012). Es wird angenommen, dass einige Sox-Gene in der frühen Diagnose von Hirntumoren bei Kindern, aufgrund ihrer sequentiellen Expression im Gehirn nützlich sein könnten (Dong *et al.*, 2004, Castillo *et al.*, 2012). Grund genug für uns, ein Gen aus der Sox-Familie, das eine besondere Rolle in der Kleinhirnentwicklung zu spielen scheint, genauer zu untersuchen.

1.4.1 Der Transkriptionsfaktor Sox2

Sox2 (Synonyme: *ANOP3*, *MCOPS3*, *MGC2413*) ist einer der bekanntesten Vertreter der Sox-Genfamilie, denn *Sox2* ist unter anderem einer der Schlüsselfaktoren zur Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen (Zhao *et al.*, 2008). Bei dem Verfahren der künstlichen Reprogrammierung wurde *Sox2* zusammen mit anderen bislang identifizierten Pluripotenzgenen (*Oct-4*, *c-Myc*, *Klf-4*, *Nanog* und *lin-28*) durch Retroviren oder Adenoviren in somatische Zellen eingebracht und die Zelle dadurch in den Zustand einer Stammzelle zurückversetzt. Für das Verfahren der Herstellung induzierter pluripotenter Stammzellen wurde 2012 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie vergeben (an Shinya Yamanaka für die Induktion pluripotenter Stammzellen aus Mausfibroblasten (Yamanaka *et al.*, 2006) und an John B. Gurdon für seine Arbeiten zur Reprogrammierbarkeit von ausdifferenzierten Zellen (Gurdon 1962)). Der Transkriptionsfaktor Sox2 wird durch ein intronloses Gen auf Chromosom 3 (3q26.3-q27) kodiert, wobei das Produkt selbst aus 317 Aminosäure besteht. Das Exon des *SOX2*-Gens enthält lediglich eine 5' untranslatierte Region (427 bp), die Protein-kodierende Region (954bp) und eine 3' untranslatierte Region (1122 bp). Es gibt einen Abschnitt des Gens für *SOX2* (*SOX2* overlapping transcript, *SOX2OT*), der für nicht-kodierende RNS kodiert. *SOX2OT* enthält mindestens fünf Exons und wird zu einer mRNA von 3.4 kb Länge transkribiert (National Center for Biotechnology Information 2014). Auf Proteinebene liegt Sox2 fast

ausschließlich in funktionellen Komplexen mit anderen Proteinen, wie Oct-4 oder Pax6 vor, was sich in dem breiten Spektrum von gemessenen Molekulargewichten widerspiegelt, die in Western Blot Analysen gefunden wurden (Cox *et al.*, 2010). Die Funktion der Erhaltung von Vorläufercharakter und Selbsterhaltungskapazität von Sox2 exprimierenden Zellen wird hauptsächlich im Zusammenspiel mit anderen Genen ausgeführt: Sox2 und Oct-4 bilden für die Kontrolle anderer embryonaler Entwicklungsgene einen trimeren Komplex mit der DNS und sind so wichtige Regulatoren der frühen Embryogenese und kontrollieren die eigene Aktivität durch die jeweils notwendige Anwesenheit des anderen Faktors (Boyer *et al.*, 2005, Lodato *et al.*, 2013). Das Protein Sox2 alleine hat abhängig von posttranslationalen Modifikationen eine Größe von etwa 34 kDa (Adachi *et al.*, 2011). Sox2 wurde aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften in die SoxB Gruppe sortiert, und weiterhin wegen seiner funktionell aktivierenden Domäne der SoxB1 Untergruppe zugeordnet. Am Beispiel von Sox2 zeigen sich auch immer wieder weitere Besonderheit der gesamten Sox-Gensuperfamilie: (1) Sox-Gene regulieren die Spezifikation und Differenzierung vieler Zelltypen. Sox-Gene werden während der Embryonalentwicklung im gesamten Neuroektoderm exprimiert und regulieren die Entwicklung diverser Zellpopulationen von neuronaler und glialer Differenzierung (Wegner *et al.*, 2005). (2) Gene innerhalb einer Sox-Genuntergruppe haben oft redundante Funktionen. Der Verlust eines Sox-Gens hat häufig die kompensatorische Hochregulation eines anderen Sox-Gens innerhalb der gleichen funktionellen Subgruppe zur Folge, so wird der Verlust von Sox2 durch verstärkte Expression von Sox1 und/oder Sox3 ausgeglichen (Graham *et al.*, 2003). (3) Gene einer Untergruppe können denen einer anderen Untergruppe entgegenwirken. Gene der SoxB1 Subgruppe, zu denen auch Sox2 gehört, werden transkriptionsaktivierende Eigenschaften zugeschrieben, während von der SoxB2 Subgruppe eher repressive Funktionen bekannt sind (Uchikawa *et al.*, 1999). (4) Das gleiche Sox-Gen kann verschiedene entwicklungsrelevante Schritte eines Zelltyps vermitteln und/oder einen Entwicklungsprozess in mehreren Zelltypen steuern. So ist Sox2 für die Erhaltung der Multipotenz während der gesamten Entwicklung des Nervensystems wie auch in anderen Organkomplexen bekannt (Driessens *et al.*, 2011). Sox2 selbst ist ein Transkriptionsfaktor, der wichtig für die Erhaltung der Selbsterhaltungskapazität, oder Pluripotenz, von undifferenzierten embryonalen Stammzellen ist (Alcock *et al.*, 2009). Sox2 ist sowohl in Zellen des Neuralrohrs als auch in proliferierenden Vorläufern des Zentralnervensystems (ZNS) exprimiert (Wood *et al.*, 1999). Dabei zeigen diese Zellen eine zentrale Eigenschaft von Stammzellen, nämlich das Potential

Tochterzellen zu produzieren, sich dabei aber selbst durch asymmetrische Teilung zu erhalten (Suh *et al.*, 2007). Im sich entwickelnden Gehirn ist Sox2 nahezu ubiquitär exprimiert, besonders in den Keimzonen, wie den Ventrikular- und Subventrikulärzonen, des Großhirns (Ferri *et al.*, 2004). Viele dieser Eigenschaften werden schon in der Kleinhirnentwicklung und im adulten Kleinhirn klar.

1.4.2 Physiologische Bedeutung von Sox2 im Cerebellum

Im adulten Gehirn ist das Expressionsmuster von Sox2 überschaubar. Nach Abschluss der Entwicklung des Gehirns wird der Stammzellfaktor weiterhin in der Ventrikulärzone des Großhirns exprimiert, in der auch noch adult Neurogenese für die Plastizität des *Bulbus olfactorius* stattfindet (Pevny *et al.*, 2010). Außerdem findet man vereinzelt Sox2 in Zellen im *Gyrus dentatus* des Hippocampus, in Körnerzellen des *Bulbus olfactorius*, in Zellen des Hirnstammes und in GFAP-positiver Astroglia verstreut im ganzen Gehirnparenchym (Komitova *et al.*, 2004).

Im embryonalen Kleinhirn ist die Ventrikularzone durch Sox2-Expression gekennzeichnet. Im adulten Kleinhirn zeigt die gesamte Bergmann-Giazellpopulation Immunoreaktivität für Sox2. Außerdem wird vermutet, dass sich in der cerebellären weißen Substanz Sox2-exprimierende Zellen mit Stammzellcharakter befinden, die auch die Fähigkeit besitzen, Tumorsphären in Zellkultur zu bilden (Lee *et al.*, 2005). Die Sox2 Expression ist im adulten Gehirn allgemein häufig mit glialen Eigenschaften von Zellen assoziiert.

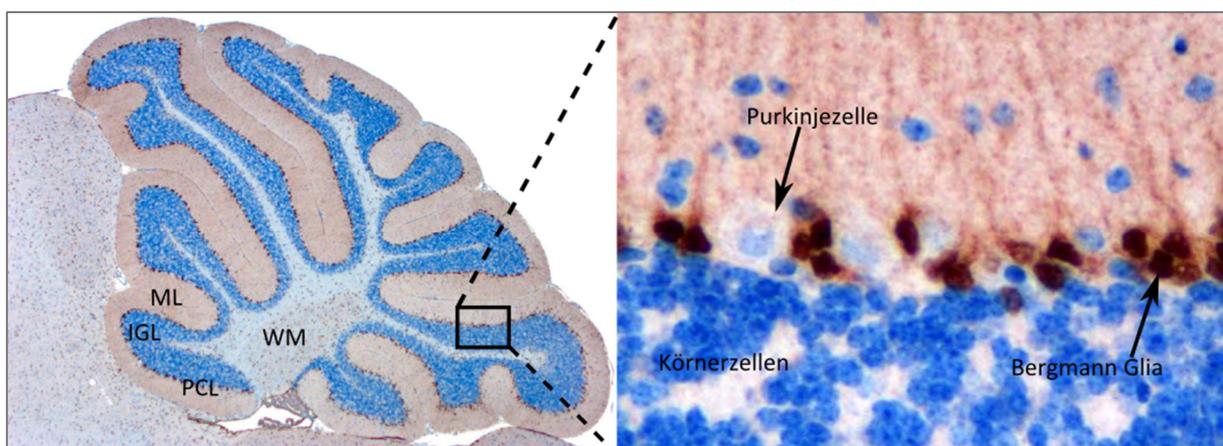


Abbildung 1.4-1 Sox2-Färbung am adulten Maus Cerebellum. Sox2-Immunopositivität ist im cerebellären Cortex hauptsächlich in der Bergmann Glia zu finden. Die Bergmann Gliazellen liegen zwischen den Purkinje Zellen eingebettet in der Purkinje-Zellschicht (PCL), welche wiederum die Grenze zwischen der Molekularschicht (ML) und der inneren Körnerzellschicht (IGL) bildet. WM – *white matter*, weiße Substanz

Hier wird häufig argumentiert, dass bestimmte Populationen von Gliazellen, vor allem radiale Gliazellen, eine wichtige Rolle in der Neurogenese und Regionalisierung des Gehirns spielen (Malatesta *et al.*, 2013). In Abbildung 1.4-1 ist eine Übersicht eines adulten murinen Kleinhirns zu sehen, in dem das Protein Sox2 immunhistochemisch angefärbt ist.

1.4.3 Bedeutung von SOX2 in der Onkologie

Die Rolle von SOX2 in verschiedenen Erkrankungen ist wohlbekannt. Besonders in der Entstehung und Erhaltung von zahlreichen Krebsarten wird dem Stammzellofaktor eine wichtige Rolle zugeschrieben, da die Überexpression von Sox2 regelmäßig zu hyperaktiver zellulärer Migration und Kontakt-unabhängiger Proliferation führt (Bass *et al.*, 2009, Alonso *et al.*, 2011). Bei der Entwicklung des Bronchialsystems der Lunge ist Sox2 ein wichtiger Faktor für die Differenzierung des Atemwegsepitheliums. Bei Überexpression kommt es jedoch zu epithelialer Hyperplasie und der Ausbildung von Lungenkarzinomen, wobei die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms häufig auf Amplifikationen der 3q26.3 Region des SOX2-Gens zurückzuführen ist (Hussenet *et al.*, 2010). SOX2 Expression wird außerdem in Prostatatumoren gefunden und ist ektop auch in Kolonkarzinomen zu finden. In Tumoren des ZNS ist eine robuste Überexpression von SOX2 sowohl in glialen Tumoren (Astro-, Oligo- und Ependymomen), als auch in neuronalen Tumoren bekannt.

Die Funktion der Expression von SOX2 im Medulloblastom ist Teil der Fragestellung dieser Arbeit. Nachdem bereits bekannt ist, dass Sox2 in einer Subpopulation von Körnerzellvorläufern während der Kleinhirnentwicklung exprimiert wird (Sutter *et al.*, 2010), liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um einen wichtigen Faktor in der Entstehung und Erhaltung von Medulloblastomen handelt.

1.4.4 Sox2 in neuronalen Stammzellen

Bis vor kurzem galt das Dogma „keine Regeneration im zentralen Nervensystem“ noch als unumstößlich und als größtes Problem in der regenerativen Medizin, z. B. nach Rückenmarksverletzungen, oder bei neurodegenerativen Erkrankungen. Mittlerweile muss diese Sichtweise jedoch relativiert werden, denn seit mehreren Jahren sind auch im Gehirn Strukturen bekannt, in denen auch nach vollständiger Entwicklung noch Neurogenese nachgewiesen werden konnte (Walton 2012). Bisher gelten zwei Bereiche des adulten Gehirns als gesicherter Ursprung von adulter Neurogenese: die Subventrikularzone (SVZ) der lateralen Ventrikel und die Subgranulärzone (SGZ) des *Gyrus dentatus* des Hippocampus (Alvarez-Buylla *et al.*, 2004). Allen neurogenen Nischen, ob während der Embryonalentwicklung oder im erwachsenen Gehirn, ist die Expression einiger Stamzelloktoren gemein. Einer der wichtigsten und allumfassendsten ist hierbei Sox2 (Driessens *et al.*, 2011). Sox2 ist nicht nur einer der vier Faktoren, die benötigt werden, um aus Fibroblasten pluripotente Stammzellen zu induzieren (Yamanaka 2008), sondern auch ein Alleinstellungsmerkmal für Zellen im Hippocampus mit dem Potential auf Umwelteinflüsse durch Veränderung der Größe des Stammzellpools zu reagieren (Suh *et al.*, 2007). Eine wichtige Funktion wird Sox2 auch in der Neurogenese zugeschrieben, hier soll es als molekularer Schalter wirken. Es hält neuronale Vorläufer im undifferenzierten Status, indem es den Funktionen anderer proneuraler Gene und Proteinen entgegenwirkt (Cimadamore *et al.*, 2013). Erst auf die Stilllegung von Sox2 hin kann die Stamm- oder Vorläuferzelle endgültig ausdifferenzieren. Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Sox2-positive Zellen der SGZ auf Stimulation durch motorischen Lernparadigmen mit der Produktion neuer neuronaler und glialer Zellen reagieren können (Suh *et al.*, 2007). Auch in der weißen Substanz des Kleinhirns wurden Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften nachgewiesen (Sutter *et al.*, 2010), mögliche neurogene Eigenschaften wurden jedoch nicht untersucht.

1.5 ZIELSETZUNG DES PROJEKTS

In unserer Arbeitsgruppe wird die Entstehung, Diagnose und Therapie von Medulloblastomen, den häufigsten malignen Gehirntumoren im Kindesalter, untersucht. Medulloblastome entstehen unter Umständen sehr früh, schon während der Embryonalentwicklung. So konnten Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Medulloblastome aus Körnerzellvorläufern der rhombischen Lippe entstehen können (Schüller et al., 2008). Die rhombische Lippe ist neben der Ventrikulärzone die Keimzone im sich entwickelnden Gehirn, aus der das Kleinhirn entsteht. Alle Keimzonen im zentralen Nervensystem sind von der Expression des Transkriptionsfaktors Sox2 gekennzeichnet. Sox2 ist ein potenter Stammzellfaktor und außerdem an der Ausbildung und Erhaltung verschiedenster Tumore des zentralen Nervensystems beteiligt. Daher sollte in diesem Projekt untersucht werden, ob Sox2 aufgrund seiner Expression in den Ursprungszellen des Medulloblastoms eine Rolle bei der Entstehung und Erhaltung von Medulloblastomen übernimmt. Durch die Analyse von humanem Gewebe und Expressionsdaten aus Medulloblastomgewebe, sollte untersucht werden, ob Medulloblastome Besonderheiten in Bezug auf die Expression von SOX2 aufweisen. Zudem sollte in verschiedenen Mausmodellen untersucht werden, welche Bedeutung Sox2 in den Körnerzellvorläufern der rhombischen Lippe für die normale Entwicklung des Kleinhirns, bzw. für die Ausbildung von Medulloblastomen im Tiermodell hat. Funktionell sollte die Rolle von Sox2 in primären murinen Zellkulturen aus normalen Körnerzellvorläufern und Tumorzellen untersucht werden, indem der Einfluss von Verlust und Überexpression von Sox2 in den jeweiligen Zellen analysiert wird. Um genauer zu verstehen, wann Sox2-positive Zellen einen entwicklungsbiologischen Einfluss auf die Entwicklung des Kleinhirns und in der Folge auch auf die Entstehung von Medulloblastomen haben, sollten induzierbare Mausmodelle zur Verfolgung des Schicksals Sox2-positiver Zellen während der Kleinhirnentwicklung, aber auch zur Tumorinduktion aus Sox2-positiven Zellen verwendet werden. Abhängig von den Ergebnissen sollte untersucht werden, ob Sox2-positive Zellen auch im adulten Cerebellum noch das Potential besitzen, Medulloblastome auszubilden. Ferner könnte Sox2, gestützt auf die Ergebnisse der Analyse humaner Proben, als Angriffspunkt für die integrative Diagnose von histologischem und molekularem Subtyp der Medulloblastome verwendet werden. Sollte die Expression von Sox2 tatsächlich auch einen Einfluss auf die proliferativen Eigenschaften des Tumors haben, könnte der Transkriptionsfaktor als therapeutischer Angriffspunkt nutzbar gemacht werden.

2. Material und Methoden

2.1 HUMANES GEWEBE

2.1.1 Eigene Kohorte

Die in dieser Arbeit untersuchte Kohorte von humanen Proben besteht aus 65 formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten chirurgischen Tumorproben von Patienten mit Medulloblastom. Der Einschluss von Patienten in die Studie war unvoreingenommen und nur abhängig von der Verfügbarkeit von ausreichend Tumormaterial und klinischer Beobachtungsdaten. Die Kohorte besteht aus 36 männlichen (55,4%) und 29 weiblichen Patienten (44,6%), die alle in den Universitätskliniken in München, Göttingen, Bremen, Hannover und Münster behandelt wurden. Die meisten Patienten wurden im Rahmen der multizentrischen Therapieoptimierungsstudie für pädiatrische Hirntumoren (HIT) der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie behandelt. Der Altersmedian innerhalb der Kohorte beträgt 7,4 Jahre (0,5 – 51,8 Jahre). Histologisch wurden 33 desmoplastische Medulloblastome (dMB), 7 Medulloblastome mit extensiver Nodularität (MBEN) und 25 klassische Medulloblastome (cMB) charakterisiert. Die Diagnose des Tumors wurde lichtmikroskopisch anhand von Hämatoxylin und Eosin-Färbung (H&E) und Gomori-Versilberungen an repräsentativen Schnittpräparaten von mindestens zwei unabhängigen Neuropathologen auf Basis der neuesten Kriterien der WHO für die Klassifizierung von Gehirntumoren gestellt. Eine Liste mit Angaben zur Histologie und zu klinischen Daten der Patienten ist in Anhang 6.1-1 angefügt.

2.1.2 Microarray Daten

RNS-Expressionsdaten und klinische Parameter wurden von Yoon-Jae Cho veröffentlicht und zugänglich gemacht (Cho *et al.*, 2011). Somit standen Expressionsdaten von 188 humanen Medulloblastomen mit klinischen Parametern und Informationen zur Eingliederung in den aktuellen Subgruppen-Konsensus zur Verfügung. Die Expressionsdaten von elf Normalgeweben wurde als Referenz genutzt.

2.2 TIEREXPERIMENTELLE ARBEITEN

Alle beschriebenen Versuche erfolgten nach den Vorgaben des geltenden Tierschutzgesetzes und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Mäuse wurden in spezifisch-pathogenfreier (SPF) Umgebung in der Tierhaltung des Zentrums für Neuropathologie der LMU München gehalten. In der SPF-Tierhaltung lebten die Mäuse gemäß den Richtlinien in geschlossenen Käfigsystemen (*individually ventilated cages, IVC*) bei einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Zur Entnahme des Gehirns wurden adulte Tiere durch zervikale Dislokation getötet, während unter 10 Tage alte Tiere durch Dekapitation getötet wurden. Zur Entnahme des Hirns wurde der Schädelknochen eröffnet und entfernt, bis die komplette Oberfläche vom *Bulbus olfaktorius anterior* bis zur *Medulla oblongata posterior* freigelegt war. Es bietet sich für die histologische Analyse des Cerebellums an, nicht das *Foramen magnum* als Ausgangspunkt für die Eröffnung zu wählen, sondern eher die zentrale Schädelnaht nahe Lambda, um das Kleinhirn nicht zu verletzen. Das Gehirn wurde aus dem Schädel herausgehoben, indem die Sehnerven am *Chiasma opticum* und die Hirnnerven unter dem Hirnstamm durchtrennt wurden.

2.2.1 Transgene Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben Versuchen mit Wildtypmäusen der Linien *C57/Bl6* und *FVB* auch mit einer Reihe von transgenen Mausmodellen gearbeitet: *ROSA26lacZ^{F1/F1}* (Soriano 1999), *SmoM2-YFP^{F1/F1}* (Mao *et al.*, 2006), *AiTdTomato* (Madisen *et al.*, 2010) und *Sox2^{F1/F1}* (Favaro *et al.*, 2009). Ferner wurden drei Treiberlinien für die Expression der Cre-Rekombinase verwendet: *hGFAP-cre* (Zhuo *et al.*, 2001), *Math1-cre* (Matei *et al.*, 2005, Schüller *et al.*, 2007) und *Sox2-creER^{T2}* (Arnold *et al.*, 2011).

2.2.1.1 Konditionelle Knockouts

Durch Verpaarung von jeweils einer Cre-Treiberlinie mit einer oder mehreren transgenen Mauslinien entstehen konditionelle Cre-loxP-Systeme. Das bedeutet, dass unter dem jeweiligen Promotor (hier *hGFAP* oder *Math1*) die Cre-Rekombinase exprimiert wird, welche wiederum die Fähigkeit besitzt, Rekombination zwischen zwei sogenannten *loxP-Sites* auf der DNS zu initiieren und damit alles, was zwischen den *loxP-Sites* lokalisiert ist, zu deletieren.

| | |
|--|--|
| <i>hGFAP-cre::Sox2^{F1/F1}</i> | (<i>Sox2</i> Knock-out unter dem humanen <i>GFAP</i> -Promotor) |
| <i>hGFAP-cre::SmoM2</i> | (konstitutive Aktivierung des Shh-Signalweges unter dem <i>GFAP</i> -Promotor) |
| <i>hGFAP-cre::Sox2^{F1/F1} SmoM2</i> | (Aktivierung des Shh-Signalweges bei gleichzeitigem <i>Sox2</i> -Verlust in <i>GFAP</i> -positiven Zellen) |
| <i>Math1-cre::Sox2^{F1/F1}</i> | (<i>Sox2</i> Knock-out unter dem <i>Math1</i> -Promotor) |
| <i>Math1-cre::SmoM2</i> | (Konstitutive Aktivierung des Shh-Signalweges unter dem <i>Math1</i> -Promotor) |

2.2.1.2 Induzierbare Knockouts

Durch Induktion mit dem Östrogenanalogon Tamoxifen können Mutationen unter dem *Sox2*-Promotor zu definierten Zeitpunkten eingebracht werden. Tiere mit diesem genetischen Hintergrund exprimieren nach erfolgreicher Cre-abhängiger Rekombination promotor-spezifisch das entsprechende Transgen. Unter dem *Sox2*-Promotor wird ein transgener Östrogenrezeptor exprimiert, der erst auf Bindung von Tamoxifen hin die Translokation der Cre-Rekombinase in den Nucleus zulässt. Hier kann das Enzym die entsprechenden STOP-Sequenzen (Polyadenylierungssequenzen) vor den zu exprimierenden Genen durch Rekombination entfernen. So ergibt sich eine Expression der Transgene, die von der Aktivität des *Sox2*-Promotors, sowie dem Zeitpunkt der Induktion mit Tamoxifen abhängt.

| | |
|--|--|
| <i>Sox2-creER^{T2}::SmoM2</i> | (induzierbare Aktivierung des Shh-Signalweges unter dem <i>Sox2</i> -Promotor) |
| <i>Sox2-creER^{T2}::ROSA26lacZ^{F1/F1}</i> | (induzierbare β -Galaktosidase-Expression in allen <i>Sox2</i> -exprimierenden Zellen und deren Tochterzellen) |
| <i>Sox2-creER^{T2}::tdTomato</i> | (induzierbare RFP-Expression in allen Zellen mit aktivem <i>Sox2</i> -Promotor und deren Tochterzellen) |

2.2.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung wird den Mäusen entweder früh postnatal eine Gewebeprobe von der Schwanzspitze, oder bei älteren Tieren eine Ohrstanze entnommen. Das Gewebe wird zeitnah mit 500 μ l Lysepuffer (200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 5 mM EDTA, 0.2 % SDS, 200 μ g/ml Proteinase K in ddH₂O) versetzt und mindestens 2 Stunden bei 56 °C auf dem Thermomixer verdaut. Anschließend werden die Proben bei 16000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß mit 500 μ l Isopropanol überführt. Durch

Schütteln kommt es zum Ausfallen der genomischen DNS, welche abermals bei 16000 g für 5 min abzentrifugiert wird. Das Pellet wird anschließend in TE-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 1 mM EDTA in ddH₂O) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

Die genomische DNS (gDNS) dient als Ausgangsmaterial für die Bestimmung der Genotypen. Hierfür werden mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. – *polymerase chain reaction*; PCR) Genotyp-spezifische Regionen des Genoms amplifiziert. Die verwendeten Primer sind in Anlehnung an die Originalpublikationen mit den Erstbeschreibungen der Mauslinien in Tabelle 2.2-1 aufgeführt.

| Primername | Sequenz 5' - 3' | Produktlänge |
|--------------------------|------------------------|---------------------|
| <i>Cre-Fw</i> | TCCGGGCTGCCACGACCAA | |
| <i>Cre-Rv</i> | GGCGCGGCAACACCATTTT | 448 bp |
| <i>hGFAP-cre-Fw</i> | ACTCCTCATAAAGCCCTCG | 190 bp (Mutante) |
| <i>hGFAP-cre-Rv</i> | ATCACTCGTTGCATCGACCG | 700 bp (Wildtyp) |
| <i>SmoM2-YFP Mut-Fw</i> | GAACGGCATCAAGGTGAA | |
| <i>SmoM2-YFP Mut-Rv</i> | CGATGGGGGTGTTCTGCT | 109 bp |
| <i>SmoM2-YFP WT-Fw</i> | GGAGCGGGAGAAATGGATATG | |
| <i>SmoM2-YFP WT-Rv</i> | CGTGATCTGCAACTCCAGTC | 410 bp |
| <i>ROSA26lacZ Mut-Fw</i> | AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT | |
| <i>ROSA26lacZ Mut-Rv</i> | GCGAAGAGTTTGCCTCAACC | 250 bp |
| <i>ROSA26lacZ WT-Fw</i> | AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT | |
| <i>ROSA26lacZ WT-Rv</i> | GGAGCGGGAGAAATGGATATG | 500 bp |
| <i>tdTomato Mu-Fw</i> | GGCATTAAAGCAGCGTATCC | |
| <i>tdTomato Mu-Rv</i> | CTGTTCTGTACGGCATGG | 196 bp |
| <i>tdTomato WT-Fw</i> | AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA | |
| <i>tdTomato WT-Rv</i> | CCGAAAATCTGTGGGAAGTC | 297 bp |
| <i>Sox2-Fw</i> | AGGCTGAGTCGGGTCAATTA | 300 bp (Mutante) |
| <i>Sox2-Rv</i> | CATCCAAGCTAGGCAGGTT | 500 bp (Wildtyp) |

Tabelle 2.2-1 Primerpaare für die Genotypisierung

Die Standardbedingungen für die Genotypisierungs-PCR sind in Tabelle 2.2-2 dargestellt.

| Schritt | Temperatur [°C] | Zeit [s] |
|-----------------------|------------------------|-----------------|
| Vorinkubation | 95 | 120 |
| Denaturierung | 95 | 30 |
| Primer-Hybridisierung | 60 | 30 |
| Elongation | 72 | 60 |
| Stop | 4 | ∞ |

Tabelle 2.2-2 PCR-Bedingungen für die Genotypisierung

2.2.3 Primärzellkultur

Für alle Primärzellkulturen, ob Körner- oder Tumorzellkultur, wurde das Gesamthirn der Tiere unter sterilen Bedingungen präpariert und das Cerebellum beziehungsweise das Tumorgewebe vom restlichen Hirn abgetrennt, wobei die Meningen soweit wie möglich entfernt wurden. Vor der weiteren Verarbeitung wurde das Gewebe in HBSS-Puffer (*Hank's buffered saline solution*, 1 mg/l Glukose) gewaschen.

Für die selektive Kultivierung von cerebellären Körnerzellen wurden die Cerebella in Lysepuffer (Trypsin/EDTA mit 10µg/ml DNase I) bei 37 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin durch FCS (10 % fötales Kälberserum in DMEM-F12) inaktiviert und 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Gewebe in 5 ml HBSS-Puffer resuspendiert. Nach erneuter 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, 1% N2 Supplement, 1% 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 Platten ausgesät. Nach einer Ruhephase von 6 bis 12 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch Kulturmedium mit Shh-Protein (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 und hinterlassen eine homogene proliferierende Körnerzellpopulation. Für die Transduktion der Körnerzellen mit *IRES-GFP* und *Cre-IRES-GFP* Viren wurde das Medium abgenommen und Virusüberstand (siehe 2.4.6) für zwei Stunden auf die Zellen gegeben. Da die hier genutzten Retroviren lediglich proliferierende Zellen transduzieren können, konnte durch die Kultivierung in selektivem Shh-Medium verhindert werden, dass andere Zelltypen als Körnerzellen von den Viren transduziert werden und unspezifische Ergebnisse erzielt werden. Nach der Virus-Transduktion wurden die Zellen abermals für 24 Stunden in Kulturmedium mit Shh-Protein 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 wurde für die Kultur der Tumorzellen jedoch ein anderes Medium (Neurobasal Medium, 1% B27 Supplement, 1% Penicillin/Streptomycin, 20 ng/ml humanes FGF, 20 ng/ml humanes EGF, 2 mM Glutamin) verwendet. Hierbei konnte auf

die Zugabe von Shh-Protein zum Medium verzichtet werden, da die kultivierten Tumorzellen aus den verwendeten Mausmodellen für Shh-assoziierte Medulloblastome ohnehin schon einen konstitutiv aktiven Shh-Signalweg haben. Die Population an Gliazellen in der Kultur ist aufgrund der Körnerzellexpansion im Tumor vernachlässigbar.

Die Auswertung der Experimente an primären Körner- und Tumorzellkulturen wurde immer nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Eine primäre Zellkultur wurde immer in zwei Versuchsbedingungen aufgeteilt, wobei diese im Laufe des Experiments mit zwei verschiedenen GFP-kodierenden retroviralen Partikeln (siehe 2.4.6) behandelt wurden. Das Kontrollvirus trägt dabei keine andere Information als die zur GFP-Expression in der transduzierten Zelle (*IRE5-GFP*). Das andere Virus kodiert zusätzlich zum GFP auch noch für die Cre-Rekombinase, die bei Zellen mit loxP-Sequenzen zur Rekombination der entsprechenden Sequenzen führt (*Cre-IRE5-GFP*). Einen Tag nach der Transduktion mit den viralen Partikeln werden alle Kulturen mit dem Basenalogon BrdU behandelt, wobei anschließend der Einbau von BrdU in die DNS der primären Zellen als Maß für deren proliferative Aktivität verwendet werden kann. Nach der Fixierung der Kultur werden Doppelfärbungen durchgeführt, die der Darstellung der transduzierten Zellen (GFP-positiv) dienen. Neben der Färbung auf das virale GFP wird je nach Fragestellung auf BrdU (Proliferationsanalyse) oder Sox2 (Kontrolle des Knockouts oder der Überexpression) gefärbt. Ausgezählt werden anschließend nur retroviral transduzierte, GFP-positive Zellen, um Kontroll- und Experimentalkondition vergleichbar zu halten. Einerseits kann so gewährleistet werden, dass nur rekombinierte Zellen der Cre-Bedingung in die Auswertung mit aufgenommen werden, andererseits werden nur proliferierende Zellen von Retroviren transduziert. So kann man zusätzlich sicher gehen, dass nur Körnerzellvorläufer ausgewertet werden, denn die Gliazellen der Kultur wurden, wie beschrieben, durch die Wartezeit von 24 Stunden nach der Kultivierung und vor der Transduktion in den Proliferations-Stopp getrieben und stehen so nicht für die Retroviren zur Verfügung.

2.2.4 Intraperitoneale Injektionen

Die induzierbaren Mausmodelle wurden mit Tamoxifen induziert. Hierfür wurde Tamoxifen (Sigma-Aldrich, Hamburg) zunächst in 100% Ethanol p. a. angelöst und anschließend in einem adäquaten Volumen Maisöl (Sigma-Aldrich, Hamburg) unter Schütteln bei 55°C gelöst.

Für intraperitoneale (i. p.) Injektionen für Proliferationsanalysen wurde BrdU in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) gelöst

Für die Injektion selbst wurde die Substanz auf Körpertemperatur erwärmt und in einer 1 ml Insulinspritze aufgezogen. Für die Injektion von trächtigen Mäusen und für die Injektion von früh postnatalen Mäusen wurden 26G x ½“ Kanülen (Braun-Melsungen AG, Melsungen) verwendet. Die Maus wurde zunächst auf dem Käfiggitter am Schwanz und dann durch Umgreifen zusätzlich am Nackenfell fixiert und auf den Rücken gedreht. Der Injektionspunkt befindet sich im unteren Quadranten, ca. 1 cm von der Mittellinie und parallel zu den Hinterbeinen. Das Tier wird in der fixierenden Hand mit dem Kopf eher nach unten gelagert, um den Einstichwinkel möglichst flach halten zu können und versehentliche Punktionen von Organen zu vermeiden. Vor der Injektion sollte kurz aspiriert werden, um auch eine Punktion von größeren Blutgefäßen ausschließen zu können. Die Substanz wurde langsam und gleichmäßig injiziert und die Kanüle nach kurzer Verweildauer im Stichkanal langsam entfernt. Es bietet sich an kurz zu kontrollieren, ob Flüssigkeit aus dem Stichkanal hervortritt. Ist dies nicht der Fall, kann das Tier behutsam in den Käfig gesetzt werden, tritt Flüssigkeit aus, muss abgewogen werden, ob eine erneute Injektion zweckmäßig ist.

2.3 HISTOLOGISCHE METHODEN

2.3.1 Allgemeine Gewebepreparation und Analyse

Gewebe für Hämatoxylin/Eosin (H&E) Färbungen und Immunhistochemie wurde wie in 1.2 beschrieben präpariert und in 4 % Paraformaldehyd in PBS über Nacht fixiert und nachfolgend in Paraffin eingebettet. Gewebe für Kryoschnitte wurde nach Fixierung durch eine Glucosereihe (10% - 20% - 30% Glucose/PBS) dehydriert und in OCT (TissueTek) eingefroren. Paraffinschnitte wurden in 4 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. Die 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.

2.3.2 Immunhistochemie

Die primären Antikörper für die Immunhistochemie und die Immunzytochemie sind in Tabelle 2.3-1 zusammengefasst.

| Antigen | Spezies | Katalognummer | Firma |
|-------------|-----------|---------------|--|
| BrdU | Maus | 10198 | Bioscience Products |
| BrdU | Ratte | ab6326 | Abcam |
| BLBP | Kaninchen | - | C. Birchmeier und T. Müller, Max-Delbrück Center, Berlin |
| Calbindin | Maus | C8666 | Sigma |
| Cre | Kaninchen | PRC106C | Covance |
| GFAP | Kaninchen | Z0334 | DAKO |
| GFP | Kaninchen | sc-9334 | Santa Cruz |
| Ki67 | Kaninchen | ab16667 | Abcam |
| Map2 | Maus | M4403 | Sigma |
| NeuN | Maus | MAB377 | Millipore |
| NeuN | Kaninchen | ab128886 | Abcam |
| Olig2 | Kaninchen | DF308 | Millipore |
| Parvalbumin | Maus | P3088 | Sigma |
| Pax2 | Kaninchen | 71-6000 | Zymed |
| Pax6 | Maus | Pax6 | Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB) |
| RFP | Kaninchen | AA234 | Antibodies Online |
| S100 | Kaninchen | 4C4.9 | RDI |
| Sox2 | Maus | ab79351 | Abcam |
| Sox2 | Kaninchen | ab97959 | Abcam |

Tabelle 2.3-1 Primäre Antikörper für die Immunhistochemie und der Immunzytochemie

2.3.2.1 DAB

Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in der absteigenden Alkoholreihe 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 einer adäquaten Verdünnung des primären Antikörpers bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit dem EnVision™ System-HRP (DAB)-Kit (Dako Deutschland GmbH, Hamburg) nach Herstellerangaben entwickelt. Bei allen chromogenen Färbungen wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun als Gegenfärbung durchgeführt.

2.3.2.2 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden sowohl Paraffin- als auch Kryoschnitte verwendet. Die Paraffinschnitte wurden wie für die DAB-Färbung entparaffiniert und rehydriert. Bei Kryoschnitten wird die Entparaffinierung durch ausgiebiges Waschen der Schnitte in PBS ersetzt, um Reste von OCT vom Präparat zu entfernen. Bei beiden Schnitten wird wiederum eine Hitze-Antigendemaskierung in Citratpuffer (pH 6), sowie eine Permeabilisierung des Gewebes mit 1% PBS-Triton durchgeführt. Anschließend werden die Schnitte in I-Block Blocking-Reagenz gebracht, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. In der Regel wurde eine Doppelfluoreszenzfärbung, also eine gleichzeitige Färbung zweier Antigene in einem Schnitt, durchgeführt. Dafür wurden zwei Antikörper aus unterschiedlichen Spezies auf den Schnitten belassen und nach 24 Stunden und zweimaligem Waschen in PBS für eine Stunde mit zwei entsprechend Spezies-spezifischen, Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpern (Alexa 488 und Alexa 546, Invitrogen) inkubiert. Die Kernegegenfärbung 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 und mit dem ColorView Soft Imaging System angefertigt.

2.3.3 BrdU-Färbung

Der immunhistochemische Nachweis der Inkorporation des Basenanalogs BrdU in die DNS anstelle des physiologischen Nukleosids Thymidin, bedarf einer weiteren Vorbehandlung vor der Inkubation mit dem Primärantikörper. Um dem BrdU-spezifischen Antikörper den Zugang zum Antigen zu ermöglichen, muss die DNS zunächst durch Behandlung mit 2N HCl für 10 min denaturiert werden. Anschließend wird die Säure mit 0.1M Natriumborat Puffer (pH 8.5) neutralisiert, um die Struktur der Primärantikörper nicht zu beeinträchtigen.

2.3.4 X-Gal Färbung

Für den Nachweis der Cre-vermittelten Expression der β -Galaktosidase wurde die enzymatische Katalyse von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid; Peqlab) in ein indigoblaues Produkt verwendet. X-Gal Färbungen auf Gewebeschnitten wurden auf Kryoschnitten von unfixiertem Gewebe durchgeführt. 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 und 0.1% Natriumdeoxycholat in PBS) wurde dafür auf die Schnitte aufgebracht, für 24 Stunden bei 37°C und unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde entweder eine Gegenfärbung mit Eosin durchgeführt, um grobe Übersichten zu erhalten, oder eine Doppelfluoreszenzfärbung angeschlossen, um das X-Gal Signal auf Einzelzellebene untersuchen zu können. Zur Kollokalisierung des X-Gal Signals mit fluoreszenten Farbstoffen wurde das chromogene X-Gal Signal aus der Hellfeldaufnahme mit Hilfe der Photoshop Software (Adobe) pseudo-kolorisiert.

2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.4.1 RNS-Isolation

Die Isolierung von RNS aus Gewebe, wie auch aus Zellen, erfolgte nach der sauren Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski 1993). Zur Isolierung von cerebellärer RNS wurden die Cerebella der Mäuse präpariert, in Trizol aufgenommen (1 ml/100 mg Gewebe) und mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) wurden 0,2 ml Chloroform 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 und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol/ml Trizol Anfangsvolumen vermischt. Nach weiteren 10 min Inkubation bei RT wurden die Proben zur RNS-Präzipitation bei 12000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit kaltem 75% Ethanol-DEPC gewaschen und wieder für 5 min bei 7500 x g und 4°C zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurde das Pellet für 10 min bei RT getrocknet, in 50µl H₂O-DEPC aufgenommen und bei 60°C für 10 min gelöst. Die Konzentration wurde anschließend in einem Spektrophotometer (Nanodrop) bestimmt. RNS-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.4.2 cDNS Synthese

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

2.4.3 Relative Quantifizierung mittels qRT-PCR

Mit der gewonnenen cDNS 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 verwendeten Primer wurden für die qRT-PCR mit dem öffentlich verfügbaren Programm Primer-BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) generiert und von Eurofins MWG GmbH bezogen. Die relative Quantifizierung wurde mittels der Normalisierung des Zielgens auf das *Housekeeper-Gen* $\beta 2m$ (beta-2-Mikroglobulin) 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 wurde anhand einer individuellen Standardkurve für jedes Primerpaar durchgeführt. Die relativen Expressionswerte wurden wie folgt berechnet:

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

Hierbei stehen nEx für den normalisierten Expressionswert, E für die Effizienz, T für das Zielgen (*target*), H für das *Housekeeper-Gen* ($\beta 2m$), K für den Kalibrator, S für die Probe (*sample*) und Cp beschreibt die jeweilige Zyklusanzahl, bei der es zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität kam. Die verwendeten Primerpaare und die bestimmten Effizienzwerte für die Amplifikation der Zielgene sind in Tabelle 2.4-1 zusammengefasst.

| Primernamen | Sequenz 5' - 3' | Primereffizienz | amplifiziertes Produkt |
|-------------|----------------------|-----------------|------------------------|
| Sox2-Fw | CTGCCCCACCTACAGCAT | | |
| Sox2-Rv | CCTCGGACTTGACCACAGAG | 2,3 | 86 bp |
| Sox1-Fw | ATCTGCCCCATCACCTT | | |
| Sox1-Rv | AAAACGCTGTGTGCCTCCT | 2,05 | 120 bp |
| Sox3-Fw | ACGCATCAGGTGAGAGAAGC | | |
| Sox3-Rv | GTCGGAGTGGTGCTCAGG | 1,7 | 115 bp |
| B2M-Fw | TGTCTTTCAGCAAGGACTGG | | |
| B2M-Rv | GATGCTGCTTACATGTATCG | 2 | 109 bp |

Tabelle 2.4-1 Primerpaare für die qRT-PCR

Die Standardbedingungen für die RT-PCR sind in Tabelle 2.4-2 zusammengefasst.

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

Tabelle 2.4-2 Bedingungen für die qRT-PCR

2.4.4 Proteinexpression und Konzentrationsbestimmung

Für die Zellkultur-Experimente benötigtes Shh-Protein wurde durch die Transformation kompetenter Bakterien mit einem Expressionsplasmid und anschließender Extraktion, Aufreinigung und Konzentration des Proteins hergestellt.

2.4.4.1 Transformation und Proteinexpression

Für die Transformation wurden kompetente *XL-2 blue* Zellen vom Stamm *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet. Es wurden pro 50 µl Bakterienlösung ca. 50 ng Plasmid (pEXP2-DEST-LRC4 (C-terminales Fusionsprotein mit N-terminaler Shh Form und Ampicillin-Resistenzgen)) hinzu pipettiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock zur thermischen Permeabilisierung der bakteriellen Zellwand wurde bei 42°C durchgeführt und die Proben anschließend wieder auf Eis gebracht. Nach drei Minuten wurden 500 µl LB-Nährmedium hinzugegeben und mindestens 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. 100 µl der Vorkultur wurden auf eine LB-Agarplatte einem der Plasmidresistenz entsprechenden Antibiotikum (hier Ampicillin) ausplattiert, um positiv auf Klone zu selektionieren, die das Plasmid aufgenommen haben. Die Agarplatte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Platten auf Einzelkolonien untersucht. Eine Kolonie wurde vom Agar abgenommen und in 500 ml LB-Medium mit Ampicillin für 4-5 Stunden bei 37°C und unter ständigem Schütteln wachsen gelassen. Bei einer gemessenen optischen Dichte (OD600) von 0,5 wurde die Proteinexpression induziert. Dies geschah mittels Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches als künstlicher Aktivator des Lactose-Operons bei *E. coli* fungiert. Durch die IPTG-induzierte Konformationsänderung des bakteriellen Lac-

Repressors wird die Transkription und Translation des Fusionsproteins aktiviert. Die Bakterienkultur mit IPTG wird weitere 2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien werden vom LB-Medium abzentrifugiert und in kaltem PBS Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Gewicht der Bakterien-Pellets bestimmt.

2.4.4.2 Proteinextraktion und Konzentration

Die Extraktion des Proteins wurde mit dem Ni-NTA Puffer Kit (Novagen) nach Herstellerangaben ausgeführt. Grob wurde ein Aufschluss der Bakterien mit Lysozym und Ultraschall durchgeführt und die Suspension auf eine für das Protein spezifische Säule geladen. Die Säule enthält ein makroporöses Silikatharz mit hohem Gehalt an Tetradentat-chelatiertem Nickel (> 20mmol Ni/ml abgesetztem Harz). Das Harz ist dazu bestimmt, bakterielle Polyhistidin-markierte (His-tag) Proteine aufzureinigen. Das Lysat fließt gemäß der Schwerkraft über eine Säule aus gepacktem Silikatharz, wobei eine Gewinnung und Auswaschung der His-markierten Proteine aus dem bakteriellen Lysat erfolgt. Die Reinigung und Konzentration des gewonnenen Shh-Proteins erfolgte durch mehrmalige Zentrifugation in Centricon plus-20 Filtersäulen nach Herstellerangaben. Die Endkonzentration sollte um 3 mg/ml im Elutionspuffer liegen.

2.4.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

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. Die absolute Proteinkonzentration konnte vergleichend mittels einer Standardreihe von bovinem Serumalbumin (BSA) ermittelt werden.

2.4.4.4 Spezifitätsbestimmung und Funktionalität

Die Proteinspezifität wurde mittels Auftrennung des Protein-Eluats im Polyacrylamid-Gel und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. Coomassie-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und damit Proteine im Gel unspezifisch anfärbt. Shh-Protein hat eine molekulare Masse von 30kDa. Durch die unspezifische Anlagerung des Farbstoffes an alle Proteine ist die Färbung auch ein Maß für die Reinheit der erhaltenen Proteinfraktion.

Die Funktionalität des Shh-Proteins wurde direkt auf primären Körnerzellkulturen untersucht, indem BrdU-Proliferationsassays von Shh-behandelten und unbehandelten Kulturen verglichen wurden. Funktionales Shh-Protein führt zu einem signifikanten Anstieg der Proliferationsaktivität in Körnerzellen.

2.4.5 Klonierung von Expressionsvektoren

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Überexpression von Sox2 in Körner- und Tumorzellen wurde ein Sox2-Expressionplasmid hergestellt. Als Basis diente ein in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenes Plasmid, mit einer IRES-GFP Sequenz als Reportergen (Reporterplasmid) und gut charakterisierten Restriktionsschnittstellen. Bei der durchgeführten Klonierung wurde das Reporterplasmid mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI versetzt geschnitten, so dass überhängende Enden (*sticky ends*) entstanden. Das zu inserierende Sox2-Fragment wurde ebenfalls mit EcoRI und XhoI aus einem Spenderplasmid herausgeschnitten, um komplementäre *sticky ends* zu erhalten. Mittels Gelelektrophorese wurde das kurze Sox2-Fragment (980 bp) räumlich vom Rest des nun linearisierten Spenderplasmids (6480 bp) getrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die isolierte DNS wurde nun mit dem linearisierten Reporterplasmid zusammengebracht. Die Ligation der beiden DNS-Fragmente wurde mit einer T4 DNS Ligase (Thermo Scientific) und einem entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben durchgeführt. Das resultierende Plasmid wurde in kompetente Zellen transformiert (siehe 1.4.4.1) und diese gemäß der auf dem Plasmid enthaltenen Ampicillin-Resistenz auf Ampicillin-haltigen Agarplatten selektioniert. Aus den gewachsenen Einzelkolonien wurde mit dem QIAprep Spin MiniPrep Kit (Qiagen) die Plasmid-DNS isoliert und zur Sequenzierung auf Insertion und korrekte Orientierung des Sox2-Fragments an Eurofins MWG GmbH gegeben.

2.4.6 Produktion retroviraler Partikel

Retrovirale Partikel zur Transduktion von primären murinen Körnerzellen wurden durch Transfektion von humanen HEK293T-Zellen (*American Type Culture Collection, ATCC*) mit Expressionsplasmiden produziert. 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 Tripel-Transfektion mit zwei Helferplasmiden (*pCMV-VsVg* und *pCMV-gag-pol*) und jeweils einem retroviralen Konstrukt mit Hilfe des Transfektionsreagenz X-tremeGENE HP (Roche) nach Herstellerangaben transfiziert. Bei den Expressionsplasmiden handelte es sich entweder um einen Vektor mit einer *IRES* (internal ribosome entry site)-*GFP*, einer *Cre* (Cre-Rekombinase)-*IRES-GFP* Sequenz, oder einer *Sox2-IRES-GFP* Sequenz. Die HEK293T-Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 70% konfluent gewachsen, um eine möglichst häufige Ernte zu ermöglichen. Das Transfektionsmedium wurde hierfür 24 Stunden nach Transfektion durch normales Kulturmedium (DMEM Medium, 10% fötales Kälberserum, 1% Glutamax) ersetzt und retroviraler Mediumüberstand wurde bis zu 4 Tage nach Transfektion geerntet. Das virushaltige Medium wurde mit Hilfe von 0.45 mm-Filtern von Zellschrott gesäubert und bis zur Benutzung bei -80°C aufbewahrt.

2.5 STATISTISCHE ANALYSEN

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Prism5.02 Software (GraphPad) durchgeführt. Zum Vergleich von Parametern zwischen Gruppen wurden die Stichprobenmengen zuerst auf Normalverteilung getestet. Folgt die Werte der Gauß'schen Normalverteilung wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test durchgeführt. Lag keine Gauß'sche Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Um Verteilungen zwischen zwei Gruppen auf ihre Signifikanz hin zu testen, wurde der χ^2 Test angewendet. Korrelationen wurden nach Spearman bestimmt. Überlebensraten von Mäusen und Patienten wurden mittels Kaplan-Meier Kurven analysiert. Mit Hilfe des Log-Rank-Tests wurden Überlebenskurven auf ihre Signifikanz hin untersucht. Bei allen Tests wurden p-Werte kleiner 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1 DIE EXPRESSION VON SOX2 IN HUMANEN MEDULLOBLASTOMEN

Medulloblastome können auf zwei Arten in Subgruppen eingeteilt werden. So ergeben sich die traditionelle Einteilung in histologische Gruppen aufgrund histomorphologischer Eigenschaften des Tumorgewebes und die modernere Gruppierung aufgrund molekularer Expressionsdaten. Für klar fundierte Aussagen im Hinblick auf Diagnostik und Therapie ist ein integrativer Ansatz beider Einteilungen zweckmäßig. Daher wird aktuell daran gearbeitet, Marker zu finden, die ein Bindeglied zwischen beiden Einteilungen zulassen, um von der histologischen Untersuchung erste Rückschlüsse auf die molekulare Subgruppe zu ermöglichen, die in Zukunft immer mehr an Wichtigkeit gewinnen wird. Durch die Untersuchung von SOX2 in humanen Medulloblastomen ist in dieser Arbeit ein weiterer Schritt zur Verbindung von histologischer und molekularer Subgruppe gelungen.

3.1.1 Immunhistochemie

Der Proteinnachweis von SOX2 auf zellulärer Ebene erfolgte mit einem Antikörper gegen SOX2 auf *tissue micro arrays* (TMA) von formalinfixiertem Tumormaterial aus Biopsien. Hierfür wurden zylindrische Proben aus dem Tumorgewebe in einen Paraffinblock gegossen und so mit exakt vergleichbaren Bedingungen histologisch untersucht. Insgesamt konnte so eine Stichprobe von 65 humanen Medulloblastomen begutachtet werden. Histologische und klinische Parameter der Patientenproben sind in Anhang 6.1-1 aufgeführt. Die SOX2-Expression erzeugt in immunhistochemischen Färbungen ein nukleäres Signal. Stark SOX2-positive Tumore sind vor allem in der Gruppe der desmoplastischen Medulloblastome (dMB) und der Medulloblastome mit extensiver Nodularität (MBEN) vertreten. Abbildung 3.1-1 A zeigt die Stärke der SOX2 Proteinexpression in drei histologischen Subgruppen. Deutlich ist zu sehen, dass dMB und MBEN zusammen eine signifikant höhere Falldichte mit starker SOX2-Expression aufweisen als die größte histologische Gruppe der Medulloblastome, die Tumore mit klassischer Histologie (cMB; $p = 0,002$). Insgesamt wurde in 27 von 65 Fällen eine schwache SOX2-Expression („-“, 41,5 %), in 20 von 65 Fällen eine intermediäre Expression („+“, 30,8 %) und in 18 von 65 Fällen eine starke Expression von SOX2 („++“, 27,7 %) gefunden. Im

Anhang ist in der Abbildung 6.1-2 ein Vergleich des SOX2-Expressionsprofils eines stark SOX2-positiven dMB und eines cMB in der Histologie exemplarisch dargestellt.

Schlüsselt man die Gruppe der dMB und MBEN nach dem Alter der Patienten (Gruppierung nach Northcott et al., 2010) auf, ergibt sich auch hier eine ungleichmäßige Verteilung der Falldichte. Abbildung 3.1-1 B zeigt, dass die SOX2-Expression in den adulten Fällen signifikant höher ist als in infantilen Patienten ($p = 0,0013$).

3.1.2 SOX2 in RNS-Expressionsdaten

Zur Analyse der Expression von *SOX2* in humanen Medulloblastomen wurden Microarray-Daten einer veröffentlichten Patientenkohorte untersucht (Cho *et al.*, 2011). Die Kohorte umfasste insgesamt 188 Medulloblastome, zu denen jeweils klinische Parameter und histologischer Subtyp bekannt waren. Bei der Untersuchung der Expression von *SOX2* auf mRNA-Ebene wurde auch hier in dMB eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu cMB nachgewiesen ($p = 0,0003$; Abbildung 3.1-1 C). Untersucht man die *SOX2*-Expression über die Gesamtheit der molekularen Subgruppen nach dem aktuellen Konsens von Taylor und Northcott (Taylor *et al.*, 2012) wird deutlich, dass *SOX2* mRNA wird in Tumoren der Gruppe 3, Gruppe 4 und der WNT-Gruppe etwa gleich stark exprimiert. In der SHH-assoziierten Gruppe hingegen ist die Expression von *SOX2* gegenüber den anderen Gruppen signifikant erhöht ($p < 0,0001$; Abbildung 3.1-1 D). Die Altersverteilung von stark *SOX2*-exprimierenden Tumoren aus der histologischen Einteilung wurde ebenfalls bestätigt: In adulten SHH-abhängigen Medulloblastomen ist die Expression von *SOX2* deutlich höher als in frühkindlichen Tumoren dieser molekularen Subgruppe ($p=0.0129$; Abbildung 3.1-1 E). Die altersabhängige Verteilung von stark *SOX2*-positiven Tumoren wird auch deutlich, wenn man alle Expressionsdaten von *SOX2* in der SHH-Gruppe mit dem jeweiligen Alter der Patienten korreliert. Es besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von *SOX2* und dem Alter, wie in Abbildung 3.1-1 F dargestellt ($r = 0,5441$, $p < 0,0001$).

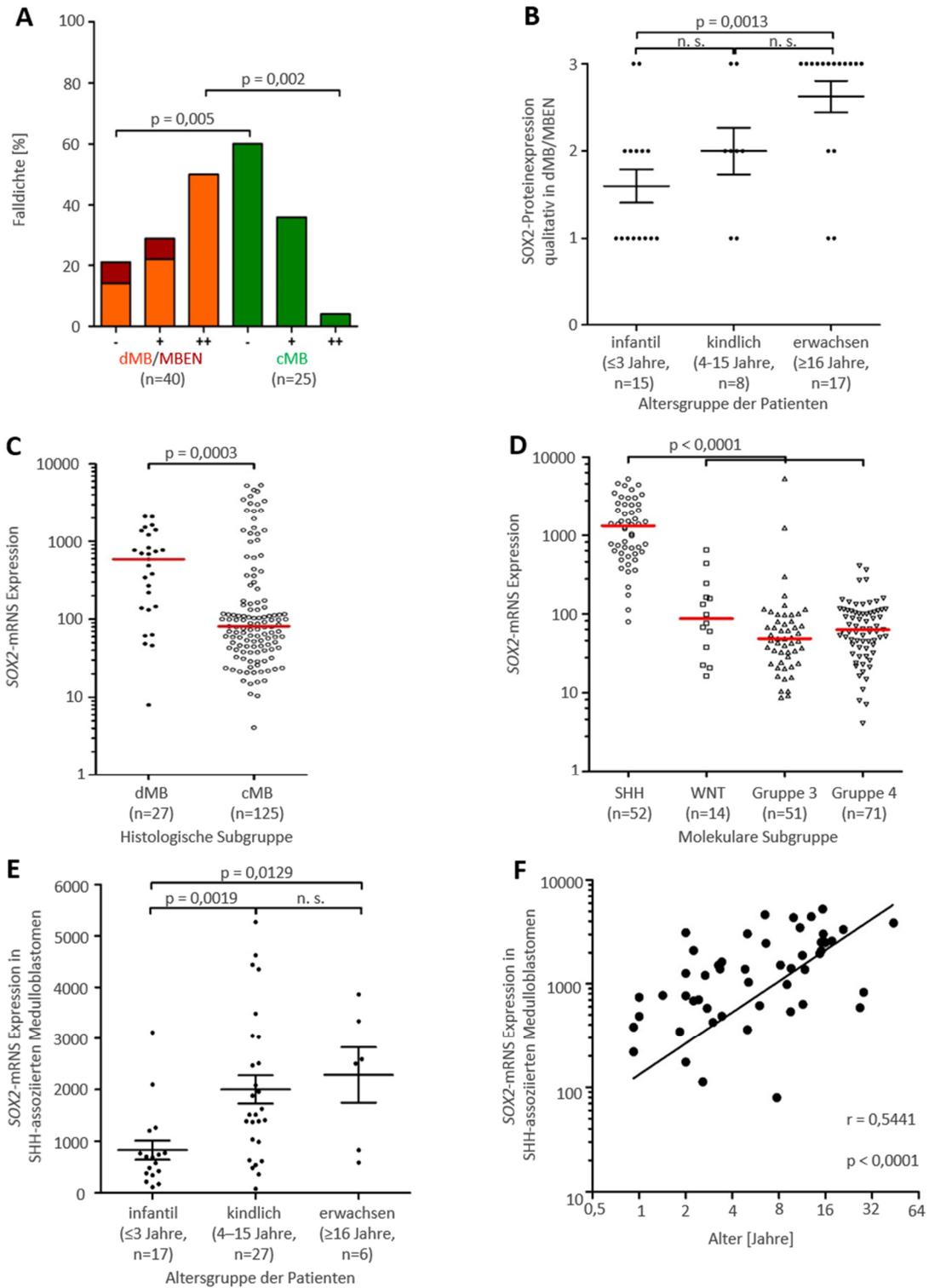


Abbildung 3.1-1 SOX2 wird besonders stark in humanen desmoplastischen und SHH-assoziierten Medulloblastomen (MB) exprimiert. Trägt man die Falldichte der Medulloblastomfälle in Abhängigkeit der Stärke der SOX2-Expression auf, wird deutlich, dass SOX2 in dMBs und MBENs zusammen stärker exprimiert wird, als in cMBs (A). Trägt man die Anzahl der Fälle von dMBs und MBENs in Abhängigkeit des Alters der Patienten auf fällt eine starke SOX2-Expression mit einem hohen Alter der Patienten zusammen (n=40; B). In RNS-Expressionsanalysen für SOX2 zeigt sich im Vergleich von dMBs und cMBs, dass SOX2 in dMBs stärker exprimiert wird (C). Untersuchungen der mRNS-Expression über alle vier molekularen Subgruppen der Medulloblastome zeigen eine starke SOX2-Expression in der SHH-assoziierten Subgruppe im Vergleich zu den anderen molekularen Subgruppen (D). Vergleicht man die SOX2-Expression in Abhängigkeit des Patientenalters, ist wiederum eine stärkere Expression in älteren Patienten zu erkennen (n=50; F). Korrelationsanalysen von SOX2-Expression und dem Patientenalter in SHH-assoziierten MBs ergeben ebenfalls eine hochsignifikante positive Korrelation der Expression von SOX2 mit zunehmendem Alter der Patienten (n=50; E). n. s., nicht signifikant. "-", keine oder schwache Expression; "+", intermediäre Expression; "++", starke Expression.

3.2 SOX2 IN DER FRÜHEN KLEINHIRNENTWICKLUNG

Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe war bekannt, dass Medulloblastome aus den frühen Vorläufern von cerebellären Körnerzellen entstehen können, wenn in diesen der Shh-Signalweg konstitutiv aktiviert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wann und wo Sox2 in Körnerzellvorläufern exprimiert wird und welche Rolle Sox2-positive Vorläuferzellen bei der Tumorigenese spielen.

3.2.1 Histologie

Sox2 wird in der normalen Embryonalentwicklung des Kleinhirns in beiden Keimzonen exprimiert. In der ersten Keimzone, der Ventrikulärzone, sind nahezu alle Zellen Sox2-positiv, während in zweiten Keimzone, der rhombischen Lippe nur eine Subpopulation von Körnerzellvorläufern Sox2 exprimiert (Abbildung 3.2-1 B). Bei genauerer Untersuchung der Sox2-positiven Zellen der rhombischen Lippe fällt auf, dass auch diese Zellen Charakteristika von Vorläufern cerebellärer Körnerzellen aufweisen. So zeigen sie neben der Expression von Sox2 auch eine Expression von Pax6 und Ki67 als Marker für anhaltende Proliferation (Abbildung 3.2-1 D und E). Sox2-positive Zellen in der rhombischen Lippe können nur von e13.5 bis e18.5 immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abbildung 3.2-1 A bis C). Ab e18.5 ist weder in der äußeren, noch in der inneren Körnerzellschicht eine Sox2-Expression zu finden (Abbildung 3.1-2 C). Im gesamten Cerebellum gibt es nach abgeschlossener Entwicklung nur wenige Populationen Sox2-exprimierender Zellen. Sox2-Expression beschränkt sich auf Zellen in der Bergmann Gliazellschicht und in der weißen Substanz. In Abbildung 6.2-1 im Anhang finden sich immunhistochemische Färbungen für Sox2 in postnatalen bis adulten Stadien der Kleinhirnentwicklung der Maus, in denen deutlich wird, dass Sox2 in postnatalen Körnerzellen nicht exprimiert wird.

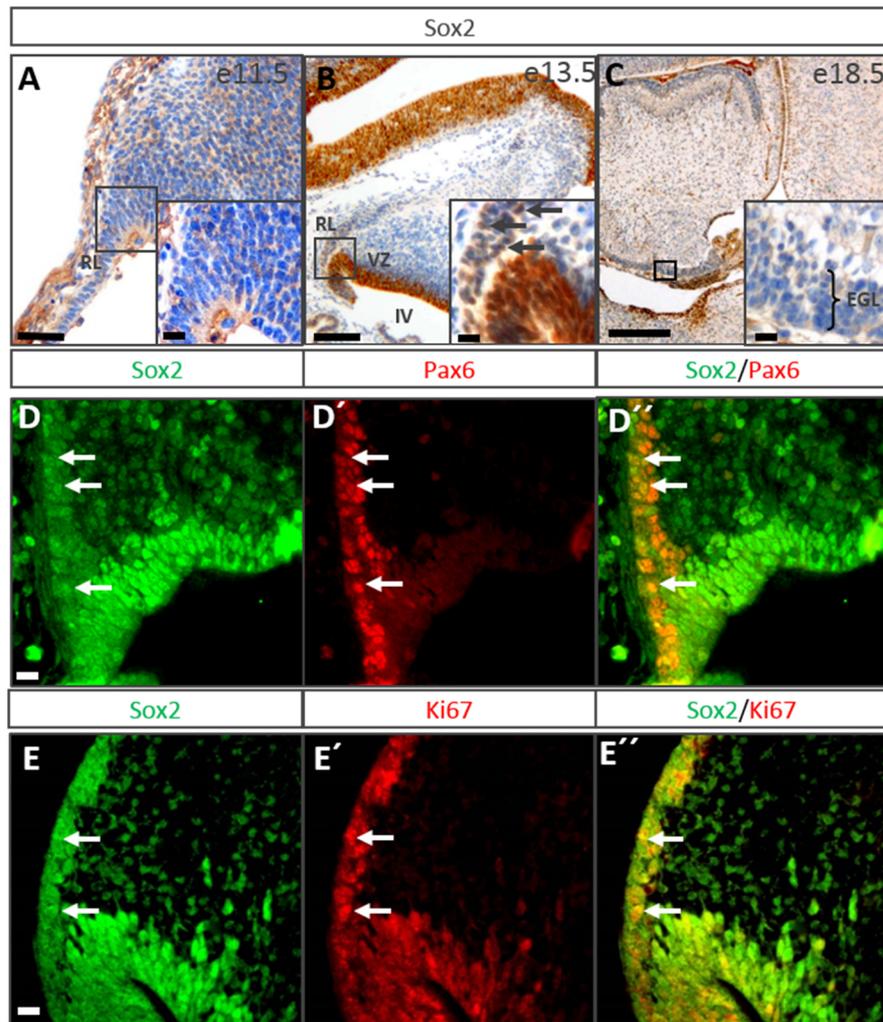


Abbildung 3.2-1 Sox2 wird in frühen Körnerzellvorläufern exprimiert. Sox2-Expression in cerebellären Körnerzellvorläufern beginnt nicht vor e13.5 (A und Pfeile in B) und geht um e18.5 verloren (C). Immunfluoreszente Ko-Färbungen für Sox2 und neuronale (Pax6; D) sowie proliferative (Ki67; E) Markerproteine verdeutlichen die Vorläufernatur von Sox2-exprimierenden Zellen in der rhombischen Lippe an e14.5 (Pfeile in D und E). Maßstäbe in kleinen Vergrößerungen entsprechen 100 μm , Maßstäbe in hohen Vergrößerungen und Detailaufnahmen entsprechen 50 μm . EGL, externe Körnerzellschicht; RL, rhombische Lippe; VZ, Ventrikulärzone; IV, vierter Ventrikel.

3.2.2 Fate-mapping

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, welche Rolle die Subpopulation von Sox2-positiven Körnerzellvorläufern in der rhombischen Lippe bei der Kleinhirnentwicklung und bei der Entstehung von Medulloblastomen spielt. Um das Schicksal von Sox2-exprimierenden Zellen genau verfolgen zu können, wurde ein System verwendet, bei dem eingeführte Mutationen nur in Zellen mit aktivem Sox2-Promotor exprimiert werden und an Tochterzellen weitergegeben werden. Eine mit einem Östrogenrezeptor gekoppelte Cre-Rekombinase wird hierfür unter dem Sox2-Promotor exprimiert und gelangt nach der Bindung von Tamoxifen in den Zellkern. Tiere aus dieser induzierbaren *Sox2-creER^{T2}*-Linie wurden mit

Mäusen verpaart, die entweder Sequenzen für ein rot fluoreszierendes Protein (tdTomato, Variante von RFP), oder für das Enzym β -Galaktosidase tragen. Die Besonderheit an diesem System ist die Irreversibilität der Cre-abhängigen Rekombination am *ROSA26*-Locus, in dem die Reporterproteine kodiert sind. Mit dem Cre-LoxP-System ist es möglich, durch Cre-vermittelte Rekombination zwischen zwei eingefügten loxP-Sequenzen, spezifisch dazwischenliegenden Sequenzen auszuschneiden. Im hier verwendeten System ist die ausgeschnittene Sequenz eine Polyadenylierungssequenz, also ein Stopp-Codon, nach dessen Verlust die Expression der codierten Reporterproteine stattfinden kann. Der *ROSA26*-Locus wird in Mäuse konstitutiv und ubiquitär abgelesen, daher manifestieren sich genetisch eingeführte Veränderungen in der Proteinexpression auch nach der Zellteilung und unabhängig von der weiteren Differenzierung der Nachkommenschaft. So exprimieren auch alle Tochterzellen einer primär rekombinierten Zelle weiterhin RFP (*red fluorescent protein*) oder β -Galaktosidase. Wegen der Verfolgbarkeit des Schicksals einzelner Zellen und Populationen mit diesem System spricht man hier von „*fate-mapping*“-Experimenten.

Durch Aktivierung der Expression (Induktion) eines Reportergens mittels Tamoxifengabe, können Zellpopulationen, die von Sox2-positiven Vorläufern ausgehen, verfolgt und ihr Beitrag zum erwachsenen Kleinhirn untersucht werden. In Versuchen an *Sox2-creER^{T2}::ROSA26lacZ^{F/+}*-Mäusen wurde Tamoxifen an verschiedenen Zeitpunkten während der Sox2-Expression in Körnerzellvorläufern der rhombischen Lippe verabreicht. Hier zeigte sich, dass im adulten Cerebellum der Versuchstiere ein großer Anteil der reifen Körnerzellen rekombiniert ist, also β -Galaktosidase exprimiert und folglich aus Sox2-positiven Vorläufern der rhombischen Lippe entstanden sein muss. Außerdem liegt offenbar ein zeitpunktspezifisches Verteilungsmuster der Nachkommen dieser Vorläufer vor. In Abbildung 3.2-2 A bis C ist nach Auswertung aller durchgeführten zeitlich gestaffelten Experimente schematisch dargestellt, wo sich die nach der embryonalen Induktion rekombinierten Zellen im adulten Cerebellum befinden. Deutlich zu sehen ist, dass Sox2-positive Vorläufer an e13.5 und e14.5 am Aufbau der rostralen Lobuli beteiligt sind (Abbildung 3.2-2 A und B), während bei späterer Induktion der Großteil der Nachkommen in den caudalen Anteilen liegt (Abbildung 3.2-2 C). In Detailaufnahmen des Gewebes aus *fate-mapping* Experimenten ist gezeigt, dass verschiedene Zelltypen des Kleinhirns aus Sox2-positiven Vorläufern entstehen, die während ihrer Entwicklung und Differenzierung auch die Expression von Sox2 verlieren. In Abbildung 3.2-2 D ist an der positiven X-Gal-Färbung in mehreren Zellkernen zu sehen, dass

der Reporter β -Galaktosidase in der weißen Substanz in Sox2-positiven Zellen exprimiert wird. Im cerebellären Cortex hingegen konnte X-Gal in der Sox2-positiven Bergmann Glia in der Purkinjezellschicht (Pfeilspitze in Abbildung 3.3-1 E) und in der inneren Körnerzellschicht und in der Molekularschicht in rekombinierten Zellen detektiert werden, die im Gegensatz zu Bergmann Glia kein Sox2 mehr exprimieren (Pfeile in Abbildung 3.2-1 E). X-Gal-positiv reife Körnerzellen sind im Detail nochmals in Abbildung 3.2-2 F durch Färbung für den neuronalen Marker NeuN dargestellt. So konnte gezeigt werden, dass Sox2-positive Zellen der Ursprung für verschiedene Zelltypen des Kleinhirns sind, die während ihrer Reifung und Differenzierung die Fähigkeit verlieren können, Sox2 zu exprimieren.

Körnerzellen werden in der Maus noch bis zu zehn Tage nach der Geburt in der äußeren Körnerzellschicht gebildet. Um herauszufinden, ob auch hier Sox2-positive Zellen noch eine Rolle spielen, wurden die *fate-mapping*-Experimente mit *Sox2-creERT²::tdTomato^{F/+}*-Reportermausen auf die frühen postnatalen Stadien ausgedehnt. Hier hat sich gezeigt, dass mindestens bis p3 der Sox2-Promotor noch zuverlässig in Körnerzellvorläufern der EGL aktiv ist. In Abbildung 3.2-2 G ist zu sehen, dass am Übergang der EGL zur IGL rekombinierte, also RFP exprimierende Zellen liegen (rotes Fluorophor), die deutlich NeuN-positiv (grünes Fluorophor), also der Körnerzelllinie zugehörig sind. Die gezeigte Zelle kann also erst seit der Induktion mit Tamoxifen an p3 aus einer Sox2-positiven Zelle entstanden und ausdifferenziert sein. Das ist der erste Beweis, dass während der Kleinhirnentwicklung auch noch postnatal neuronal differenzierte Zellen aus Sox2-positiven Vorläufern der äußeren Körnerzellschicht entstehen können.

Welche Auswirkungen dieser Befund auf die Forschung an adult entstandenen Medulloblastomen hat, wird im folgenden Kapitel untersucht.

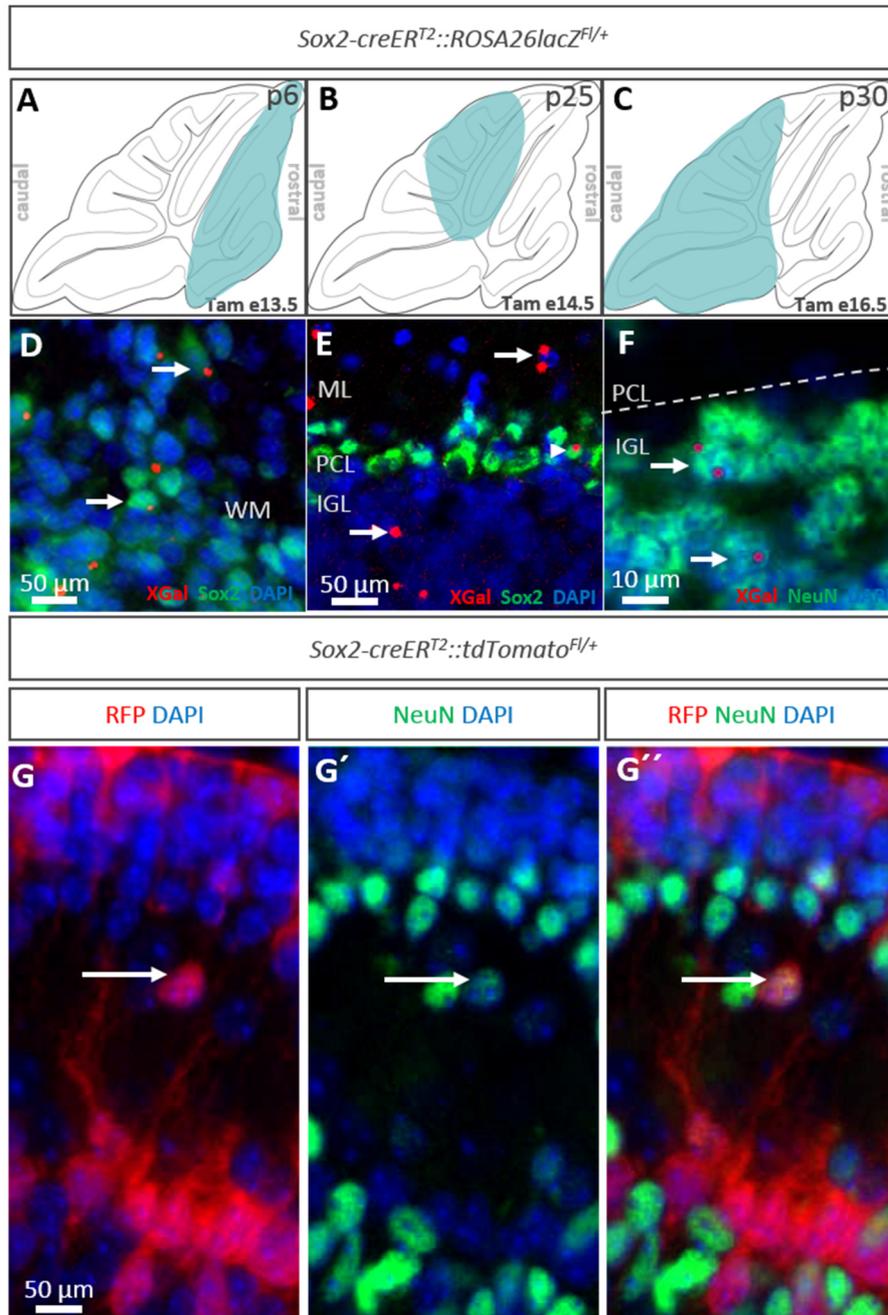


Abbildung 3.2-2 Sox-positive Körnerzellvorläufer tragen zum Aufbau des reifen Cerebellums bei. Schematische Darstellung der Verteilung von reifen Körnerzellen, die zu definierten Zeitpunkten aus Sox2-positiven Vorläuferzellen entstanden sind (Induktion an e13.5 – A; e14.5 – B; e16.5 – C). Frühe Sox2-positiv Vorläufer bauen rostrale Anteile, späte Vorläufer caudale Anteile des adulten cerebellären Cortex auf (blaue Schattierung in A – C). Aus Sox2-positiven Vorläuferzellen entstehen Sox2-positiv Zellen der weißen Substanz (Pfeile in D) und in der PCL (Pfeilspitze in E), aber auch Sox2-negative Zellen der inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht (Pfeile in E). Nachkommen von Sox2-positiven Vorläuferzellen können zu reifen Körnerzellen ausdifferenzieren (F). Postnatal liegen vereinzelt noch Körnerzellvorläufer mit latent aktivem Sox2-Promotor in der EGL vor. Bei Induktion des Reporters in Sox2-positiven Zellen an p3 findet man an p6 rekombinierte (RFP, rot) Körnerzellen (NeuN, grün) am Übergang der inneren EGL zur IGL (Pfeil in G). EGL, äußere Körnerzellschicht; IGL, innere Körnerzellschicht; ML, Molekularschicht; PCL, Purkinjzellschicht; RL, rhombische Lippe; RL, rhombische Lippe; VZ, Ventrikulärzone; WM, weiße Substanz.

3.3 SOX2 IM MAUSMODELL FÜR MEDULLOBLASTOME

Um die im humanen System gewonnenen Daten zur Expression von SOX2 in Medulloblastomen klinisch und entwicklungsbiologisch besser einordnen zu können, wurde auf ein bereits etabliertes Mausmodell für SHH-assoziierte Medulloblastome zurückgegriffen.

3.3.1 Immunhistochemie

Mäuse, die eine Mutation des *Smoothed* Rezeptors (*SmoM2*) unter der Kontrolle des humanen *GFAP*-Promotors exprimieren, entwickeln bereits embryonal Tumoren und überleben nur etwa drei Wochen nach der Geburt (Schüller *et al.*, 2008). Bereits durch eine heterozygote *SmoM2* Mutation wird der mitogene Shh-Signalweg konstitutiv aktiviert und führt so zur Hyperproliferation von Körnerzellvorläufern. In so entstandenen murinen Tumoren wird im Gegensatz zu Körnerzellen des gesunden Kleinhirns Sox2 exprimiert. Abbildung 3.3-1 zeigt eine Sox2-Färbung in einem *hGFAP-cre::SmoM2^{Fl/+}* Tumor (Abbildung 3.3-1 A) und eine anteilmäßige Quantifizierung der Sox2-positiven Zellen im Tumor über die Zeit (Abbildung 3.3-1 B). Hier zeigt sich, dass in frühen Stadien über 30% der Tumorzellen Sox2 exprimieren, die Expression aber im Laufe der Zeit signifikant abnimmt und zwischen p8 und p31 auf 3,1% fällt ($p = 0,0031$; Abbildung 3.3-1 B). Sox2-positive Zellen könnten einerseits wichtig für die Initiation des Tumorwachstums wichtig sein, andererseits aber auch für die Erhaltung des Tumors durch Generierung von Tumorzellen. Auffällig im Hinblick auf die Funktion dieser Sox2-positiven Zellen ist das Bild, das sich in Ko-Färbungen von Sox2 und Markern für die Vorläuferidentität von unreifen Neuronen im Tumor ergibt. In Abbildung 6.3-1 im Anhang ist zu sehen, dass DCX-positive Zellen meist in Inseln um Gruppen von Sox2-positiven Zellen liegen (6.3-1 A), und dass Tuj1 und Sox2 immer kolokalisiert im Tumor vorliegen (6.3-1 B). Diese Assoziation von Sox2-positiven Zellen mit den Vorläufermarkern der Körnerzelllinie lässt eine Rolle von Sox2-positiven Zellen beim Wachstum von Medulloblastomen vermuten. Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um zu überprüfen, ob und wann aus Sox2-positiven Körnerzellvorläufern Tumore entstehen können.

3.3.2 Tumorentstehung

Um zu überprüfen, ob aus Sox2-positiven Vorläufern der rhombischen Lippe auch Medulloblastome entstehen können, wurde ein Mausmodell zur zell- und zeitpunktspezifischen Aktivierung der *Smoothed*-Mutation verwendet. In Sox2-*creER^{T2}::SmoM2^{Fl/+}*-Mäusen führt die Gabe von Tamoxifen zur Aktivierung des Shh-Signalweges in Zellen, die einen aktiven Sox2-Promotor haben und anschließend in allen Zellen, die aus dieser Population hervorgehen.

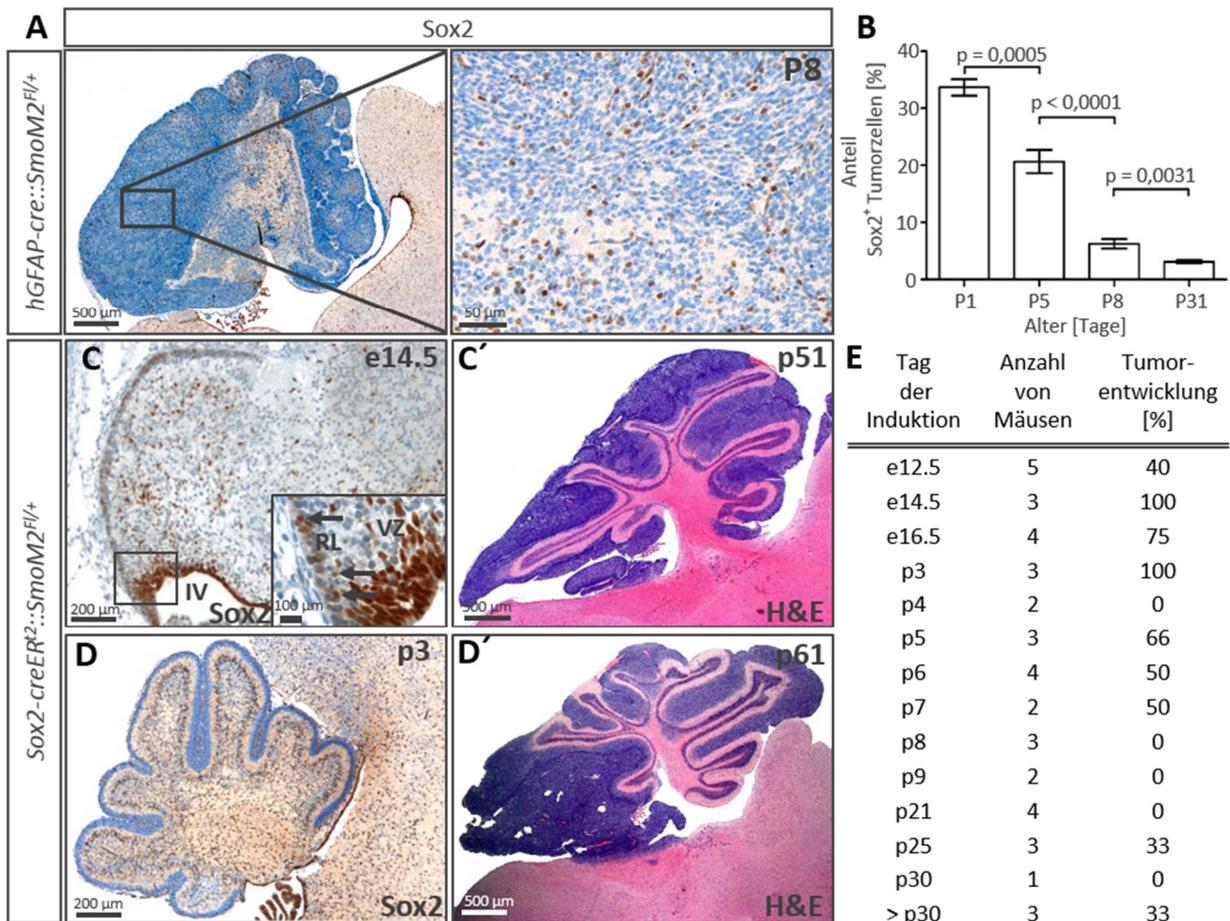


Abbildung 3.3-1 Onkogenes Potential Sox2-positiver Körnerzellvorläufer während der Kleinhirnentwicklung. Konstitutive Aktivierung des Shh-Signalweges unter dem *hGFAP*-Promotor führt zur Bildung von Shh-assoziierten Medulloblastomen im Mausmodell mit verstreut im Tumor liegenden Sox2-positiven Zellen (A). Der Anteil der Sox2-positiven Zellen an den Tumorzellen nimmt mit zunehmendem Alter ab (B). Sox2-positiv Zellen in der rhombischen Lippe haben das Potential nach Aktivierung des Shh-Signalweges Tumoren auszubilden (1mg Tamoxifen an e14.5; C). Aus Zellen der äußeren Körnerzellschicht mit aktivem Sox2-Promotor können bis p3 zuverlässig Tumoren induziert werden (1mg Tamoxifen an p3; D). RL, rhombische Lippe; IV, vierter Ventrikel VZ, Ventriklurzone.

Bei diesen Versuchen zeigte sich zunächst, dass Sox2-positive Körnerzellvorläufer der rhombischen Lippe das Potential besitzen, Tumoren auszubilden. In Abbildung 3.3-1 C' ist ein Tumor zu sehen, der nach embryonaler Aktivierung des Shh-Signalweges an e14.5 in Sox2-positiven Körnerzellvorläufern der rhombischen Lippe entstanden ist (RL; Pfeile in der Detailansicht in Abbildung 3.3-1 C). Wie in Abbildung 3.3-1 E zu sehen ist, konnte die Tumorentstehung nicht nur zwischen e13.5 und e18.5 initiiert werden, sondern durchaus auch bis in die frühen postnatalen Tage. Eine konsistente Tumorentstehung aus Sox2-positiven Zellen war bis p3 möglich (Abbildung 3.3-1 D'). Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen aus dem früh postnatalen *fate-mapping*, bei dem gezeigt werden konnte, dass einzelne Zellen der äußeren Körnerzellschicht noch einen aktiven Sox2-Promotor haben, auch wenn das Protein immunhistochemisch nicht mehr nachweisbar ist (Abbildung 3.2-2 G).

Weil die Induktion von Tumoren aus Sox2-positiven Zellen offenbar nicht auf die embryonalen Stadien beschränkt ist, sollte untersucht werden, ob auch in adulten Tieren Tumoren aus Sox2-positiven Zellen erzeugt werden können. Hierzu wurde wiederum das induzierbare Mausmodell *Sox2-creER^{T2}::SmoM2^{Fl/+}* verwendet, durch das ausschließlich in Zellen mit aktivem Sox2-Promotor der Shh-Signalweg aktiviert wird. Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Geburt und deutlich nach Abschluss der cerebellären Entwicklung (p21) mit Tamoxifen induziert und bis zur Ausbildung von Symptomen am Leben gelassen. Bei ataktischem Phänotyp wurden die Tiere getötet, das Gehirn entnommen und histologisch aufgearbeitet. Die Überlebensdaten sind in Kaplan-Meier-Kurven dargestellt (Abbildung 6.3-2 A). Auffällig ist hier die Zeitspanne zwischen p7 und p25, in der offenbar keine Induktion von Tumoren aus Sox2-positiven Zellen möglich ist. Eine analoge biphasische Altersverteilung zeigt sich auch bei der Analyse von dMBs und MBENs, den Subtypen des Medulloblastoms mit signifikant erhöhter SOX2-Expression (Abbildung 6.3-2 B), wie sie auch schon für die SHH-assoziierten Medulloblastome gezeigt werden konnte (Northcott *et al.*, 2011a). Die besondere Assoziation der SHH-Medulloblastome mit der Expression von SOX2 wird auch auf molekularer Ebene deutlich. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von SOX2 und SHH in SHH-assoziierten Medulloblastomen (Abbildung 6.3-2 C). Welche Funktion Sox2 in Medulloblastomzellen hat, soll im folgenden Kapitel untersucht werden.

3.4 FUNKTIONELLE ASPEKTE VON SOX2 IN TUMORZELLEN

Das außergewöhnlich häufige Vorkommen von SOX2-exprimierenden Zellen in SHH-assoziierten Tumoren wirft die Frage auf, welche Funktion diese Zellen bei der Tumorentstehung und der Erhaltung des Tumors haben. Für die Klärung dieser Frage waren zunächst die Folgen von Verlust und Überexpression von *Sox2* in der Tumorentwicklung interessant.

3.4.1 Knockout von Sox2 in Körnerzellvorläufern

Der Verlust von *Sox2* in Körnerzellvorläufern wurde *in vivo* zunächst während der normalen Kleinhirnentwicklung und anschließend bei der Entstehung von Shh-assoziierten Medulloblastomen untersucht.

3.4.1.1 Knockout von Sox2

Zur Untersuchung der Konsequenzen eines frühen Verlustes von *Sox2* in Körnerzellvorläufern, wurden transgene Mäuse verwendet, bei denen die Cre-Rekombinase unter dem humanen *GFAP*-Promotor exprimiert wird. Die *Sox2*-Sequenz ist in diesem Modell von zwei loxP-Sequenzen flankiert und wird dementsprechend mit der Aktivierung des *hGFAP*-Promotors in Körnerzellvorläufern durch Rekombination entfernt.

In Abbildung 3.4-1 A und B sind Übersichtsfärbungen der sich entwickelnden Kleinhirnen von *hGFAP-cre::Sox2^{F1/+}* (Kontrolle) sowie *hGFAP-cre::Sox2^{F1/F1}* Mäusen zu sehen. Die Färbungen für die Cre-Rekombinase dienen als interne Kontrolle für die Enzymaktivität (Abbildung 3.4-1 A' und B'), während jene für Sox2 den frühen Verlust von *Sox2* in der rhombischen Lippe schon ab e13.5 als vollständig nachweisen (Abbildung 3.4-1 B''). In der Kontrollsituation ist sowohl die Cre-Expression, als auch Sox2 deutlich an der braunen Färbung aus der DAB-Reaktion zu erkennen (Abbildung 3.4-1 A' und A''), während im homozygoten Knockout Cre-Expression vorhanden ist, aber kein Sox2 mehr nachgewiesen werden kann (Abbildung 3.4-1 B' und B''). Allerdings ist sowohl in der H&E-Übersichtsfärbung einer adulten Altersstufe (Abbildung 3.4-1 D) als auch in den Detailaufnahmen anderer charakteristischer Marker zu beiden Zeitpunkten keine unmittelbare Auswirkung des frühen Verlusts von *Sox2* auf den zellulären Aufbau oder die grobe Morphologie des Cerebellums zu erkennen (Anhang 6.4-1 A - N).

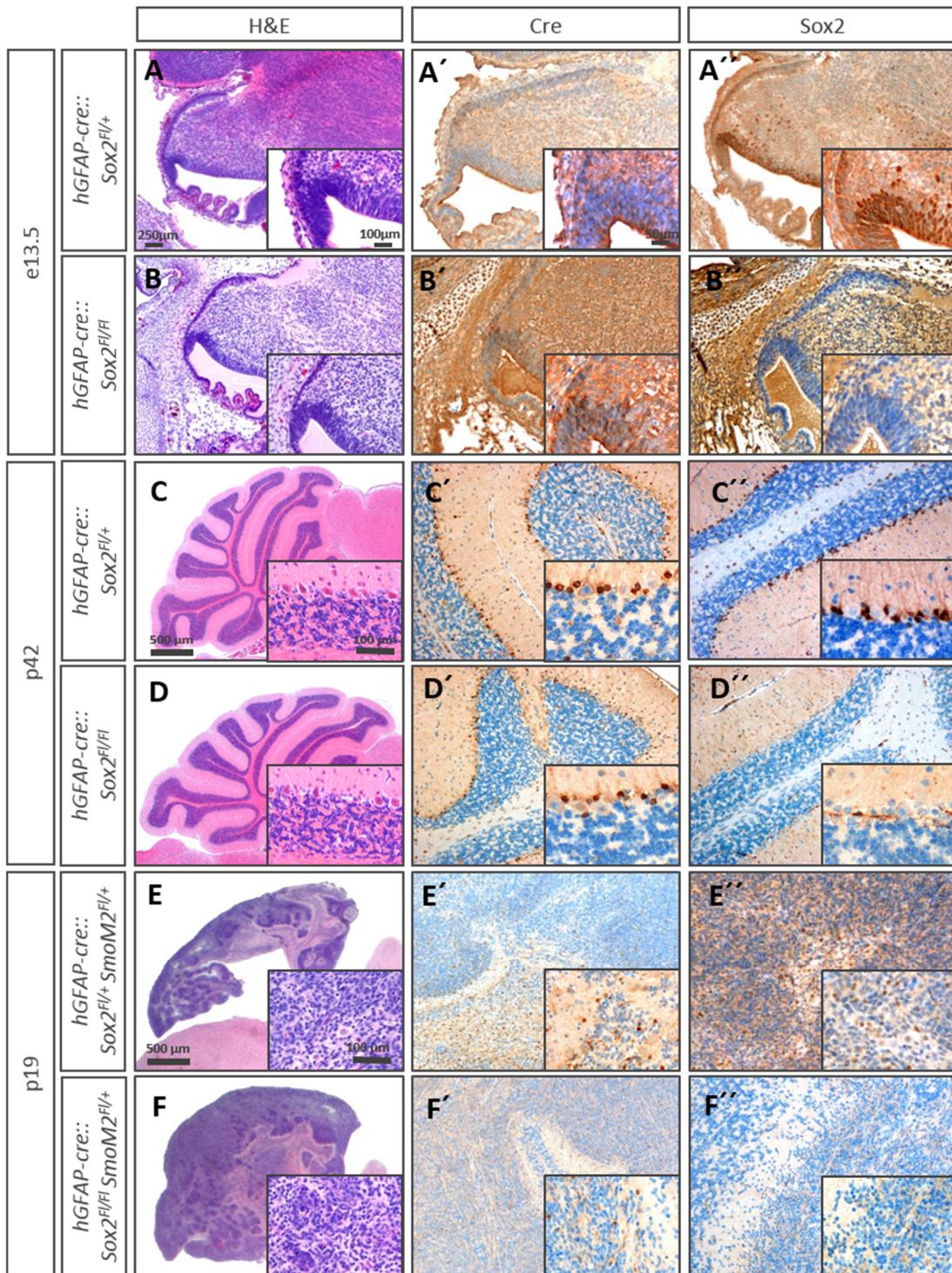


Abbildung 3.4-1 Früher Verlust von Sox2 in Körnerzellvorläufern hat keinen Einfluss auf die Entwicklung des Kleinhirns. Nachweis des frühen Cre-abhängigen Verlusts von *Sox2* unter dem *hGFAP*-Promotor in der rhombischen Lippe an e13.5 (A und B). Im adulten Cerebellum ist die grobe Morphologie des Cerebellums im Vergleich mit der Kontrolle, trotz vollständigem Verlust von *Sox2* normal (C und D). Auch im Modell für *Shh*-assoziierte Medulloblastome hat der frühe Verlust von *Sox2* keinerlei Auswirkung auf die Entstehung des Tumors (E und F).

Unter Umständen ist Sox2 in frühen Stadien der Embryonalentwicklung also nicht essentiell für die normale Entwicklung des Cerebellums. Aufgrund der vorliegenden Expressionsdaten aus humanen Tumoren und dem Mausmodell für Medulloblastome, die eine Rolle von Sox2 im oder in der Tumorentstehung vermuten lassen, sollte die Bedeutung von Sox2 für die Entwicklung von Shh-assoziierten Tumoren untersucht werden. Es wurde das oben erwähnte konditionelle Knockout-System verwendet, wobei zusätzlich zum Verlust von Sox2 die *SmoM2*-Mutation Cre-abhängig exprimiert wird. Auch hier zeigten sich jedoch im direkten Vergleich von *hGFAP-cre::Sox2^{F1/F1}SmoM2^{F1/+}*-Gehirnen (Abbildung 3.4-1 F) mit *hGFAP-cre::Sox2^{F1/+}SmoM2^{F1/+}* Kontrollgewebe (Abbildung 3.4-1 E) keine grob morphologischen Unterschiede. Die Expression der Cre-Rekombinase in beiden Konditionen, sowie der Sox2-Verlust in der homozygoten Knockout-Maus sind deutlich (Abbildung 3.4-1 Vergleich von E' und F', sowie E'' und F''), dennoch sind weder makroskopisch noch mikroskopisch essentielle Veränderungen in der Tumorentwicklung zu erkennen. In Anhang 6.4-1 O - Z sind Übersichtsfärbungen und weiterführende Färbungen im Detail gezeigt, an denen zu erkennen ist, dass außer dem vollständigen Verlust von Sox2 keine entscheidenden Unterschiede im zytologischen Aufbau des Tumors vorliegen.

Um diese Befunde zu unterstreichen und eventuelle Unterschiede in der zeitlichen Entwicklung der Tumoren mit und ohne Sox2-Expression aufzudecken, wurden vergleichende Überlebensanalysen der Tiere mit normaler Sox2-Expression und bei Sox2-Verlust im Shh-abhängigen Tumor durchgeführt. Die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 3.4-2 A zeigt keinen Unterschied im Überleben zwischen den beiden untersuchten Gruppen ($p = 0,6039$).

Die Ergebnisse aus den Versuchen zum embryonalen Verlust von Sox2 *in vivo* lassen zwei Interpretationen zu, zum einen, dass Sox2 keine Rolle in der Initiation von Medulloblastomen hat, zum anderen, dass unter Umständen in frühen Entwicklungsstadien kompensatorische Mechanismen eingreifen, wenn wichtige Faktoren verloren gehen. Da ähnliche Phänomene besonders innerhalb der großen Familie der Sox-Gene bereits bekannt sind (Graham *et al.*, 2003, Matsui *et al.*, 2006), wurde die Expression der anderen beiden Mitglieder der SoxB1-Gruppe mittels relativer Quantifizierung bestimmt. Abbildung 3.4-2 B und C zeigen die Analyse der RNS für die Expression von Sox1, Sox2 und Sox3 in Shh-assoziiertem Tumorgewebe in unterschiedlichen Altersstufen. Der komplette Verlust von Sox2 ist jeweils gut an der fehlenden RNS-Expression zu erkennen und dient in diesen Versuchen auch als interne Kontrolle für die technische Ausführung der Versuche. Im Kontrollgewebe fanden sich jeweils

konstante Level aller *SoxB1*-Gene in Bezug auf die RNS-Transkription. Als Reaktion auf den vollständigen Verlust von *Sox2* ist jedoch sowohl an p0 als auch an p5 klar der Anstieg in der Transkription von *Sox3* RNS zu erkennen ($p = 0,029$; Abbildung 3.4-2 B; $p = 0,031$; Abbildung 3.4-2 C). Im Expressionsprofil älterer Tiere ist der relative Anstieg in der RNS für *Sox3* nicht mehr nachzuweisen, wie in Abbildung 6.4-2 A - C nochmals im Vergleich zu den beiden früheren Altersstufen dargestellt ist. Im Anhang sind ebenfalls Analysen zur *Sox3*-Expression über die Subgruppen von Medulloblastomen (6.4-2 D) und die Korrelation mit der Expression von *Sox2* (6.4-2 E) dargestellt. Die Expression von *Sox3* ist analog zu *Sox2* auch in der SHH-Gruppe der Medulloblastome signifikant erhöht. So findet man auch eine signifikante Korrelation zwischen der Expression der beiden *SoxB1*-Gene in Medulloblastomen.

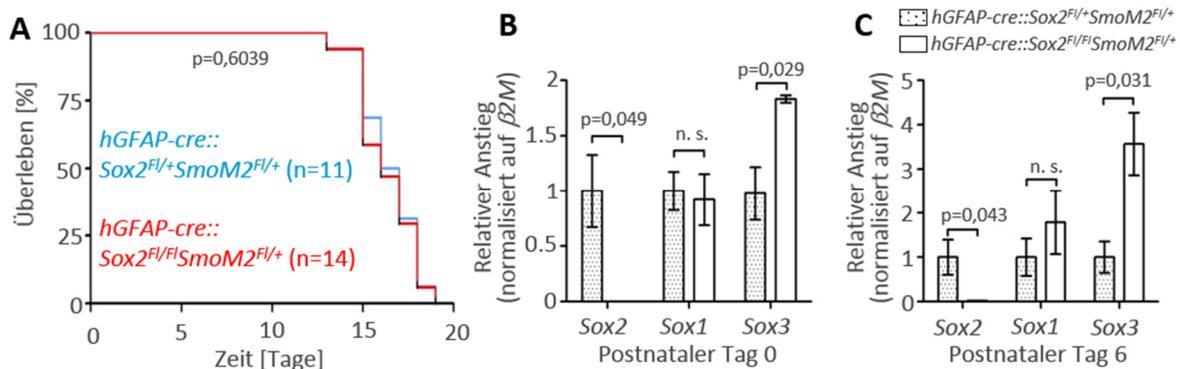


Abbildung 3.4-2 Der frühe Verlust von *Sox2* in murinen Shh-assoziierten Medulloblastomen wird durch eine erhöhte Expression von *Sox3* kompensiert. Der vollständige Verlust von *Sox2* in Medulloblastomen mit einer *SmoM2*-Mutation zeigt keine Wirkung auf das Überleben der Mäuse (A). Regulatorische Expression von *Sox3* kompensiert für den frühen Verlust von *Sox2*, wie in der relativen Quantifizierung für die Expression der Gene der *SoxB1*-Gruppe an p0 (B) und p6 (C) gezeigt. Schattierte Balken: *hGFAP-cre::Sox2^{F/+}SmoM2^{F/+}* (Kontrolle); weiße Balken: *hGFAP-cre::Sox2^{F/F}SmoM2^{F/+}*. n. s., nicht signifikant.

Um diese frühen kompensatorischen Mechanismen zu umgehen, wurde in einem nächsten Schritt der akute Verlust von *Sox2* in primären Körnerzellkulturen untersucht.

3.4.1.2 Primäre Körnerzellkultur

In primären Körnerzellkulturen wurden zum Zeitpunkt der größten klonalen Expansion der Körnerzellvorläufer (p5 – p7) gleichzeitig die Shh-aktivierende *SmoM2*-Mutation und der *Sox2*-Knockout durch viral eingebrachte Cre-Rekombinase eingeführt. Die Auswirkung des auf diese Weise eingebrachten akuten Verlusts von *Sox2* kann so ohne frühen kompensatorischen Eingriff redundant exprimierter *Sox*-Gene untersucht werden.

In Vorversuchen zur Funktionalität primärer Körnerzellkulturen hat sich herausgestellt, dass eine gewisse positive Selektion der Körnerzellvorläufer gegenüber den abundant zu findenden Gliazellen zweckmäßig ist, um die Zahl der vitalen neuronalen Vorläuferzellen möglichst hoch und die Aussagekraft der Kultur in Bezug auf die Eigenschaften von Körnerzellen möglichst groß zu halten. Daher wird bakteriell synthetisiertes Shh-Protein (siehe 2.4.4) ins Zellkulturmedium gegeben, um Körnerzellvorläufer weiter proliferativ zu halten, wie es im Umfeld der Shh-sezernierenden Purkinjezellen physiologisch ist (Dahmane *et al.*, 1999). Während der 24-stündigen Inkubation in Shh-haltigem Medium gehen Gliazellen in der Kultur in die G0-Phase über. So wird verhindert, dass Retroviren Gliazellen transduzieren und so Aussagen über Körnerzellen durch kontaminierende Glia verfälscht werden. Abbildung 3.4-3 A - D zeigt den Effekt von Shh-Protein auf die proliferative Aktivität von Körnerzellen. Die Proliferation der Körnerzellvorläufer steigt mit erhöhter Shh-Konzentration im Medium bis zur physiologischen Konzentration von 3 µg/ml *in vitro* (Lai *et al.*, 2003) auf das Fünffache gegenüber der unbehandelten Kulturen an (Abbildung 3.4-3 D). In Abbildung 6.4-3 im Anhang ist durch Ko-Färbungen von viralem GFP zusammen mit den neuronalen Markern Pax6 und NeuN zu sehen, dass in unserem Protokoll tatsächlich fast ausschließlich Körnerzellen in der Kultur von den retroviralen Partikeln transduziert werden. Bei Versuchen an Körnerzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Shh-Protein im Medium konnte gezeigt werden, dass mit steigender Shh-Konzentration auch die Zahl der Sox2-positiven Körnerzellen in der Kultur ansteigt. Abbildung 3.4-3 E - H zeigt durch Ko-Färbungen von Sox2 mit dem Marker für Körnerzellvorläufer Pax6, dass in normalen Körnerzellvorläufern der Anteil an Sox2-positiven Zellen auf das Vierfache ansteigt, wenn die Shh-Konzentration von 0 µg/ml auf 3 µg/ml erhöht wird ($p < 0,0001$; Abbildung 3.4-3 G und H). Für diesen Versuch wurde zusätzlich ausgeschlossen, dass es sich bei der Erhöhung der Zahl Sox-positiver Zellen um eine Expansion cerebellärer Gliazellen handelt. In Abbildung 6.4-4 im Anhang ist durch Ko-Färbungen von Sox2 mit neuronalen Markern gezeigt, dass in der Versuchskondition mit aktiviertem Shh-

Signalweg tatsächlich die Zahl an Sox2-positiven Neuronen im Vergleich zu den drei Kontrollkonditionen ansteigt.

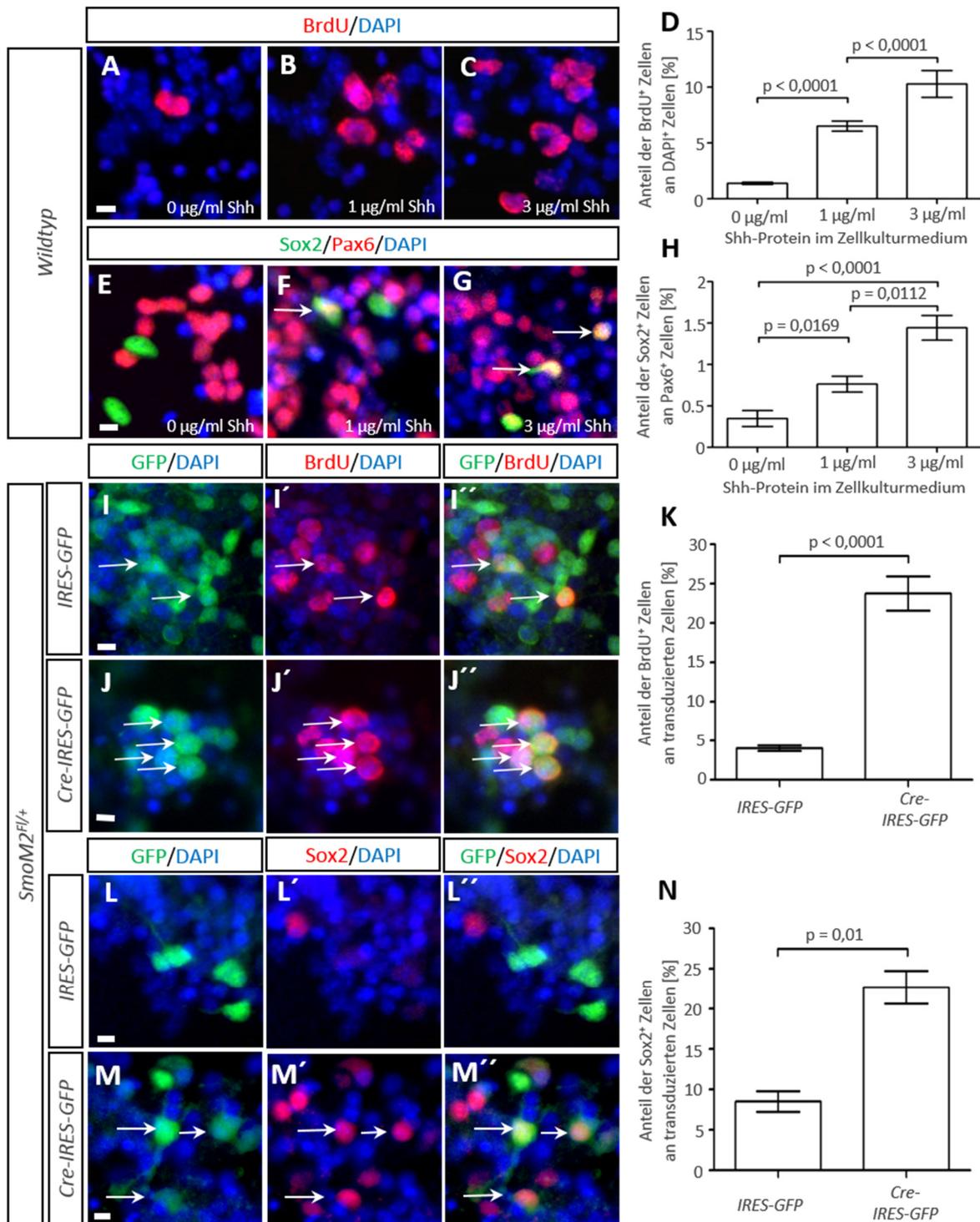


Abbildung 3.4-3 Konstitutive Aktivierung des Shh-Signalweges treibt die Expression von Sox2 *in vitro*. Mit ansteigender Konzentration von exogen zugeführtem Shh-Protein in primären Körnerzellkulturen steigt auch die Proliferation (A-D) sowie die Sox2-Expression in Körnerzellen an (E-H, Pfeile in F und G). Ähnliche Befunde beobachtet man, wenn der Shh-Signalweg in Körnerzellvorläufern retroviral aktiviert wird. *Cre-IRES-GFP*-Viren induzieren die Rekombination einer Poly-Adenylierungssequenz stromaufwärts der *SmoM2*-Mutation, die daraufhin exprimiert und der Shh-Signalweg aktiviert wird. Daraufhin steigt sowohl die Proliferation (I-K, Pfeile in I und J) als auch der Anteil Sox2-positiver Zellen in der Kultur (L-N, Pfeile in M). Maßstäbe: 10 µm

Die Auswertung der primären Körner- und Tumorzellkulturen erfolgte wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben.

Vergleichbare Ergebnisse wie in den Vorversuchen mit ansteigender Shh-Konzentration im Zellkulturmedium, wurden in Körnerzellkulturen erlangt, bei denen endogen der Shh-Signalweg durch retrovirale Partikel aktiviert wurde, die Sequenzen für die Expression der Cre-Rekombinase enthalten. In primären Körnerzellvorläufern vom *SmoM2^{Fl/+}*-Genotyp stieg entsprechend sowohl die Proliferation ($p < 0,0001$) als auch der Anteil Sox2-positiver Zellen ($p = 0,01$) in der Körnerzellkultur signifikant an, wenn durch *Cre-IRES-GFP* Viren der Shh-Signalweg in proliferierenden Körnerzellen konstitutiv aktiviert wurde (Abbildung 3.4-3 K und N). Beim Vergleich von Kontrollen (Abbildungen 3.4-3 I und L) mit den Konditionen mit aktiviertem Shh-Signalweg (Abbildung 3.4-3 J und M) ist deutlich der größere Anteil von transduzierten GFP-positiven Zellen zu erkennen, die gleichzeitig BrdU inkorporiert haben (Abbildung 3.4-3 I und J) oder Sox2 exprimieren (Abbildung 3.4-3 L und M). Endogene Aktivierung des Shh-Signalweges führt also in Körnerzellvorläufern sowohl zum Anstieg der Proliferation als auch zur Erhöhung der Sox2-Expression.

Dieses Zellkultursystem zeigt den charakteristischen Proliferationsschub in Körnerzellen auf Aktivierung des Shh-Signalweges hin sowie die ektope Expression von Sox2 in Körnerzellen. Es kann also als *in vitro* Modell für Shh-assoziierte Medulloblastome dienen, um den Einfluss eines akuten Sox2-Verlustes auf die proliferative Aktivität von Medulloblastomzellen zu untersuchen. Bei diesen Versuchen wurden Körnerzellvorläufer von Mäusen verwendet, die jeweils Cre-abhängig den mutierten Transmembranrezeptor SmoM2 exprimieren und gleichzeitig die Fähigkeit verlieren, Sox2 zu exprimieren. Wird zu diesen *Sox2^{Fl/Fl}SmoM2^{Fl/+}* Zellen das Cre-exprimierende Retrovirus gegeben, kann man beobachten, wie im Vergleich zur Kontrollsituation (Abbildung 3.4-4 A) der Anteil der Sox2-positiven Zellen in der Population der transduzierten Körnerzellen auf nahezu Null zurückgeht ($p = 0,005$; Abbildungen 3.4-4 B und C). Für die Validität der Auswertung der Ergebnisse aus dem Zellkultursystems ist das essentiell, denn nur so kann man davon ausgehen, dass in GFP-positiven, also viral transduzierten Zellen ein vollständiger Verlust der Sox2-Expression vorliegt. Bei der Proliferationsanalyse der transduzierten und somit Sox2-defizienten Zellen wird beim Vergleich mit der Kontrollsituation (Abbildungen 3.4-4 D und E) deutlich, dass der Anteil an transduzierten proliferativen Zellen in der Kultur signifikant zurückgeht ($p = 0,0002$; Abbildung 3.4-4 F). In Abbildung 3.4-4 D sind exemplarisch GFP- und BrdU-positive Zellen in einer Kultur

mit aktiviertem Shh-Signalweg zu sehen. In dieser Versuchskondition proliferieren durchschnittlich 23,7 % der transduzierten Zellen. Das entspricht auch der Proliferationsrate in vorherigen Versuchen an Körnerzellen mit aktiviertem Shh-Signalweg (Abbildung 3.4-3 K). Bei vollständigem Verlust von Sox2 fällt der Anteil proliferierender Zellen mit aktiviertem Shh-Signalweg um fast ein Viertel auf 15,6 % im Vergleich zur Kondition, in der Sox2 vorhanden ist (Abbildung 3.4-4 F).

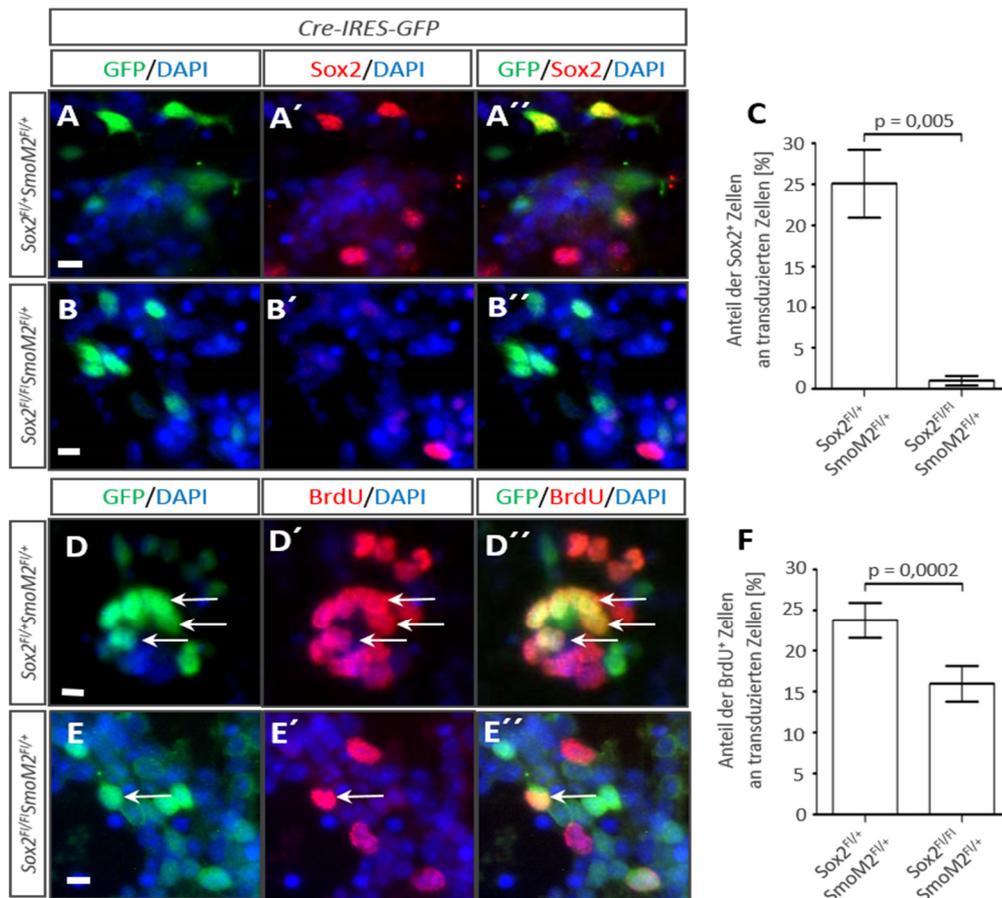


Abbildung 3.4-4 Sox2 ist notwendig, um die Proliferation von Medulloblastomzellen zu modulieren. In primären Körnerzellkulturen aus *Sox2^{Fl/Fl}SmoM2^{Fl/+}* Mäusen konnte durch retrovirale Transduktion mit *Cre-IRES-GFP*-Viren ein vollständiger Verlust von Sox2 erzielt werden (A, B und C). *Cre*-Virus abhängige Aktivierung des Shh-Signalweges mit gleichzeitiger Verlust von Sox2 führt zu einer signifikant niedrigeren Proliferation, im Vergleich zur *SmoM2*-mutierten Situation mit normaler Sox2-Expression (Pfeile in D und E, F). Maßstäbe: 10 μ m.

Somit konnte zum ersten Mal ein funktioneller Effekt von Sox2 in Zellen von Shh-assoziierten Medulloblastomen gezeigt werden. Der akute Verlust von Sox2 in Körnerzellvorläufern mit aktiviertem Shh-Signalweg führt zu einer verringerten proliferativen Aktivität.

3.4.2 Überexpression von Sox2 in Tumorzellen

Die Überexpression von *Sox2* in Medulloblastomzellen wurde *in vitro* in Tumorzellen des Mausmodells für Shh-assoziierte Medulloblastome untersucht.

Nach der erwiesenen Funktionalität von *Sox2* in Medulloblastomzellen, wurde nun untersucht, ob das Expressionslevel von *Sox2* einen direkten Einfluss auf die proliferative Aktivität von Tumorzellen hat, oder ob der Regulationsmechanismus nur in eine Richtung wirkt. Hierfür wurde ein System gewählt, bei dem Tumorzellen aus *hGFAP-cre::SmoM2^{Fl/+}* Tieren in Kultur genommen und mit einem *Sox2*-exprimierenden Retrovirus behandelt wurden (siehe 2.4.5 und 2.4.6). Zunächst wurde die Effizienz des selbst hergestellten Retrovirus getestet. In transduzierten Tumorzellkulturen steigt der Anteil der *Sox2*-positiven Zellen auf nahezu 100% (Abbildung 3.4-5 C; $p < 0,0001$) im Vergleich zu einer mit GFP-exprimierendem Kontrollvirus behandelten Tumorzellkultur (Abbildung 3.4-5 A und B). Misst man die proliferative Aktivität der transduzierten Zellen mittels des bereits beschriebenen BrdU-Inkorporationsassay, steigt in der *Sox2-IRES-GFP*-Virus behandelten Kultur der Anteil an BrdU-positiven, also proliferierenden Zellen gegenüber der *IRES-GFP*-Kontrolle signifikant an (Abbildung 3.4-5 F; $p = 0,0022$). In der Quantifizierung sowie im Vergleich der aufgenommenen Bilder aus der Tumorzellkultur wird deutlich, dass die Überexpression von *Sox2* in Shh-aktivierten Zellen zu einer durchschnittlichen Erhöhung der Proliferation um 33% im Vergleich zur Kontrollbedingung führt (Abbildung 3.4-5 D und E). Diese Daten legen nahe, dass die Expression von *Sox2* in Medulloblastomzellen ausreicht, um deren Proliferation signifikant zu steigern.

Ein früher Verlust von *Sox2* während der Kleinhirn- und Medulloblastomentwicklung kann also von anderen *Sox*-Genen erfolgreich kompensiert werden. Trotzdem konnte sowohl im akuten Knockout von *Sox2* in Medulloblastomzellen als auch in Überexpressionsversuchen von *Sox2* in Tumorzellen gezeigt werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Proliferationsaktivität der Shh-abhängigen Tumorzellen und der Expression von *Sox2* besteht.

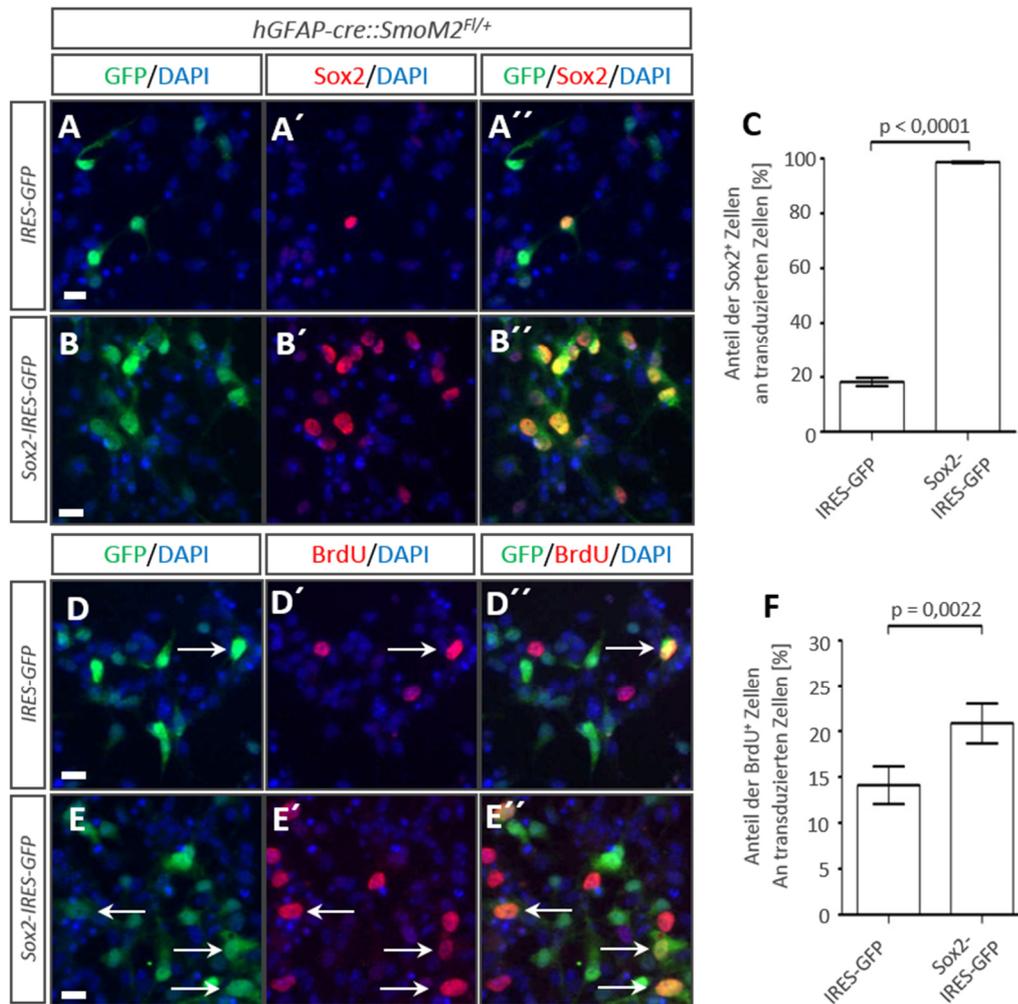


Abbildung 3.4-5 Sox2 ist ausreichend, um die Proliferation von Medulloblastomzellen zu modulieren. Durch die Transduktion von Tumorzellen mit einem Sox2-Expressionsvirus konnte die Population von Sox2-positiven Zellen in der Tumorzellkultur von 20% auf knapp 100% der transduzierten Zellen gesteigert werden (A, B und C). In der Folge konnte mit der Überexpression von Sox2 ein signifikanter Anstieg der Proliferation durch BrdU-Inkorporation in der transduzierten Population (Pfeile in D und E) gemessen werden (F). Maßstäbe: 25 µm.

SOX2 hat, wie die eingangs gezeigten humanen Arraydaten andeuten, wohl eine größere Bedeutung in adulten Medulloblastomen, als in infantilen Tumoren (Abbildung 3.1-1). Welche Bedeutung Sox2 im adulten Cerebellum allgemein hat, soll im folgenden Kapitel untersucht werden.

3.5 SOX2 IM ADULTEN KLEINHIRN

Die größte Sox2-positive Population im adulten cerebellären Cortex ist die Bergmann Glia, wie in Abbildung 3.5-1 A in der DAB-Färbung für Sox2 dargestellt. Weiterhin wird der Transkriptionsfaktor in Astrozyten und Oligodendrozyten der inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht exprimiert. In der cerebellären weißen Substanz von früh postnatalen Mäusen wurde erst kürzlich eine Population von CD133-positiven Sox2-positiven Vorläuferzellen gefunden (Lee *et al.*, 2005), die neben Sox2-positiven Oligodendrozyten in der weißen Substanz liegen. Grundsätzlich ist also bekannt, dass Sox2 im gesunden adulten Cerebellum vor allem in Gliazellen exprimiert wird. Bis jetzt ist allerdings noch ungeklärt, warum besonders in der adulten Form von Medulloblastomen Sox2 abundant in Tumorzellen exprimiert wird (vgl. Abbildung 3.1-1 B und D).

3.5.1 Sox2-positive neuronale Vorläufer im murinen cerebellären Cortex

Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob es im adulten Kleinhirn Sox2-positive Zellen gibt, die auch nach der vollständigen Reifung des Cerebellums noch die Fähigkeit besitzen, neue Zellen zu generieren, oder nach onkogener Veränderung Tumorzellen zu produzieren.

3.5.1.1 Histologie

Sox2 wird im adulten cerebellären Cortex vorwiegend in Gliazellen exprimiert. Wie bereits erwähnt, ist die auffälligste Sox2-positive Population die Bergmann Glia (Abbildung 3.5-1 A). Zwischen den Purkinjezellen liegend reichen die Fortsätze der Zellen durch die Molekularschicht in Richtung der pialen Grenzschicht an der Oberfläche des Cerebellums. Vereinzelt findet man Sox2-exprimierende Astrozyten und Oligodendrozyten in der IGL und in der Molekularschicht, wo man sie durch immunhistochemische Färbungen mit den glialen Markern GFAP als Astrozyten oder Olig2 als Oligodendrozyten darstellen kann. Wie bereits erwähnt, kommt Sox2 im adulten Kleinhirn nicht in reifen Körnerzellen vor. In Abbildung 3.5-1 B ist eine immunfluoreszente Doppelfärbung von Sox2 und dem neuronalen Marker NeuN in allen Schichten des cerebellären Cortex gezeigt. Deutlich zu sehen ist, dass die Expression von Sox2 (rotes Fluorophor) und NeuN (grünes Fluorophor) niemals in der gleichen Zelle vorkommt.

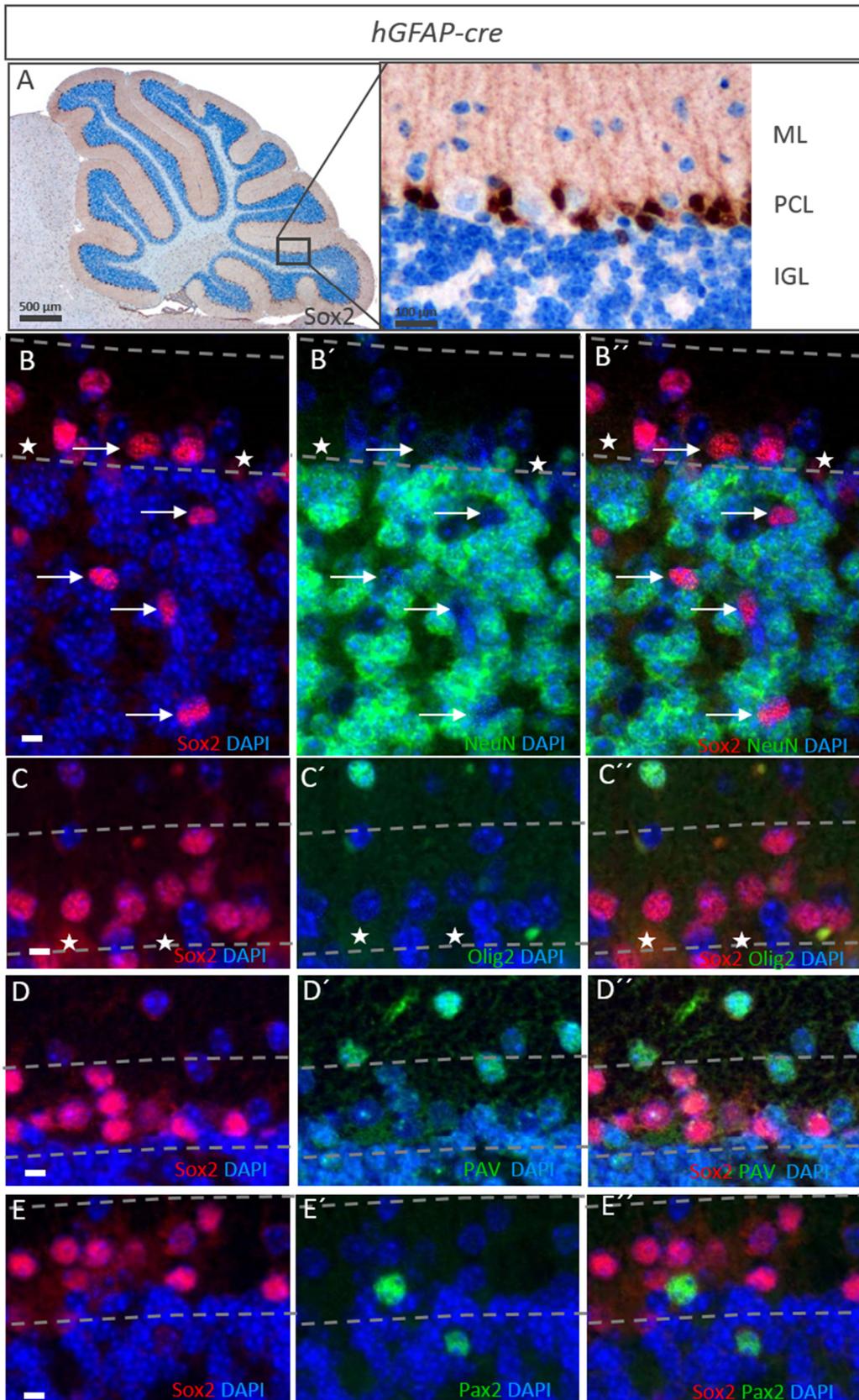


Abbildung 3.5-1 Charakterisierung von Sox2-positiven Zellen in der Purkinjezellschicht. Sox2-positive Zellen liegen im adulten cerebellären Cortex hauptsächlich in der Purkinjezellschicht als Bergmann Gliazellen vor (A). Sox2-positive Zellen exprimieren weder in der Purkinjezellschicht, noch in der inneren Körnerzellschicht NeuN (B), einen Marker für reife Körnerzellen. Sox2-Expression kommt in der Purkinjezellschicht auch nicht in Oligodendrozyten (Olig2, C), in cerebellären Interneuronen (Parvalbumin, D), oder in unreifen Interneuronen (Pax2, E) in der Purkinjezellschicht vor. Die Maßstäbe in B-E entsprechen 10 µm. IGL, innere Körnerzellschicht; ML, Molekularschicht; PCL, Purkinjezellschicht.

Außerdem kommt Sox2-Expression in der direkten Umgebung der Purkinjzellschicht speziell nie in Oligodendrozyten (Olig2; Abbildung 3.5-1 C), in reifen Interneuronen (Parvalbumin; Abbildung 3.5-1 D) oder in Vorläuferzellen inhibitorischer Interneurone (Pax2; Abbildung 3.5-1 E) vor.

Ein Protein, das in allen cerebellären Gliazellen exprimiert wird, ist S100. Es kann so zur einfachen Abgrenzung der reifen cerebellären Gliazellen gegenüber Neuronen und Interneuronen in und um die Purkinjzellschicht verwendet werden. Wie in Abbildung 3.5-2 A zu erkennen ist, kolokalisiert das Markerprotein S100 für reife Glia in der Purkinjzellschicht mit Sox2, das bekanntermaßen in Bergmann Gliazellen exprimiert wird. Was allerdings auffällt, ist, dass umgekehrt nicht alle Sox2-positiven Zellen der Purkinjzellschicht auch S100 exprimieren. In Abbildung 3.5-2 A ist Sox2-Expression durch immunhistochemische Doppelfluoreszenzfärbung mit einem roten Fluorophor markiert, während S100-positive Zellen grün markiert wurden. Deutlich sind mindestens zwei rote, also Sox2-positive Zellen zu erkennen, die nicht gleichzeitig auch grün, also S100-positiv sind. Ein ähnliches Bild ergibt sich bei Doppelfärbungen für Sox2 zusammen mit anderen Reifemarkern der Gliazellpopulation. Auch bei Kolokalisationsversuchen von Sox2 mit Cre-Rekombinase, was im *hGFAP-cre*-Mausmodell als nukleärer Ersatzmarker für *GFAP*-Expression verwendet werden kann (Abbildung 3.5-2 B), und BLBP, einem weiteren Reifemarkern für die Bergmann Glia (Abbildung 3.5-2 C), sind immer wieder Sox2-positive Zellen zu erkennen, die neben Sox2 keinen Marker für reife Gliazellen exprimieren. Alle diese Zellen sind in Abbildung 3.5-2 mit Pfeilen gekennzeichnet. Zur Orientierung wurde die Lage der Purkinjzellen in den Einzelbildern mit Sternchen markiert. Die Vermutung, dass es sich bei den undifferenzierten Zellen, von denen bis jetzt nur die Expression des potenten Stammzellmarkers Sox2 bekannt ist, um cerebelläre Vorläuferzellen handeln könnte, wird durch weitere Färbungen an adulten Kleinhirnen bekräftigt. An *Nestin-GFP*-Mäusen, bei denen GFP unter dem *Nestin*-Promotor exprimiert wird, kann somit noch ein Stammzellmarker neben Sox2 markiert werden. In Tripelfärbungen für Sox2 (rot), GFP für Nestin (grün) und den glialen Markern BLBP (blau; Abbildung 3.5-2 D) und S100 (blau; Abbildung 3.5-2 E) wird deutlich, dass es Sox2-positive Zellen in der Purkinjzellschicht gibt, die weder S100 noch BLBP exprimieren, dafür aber eine GFP-Färbung für *Nestin*-Expression zeigen. Somit konnte die Existenz von Zellen im adulten cerebellären Cortex nachgewiesen werden, die neben der Ko-Expression von zwei anerkannten Stammzellmarkern auch einen Mangel an Reifemarkern zeigen. In Abbildung 3.5-2 F ist ein weiterer Hinweis auf die

Vorläuferidentität einiger Sox2-positiver Zellen in der Purkinjezellschicht dargestellt. In Zellen, die Sox2 und GFP für Nestin exprimieren, kommt auch der Proliferationsmarker Ki67 vor. Das spricht für eine proliferative Vorläufurnatur dieser Sox2-positiven Population im adulten cerebellären Cortex.

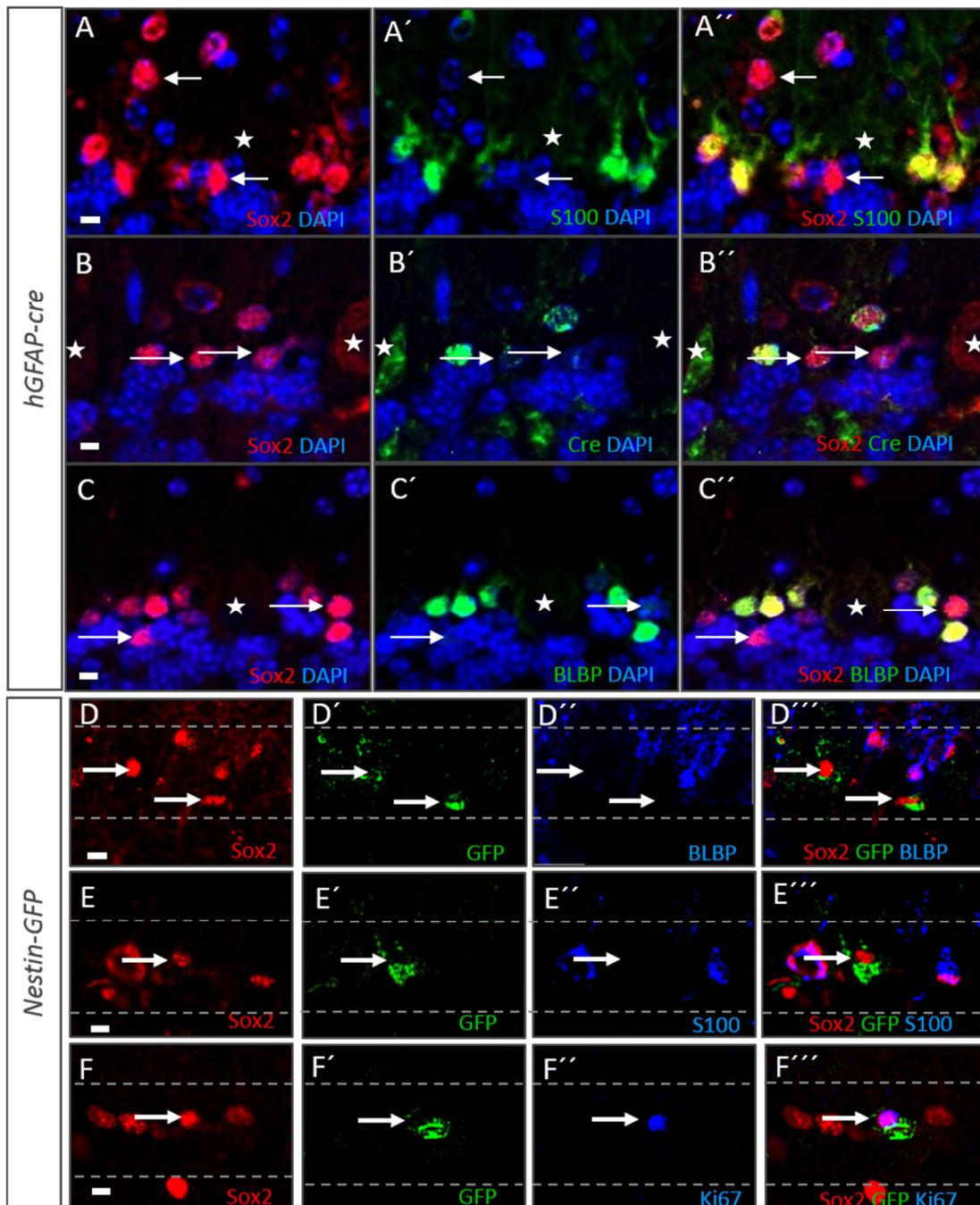


Abbildung 3.5-2 Sox2-Expression im adulten gesunden Cerebellum. Im normalen cerebellären Cortex wird Sox2 hauptsächlich in reifer Bergmann Glia exprimiert. Daher findet man in Ko-Färbungen auf Sox2 und Marker für reife Gliazellen wie S100 (A), Cre als Ersatz für GFAP (B) und BLBP (C) immer eine Vielzahl an doppelt markierten Zellen. Einzelne Zellen sind aber in allen Ko-Färbungen auf Sox2 und gliale Reifemarker nur Sox2-positiv (Pfeile in A-C). Diese Population zeigt zusätzlich Nestin-Expression, die durch Nestin-abhängige GFP-Expression nachgewiesen wurde, in Sox2-positiven Zellen ohne Reaktivität für gliale Reifemarker (D und E). Zusätzlich zeigen Sox2+ Nestin+ Zellen in der Purkinjezellschicht proliferatives Potential, wie die Tripelfärbung auf Sox2, GFP für Nestin, und Ki67 zeigt (F). Sternchen zeigen die Position der Purkinjezellen an. Gestrichelte Linien zeigen die Grenzen der Purkinjezellschicht. Die Maßstäbe in A-C stehen für 10 μ m, die Maßstäbe in D-F stehen für 25 μ m.

In Anlehnung an die Koexpression von Sox2, Nestin und Ki67 wurden weitere Färbungen auf Sox2 und Ki67 im reifen Kleinhirn ausgewertet. Hier zeigt sich eine klare Tendenz zur Kolo-kalisation von Ki67 mit Sox2 in vielen adulten Altersstufen (Abbildungen 3.5-3 B – D). Besonders interessant ist, dass Proliferation in der Purkinjzellschicht des adulten Kleinhirns in 79,9% der Fälle mit der Expression von Sox2 assoziiert ist (Abbildung 3.5-3 A). Zusätzlich konnte in Doppelfärbungen für Sox2 zusammen mit Doublecortin (DCX), einem Marker für neuronale Vorläuferzellen, eine regionale Assoziation dargestellt werden. In Abbildung 3.5-3 E ist eine Sox2-positive Zelle (rot) mit deutlich DCX-positivem Zytoplasma (grün) direkt am Rande der Purkinjzellschicht gezeigt.

Um die bisher unbekannteren undifferenzierten Sox2-positiven Zellen der Purkinjzellschicht im adulten cerebellären Cortex genauer zu charakterisieren und entwicklungsbiologisch zu verstehen, wurden auch in adulten Mäusen *fate-mapping* Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind im Folgenden dargestellt.

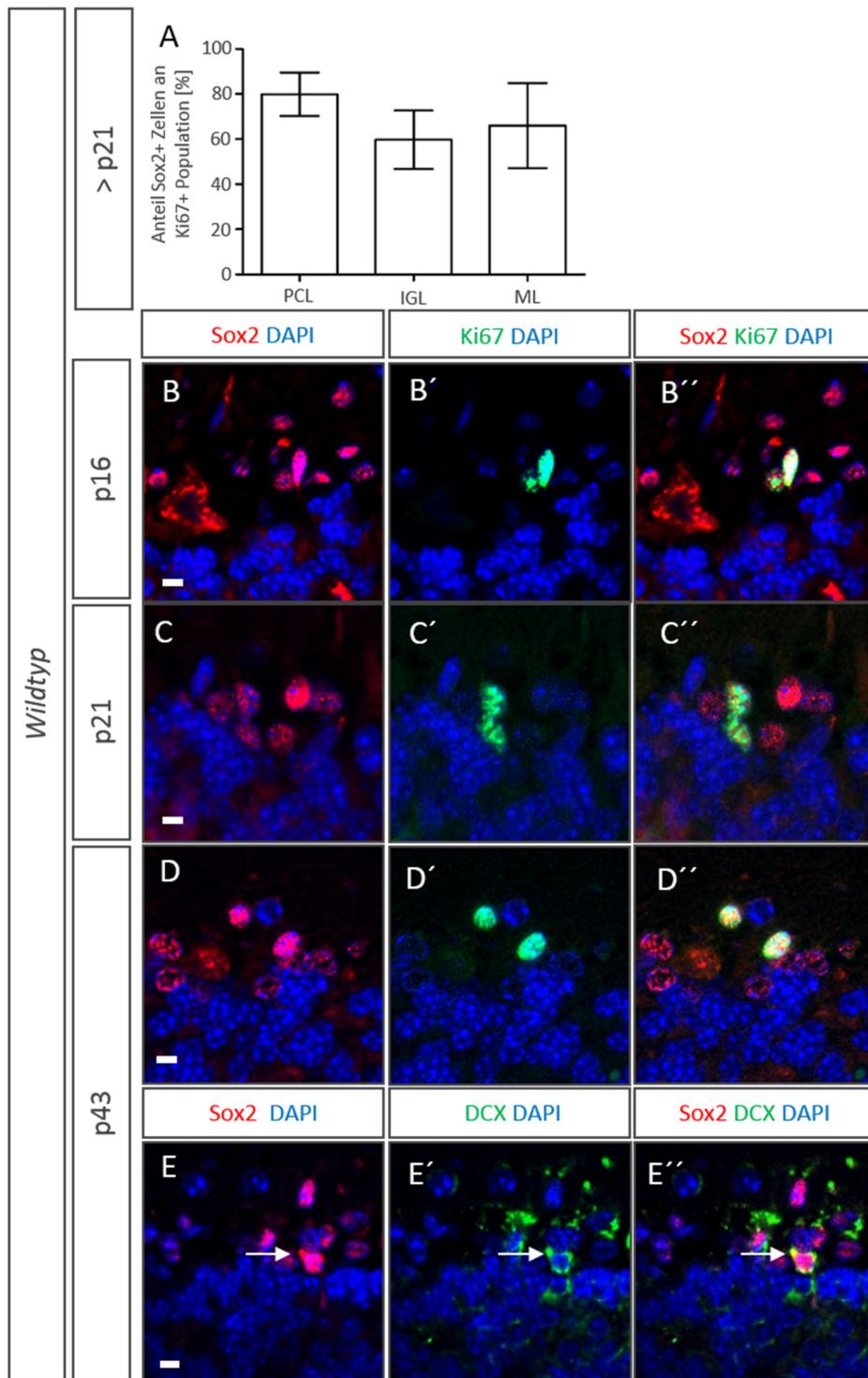


Abbildung 3.5-3 Proliferation im adulten cerebellären Cortex. Im normalen Cerebellum proliferieren nur sehr wenige Zellen. Allerdings ist proliferative Aktivität im adulten cerebellären Cortex häufig mit Expression von Sox2 assoziiert (A). Besonders in der Purkinjenzellschicht fällt diese Assoziation auf, die auch in Ko-Färbungen von Sox2 mit dem Proliferationsmarker Ki67 in verschiedenen Altersstufen nach dem Abschluss der cerebellären Entwicklung deutlich wird (B-C). Ko-Färbungen für Sox2 und den neuronalen Vorläufermarker Doublecortin (DCX) zeigen, dass eine Subpopulation von Sox2-positiven Zellen auch im adulten Cerebellum die Fähigkeit behält, neue Neurone zu generieren (Pfeil in E). Maßstäbe: 10µm. IGL, innere Körnerzellschicht; ML, Molekularschicht; PCL, Purkinjenzellschicht.

3.5.1.2 Fate-mapping

Nachdem die Funktion der zuvor beschriebenen undifferenzierten Sox2-positiven Zellen in der Purkinjezellschicht noch nicht untersucht wurde, sollen im Folgenden erste *fate-mapping* Studien zeigen, inwiefern diese Zellen an der Homöostase des adulten Cerebellums beteiligt sind.

Da seit längerem bekannt ist, dass radiale Gliazellen, wie die Bergmann Glia, bestimmte Charakteristika und Funktionen mit Stammzellen gemeinsam haben (Malatesta *et al.*, 2003), wurden entwicklungsbiologische Experimente zum neurogenen Potential der Sox2-positiven, aber doch nicht glial differenzierten Zellen inmitten der Bergmann Glia durchgeführt. Mit dem bereits bekannten *Sox2-creER^{T2}::tdTomato^{F/+}*-Reportersystem wurden die Sox2-positiven Zellpopulationen im Kleinhirn auf eventuelle Nachkommen untersucht.

Sox2-creER^{T2}::tdTomato^{F/+}-Tiere bekamen nach abgeschlossener Kleinhirnentwicklung Injektionen mit Tamoxifen und BrdU. Tamoxifen aktiviert hier das für die Expression von RFP kodierende Reporterallel in Zellen mit aktivem Sox2-Promotor. Die BrdU-Injektion dient dem Nachweis der proliferativen Eigenschaften von entstandenen Zellen. BrdU wird in der S-Phase der Mitose statt des Nukleosids Thymidin in die replizierende DNS eingebaut und ist anschließend, abhängig von der Zellteilungsrate, über mehrere Wochen bis zu einem Jahr nachweisbar (Kempermann *et al.*, 2003). Ob Sox2-positive Zellen auch postnatal noch das Potential besitzen Nachkommen zu produzieren, kann so eindeutig geklärt werden.

In Vorversuchen an Wildtyp-Mäusen konnte das BrdU-Protokoll etabliert werden. Mäusen wurde an p21 BrdU injiziert und diese dann zu definierten Zeitpunkten (4 Stunden, 24 Stunden, 60 Tage) aus dem Versuch entnommen und histologisch aufgearbeitet. Hier konnte bestätigt werden, was in Proliferationsfärbungen mit Ki67 schon gezeigt wurde. Akut proliferativ sind nach 4 und 24 Stunden im cerebellären Cortex fast ausschließlich Sox2-positive Zellen und keine reifen Neurone oder Gliazellen, wie in Abbildung 3.5-4 durch Ko-Färbungen von BrdU mit Sox2 (Abbildung 3.5-4 A und D), S100 (Abbildung 3.5-4 B und E) und NeuN (Abbildung 3.5-4 C und F) gezeigt wird. Nach 60 Tagen zeigt sich ein anderes Bild, bei dem BrdU-Inkorporation kaum noch in Sox2-positiven Zellen nachgewiesen werden kann, dafür aber umso mehr in der NeuN-positiven Körnerzellpopulation (Abbildung 3.5-4 G und I). In Gliazellen konnte zu keinem Zeitpunkt BrdU detektiert werden (Abbildung 3.5-4 B, E, H).

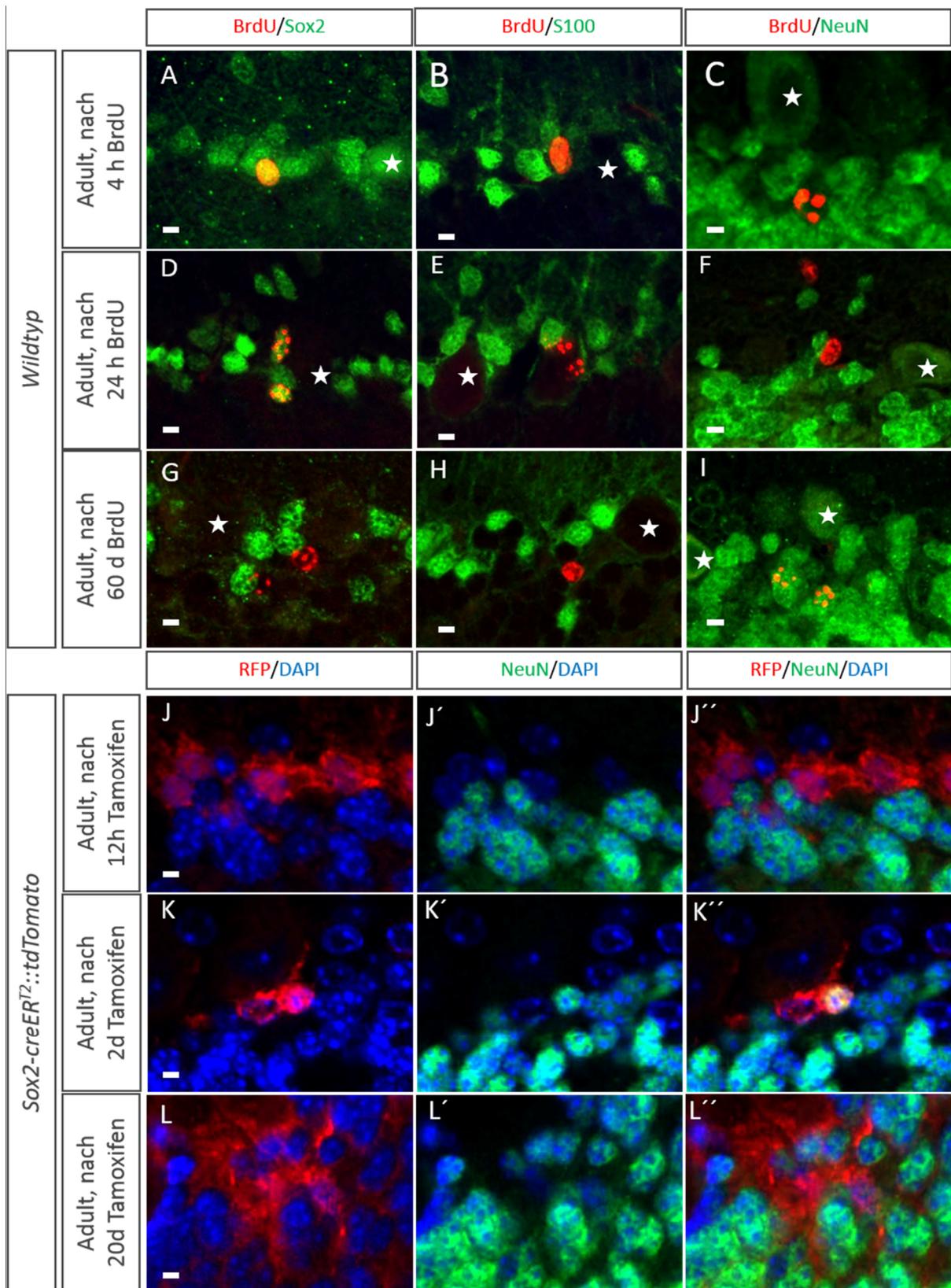


Abbildung 3.5-4 Sox2-positive Zellen als Ursprung von adulter Neurogenese im Cerebellum. Bei zeitlich gestaffelten BrdU-Puls Versuchen ist nach 4 h BrdU (rotes Fluorophor) bevorzugt in Sox2-positive Zellen inkorporiert (A), nie in S100-positive Bergmann Glia (B) und nie in reifen Körnerzellen (C). In Tieren, die 24 h nach dem BrdU-Puls getötet wurden, wurde mehr BrdU in Sox2-positiven Zellen in der Purkinjezellschicht nachgewiesen (D), allerdings noch immer kein S100 (E), oder NeuN (F). Tiere, die 60 Tage nach dem BrdU-Puls getötet wurden, zeigen kaum noch BrdU in Sox2-positiven Zellen (G), wiederum kein BrdU-Signal in S100-positiven Gliazellen (H), dafür eine Vielzahl von BrdU-positiven neuronal differenzierten Zellen in der inneren Körnerzellschicht (I). Ein analoges Versuchsprotokoll mit dem *fate-mapping* System zeigt, dass nach 12 h ausschließlich nicht-neuronal differenzierte Zellen rekombiniert sind (RFP-rot; J). Zwei Tage nach der Induktion mit Tamoxifen sind bereits rekombinierte Zellen am Rand der IGL nachweisbar, die neuronale Differenzierung aufweisen (NeuN-grün, K). 20 Tage nach Induktion können ganze Gruppen von NeuN-positiven rekombinierten Zellen in der IGL nachgewiesen werden (L). Sternchen zeigen die Position der Purkinjezellen. Die Maßstäbe stehen für 10µm. d, Tage; h, Stunden.

Erste Versuche mit dem *Sox2-creER^{T2}::tdTomato^{Fl/+}-fate-mapping* Modellsystem und einem analogen Versuchsprotokoll erbrachten ähnliche Ergebnisse. Zwölf Stunden nach der Induktion konnte RFP-Detektion noch mit der Expression von *Sox2* gleichgesetzt werden. Rekombination und somit Expression des Reporterproteins konnte nur in Zellen nachgewiesen werden, in denen anerkanntermaßen der *Sox2*-Promotor aktiv ist, wie in der Bergmann Glia (Abbildung 3.5-4 J). Zwei Tage nach Induktion mit Tamoxifen konnte erstmals Rekombination in NeuN-positiven Zellen detektiert werden (Abbildung 3.5-4 K). Der in Abbildung 3.5-4 K zu sehende lokale Zusammenhang der RFP-positiven, daher vermutlich primär rekombinierten *Sox2*-positiven Zelle mit der RFP- und NeuN-positiven Körnerzelle konnte als erster Hinweis auf adulte Neurogenese im murinen Kleinhirn gewertet werden. 20 Tage nach der Induktion mit Tamoxifen sind bereits ganze Ansammlungen von sekundär rekombinierten Körnerzellen mit zytoplasmatischer RFP-Markierung und nukleärem NeuN, in der IGL zu sehen (Abbildung 3.5-4 L).

Um eindeutig nachzuweisen, dass es sich hierbei um eine expansive Population mit *Sox2*-positiven Vorläufern als Ursprungszelle handelt, wurde das *fate-mapping* System mit dem BrdU-Assay kombiniert. *Sox2-creER^{T2}::tdTomato^{Fl/+}*-Mäusen wurde ab p25 jeweils eine einzelne Dosis Tamoxifen und BrdU verabreicht und die Tiere anschließend wieder zu definierten Zeitpunkten aus dem Versuch entnommen. Zur Kontrolle wurde wiederum sechs Stunden nach der Injektion von BrdU und Tamoxifen ein Tier aus dem Versuch genommen. Hier konnte die Expression des Reporters RFP nur in *Sox2*-positiven Zellen nachgewiesen werden, während zusätzlich die Inkorporation von BrdU wieder nur auf *Sox2*-positive Zellen in der Purkinjzellschicht beschränkt ist. Exemplarisch ist in Abbildung 3.5-5 A eine Tripelfärbung auf *Sox2* (grün), RFP (rot) und BrdU (blau) zu sehen. Bereits zwei Tage nach den Injektionen konnten bei einem Tier, das an p25 Tamoxifen und BrdU bekommen hatte, mehrere Zellen mit neuronaler Differenzierung nachgewiesen werden, die BrdU inkorporiert hatten, sich also in den vergangenen zwei Tagen geteilt haben mussten. Gleichzeitig waren diese Zellen für die *RFP*-Expression rekombiniert, waren also seit der Induktion aus einer *Sox2*-positiven Population entstanden (Abbildung 3.5-5 B). In der konfokalen Rekonstruktion der Seitenansichten der Zelle konnte nachgewiesen werden, dass alle drei Markierungen tatsächlich in derselben Zelle sind (Abbildung 3.5-5 C).

Dies ist der erste Beweis für adulte Neurogenese im murinen Kleinhirn.

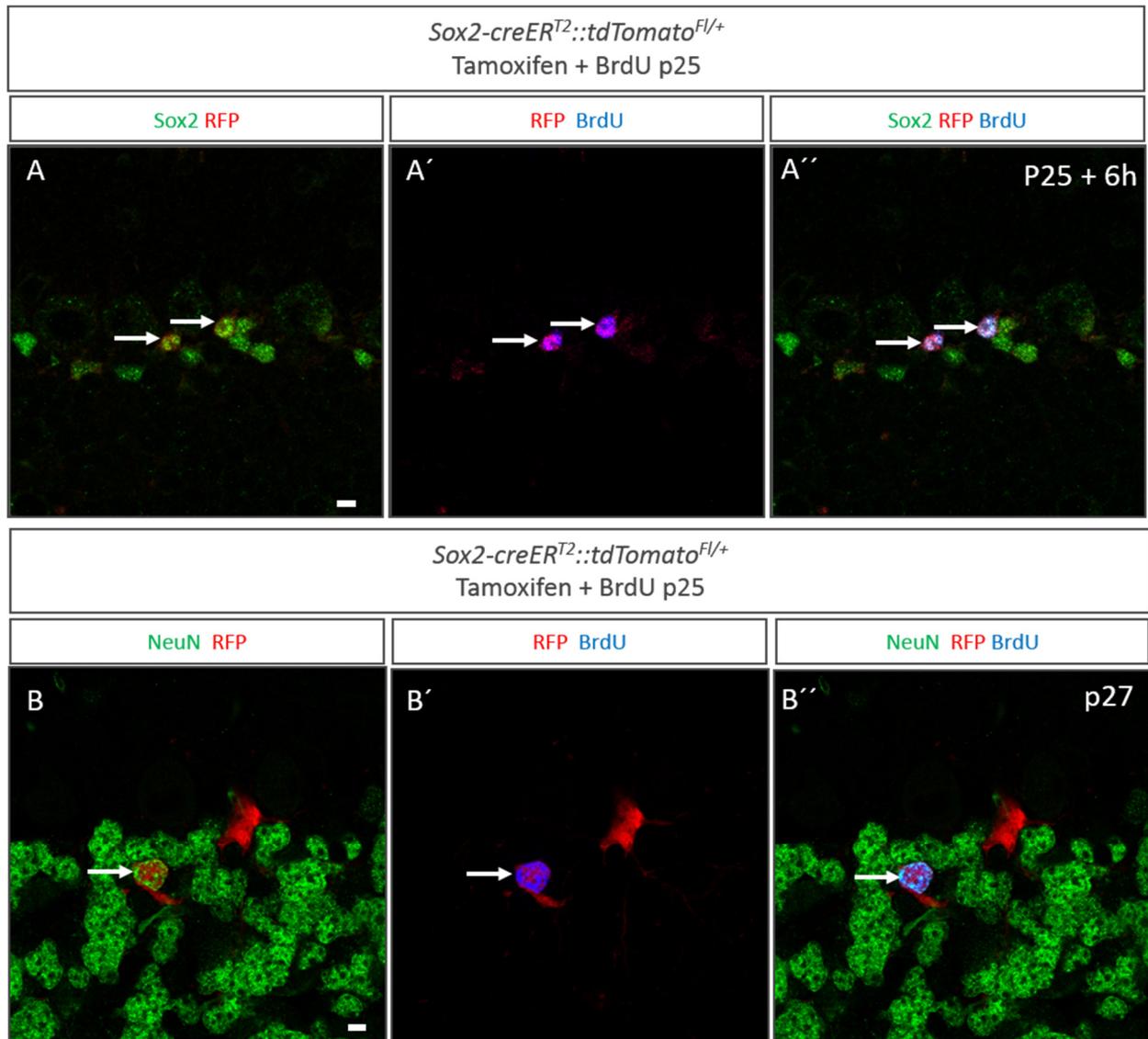
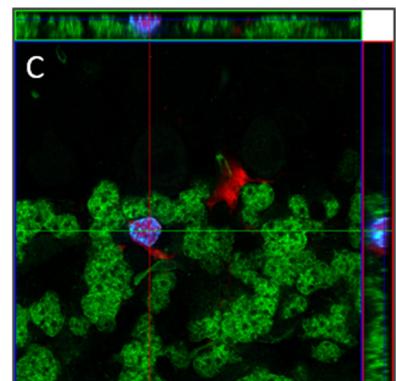


Abbildung 3.5-5 Neurogenese aus Sox2-positiven Stammzellen des Cerebellums. 6h nach Induktion mit Tamoxifen sind nur Zellen mit akut aktivem Sox2-Promotor (Sox2, grün) rekombiniert (rot) und haben BrdU-inkorporiert (blau; Pfeile in A). 2 Tage nach der Induktion (B) sind rekombinierte Zellen (RFP, rot) am Rande der Purkinjezellschicht vorhanden, die neuronal differenziert sind (NeuN, grün). Zusätzlich kann in solchen Zellen auch BrdU-Inkorporation nachgewiesen werden (BrdU, blau), was bedeutet, dass diese Körnerzelle seit der Induktion durch Proliferation aus einer Sox2-positiven Zelle entstanden sein muss. Dass es sich bei dieser Tripelmarkierung jeweils um ein Signal in derselben Zelle handelt wird in der konfokalen Rekonstruktion der Seitenansichten der Zelle deutlich (C). Maßstäbe: 10 µm.



3.5.2 SOX2-positive Vorläufer im humanen cerebellären Cortex

Um die Relevanz des Befundes der adulten Neurogenese im murinen Kleinhirn zu verdeutlichen, sollte die *Sox2*-positive Population mit Stammzellcharakter auch im humanen Kleinhirn identifiziert werden.

3.5.2.1 Normalgewebe

In *post mortem* Gewebe von Patienten ohne pathologischen Befund im Kleinhirn (Abbildung 3.5-6 A) wurden Doppelfärbungen analog den im Mausgehirn verwendeten Markern angefertigt. Auch hier konnte die zuvor in der Maus beschriebene Population von undifferenzierten *Sox2*-positiven Zellen in der Purkinjzellschicht nachgewiesen werden, wie in Abbildung 3.5-6 B in Doppelfärbungen auf SOX2 und den glialen Marker S100 zu sehen ist. Die Pfeile deuten auf SOX2-positive Zellen, die trotz ihrer regionalen Zugehörigkeit zur Bergmann Glia keine Reifemarker der glialen Population exprimieren.

3.5.2.2 Infarktgewebe

In humanem Kleinhirngewebe mit neuropathologisch diagnostiziertem Infarkt im Cerebellum (exemplarisch in Abbildung 3.5-6 C) wurden die gleichen Doppelfärbungen, wie für das Kontrollgewebe beschrieben wieder durchgeführt, um eventuelle Veränderungen in der Struktur, Verteilung oder Anzahl der SOX2-positiven undifferenzierten Zellen im cerebellären Cortex zu untersuchen. Als Folge von Infarkten im ZNS sind in unmittelbarer Nachbarschaft häufig reaktive Gliosen zu beobachten. Im Cerebellum findet man speziell die reaktive Bergmann Gliose, die durch eine starke Expansion der Bergmann Glia Population charakterisiert ist. Es galt hier zu untersuchen, welchen Anteil die SOX2-positiven und nicht anderweitig differenzierten Zellen an der Expansion der Gliazellen haben. Durch erneute Doppelfärbungen auf SOX2 und S100 im pathologischen Gewebe konnte so ein signifikanter Anstieg der Anzahl an SOX2-positiven S100-negativen Zellen, im Vergleich zum Kontrollgewebe ohne Infarkt nachgewiesen werden ($p = 0,003$; Abbildung 3.5-6 E, Pfeile in D). Dies ist ein erster Nachweis für das reaktive Potential von SOX2-positiven Vorläuferzellen auch im humanen System.

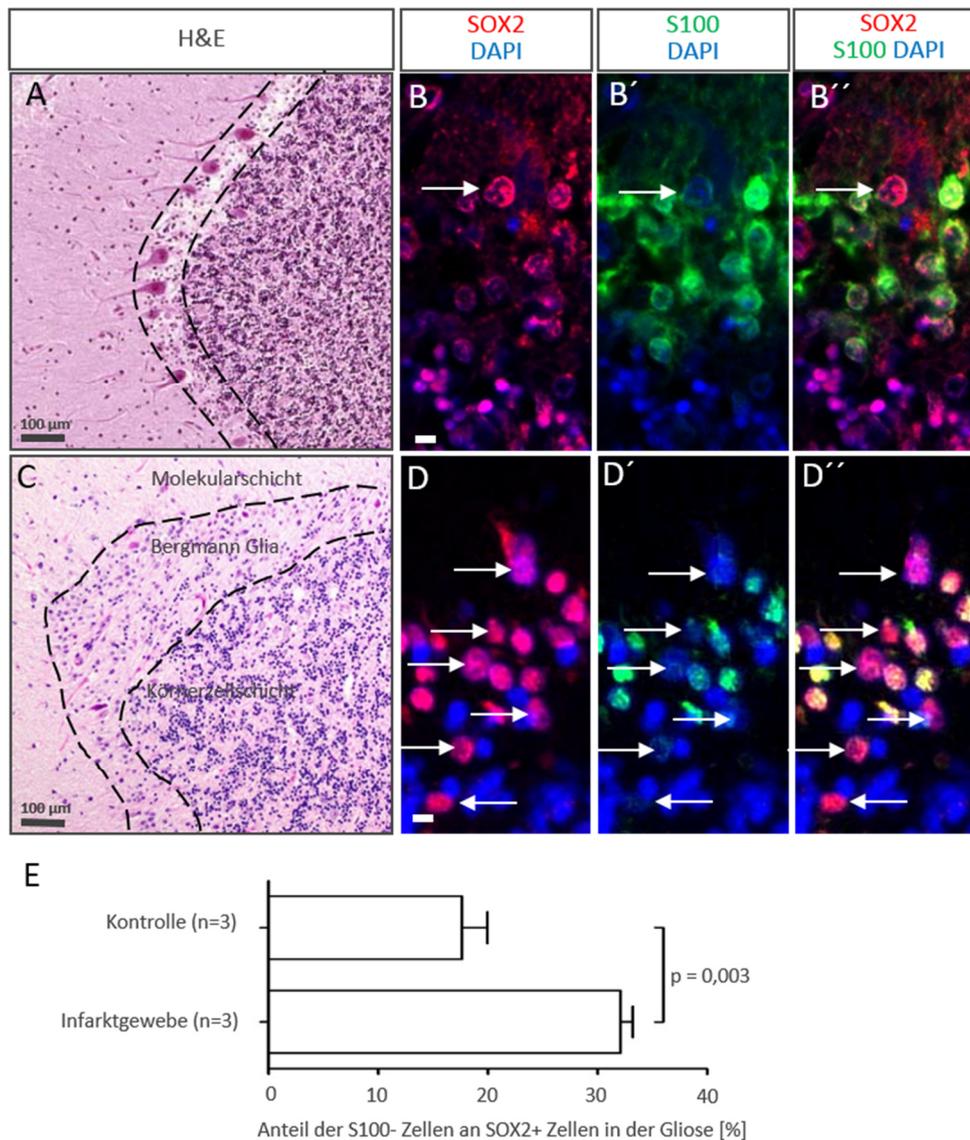


Abbildung 3.5-6 Proliferation von SOX2-positiven/S100-negativen Zellen in der Purkinjezellschicht nach cerebellärem Infarkt. In humanem cerebellärem Gewebe (A) konnten ebenfalls SOX2+ S100- Zellen in der Purkinjezellschicht nachgewiesen werden (B). Auf Verletzung des Gewebes hin, zum Beispiel durch cerebellären Infarkt, bildet sich häufig eine reaktive Glia (Bergmann Glia; C), die durch eine massive Expansion der Bergmann Glia gekennzeichnet ist. Diese Expansion geht hauptsächlich von SOX2+ S100- Zellen aus (D), deren Anteil an der Population differenzierter S100+ Gliazellen signifikant zunimmt (E). Quantifiziert wurde die Anzahl der S100- Zellen in der gesamten SOX2+ Population im Bereich der Glia (gestrichelte Linie in C). Maßstäbe: 10 μ m.

Die Entdeckung, dass reaktive Gliosen im Kleinhirn nicht von reifer Glia allein vermittelt wird, sondern von undifferenzierten SOX2-positiven Zellen auszugehen scheint, ist vollkommen neu. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob mit einem möglichen neurogenen Potential dieser Zellen, wie es in dieser Arbeit im adulten murinen Cerebellum gezeigt werden konnte, regenerative Therapien bei cerebellären Infarkten als mögliche Behandlung in Frage kommen.

4. Diskussion

4.1 SOX2 IN DER ENTSTEHUNG VON MEDULLOBLASTOMEN

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Medulloblastome in Bezug auf die Expression von *SOX2* ein distinktes Expressionsprofil über die verschiedenen Subgruppen und in unterschiedlichen Altersgruppen aufweisen. Diese Ergebnisse passen zu den Daten, die Northcott und Kollegen vor kurzem veröffentlicht haben. Es wird angenommen, dass die infantilen und adulten Fälle innerhalb der SHH-Subgruppe von Medulloblastomen molekular und klinisch unterschiedliche Charakteristika aufweisen (Northcott *et al.*, 2011a). Der Fund eines Markers, der wie *SOX2* zuverlässig histologische und molekulare Subgruppen verbindet und dabei auch noch eine altersspezifische Verteilung aufweist, kann für die diagnostische Neuropathologie sehr wertvoll sein. So ließen beispielsweise Medulloblastome des desmoplastischen Subtyps mit starker *SOX2*-Reaktivität auf eine Zugehörigkeit zur SHH-Subgruppe schließen, ohne zusätzliche globale Expressionsanalysen durchführen zu müssen. Ebenso könnte bei älteren Patienten mit starker immunhistochemischer *SOX2*-Reaktivität auch bei nicht eindeutiger Morphologie auf einen desmoplastischen Subtyp geschlossen werden.

Die distinkte Expression von *SOX2* in bestimmten Subgruppen und Altersgruppen lässt auf eine nicht zufällige Verteilung in Medulloblastomen schließen. Ob die unterschiedlichen Expressionsprofile von *SOX2* innerhalb der SHH-Subgruppe auch auf unterschiedliche zelluläre Ursprungspopulationen der infantilen und adulten Tumoren schließen lassen, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Die Bedeutung von *Sox2* als wichtiger Stammzellfaktor und weit verbreiteter Marker in Tumoren des ZNS ist bereits aus anderen System, wie Glioblastomen und Oligodendrogliomen, bekannt und wird auch aktuell weiter erforscht (Annovazzi *et al.*, 2011, Amini *et al.*, 2014, Favaro *et al.*, 2014). Während der Entwicklung wird *Sox2* in allen Keimzonen des Gehirns stark exprimiert (Bergsland *et al.*, 2011). Zu den eindrücklichen Ergebnissen aus den Untersuchungen von humanen Medulloblastomproben auf *SOX2* kommt, dass Medulloblastomen embryonal ihren Ursprung in Vorläuferzellen der cerebellären Körnerzellen haben können. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung des *Shh*-Signalweges in

Körnerzellvorläufern der rhombischen Lippe und der äußeren Körnerzellschicht zur Entstehung von Shh-assoziierten Medulloblastomen führen kann (Schüller *et al.*, 2008). Die Expression von *Sox2* in diesen Körnerzellvorläufern ist aufgrund deren undifferenzierten Status wahrscheinlich und sollte deswegen in dieser Arbeit untersucht werden. Die Expression von *Sox2* in Körnerzellvorläufern konnte nachgewiesen werden und weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von *Sox2* lediglich auf einen kurzen Zeitraum während der cerebellären Entwicklung begrenzt ist. Der Anteil dieser kleinen und nur kurz vorhandenen Population am Aufbau des adulten Kleinhirns sollte im Hinblick auf eventuelle Aussagen über die Tumorlokalisierung untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass *Sox2*-positive Körnerzellvorläufer nach der gleichen zeitlich-örtlichen Achse zum rostro-caudalen Aufbau des Cerebellums beitragen wie auch *Sox2*-negative Körnerzellvorläufer (Machold *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2005). Es muss natürlich beachtet werden, dass mit den *fate-mapping* Experimenten unter dem *Sox2*-Promotor nicht nur Zellen der rhombischen Lippe getroffen werden, sondern auch die große Population der Ventrikulärzone, die dann zum Aufbau von Purkinjezellschicht, Bergmann Glia, Molekularschicht und weißer Substanz beitragen (Sudarov *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass in der weißen Substanz des frühen postnatalen Kleinhirns *Sox2*-positive CD133-positive Stammzellen liegen, die das Potential haben, Neurosphären zu bilden, deren Funktion im normalen Cerebellum bis heute aber nicht genau geklärt ist (Lee *et al.*, 2005). Unter Umständen könnten die Nachkommen der kleinen Population von *Sox2*-positiven Körnerzellvorläufern der rhombischen Lippe auch ein größeres Potential besitzen, als schlicht zu reifen Körnerzellen zu differenzieren. Um zu überprüfen, welchen Einfluss *Sox2*-exprimierende Zellen auf die Entwicklung des Kleinhirns haben, wurden die *fate-mapping* Experimente auf frühe postnatale Stadien ausgeweitet. So konnte gezeigt werden, dass der *Sox2*-Promotor weiterhin in neuronalen Vorläufern der äußeren Körnerzellschicht aktiv ist, auch wenn kein nachweisbares Protein mehr produziert wird. Mindestens bis p3 sind noch Zellen mit einer gewissen Aktivität des *Sox2*-Promotors in der Keimzone des postnatalen Kleinhirns vorhanden. Das Herunterfahren der Promotoraktivität ist bei Stammzellfaktoren ein verbreitetes Phänomen, das den reaktiven Eigenschaften von Stammzellen geschuldet ist (Hirabayashi *et al.*, 2010). In einer Subpopulation im postnatalen Kleinhirn ist also latent der *Sox2*-Promotor aktiv und damit unter Umständen weiterhin angreifbar für tumorauslösende, Shh-aktivierende Mutationen. Das onkogene Potential von *Sox2* in der Entwicklung von

Medulloblastomen sowie funktionelle Eigenschaften von Sox2-positiven Zellen im Tumor sollten daher im nächsten Schritt untersucht werden.

Im Mausmodell für Medulloblastome können die Befunde über die Sox2-Expression im Shh-assoziierten Medulloblastom aus dem humanen System bestätigt werden (Kapitel 3.1). Obwohl von Sutter und Kollegen gezeigt wurde, dass Medulloblastome aus Körnerzellvorläufern tendenziell keine Stammzellmarker wie *Nestin*, *Sox9* oder *Sox2* exprimieren (Sutter *et al.*, 2010), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Sox2 sehr wohl in Tumoren exprimiert wird, die auf die Vorläufer der Körnerzelllinie zurückgehen. Ein klassisches Beispiel sind Tumoren, die aus dem Modellsystem für Shh-assoziierte Medulloblastome hervorgehen und, wie im Menschen auch, eine vergleichsweise hohe Immunopositivität für Sox2 aufweisen. Im verwendeten *hGFAP-cre::SmoM2^{Fl/+}*-Modell für Shh-assoziierte Medulloblastome konnte dementsprechend in den entstehenden Tumoren eine starke Immunoreaktivität für Sox2 nachgewiesen werden. Sox2-positive Zellen liegen verstreut im ganzen Tumor, wobei mit zunehmendem Alter der Anteil an Sox2-positiven Zellen an der gesamten Tumormasse abnimmt. Der abnehmende Anteil an Sox2-exprimierenden Zellen im Tumor könnte einerseits durch ein sukzessives Abschalten des Sox2-Promotors nach der initialen Entstehung des Tumors und daher für eine eher initiierende Funktion von Sox2-positiven Zellen bei der Tumorentwicklung erklärt werden. Andererseits spricht die anteilmäßige Abnahme der Sox2-Expression im Tumor für eine zahlenmäßig konstant angelegte Population von Vorläuferzellen, die durch ihre weiterhin undifferenzierten Eigenschaften an der Erhaltung des Tumors beteiligt sind. Für ersteres sprechen Ergebnisse von Oliver und Kollegen, die zeigen konnte, dass die Expression von Sox2 in präneoplastischen Läsionen in einem ähnlichen Modell für Shh-assoziierte Medulloblastome stärker ist als in Tumoren (Oliver *et al.*, 2005). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Sox2 im Tumor mit einem Marker für neuronale Vorläufer (Tuj-1) kolokalisiert und es einen regionalen Zusammenhang von Sox2-positiven Zellen und unreifen Neuronen (DCX) im Tumor gibt (Abbildung 6.3-1). Eine zusätzliche tumorerhaltende Natur der Sox2-positiven Zellen kann daher nicht vollends ausgeschlossen werden und könnte durch Untersuchungen in einem induzierbaren *fate-mapping* System im Tumor aufgeklärt werden.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass aus Sox2-positiven Vorläufern allein Tumoren entstehen können. In der Zeitspanne, während der in der embryonalen Kleinhirnentwicklung in der rhombischen Lippe Sox2 exprimiert wird, können durch zeitpunktspezifische Aktivierung des Shh-Signalweges mit Tamoxifen in nahezu 100% der Fälle Tumoren induziert werden. Eine Tumorentstehung in lediglich 40% der Fälle bei einer frühen Induktion an e12.5 ist wahrscheinlich auf die geringe Anzahl der rekombinierbaren Sox2-positiven Zellen zu diesem Zeitpunkt zurückzuführen. Wie in Abbildung 3.1-2 A bis C in immunhistochemischen Färbungen gezeigt ist, beginnt eine zuverlässige Expression von Sox2 in der rhombischen Lippe erst um e13.5, was bei früheren Induktionen zu einer geringeren Rekombinationseffizienz führt. Ähnliches ist bei späteren Induktionen ab e16.5 wahrscheinlich. Es konnte immunhistochemisch an e18.5 keine Expression von Sox2 in der äußeren Körnerzellschicht mehr nachgewiesen werden, was nahelegt, dass die Rekombinationsrate nicht mehr bei 100% liegt. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor bei embryonalen Induktionen ist die Zugänglichkeit von Tamoxifen bei indirekter Gabe durch Injektion der Mutter. Allerdings konnten trotz Sox2-Negativität in der Immunhistochemie in Zellen der äußeren Körnerzellschicht noch bis p3 zuverlässig und bis p6 noch unregelmäßig Tumoren aus Sox2-positiven Zellen erzeugt werden. Es konnte bereits durch frühe postnatale *fate-mapping* Experimente gezeigt werden, dass der Sox2-Promotor in neuronalen Vorläufern der äußeren Körnerzellschicht weiterhin aktiv ist, auch wenn kein nachweisbares Protein mehr produziert wird. Der Zeitraum für den die postnatale Aktivität des Sox2-Promotors mittels *fate-mapping* nachgewiesen wurde, deckt sich mit dem Zeitraum, in dem postnatal noch Tumoren aus Sox2-exprimierenden Zellen erzeugt werden können. Hier kommt vermutlich zusätzlich der Vorteil einer direkten Induktion des Tieres mit Tamoxifen zum Tragen, was die Rekombinationseffizienz erhöht. Es ist vereinzelt möglich in adulten Tieren Tumoren aus Sox2-positiven Zellen zu erzeugen, wenn auch nicht mit der gleichen Konsistenz, wie bei frühen Induktionen. Vereinzelt entwickelten auch Tiere einen Tumor, die primär kein Tamoxifen erhalten hatten. Möglicherweise ist dies aber ein sekundärer Effekt, der bei gemeinsamer Haltung von Geschwistern in einem Käfig auftritt, wenn einzelne Geschwister induziert werden und andere nicht. Bei der gegenseitigen Fellpflege zum Beispiel könnten Reste der Tamoxifenlösung von Geschwistern oral aufgenommen werden und so auch zu einer Rekombination von Sox2-positiven Zellen führen. Orale Induktion mittels Tamoxifen ist prinzipiell möglich (Kiermayer *et al.*, 2007). Tumoren, die ohne aktive Induktion mit Tamoxifen

entstanden sind, wurden nicht in die Auswertung aufgenommen, da hier der genaue Zeitpunkt der Aktivierung der *SmoM2*-Mutation nicht genau bestimmt werden konnte. Trotzdem sind auch diese unspezifisch entstandenen Tumoren aus Sox2-positiven Zellen hervorgegangen, da nur in Zellen mit aktivem *Sox2*-Promotor die Cre-Rekombinase exprimiert wird. Unter bestimmten Umständen könnte die Rekombinase ohne Bindung an Tamoxifen in den Kern wandern und zur Expression der *SmoM2*-Mutation führen. Bei der endgültigen Auswertung aller Daten ergibt sich ein eindeutiger Trend in Richtung einer möglichen Entstehung adulter Tumoren aus Sox2-positiven Zellen. Es bleibt festzuhalten, dass die Anzahl der aus Sox2-positiven Zellen entstandenen Tumoren stark vom Zeitpunkt der Induktion abhängt. Es sollte in zukünftigen Studien untersucht werden, ob die Expression von *Sox2* vielleicht alleine nicht ausreicht, um eine Zelle des adulten Kleinhirns zuverlässig angreifbar für Mutationen des Shh-Signalweges zu machen und so zu Tumoren zu führen. Obwohl es scheint, dass im reifen Zustand kaum noch Induktion von Tumoren aus Sox2-positiven Zellen möglich ist, sollte doch diskutiert werden, ob die Altersverteilung der induzierten Tumoren auf funktionelle Parallelen mit der im Anhang dargestellten Altersverteilung von humanen desmoplastischen und extensiv-nodulären Medulloblastomen schließen lässt, die ebenfalls für SHH-abhängige Medulloblastome gezeigt wurde (Northcott *et al.*, 2011a). Weitere Analysen an Proben von humanen adulten Medulloblastomen werden nötig sein, um eventuelle Partner von *SOX2* zu identifizieren, die die Entstehung von adulten Medulloblastomen begünstigen. Ein weiterer Hinweis auf die essentielle Rolle von *SOX2* in SHH-assoziierten Medulloblastomen ist, dass es auch auf molekularer Ebene eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von *SOX2* und *SHH* in SHH-assoziierten Medulloblastomen gibt. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Shh-Signalweg und *Sox2* wurde für die Entwicklung des Hippocampus bereits beschrieben (Favaro *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit werden häufig Parallelen zwischen dem Cerebellum und dem Hippocampus gezogen, vor allem was relevante Signalwege und Entwicklungsprozesse angeht. Aufgrund des ähnlichen zellulären Aufbaus mit Körnerzellen, radialer Glia und Sox2-positiven Vorläuferzellen (Barry *et al.*, 2008, Favaro *et al.*, 2009, Lugert *et al.*, 2010) ist es sinnvoll Hinweise aus dem hippocampalen System im Hinblick auf die Entwicklung des Cerebellums und der Entstehung von SHH-assoziierten Medulloblastomen nicht aus den Augen zu verlieren.

Um eine Aussage über den Nutzen von Sox2 als Angriffspunkt für wachstumsregulierende Substanzen zu machen, ist es wichtig, den Einfluss von Veränderungen in der

Expressionsstärke von *Sox2* in der Kleinhirn- und Tumorentwicklung zu kennen. Weiterhin sollte mit Bedacht auf die distinkte Altersverteilung der Expression von *SOX2* in humanen Medulloblastomen bedacht werden, dass ein therapeutischer Angriff an dem Transkriptionsfaktor unter Umständen nur in einer bestimmten Altersgruppe erfolgversprechend sein könnte.

Die Versuche zum frühen Verlust von *Sox2* in Körnerzellvorläufern haben gezeigt, dass *Sox2* offenbar nicht unmittelbar notwendig für die normale Entwicklung des Kleinhirns oder für die Entstehung von frühen *Shh*-assoziierten Medulloblastomen zu sein scheint. Dieser Befund konnte mit Kompensationsmechanismen durch redundant exprimierte frühe *Sox*-Gene erklärt werden. Die Expression von *Sox3* wird bei frühem Verlust von *Sox2* hochreguliert und könnte bedeuten, dass *Sox3* Funktionen von *Sox2* übernimmt und so für den Verlust kompensiert. Dieser Fund wird durch die Korrelationsanalysen zwischen der Expression von *Sox2* und *Sox3* im Tumorgewebe zusätzlich gestützt. Es ist bereits bekannt, dass *Sox*-Gene untereinander Redundanz in Expression und Funktion zeigen (Archer *et al.*, 2011) und im Besonderen, dass *Sox3* in *Sox2*-defizienten Zellen verstärkt exprimiert wird (Miyagi *et al.*, 2009). Interessant für die Untersuchungen in dieser Arbeit war, dass diese Kompensation an p0 am stärksten war, bis zur Messung an p6 leicht nachließ und an p15 nicht mehr nachweisbar war. Das ist nicht erstaunlich, da die Expression von *Sox*-Genen als frühe Entwicklungsgene mit dem Alter nachlässt und so kompensatorische Mechanismen wegfallen. Allerdings könnte das bedeuten, dass eine akute Veränderung in der Expression von *Sox2* in postnatalen Körnerzellvorläufern oder reifen Körnerzellen für die Ausbildung und die Entwicklung von *Shh*-assoziierten Medulloblastomen entscheidend sein könnte. Das würde sich mit unseren Ergebnissen aus den Untersuchungen an humanen Medulloblastomproben decken, die zeigen, dass *SOX2* in adulten Medulloblastomen bedeutender ist als in infantilen und frühkindlichen Tumoren.

Um zu untersuchen, welche Auswirkung ein akuter Verlust von *Sox2* in Körnerzellvorläufern und Tumorzellen hat, wurde ein primäres Zellkultursystem verwendet. Der Befund, dass die konstitutive Aktivierung des *Shh*-Signalweges sowohl die Expression von *Sox2* als auch die Proliferation von Medulloblastomzellen *in vitro* antreibt, lässt Vermutungen in Bezug auf einen direkten Zusammenhang zwischen *Sox2*, *Shh* und proliferativer Aktivität von Körnerzellen zu. Einen ähnlichen Zusammenhang haben schon Favaro und Kollegen im Hippocampus festgestellt. Hier führte der Verlust von *Sox2* in neuralen Stammzellen des Hippocampus zum Verlust der *Shh*-Expression sowie zum Proliferationsarrest der

hippocampalen Stammzellen (Favaro *et al.*, 2009). Die erhöhte Sox2-Expression in den primären Zellkulturen nach der Aktivierung des Shh-Signalweges passt zur ektopen Expression von Sox2 in Tumoren aus Mausmodellen für Shh-assoziierte Medulloblastome, obwohl nachweislich nach e18.5 keine Immunreaktivität für Sox2 mehr in reifen Körnerzellen vorhanden sein sollte. In humanen SHH-assoziierten Medulloblastomen besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Expression von *SHH* und *SOX2*, wobei mehr *SOX2*, wie mehr *SHH*, möglicherweise zu einer erhöhten Proliferation und so im Endeffekt zu einer höheren Aggressivität des Tumors und einer schlechteren Prognose führen könnte. Der Beleg für einen Einfluss der *SOX2*-Expression auf das Überleben der Patienten konnte bisher nicht erbracht werden, da in der zu Verfügung stehenden Kohorte nur sechs Datensätze zu adulten Patienten zur Verfügung standen. Möglicherweise lässt sich aber an einer angemessen großen Stichprobe ein Zusammenhang zwischen *SOX2*-Expression und dem Überleben von Patienten mit SHH-abhängigen Medulloblastomen nachweisen.

Kann die Proliferationsrate in Shh-assoziierten Tumoren durch Regulation der Sox2-Expression moduliert werden? *In vitro* konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass dies tatsächlich möglich ist. Der Verlust von Sox2 in Körnerzellvorläufern führt zu einer Verringerung der Proliferation in Körnerzellen mit aktiviertem Shh-Signalweg, die Überexpression von Sox2 in primären Tumorzellen aus Shh-assoziierten Tumoren führt zu einer Erhöhung der Proliferation. Sox2 alleine ist also ausreichend, aber auch notwendig, um die Proliferationsrate in Shh-abhängigen Medulloblastomzellen zu modulieren. Ein funktionell-regulatorischer Zusammenhang zwischen Sox2 und dem Shh-Signalweg wurde bereits von Favaro und Kollegen für die Entwicklung des Hippocampus beschrieben, wobei Sox2 stromaufwärts von Shh liegen soll und die Aktivierung des Shh-Signalweges steuern kann (Favaro *et al.*, 2009). Aufgrund der Bedeutung von *SOX2* in adulten Medulloblastomen, ist nicht auszuschließen, dass *SOX2*-exprimierende Zellen eventuell eine Quelle für SHH-assoziierte Tumoren im adulten Kleinhirn und einen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung von SHH-assoziierten Medulloblastomen darstellen könnten.

4.2 SOX2 IM ADULTEN KLEINHIRN

Eine Besonderheit des Kleinhirns ist, dass die Entwicklung der Gehirnregion nicht mit der Geburt abgeschlossen ist, sondern besonders postnatal noch plastischen Veränderungen unterworfen ist. Die Entwicklung des Kleinhirns beschränkt sich daher nicht nur auf die embryonale Entwicklung, sondern besonders auf die postnatale und sogar adulte Struktur des Cerebellums. Die Daten, die in humanen Medulloblastomen in Bezug auf SOX2-Expression gesammelt wurden, deuten allesamt auf eine Bedeutung von SOX2 in adulten SHH-assoziierten Tumoren hin. Um zu untersuchen, welche Funktion Sox2-positive Zellen allgemein im adulten Kleinhirn haben, wurde die Expression von Sox2 im murinen cerebellären Cortex genauer untersucht.

Die stark Sox2-positive Bergmann Glia zwischen der inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht ist besonders auffällig. Die Bergmann Glia ist eine Population von radialer Glia, die bei der corticalen Entwicklung des Cerebellums als Leitungssystem für die Migration der Körnerzellen von der äußeren in die innere Körnerzellschicht dient. Es wurde bereits gezeigt, dass radiale Gliazellen ein gewisses Stammzellpotential besitzen können (Robel *et al.*, 2011, Malatesta *et al.*, 2013). Daher wurde in dieser Arbeit die Population von Sox2-positiven Zellen im Hinblick auf ihre Bedeutung als potentieller Ursprung für adulte Medulloblastome genauer untersucht.

Der erste und wichtigste Befund im Hinblick auf spätere Ergebnisse und deren Interpretation ist, dass es weder in der Purkinjzellschicht, in der sich die Sox2-positive Bergmann Glia befindet, noch in der inneren Körnerzellschicht Sox2-positive, reife Körnerzellen gibt. Das bedeutet also, dass sich im cerebellären Cortex eine ausdifferenzierte neuronale Identität und Sox2-Expression immer ausschließen.

In der Purkinjzellschicht konnten in dieser Arbeit Sox2-positive Zellen gefunden werden, die (1) keinerlei Immunoreaktivität für Reifemarker des adulten Cerebellums zeigen und (2) diverse Proliferationsmarker exprimieren. Diese Ergebnisse sind vielversprechend auf der Suche nach Zellen, die unter Umständen einen gewissen Vorläufercharakter zeigen und somit reaktiver und eher angreifbar für onkogene Veränderungen im reifen Kleinhirn sein könnten.

Unabhängig vom bereits diskutierten Potential Tumoren zu generieren, sollte die bisher unbekannte undifferenzierte Sox2-positive Population in der Purkinjzellschicht besonders im Hinblick auf ihre proliferativen Eigenschaften genauer charakterisiert werden. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass akute Proliferation in rund 80% der Fälle Sox2-positive Zellen betrifft, sondern auch, dass diese Proliferation neuronale Nachkommen zur Folge hat. Um den Übergang des BrdU-Signals von Sox2-positiven Zellen auf ausdifferenzierte Körnerzellen sicher auf eine Sox2-exprimierende Ursprungszelle zurückverfolgen zu können, wurde der BrdU-Assay mit dem *fate-mapping* System kombiniert. Es konnte nachgewiesen werden, dass RFP-positive Zellen nicht aufgrund eines latent aktiven Sox2-Promotors primär durch Tamoxifen rekombiniert wurden. Vielmehr müssen sie bei inkorporiertem BrdU durch Zellteilung seit der Injektion von BrdU und Tamoxifen entstanden sein. Aus eben diesem Grund wurde entschieden durch eine einzelne BrdU-Injektion zusammen Tamoxifen nur genau die Zellen mit dem Basenanalogen zu markieren, die zum Zeitpunkt der Induktion mit Tamoxifen proliferativ aktiv sind.

So konnte eindeutig gezeigt werden, dass Sox2-positive Zellen im adulten Kleinhirn das Potential haben, neuronale Nachkommen zu erzeugen.

Die Frage nach dem Ursprung dieser adult generierten Neurone ist dennoch nicht endgültig geklärt. Die Bergmann Glia wurde aufgrund ihrer radialen Eigenschaften schon als eine Population von Stammzellen im cerebellären Cortex diskutiert (Alcock *et al.*, 2007). Möglich wäre, dass nicht die gesamte Bergmann Glia, aber unter Umständen eine kleinere Subpopulation, wie die in dieser Arbeit gefundene für diese Funktion in Frage kommt. Obwohl vieles auf eine Sox2-positive Population von cerebellären Vorläufer- oder sogar Stammzellen innerhalb der Bergmann Glia hindeutet, kann mit dem jetzigen Stand der Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass eine andere Sox2-positive Population des Kleinhirns der Ursprung der adulten Neurogenese ist. In der weißen Substanz des früh postnatalen Cerebellums wurden Sox2-positive Stammzellen beschrieben, allerdings hier nur das Potential *in vitro* Neurosphären zu bilden (Lee *et al.*, 2005). In Bezug auf die bis jetzt unbekannt, undifferenzierten Sox2-positiven Zellen innerhalb der Purkinjzellschicht gilt es zu klären, ob es sich bei der Bergmann Glia tatsächlich um eine heterogene Population von Sox2-positiven reifen Gliazellen und Sox2-positiven Vorläuferzellen handelt, oder ob Bergmann Gliazellen eventuell transient in einen Vorläuferstatus übergehen und ohne weitere Stimulation wieder ausdifferenzieren. Bisher war adulte Neurogenese bei Säugetieren nur in zwei Bereichen des

reifen Gehirns bekannt, und zwar in den Subventrikulärzonen der Seitenventrikel und im Hippocampus. In Invertebraten ist bereits seit längerem bekannt, dass in den Pilzkörpern, dem funktionellen Analogon des hippocampalen Systems, auch im reifen Nervensystem noch Neurone gebildet werden (Cayre *et al.*, 2002). In evolutionär älteren Vertebraten, wie den Teleostei wurde allerdings bereits adulte Neurogenese in kleinhirnähnlichen Strukturen nachgewiesen (Zupanc 2001). Auch in Kaninchen wurde eine Art von adulter Neurogenese im Kleinhirn beschrieben, wobei hier die neugeborenen Neurone nicht aus Zellen des reifen cerebellären Cortex hervorgehen, sondern aus den Resten der äußeren Körnerzellschicht, die in Kaninchen ungewöhnlich lange erhalten bleibt (Ponti *et al.*, 2008). Mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit kommt eine weitere Zellpopulation des reifen zentralen Nervensystems von Säugetieren dazu, die auch adult weiterhin die Fähigkeit besitzt Neurone zu generieren. Besonders interessant sind wiederum die Parallelen, die sich mit der adulten Neurogenese im *Gyrus dentatus* des Hippocampus ergeben. Auch hier ist die neurogene Zellpopulation Sox2-positiv und generiert Körnerzellen, die in das neuronale Netzwerk des Hippocampus eingebaut werden (van Praag *et al.*, 2002, Suh *et al.*, 2007, Favaro *et al.*, 2009). In Anlehnung an diese Arbeiten sind weitere Experimente nötig, um die adulte Neurogenese im Kleinhirn genauer zu charakterisieren und funktionelle Aspekte für eventuelle therapeutische Anwendungen zu untersuchen.

Auch wenn es bis jetzt nicht möglich war, zuverlässig Shh-assoziierte Tumoren aus Sox2-positiven Zellen des adulten Kleinhirns zu generieren, gab es eine Möglichkeit, dennoch eine reaktive Natur dieser Zellen nachzuweisen. Mit Gewebe von Patienten mit cerebellären Infarkten war es sogar möglich, dies direkt im humanen System zu untersuchen. Im Gewebe der reaktiven Bergmann Gliose wurde tatsächlich eine anteilmäßige Vermehrung der undifferenzierten SOX2-positiven Zellen gemessen. Das Phänomen der reaktiven Gliose als Antwort auf Verletzungen des Gehirns ist in der Stammzellforschung gut dokumentiert und gilt als eine Quelle von vielversprechenden Reparaturmechanismen des Gehirns. Dabei werden neurogene Prozesse im Anschluss an die reaktive Expansion der Gliazellpopulation diskutiert (Robel *et al.*, 2011). Auch wenn weitere Untersuchungen nötig sein werden, ist dies ein erster Hinweis auf eine reaktive Funktion von SOX2-positiven Zellen im humanen Kleinhirn, die in der regenerativen Medizin nutzbar gemacht werden könnte. Es wäre möglich, dass reaktive Neurogenese durch bestimmte Stimuli angeregt und verstärkt werden könnte, um so beschädigte neuronale Netzwerke zu stabilisieren und eventuell wieder aufzubauen.

In Abbildung 4.2-1 ist schematisch dargestellt, welche entwicklungsbiologisch wichtigen neuen Funktionen von Sox2-positiven Zellen in dieser Arbeit entdeckt wurden. Zunächst konnte gezeigt werden, dass Sox2-exprimierende Körnerzellvorläufer länger und auch postnatal noch in der äußeren Körnerzellschicht vorliegen und Neurone produzieren als bisher angenommen. Ferner behalten diese Zellen bis in postnatale Stadien das Potential, bei Aktivierung des Shh-Signalweges Tumoren zu produzieren (Abbildung 4.2-1 A). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine bisher unbekannte Population von Sox2-positiven Zellen in der Purkinjezellschicht inmitten der Bergmann Glia liegt. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Sox2-positive Zellen im adulten Cerebellum noch neue Zellen generieren können (Abbildung 4.2-1 B), die zu reifen Körnerzellen ausdifferenzieren.

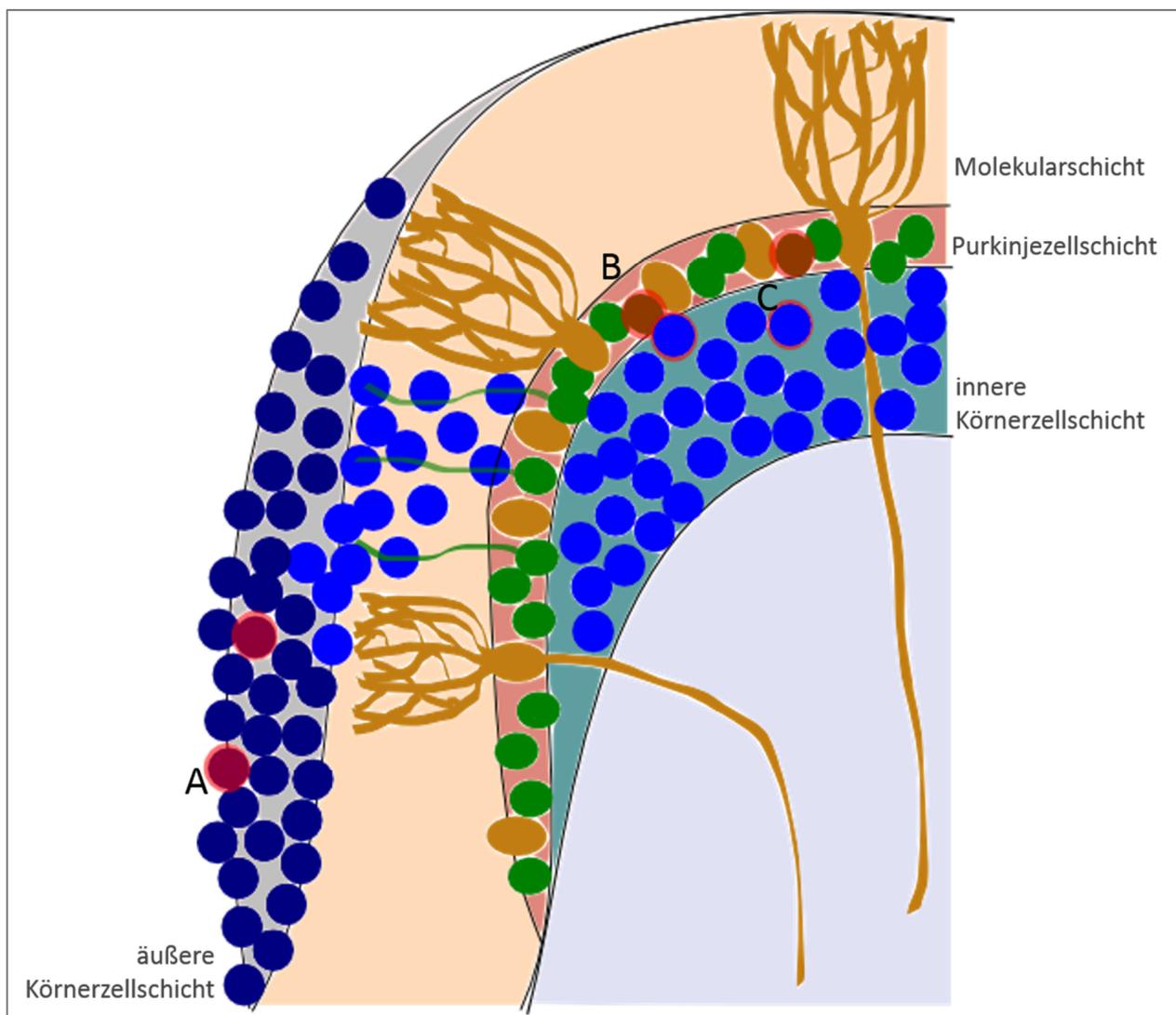


Abbildung 4.2-1 Zusammenfassung der neu entdeckten neurogenen Prozesse aus Sox2-positiven Zellen in der Kleinhirnentwicklung (rot, A) und im adulten cerebellären Cortex (rot, B). In weiteren Experimenten soll untersucht werden, ob adult geborene Körnerzellen (blau mit rotem Rand) vollständig in das neuronale Netzwerk des Cerebellums integriert werden (C).

Weitere Charakterisierungen im Hinblick auf synaptische Integration der neu geborenen Zellen und der Funktion der Neurogenese werden folgen (Abbildung 4.2-1 C).

In dieser Arbeit ist nicht nur der Nachweis von adulter Neurogenese im Cerebellum gelungen, sondern auch, dass Sox2-positive Zellen der Ursprung dieser adulten Neurogenese sind.

5. Ausblick für weitere Arbeiten

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen im Bereich der Medulloblastomforschung. Selbstverständlich sollten alle Analysen an humanen Expressionsdaten immer auf dem aktuellen Stand der verfügbaren Kohorten gehalten werden, um Maskierungseffekte oder Überinterpretation von Ergebnissen aus kleinen Stichproben zu vermeiden.

Durch den in dieser Arbeit erbrachten Nachweis der besonderen Bedeutung von SOX2 in SHH-assoziierten Medulloblastomen und der Entdeckung des proliferationssteigernden Effekts von Sox2 in Medulloblastomzellen des Shh-Subtyps, kann zukünftig untersucht werden auf welcher Ebene des Shh-Signalweges Sox2 seine regulatorische Funktion ausübt. Für den Hippocampus wurde bereits beschrieben, dass Sox2 stromaufwärts von Shh liegt und damit indirekt die Aktivierung des Shh-Signalweges steuern kann (Favaro *et al.*, 2009). Im System der cerebellären Körnerzellen könnten Versuche in primären Körnerzellkulturen mit Inhibitoren für spezifische Komponenten des Signalweges (zum Beispiel Arsentrioxid für Gli1) zeigen, inwiefern eine Überexpression von Sox2 der Inhibition noch entgegen wirken könnte.

Erst mit der Auswertung von SOX2-Expressionsdaten in Medulloblastomen unter Bezugnahme auf das Alter der Patienten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SOX2 eine besondere Bedeutung in den aggressiven adulten Medulloblastomen hat. Um ein tieferes Verständnis für die Rolle von SOX2 in der Entstehung und Erhaltung von Medulloblastomen im Erwachsenenalter zu erhalten, wären Versuche zur Überexpression in adulten Kleinhirnen denkbar. Man könnte sich vorstellen, das für dieses Projekt entwickelte Sox2-Expressionsvirus in das Kleinhirn von gesunden adulten Mäusen zu injizieren und das tumorfreie Überleben zu dokumentieren.

In vivo könnte eine größere Stichprobe von postnatal und adult induzierten Sox2-*creER^{T2}::SmoM2^{Fl/+}*-Tieren helfen, zu verstehen, ob und wann postnatal noch Tumoren aus Sox2-positiven Zellen entstehen können. Außerdem ist es nicht unwahrscheinlich, dass neben der Aktivierung des Shh-Signalweges in Sox2-positiven Vorläufern des adulten Cerebellums noch weitere tumorigene Ereignisse eintreten müssen, um eine zuverlässige Entstehung von Medulloblastomen zu erreichen. Die Möglichkeit, aus diesem System ein Modell für die

Untersuchung von adulten Shh-assoziierten Medulloblastomen zu generieren, sollte weiter verfolgt werden.

Die in dieser Arbeit entdeckte undifferenzierte Sox2-positive Zellpopulation in der Purkinjezellschicht bietet viel Raum für weiterführende Forschung. Es sind Versuche zur exogenen Verstärkung der Neurogenese im Cerebellum geplant. Durch motorisches Training von induzierbaren Reporter-Mäusen auf dem RotaRod, soll gezeigt werden, dass adulte Neurogenese aus Sox2-positiven Vorläuferzellen durch äußere Stimulation verstärkt werden kann. Ähnliche Versuche wurden bereits für die Neurogenese im Hippocampus durchgeführt und zeigten erstaunliche Ergebnisse in Bezug auf die reaktive Proliferation von Sox2-positiven Stammzellen des *Gyrus dentatus* (Suh *et al.*, 2007). Ferner sind genauere Untersuchungen der neu gebildeten Neurone in der inneren Körnerzellschicht geplant. Durch elektrophysiologische Experimente soll die synaptische Integration der entstandenen Körnerzellen in das neuronale Netzwerk des cerebellären Cortex nachgewiesen, wie es bereits im Hippocampus gemacht wurde (van Praag *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal neurogene und regenerative Prozesse im reifen Kleinhirn nachgewiesen und bis auf ihre Sox2-positive Ursprungspopulation zurückverfolgt. Die reaktive Natur undifferenzierter Sox2-positiver Zellen im adulten cerebellären Cortex könnte ein wertvolles System zur Untersuchung neoplastischer Veränderungen im Cerebellum sein. Außerdem könnte die Fähigkeit dieser Population, adulte Neurone zu generieren, eine Chance für die translationale Etablierung von Reparaturmechanismen bei neurodegenerativen Erkrankungen darstellen. Es gilt zu untersuchen, ob aus den bisher unbekannt undifferenzierten Sox2-positiven Zellen neben reifen Neuronen auch andere Zelltypen entstehen könnten. Im Hinblick auf die onkologische Forschung könnte diese Population durch das Einbringen von bekannten tumorspezifischen Mutationen auch auf die Fähigkeit untersucht werden andere Tumoren außer Medulloblastomen auszubilden.

6. Anhang

6.1 SOX2 IN HUMANEN MEDULLOBLASTOMEN

| Patientennummer | Geschlecht | Alter [Jahre] | Histologischer Subtyp | SOX2-Status |
|-----------------|------------|---------------|-----------------------|-------------|
| 1 | M | 0,5 | extensiv nodulär | - |
| 2 | M | 0,6 | extensiv nodulär | + |
| 3 | W | 0,7 | extensiv nodulär | - |
| 4 | M | 0,8 | extensiv nodulär | + |
| 5 | M | 0,9 | desmoplastisch | ++ |
| 6 | M | 0,9 | desmoplastisch | - |
| 7 | M | 1,1 | desmoplastisch | + |
| 8 | W | 1,6 | desmoplastisch | ++ |
| 9 | M | 1,7 | desmoplastisch | + |
| 10 | W | 1,8 | klassisch | - |
| 11 | W | 1,8 | klassisch | - |
| 12 | M | 2 | desmoplastisch | - |
| 13 | W | 2,2 | desmoplastisch | - |
| 14 | W | 2,2 | extensiv nodulär | - |
| 15 | M | 2,4 | klassisch | - |
| 16 | M | 2,5 | desmoplastisch | + |
| 17 | M | 2,7 | extensiv nodulär | - |
| 18 | W | 2,9 | extensiv nodulär | - |
| 19 | W | 3,6 | klassisch | ++ |
| 20 | M | 3,7 | klassisch | - |
| 21 | W | 3,9 | klassisch | + |
| 22 | M | 4,1 | klassisch | - |
| 23 | W | 4,5 | desmoplastisch | - |
| 24 | W | 4,8 | klassisch | - |
| 25 | M | 4,9 | klassisch | ++ |
| 26 | M | 5,3 | desmoplastisch | ++ |
| 27 | M | 5,4 | klassisch | + |
| 28 | M | 6,2 | klassisch | - |
| 29 | M | 6,5 | klassisch | - |
| 30 | W | 6,5 | klassisch | + |
| 31 | M | 6,7 | klassisch | + |
| 32 | M | 6,8 | desmoplastisch | - |
| 33 | M | 7,4 | desmoplastisch | + |
| 34 | M | 7,5 | desmoplastisch | + |
| 35 | W | 7,5 | klassisch | - |
| 36 | W | 7,9 | klassisch | - |
| 37 | M | 8,5 | klassisch | + |
| 38 | M | 9 | klassisch | + |
| 39 | W | 9,4 | desmoplastisch | + |
| 40 | M | 11,5 | klassisch | + |
| 41 | W | 14,3 | desmoplastisch | ++ |
| 42 | W | 14,3 | desmoplastisch | + |
| 43 | W | 14,4 | klassisch | - |
| 44 | W | 17,2 | klassisch | - |
| 45 | M | 19 | desmoplastisch | + |
| 46 | M | 22,3 | klassisch | - |
| 47 | M | 22,8 | desmoplastisch | ++ |
| 48 | W | 23,7 | desmoplastisch | + |
| 49 | W | 25,5 | klassisch | + |
| 50 | W | 25,5 | desmoplastisch | ++ |
| 51 | M | 25,6 | desmoplastisch | ++ |
| 52 | W | 26,5 | desmoplastisch | + |
| 53 | M | 27,8 | desmoplastisch | - |
| 54 | M | 29,6 | desmoplastisch | ++ |
| 55 | M | 30,3 | desmoplastisch | ++ |
| 56 | W | 30,5 | desmoplastisch | ++ |
| 57 | M | 30,6 | desmoplastisch | ++ |
| 58 | W | 30,7 | desmoplastisch | ++ |
| 59 | M | 33,3 | desmoplastisch | ++ |
| 60 | W | 34,9 | desmoplastisch | ++ |
| 61 | W | 35,8 | desmoplastisch | - |
| 62 | W | 36,8 | klassisch | - |
| 63 | M | 37,5 | klassisch | - |
| 64 | W | 40,4 | desmoplastisch | ++ |
| 65 | M | 51,8 | desmoplastisch | ++ |

Abbildung 6.1-1 Zusammenfassung der Tumorpathologie und klinischer Daten in humanen Medulloblastom Fällen. -, + und ++ stehen für keine bis schwache, intermediäre und starke SOX2-Expression im Tumor.

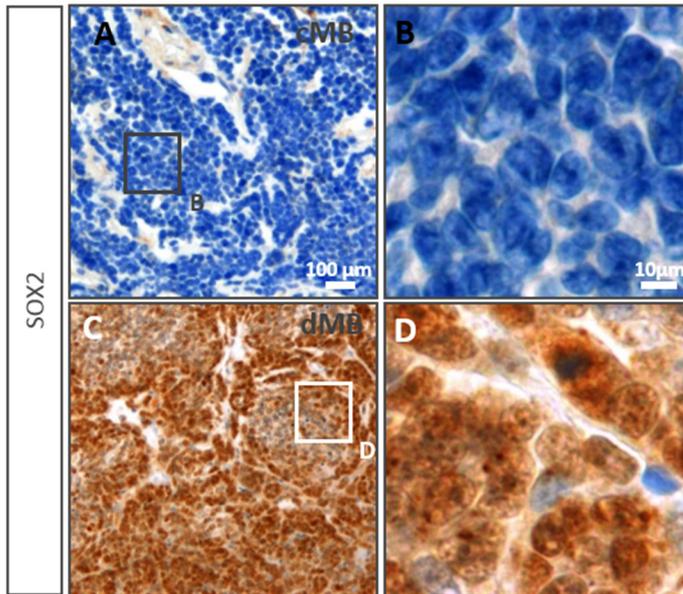


Abbildung 6.1-2 Beispiele für die SOX2-Expression in Medulloblastomen des klassischen (cMB) histologischen Subtyps (A und B) und des desmoplastischen (dMB) Subtyps (C und D).

6.2 SOX2 IN DER KLEINHIRNENTWICKLUNG

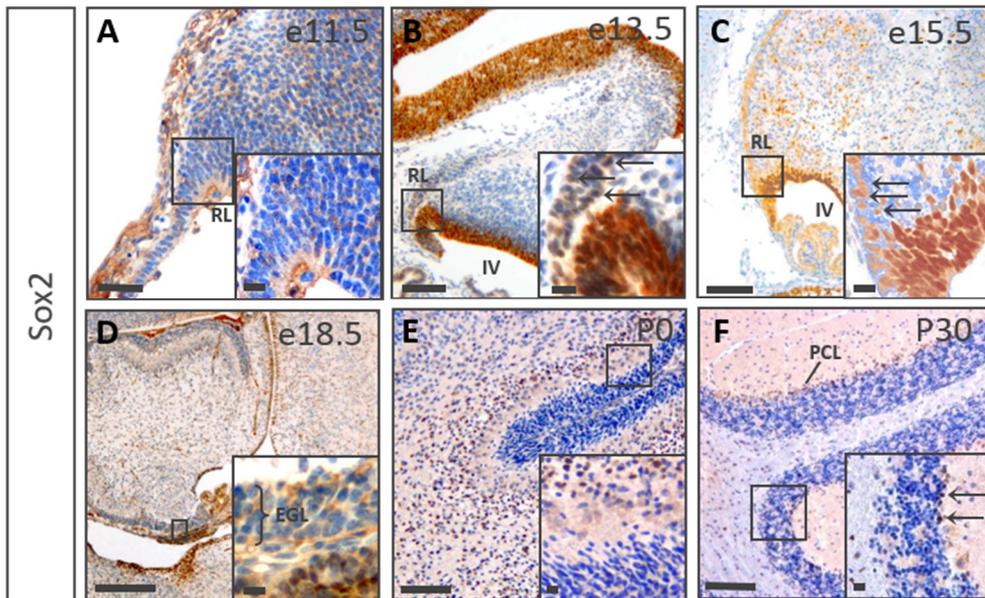


Abbildung 6.2-1 Übersicht über die Expression von Sox2 in der murinen Kleinhirnentwicklung, bis hin zum adulten Cerebellum. Sox2 kann in Körnerzellvorläufern nur zwischen e13.5 und e18.5 in der rhombischen Lippe und der EGL nachgewiesen werden (A-D). Im adulten cerebellären Cortex wird Sox2 nur in Bergmann Glia exprimiert (E und Pfeile in F) Die Maßstäbe in den Übersichtsaufnahmen stehen für 100 µm, die Maßstäbe in Detailaufnahmen stehen für 50 µm). EGL, externe Körnerzellschicht; PCL, Purkinjellschicht; RL, rhombische Lippe; IV, vierter Ventrikel.

6.3 Sox2 IM MAUSMODELL FÜR MEDULLOBLASTOME

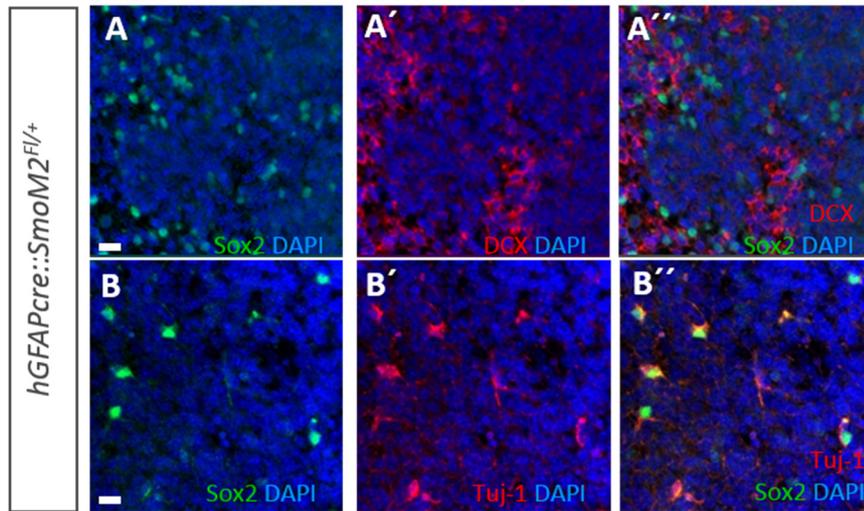


Abbildung 6.3-1 Im Mausmodell für Shh-assoziierte Medulloblastome scheint es, dass Sox2-Expression und die Expression von Markern für Körnerzelldifferentenzierung sich gegenseitig ausschließen. Sox2-positive Zellen (grün) liegen verstreut im ganzen Tumor vor, aber diese Zellen kolokalisieren nie mit dem Marker für neuronale Vorläufer Doublecortin (DCX), liegen aber lokal immer in der Nähe DCX-positiver Zellansammlungen (A). Häufige Ko-Expression findet man für Sox2 und den neuronalen Vorläufermarker Tuj-1 (B). Maßstäbe: 100 µm.

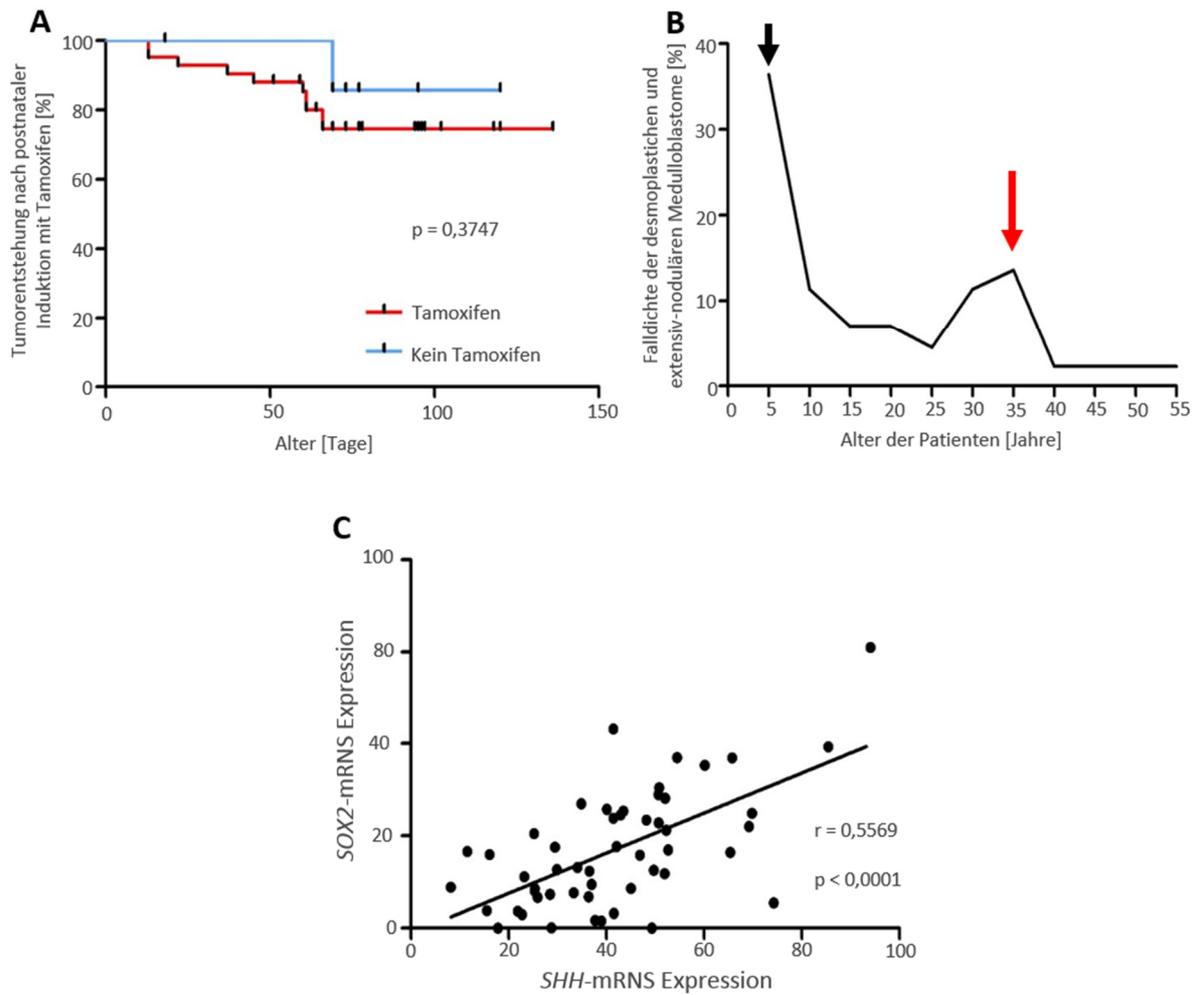


Abbildung 6.3-2 Postnatale Induktion der Tumorentstehung aus Sox2-positiven Zellen. Im Mausmodell können nach p3 nicht mehr zuverlässig Tumore durch Aktivierung des Shh-Signalweges in Sox2-positiven Zellen erzeugt werden. Nach einer langen Altersperiode, in der keine Tumorentstehung aus Sox2-positiven Zellen möglich ist, ist ab dem Abschluss der Kleinhirnentwicklung in Einzelfällen das Potential wieder vorhanden. Eine Analyse der Tumorentstehung in allen postnatal induzierten *Sox2-creER^{T2}::SmoM2^{Fl/+}*-Mäuse ist in A dargestellt. Frühe Induktionen mit Tamoxifen führen deutlich häufiger zu Tumorentstehung, allerdings ist ab einem gewissen Alter kein signifikanter Unterschied zur Entwicklung in den Kontrollen festzustellen. Indiziert ist der Zeitpunkt der Entnahmen aus dem Versuch, ein Tumor bei der Entnahme wird als Abfall der Kurve dargestellt. Eine biphasische Altersverteilung mit einem frühen (schwarzer Pfeil) und einem späten Inzidenzmaximum (roter Pfeil) zeigt sich auch bei den desmoplastischen und extensiv-nodulären Medulloblastomen im humanen System (B). Der direkte Zusammenhang der Expression von SOX2 und SHH in der SHH-assoziierten Subgruppe von Medulloblastomen ist in C dargestellt.

6.4 FUNKTIONELLE ASPEKTE VON SOX2 IN TUMORZELLEN

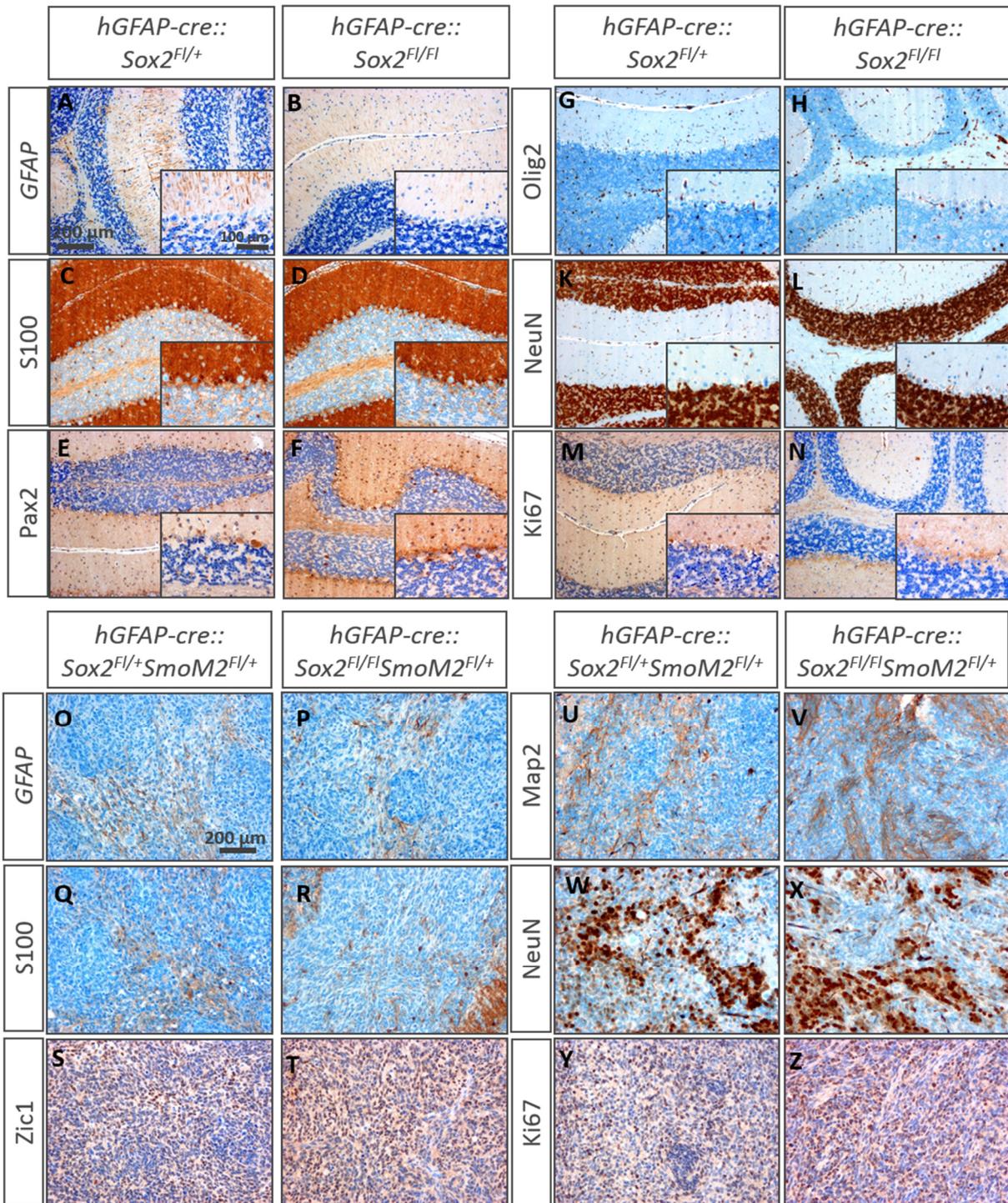


Abbildung 6.4-1 Der Verlust von *Sox2* in neuronalen Vorläuferzellen hat keine Auswirkungen auf die grobe Kleinhirnentwicklung oder die Entwicklung von *Shh*-assoziierten Medulloblastomen im Mausmodell.

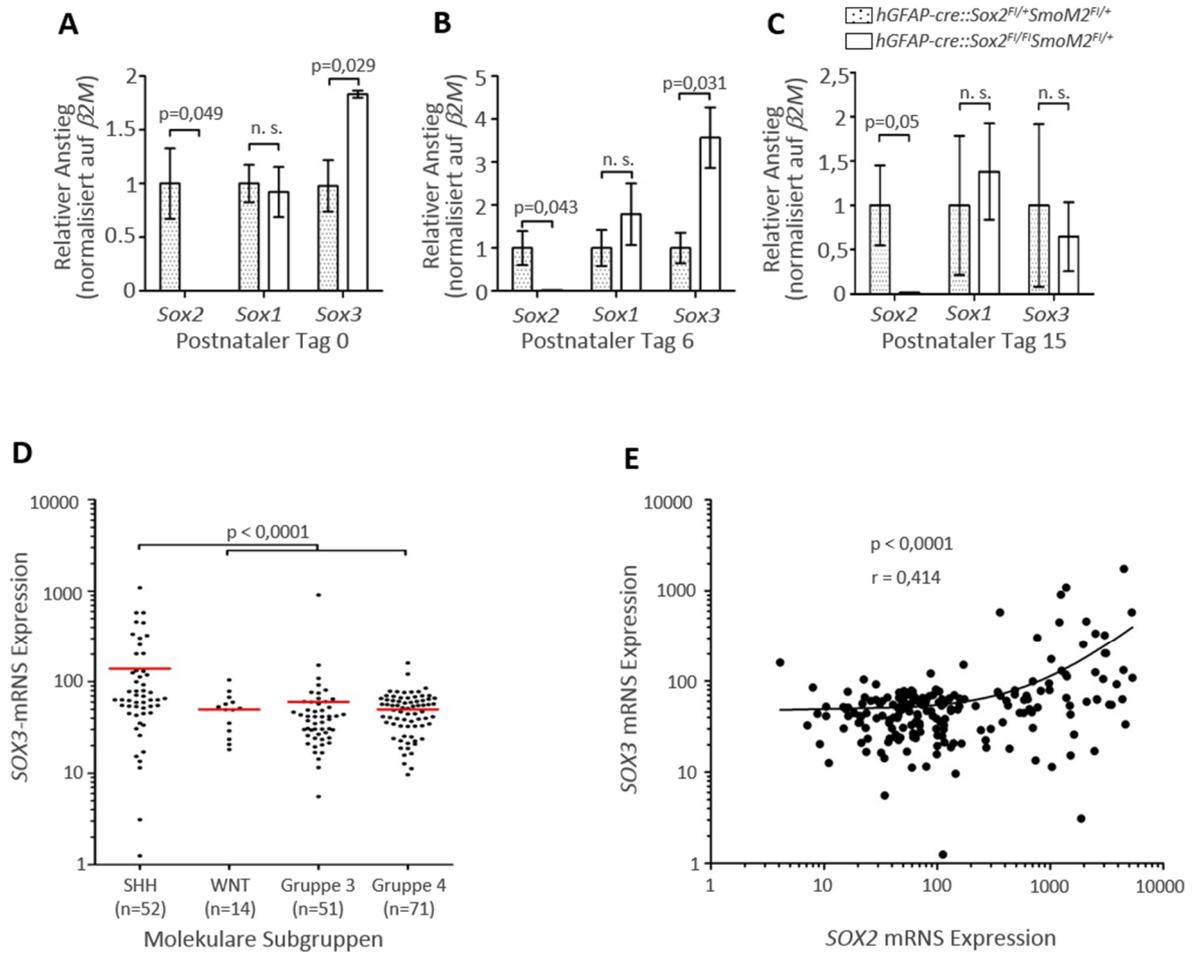


Abbildung 6.4-2 Kompensation des frühen Verlusts von *Sox2* in der Tumorentwicklung. Hochregulation der *Sox3*-Expression auf den Verlust von *Sox2* hin kann nur in frühen Stadien der postnatalen Entwicklung festgestellt werden (A und B). 15 Tage nach der Geburt sind keine kompensatorischen Effekte in der RNS-Expression zu erkennen (C). Untersuchungen an mRNA-Expressionsdaten von *SOX3* ergaben eine ähnliche Verteilung der Expressionsstärke in Bezug auf die molekulare Subgruppen von Medulloblastomen wie für *SOX2* (D). Außerdem besteht eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Expression von *SOX2* und *SOX3* in Medulloblastomproben (E).

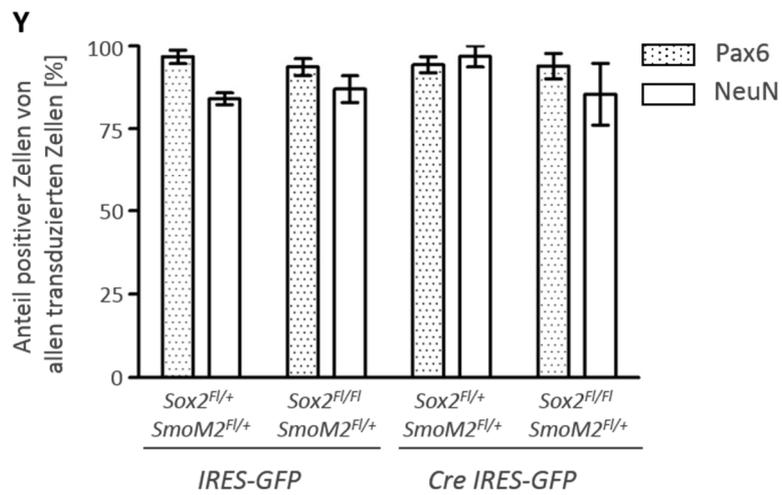
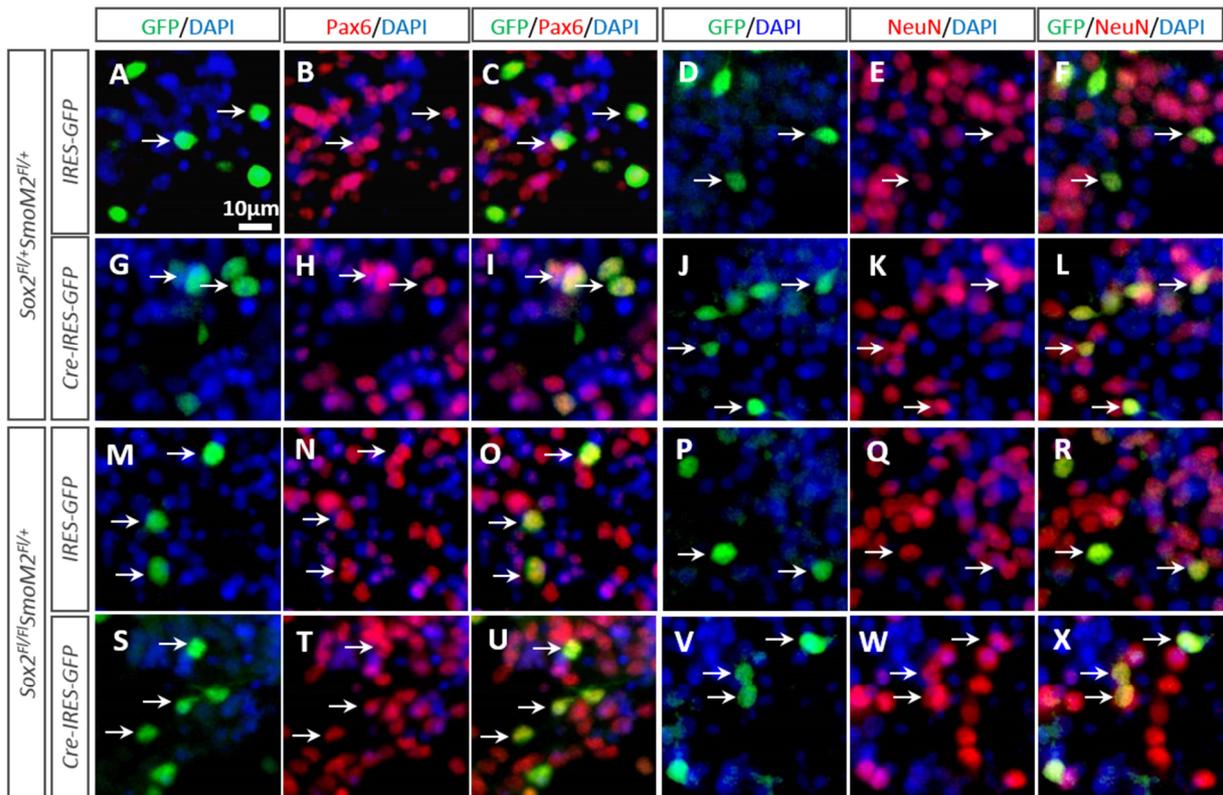


Abbildung 6.4-3 Transduzierte Zellen in Körnerzellkulturen sind neuronalen Ursprungs. Viral transduzierten Zellen in primäre Kulturen von Körnerzellvorläufern sind fast ausschließlich neuronalen Ursprungs, wie durch immunfluoreszente Ko-Färbungen auf virales GFP und neuronale Markerproteine Pax6 und NeuN gezeigt wurde.

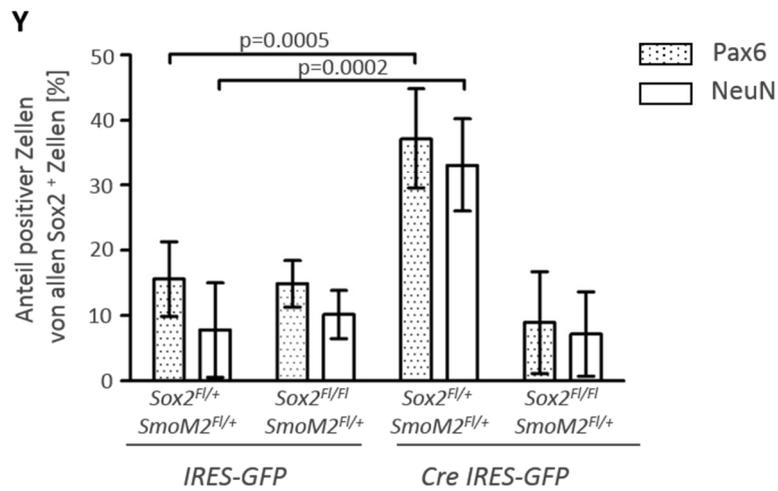
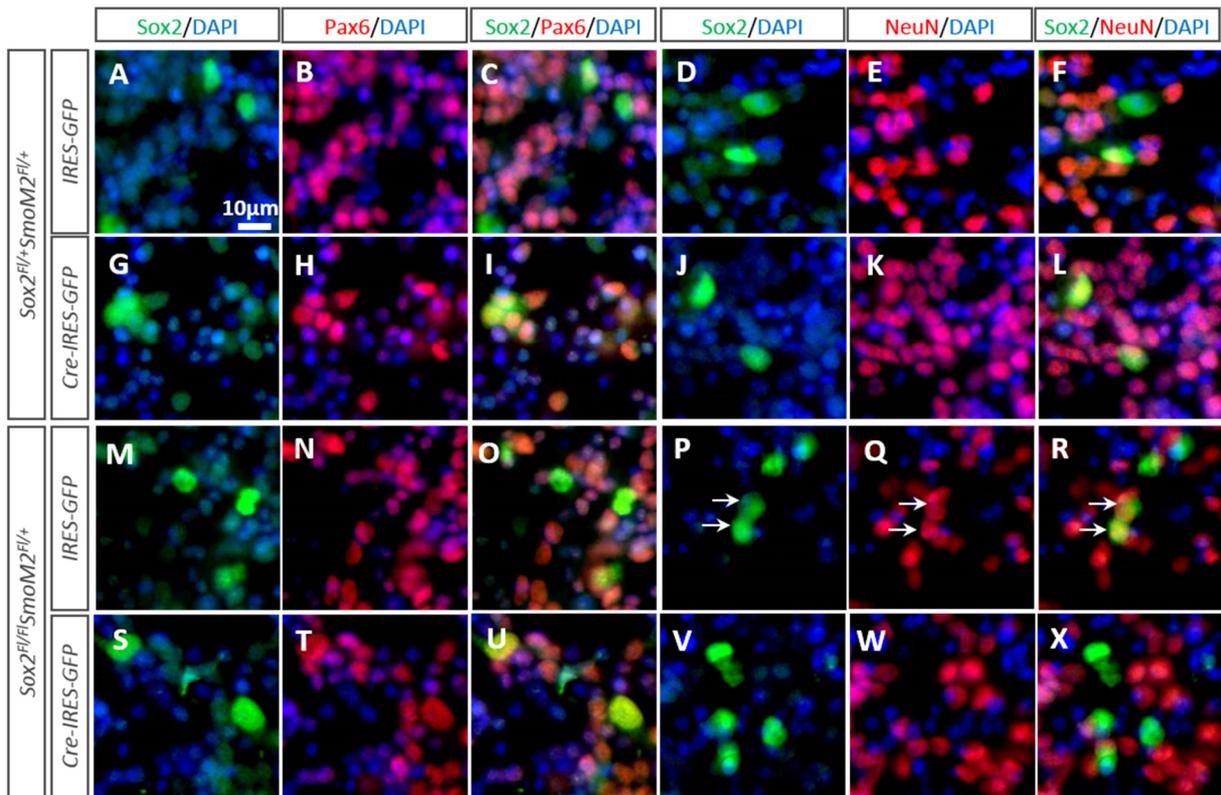


Abbildung 6.4-4 Sox2-positive Zellen exprimieren neuronale Marker nach Aktivierung des Shh-Signalweges. Der Anteil von Sox2-positiven Zellen mit neuronalen Eigenschaften in primären Körnerzellkulturen stieg signifikant an, wenn der Shh-Signalweg aktiviert wurde, wie in Doppelfärbungen auf Sox2 und die neuronalen Marker Pax6 und NeuN gezeigt wurde.

6.5 STANDARDREAGENZILIEN

Im Folgenden sind die verwendeten Standardlösungen aufgeführt. Alle verwendeten Chemikalien besaßen die höchste kommerziell erhältliche Reinheit. Einmal verwendbare Materialien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Die Basis der verwendeten Lösungen und Puffer war mit einem Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore, MA, USA) aufbereitetes Wasser.

| | |
|--------------------|---|
| 10 x PBS-Puffer | 82,3 g Na ₂ HPO ₄ 23,5 g NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O 40 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O pH 7,3 |
| 1 % PBS-Triton | 1000 ml PBS 10 ml Triton X-100 |
| LB-Medium | 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O pH 7,1 |
| LB-Medium mit Agar | 1000 ml LB-Medium 15 g Agar Agar entsprechendes Antibiotikum zugeben |
| 10 x Citratpuffer: | 3,78 g Citronensäure 24,21 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ad 1000 ml H ₂ O pH 6,0 |
| 0.1M Borat Puffer | 6,2 g Dinatriumtetraborat-Decahydrat 1000 ml H ₂ O pH 8,5 |

7. Literatur

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.*, 16(13): 3797-3804.
- Adachi, K., Suemori, H., Nakatsuji, N. and Kawase, E. (2011). The Role of SOX2 in Maintaining Pluripotency and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells.
- Adamson, D. C., Shi, Q., Wortham, M., Northcott, P. A., Di, C., Duncan, C. G., Li, J., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Taylor, M. D. and Yan, H. (2010). OTX2 is critical for the maintenance and progression of Shh-independent medulloblastomas. *Cancer Res.*, 70(1): 181-191.
- Al-Halabi, H., Nantel, A., Klekner, A., Guiot, M. C., Albrecht, S., Hauser, P., Garami, M., Bognar, L., Kavan, P., Gerges, N., Shirinian, M., Roberge, D., Muanza, T. and Jabado, N. (2011). Preponderance of sonic hedgehog pathway activation characterizes adult medulloblastoma. *Acta neuropathologica*, 121(2): 229-239.
- Alcock, J., Lowe, J., England, T., Bath, P. and Sottile, V. (2009). Expression of Sox1, Sox2 and Sox9 is maintained in adult human cerebellar cortex. *Neurosci. Lett.*, 450(2): 114-116.
- Alcock, J., Scotting, P. and Sottile, V. (2007). Bergmann glia as putative stem cells of the mature cerebellum. *Medical hypotheses*, 69(2): 341-345.
- Alonso, M. M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Urquiza, L., Jauregi, P., Lopez de Munain, A., Sampron, N., Aramburu, A., Tejada-Solis, S., Vicente, C., Odero, M. D., Bandres, E., Garcia-Foncillas, J., Idoate, M. A., Lang, F. F., Fueyo, J. and Gomez-Manzano, C. (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS one*, 6(11): e26740.
- Alston, R. D., Newton, R., Kelsey, A., Newbould, M. J., Birch, J. M., Lawson, B. and McNally, R. J. (2003). Childhood medulloblastoma in northwest England 1954 to 1997: incidence and survival. *Dev. Med. Child Neurol.*, 45(5): 308-314.
- Altmann, J. and Bayer, S. A. (1997). Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure and Functions. New York, CRC Press.
- Alvarez-Buylla, A. and Lim, D. A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41(5): 683-686.
- Amini, S., Fathi, F., Mobalegi, J., Sofimajidpour, H. and Ghadimi, T. (2014). The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and

- Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anatomy & cell biology*, 47(1): 1-11.
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y. and Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.*, 16(9): 1066-1076.
- Annovazzi, L., Mellai, M., Caldera, V., Valente, G. and Schiffer, D. (2011). SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. *Cancer genomics & proteomics*, 8(3): 139-147.
- Archer, T. C., Jin, J. and Casey, E. S. (2011). Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis. *Developmental biology*, 350(2): 429-440.
- Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M. A., Polo, J. M., Bronson, R., Sengupta, S., Seandel, M., Geijsen, N. and Hochedlinger, K. (2011). Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell stem cell*, 9(4): 317-329.
- Ayrault, O., Zindy, F., Rehg, J., Sherr, C. J. and Roussel, M. F. (2009). Two tumor suppressors, p27Kip1 and patched-1, collaborate to prevent medulloblastoma. *Molecular cancer research : MCR*, 7(1): 33-40.
- Aza-Blanc, P., Ramirez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C. and Kornberg, T. B. (1997). Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell*, 89(7): 1043-1053.
- Bai, C. B., Auerbach, W., Lee, J. S., Stephen, D. and Joyner, A. L. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development*, 129(20): 4753-4761.
- Bailey, P. and Cushing, H. (1925). Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 11(1): 82-84.
- Bale, S. J., Falk, R. T. and Rogers, G. R. (1998). Patching together the genetics of Gorlin syndrome. *J. Cutan. Med. Surg.*, 3(1): 31-34.
- Barry, G., Piper, M., Lindwall, C., Moldrich, R., Mason, S., Little, E., Sarkar, A., Tole, S., Gronostajski, R. M. and Richards, L. J. (2008). Specific glial populations regulate hippocampal morphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(47): 12328-12340.

- Bass, A. J., Watanabe, H., Mermel, C. H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R. G., Kim, S. Y., Wardwell, L., Tamayo, P., Gat-Viks, I., Ramos, A. H., Woo, M. S., Weir, B. A., Getz, G., Beroukhi, R., O'Kelly, M., Dutt, A., Rozenblatt-Rosen, O., Dziunycz, P., Komisarof, J., Chirieac, L. R., Lafargue, C. J., Scheble, V., Wilbertz, T., Ma, C., Rao, S., Nakagawa, H., Stairs, D. B., Lin, L., Giordano, T. J., Wagner, P., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Zhu, C. Q., Brose, M. S., Ceccconello, I., Jr, U. R., Marie, S. K., Dahl, O., Shivdasani, R. A., Tsao, M. S., Rubin, M. A., Wong, K. K., Regev, A., Hahn, W. C., Beer, D. G., Rustgi, A. K. and Meyerson, M. (2009). SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature genetics*, 41(11): 1238-1242.
- Behrens, J., Jerchow, B. A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, 280(5363): 596-599.
- Bergsland, M., Ramskold, D., Zaouter, C., Klum, S., Sandberg, R. and Muhr, J. (2011). Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes & development*, 25(23): 2453-2464.
- Berman, D. M., Karhadkar, S. S., Hallahan, A. R., Pritchard, J. I., Eberhart, C. G., Watkins, D. N., Chen, J. K., Cooper, M. K., Taipale, J., Olson, J. M. and Beachy, P. A. (2002). Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science*, 297(5586): 1559-1561.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J. and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature*, 382(6588): 225-230.
- Bowles, J., Schepers, G. and Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.*, 227(2): 239-255.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. and Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6): 947-956.
- Brandes, A. A., Franceschi, E., Tosoni, A., Reni, M., Gatta, G., Vecht, C. and Kortmann, R. D. (2009). Adult neuroectodermal tumors of posterior fossa (medulloblastoma) and of supratentorial sites (stPNET). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 71(2): 165-179.
- Brugieres, L., Pierron, G., Chompret, A., Paillerets, B. B., Di Rocco, F., Varlet, P., Pierre-Kahn, A., Caron, O., Grill, J. and Delattre, O. (2010). Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germ-line SUFU mutations. *J. Med. Genet.*, 47(2): 142-144.

- Castillo, S. D. and Sanchez-Cespedes, M. (2012). The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 16(9): 903-919.
- Cayre, M., Malaterre, J., Scotto-Lomassese, S., Strambi, C. and Strambi, A. (2002). The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 132(1): 1-15.
- Chamorro, M. N., Schwartz, D. R., Vonica, A., Brivanlou, A. H., Cho, K. R. and Varmus, H. E. (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.
- Chatterjee, S., Sivakamasundari, V., Lee, W. J., Chan, H. Y. and Lufkin, T. (2012). Making no bones about it: Transcription factors in vertebrate skeletogenesis and disease. *Trends in developmental biology*, 6: 45-52.
- Chew, L. J. and Gallo, V. (2009). The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *Journal of neuroscience research*, 87(15): 3277-3287.
- Cho, Y.-J., Tsherniak, A., Tamayo, P., Santagata, S., Ligon, A., Greulich, H., Berhoukim, R., Amani, V., Goumnerova, L., Eberhart, C. G., Lau, C. C., Olson, J. M., Gilbertson, R. J., Gajjar, A., Delattre, O., Kool, M., Ligon, K., Meyerson, M., Mesirov, J. P. and Pomeroy, S. L. (2011). Integrative Genomic Analysis of Medulloblastoma Identifies a Molecular Subgroup That Drives Poor Clinical Outcome. *Journal of Clinical Oncology*, 29(11): 1424-1430.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15(3): 532-534, 536-537.
- Cimadamore, F., Amador-Arjona, A., Chen, C., Huang, C. T. and Terskikh, A. V. (2013). SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(32): E3017-3026.
- Clifford, S. C., Lusher, M. E., Lindsey, J. C., Langdon, J. A., Gilbertson, R. J., Straughton, D. and Ellison, D. W. (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): 2666-2670.
- Coon, V., Laukert, T., Pedone, C. A., Lattera, J., Kim, K. J. and Fults, D. W. (2010). Molecular therapy targeting Sonic hedgehog and hepatocyte growth factor signaling in a mouse model of medulloblastoma. *Mol Cancer Ther*, 9(9): 2627-2636.

- Corbit, K. C., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A. R., Stainier, D. Y. and Reiter, J. F. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*, 437(7061): 1018-1021.
- Cox, J. L., Mallanna, S. K., Luo, X. and Rizzino, A. (2010). Sox2 uses multiple domains to associate with proteins present in Sox2-protein complexes. *PLoS One*, 5(11): e15486.
- Dahmane, N. and Altaba, A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. *Development.*, 126: 3089-3100.
- Dann, C. E., Hsieh, J. C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J. and Leahy, D. J. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature*, 412(6842): 86-90.
- Dino, M. R., Schuerger, R. J., Liu, Y., Slater, N. T. and Mugnaini, E. (2000). Unipolar brush cell: a potential feedforward excitatory interneuron of the cerebellum. *Neuroscience*, 98(4): 625-636.
- Dong, C., Wilhelm, D. and Koopman, P. (2004). Sox genes and cancer. *Cytogenetic and genome research*, 105(2-4): 442-447.
- Driessens, G. and Blanpain, C. (2011). Long live sox2: sox2 lasts a lifetime. *Cell stem cell*, 9(4): 283-284.
- Duband, J. L. (2010). Diversity in the molecular and cellular strategies of epithelium-to-mesenchyme transitions: Insights from the neural crest. *Cell adhesion & migration*, 4(3): 458-482.
- Duffner, P. K., Horowitz, M. E., Krischer, J. P., Friedman, H. S., Burger, P. C., Cohen, M. E., Sanford, R. A., Mulhern, R. K., James, H. E., Freeman, C. R. and et al. (1993). Postoperative chemotherapy and delayed radiation in children less than three years of age with malignant brain tumors. *N. Engl. J. Med.*, 328(24): 1725-1731.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A. and McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7): 1417-1430.
- Ellison, D. W. (2010). Childhood medulloblastoma: novel approaches to the classification of a heterogeneous disease. *Acta neuropathologica*, 120(3): 305-316.

- Ellison, D. W., Dalton, J., Kocak, M., Nicholson, S. L., Fraga, C., Neale, G., Kenney, A. M., Brat, D. J., Perry, A., Yong, W. H., Taylor, R. E., Bailey, S., Clifford, S. C. and Gilbertson, R. J. (2011). Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta neuropathologica*, 121(3): 381-396.
- Ellison, D. W., Onilude, O. E., Lindsey, J. C., Lusher, M. E., Weston, C. L., Taylor, R. E., Pearson, A. D. and Clifford, S. C. (2005). beta-catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: The United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee. *Journal of Clinical Oncology*, 23(31): 7951-7957.
- Erdmann, G., Schutz, G. and Berger, S. (2007). Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neurosci*, 8: 63.
- Evans, A. E., Jenkin, R. D., Sposto, R., Ortega, J. A., Wilson, C. B., Wara, W., Ertel, I. J., Kramer, S., Chang, C. H. and Leikin, S. L. (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.
- Favaro, R., Appolloni, I., Pellegatta, S., Sanga, A. B., Pagella, P., Gambini, E., Pisati, F., Ottolenghi, S., Foti, M., Finocchiaro, G., Malatesta, P. and Nicolis, S. K. (2014). Sox2 Is Required to Maintain Cancer Stem Cells in a Mouse Model of High-Grade Oligodendroglioma. *Cancer research*.
- Favaro, R., Valotta, M., Ferri, A. L., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., Lancini, C., Tosetti, V., Ottolenghi, S., Taylor, V. and Nicolis, S. K. (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nature neuroscience*, 12(10): 1248-1256.
- Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., DeBiasi, S. and Nicolis, S. K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*, 131(15): 3805-3819.
- Fietz, M. J., Concordet, J. P., Barbosa, R., Johnson, R., Krauss, S., McMahon, A. P., Tabin, C. and Ingham, P. W. (1994). The hedgehog gene family in Drosophila and vertebrate development. *Dev. Suppl.*: 43-51.
- Gatta, G., Zigon, G., Capocaccia, R., Coebergh, J. W., Desandes, E., Kaatsch, P., Pastore, G., Peris-Bonet, R. and Stiller, C. A. (2009). Survival of European children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *Eur. J. Cancer*, 45(6): 992-1005.

- Gerber, N. U., Mynarek, M., von Hoff, K., Friedrich, C., Resch, A. and Rutkowski, S. (2014). Recent developments and current concepts in medulloblastoma. *Cancer treatment reviews*, 40(3): 356-365.
- Gibson, P., Tong, Y., Robinson, G., Thompson, M. C., Currle, D. S., Eden, C., Kranenburg, T. A., Hogg, T., Poppleton, H., Martin, J., Finkelstein, D., Pounds, S., Weiss, A., Patay, Z., Scoggins, M., Ogg, R., Pei, Y., Yang, Z. J., Brun, S., Lee, Y., Zindy, F., Lindsey, J. C., Taketo, M. M., Boop, F. A., Sanford, R. A., Gajjar, A., Clifford, S. C., Roussel, M. F., McKinnon, P. J., Gutmann, D. H., Ellison, D. W., Wechsler-Reya, R. and Gilbertson, R. J. (2010). Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*, 468(7327): 1095-1099.
- Gilbertson, R. J. and Ellison, D. W. (2008). The Origins of Medulloblastoma Subtypes. *Annual review of pathology*, 3: 341-365.
- Goodrich, L. V., Milenkovic, L., Higgins, K. M. and Scott, M. P. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science.*, 277: 1109-1113.
- Gracz, A. D. and Magness, S. T. (2011). Sry-box (Sox) transcription factors in gastrointestinal physiology and disease. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 300(4): G503-515.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*, 39(5): 749-765.
- Grammel, D., Warmuth-Metz, M., von Bueren, A. O., Kool, M., Pietsch, T., Kretschmar, H. A., Rowitch, D. H., Rutkowski, S., Pfister, S. M. and Schuller, U. (2012). Sonic hedgehog-associated medulloblastoma arising from the cochlear nuclei of the brainstem. *Acta Neuropathol*, 123(4): 601-614.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, 346(6281): 245-250.
- Gurdon, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 10: 622-640.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Miller, G. and Zimmer, A. (1999). The patched signaling pathway in tumorigenesis and development: lessons from animal models. *Journal of Molecular Medicine*, 77: 459-468.

- Hahn, H., Wojnowski, L., Specht, K., Kappler, R., Calzada-Wack, J., Potter, D., Zimmer, A., Muller, U., Samson, E. and Quintanilla-Martinez, L. (2000). Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37): 28341-28344.
- Hallonet, M. E. and Le Douarin, N. M. (1993). Tracing neuroepithelial cells of the mesencephalic and metencephalic alar plates during cerebellar ontogeny in quail-chick chimaeras. *Eur. J. Neurosci.*, 5(9): 1145-1155.
- Hamilton, S. R., Liu, B., Parsons, R. E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell, S. M., Krush, A. J., Berk, T., Cohen, Z., Tetu, B., Burger, P. C., Wood, P. A., Taqi, F., Booker, S. V., Petersen, G. M., Offerhaus, G. J. A., Tersmette, A. C., Giardiello, F. M., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1995). The Molecular-Basis of Turcots-Syndrome. *N Engl J Med*, 332(13): 839-847.
- Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22: 511-539.
- Hatten, M. E., Alder, J., Zimmerman, K. and Heintz, N. (1997). Genes involved in cerebellar cell specification and differentiation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7(1): 40-47.
- Hatten, M. E. and Heintz, N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.*, 18: 385-408.
- Hatten, M. E. and Roussel, M. F. (2011). Development and cancer of the cerebellum. *Trends Neurosci*, 34(3): 134-142.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281(5382): 1509-1512.
- Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nature reviews. Neuroscience*, 11(6): 377-388.
- Hoshino, M., Nakamura, S., Mori, K., Kawauchi, T., Terao, M., Nishimura, Y. V., Fukuda, A., Fuse, T., Matsuo, N., Sone, M., Watanabe, M., Bito, H., Terashima, T., Wright, C. V., Kawaguchi, Y., Nakao, K. and Nabeshima, Y. (2005). Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron.*, 47: 201-213.
- Huangfu, D. and Anderson, K. V. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development*, 133(1): 3-14.

- Hussenet, T., Dali, S., Exinger, J., Monga, B., Jost, B., Dembele, D., Martinet, N., Thibault, C., Huelsken, J., Brambilla, E. and du Manoir, S. (2010). SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PloS one*, 5(1): e8960.
- Jenkins, D. (2009). Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell. Signal.*, 21(7): 1023-1034.
- Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N. and 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): 1172-1183.
- Johnson, R. L., Rothman, A. L., Xie, J., Goodrich, L. V., Bare, J. W., Bonifas, J. M., Quinn, A. G., Myers, R. M., Cox, D. R., Epstein, E. H., Jr. and Scott, M. P. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science.*, 272: 1668-1671.
- Joyner, A. L. (1996). Engrailed, Wnt and Pax genes regulate midbrain--hindbrain development. *Trends Genet*, 12(1): 15-20.
- Joyner, A. L., Liu, A. and Millet, S. (2000). Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12(6): 736-741.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R. and Kondoh, H. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev.*, 15(10): 1272-1286.
- Kawauchi, D., Robinson, G., Uziel, T., Gibson, P., Rehg, J., Gao, C., Finkelstein, D., Qu, C., Pounds, S., Ellison, D. W., Gilbertson, R. J. and Roussel, M. F. (2012). A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. *Cancer cell*, 21(2): 168-180.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. and Gage, F. H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2): 391-399.
- Kiermayer, C., Conrad, M., Schneider, M., Schmidt, J. and Brielmeier, M. (2007). Optimization of spatiotemporal gene inactivation in mouse heart by oral application of tamoxifen citrate. *Genesis*, 45(1): 11-16.
- Komitova, M. and Eriksson, P. S. (2004). Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neuroscience letters*, 369(1): 24-27.

- Kool, M., Korshunov, A., Remke, M., Jones, D. T., Schlanstein, M., Northcott, P. A., Cho, Y. J., Koster, J., Schouten-van Meeteren, A., van Vuurden, D., Clifford, S. C., Pietsch, T., von Bueren, A. O., Rutkowski, S., McCabe, M., Collins, V. P., Backlund, M. L., Haberler, C., Bourdeaut, F., Delattre, O., Doz, F., Ellison, D. W., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Taylor, M. D., Lichter, P. and Pfister, S. M. (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 neuropathologica*, 123(4): 473-484.
- Kool, M., Koster, J., Bunt, J., Hasselt, N. E., Lakeman, A., van Sluis, P., Troost, D., Meeteren, N. S., Caron, H. N., Cloos, J., Mrcic, A., Ylstra, B., Grajkowska, W., Hartmann, W., Pietsch, T., Ellison, D., Clifford, S. C. and Versteeg, R. (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, N. S. V., Ylstra, B., Grajkowska, W., Hartmann, W., Pietsch, T., Ellison, D., Clifford, S. and Versteeg, R. (2008b). Identification of medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures, and clinicopathological features. *Neuro-Oncology*, 10(3): 384-384.
- Kortmann, R.-D., Kühl, J., Timmermann, B., Mittler, U., Urban, C., Budach, V., Richter, E., Willich, N., Flentje, M., Berthold, F., Slavc, I., Wolff, J., Meisner, C., Wiestler, O., Sörensen, N., Warmuth-Metz, M. and Bamberg, M. (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): 269-279.
- Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H. and Schaffer, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nature neuroscience*, 6(1): 21-27.
- Landsberg, R. L., Awatramani, R. B., Hunter, N. L., Farago, A. F., DiPietrantonio, H. J., Rodriguez, C. I. and Dymecki, S. M. (2005). Hindbrain rhombic lip is comprised of discrete progenitor cell populations allocated by Pax6. *Neuron*, 48(6): 933-947.
- Lee, A., Kessler, J. D., Read, T. A., Kaiser, C., Corbeil, D., Huttner, W. B., Johnson, J. E. and Wechsler-Reya, R. J. (2005). Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat. Neurosci.*, 8: 723-729.
- Lee, Y., Miller, H. L., Russell, H. R., Boyd, K., Curran, T. and McKinnon, P. J. (2006). Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice. *Cancer Res.*, 66(14): 6964-6971.

- Leone, D. P., Genoud, S., Atanasoski, S., Grausenburger, R., Berger, P., Metzger, D., Macklin, W. B., Chambon, P. and Suter, U. (2003). Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, 22(4): 430-440.
- Lodato, M. A., Ng, C. W., Wamstad, J. A., Cheng, A. W., Thai, K. K., Fraenkel, E., Jaenisch, R. and Boyer, L. A. (2013). SOX2 co-occupies distal enhancer elements with distinct POU factors in ESCs and NPCs to specify cell state. *PLoS Genet*, 9(2): e1003288.
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., Haas, C. A., Kempermann, G., Taylor, V. and Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell stem cell*, 6(5): 445-456.
- Machold, R. and Fishell, G. (2005). Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron*, 48: 17-24.
- Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S. and Zeng, H. (2010). A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nature neuroscience*, 13(1): 133-140.
- Malatesta, P. and Gotz, M. (2013). Radial glia - from boring cables to stem cell stars. *Development*, 140(3): 483-486.
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F. and Gotz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, 37(5): 751-764.
- Mao, J., Ligon, K. L., Rakhlin, E. Y., Thayer, S. P., Bronson, R. T., Rowitch, D. and McMahon, A. P. (2006). A novel somatic mouse model to survey tumorigenic potential applied to the Hedgehog pathway. *Cancer Res.*, 66: 10171-10178.
- Matei, V., Pauley, S., Kaing, S., Rowitch, D., Beisel, K. W., Morris, K., Feng, F., Jones, K., Lee, J. and Fritzsche, B. (2005). Smaller inner ear sensory epithelia in Neurog 1 null mice are related to earlier hair cell cycle exit. *Dev.Dyn.*, 234: 633-650.
- Matsui, T., Kanai-Azuma, M., Hara, K., Matoba, S., Hiramatsu, R., Kawakami, H., Kurohmaru, M., Koopman, P. and Kanai, Y. (2006). Redundant roles of Sox17 and Sox18 in postnatal angiogenesis in mice. *Journal of cell science*, 119(Pt 17): 3513-3526.
- Miyagi, S., Kato, H. and Okuda, A. (2009). Role of SoxB1 transcription factors in development. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(23): 3675-3684.

- National Center for Biotechnology Information (2014). SOX2 SRY (sex determining region Y)-box 2 [Homo sapiens (human)]. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA. am 16.02. 2014, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657#summary>.
- Northcott, P. A., Hielscher, T., Dubuc, A., Mack, S., Shih, D., Remke, M., Al-Halabi, H., Albrecht, S., Jabado, N., Eberhart, C. G., Grajkowska, W., Weiss, W. A., Clifford, S. C., Bouffet, E., Rutka, J. T., Korshunov, A., Pfister, S. and Taylor, M. D. (2011a). Pediatric and adult sonic hedgehog medulloblastomas are clinically and molecularly distinct. *Acta neuropathologica*, 122(2): 231-240.
- Northcott, P. A., Korshunov, A., Witt, H., Hielscher, T., Eberhart, C. G., Mack, S., Bouffet, E., Clifford, S. C., Hawkins, C. E., French, P., Rutka, J. T., Pfister, S. and Taylor, M. D. (2011b). Medulloblastoma Comprises Four Distinct Molecular Variants. *J. Clin. Oncol.*, 29(11): 1408-1414.
- Northcott, P. A., Nakahara, Y., Wu, X., Feuk, L., Ellison, D. W., Croul, S., Mack, S., Kongkham, P. N., Peacock, J., Dubuc, A., Ra, Y. S., Zilberberg, K., McLeod, J., Scherer, S. W., Sunil Rao, J., Eberhart, C. G., Grajkowska, W., Gillespie, Y., Lach, B., Grundy, R., Pollack, I. F., Hamilton, R. L., Van Meter, T., Carlotti, C. G., Boop, F., Bigner, D., Gilbertson, R. J., Rutka, J. T. and Taylor, M. D. (2009). Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nature genetics*, 41(4): 465-472.
- Oliver, T. G., Read, T. A., Kessler, J. D., Mehmeti, A., Wells, J. F., Huynh, T. T., Lin, S. M. and Wechsler-Reya, R. J. (2005). Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Development*, 132: 2425-2439.
- Packer, R. J. and Vezina, G. (2008). Management of and prognosis with medulloblastoma: therapy at a crossroads. *Arch. Neurol.*, 65(11): 1419-1424.
- Pastorino, L., Ghiorzo, P., Nasti, S., Battistuzzi, L., Cusano, R., Marzocchi, C., Garre, M. L., Clementi, M. and Scarra, G. B. (2009). Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *American journal of medical genetics. Part A*, 149A(7): 1539-1543.
- Pei, Y., Moore, C. E., Wang, J., Tewari, A. K., Eroshkin, A., Cho, Y. J., Witt, H., Korshunov, A., Read, T. A., Sun, J. L., Schmitt, E. M., Miller, C. R., Buckley, A. F., McLendon, R. E., Westbrook, T. F., Northcott, P. A., Taylor, M. D., Pfister, S. M., Febbo, P. G. and Wechsler-Reya, R. J. (2012). An animal model of MYC-driven medulloblastoma. *Cancer Cell*, 21(2): 155-167.

- Persson, M., Stamatakis, D., te Welscher, P., Andersson, E., Bose, J., Ruther, U., Ericson, J. and Briscoe, J. (2002). Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes Dev.*, 16(22): 2865-2878.
- Pevny, L. H. and Nicolis, S. K. (2010). Sox2 roles in neural stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42(3): 421-424.
- Phochanukul, N. and Russell, S. (2010). No backbone but lots of Sox: Invertebrate Sox genes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 42(3): 453-464.
- Pietsch, T., Waha, A., Koch, A., Kraus, J., Albrecht, S., Tonn, J., Sörensen, N., Berthold, F., Henk, B., Schmandt, N., Wolf, H. K., von Deimling, A., Wainwright, B., Chenevix-Trench, G., Wiestler, O. D. and Wicking, C. (1997). Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched. *Cancer Res.*, 57: 2085-2088.
- Ponti, G., Peretto, P. and Bonfanti, L. (2008). Genesis of neuronal and glial progenitors in the cerebellar cortex of peripuberal and adult rabbits. *PLoS one*, 3(6): e2366.
- Powell, S. K., Rivas, R. J., Rodriguez-Boulán, E. and Hatten, M. E. (1997). Development of polarity in cerebellar granule neurons. *J. Neurobiol.*, 32(2): 223-236.
- Prior, H. M. and Walter, M. A. (1996). SOX genes: architects of development. *Mol. Med.*, 2(4): 405-412.
- Robel, S., Berninger, B. and Gotz, M. (2011). The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(2): 88-104.
- Rogers, H. A., Miller, S., Lowe, J., Brundler, M. A., Coyle, B. and Grundy, R. G. (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): 1292-1302.
- Romer, J. and Curran, T. (2005). Targeting medulloblastoma: small-molecule inhibitors of the Sonic Hedgehog pathway as potential cancer therapeutics. *Cancer Res.*, 65(12): 4975-4978.
- Romer, J. T., Kimura, H., Magdaleno, S., Sasai, K., Fuller, C., Baines, H., Connelly, M., Stewart, C. F., Gould, S., Rubin, L. L. and Curran, T. (2004). Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice. *Cancer cell*, 6(3): 229-240.

- Roussel, M. F. and Hatten, M. E. (2011). Cerebellum development and medulloblastoma. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 94: 235-282.
- Roussel, M. F. and Robinson, G. W. (2013). Role of MYC in Medulloblastoma. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(11).
- Salic, A., Lee, E., Mayer, L. and Kirschner, M. W. (2000). Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell*, 5(3): 523-532.
- Schepers, G. E., Teasdale, R. D. and Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell*, 3(2): 167-170.
- Schüller, U., Heine, V. M., Mao, J., Kho, A. T., Dillon, A. K., Han, Y. G., Huillard, E., Sun, T., Ligon, A. H., Qian, Y., Ma, Q., Alvarez-Buylla, A., McMahon, A. P., Rowitch, D. H. and Ligon, K. L. (2008). Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer cell*, 14(2): 123-134.
- Schüller, U., Zhao, Q., Godinho, S. A., Heine, V. M., Medema, R. H., Pellman, D. and Rowitch, D. H. (2007). Forkhead transcription factor FoxM1 regulates mitotic entry and prevents spindle defects in cerebellar granule neuron precursors. *Mol Cell Biol*, 27(23): 8259-8270.
- Schwalbe, E. C., Lindsey, J. C., Straughton, D., Hogg, T. L., Cole, M., Megahed, H., Ryan, S. L., Lusher, M. E., Taylor, M. D., Gilbertson, R. J., Ellison, D. W., Bailey, S. and Clifford, S. C. (2011). Rapid diagnosis of medulloblastoma molecular subgroups. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(7): 1883-1894.
- Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346(6281): 240-244.
- Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, 21(1): 70-71.
- Sudarov, A., Turnbull, R. K., Kim, E. J., Lebel-Potter, M., Guillemot, F. and Joyner, A. L. (2011). *Ascl1* genetics reveals insights into cerebellum local circuit assembly. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(30): 11055-11069.

- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A. and Gage, F. H. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell stem cell*, 1(5): 515-528.
- Sultan, F. and Glickstein, M. (2007). The cerebellum: Comparative and animal studies. *Cerebellum*, 6(3): 168-176.
- Sutter, R., Shakhova, O., Bhagat, H., Behesti, H., Sutter, C., Penkar, S., Santucci, A., Bernays, R., Heppner, F. L., Schuller, U., Grotzer, M., Moch, H., Schraml, P. and Marino, S. (2010). Cerebellar stem cells act as medulloblastoma-initiating cells in a mouse model and a neural stem cell signature characterizes a subset of human medulloblastomas. *Oncogene*, 29(12): 1845-1856.
- Tait, D. M., Thornton-Jones, H., Bloom, H. J., Lemerle, J. and 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): 464-469.
- Taylor, M. D., Gokgoz, N., Andrulis, I. L., Mainprize, T. G., Drake, J. M. and Rutka, J. T. (2000). Familial posterior fossa brain tumors of infancy secondary to germline mutation of the hSNF5 gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 66(4): 1403-1406.
- Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C. C., Mainprize, T. G., Zhang, X., Agatep, R., Chiappa, S., Gao, L., Lowrance, A., Hao, A., Goldstein, A. M., Stavrou, T., Scherer, S. W., Dura, W. T., Wainwright, B., Squire, J. A., Rutka, J. T. and Hogg, D. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nature genetics*, 31(3): 306-310.
- Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y. J., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D. W., Lichter, P., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Kool, M. and Pfister, S. M. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta neuropathologica*, 123(4): 465-472.
- Taylor, R. E., Bailey, C. C., Robinson, K., Weston, C. L., Ellison, D., Ironside, J., Lucreft, H., Gilbertson, R., Tait, D. M., Walker, D. A., Pizer, B. L., Imeson, J., Lashford, L. S., International Society of Paediatric, O. and United Kingdom Children's Cancer Study, G. (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. *Journal of Clinical Oncology*, 21(8): 1581-1591.
- Thompson, M. C., Fuller, C., Hogg, T. L., Dalton, J., Finkelstein, D., Lau, C. C., Chintagumpala, M., Adesina, A., Ashley, D. M., Kellie, S. J., Michael, D. T., Curran, T., Gajjar, A. and Gilbertson, R. J. (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J. Clin. Oncol.*, 24(12): 1924-1931.

- Tolwinski, N. S. and Wieschaus, E. (2004). A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS Biol*, 2(4): E95.
- Uchikawa, M., Kamachi, Y. and Kondoh, H. (1999). Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mechanisms of development*, 84(1-2): 103-120.
- Uziel, T., Zindy, F., Sherr, C. J. and Roussel, M. F. (2006). The CDK inhibitor p18Ink4c is a tumor suppressor in medulloblastoma. *Cell Cycle*, 5(4): 363-365.
- Uziel, T., Zindy, F., Xie, S., Lee, Y., Forget, A., Magdaleno, S., Rehg, J. E., Calabrese, C., Solecki, D., Eberhart, C. G., Sherr, S. E., Plimmer, S., Clifford, S. C., Hatten, M. E., McKinnon, P. J., Gilbertson, R. J., Curran, T., Sherr, C. J. and Roussel, M. F. (2005). The tumor suppressors Ink4c and p53 collaborate independently with Patched to suppress medulloblastoma formation. *Genes & development*, 19(22): 2656-2667.
- van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D. and Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875): 1030-1034.
- Voogd, J. and Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*, 21(9): 370-375.
- Walton, R. M. (2012). Postnatal neurogenesis: of mice, men, and macaques. *Veterinary pathology*, 49(1): 155-165.
- Wang, V. Y., Rose, M. F. and Zoghbi, H. Y. (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, C. T. and McMahon, A. P. (2009). Selective translocation of intracellular Smoothened to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(8): 2623-2628.
- Watanabe, Y., Duprez, D., Monsoro-Burq, A. H., Vincent, C. and Le Douarin, N. M. (1998). Two domains in vertebral development: antagonistic regulation by SHH and BMP4 proteins. *Development*, 125(14): 2631-2639.
- Wechsler-Reya, R. J. and Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 22: 103-114.

- Wegner, M. and Stolt, C. C. (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends in neurosciences*, 28(11): 583-588.
- Wetmore, C., Eberhart, D. E. and Curran, T. (2001). Loss of p53 but not ARF accelerates medulloblastoma in mice heterozygous for patched. *Cancer research*, 61(2): 513-516.
- Weyer, A. and 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, V. J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., Clevers, H. and Pals, S. T. (1999). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am. J. Pathol.*, 154(2): 515-523.
- Wilson, M. J. and Dearden, P. K. (2008). Evolution of the insect Sox genes. *BMC evolutionary biology*, 8: 120.
- Wingate, R. J. (2001). The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11(1): 82-88.
- Wood, H. B. and Episkopou, V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. *Mechanisms of development*, 86(1-2): 197-201.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S. M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J. M., Lam, C. W., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Jr, E. H. E. and de Sauvage, F. J. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*, 391(6662): 90-92.
- Yamanaka, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell proliferation*, 41 Suppl 1: 51-56.
- Yamanaka, S. and Takahashi, K. (2006). [Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 51(15): 2346-2351.
- Yang, Z. J., Ellis, T., Markant, S. L., Read, T. A., Kessler, J. D., Bourbonoulas, M., Schuller, U., Machold, R., Fishell, G., Rowitch, D. H., Wainwright, B. J. and Wechsler-Reya, R. J. (2008). Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer cell*, 14(2): 135-145.
- Zeltzer, P. M., Boyett, J. M., Finlay, J. L., Albright, A. L., Rorke, L. B., Milstein, J. M., Allen, J. C., Stevens, K. R., Stanley, P., Li, H., Wisoff, J. H., Geyer, J. R., McGuire-Cullen, P., Stehbens, J. A., Shurin, S. B. and Packer, R. J. (1999). Metastasis stage, adjuvant treatment, and residual tumor are prognostic factors for medulloblastoma in children: conclusions

from the Children's Cancer Group 921 randomized phase III study. *J.Clin.Oncol.*, 17(3): 832-845.

Zhao, R. and Daley, G. Q. (2008). From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors. *J. Cell. Biochem.*, 105(4): 949-955.

Zhuo, L., Theis, M., Alvarez-Maya, I., Brenner, M., Willecke, K. and Messing, A. (2001). hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis.*, 31: 85-94.

Zupanc, G. K. (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain, behavior and evolution*, 58(5): 250-275.

Zurawel, R. H., Chiappa, S. A., Allen, C. and Raffel, C. (1998). Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations. *Cancer research*, 58(5): 896-899.

9. Dank

Mein herzlicher Dank gilt:

PD Dr. med. Ulrich Schüller. Ulrich, von dir habe ich gelernt, dass sich Überzeugung, Einsatz und Fleiß auch in der Wissenschaft auszahlen. Ich bin dir sehr dankbar dafür, dass du mich gefördert, aber auch gefordert hast... An der weißen Strähne, die über die letzten drei Jahre in meinen Haaren gewachsen ist bist du sicher nicht ganz unschuldig. Du hast mir mal gesagt, dass du stolz bist, dass ich mein Projekt, auch gegen Widerstand, in andere Richtungen weiterverfolgt und vorangetrieben habe. Ich möchte mich für die Herausforderung, dein Vertrauen und deine Unterstützung aus tiefstem Herzen bedanken.

Prof. Dr. rer. nat. George Boyan. Nicht nur für die Vertretung meiner Arbeit vor der biologischen Fakultät möchte ich mich bei Ihnen bedanken, sondern auch für die Zeit, die Sie sich für mich genommen haben. Der Blick über den Tellerrand des eigenen Modellsystems und speziesübergreifendes Denken, zusammen mit einem tiefen Verständnis für die grundlegende Funktionsweise von Lebewesen sind wertvolle Eigenschaften, die jeden Biologen auszeichnen sollten.

Prof. Dr. rer. nat. Anja Horn-Bochtler, meiner Zweitgutachterin, stellvertretend für alle Gutachter dieser Arbeit.

Silvia Occhionero und Michael Schmidt. Ihr habt mir so gut wie alle Techniken, die ich für meine Doktorarbeit gebraucht habe erst beigebracht und mir immer geholfen Probleme jeglicher Art zu bewältigen. Der Grund, warum ich während meiner Doktorarbeit so gerne mit euch zusammengearbeitet habe, ist aber nicht nur, dass Ihr mir viel Arbeit abgenommen habt, sondern hauptsächlich, dass ich mich darauf verlassen konnte, dass alles, was ihr anpackt funktioniert. Vielen Dank euch beiden, ihr seid toll!

Den Tierpflegern. Pitt und Beate, Ela und Pati, ihr wart mir immer eine riesige Hilfe, immer für eine Standpauke gut und von euch habe ich gelernt, dass Mäuse auch nur Menschen mit übernatürlichen Fähigkeiten sind. Danke!

Daniel Grammel. Kronki, stellvertretend für die vielen Konstellationen der ganzen Arbeitsgruppe möchte ich mich bei dir besonders dafür bedanken, mit mir zusammen nie die naturwissenschaftliche Sichtweise auf die medizinische Forschung aus den Augen verloren zu haben.

Annika Wefers, Julia Pöschl und Manu Dorostkar für ärztlichen Rat.

Markus Priller und Martin Bartels, Johanna Neuner und Severin Filser, Sonja Steinbach und Song Shi, Catharina Prix und Karin Schinke, Phong Nguyen und Sevasti Tsenekidou, Patrick Stenner und Katharina Feigl. Ihr habt mir auf vielfältige Weise meine Doktorarbeit leichter gemacht. Ihr seid mit mir den kleinen Dienstweg gegangen, habt mich zu sportlichen Höchstleistungen getrieben, habt mir lange Nächte und noch längere Tage danach beschert, wart mir nicht böse, wenn ich mal länger oder gleich das ganze Wochenende im Labor war und habt mich aufgefangen, wenn es nötig war. 1000 Dank!!

Felix Schmidt. Felix, von dir habe ich so viel gelernt, so viel Unterstützung erfahren und ohne dich hätte ich so viel verpasst. Danke!!

Anna und Philipp Ahlfeld. Annalein und Philipp, ich bin sehr dankbar dafür, dass wir uns haben.

Emanuel Danczak. Emanuel, du hast mich versorgt und beschützt und aufgepasst, dass ich meinen Kopf nicht verliere. Du hast mich durch diese Arbeit getragen, hast mir gesagt, wann es Zeit ist aufzustehen, aber auch, wann es Zeit ist wieder nach Hause zu kommen.

Genovefa und Jürgen Ahlfeld. Ihr habt mich immer unterstützt und auf meine Intelligenz vertraut. Ihr habt mir alles beigebracht, was ich brauchte, um mein eigenes Leben zu leben und alles gegeben, damit ich immer noch gerne nach Hause komme. Mama, du bist die hilfsbereiteste, offenste, klügste und stärkste Frau, die ich kenne und eine echte Inspiration. Papa, du bist auch jetzt noch ein großes Vorbild für mich. Danke.

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angaben der entsprechenden Literatur gekennzeichnet.

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

Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

München, den 17.04.2014