

Aus dem Institut für Neuropathologie (Zentrum für Neuropathologie und  
Prionforschung, ZNP)  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Leiter: Prof. Dr. Jochen Herms

**Die Bedeutung von LIN28A für die Entstehung embryonaler Hirntumoren mit  
vielschichtigen Rosetten (ETMRs)**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Valerie Meister  
aus  
Kreuztal  
Jahr  
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Schüller

Mitberichterstatter: PD Dr. Louisa von Baumgarten

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2019

Teile dieser Dissertation wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Neumann JE, Wefers AK, Lambo S, Bianchi E, Bockstaller M, Dorostkar MM, **Meister V**, Schindler P, Korshunov A, von Hoff K, Nowak J, Warmuth-Metz M, Schneider MR, Renner-Müller I, Merk DJ, Shakarami M, Sharma T, Chavez L, Glass R, Chan JA, Taketo MM, Neumann P, Kool M, Schüller U. (2017). A mouse model for embryonal tumors with multilayered rosettes uncovers the therapeutic potential of sonic-hedgehog inhibitors.

Nat Med. 2017 Oct;23(10):1191-1202. doi: 10.1038/nm.4402. Epub 2017 Sep 11.

Ich widme diese Arbeit allen an embryonalen Hirntumoren erkrankten  
Neugeborenen und ihren Angehörigen.

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Embryonale Tumoren mit vielschichtigen Rosetten	9
1.1.1	Klinik und Epidemiologie von ETMRs	9
1.1.2	Molekulare Alterationen und Histopathologie in ETMRs	9
1.2	Fragestellung	13
2	METHODEN	13
2.1	Transgene Mäuse	13
2.1.1	<i>hGFAP-cre</i> Maus	13
2.1.2	<i>TdTomato</i> Maus	14
2.1.3	<i>Ctnnb1(ex3)<sup>Fl/Fl</sup></i> Maus	14
2.1.4	LIN28A Maus	14
2.1.5	<i>hGFAP-cre::tdTomato</i> Maus	15
2.1.6	<i>hGFAP-cre::Ctnnb1(ex3)<sup>Fl/Fl</sup></i> Maus	16
2.1.7	<i>hGFAP-cre::Isl-LIN28A</i> Maus	17
2.2	Genotypisierung	19
2.3	Histologie und Immunfärbungen	21
2.4	Transduktion von neuronalen Vorläuferzellen der Maus mit alteriertem Beta-Catenin und LIN28A	22
2.4.1	Produktion von Viren zur Transduktion von <i>Ctnnb1 (ex3)</i> und <i>LIN28A</i> in neurale Vorläuferzellen der Maus	22
2.4.2	Kultur neuronaler Vorläuferzellen der Maus	27
2.5	Statistik	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Charakterisierung eines Mausmodells mit Überexpression von LIN28A in neuronalen Vorläufern	29
3.1.1	Vitalität, Fertilität	29
3.1.2	Tumorentwicklung	29
3.1.3	Entwicklungsdefekte im ZNS	29
3.2	Evaluation einer <i>Ctnnb1</i> und <i>LIN28A</i> -Überaktivierung in der Kultur neuronaler Vorläuferzellen der Maus	36
4	DISKUSSION	38
5	ZUSAMMENFASSUNG	40
6	LITERATURVERZEICHNIS	42

7 DANKSAGUNG	47
8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	48

# Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1. Die Inhibition von let-7 durch LIN28A.** LIN28A nutzt verschiedene Mechanismen, um die Prozessierung von let-7 zu verhindern. In A wird die Entstehung von pre let-7 direkt gehemmt. In Bild B kommt es zwar noch zur Entstehung von up-let 7 aus pre let-7, dieses wird aber schon während seiner Entstehung uridyliert und kann so nur noch abgebaut werden (Winter, Jung et al. 2009). 12
- Abbildung 2. Die DNA-Mikroinjektion.** Verfahren, bei dem ein fremdes Plasmid in Maus-Zygoten injiziert wird (A). Diese Zygote wird in den Eileiter einer Amme implantiert (B) und kann nun, nach erfolgreicher Einnistung, bis zur Geburt reifen (C). 15
- Abbildung 3. Das LIN28A Transgen.** Ohne Rekombination mit einer cre-Rekombinase kommt es bei der transgenen Maus nicht zur Transkription der 3 LIN28A Sequenzen. 15
- Abbildung 4. Die tdTomato-Expression in der hGFAP-cre::TdTomato Maus.** Obwohl die die hGFAP-cre Rekombinase nach Stadium 1 der Neurogenese (Proliferationsstadium) nicht mehr aktiv ist (von Bohlen Und Halbach 2007), wird in rekombinierten Zellen fortlaufend tdTomato exprimiert. 16
- Abbildung 5. Die Auswirkung des Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup> Transgens.** Exon 3 des Ctnnb1 Gens liegt zwischen zwei loxP Stellen und wird bei Interaktion mit der Cre Rekombinase entfernt. Exon 3 kodiert für Proteindomänen des Beta-Catenins, die von der Glykogensynthase 3-Beta phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung ihrerseits führt zum Abbau des Beta-Catenins. Wird Exon 3 herausgeschnitten, kommt es nicht mehr zur Ausprägung der Proteindomänen und infolgedessen auch nicht mehr zur Phosphorylierung und zum Abbau von Beta-Catenin. 17
- Abbildung 6. Die LIN28A Überexpression in der hGFAP-cre::LIN28A Maus.** Poly-A-Stop-Kassette im Transgen der Maus wird durch Rekombination mit der cre-Rekombinase herausgeschnitten. LIN28A wird unter dem CAG Promotor konstitutiv exprimiert. 18
- Abbildung 7. Vektorplasmid pMSCV-IRES-mCherry FP.** Das Plasmid und die Vektorkarte wurden von addgene erworben (<https://www.addgene.org/52114/>). Auf der Karte sind die verschiedenen Schnittstellen der Restriktionsenzyme zu erkennen, u.a. BamHI und XhoI. 23
- Abbildung 8. Ctnnb1(ex3)mCherry.** *Ctnnb1(ex3)mCherry* ist durch Ligation von *Ctnnb1 Part I*, *Ctnnb1 Part II* und dem aufgetrennten Vektor *pMSCV-IRES-mCherry FP* entstanden. Das Plasmid enthält 8766 bp. 26
- Abbildung 9: Überblick des frontalen Maushirns an P15.** Der Messbalken entspricht 1 mm. 29
- Abbildung 10: Messung des Volumens der Neurone des Neocortex an P15.** 30
- Abbildung 11: Messung der Dicke des Neocortex an einer 15 Tage alten Maus.** 30
- Abbildung 12. Hippocampus einer 15 Tage alten Maus.** Die Färbungen sind an Paraffinschnitten in frontaler Orientierung vorgenommen worden. Der Messbalken in A-D entspricht 250 µm und in E-L 100 µm. Bereits in der H&E Färbung (C) sind morphologische Auffälligkeiten in Form einer Zelldispersion im transgenen Tier sichtbar. Diese sind in den Insets G und K vergrößert dargestellt. In der LIN28A Färbung lässt sich beim transgenen Tier ein charakteristisches Expressionsmuster zeigen (D). Die angezeigten Bereiche der Pfeile H und L sind darunter vergrößert dargestellt. 31
- Abbildung 13 HUB & WFS Färbung des Cornu Ammonis der 15 Tage alten Maus.** Mit der HUB- und WFS-Färbung handelt es sich um immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten der Maus, die es ermöglichen, die verschiedenen Bereiche des Cornu ammonis einordnen zu können. Das Cornu ammonis ist in frontaler Orientierung zu sehen. Der Messbalken in A-D entspricht 250 µm. 32

**Abbildung 14: Anterior/Posterior Vergleiche des Hippocampus einer 15 Tage alten Maus.** In der Hippocampusmorphologie lassen sich deutliche Unterschiede in den verschiedenen Schnittebenen feststellen. Im Inset in C ist ein Zellverband vergrößert dargestellt, der kein LIN28A exprimiert. Diese Zellverbände nehmen in den posterioren Schnitten F und I zu (Pfeil 1). Zudem lässt sich ein außerhalb des Cornu Ammonis befindlicher Zellverband im Corpus Callosum abgrenzen, der im anterioren Schnitt noch nicht zu sehen ist (Pfeil 2 in F und I). Darüber hinaus verstärkt sich die Zelldispersion im CA1 Bereich des Hippocampus, hier mit Pfeil 3 dargestellt. Der Messbalken in A-I entspricht 250 µm. Für die hohe Vergrößerung in C entspricht der Messbalken 100 µm. 34

**Abbildung 15 Altersvergleich des Expressionsmusters von LIN28A und NeuN an P15, P30 und P68.** Hier ist eine deutliche Abnahme in der Expression von LIN28A erkennbar (C im Vergleich zu G und K). Um eine Expression von LIN28A in den Astrozyten darstellen zu können, ist eine hohe Vergrößerung notwendig (Inset in K). Mit der NeuN-Färbung lässt sich vergleichend darstellen, dass die Zelldispersion im Cornu Ammonis im Altersverlauf erhalten bleibt. Der Messbalken in A-L entspricht 250 µm, für die hohen Vergrößerungen in I und K entsprechen sie 50 µm. 35

**Abbildung 16. Fate Mapping mit RFP im Altersvergleich an P7, P15 und P30.** Hippocampus der Maus im Frontalschnitt. Im Fate-Mapping Versuch konnte keine RFP Expression analog zum LIN28A Expressionsmuster festgestellt werden. Zur genaueren Analyse wurden die Zellen jeweils vergrößert dargestellt (B aus A, D aus C und F aus E). Der Messbalken in A, C und E entspricht 250 µm, die hohen Vergrößerungen in B, D und F entsprechen 100 µm. 36

**Abbildung 17 Mit *Ctnnb1(ex3)*mCherry transfiizierte HEK 293 T Zellen in verschiedenen Farbkanälen.** Bild A: Alle Farbfilter, hier sind Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen sichtbar. Bild B: Farbfilter B zeigt zuvor grün angefärbtes *Ctnnb1(ex3)* an, Bild C: Farbfilter C zeigt mCherry an (rot), Bild D: 4,6 Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, blau) zeigt Doppelstrang-DNA an. Die Pfeile zeigen die erfolgreich transfezierten Zellen. 37

**Abbildung 18: MTT-Assay zur Ermittlung der Zellviabilität.** Graphen verschiedenfarbig markiert. Schwarz: IRES-GFP, Grün: LIN28A IRES-GFP, Gelb: LIN28A IRES-GFP+Ctnnb1 (131N)-IRES-mCherry, Rot: Ctnnb1 (131N)-IRES-mCherry) 38



# 1 Einleitung

## 1.1 Embryonale Tumoren mit vielschichtigen Rosetten

Im Jahr 2000 wurden embryonale Tumoren mit vielschichtigen Rosetten (engl. *Embryonal Tumor with Multilayered Rosettes, ETMR*) erstmals histologisch beschrieben (Eberhart, Brat et al. 2000, Paulus and Kleihues 2010). Ihr Auftreten im frühkindlichen Alter und die Neigung, ausgeprägte Rosettenstrukturen zu bilden, sollten dieser Tumorentität später seinen Namen verleihen. Histopathologisch wurden ETMRs noch viele Jahre einer der drei embryonalen, rosettenformenden, neuroepithelialen Tumorentitäten (Ependymoblastome, Medulloepitheliome, *Embryonal Tumors with Abundant Neuropil and true Rosettes, ETANTR*) zugeordnet. Aufgrund ihrer molekulargenetischen und klinischen Gemeinsamkeiten, allen voran die Amplifikation des *C19MC* Clusters, bilden die drei Entitäten nun zusammen die Gruppe der Embryonalen Tumoren mit vielschichtigen Rosetten (ETMRs) (Korshunov, Sturm et al. 2014). Seit 2016 hat die WHO diese eigene Tumorentität auch in ihre ZNS-Tumor-Klassifikation aufgenommen (Louis, Perry et al. 2016).

### 1.1.1 Klinik und Epidemiologie von ETMRs

Embryonale Tumoren mit vielschichtigen Rosetten treten im frühen Kindesalter auf und gehen mit einer sehr schlechten Prognose einher. Trotz intensiver Bestrahlungs- und Chemotherapie versterben die Kinder im Durchschnitt innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung (Eberhart, Brat et al. 2000, Gessi, Giangaspero et al. 2009). Mädchen erkranken häufiger in einem Verhältnis von ca. 1,56:1 und die Patienten werden im Median 2,9 Jahre alt (Picard, Miller et al. 2012).

### 1.1.2 Molekulare Alterationen und Histopathologie in ETMRs

Aufgrund ihrer spezifischen Immunhistochemie und ihrer molekularen Eigenschaften lassen sich embryonale Tumoren mit vielschichtigen Rosetten jedoch mittlerweile einer eigenständigen Tumorentität zuordnen, die wie folgt charakterisiert ist.

#### 1.1.2.1 Histologische Charakterisierung von ETMRs

Histologisch sind ETMRs von mittelgroßen, rundlichen, hyperchromatischen Zellen gekennzeichnet, die sich eng aneinander anlagern. Die so entstandenen,

zellreichen Areale werden von fibrillärem, anukleärem Neuropil durchzogen (Eberhart, Brat et al. 2000). Die Tumorzellen zeigen immunhistochemisch ein positives Signal für Synaptophysin und Neurofilament. Während Nekrosen selten sind, kommen viele mitotische und apoptotische Zellen vor.

Namensgebend für diese Tumorentität sind jedoch die unterschiedlich gearteten Rosetten, die im Tumorgewebe zu identifizieren sind. Neben perivaskulären Rosetten und solchen, deren Lumen mit Debris gefüllt ist, lassen sich auch sogenannte „Homer Wright Rosetten“ finden. Diese lagern sich typischerweise um Neuropil herum und sind an neuronalen Differenzierungsprozessen beteiligt (Wippold and Perry 2006).

#### **1.1.2.2 Das C19MC Cluster und seine Fusion mit TTYH1 in ETMRs**

Mikro-RNAs sind kurze, regulatorische RNA-Sequenzen (ca. 22 Basenpaare), die beispielsweise den Zellzyklus beeinflussen können. Sie steuern dabei die Zellsynthese, das Zellüberleben und schließlich auch Apoptoseprozesse (Bar, Wyman et al. 2008). Kommt es zum Ungleichgewicht zwischen den Mikro-RNAs, kann dies Ausgangspunkt für die Entwicklung einer malignen Erkrankung sein (Esquela-Kerscher and Slack 2006).

Auch ETMRs wurden hinsichtlich ihrer Veränderungen im Bereich der Mikro-RNAs analysiert. Hierbei konnte eine Amplifikation eines für Mikro-RNAs kodierenden Genclusters auf dem Genlocus Chr19q13.41-42 gefunden werden (Li, Lee et al. 2009). Bei der Amplifikation des C19MC Clusters handelt es sich um eine seltene genetische Alteration, die tumorspezifisch ist (Korshunov, Remke et al. 2010) und die ETMRs von anderen ZNS-Tumoren abgrenzt (Louis, Perry et al. 2016). Dieser Gencluster ist mit 100 kb einer der größten, die bisher identifiziert wurde (Bentwich, Avniel et al. 2005). Er kodiert u.a. für große Mengen der Mikro-RNAs miR-517c und 520g, welche wachstumsfördernd auf undifferenzierte, neurale Stammzellen wirken und so auch das Zellüberleben verlängern (Li, Lee et al. 2009).

Der C19MC Cluster ist in ETMRs mit dem TTYH1 Gen fusioniert (Kleinman, Gerges et al. 2014). TTYH1 ist in neuralem Gewebe in embryonalen Stammzellen nachweisbar (Suzuki and Mizuno 2004). Durch die Fusion des hochaktiven, neuronalen Promotors mit dem C19MC Cluster kommt es zur Überexpression jener miRNAs, die von diesem Cluster aus synthetisiert werden.

Die Veränderung des C19MC Clusters und seine Fusion mit TTYH1 sind daher zurzeit verstärkt in den Fokus Forschung gelangt.

### 1.1.2.3 Alterationen von Entwicklungskontrollsignalwegen

Bei der molekularen Analyse eines Tumors ist es höchst relevant, welche Signalwege in der Tumorgenese eine Rolle spielen. In vielen Fällen maligner Tumorerkrankungen liegen mutierte Gene in Kontrollsignalwegen, die für die physiologische Entwicklung des Organismus essentiell sind, vor und es kommt zum ungehemmten Wachstum. Oft stellen einzelne Schlüsselproteine dieser Entwicklungskontrollsignalwege spezifische Ansatzpunkte für pharmakologische Therapien dar (*targeted therapy*).

Bei der genetischen Analyse des C19MC Clusters ist bereits aufgefallen, dass die Überexpression der Mikro-RNA miR-520g mit einer Erhöhung von WNT-spezifischen Zielstrukturen einhergeht (Li, Lee et al. 2009). Der WNT-Signalweg ist hochkonserviert und wurde schon recht früh in Verbindung mit malignen Erkrankungen gebracht (Nusse and Varmus 1982).

In einer später durchgeführten, integrativen Genomanalyse verschiedener primitiv-neuroektodermaler Tumoren des Zentralnervensystems (ZNS-PNETs) konnte im Jahr 2012 eine Überexpression verschiedener Zielgene aus dem WNT- und dem Sonic Hedgehog Signalweg gefunden werden (Picard, Miller et al. 2012). Diese betraf genau die Tumoren, die eine Amplifikation des C19MC Cluster aufwiesen, also solche, die heute zu den ETMRs gezählt werden (Korshunov, Ryzhova et al. 2012, Picard, Miller et al. 2012).

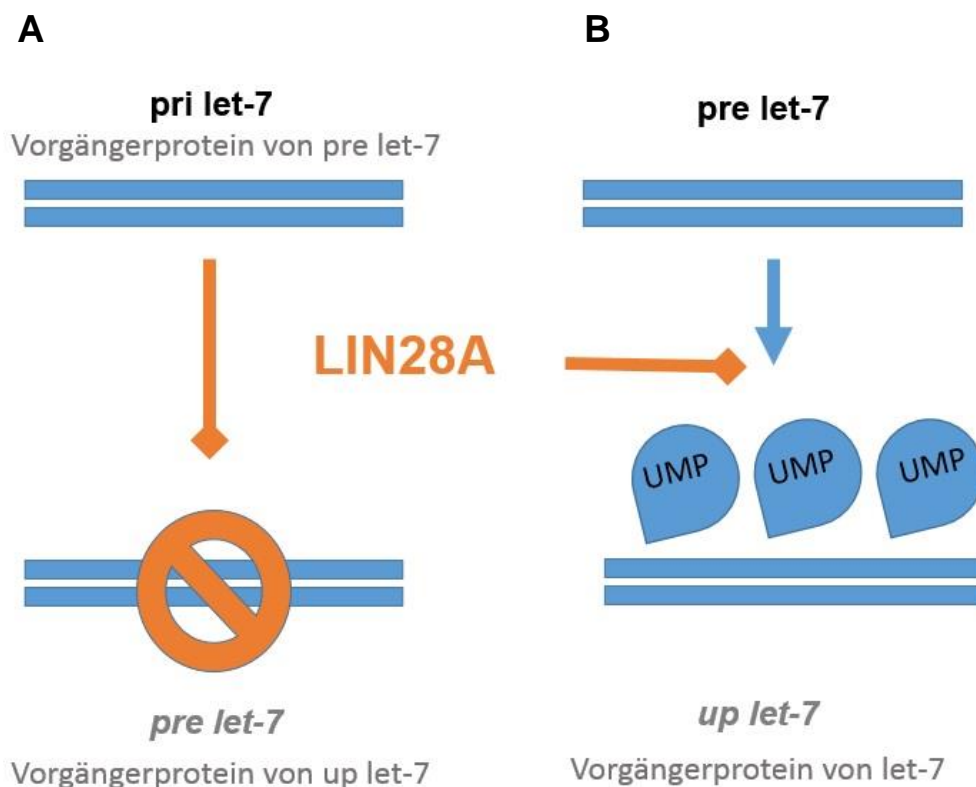
Die Frage, ob Mutationen im WNT- und Sonic Hedgehog Signalweg ursächlich für die Entstehung von ETMRs sein könnten, bildete die Grundlage für präklinische Studien. Hierzu wurde ein Mausmodell entwickelt (Neumann, Wefers et al. 2017) bei dem sowohl der WNT, als auch der Sonic Hedgehog Signalweg gleichzeitig in hGFAP positiven neuronalen Vorläuferzellen der Maus konstitutiv aktiv ist. In solchen Mäusen kam es zur Ausprägung größerer, hochproliferativer Tumoren des Großhirns, die in Bezug auf ihre Morphologie, Genexpression und Klinik ETMRs ähneln. Diese Befunde zeigen, dass beide Signalwege in Kooperation entscheidend für die Entwicklung von ETMRs sind.

### 1.1.2.4 Hochregulierung von LIN28A in ETMRs

Neben der genetischen Alteration des C19MC Clusters lassen sich embryonale Tumoren mit vielschichtigen Rosetten auch durch eine spezifische Immunhistochemie diagnostizieren. Hierzu wird das Protein LIN28A mit einem Antikörper nachgewiesen. LIN28A ist hochspezifisch für ETMRs und stellt einen hochsensiblen und äußerst potenten Marker in der histologischen Diagnostik dar (Korshunov, Ryzhova et al. 2012, Spence, Sin-Chan et al. 2014). Bei LIN28A handelt es sich um ein Protein, welches Bindungsstellen für RNA aufweist und in

embryonalen Stammzellen exprimiert wird (Skottman, Mikkola et al. 2005). Die Expression von LIN28A ist in frühen Entwicklungsstadien hochreguliert und nimmt im Zuge der Zelldifferenzierung ab (Moss and Tang 2003). LIN28A wird mit einer Dedifferenzierung von somatischen Zellen in pluripotente Zellen in Zusammenhang gebracht (Yu, Vodyanik et al. 2007, Hanna, Saha et al. 2009), was in Einklang mit der klinischen Beobachtung steht, dass LIN28A in einem undifferenzierten, malignen Tumor auftritt. Die eigentliche Funktion von LIN28A ist bis heute nicht abschließend aufgeklärt. Aufschlussreich ist allerdings ein negativer Zusammenhang von LIN28A und let-7, der in molekularen Analysen gezeigt werden konnte (Viswanathan, Daley et al. 2008). Die Gruppe der let-7 miRNAs wird mit wachstumshemmenden und zelldifferenzierungsfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht und kann so den Tumor-Suppressor-miRNAs zugeordnet werden (Bussing, Slack et al. 2008).

Hierbei stellte sich heraus, dass LIN28A Vorstufen der let-7 miRNA binden und seine Prozessierung so verhindern kann (Abb. 1).



**Abbildung 1. Die Inhibition von let-7 durch LIN28A.** LIN28A nutzt verschiedene Mechanismen, um die Prozessierung von let-7 zu verhindern. In A wird die Entstehung von pre let-7 direkt gehemmt. In Bild B kommt es zwar noch zur Entstehung von up-let 7 aus pre let-7, dieses wird aber schon während seiner Entstehung uridyliert und kann so nur noch abgebaut werden (Winter, Jung et al. 2009).

Die Gruppe der let-7 miRNAs wird mit wachstumshemmenden und zelldifferenzierungsfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht und kann so den Tumor-Suppressor-miRNAs zugeordnet werden (Bussing, Slack et al. 2008).

## 1.2 Fragestellung

Nachdem o.g. Vorarbeiten gezeigt haben, dass sich Embryonale Tumoren mit vielschichtigen Rosetten nicht nur durch klinische und histologische Merkmale, sondern auch spezifisch durch die hohe Expression von LIN28A abgrenzen lassen, ist die Aufgabe dieser Arbeit, zu untersuchen, welchen Einfluss eine Überexpression von LIN28A in neuronalen Vorläuferzellen auf die Entwicklung des Maushirns hat. Insbesondere ist zu analysieren, ob die transgenen Tiere (*hGFAP-cre::lox-STOP-lox-Lin28A*) einen Phänotyp entwickeln und möglicherweise sogar Tumoren ausbilden, die humanen ETMRs ähneln.

In einem präklinischen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Hochregulation des WNT-Signalweges zusammen mit anderen Einflussfaktoren zur Ausbildung von ETMR-ähnlichen Tumoren geführt hat. Im zweiten Teil der Arbeit soll nun untersucht werden, welchen Einfluss eine Hochregulation des WNT Signalweges in Kombination mit LIN28A auf neurale Vorläuferzellen der Maus hat. Es soll beschrieben werden, ob und welche Veränderungen *in vitro* bei gleichzeitigem Einfluss von hochreguliertem LIN28A und aktiviertem Wnt-Signalweg auftreten.

## 2 Methoden

### 2.1 Transgene Mäuse

#### 2.1.1 *hGFAP-cre* Maus

Die *hGFAP-cre* Maus exprimiert in allen *hGFAP*-positiven Zellen die cre-Rekombinase. Die cre-Rekombinase setzt an zwei identischen Gensequenzen an, den sogenannten loxP Sequenzen. Diese Abschnitte flankieren ein funktionelles Genfragment, das durch die Interaktion von cre-Rekombinase und loxP-Sequenzen durch Rekombination entfernt wird (Kuhn and Torres 2002). Neben reifen Astrozyten ist der *hGFAP* Promotor auch in neuronalen Vorläuferzellen mehrerer Hirnareale aktiv, zum Beispiel im Bereich des Cerebellums, des Bulbus Olfactorius, des Hippocampus und des Neocortex (Zhuo, Theis et al. 2001). Zur PCR-basierten Detektion der Sequenzen, die für die cre-Rekombinase innerhalb der *hGFAP-cre* Maus kodieren, wurden die Primer *hGFAP Fw* sowie *hGFAP Rv* genutzt (Zhuo, Theis et al. 2001) (Tabelle 2).

### 2.1.2 *TdTomato* Maus

Die *tdTomato*-Maus trägt ein Reporter-Gen. Dabei handelt es sich um ein Gen, welches Aktivitäten anderer Gene, beispielsweise bestimmter Promotoren, qualitativ sichtbar machen kann. Besonders nützlich ist diese Technik, wenn es nötig ist, abgelaufene Expressionsmuster später nachvollziehen zu können. Aufgrund dieser Eigenschaft heißt die Methode, ein Reporter-gen einzusetzen, auch „Fate Mapping“ (Soriano 1999). Das *tdTomato*-Protein beispielsweise, welches in der *tdTomato* Maus abhängig von der Aktivität einer cre-Rekombinase exprimiert wird, kann später immunhistochemisch (siehe 2.3) mit Antikörpern gegen *Red Fluorescent Protein* (RFP) nachgewiesen werden.

Ob die Maus das Reporter-gen trägt, lässt sich mit den Primern *tdTomato Fw wildtyp*, *tdTomato Rv wildtyp*, *tdTomato Fw wildtyp*, *tdTomato Rv knockin* detektieren (Tabelle 2)(Madisen, Zwingman et al. 2010).

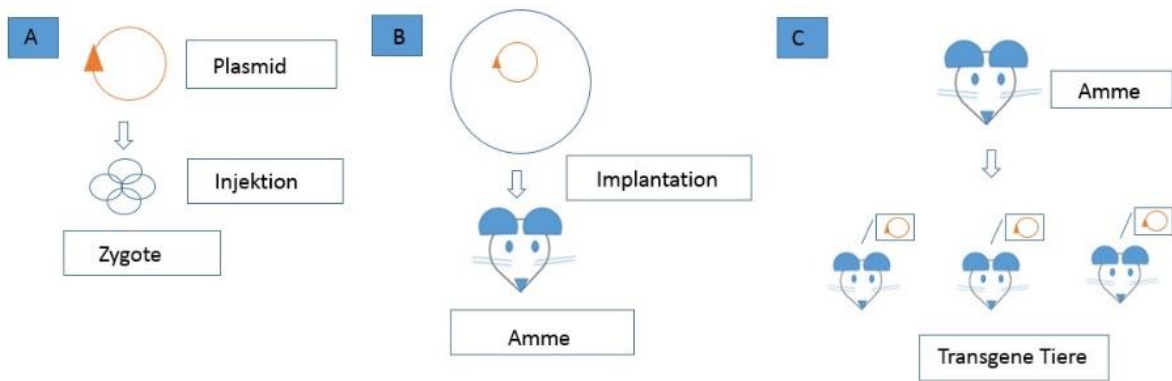
### 2.1.3 *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus

Die *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus, die uns mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Markoto Mark Taketo (Kyoto University, Kyoto) zur Verfügung gestellt wurde, trägt ein modifiziertes Beta-Catenin-Gen (*Ctnnb1(ex3)*). Exon 3 des Gens ist für den Abbau von Beta-Catenin funktionell wichtig. Dieses Exon ist von loxP Sequenzen flankiert, sodass es bei einer Rekombination durch die cre-Rekombinase herausgeschnitten wird (Harada et al., 1999). Die Interaktion mit der cre-Rekombinase führt letztlich zur konstitutiven Expression von Beta-Catenin (siehe 2.2.6.).

Zur Detektion des *Ctnnb1(ex3)* Allels wurden die Primer *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup> Fw* und *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup> Rv* genutzt (Tabelle 2) (Harada, Tamai et al. 1999).

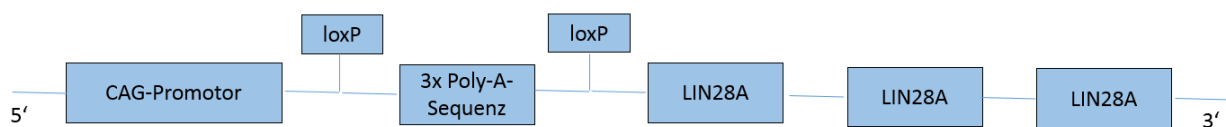
### 2.1.4 LIN28A Maus

Das Transgen der LIN28A Maus wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. Marlon Schneider (Genzentrum, LMU München) per DNA Mikroinjektion in das Genom der Tiere eingebracht (Abb. 2).



**Abbildung 2. Die DNA-Mikroinjektion.** Verfahren, bei dem ein fremdes Plasmid in Maus-Zygoten injiziert wird (A). Diese Zygote wird in den Eileiter einer Amme implantiert (B) und kann nun, nach erfolgreicher Einnistung, bis zur Geburt reifen (C).

Das im Nachfolgenden beschriebene Plasmid durfte mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Kobayashi (Massachusetts General Hospital, Harvard, Boston) genutzt werden. In Abbildung 3 ist der Aufbau der Gensequenz veranschaulicht. Das Plasmid enthält drei nacheinander geschaltete Gensequenzen, die für LIN28A kodieren. Vor diesen Gensequenzen befindet sich eine sogenannte loxP-Stop-loxP-Kassette, also dreifach repetitive Poly-Adenylierungssequenzen, die eine Ablesung der LIN28A-Genabschnitte verhindern. Diese Poly-Adenylierungs-Kassette wird von zwei lox-P-Sequenzen flankiert, die eine spätere Rekombination mit einer cre-Rekombinase ermöglichen (Kuhn and Torres 2002). Vor der loxP-Stop-loxP-Kassette befindet sich ein starker synthetischer CAG-Promotor (Miyazaki, Takaki et al. 1989), der zu einer kontinuierlichen Transkription der auf ihn folgenden Gensequenz führt.



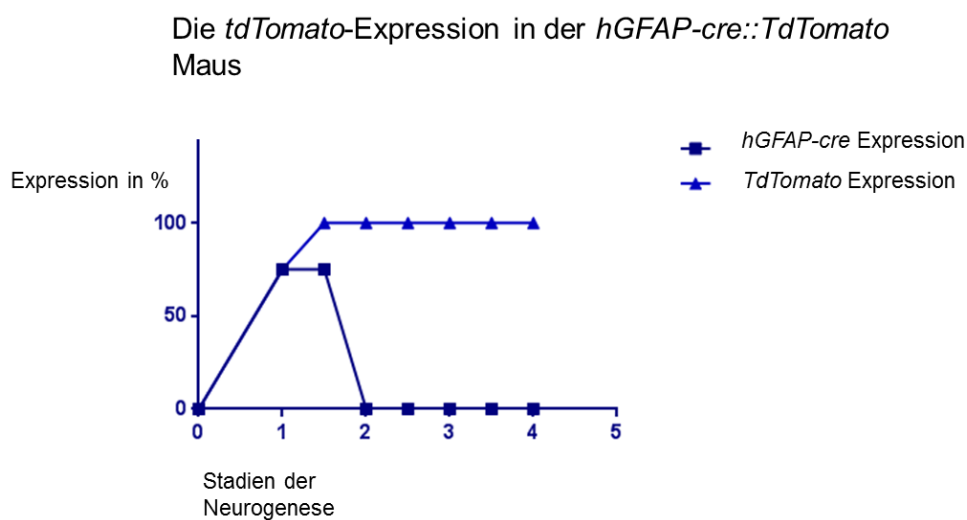
**Abbildung 3. Das LIN28A Transgen.** Ohne Rekombination mit einer cre-Rekombinase kommt es bei der transgenen Maus nicht zur Transkription der 3 LIN28A Sequenzen.

Zur Detektion der Sequenz, die für LIN28A kodiert, wurden die Primer LIN28A Fw und LIN28A Rv genutzt (Tabelle 2).

### 2.1.5 *hGFAP-cre::tdTomato* Maus

Die *hGFAP-cre::tdTomato* Maus wurde durch die Verpaarung einer *hGFAP-cre*-positiven Maus mit einer *tdTomato* Maus generiert. Zum Nachweis von tdTomato und der Sequenzen, die für die cre-Rekombinase innerhalb der *hGFAP-cre* Maus kodieren, wurden die in 2.2.1 und 2.2.2 genannten Primer genutzt.

Bei der *hGFAP-cre::tdTomato* Maus wird die Technik des *fate mappings* (Vogt et al., 1929) genutzt. Mithilfe dieser Technik können Zellen, deren Entstehung durch mittlerweile inaktive Promotoren ermöglicht wurde, auch nach Ende der Expressionsphase der Promotoren noch sichtbar gemacht werden. Im Falle der *hGFAP-cre::tdTomato* Maus rekombiniert jede Vorläuferzelle, die einen aktiven *hGFAP*-Promotor hat, die Stop Sequenz vor der *tdTomato* Sequenz und exprimiert daher tdTomato. Im adulten Tier können nun immunhistochemisch mit Antikörpern gegen *red fluorescent protein* (RFP) alle Zellen angefärbt werden, die jemals einen aktiven *hGFAP*-Promotor gehabt haben oder zum Zeitpunkt der Analyse haben.



**Abbildung 4. Die tdTomato-Expression in der *hGFAP-cre::TdTomato* Maus.** Obwohl die *hGFAP-cre* Rekombinase nach Stadium 1 der Neurogenese (Proliferationsstadium) nicht mehr aktiv ist (von Bohlen Und Halbach 2007), wird in rekombinierten Zellen fortlaufend tdTomato exprimiert.

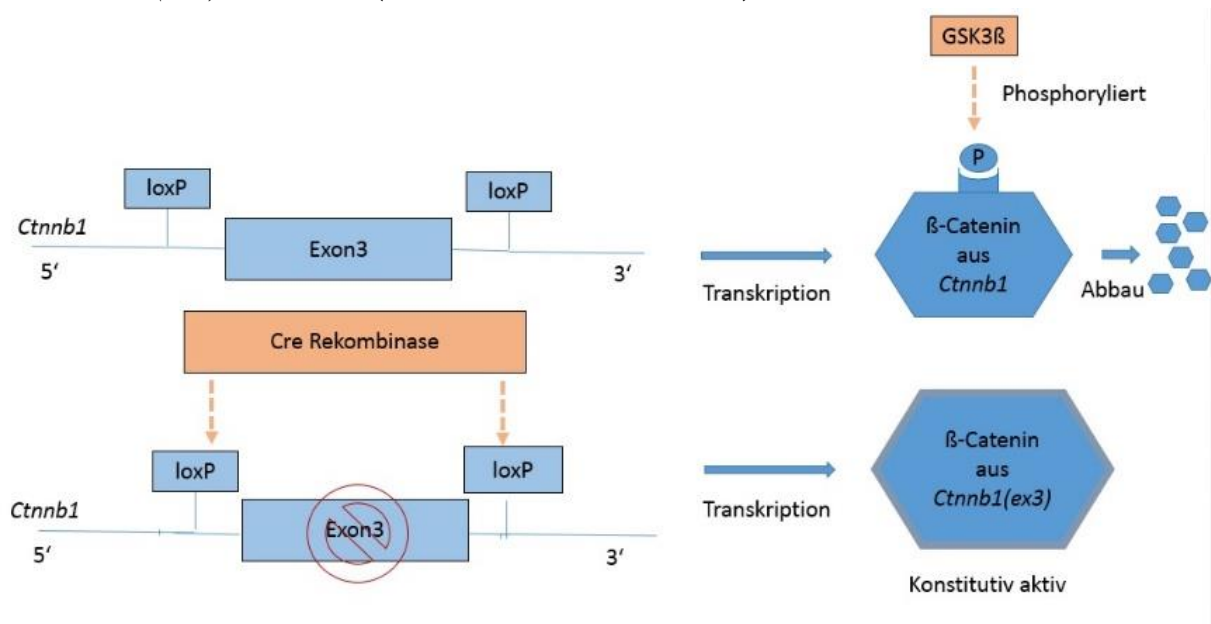
### 2.1.6 *hGFAP-cre::Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus

Die *hGFAP-cre::Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus wurde durch Verpaarung der *hGFAP-cre* Maus mit der *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus generiert. Zum Nachweis von gefloxtem *Ctnnb1* und der Sequenzen, die für die cre-Rekombinase innerhalb der *hGFAP-cre* Maus kodieren, wurden die in 2.2.1 und 2.2.3 genannten Primer genutzt.

Die *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus trägt ein modifiziertes Beta-Catenin Gen. Exon 3 des Gens ist von loxP Sequenzen flankiert, sodass es bei einer Rekombination durch die cre-Rekombinase herausgeschnitten werden kann (Harada et al., 1999). Exon 3 hat eine wichtige Funktion im Abbau von Beta-Catenin. So kodiert es eine Proteindomäne, die durch die Glykogen Synthase 3 Beta (GSK $\beta$ ) phosphoryliert



werden kann. Die Phosphorylierung durch die GSK3 $\beta$  ist wiederum das Signal zum Abbau von Beta-Catenin (Harada, Tamai et al. 1999). Kommt es nun zur Rekombination, wird Exon 3 entfernt und Beta-Catenin verliert die für seinen Abbau essentiellen Phosphorylierungsstellen (Harada, Tamai et al. 1999). Durch den fehlenden Abbau von Beta-Catenin kommt es zur Akkumulation und Translokation in den Kern. Dort bindet Beta-Catenin dauerhaft an den *TCF4* Promotor. Es kommt nun zur konstitutiven Aktivierung des WNT-Signalwegs in der *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus (Barth, Nathke et al. 1997).



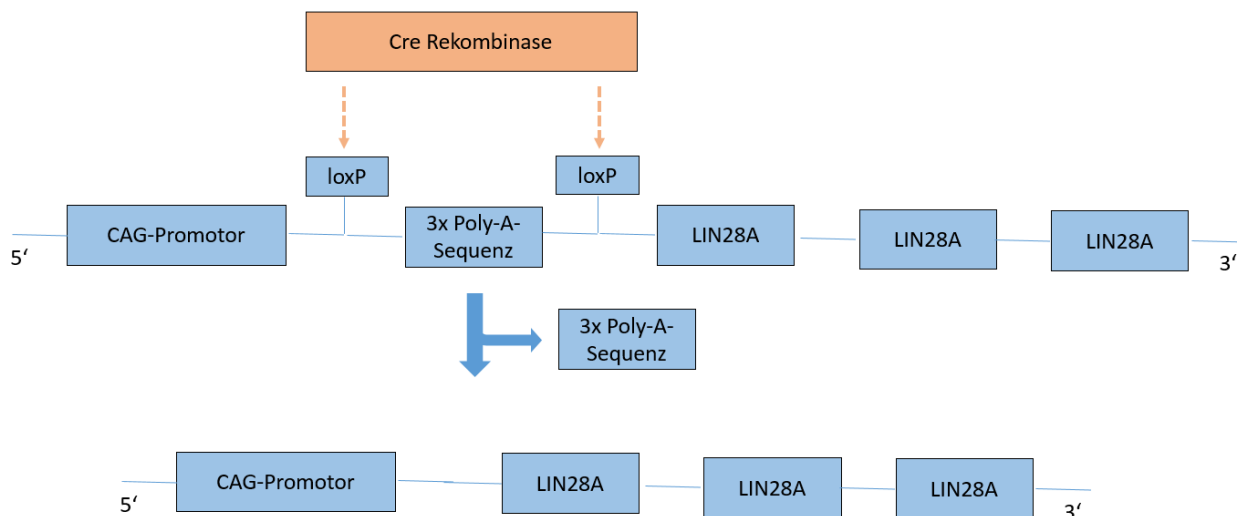
**Abbildung 5. Die Auswirkung des *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Transgens.** Exon 3 des *Ctnnb1* Gens liegt zwischen zwei loxP Stellen und wird bei Interaktion mit der Cre Rekombinase entfernt. Exon 3 kodiert für Proteindomänen des Beta-Catenins, die von der Glykogensynthase 3-Beta phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung ihrerseits führt zum Abbau des Beta-Catenins. Wird Exon 3 herausgeschnitten, kommt es nicht mehr zur Ausprägung der Proteindomänen und infolgedessen auch nicht mehr zur Phosphorylierung und zum Abbau von Beta-Catenin.

### 2.1.7 *hGFAP-cre::Isl-LIN28A* Maus

Die *hGFAP-cre::Isl-LIN28A* Maus wurde durch eine Verpaarung der *hGFAP-cre* Maus (2.2.1) mit der *LIN28A* Maus (2.2.4) generiert. Zum Nachweis von LIN28A und der Sequenzen, die für die cre-Rekombinase innerhalb der *hGFAP-cre* Maus kodieren, wurden die in 2.2.4 und 2.2.2 genannten Primer genutzt.

Bei dieser Maus kommt es zu der oben beschriebenen Rekombination durch die cre-Rekombinase in hGFAP positiven Zellen in der LIN28A Maus. Die Poly-A-Stop-Kassette (s. Abb. 6) wird durch Rekombination entfernt und es kommt zur

stabilen, kontinuierlichen Proteinexpression von LIN28A in allen *hGFAP*-positiven Zellen und deren Nachfahren.



**Abbildung 6. Die LIN28A Überexpression in der *hGFAP-cre::LIN28A* Maus.** Die Poly-A-Stop-Kassette im Transgen der Maus wird durch Rekombination mit der *cre*-Rekombinase herausgeschnitten. LIN28A wird unter dem CAG Promotor konstitutiv exprimiert.

Um Zellvolumen und Neocortexdicke bestimmen zu können, wurden Messungen bei jeweils 3 Tieren des Genotyps *hGFAP-cre::Isl-LIN28A* im Vergleich zum Kontrolltier durchgeführt (n=3). Hierzu wurde Lamina V des Neocortex vermessen. Das Zellvolumen wurde mit der Formel:

$$V_{cell} = \frac{1}{12} \times b^2 \pi a$$

berechnet (wobei a der Höhe des Neurons und b dem maximalen Durchmesser des Neurons entspricht). Um die Neocortexdicke zu vermessen, wurden in drei Ebenen (oberhalb, lateral und unterhalb des Hippocampus, frontal angeschnitten) Mehrfachmessungen durchgeführt.

### 2.2.8 *hGFAP-cre::Isl-LIN28A, Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup> Maus*

Die *hGFAP-cre::Isl-LIN28A, Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus wurde durch Verpaarung der *hGFAP-cre::Isl-LIN28A* Maus mit der *Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus generiert. Zum Nachweis von LIN28A, Ctnnb1 und der Sequenzen, die für die *cre*-Rekombinase innerhalb der *hGFAP-cre* Maus kodieren, wurden die in 2.2.1, 2.2.3 und 2.2.4 genannten Primer genutzt.

In der *bGFAP-creLIN28A::Ctnnb1(ex3)<sup>F1/F1</sup>* Maus kommt es sowohl zur stabilen Überexpression von LIN28A (2.2.7), als auch zur Deletion von Exon 3 des *Ctnnb1* Gens und damit zur Hochregulation des WNT-Signalwegs (2.2.6).

## 2.2 Genotypisierung

Zur Bestimmung des korrekten Genotyps muss die DNA der präparierten Tiere gewonnen werden. Hierzu werden Ohr- oder Schwanzbiopsien verwendet. Jede Biopsie wird mit 500 µl Laird's Lysis Buffer (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS und 100 mM Tris Buffer (pH 8,5)) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und für 2 Std. im Thermoschüttler für 2 Stunden bei 55°C lysiert.

Anschließend werden die Proben bei 11.000 x g bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wird anschließend in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. Danach werden 500 µl Isopropanol hinzugefügt, sodass die DNA ausfällt.

Um die ausgefallene DNA vom Überstand zu trennen, wird die Probe nun nochmals bei 14.000 U für 5 Minuten zentrifugiert. Nun ist ein DNA Pellet entstanden. Das übrige Isopropanol kann abpipettiert und verworfen werden, während das Pellet in DEPC Wasser resuspendiert wird. Die gewonnene DNA Probe kann bei 4°C gelagert werden.

Zur Genotypisierung wird das gesuchte Transgen in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Untenstehend sind die Standardbedingungen einer Genotypisierungs PCR dargestellt.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Vorinkubation	95	120
Denaturierung	95	30
Primer Hybridisierung	60	30 (35 Zyklen)
Elongation	72	60
Stop	4	∞

**Tabelle 1. PCR Bedingungen einer Genotypisierung.**

Die zur Genotypisierung genutzten Primerpaare sind in der untenstehenden Tabelle 2 aufgeführt.

Primerbezeichnung	Primersequenz	Annealing Temperatur
<i>hGFAP</i> Fw	5'- ACTCCTTCATAAA GCCCTCG - 3'	65°C
<i>hGFAP</i> Rv	5'- ATCACTCGTTGCA TCGACCG - 3'	
<i>tdTomato</i> Fw wildtyp	5'-AAGGGAGCTGCA GTGGAGTA - 3'	60°C
<i>tdTomato</i> Rv wildtyp	5'- CCGAAAATCTGTG GGAAGTC- 3'	
<i>tdTomato</i> Fw knockin	5'- GGCATTAAAGCAG CGTATCC- 3'	60°C
<i>tdTomato</i> Rv knockin	5'-CTGTTTCCTGTACG GCATGG - 3'	
<i>Ctnnb1(ex3)<sup>Fl/Fl</sup></i> Fw	5'- CGTGGACAATGGCTACTC AA - 3'	60°C
<i>Ctnnb1(ex3)<sup>Fl/Fl</sup></i> Rv	5'- TGTCCAACCTCCATCAGGT CA - 3'	
<i>LIN28A</i> Fw	5'- ATCTTATCATGTCTGGAT CCCC - 3'	58°C
<i>LIN28A</i> Rv	5'- CGCAGTTGTAGCACCTGT CTC- 3'	

**Tabelle 2. Primerpaare, die zur Genotypisierungs-PCR in Anlehnung an Originalpublikationen genutzt wurden.**

Das amplifizierte DNA-Fragment wird daraufhin zusammen mit einem interkalierenden Farbstoff zur Färbung auf ein Agarose-Gel (siehe Tabelle 9) aufgetragen, an das eine Spannung zwischen 150 und 250 Volt angelegt wird. Die DNA-Fragmente wandern nun entlang des Spannungsgradienten und trennen sich der Länge nach auf (kurze DNA Fragmente wandern weit, lange DNA-Fragmente bleiben näher am Ausgangspunkt). Mithilfe einer DNA-Leiter, die aus DNA-

Fragmenten unterschiedlicher Länge besteht, lassen sich die Größen der entstandenen Fragmente nach abgeschlossener Gelelektrophorese abschätzen. Dies geschieht unter UV-Licht.

## 2.3 Histologie und Immunfärbungen

Nach der Präparation des Maushirns wird es in 4 % Formaldehyd bei 4°C über Nacht fixiert. Für Hämatoxylin und Eosin (H & E) Färbungen und immunhistochemische Reaktionen wird das Gewebe in Paraffin eingebettet, mit einer Dicke von 4 µm vom Paraffinblock geschnitten und anschließend rehydriert. Für H & E Färbungen folgen nun mehrere Färbeschritte mit Eosin, Hämatoxylin und Alkohol zur Fixation. Diese Färbetechnik basiert auf eosinophilen bzw. basophilen Eigenschaften des anzufärbenden Gewebes. Die immunhistochemischen Färbungen hingegen basieren auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion des zu färbenden Gewebes. Man kann eine direkte immunhistochemische Färbung, bei der der Antikörper unmittelbar an eine Markersubstanz gekoppelt ist, von einer indirekten immunhistochemischen Färbung unterscheiden. Bei letzterer wird ein sogenannter Primärantikörper, der mit dem Epitop des Gewebes ein Antigen-Antikörper-Komplex bildet, appliziert. Anschließend wird ein Sekundärantikörper mit Markersubstanz aufgetragen. Mit WFS handelt es sich um einen Transmembran-Ionenkanal, der kationen-selektiv ist und vorwiegend im CA 1 Bereich des Cornu Ammonis zu finden ist (Takeda, Inoue et al. 2001, Osman, Saito et al. 2003). HUB bezeichnet ein mRNA-bindendes Protein aus der Hu-Familie, das vorwiegend im CA3 Bereich des Cornu Ammonis exprimiert wird (Good 1995, Hinman and Lou 2008, Ohtsuka, Yano et al. 2015). Eine Übersicht der verwendeten Antikörper ist in Tabelle 3 zu finden.

Die histologische Bildgebung wurde mit den Olympus Bx41 und Bx50 Mikroskopen, sowie der Cell Software oder dem Color View Soft Imaging System von Olympus durchgeführt.

Name des Antikörpers	Herstellerfirma und Katalognummer	Verdünnung, in der der Antikörper einzusetzen ist
Beta-Catenin	BD, 610153	1:1500
Ki67	Abcam, ab16667	1:200
HUB	Sigma, H1538	1:200
LIN28A	Cell Signaling Tech, 3978	1:50

NeuN	Chemicon (Millipore), AB5922	1:300
RFP	Antibodies online, AA234	1:200
WFS	Acris Antibodies, 11558- 1-AP	1:50

Tabelle 3. Antikörper der immunhistochemischen Färbungen.

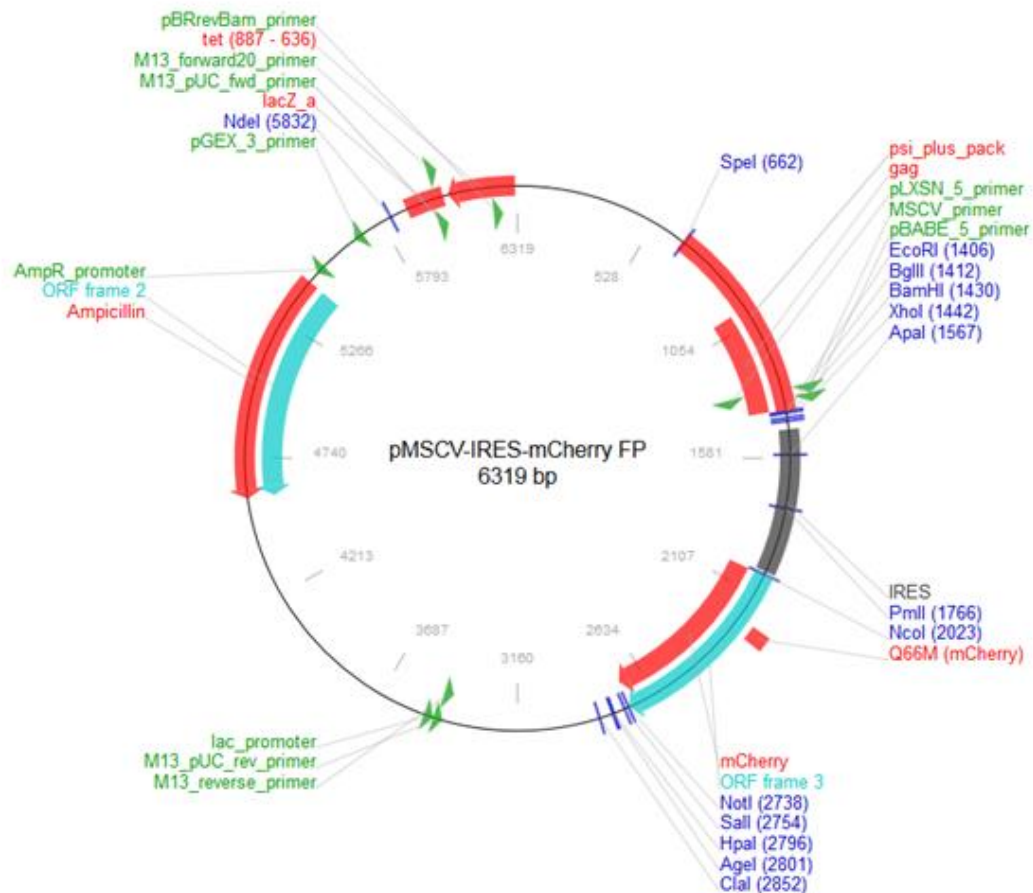
## 2.4 Transduktion von neuronalen Vorläuferzellen der Maus mit alteriertem Beta-Catenin und LIN28A

### 2.4.1 Produktion von Viren zur Transduktion von *Ctnnb1 (ex3)* und *LIN28A* in neurale Vorläuferzellen der Maus

Hierzu wurde ein Plasmid kloniert, welches sowohl das transgene Beta-Catenin *Ctnnb1 (ex3)*, als auch die Zielsequenz für das rot fluoreszierende Protein *mCherry* enthält. Der Ausgangsvektor für die Klonierung war das Plasmid *pMSCV-IRES-mCherry FP* (<https://www.addgene.org/52114/>). In Abbildung 7 befindet sich die zugehörige Plasmidkarte. Der Vektor besteht aus insgesamt 6319 bp. Im Vektor befindet sich neben der fluoreszierenden *mCherry* Sequenz auch eine IRES-Sequenz (interne ribosomale Eintrittsstelle), die die Translation der *mCherry* mRNA am Ribosom möglich macht. Jedes Mal, wenn das eingefügte Gen transkribiert wird, ist ein rotes Farbsignal zu detektieren.

## Full Sequence Map for pMSCV-IRES-mCherry FP

Generated by Addgene from full sequence supplied by depositor.



**Abbildung 7. Vektorplasmid *pMSCV-IRES-mCherry FP*.** Das Plasmid und die Vektorkarte wurden von addgene erworben (<https://www.addgene.org/52114/>). Auf der Karte sind die verschiedenen Schnittstellen der Restriktionsenzyme zu erkennen, u.a. BamHI und XhoI.

Der Vektor wurde mithilfe Restriktionsenzyme BamHI und XhoI im folgenden Ansatz für 2 Stunden bei 37 °C verdaut:

DNA	1,5 µl (1 µg)
10x NEBuffer 3.1	5 µl
XhoI	1 µl
BamHI	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	41,5 µl
<hr/>	
Restriktionsansatz	50 µl

**Tabelle 4. Restriktionsansatz**

Name	BamHI	XhoI
Schnittstelle	5' ... G↓GATCC ... 3' 3' ... CCTAG↑G ... 5'	5' ... C↓TCGAG ... 3' 3' ... GAGCT↑C ... 5'
Herstellerfirma	New England Biolabs	New England Biolabs

**Tabelle 5. Restriktionsenzyme zur Vektorklonierung und ihre Schnittstellen**

Anschließend wurden die Vektorfragmente mit einer Gelelektrophorese aufgetrennt (Fragment 1: 6307 bp, Fragment 2: 12 bp). Fragment 1 wurde aus dem Gel mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten. Um die DNA aus dem Gel aufzureinigen, wurde eine Gelextraktion mit dem *Gel Extraction Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Verfahren dient einer Aufreinigung der DNA über einen selektiven Filter, der diese bindet. Im letzten Schritt kann dann die aufgereinigte DNA aus der Filtermembran eluiert werden.

Nun musste das Zielgen, welches in den Vektor ligiert werden sollte, aus seinem Ursprungsvektor amplifiziert werden. Hierbei stellte sich die Herausforderung, dass im Zielvektor keine geeigneten Schnittstellen gefunden werden konnten. Daher mussten sogenannte *Overhang Primer* mithilfe des Infusion Cloning System angefügt werden, die komplementär zu den Schnittstellen des Zielvektors waren. Es handelt sich hierbei also um eine Zwei-Fragment-Klonierung mit dem Infusion System von Takara.

Das alterierte *Ctnnb1* enthält insgesamt 2500 bp und wurde in Part I und Part II geteilt. Um Part I (1781 bp) zu amplifizieren, wurde der in Tabelle 6 gezeigte Ansatz genutzt:

<i>Ctnnb1(ex3) Vektorplasmid</i>	0,5	μl
GC Puffer	4,0	μl
dNTPs	0,5	μl
Phusion-Polymerase	0,25	μl
<i>Ctnnb1 Part I Fw</i>	1,0	μl
<i>Ctnnb1 Part I Rv</i>	1,0	μl
ddH <sub>2</sub> O	12,75	μl
<hr/>		
PCR Ansatz	20	μl



**Tabelle 6. Amplifikationsansatz für die PCR des Part I des *Ctnnb1(ex3)* Gens**

<i>Ctnnb1</i> Part I F	5'- CGTAGCTAGCGGATCCCGGTGTCCCGGAAGAAATA- 3'
<i>Ctnnb1</i> Part I Rv	5'- GTGAACATCCCGAGCTAGGA- 3'
<i>Annealing Temperatur: 60°C, 35 Zyklen</i>	

**Tabelle 7. Overhang Primer zur Amplifikation des Part I.**

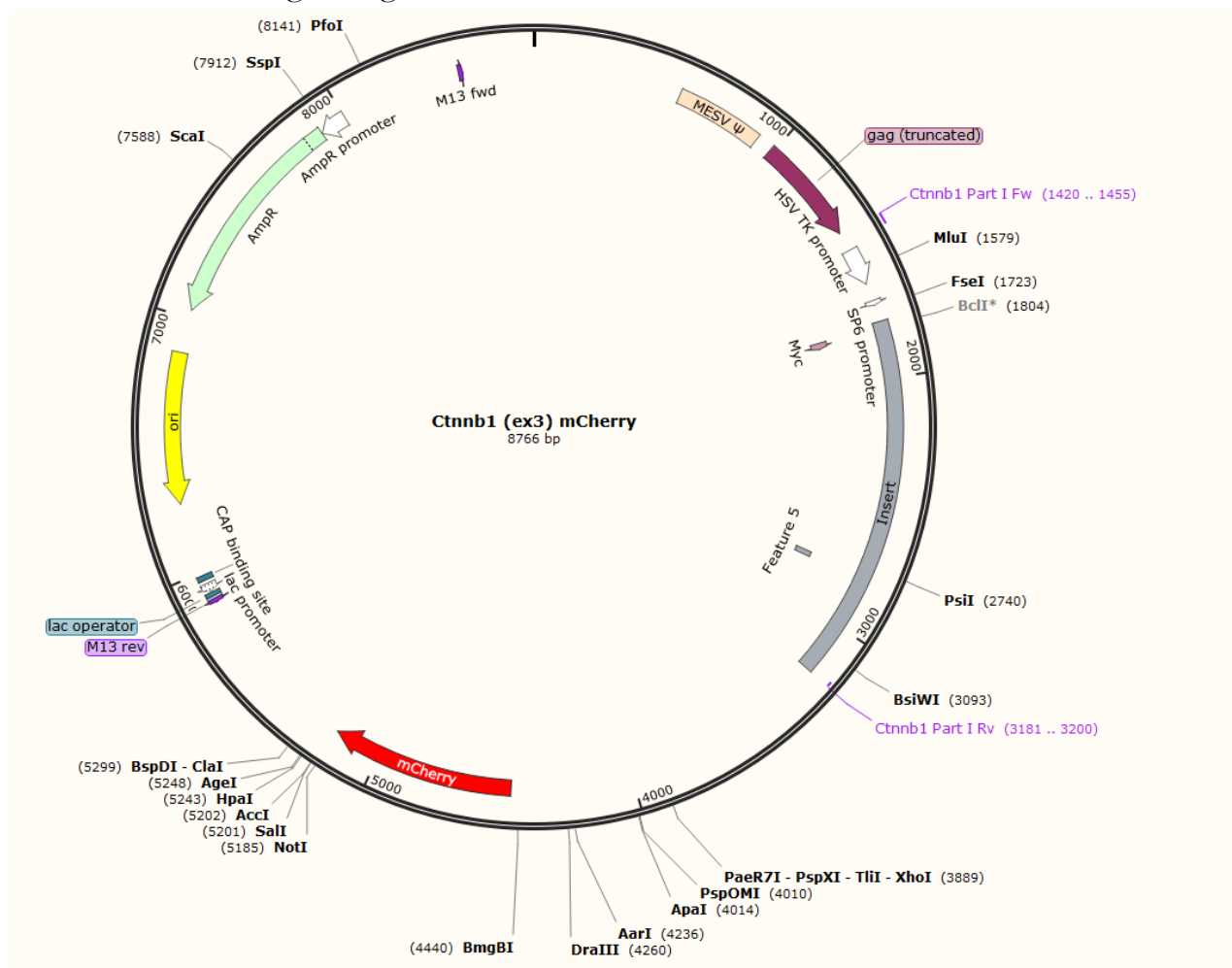
Part II (719 bp) wurde von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert. Beide Teile des modifizierten Beta-Catenins wurden nun zur Ligation mit dem Infusion Ligation Mix (Takara) in folgenden Ansatz gegeben:

Part I (17 ng/μl)	5,9	μl
Part II (25 ng/μl)	4	μl
pMSCV-IRES-mCherry FP	4,4	μl
5x Infusion Enzyme Premix	4	μl
ddH <sub>2</sub> O	1,7	μl
<hr/>		
Ligationsansatz	20	μl
<hr/> <hr/>		

**Tabelle 8. Ligationsansatz nach Infusion Cloning (Takara).**

Nach erfolgreicher Ligation wurde das Plasmid in XL<sub>2</sub>-Zellen transformiert. Dazu wurden BlueX<sub>2</sub> Zellen auf Eis in <5 Min. aufgetaut. Anschließend wurden 5 μl der Plasmidlösung einpipettiert. Dieser Mix wurde 25 Minuten ohne Schütteln auf dem Eis inkubiert. Anschließend wurde das Aliquot für 35 Sekunden auf 42°C erwärmt und danach wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nun wurden 500 μl LB-Medium hinzugegeben und die Probe wurde für 60 Minuten bei 37°C geschüttelt. 70 μl der Probe werden nun auf einer Agarplatte mit Ampicillin als Selektionsmedium ausgespachtelt. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Bakterienkolonie von der bewachsenen Platte gepickt. 5 ml LB-Medium wurden mit der Kolonie im Verhältnis 1:1000 beimpft. Das Medium wurde für 12 Stunden im Schüttler inkubiert. Am 3. Tag wurde die DNA, die die Bakterien aufgenommen hatten, mit einer Miniprep (Qiagen, Kit) nach Herstellerangaben extrahiert. Bei der sogenannten Miniprep wird über eine

Filtermembran die bakterielle DNA gebunden. Anschließend können alle nicht an die Membran gebundenen Zellbestandteile mittels Zentrifugation isoliert werden. Zuletzt wird die aufgereinigte, bakterielle DNA aus dem Filter eluiert.



**Abbildung 8. *Ctnnb1(ex3)mCherry*.** *Ctnnb1(ex3)mCherry* ist durch Ligation von *Ctnnb1 Part I*, *Ctnnb1 Part II* und dem aufgetrennten Vektor *pMSCV-IRES-mCherry FP* entstanden. Das Plasmid enthält 8766 bp.

Nach der Ligation und Sequenzierung von *Ctnnb1 (ex3) mCherry* wurde nun ein Lentivirus produziert, der in der Lage sein sollte, das Plasmid in neurale Vorläuferzellen der Maus einzubringen.

Zur Virusproduktion wurden die *Ctnnb1(ex3)mCherry* Zellen am Vortag ausgesät. Bei 60-80% Bewuchs der Platte wurde das Nährmedium gewechselt und der Transfektionsmix, der neben anderen Bestandteilen (s. Tabelle 9) Verpackungsplasmide des Virus enthält, angesetzt. Zu diesem Transfektionsmix wurde unter ständigem Vortexen HBS hinzugegeben, bevor er tropfenweise zu den Zellen gegeben wurde. Es folgte eine vierstündige Inkubationszeit und ein Austausch des Nährmediums. Dieser Vorgang wurde nach 24 Stunden wiederholt.

Abschließend konnte der Mediumüberstand mit Virus geerntet werden. Dieser Vorgang wurde nach 24 Stunden wiederholt (sog. 2. Virusernte). Nach den Virusernten wurde das Virus enthaltende Medium zentrifugiert, um Zellschrott zu entfernen (2 h, 4°C, 22.000 x g). Der Virus wurde in Aliquots in Serum-freien Medium bei -80°C gelagert.

#### 2.4.2 Kultur neuraler Vorläuferzellen der Maus

Nach abgeschlossener Virusproduktion konnten nun neurale Vorläuferzellen der Maus mit dem Virus transduziert werden. Die Vorläuferzellen wurden postnatal (P0) isoliert. Nach der Dekapitation wurde der Schädel der Maus sorgfältig bis zum Großhirn präpariert. Dieses wurde aseptisch unter Sichtkontrolle von Cerebellum und Hirnstamm abgetrennt. Das Großhirngewebe wurde bei 37 °C in *Brain Lysis Buffer* (s. Tabelle 9) lysiert. Für 3 Minuten wurden die einzelnen Vorläuferzellen mittels stetigem Auf-und Abpipettieren mit einer sterilen 1000 µl Pipette voneinander getrennt und anschließend für weitere 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 300 g und Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen in 37 °C warmem Leibowitz's medium resuspendiert und abermals für 5 Minuten zentrifugiert. Gegenfalls wurde dieser Waschschrift wiederholt, bevor die Zellen durch einen 70 µm großes Mikrosieb gefiltert und anschließend in *Neurosphere Culture Medium* (s. Tabelle 9) suspendiert wurden. Die Zellen wurden in einer T75 Kulturflasche gehalten. Alle 3 Tage wurde mEGF in das Nährmedium gegeben, um die Zellkultur zu erhalten.

Um die sog. Zellviabilität, also den Anteil lebender Zellen an der Gesamtpopulation zu bestimmen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Hierbei werden Zellen *in vitro* mit dem Farbstoff 3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid behandelt. Dieses wird von vitalen Zellen zu 5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan reduziert und entspricht der Glykolyserate pro Zelle. Dies kann nun auf die Zellviabilität bezogen werden: Eine hohe Glykolyserate spricht für eine hohe Zellpopulation.

Name	Verwendungszweck	Inhaltsstoffe
PBS, pH 7,4	Pufferlösung zum Präparieren von Maushirnen	NaCl, KCl, Na <sub>2</sub> HPO <sup>4</sup> , KH <sub>2</sub> PO <sup>4</sup> , Aqua Dest.
TBE	Medium zur Gelelektrophorese	Tris, Borsäure, EDTA, Aqua Dest.

LB Medium, pH 7,0-7,2	Medium zur Kultivierung von Bakterienkulturen	Trypton, Hefeextrakt, NaCl, Aqua Dest.
Agarose-Gel	Gelelektrophorese	Agarose, TBE, DNA Stain Clear G (Serva, Art.-Nr. 39804.01)
Lairds-Puffer	Genotypisierung, Lysierung der Schwanzbiopsien	NaCl, Tris-HCl, EDTA, SDS, H <sub>2</sub> O
Selektionsagar (Ampicillin)	Agarplatten zur Kultivierung von Bakterien	LB-Agar (Roth, Art.Nr. X969.2), Ampicillin, H <sub>2</sub> O
Transfektionsmix	Zur Transfektion von Viren	2xHBS, CaCl <sub>2</sub> , Wasser(Millipor), Verpackungsplasmide pN8-VSVg und pN8-gag-pol, Virusplasmide
Brain Lysis Buffer (BLB)	Medium zur Lyse des Großhirns der Maus	Leibowitz's Medium, DNase I, Papain, EDTA (500 mM)
Neurosphere Culture Medium	Medium zur Kultivierung der Vorläuferzellen der Maus	DMEM/F12, HEPES (1 M), B27 growth supplement without Vitamin A, Glutamax, non essential amino acids (NEM), Penicillin/Streptomycin, mEGF

**Tabelle 9. Materialtabelle**

## 2.5 Statistik

Die Tiere wurden an Tag 14,5 der Embryonalentwicklung (e14,5) und den postnatalen Tagen P0, P15, P30 und P68 analysiert.

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Prism 5.02 Software durchgeführt. Zum Vergleich von Parametern zwischen Gruppen wurden die Stichprobenmengen zunächst auf Normalverteilung getestet. Folgt die Werte der Gauß'schen Normalverteilung wurde der unpaare, zweiseitige t-Test durchgeführt. Lag keine Gauß'sche Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-U Test angewendet. Bei allen Tests wurden p-Werte <0,05 als statistisch signifikant gewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung eines Mausmodells mit Überexpression von LIN28A in neuronalen Vorläufern

Im Folgenden werden die Tiere des Genotyps *bGFAP-cre::Isl-LIN28A* (2.2.7) hinsichtlich ihrer Fertilität, Vitalität, Tumorentwicklung und möglichen Entwicklungsdefekten im ZNS charakterisiert. Die Tiere wurden an Tag 14,5 der Embryonalentwicklung (e14,5) und den postnatalen Tagen P0, P15, P30 und P68 analysiert.

#### 3.1.1 Vitalität, Fertilität

Die o.g. Tiere wirken vital und fit und zeigen im Vergleich zu den Kontrolltieren *Isl::LIN28A* ein normales Überleben. Die Mäuse wurden bis P260 regelmäßig begutachtet.

#### 3.1.2 Tumorentwicklung

Makroskopisch konnten keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Schädels gefunden werden. In keinem der analysierten Tiere wurde eine Tumorentwicklung festgestellt. Das Gehirn wurde genau untersucht und es konnte weder in sagittaler, noch in frontaler Orientierung tumorsuspektes Gewebe gesehen werden. Auch Herz, Lunge, Pankreas, Colon und Magen zeigen in der H&E Histologie keinen Hinweis auf Tumorentwicklung.

#### 3.1.3 Entwicklungsdefekte im ZNS

In der Analyse der *bGFAP-cre::Isl-LIN28A* Tiere zeigen sich im Vergleich zur Kontrolle grobmorphologisch keine Auffälligkeiten (Abb. 9, A und B). Die Struktur des Neocortex erscheint unauffällig, der Balken sowie beide Hippocampi sind gut abgrenzbar.

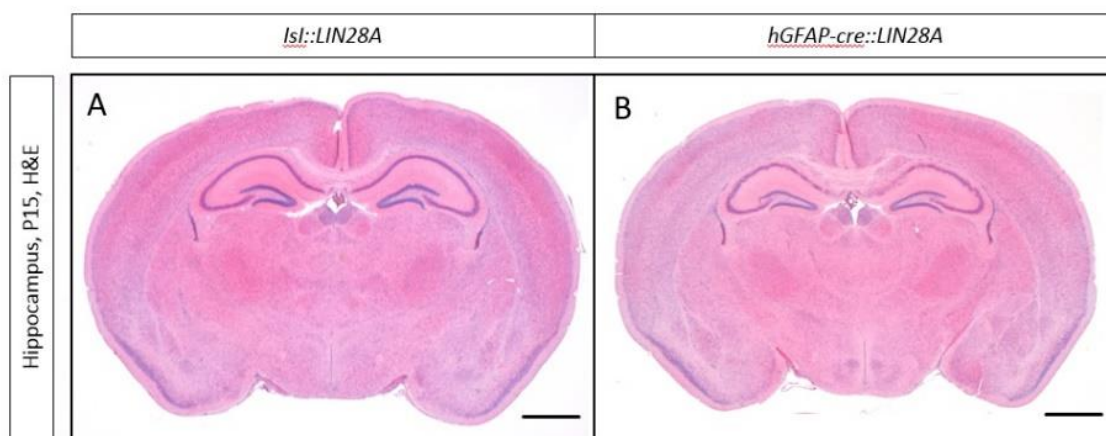
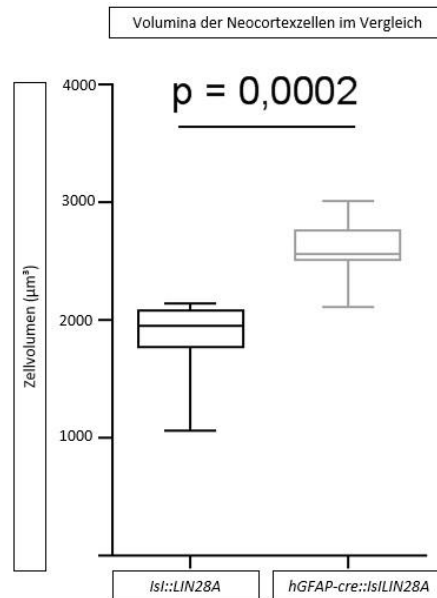


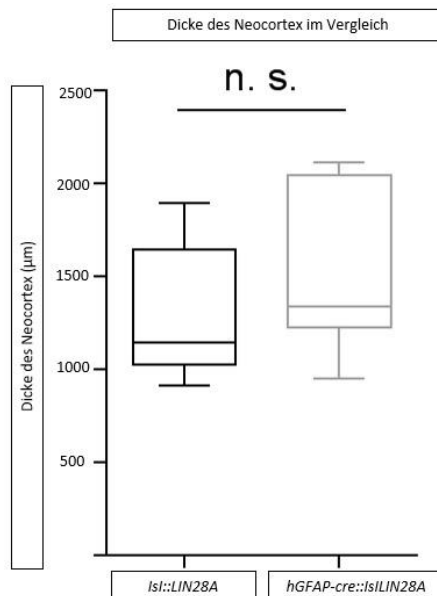
Abbildung 9: Überblick des frontalen Maushirns an P15. Der Messbalken entspricht 1 mm.

Um die Morphologie des transgenen Mausmodells tiefergehend zu untersuchen, wurde das Zellvolumen der Neurone der Lamina V vermessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Neurone der Lamina V des Neocortex der transgenen Tiere ein verändertes Zellvolumen aufweisen (Abb. 10). Dieses ist signifikant größer als bei Neuronen im Kontrolltier.



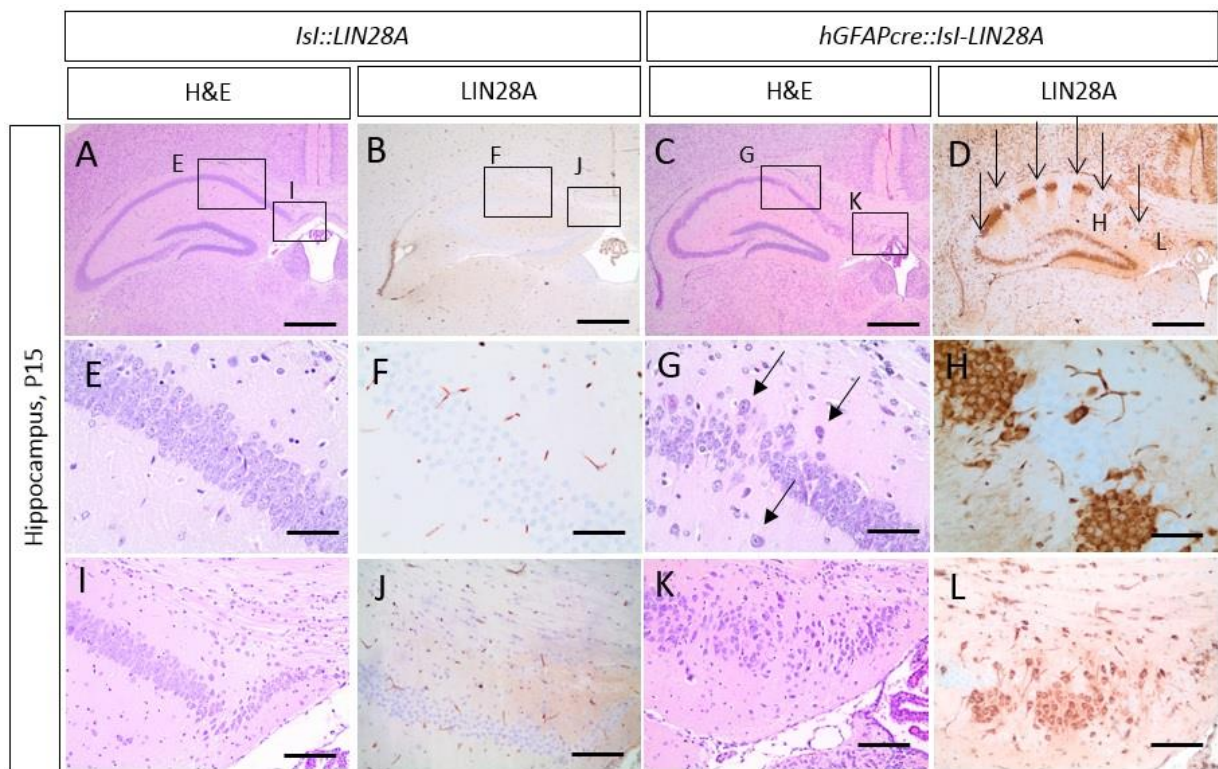
**Abbildung 10: Messung des Volumens der Neurone des Neocortex an P15.**

Nachfolgend wurde untersucht, ob das erhöhte Zellvolumen zu einem verdickten Neocortex geführt hat. Die Messungen ergaben, dass in den *hGFAP-cre::Isl-LIN28A* Tieren eine Tendenz zu einem verdickten Neocortex im Vergleich zu Tieren ohne LIN28A Überexpression zu sehen ist (Abb. 11). Statistisch signifikante Unterschiede wurden jedoch nicht gesehen.



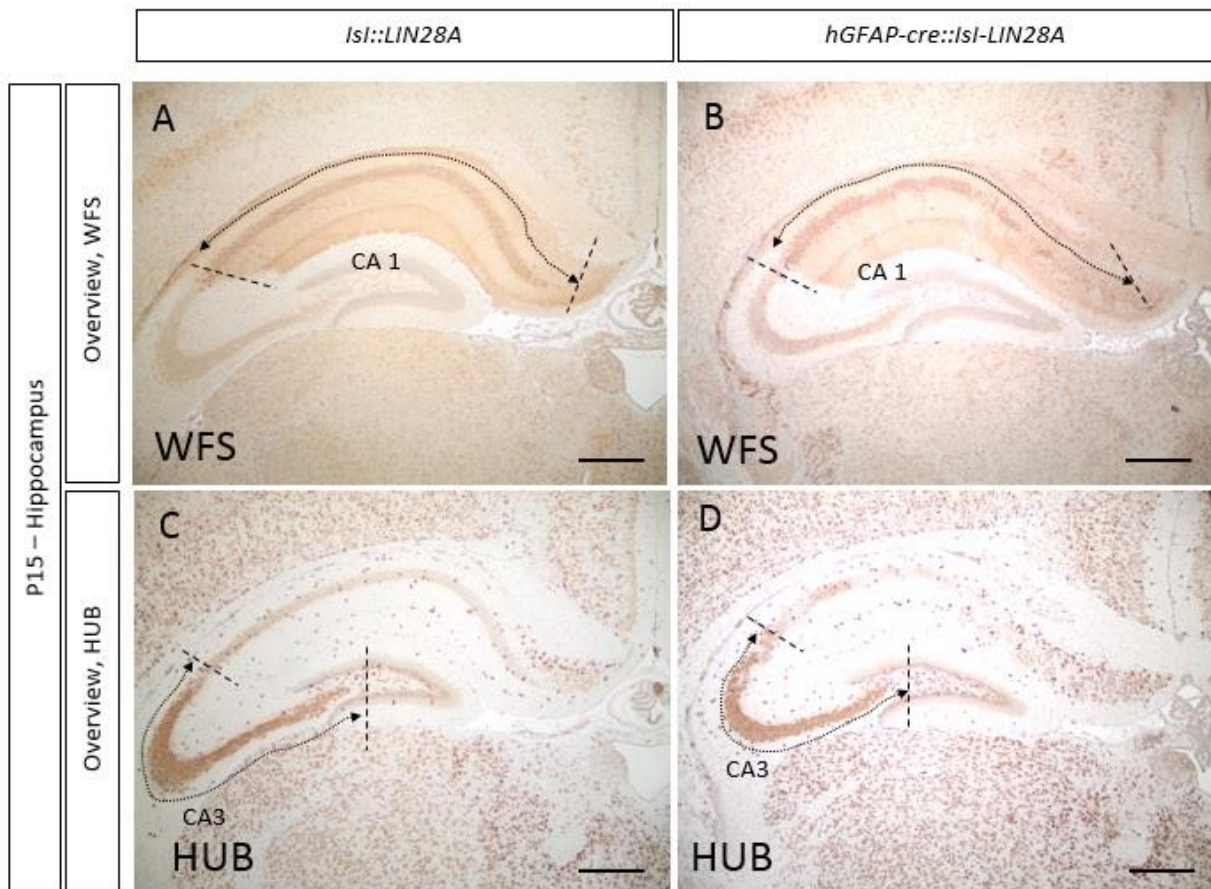
**Abbildung 11: Messung der Dicke des Neocortex an einer 15 Tage alten Maus.**

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Veränderungen im Neocortex der transgenen Tiere sind morphologische Veränderungen im Hippocampus zu beobachten. Zunächst erscheint das Cornu ammonis auffällig. Dieses wurde mittels verschiedener histologischer Färbungen untersucht. Dabei war das Expressionsmuster von LIN28A im transgenen Mausmodell der *bGFAPcre::Isl-LIN28A* Maus deutlich verändert. In Anbetracht der Tatsache, dass der *bGFAP* Promotor im gesamten Hippocampus aktiv ist, wäre eine Expression von LIN28A in allen Hippocampusbereichen zu erwarten gewesen. In Abbildung 12 ist allerdings ein charakteristisches Verteilungsmuster von LIN28A zu sehen, welchem bis heute weder eine morphologische noch eine funktionelle Funktion zuzuordnen ist (D). Bei genauerer Betrachtung (H) fällt auf, dass die Zellen, die kein LIN28A exprimieren, eine regelrechte Morphologie aufweisen. Sie sind von den LIN28A produzierenden Zellen scharf abgrenzbar und sind nicht gleichmäßig über das Cornu ammonis verteilt, sondern in Gruppen angeordnet (Pfeile in D). Darüber hinaus ist in Abbildung 12 die Zelldispersion im Cornu ammonis im Vergleich zu den Kontrolltieren erkennbar (G und K, E und I).



**Abbildung 12. Hippocampus einer 15 Tage alten Maus.** Die Färbungen sind an Paraffinschnitten in frontaler Orientierung vorgenommen worden. Der Messbalken in A-D entspricht 250  $\mu$ m und in E-L 100  $\mu$ m. Bereits in der H&E Färbung (C) sind morphologische Auffälligkeiten in Form einer Zelldispersion im transgenen Tier sichtbar. Diese sind in den Insets G und K vergrößert dargestellt. In der LIN28A Färbung lässt sich beim transgenen Tier ein charakteristisches Expressionsmuster zeigen (D). Die angezeigten Bereiche der Pfeile H und L sind darunter vergrößert dargestellt.

Um diese Zelldispersion anatomisch einzuordnen und abzugrenzen, wurden vergleichend HUB und WFS Färbungen durchgeführt. Bei HUB und WFS handelt es sich um zwei Antikörper, die an Epitope spezifischer Regionen des Cornu ammonis binden (s. 2.3). Der CA1 Bereich wird dabei durch die WFS Färbung gekennzeichnet und der CA3 Bereich des Cornu ammonis entspricht der HUB Färbung. Es wird deutlich, dass sich die Dispersion, die sich bereits in Abbildung 12 eindeutig lokalisieren lässt, vorwiegend im CA1 Teil befindet (Markierung in Abb. 13A und B) und im weiteren Verlauf Richtung Gyrus dentatus etwas abnimmt, jedoch erkennbar bleibt (Markierung in Abb. 13C und D).



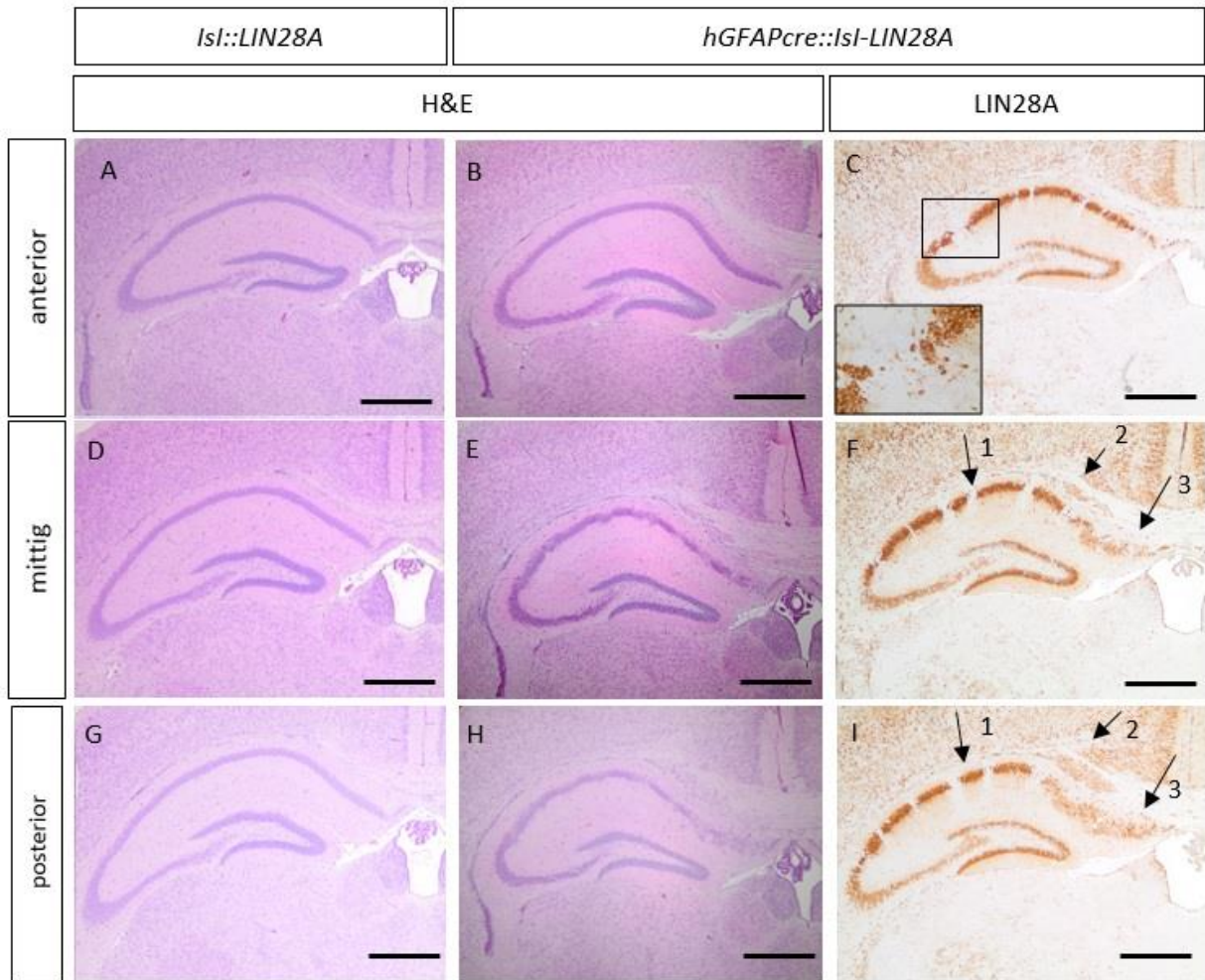
**Abbildung 13 HUB & WFS Färbung des Cornu Ammonis der 15 Tage alten Maus.** Mit der HUB- und WFS-Färbung handelt es sich um immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten der Maus, die es ermöglichen, die verschiedenen Bereiche des Cornu ammonis einordnen zu können. Das Cornu ammonis ist in frontaler Orientierung zu sehen. Der Messbalken in A-D entspricht 250  $\mu$ m.

Der Phänotyp der *hGFAPcre::Isl-LIN28A* Maus mit seinen zwei charakteristischen Hauptmerkmalen (Zelldispersion und Expressionsmuster von LIN28A) zeigt sowohl Veränderungen in der anterioren, als auch in posterioren Hippocampusabschnitten (Abb. 14) sowie auch im Altersverlauf (Abbildung 15).



In Abb. 14 fällt auf, dass in den anterioren Schnittebenen die Zelldispersion im Hippocampus noch recht begrenzt ausfällt (Abb. 14 B C). Der CA1 Bereich ist noch als dichtes Zellband, wenn auch mit leichten Unregelmäßigkeiten abgrenzbar. Die Expression von LIN28A (C) erscheint im anterioren Schnitt zwar unregelmäßig, aber ohne größere Felder, die LIN28A-negative Neuronen aufweisen.

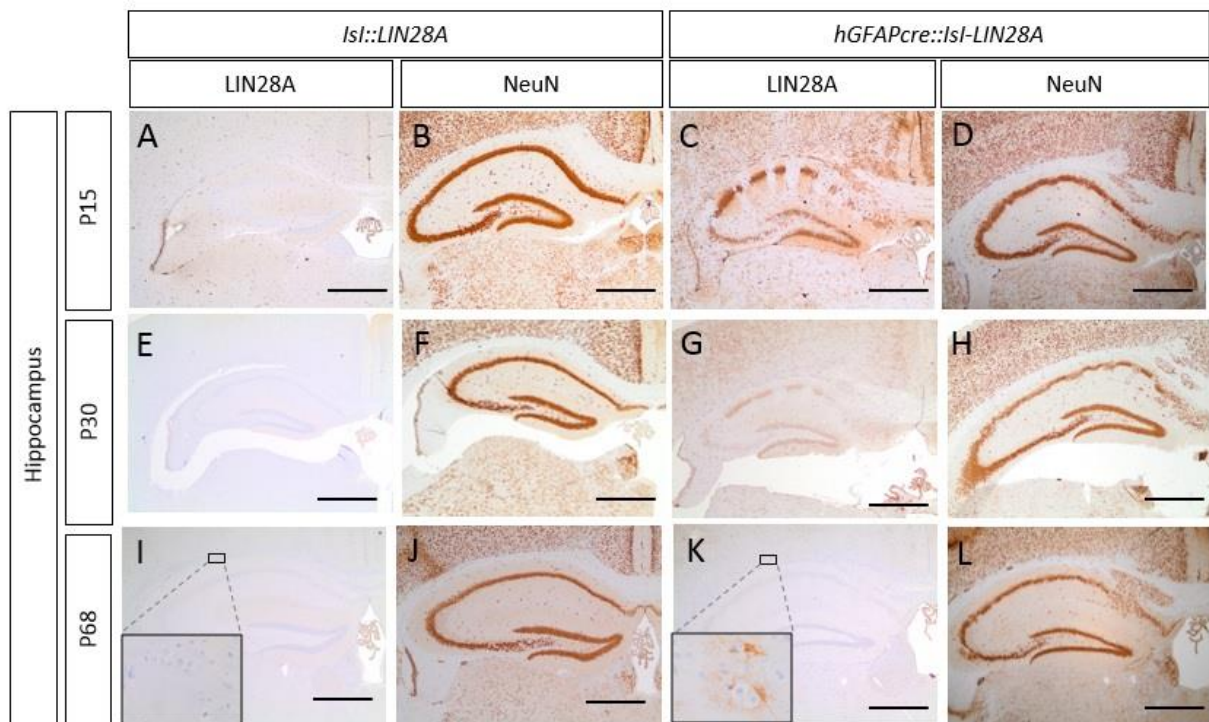
In medianen Schnittebenen (Abb. 14 D-F) lassen sich größere Bereiche abgrenzen, in denen Zellverbände kein LIN28A exprimieren (Abb. 14 F). Auch die Zelldispersion nimmt, insbesondere im CA1 Bereich, zu (Abb. 14 F, 3). Hier ist eine große Differenz zu Abbildung 14 C zu sehen. Hinzu kommt noch eine Veränderung im Bereich des Corpus Callosum (Abb. 14 F, 2). Hier ist eine Zellgruppe zu sehen, die sich auch im posterioren Schnitt (Abb. 14 I, 2) zeigt. Diese Zellgruppe ist nicht direkt zu identifizieren, wobei sich mit einer Färbung auf einen neuronalen Marker (NeuN) zeigen lässt, dass es sich bei diesen Zellen um reife Neurone handelt (Abb. 15).



**Abbildung 14: Anterior/Posterior Vergleiche des Hippocampus einer 15 Tage alten Maus.** In der Hippocampusmorphologie lassen sich deutliche Unterschiede in den verschiedenen Schnittebenen feststellen. Im Inset in C ist ein Zellverband vergrößert dargestellt, der kein LIN28A exprimiert. Diese Zellverbände nehmen in den posterioren Schnitten F und I zu (Pfeil 1). Zudem lässt sich ein außerhalb des Cornu Ammonis befindlicher Zellverband im Corpus Callosum abgrenzen, der im anterioren Schnitt noch nicht zu sehen ist (Pfeil 2 in F und I). Darüber hinaus verstärkt sich die Zelldispersion im CA1 Bereich des Hippocampus, hier mit Pfeil 3 dargestellt. Der Messbalken in A-I entspricht 250  $\mu$ m. Für die hohe Vergrößerung in C entspricht der Messbalken 100  $\mu$ m.

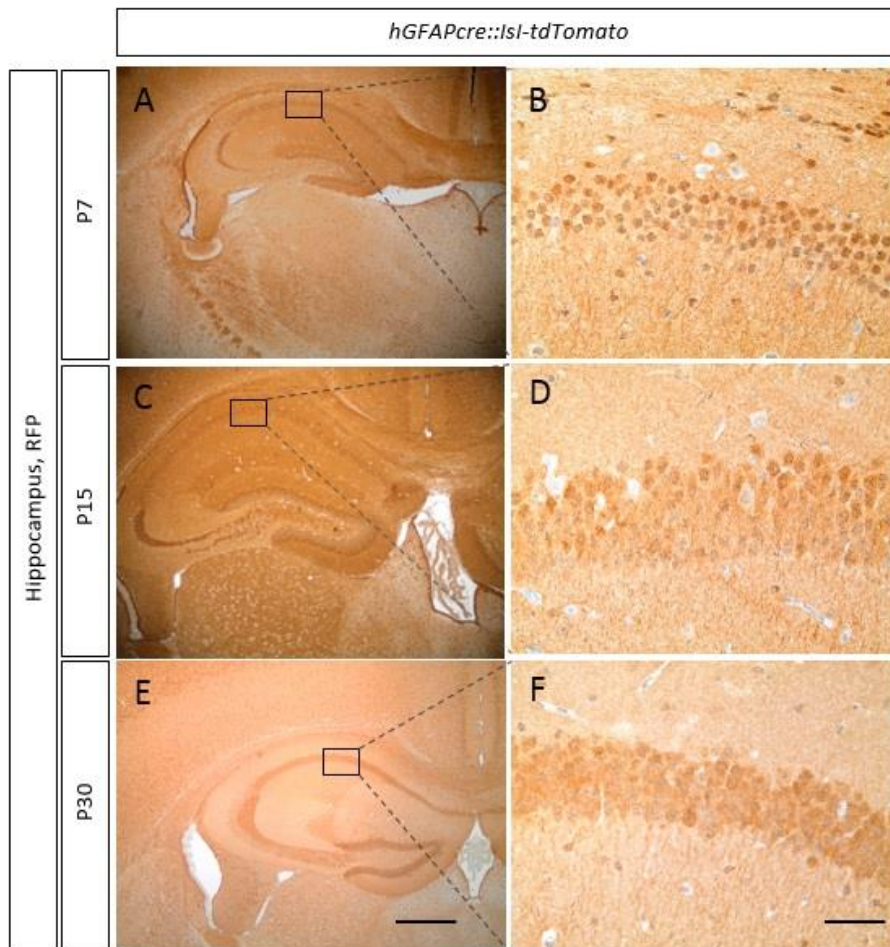
Im Altersvergleich lassen sich auch gravierende Veränderungen feststellen (Abb. 15). Hier ist erkennbar, dass in den transgenen Mäusen mit zunehmendem Alter immer weniger LIN28A exprimiert wird. An P30 (Abb. 15 G) ist das Expressionsniveau im Vergleich zu P15 (Abb. 15 C) bereits deutlich abgesunken, bis an P68 (Abb. 15 K) LIN28A nur noch in den Astrozyten nachweisbar ist. Hier ist eine starke Vergrößerung notwendig, um die geringe Expression nachweisen zu können (Inset in K im Vergleich zu Inset in I). In der NeuN Färbung lässt sich vergleichend darstellen, dass sich die charakteristischen morphologischen Veränderungen auch im Alter zeigen. Die Zelldispersion, aber auch die Zellinseln

im Balken sind in allen Altersstufen klar erkennbar. Wichtig ist hier auch im Vergleich zur vorangegangenen morphologischen Charakterisierung in der H&E Färbung, dass NeuN reife Neuronen anfärbt (Mullen, Buck et al. 1992).



**Abbildung 15 Altersvergleich des Expressionsmusters von LIN28A und NeuN an P15, P30 und P68.** Hier ist eine deutliche Abnahme in der Expression von LIN28A erkennbar (C im Vergleich zu G und K). Um eine Expression von LIN28A in den Astrozyten darstellen zu können, ist eine hohe Vergrößerung notwendig (Inset in K). Mit der NeuN-Färbung lässt sich vergleichend darstellen, dass die Zelldispersion im Cornu Ammonis im Altersverlauf erhalten bleibt. Der Messbalken in A-L entspricht 250  $\mu\text{m}$ , für die hohen Vergrößerungen in I und K entsprechen sie 50  $\mu\text{m}$ .

Um auszuschließen, dass es sich bei der Felderung der LIN28A Expression im Hippocampus um eine Aberration in der Expression von hGFAP handelt, wurde ein Fate Mapping Versuch in verschiedenen Altersstufen durchgeführt (Abb. 16). Wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben rekombiniert jede Vorläuferzelle mit jemals aktivem *hGFAP*-Promotor die Stop-Sequenz vor dem *tdTomato* Gen und exprimiert tdTomato. So können auch im adulten Tier alle Zellen angefärbt werden, die je einen aktiven *hGFAP*-Promotor hatten oder aktuell haben. Läge der ausbleibenden Expression von LIN28A eine Aberration von hGFAP zugrunde, hätte sich hier ein analoges Muster aus nicht RFP-exprimierenden, Hämatoxylin-blauen Zellen und RFP-positiven, dunkelbraunen Zellen ergeben. Dieses ergab sich jedoch nicht, sodass der Promotor als Ursache für den Phänotyp der *hGFAPcre::Isl-LIN28A* Maus nicht infrage kommt.



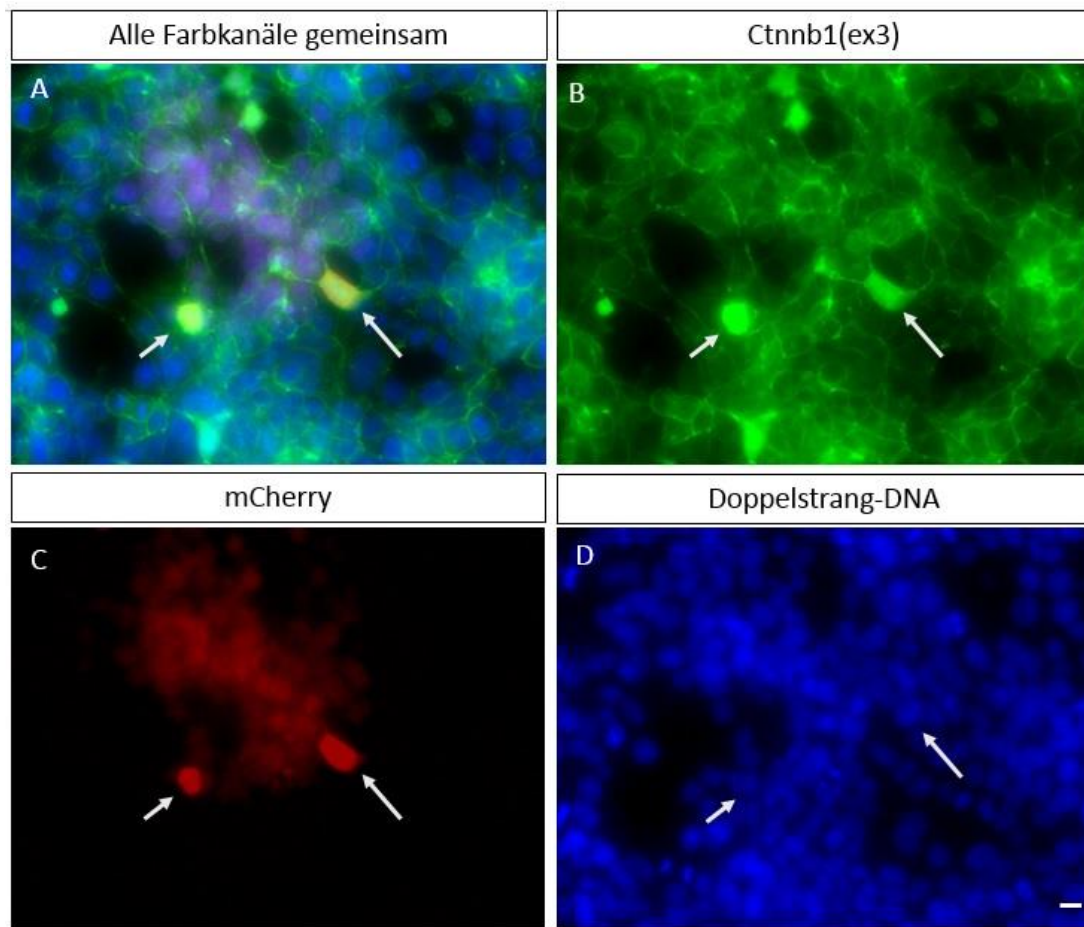
**Abbildung 16. Fate Mapping mit RFP im Altersvergleich an P7, P15 und P30.** Hippocampus der Maus im Frontalschnitt. Im Fate-Mapping Versuch konnte keine RFP Expression analog zum LIN28A Expressionsmuster festgestellt werden. Zur genaueren Analyse wurden die Zellen jeweils vergrößert dargestellt (B aus A, D aus C und F aus E). Der Messbalken in A, C und E entspricht 250  $\mu\text{m}$ , die hohen Vergrößerungen in B, D und F entsprechen 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 Evaluation einer *Ctnnb1* und *LIN28A*-Überaktivierung in der Kultur neuraler Vorläuferzellen der Maus

Präklinische Modelle konnten zeigen, dass eine Hochregulation des WNT-Signalweges zusammen mit anderen Einflussfaktoren *in vivo* zur Ausbildung von ETMR-ähnlichen Tumoren geführt hat. In der nachfolgend beschriebenen Zellkultur soll nun orientierend abgebildet werden, welchen Einfluss eine Hochregulation des WNT Signalweges in Kombination mit LIN28A auf neurale Vorläuferzellen der Maus hat. Anschließend sollten mithilfe eines MTT-Assays präliminäre Aussagen über das Zellüberleben getroffen werden.

Für den MTT-Assay ist unter anderem das in 2-Fragment-Klonierung hergestellte Plasmid *Ctnnb1(ex3)mCherry* (siehe 2.4.1) verwendet worden. Um die Funktion des

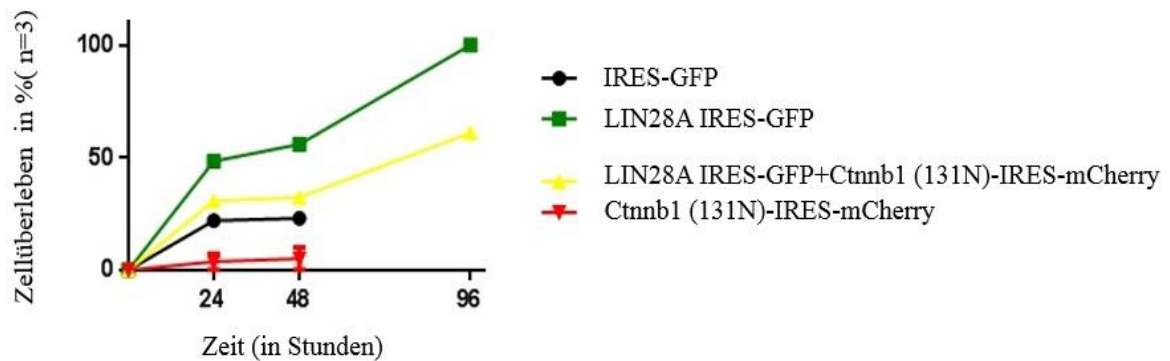
klonierten Plasmids sicherzustellen, wurde im Anschluss eine Transfektion mit der Calcium-Phosphat Methode auf HEK 293 T Zellen durchgeführt (Abb. 17).



**Abbildung 17 Mit *Ctnnb1(ex3)mCherry* transfizierte HEK 293 T Zellen in verschiedenen Farbkanälen.** Bild A: Alle Farbfilter, hier sind Fluoreszenzen verschiedener Wellenlängen sichtbar. Bild B: Farbfilter B zeigt zuvor grün angefärbtes *Ctnnb1(ex3)* an, Bild C: Farbfilter C zeigt *mCherry* an (rot), Bild D: 4,6 Diamidin-2-Phenylindol (DAPI, blau) zeigt Doppelstrang-DNA an. Die Pfeile zeigen die erfolgreich transfizierten Zellen.

In Abbildung 17 sind die transfizierten HEK 293 T Zellen zu erkennen. In Bild A werden alle Farbkanäle gezeigt. In Bild B zeigt die grüne Fluoreszenz die erfolgreiche Akkumulation von zuvor gefärbtem *Ctnnb1(ex3)* im Zellkern. Bild C zeigt die erfolgreiche Transfektion von *mCherry* an, das im entsprechenden Farbkanal rot fluoreszierend zu erkennen ist (Pfeile auf die entsprechenden Zellen). Die Zellen in Bild D sind mit 4,6 Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an Doppelstrang-DNA anlagert. Gefärbte Zellen zeigen eine blau erscheinende Fluoreszenz, wie in Bild D deutlich sichtbar ist. Nach der Sicherstellung der korrekten Funktion des Plasmids konnte es dann für die Virusherstellung genutzt werden. Hierzu wurden neurale Vorläuferzellen der Maus an P0 gewonnen. Diese wurden im Anschluss mit vier verschiedenen Viren

mit jeweils unterschiedlichen Plasmiden transduziert. Um in der Transduktion muriner Vorläuferzellen eine Effizienz von >90 % erreichen zu können, wurde ein Lentivirus zur Transduktion genutzt. Nun konnte die Zellviabilität der Zellen untereinander verglichen werden (Abb. 18).



**Abbildung 18: MTT-Assay zur Ermittlung der Zellviabilität.** Graphen verschiedenfarbig markiert. Schwarz: IRES-GFP, Grün: LIN28A IRES-GFP, Gelb: LIN28A IRES-GFP+Ctnnb1 (131N)-IRES-mCherry, Rot: Ctnnb1 (131N)-IRES-mCherry

Für den MTT-Assay wurden insgesamt 4 Zellpopulationen generiert und anschließend verglichen. Hierfür wurden primäre neurale Vorläuferzellen isoliert und mit drei verschiedenen LIN28A-, LIN28A+Ctnnb1(131N) oder Ctnnb1(131N)-exprimierende retroviralen Partikeln transduziert. Mit der Zusatzbezeichnung 131 N ist darauf hingewiesen, dass es sich um die mutierte, konstitutiv aktive Variante des *Ctnnb1*-Gens handelt, wie sie in 2.2.6 beschrieben ist. Sie wurde verwendet, um eine Überexpression von  $\beta$ -Catenin zu simulieren, wie sie in embryonalen Tumoren mit vielschichtigen Rosetten (ETMRs) gezeigt werden kann. Eine ausschließlich mit dem Vektor IRES-GFP transduzierte Zelllinie dient hier als Kontrolle. In statistischen Testungen erwiesen sich die Unterschiede der Überlebenskurven allerdings als nicht signifikant. Eine Transduktion der Zellen mit dem Virus, der eine Kombination aus LIN28A und *Ctnnb1* (131N) enthält, führt also nicht etwa zu einem signifikant längeren Überleben der Zellen.

## 4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt die erste hGFAP-abhängige Überexpression von LIN28A im murinen System. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass LIN28A hochspezifisch in embryonalen Tumoren mit vielschichtigen Rosetten vorkommt (Korshunov, Ryzhova et al. 2012). Über eine diagnostische Einordnung hinaus kommt der LIN28A Überexpression auch eine funktionelle Rolle zu. So konnte eine negative Regulation der mRNA Tumorsuppressorgruppe let-7 gezeigt werden (Viswanathan, Daley et al. 2008). In einer weiteren Arbeit (Neumann, Wefers et al. 2017) zeigte sich sogar ein direkter Zusammenhang zwischen der negativen

Regulation von let-7 durch LIN28A und wichtigen Zielgenen des Sonic Hedgehog-Signalwegs. Trotzdem hat eine alleinige Überexpression von LIN28A in hGFAP positiven neuronalen Vorläuferzellen der Maus nicht zur Entstehung eines Tumors geführt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Untersuchungen aus dem Jahr 2015 (Yang, Yang et al. 2015), bei denen eine Nestin+-abhängige Überexpression von LIN28A zwar zu einer Zellexpansion und einem vergrößerten Hirn geführt haben, nicht aber zur Tumorentstehung. Auch die in dieser Arbeit untersuchten *hGFAP<sup>Cre</sup>::Isl-LIN28A* Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren ein signifikant größeres Zellvolumen (Abb. 10). Es ist also eine allgemeine Wachstumstendenz zu beobachten, jedoch kein weiterer Hinweis auf eine Tumorgenese. Über die signifikant vergrößerten Zellvolumina hinaus ist allerdings ein hochinteressanter Phänotyp im Hippocampus zu beobachten gewesen, dessen Entstehung und Bedeutung bis heute nicht abschließend geklärt ist. Die Zelldispersion im Hippocampus und die Felderung der LIN28A Expression lassen den Schluss zu, dass LIN28A auch hier eine funktionelle Bedeutung hat und legen nahe, die Morphologie und Immunhistochemie des Hippocampus in zukünftigen Untersuchungen zu LIN28A unbedingt miteinzubeziehen.

Bei der Suche nach anderen möglichen Einflussfaktoren der Tumorgenese spielt zum einen die C19MC Cluster Modifikation (Li, Lee et al. 2009) eine große Rolle, zum anderen sind aber auch Beta-Catenin Mutationen gefunden worden, die einen Einfluss auf die Tumorgenese haben könnten (Kleinman, Gerges et al. 2014). Die daraufhin durchgeführten *in vitro* Analysen dieser Arbeit zeigten allerdings kein signifikant erhöhtes Zellüberleben der Zellen, die sowohl mit LIN28A, als auch mit mutiertem Beta-Catenin transduziert wurden. Diese Befunde legen nahe, in die Genese der Embryonalen Tumoren mit vielschichtigen Rosetten über mutiertes Beta-Catenin hinaus in Zukunft auch weitere mögliche Onko- und Tumorsuppressorgene miteinzubeziehen und ihren Einfluss zu untersuchen.

Für die Entwicklung von therapeutischen Konzepten ist das Verständnis der sicherlich multifaktoriellen Genese der ETMRs essentiell. Neben der Suche nach Verbindungen von LIN28A, dem Sonic Hedgehog und auch dem WNT Signalweg gilt es hierbei auch nach weiteren Einflussfaktoren zur Tumorentstehung zu suchen. Besonders die Alteration des C19MC Clusters bzw. seiner Fusion mit dem TTYH1 Promotor könnte insbesondere im Hinblick auf die wachsenden Möglichkeiten zur Gentherapie ein wichtiger Ansatz sein.

## 5 Zusammenfassung

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde das erste Mausmodell einer hGFAP-abhängigen LIN28A Überexpression erfolgreich etabliert. Es zeigt nicht nur einen spezifischen und reproduzierbaren Phänotyp im Hippocampus, sondern stellt darüber hinaus eine wichtige Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen dar, die der Erforschung der Genese des embryonalen Tumors mit vielschichtigen Rosetten dient. Diverse Vorarbeiten konnten zeigen, dass LIN28A zum einen hochspezifisch in ETMRs exprimiert wird und zum anderen auch über die Bindung der Tumorsuppressorgruppe let-7 direkten Einfluss auf das Zellwachstum und -überleben der Tumorzellen hat. Im Mausmodell zeigte sich zwar ein signifikant verdicktes Zellvolumen im Neocortex, es konnte aber in keiner der untersuchten Mäuse ein Tumorwachstum festgestellt werden. Auch das Überleben der Tiere war im Vergleich zur Kontrolle unauffällig. *hGFAP-cre::lox-STOP-lox-Lin28A*-Tiere zeigen trotzdem einen deutlichen Phänotyp. Im Hippocampus der Tiere zeigt sich eine Zelldispersion in allen Bereichen des Cornu Ammonis. Darüber hinaus kommt es bei den transgenen Tieren zu einem charakteristischen Expressionsmuster von LIN28A, das weder anatomisch noch funktionell erklärbar ist und Anlass zu weiteren Nachforschungen gibt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden *in vitro* Versuche zur synchronistischen Auswirkung der Aktivierung von LIN28A und mutiertem Beta-Catenin durchgeführt. Hier zeigte sich kein signifikant höheres Zellüberleben bei der mit mutiertem Beta-Catenin in Kombination mit LIN28A transduzierten Zelllinie. Im Gegensatz dazu zeigen Vorarbeiten, dass in ETMRs sowohl der Sonic Hedgehog, als auch der WNT Signalweg überaktiviert sind. Diese Arbeit bestätigt, dass LIN28A allein nicht ausreicht, sondern eine synchronistische Aktivierung notwendig ist, um zur Tumorgenese zu führen.

Dies gibt Anlass zu weiterführenden *in vivo* und *in vitro* Analysen des Zusammenwirkens des WNT- und Sonic Hedgehog Signalweges in Bezug auf die Entstehung und auch mögliche Therapie der ETMRs. Es ist zu vermuten, dass das Zusammenwirken von LIN28A, des Sonic-Hedgehog und WNT Signalweges komplex und vor allem stark kontextspezifisch ist.





## 6 Literaturverzeichnis

Bar, M., S. K. Wyman, B. R. Fritz, J. Qi, K. S. Garg, R. K. Parkin, E. M. Kroh, A. Bendoraite, P. S. Mitchell, A. M. Nelson, W. L. Ruzzo, C. Ware, J. P. Radich, R. Gentleman, H. Ruohola-Baker and M. Tewari (2008). "MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries." Stem Cells **26**(10): 2496-2505.

Barth, A. I., I. S. Nathke and W. J. Nelson (1997). "Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 683-690.

Bentwich, I., A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector and Z. Bentwich (2005). "Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs." Nat Genet **37**(7): 766-770.

Bussing, I., F. J. Slack and H. Grosshans (2008). "let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer." Trends Mol Med **14**(9): 400-409.

Eberhart, C. G., D. J. Brat, K. J. Cohen and P. C. Burger (2000). "Pediatric neuroblastic brain tumors containing abundant neuropil and true rosettes." Pediatr Dev Pathol **3**(4): 346-352.

Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." Nat Rev Cancer **6**(4): 259-269.

Gessi, M., F. Giangaspero, L. Lauriola, M. Gardiman, B. W. Scheithauer, W. Halliday, C. Hawkins, M. K. Rosenblum, P. C. Burger and C. G. Eberhart (2009). "Embryonal tumors with abundant neuropil and true rosettes: a distinctive CNS primitive neuroectodermal tumor." Am J Surg Pathol **33**(2): 211-217.

Good, P. J. (1995). "A conserved family of elav-like genes in vertebrates." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4557-4561.

Hanna, J., K. Saha, B. Pando, J. van Zon, C. J. Lengner, M. P. Creighton, A. van Oudenaarden and R. Jaenisch (2009). "Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration." Nature **462**(7273): 595-601.

Harada, N., Y. Tamai, T. Ishikawa, B. Sauer, K. Takaku, M. Oshima and M. M. Taketo (1999). "Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene." EMBO J **18**(21): 5931-5942.

Hinman, M. N. and H. Lou (2008). "Diverse molecular functions of Hu proteins." Cell Mol Life Sci **65**(20): 3168-3181.

Kleinman, C. L., N. Gerges, S. Papillon-Cavanagh, P. Sin-Chan, A. Pramatarova, D. A. Quang, V. Adoue, S. Busche, M. Caron, H. Djambazian, A. Bemmo, A. M. Fontebasso, T. Spence, J. Schwartzentruber, S. Albrecht, P. Hauser, M. Garami, A. Klekner, L. Bognar, J. L. Montes, A. Staffa, A. Montpetit, P. Berube, M. Zakrzewska, K. Zakrzewski, P. P. Liberski, Z. Dong, P. M. Siegel, T. Duchaine, C. Perotti, A. Fleming, D. Faury, M. Remke, M. Gallo, P. Dirks, M. D. Taylor, R. Sladek, T. Pastinen, J. A. Chan, A. Huang, J. Majewski and N. Jabado (2014). "Fusion of TTYH1 with the C19MC microRNA cluster drives expression of a brain-specific DNMT3B isoform in the embryonal brain tumor ETMR." Nat Genet **46**(1): 39-44.

Korshunov, A., M. Remke, M. Gessi, M. Ryzhova, T. Hielscher, H. Witt, V. Tobias, A. M. Buccoliero, I. Sardi, M. P. Gardiman, J. Bonnin, B. Scheithauer, A. E. Kulozik, O. Witt, S. Mork, A. von Deimling, O. D. Wiestler, F. Giangaspero, M. Rosenblum, T. Pietsch, P. Lichter and S. M. Pfister (2010). "Focal genomic amplification at 19q13.42 comprises a powerful diagnostic marker for embryonal tumors with ependymoblastic rosettes." Acta Neuropathol **120**(2): 253-260.

Korshunov, A., M. Ryzhova, D. T. Jones, P. A. Northcott, P. van Sluis, R. Volckmann, J. Koster, R. Versteeg, C. Cowdrey, A. Perry, D. Picard, M. Rosenblum, F. Giangaspero, E. Aronica, U. Schuller, M. Hasselblatt, V. P. Collins, A. von Deimling, P. Lichter, A. Huang, S. M. Pfister and M. Kool (2012). "LIN28A immunoreactivity is a potent diagnostic marker of embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR)." Acta Neuropathol **124**(6): 875-881.

Korshunov, A., D. Sturm, M. Ryzhova, V. Hovestadt, M. Gessi, D. T. Jones, M. Remke, P. Northcott, A. Perry, D. Picard, M. Rosenblum, M. Antonelli, E. Aronica, U. Schuller, M. Hasselblatt, A. Woehrer, O. Zheludkova, E. Kumirova, S. Puget, M. D. Taylor, F. Giangaspero, V. Peter Collins, A. von Deimling, P. Lichter, A. Huang, T. Pietsch, S. M. Pfister and M. Kool (2014). "Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR), ependymoblastoma, and medulloepithelioma share molecular similarity and comprise a single clinicopathological entity." Acta Neuropathol **128**(2): 279-289.

Kuhn, R. and R. M. Torres (2002). "Cre/loxP recombination system and gene targeting." Methods Mol Biol **180**: 175-204.

Li, M., K. F. Lee, Y. Lu, I. Clarke, D. Shih, C. Eberhart, V. P. Collins, T. Van Meter, D. Picard, L. Zhou, P. C. Boutros, P. Modena, M. L. Liang, S. W. Scherer, E. Bouffet, J. T. Rutka, S. L. Pomeroy, C. C. Lau, M. D. Taylor, A. Gajjar, P. B. Dirks, C. E. Hawkins and A. Huang (2009). "Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors." Cancer Cell **16**(6): 533-546.

Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues and D. W. Ellison (2016). "The

2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Acta Neuropathol **131**(6): 803-820.

Madisen, L., T. A. Zwingman, S. M. Sunkin, S. W. Oh, H. A. Zariwala, H. Gu, L. L. Ng, R. D. Palmiter, M. J. Hawrylycz, A. R. Jones, E. S. Lein and H. Zeng (2010). "A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain." Nat Neurosci **13**(1): 133-140.

Miyazaki, J., S. Takaki, K. Araki, F. Tashiro, A. Tominaga, K. Takatsu and K. Yamamura (1989). "Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5." Gene **79**(2): 269-277.

Moss, E. G. and L. Tang (2003). "Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites." Dev Biol **258**(2): 432-442.

Mullen, R. J., C. R. Buck and A. M. Smith (1992). "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." Development **116**(1): 201-211.

Neumann, J. E., A. K. Wefers, S. Lambo, E. Bianchi, M. Bockstaller, M. M. Dorostkar, V. Meister, P. Schindler, A. Korshunov, K. von Hoff, J. Nowak, M. Warmuth-Metz, M. R. Schneider, I. Renner-Muller, D. J. Merk, M. Shakarami, T. Sharma, L. Chavez, R. Glass, J. A. Chan, M. M. Taketo, P. Neumann, M. Kool and U. Schuller (2017). "A mouse model for embryonal tumors with multilayered rosettes uncovers the therapeutic potential of Sonic-hedgehog inhibitors." Nat Med **23**(10): 1191-1202.

Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." Cell **31**(1): 99-109.

Ohtsuka, T., M. Yano and H. Okano (2015). "Acute reduction of neuronal RNA binding Elavl2 protein and Gap43 mRNA in mouse hippocampus after kainic acid treatment." Biochem Biophys Res Commun **466**(1): 46-51.

Osman, A. A., M. Saito, C. Makepeace, M. A. Permutt, P. Schlesinger and M. Mueckler (2003). "Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium." J Biol Chem **278**(52): 52755-52762.

Paulus, W. and P. Kleihues (2010). "Genetic profiling of CNS tumors extends histological classification." Acta Neuropathol **120**(2): 269-270.

Picard, D., S. Miller, C. E. Hawkins, E. Bouffet, H. A. Rogers, T. S. Chan, S. K. Kim, Y. S. Ra, J. Fangusaro, A. Korshunov, H. Toledano, H. Nakamura, J. T. Hayden, J. Chan, L. Lafay-Cousin, P. Hu, X. Fan, K. M. Muraszko, S. L. Pomeroy, C. C. Lau, H. K. Ng, C. Jones, T. Van Meter, S. C. Clifford, C. Eberhart, A. Gajjar,

- S. M. Pfister, R. G. Grundy and A. Huang (2012). "Markers of survival and metastatic potential in childhood CNS primitive neuro-ectodermal brain tumours: an integrative genomic analysis." Lancet Oncol **13**(8): 838-848.
- Skottman, H., M. Mikkola, K. Lundin, C. Olsson, A. M. Stromberg, T. Tuuri, T. Otonkoski, O. Hovatta and R. Lahesmaa (2005). "Gene expression signatures of seven individual human embryonic stem cell lines." Stem Cells **23**(9): 1343-1356.
- Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." Nat Genet **21**(1): 70-71.
- Spence, T., P. Sin-Chan, D. Picard, M. Barszczyk, K. Hoss, M. Lu, S. K. Kim, Y. S. Ra, H. Nakamura, J. Fangusaro, E. Hwang, E. Kiehna, H. Toledano, Y. Wang, Q. Shi, D. Johnston, J. Michaud, M. La Spina, A. M. Buccoliero, D. Adamek, S. Camelo-Piragua, V. Peter Collins, C. Jones, N. Kabbara, N. Jurdi, P. Varlet, A. Perry, D. Scharnhorst, X. Fan, K. M. Muraszko, C. G. Eberhart, H. K. Ng, S. Gururangan, T. Van Meter, M. Remke, L. Lafay-Cousin, J. A. Chan, N. Sirachainan, S. L. Pomeroy, S. C. Clifford, A. Gajjar, M. Shago, W. Halliday, M. D. Taylor, R. Grundy, C. C. Lau, J. Phillips, E. Bouffet, P. B. Dirks, C. E. Hawkins and A. Huang (2014). "CNS-PNETs with C19MC amplification and/or LIN28 expression comprise a distinct histogenetic diagnostic and therapeutic entity." Acta Neuropathol **128**(2): 291-303.
- Suzuki, M. and A. Mizuno (2004). "A novel human Cl(-) channel family related to *Drosophila* flightless locus." J Biol Chem **279**(21): 22461-22468.
- Takeda, K., H. Inoue, Y. Tanizawa, Y. Matsuzaki, J. Oba, Y. Watanabe, K. Shinoda and Y. Oka (2001). "WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain." Hum Mol Genet **10**(5): 477-484.
- Viswanathan, S. R., G. Q. Daley and R. I. Gregory (2008). "Selective blockade of microRNA processing by Lin28." Science **320**(5872): 97-100.
- von Bohlen Und Halbach, O. (2007). "Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus." Cell Tissue Res **329**(3): 409-420.
- Winter, J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory and S. Diederichs (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." Nat Cell Biol **11**(3): 228-234.
- Wippold, F. J., 2nd and A. Perry (2006). "Neuropathology for the neuroradiologist: rosettes and pseudorosettes." AJNR Am J Neuroradiol **27**(3): 488-492.
- Yang, M., S. L. Yang, S. Herrlinger, C. Liang, M. Dzieciatkowska, K. C. Hansen, R. Desai, A. Nagy, L. Niswander, E. G. Moss and J. F. Chen (2015). "Lin28 promotes

the proliferative capacity of neural progenitor cells in brain development." Development **142**(9): 1616-1627.

Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-1920.

Zhuo, L., M. Theis, I. Alvarez-Maya, M. Brenner, K. Willecke and A. Messing (2001). "hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo." Genesis **31**(2): 85-94.

## 7 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich Schüller und meiner Betreuerin Frau Dr. Julia Neumann für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Vielen Dank für die Möglichkeit, in diesem hochspannenden Feld forschen zu dürfen. Ich durfte von Euch sehr viel lernen und danke Euch für die großartige Unterstützung, auch über geografische Entfernungen hinweg.

Ich bedanke mich bei meinem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Jochen Herms für die Möglichkeit, im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung forschen zu dürfen.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Daniel Merk, Herrn Marc Weißhaar und insbesondere bei Frau Dr. Julia Ahlfeld für die kompetente Unterstützung und den naturwissenschaftlichen Rat im Laboralltag und darüber hinaus. Danke für die vielen Stunden, die ihr mir und meiner Arbeit gewidmet habt. Ohne Eure tatkräftige Unterstützung wäre mein Projekt nicht möglich gewesen.

Ich bedanke mich außerdem bei Frau Silvia Occhionero, Frau Marie-Christin Burmester und Herrn Michael Schmidt. Vielen Dank, dass ich von Eurer Erfahrung lernen durfte und für Eure zuverlässige Hilfe.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Gerda Mitteregger-Kretschmer, Frau Dr. Ingrid Renner-Müller, Herrn PD Dr. Marlon Schneider, Herrn Prof. Markoto Mark Taketo und Herrn Dr. Tasuya Kobayashi für die hervorragende Zusammenarbeit.

Ich möchte mich außerdem bei Michael Launspach bedanken. Es ist ein Privileg, mit einem Freund zusammenarbeiten zu dürfen. Danke für Deine persönliche Motivation, Deine guten Ideen und Deine große Hilfe.

# 8 Eidesstattliche Versicherung

## Eidesstattliche Versicherung

**Meister, Valerie**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die Bedeutung von LIN28A für die Entstehung embryonaler Hirntumoren mit  
vielschichtigen Rosetten (ETMRs)**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und  
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als  
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle  
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in  
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades  
eingereicht wurde.

**München, den 15.11.2018**

Ort, Datum

**V. Meister**

Unterschrift Doktorandin/Doktorand