

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologischen Anatomie
der Technischen Universität München
Univ.-Prof. Dr. med. H. Höfler

Das Patched1-Gen und seine Beteiligung an der Entwicklung des ZNS

Manuel Keim

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung der akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. med. H. Höfler
 2. Univ.-Prof. Dr. M. Hrabé de Angelis

Die Dissertation wurde am 26.06.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	- 7 -
1.1. Die frühe embryonale Gehirnentwicklung.....	- 7 -
1.2. Die Kleinhirnentwicklung.....	- 8 -
1.3. Der „Isthmic Organizer“ und die „Midbrain-Hindbrain-Boundary“	- 9 -
1.4. Die an der Bildung der MHB beteiligten Gene.....	- 10 -
1.4.1. Otx-2.....	- 11 -
1.4.2. Wnt-1	- 11 -
1.4.3. Gbx-2.....	- 12 -
1.4.4. Fgf-8	- 12 -
1.4.5. Spry-2	- 13 -
1.4.6. Lmx1b.....	- 14 -
1.4.7. En-1	- 14 -
1.4.8. Krox-20.....	- 15 -
1.4.9. Dll-1.....	- 15 -
1.4.10. BF-1	- 16 -
1.5. Die Funktion der MHB	- 16 -
1.6. Die Segment-Polaritäts-Gene Ptch, Shh und Gli-1.....	- 18 -
1.6.1. Shh.....	- 18 -
1.6.2. Ptch1	- 19 -
1.6.3. Gli-1.....	- 20 -
1.7. Der Shh-Ptch-Signaltransduktionsweg	- 21 -
1.8. Das Basalzellnävussyndrom	- 22 -
1.9. Das Medulloblastom.....	- 24 -
2. FRAGESTELLUNG	- 27 -
3. MATERIAL UND METHODEN	- 29 -
3.1. Methoden.....	- 29 -
3.1.1. Mäuse	- 29 -
3.1.2. Genotypisierung von Ptch1 Mutanten	- 29 -
3.1.3. Embryonendissektion	- 30 -
3.1.4. Elektronenmikroskopie.....	- 32 -
3.1.5. Sondengenerierung für Whole-mount in-situ Hybridisierung.....	- 32 -
3.1.5.1. DNA Extraktion aus Agarosegel	- 33 -
3.1.5.2. Ligation.....	- 33 -
3.1.5.3. Transformation von kompetenten Bakterien.....	- 33 -
3.1.5.4. Plasmid Minipräparation und Plasmidskontrolle mittels Restriktionsverdau	- 34 -
3.1.5.5. Plasmid Midipräparation.....	- 35 -
3.1.5.6. Sequenzierung.....	- 36 -
3.1.5.7. DIG-Markierung der Sonde	- 36 -
3.1.6. Whole mount in-situ hybridization (WMISH)	- 38 -

3.1.7.	Northern Blot Analyse.....	- 40 -
3.2.	Material	- 42 -
3.2.1.	Mäuse	- 42 -
3.2.2.	Medulloblastome	- 43 -
3.2.3.	Chemikalien.....	- 43 -
3.2.4.	Lösungen	- 43 -
3.2.5.	Gebrauchsfertige Puffer.....	- 46 -
4.	ERGEBNISSE.....	- 46 -
4.1.	Genotypisierung von heterozygoten Ptch^{+/+} und Wildtyp- Mäusen.....	- 46 -
4.2.	Phänotypisierung von homozygoten Ptch^{-/-} Embryonen durch Lichtmikroskopie.....	- 47 -
4.3.	Phänotypisierung von homozygoten Ptch^{-/-} Embryonen durch Elektronenmikroskopie.....	- 48 -
4.4.	Phänotypisierung von homozygoten Ptch^{-/-} Embryonen durch Whole Mount In-situ Hybridisierung	- 53 -
4.4.1.	Whole Mount in-situ Hybridisierung von homozygoten Ptch ^{-/-} und Wildtyp Embryonen	- 53 -
4.4.1.1.	Expression von Shh	- 53 -
4.4.1.2.	Expression von Ptch.....	- 55 -
4.4.1.3.	Expression von Gli-1	- 57 -
4.4.1.4.	Expression von BF-1	- 58 -
4.4.1.5.	Expression von Otx-2	- 59 -
4.4.1.6.	Expression von Gbx-2	- 61 -
4.4.1.7.	Expression von Wnt-1	- 63 -
4.4.1.8.	Expression von FGF-8.....	- 64 -
4.4.1.9.	Expression von En-1	- 66 -
4.4.1.10.	Expression von Krox-20.....	- 68 -
4.4.1.11.	Expression von Lmx1b	- 69 -
4.4.1.12.	Expression von Spry-2.....	- 70 -
4.4.1.13.	Expression von Dll-1	- 71 -
4.4.2.	Auswertung der Whole Mount in-situ Hybridisierung.....	- 73 -
4.5.	Northern Blot Analysen	- 74 -
4.5.1.	Blotting	- 74 -
4.5.2.	Posthybridisierung	- 74 -
4.5.3.	Quantifizierung.....	- 75 -
5.	DISKUSSION.....	- 75 -
5.1.	Der Phänotyp von Ptch^{-/-} Embryonen.....	- 75 -
5.2.	Der Effekt von Ptch^{-/-} auf den Shh-Signaltransduktionsweg.....	- 77 -
5.2.1.	Shh-Signaltransduktionsweg und Gastrulation	- 78 -
5.2.2.	Shh-Signaltransduktionsweg und Neurulation	- 80 -
5.3.	Der Effekt von Ptch^{-/-} auf die MHB	- 81 -
5.3.1.	Die Genexpression an der MHB.....	- 82 -
5.3.2.	Die Positionierung der MHB	- 85 -

5.3.3.	Die Induktion der MHB.....	- 87 -
5.4.	Der Effekt von $Ptch^{-/-}$ auf die Entstehung von Medulloblastomen	- 88 -
6.	ZUSAMMENFASSUNG	- 89 -
7.	SUMMARY.....	- 90 -
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	- 93 -
9.	ANHANG	- 117 -
9.1.	Abkürzungen.....	- 117 -
9.2.	BF-1 Sequenz	- 118 -
9.3.	Lmx1b Sequenz.....	- 119 -
9.4.	Primer Sequenzen.....	- 120 -
9.5.	Restriktionsenzyme	- 121 -
10.	LEBENS LAUF	- 122 -
11.	DANKSAGUNG	- 125 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Gehirnentwicklung	- 8 -
Abbildung 2 Genexpression an der MHB	- 10 -
Abbildung 3 Shh/Ptch Signaltransduktionsweg	- 22 -
Abbildung 4 WHO Klassifikation der ZNS-Tumoren	- 24 -
Abbildung 5 Ptch Allel	- 29 -
Abbildung 6 Subklonierung	- 35 -
Abbildung 7 DIG-Markierung	- 38 -
Abbildung 8 Genotypisierung	- 47 -
Abbildung 9 Lichtmikroskopie der Embryonen	- 48 -
Abbildung 10 Elektronenmikroskopie der Embryonen	- 53 -
Abbildung 11 Färbung mit der Shh-Sonde	- 54 -
Abbildung 12 Schematische Darstellung der Shh Expression	- 55 -
Abbildung 13 Färbung mit der Ptch-Sonde	- 56 -
Abbildung 14 Schematische Darstellung der Ptch Expression	- 56 -
Abbildung 15 Färbung mit der Gli-1-Sonde	- 57 -
Abbildung 16 Schematische Darstellung der Gli-1 Expression	- 57 -
Abbildung 17 Färbung mit der BF-1-Sonde	- 58 -
Abbildung 18 Schematische Darstellung der BF-1 Expression	- 59 -
Abbildung 19 Färbung mit der Otx-2-Sonde	- 60 -
Abbildung 20 Schematische Darstellung der Otx-2 Expression	- 61 -
Abbildung 21 Färbungen mit der Gbx-2-Sonde	- 62 -
Abbildung 22 Schematische Darstellung der Gbx-2 Expression	- 63 -
Abbildung 23 Schematische Darstellung der Wnt-1 Expression	- 63 -
Abbildung 24 Färbungen mit der Wnt-1-Sonde	- 64 -
Abbildung 25 Färbungen mit der Fgf-8-Sonde	- 65 -
Abbildung 26 Schematische Darstellung der FGF-8 Expression	- 66 -
Abbildung 27 Schematische Darstellung der En-1 Expression	- 67 -
Abbildung 28 Färbungen mit der En-1-Sonde	- 67 -
Abbildung 29 Schematische Darstellung der Krox-20 Expression	- 68 -
Abbildung 30 Färbungen mit der Krox-20-Sonde	- 68 -
Abbildung 31 Schematische Darstellung der Lmx1b Expression	- 69 -
Abbildung 32 Färbungen mit der Lmx1b-Sonde	- 70 -
Abbildung 33 Schematische Darstellung der Spry-2 Expression	- 71 -
Abbildung 34 Färbungen mit der Spry-2-Sonde	- 71 -
Abbildung 35 Färbungen mit der Dll-1-Sonde	- 72 -
Abbildung 36 Schematische Darstellung der Dll-1 Expression	- 73 -
Abbildung 37 Northern Blotting	- 74 -
Abbildung 38 Northern Blot Analysen	- 75 -
Abbildung 39 Shh/Ptch Signalweg bei Ptch ^{-/-} Mutanten	- 77 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Basalzellnävussyndrom	- 23 -
Tabelle 2 Mäusewürfe	- 42 -
Tabelle 3 Genexpression WMISH.....	- 73 -
Tabelle 4 Auswertung Northern Blot	- 75 -

1. Einleitung

Die Entwicklung des eukaryoten Gehirns ist ein sehr komplexer Vorgang in der Entwicklung zum vollständigen Lebewesen, der bis heute nur sehr wenig verstanden ist. In jüngster Zeit wurden jedoch enorme Fortschritte in der Neuroembryologie gemacht, so dass daraus ein teilweise komplett neues Verständnis der verschiedenen Entwicklungsprozesse entstanden ist. Diese hier vorliegende Arbeit soll ihren Teil dazu beitragen.

1.1. Die frühe embryonale Gehirnentwicklung

Zunächst sollen die für das Verständnis dieser Arbeit relevanten Entwicklungsschritte noch einmal kurz dargestellt werden (Gilbert, 2000):

Die normale Gehirnentwicklung läuft bei allen Säugern in gleichen Schritten ab, ein Hinweis auf die Konservierung der ablaufenden Prozesse über die Evolution. Sie beginnt kurz nach der Implantation, mit der Bildung des Embryoblasten aus der Blastozyste, welcher zunächst aus zwei Keimblättern, dem Endoderm und Ektoderm besteht. Aus letzterem entwickelt sich neben dem ZNS u.a. auch Haut und Hautanhangsgebilde, Augenlinse, Hypophyse, Zahnschmelz und Innenohr. Besonderer Bedeutung kommt bei der Entwicklung des ZNS der Gastrulation zu, während der aus dem Endoderm einzelne Zellen zwischen Endoderm und Ektoderm einwandern und somit das dritte Keimblatt, das Mesoderm bilden. Das Mesoderm übt in der weiteren Entwicklung indirekt an der Differenzierung des ZNS mit. Die mesodermalen Zellen formieren sich zunächst zum primitiven Streifen, welcher seinerseits dann wieder die Chorda dorsalis bildet. Diese stellt entwicklungsgeschichtlich den Vorläufer der Wirbelsäule dar. An die Gastrulation schließt sich die Neurulation an, während welcher der Chorda dorsalis eine zentrale Rolle zukommt. Durch verschieden chemotaktische Faktoren beeinflusst die Chorda dorsalis das überliegende Ektoderm zur Proliferation und zur Differenzierung. Daraus entwickeln sich das Neuroektoderm und die Neuralplatte. In dieser entsteht im Weiteren zentral eine Rinne, die sogenannte Neuralrinne, welche sich nach kranial und nach kaudal verlängert. An den Seiten der Neuralrinne bilden sich aus dem Neuroektoderm die Neuralfalten, die ihrerseits lateral von den mesodermalen Somiten begleitet sind. Die Neuralfalten wachsen über die Neuralrinne und fusionieren und bilden so das Neuralrohr, dessen kraniales drittel den Vorläufer des ZNS bildet. Die Fusion beginnt zunächst mittig am Embryo und schreitet nach kranial und kaudal fort, bis nur noch zwei Neuroporen an beiden Enden offen sind. Schließlich verschließen sich diese auch. Während das primitive Neuroektoderm noch keine Ausrichtung nach anteroposterior aufweist, lediglich eine dorsoventrale Musterung ist etabliert, so entsteht wäh-

rend dem Schluss des Neuralrohres, eventuell sogar schon früher, erstmals eine antero-posteriore bzw. später kraniokaudale Musterung. Sobald der anteriore Neuroporus geschlossen ist, entwickeln sich im anterioren Drittel zunächst drei Ausstülpungen bzw. Vesikel, die das Vorder-, Mittel- und das Hinterhirn darstellen. Der erste und der letzte Vesikel teilen sich dabei noch einmal und somit kommt es zur Bildung von den fünf Gehirnbläschen, die das Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Metencephalon und Myelencephalon darstellen (siehe Abbildung 1). Nun kommt es zur Zellproliferation und zur Zelldifferenzierung, und zur Wanderung der verschiedenen Zellarten an die jeweilig für sie bestimmte Position.

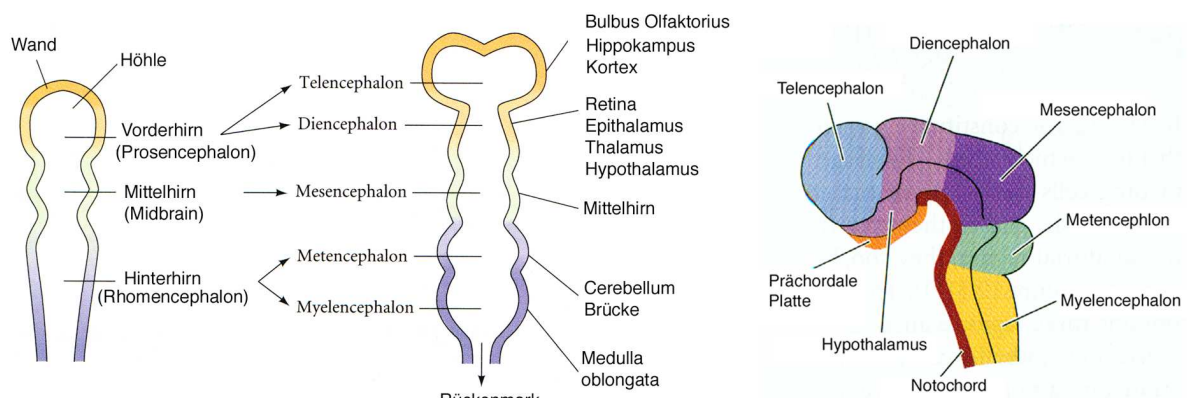


Abbildung 1 Gehirnentwicklung
Schematische Übersicht über die Gehirnentwicklung..

1.2. Die Kleinhirnentwicklung

Eine Sonderstellung innerhalb der Gehirnentwicklung nimmt nun das Cerebellum, bzw. Kleinhirn ein.

Die Kleinhirnentwicklung vollzieht sich im Wesentlichen in vier Stufen: als erstes wird die Kleinhirnregion durch ein spezifisches Genexpressionsmuster entlang der anteroposterioren Achse des Embryos lokalisiert. Im zweiten Schritt entstehen zwei Proliferationszentren: zum einen die „rhombic lip“, aus der die Vorläufer der Körnerzellen und einige Hirnstammkerne entstehen, zum anderen eine Region in der metenzephalen Flügelplatte, aus der die Purkinje-Zellen entstehen. Daran anschließend werden im dritten Schritt durch die Neurogenese die einzelnen Schichten des Cerebellums herausgebildet. Im letzten Schritt werden durch weitere Genexpressionsmuster die Ausdifferenzierung der einzelnen Neuronenklassen und deren Verschaltung gefördert (Gilbert, 2000, Millen et al., 1999, Sotelo, 2004, ten Donkelaar et al., 2003)).

Bis vor kurzem nahm man an, dass das Kleinhirn ausschließlich aus metenzephalen Strukturen, einer Region die posterior durch den Plexus choroideus und anterior durch den Isth-

mus, die Grenze zwischen Mesenzephalon und Metenzephalon, entsteht (Miale und Sidman, 1961, Altman and Bayer, 1997). Durch neuere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Kleinhirn aber auch aus mesenzephalen Anteilen besteht. Hierzu wurde eine Huhn-Wachtel Chimäre entwickelt. Es wurde bei einer Spezies Teile des Gehirns durch gleiche Anteile aus der anderen Spezies ersetzt. Nach Ausreifung des Gehirns zeigte sich mit Färbemethoden, dass Zellen aus dem Mittelhirn in das Kleinhirn eingewachsen waren (Martinez und Alvarado-Mallart, 1989, Hallonet et al., 1990, Alvarez Otero et al., 1993, Hallonet und Alvarado-Mallart, 1997). Im weiteren Verlauf entwickeln sich die Kleinhirnhemisphären aus dem Metenzephalon, während sich der Vermis aus dem kaudalen Drittel des Mesenzephalon entsteht (Yachnis und Rorke, 1999, Wassef et al., 1993)

Zentrale Rolle in der Entwicklung des Kleinhirns kommt dabei einem Organisationszentrum zu, das in der Region des Isthmus, bzw. der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn (Midbrain-Hindbrain-Boundary) lokalisiert ist (Wassef und Joyner, 1997).

Für all diese Schritte ist die Zelldifferenzierung von zentraler Bedeutung. Das bedeutet unter anderem, welche Zellen entwickeln sich in welche spezifischen, postmitotischen Zellen, welche Wanderungsbewegungen werden von den Zellen aktiv oder passiv vollzogen, welche Neurotransmitter sind aktiv und welche Synapsen werden mit welchen Zellen ausgebildet. Diese Differenzierung der Zellen führt zur regionalen Spezifikation. Man nimmt an, dass diese Spezifizierung im Wesentlichen genetisch kontrolliert wird und hierbei wird sogenannten Organisationszentren eine zentrale Rolle zugesprochen (Gilbert, 2000).

1.3. Der „Isthmic Organizer“ und die „Midbrain-Hindbrain-Boundary“

Der „Isthmic Organizer“ ist in der Gehirnentwicklung ein Organisationszentrum, das für die Zelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung ist (Lumsden und Krumlauf, 1996, Wassef und Joyner, 1997). Schon zuvor wurde angenommen, dass zwischen Grenzen verschiedener Zellpopulationen Organisationszentren eingerichtet werden können und diese entscheidend für die weitere Entwicklung sind (Meinhardt, 1983). Der IsO ist anatomisch an der Grenze zwischen Mesenzephalon und Metenzephalon lokalisiert, der sogenannten Midbrain-Hindbrain-Boundary MHB (Marin und Puelles, 1994). Tatsächlich liegt das eigentliche Organisationszentrum aber leicht kaudal der MHB in Rhombomer 1 (Millet et al., 1996). Dieses Zentrum ist, wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Mesenzephalon und Metenzephalon und damit des Kleinhirns. Dieses Organisationszentrum wird durch Zellpopulationen rostral und kaudal davon stabilisiert (Langenberg und Brand, 2005, Zerwas et al., 2004) und ist durch eine Reihe von Faktoren, die sich gegenseitig durch verschiedene positive und negative Rück-

koppelungsschleifen beeinflussen, charakterisiert (Rhinn und Brand, 2001, Wurst und Bally-Cuif, 2001). Diese Faktoren sind nicht nur von Bedeutung für die Einrichtung dieses Zentrums, sondern auch für die Funktion des selbigen (Aroca und Puelles, 2005).

Zunächst sollen die einzelnen an der Einrichtung und Funktion der MHB beteiligten Faktoren dargestellt werden um dann deren Interaktionen während der Entwicklung des Kleinhirns zu beschreiben.

1.4. Die an der Bildung der MHB beteiligten Gene

Die MHB ist auf molekularer Ebene über eine Reihe von Faktoren definiert (Prakash und Wurst, 2004, Raible und Brand, 2004, Wurst und Bally-Cuif, 2001): der anteriore Bereich der MHB ist über die kaudale Grenze von Otx2 und der ringförmigen Expression von Wnt-1 definiert (McMahon et al., 1992, Wilkinson et al., 1987), der posteriore Bereich der MHB über die rostrale Grenze von Gbx-2 und die ebenfalls ringförmige Expression von Fgf-8 (Crossley und Martin, 1995, Li et al., 2002). Entscheidend für die Positionierung ist dabei die Grenze zwischen Gbx-2 und Otx-2 (Li und Joyner, 2001, Simeone, 2000). Diesen vier Genen kommt initial eine entscheidende Bedeutung zu, da mangelnde, fehlende oder falsche Expression eines dieser Gene zu einer Dysgenese oder Agenesie der Kleinhirnanlage führt (siehe unten). Dabei wird Fgf-8 die zentrale Rolle der MHB-Induktion zugesprochen (Crossley et al., 1996).

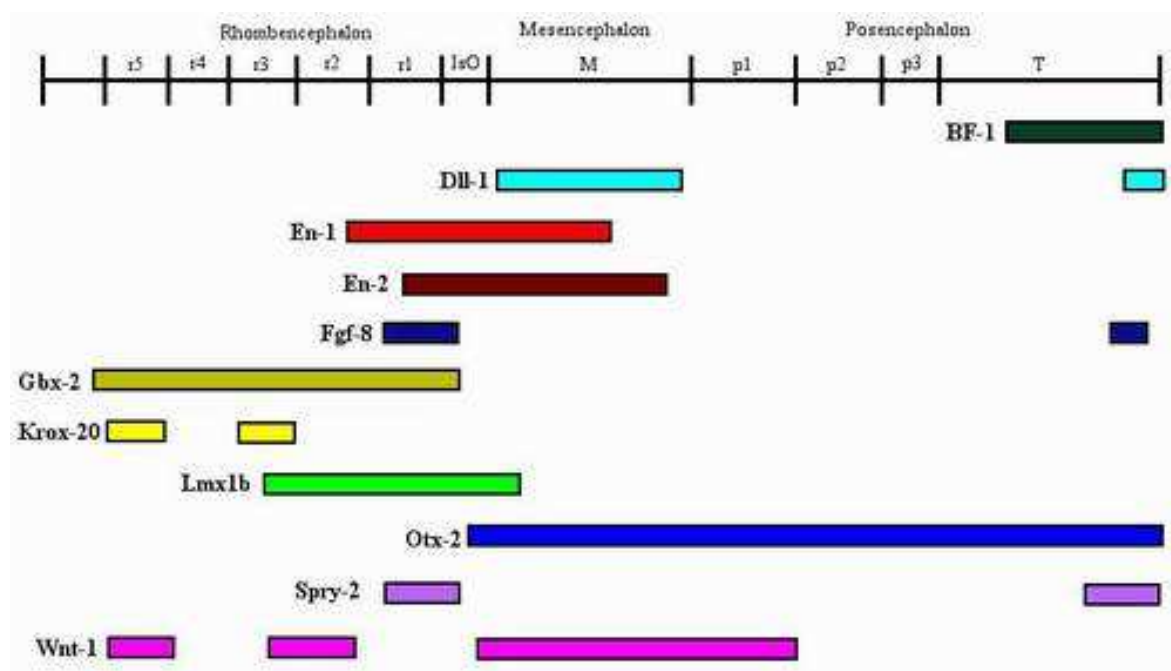


Abbildung 2 Genexpression an der MHB

Schematische Darstellung der normalen Expression der verschiedenen Gene an der MHB. Die Darstellung zeigt die anteroposteriore Verteilung der Expression, die dorsoventrale und laterale Expression sind hier nicht mit einbezogen. Für weitere Details siehe Text.

Des Weiteren sind noch eine Reihe von anderen Markern und Genen an der MHB exprimiert, darunter *Spry-2*, *Lmx1b*, *En-1* und *En-2*, die mit den obigen Genen in verschiedenen Schleifen interagieren und somit indirekt an die Kleinhirnentwicklung teilnehmen (de Maximy et al., 1999, Joyner, 1996, Matsunaga et al., 2002). Eine Übersicht über die Verteilung der in dieser Arbeit untersuchten Gene an der MHB ist aus Abbildung 2 zu entnehmen.

1.4.1. Otx-2

Die Orthodenticle-Gruppe innerhalb der HOX-Gene spielt in der Gehirnentwicklung eine entscheidende Rolle. Zu diesen gehören das *Drosophila orthodenticle otd* und die vertebra-ten Homologe *Otx1* und *Otx-2*, die eine Homeodomäne enthalten (Finkelstein und Boncinelli 1994, Simeone, 1998).

Otx2 wird bereits vor der Gastrulation exprimiert und am Ende der Gastrulation in der rostralen Neuralplatte (Ang et al., 1994, Simeone et al., 1992). Die posteriore Grenze für *Otx2* liegt an der Grenze zwischen Mittel und Hinterhirn (Millet et al., 1996, Simeone et al., 1992).

Die Bedeutung von *Otx2* für die Entwicklung des ZNS wurde an Mausmodellen deutlich: *Otx2*^{-/-} Embryos starben früh während der Embryogenese mit schweren Abnormalitäten im Körperbau und einem kompletten fehlen des rostralen Neuroektoderm, aus dem sich Vorder-, Mittel- und rostrales Hinterhirn entwickelt (Acampora et al., 1995, Ang et al., 1996, Matsuo et al., 1995). Heterozygote *Otx2*^{+/-} Embryos zeigten schwere Gehirnmissbildungen und kraniofaziale Fehlbildungen (Matsuo et al., 1995). Über chimäre Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass Embryonen, welche die Neuralplatte über eine *Otx2* Expression ausbilden, deren Neuralplatte selbst aber kein *Otx2* sezerniert, kein typisches Vorder- und Mittelhirn ausbilden und auch die typischen Gene dieser Hirnregionen nicht exprimiert sind (Acampora et al., 1998, Rhinn et al., 1998). Diese Ergebnisse zeigen, dass *Otx2* einerseits für die Induktion der Neuralplatte unabdingbar ist, andererseits auch für die Musterung und regionale Spezifizierung des Vorder- und Mittelhirnes (Acampora et al., 1999). Außerdem wird *Otx2* eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Positionierung des IsO zugesprochen (Acampora et al., 2001, Wurst und Bally-Cuif, 2001). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass *Otx-2* auch an der dorsoventralen Musterung durch eine Interaktion mit *Shh* beteiligt ist (Alexandre et al., 2003, Alexandre und Wassef, 2005).

1.4.2. Wnt-1

Wnt Gene codieren für eine große Gruppe von Signalmolekülen, die in die embryonale Musterung und in die Zellproliferation eingreifen (Brown und Moon, 1998, Wodarz und

Nusse, 1999). Der Name stammt von den Genen *wg* *wingless* in *Drosophila* und *Int-1* aus der Maus (Patapoutian und Reichardt, 2000). Die Proteine agieren durch Rezeptoren der Frizzled-Familie und kontrollieren hierdurch entweder die Gen-Transkription oder den Kalzium-Influx (Dale, 1998, Nusse, 1999).

Wnt Gene sind ebenfalls an der Entwicklung des Gehirns während der Embryogenese beteiligt, z.B. ist Wnt-1 an der Induktion der Neuralplatte beteiligt indem es BMP-4, das eine Differenzierung des Neuroektoderms unterdrückt, inhibiert (Niehrs, 1999, Baker et al., 1999) und in Kombination mit Wnt-3a und Wnt-10 an der Bildung der MHB (Buckles et al., 2004). Ebenso konnte eine isolierte Rolle von Wnt-1 in der Bildung und Funktion des IsO beschrieben werden: während der embryonalen Entwicklung ist Wnt1 in Form eines breiten Bandes entlang der zukünftigen MHB exprimiert. Dieses Band wird im Laufe der Entwicklung zu einem schmalen Ring kaudal der MHB. Außerdem wird es in zwei parasagittalen Streifen exprimiert (Bally-Cuif und Wassef, 1994, Davis und Joyner, 1988, Parr et al., 1993, Wilkinson et al., 1987). Inaktivierung des Wnt-1 Genes führt zu einer Deletion der MHB mit Verlust der Fgf-8 und En1 Expression (Lee et al., 1997, McMahon and Bradley, 1990, McMahon et al., 1992). Zugleich konnte aber gezeigt werden, dass En-1 Expression in Wnt-1^{-/-} Embryonen die normalerweise nicht angelegten Gehirnregionen (Mittel- und Hinterhirn) wieder rettet (Danielian und McMahon 1996).

1.4.3. Gbx-2

Gbx-2 (gastrulation brain homeobox 2) ist ein Transkriptionsfaktor, der zu der Familie der Homeobox-Gene gehört, welche für die axiale Musterung und die Zelldifferenzierung von Bedeutung sind (Chapman und Rathjen, 1995). Gbx-2 gehört zur GBX-Klasse der Homeobox-Gene und ist mit dem *Drosophila* Gen *unplugged* verwandt (Chiang et al., 1995). Während der Embryogenese der Maus ist Gbx-2 ab 7,5dpc in allen drei Keimblättern zu finden und erstreckt sich vom posterioren Ende des Embryos bis zum Hinterhirn (Shamim und Mason, 1998). Diese Expression verkleinert sich im Laufe der Entwicklung auf ein schmales Band, das direkt benachbart zu der MHB ist. Außerdem wird Gbx-2 in zwei longitudinalen Säulen im Hinterhirn und entlang dem Rückenmark exprimiert (Wassarman et al., 1997). Aufgrund dieses Expressionsmusters ist Gbx-2 auch an der Bildung des IsO beteiligt (Li und Joyner, 2001, Millet et al., 1999, Wassarman et al., 1997). Diese Beteiligung ist nach neueren Untersuchungen dosisabhängig (Waters und Lewandoski, 2006).

1.4.4. Fgf-8

Zu der Familie der fibroblast growth factors Fgf, die 18 verschiedene Gene umfasst, gehört auch der Fibroblast growth factor 8 Fgf-8 (Basilico und Moscatelli, 1992). Diese Gene

codieren für Proteine die in der Embryogenese schon sehr früh in die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung eingreifen. Fgf-8 wurde ursprünglich als das Protein AIGF Androgen induced growth factor aus einer Maus-Brustkrebs Zell-Linie isoliert (Tanaka et al., 1992). cDNA-Klonierung enthüllte die Zugehörigkeit zu der Fgf-Familie.

Fgf-8 wirkt im Verlauf der Embryogenese an verschiedenen Stellen, u.a. im Epiblasten, im Primitivstreifen, dem Kiemenbogenepithel, der Gliedmaßenknospe dem Vorderhirn (Heikinheimo et al., 1994, Ohuchi et al., 1994., Crossley und Martin, 1995., Lorenzi et al., 1995). Die Funktion von Fgf-8 im Gehirn wurde bislang am besten untersucht (Echevarria et al., 2005). Fgf-8 ist auch an der MHB exprimiert und übernimmt dort eine Zentrale Rolle in der Funktion des IsO (Crossley et al., 1996, Lee et al., 1997, Martinez et al., 1999, Mason et al., 2000, Ohuchi et al., 1994, Partanen, 2007, Sato et al., 2004). Dabei scheint Fgf-8 nicht entscheidend an der Positionierung der MHB beteiligt zu sein sondern v.a. an der Aktivität des IsO und der Zellproliferation (Wurst und Bally-Cuif, 2001). Diese Funktion an der MHB ist zu einem hohen Maße von Wnt-abhängig (Canning et al., 2006) Zudem spielt Fgf-8 eine wichtige Rolle in der korrekten Musterung des Metenzephalons (Beermann et al., 2006, Irving und Mason, 2000). Erst kürzlich konnte eine Interaktion von Fgf-8 mit Shh gezeigt werden, in welcher Fgf-8 eine wichtige Rolle für die dorsoventrale Musterung übernimmt und für die Positionierung und Differenzierung bestimmten Neuronengruppen verantwortlich ist (Alexandre und Wassef, 2005 Fogarty et al., 2007).

1.4.5. Spry-2

In Drosophila wurde sprouty zunächst im Wechselspiel mit branchless bnl, einem Drosophila Fgf Homolog entdeckt und ist dort in die Entwicklung der Lungen und des Respiratorischen Systems eingebunden. Hier arbeitet sprouty als Antagonist zu branchless und als Inhibitor zur Zellproliferation (Hacohen et al., 1998, Sutherland et al., 1996). Das murine Homolog zu sprouty, mSpry-2 (im folgenden spry-2) zeigt starke Expression in den Lungen als auch im Herz, dem Skelettmuskel, der Niere und dem Gehirn. Auch hier arbeitet Spry-2 als Antagonist zu Fgf-8 (de Maximy et al., 1999, Tefft et al., 1999). Auf molekularer Ebene greift Spry-2 in den Ras Signalweg ein (Casci et al., 1999).

Sprouty zeigt in der Expression, aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung, eine enge Korrelation mit der Fgf-8 Expression (Chambers und Mason, 2000), besonders entlang der MHB ist Spry-2 mit Fgf-8 vergesellschaftet (Chambers et al., 2000, Chambers und Mason, 2000, Minowada et al., 1999). Hier wird Spry-2 von Fgf-8 induziert und nimmt somit an einer negativen Feedback-Schleife teil, welche die Aktivität von Fgf-8 moduliert (Cham-

bers et al., 2000). Dabei nimmt aber *Spry-2* selbst einen Einfluss auf die Genexpression an der MHB und damit auch auf die Bildung des Cerebellums (Suzuki-Hirano et al., 2005).

1.4.6. *Lmx1b*

Lmx1b, früher *lmx-1* genannt gehört zur LIM-Klasse innerhalb der Homeobox Gene und enthält eine Homeodomäne. Es wird im ZNS, in den Gliedmaßenknospen und in der Niere während der Embryogenese exprimiert (Chen et al., 1998, Riddle et al., 1995, Vogel et al., 1995). Die Expression im ZNS findet man im Neuralrohr entlang der Bodenplatte, der Deckplatte und einigen Interneuronen (Chizhikov et al., 2004, Riddle et al., 1995). Innerhalb des ZNS ist *lmx1b* für die Differenzierung einzelner Neuronengruppen von Bedeutung, unter anderem für serotonerge und dopaminerge Neuronen im Mittelhirn (Ding et al., 2003, Smidt et al., 2000). Erst kürzlich konnte *Lmx1b* eine wichtige Rolle in der Bildung der MHB zugesprochen werden, wo es mit *Wnt1* interagiert (Adams et al., 2000, Matsunaga et al., 2002, O'Hara et al., 2005). Ebenfalls scheint die Interaktion mit *Fgf-8* an der MHB entscheidend für die Bildung des Kleinhirnes zu sein (Guo et al., 2007).

1.4.7. *En-1*

En-1 ist zusammen mit seinem verwandten *En-2* muriner Vertreter einer Gen-Familie, die mit der in *Drosophila* entdeckten Segmentations-Genen *engrailed* (*en*) verwandt sind (Joyner et al., 1985, Joyner and Martin, 1987). *Drosophila engrailed* übernimmt wichtige Funktion in Einrichtung der Körpersegmente und der Musterung in der Entwicklung. Eine Deletion führt zu schweren Mutationen (Hooper und Scott, 1992, Kornberg, 1981). Auch die murinen Vertreter *En-1* und *En-2* sind an der Embryogenese beteiligt. *En-1* und *En-2* unterscheiden sich nicht so sehr in ihrer Funktion oder ihrer Struktur, als viel mehr in der zeitlich und örtlich unterschiedlichen Expression (Hanks et al., 1995).

Die Expression beginnt am Tag 7dpc im Neuroepithel in der Region, die später die MHB bildet (Davis et al., 1988, Davis und Joyner, 1988, Davidson et al., 1988, McMahon et al., 1992). Im weiteren Verlauf der Embryogenese wird *En-1* am Tag 9,5dpc in zwei Streifen lateral des Hinterhirns und des Rückenmarks exprimiert. Ebenso findet man *En-1* im Dermamyotom der Somiten, dem aus den Somiten stammenden Sklerotom, als auch in den Gliedmaßenknospen. Aufgrund dieser Expressionsmuster wurde eine konservierte Funktion von *Drosophila en* angenommen und man postulierte, dass *En-1* und *En-2* auch in die Musterung des Gehirns eingreifen (Davis et al., 1988, Wurst et al., 1994). Hier ist *En-1* zum eine wichtig für die korrekte Positionierung der dienzephalen-mesenzephalen Grenze (Araki et al., 1999, Scholpp et al., 2003), zum anderen greift es auch in die Musterung von

Mittelhirn und Hinterhirn ein (Erickson et al., 2007, Liu und Joyner, 2001, Martinez et al., 1991, Wurst et al., 1994).

1.4.8. Krox-20

Ursprünglich in Maus-Fibroblasten entdeckt, wurde *krox-20* später als Transkriptionsfaktor beschrieben, der für ein Protein mit drei Zink-Fingern codiert (Almendral et al., 1988, Chavrier et al., 1988).

Krox-20 wird ab dem Tag 8.5dpc in Form von zwei transversen Streifen im Neuroepithel des Hinterhirnes exprimiert. Diese Streifen demarkieren die Region der zukünftigen Rhombomere 3 und 5 des Hinterhirnes. Im Laufe der Expression nimmt die Expression zunächst im Rhombomer 3, später dann in Rhombomer 5 ab und ist ab Tag 10.5dpc nicht mehr nachweisbar (Wilkinson et al., 1989). Außerdem wird es in der weiteren Embryogenese in einigen Ganglien und Neuralleistenabkömmlingen exprimiert (Wilkinson et al., 1989).

In der Gehirnentwicklung ist es von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung der Rhombomere 3 und 5, wie durch Knock-outs beschrieben wurde. Diese entwickelten keine der entsprechenden Rhombomere (Schneider-Manoury et al., 1993, 1997, Swiatek und Gridley, 1993). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Rhombomere erhalten bleiben, aber eine andere Identität annehmen (Voiculescu et al., 2001). Außerdem interagiert *krox-20* mit einigen Genen der Hox-Gruppe, die für die Segmentation und Entwicklung des Hinterhirns von Bedeutung sind (Helmbacher et al., 1998, Nonchev et al., 1996, Seitanidou, 1997).

1.4.9. Dll-1

Dll-1 (delta like 1) ist Teil des Notch signalling pathway, dessen Zell- Zell Interaktionen und Kommunikation für verschiedene entwicklungsbiologische Entscheidungen von großer Bedeutung ist, u.a. Somitogenese und neuronale Differenzierung (Hrabè de Angelis et al., 1997). *Dll-1* ist ein Transmembranprotein der DSL-Gruppe die als Liganden für den Notch Rezeptor funktioniert (Heitzler und Simpson, 1993).

Während der Entwicklung ist *Dll-1* im paraxialen Mesoderm, in Muskelzellen, im Gehirn und im Neuroepithel, sowie in Blutgefäßen, Haarfollikeln, Epidermis und Zähnen (Beckers et al., 1999, Bettenhausen et al., 1995). Die Expression beginnt um den Tag 7dpc im Mesoderm und ist bis zum Tag 12.5dpc am stärksten, kann aber bis 18,5dpc andauern. Im ZNS beginnt die Expression am Tag 8 und erstreckt sich auf das gesamte Neuralrohr (Bettenhausen et al., 1995).

Dll-1 ist während der Embryogenese für die Entwicklung der Somiten verantwortlich (Hrabè de Angelis et al., 1997). Außerdem scheint Dll-1 in die Körpersymmetrie einzugreifen (Przemeck et al., 2003). Inwieweit Dll-1 und der Notch Signalweg in die Neurogenese und die Entwicklung im Neuralrohr eingreift ist noch nicht sehr gut verstanden. Bisher scheint klar zu sein, dass der ursprünglich in *Drosophila* beschriebene Signalweg im Neuroepithel auch in Vertebraten vorhanden ist (de la Pompa et al., 1997). Zudem greift der Weg in die Differenzierung von Neuronengruppen ein (Grandbarbe et al., 2003).

1.4.10. BF-1

BF-1 (brain factor 1) ist ein winged helix (wh) Transkriptionsfaktor. Diese Gruppe von Faktoren übernimmt verschieden Aufgaben in der Entwicklung indem sie die Gen-Transkription regulieren. Ursprünglich wurde BF-1, das murine Homolog, als HNF3 β (hepatic nuclear factor) entdeckt, der Ähnlichkeiten zu *Drosophila* fork-head aufwies (Tao et al., 1992, Lai et al., 1993) und in die Transkription von Genen eingreift (Yao et al., 2001). Die Expression für BF-1, welche ab 5 Somiten nachweisbar ist, beschränkt sich auf das Prosenzephalon und ist in diesem Gehirnteil Marker für einen großen Teil der Flügelplatte (Shimamura et al., 1995). Hier ist es wichtig für die weitere Differenzierung des Telencephalons (Xuan et al., 1995). BF-1 kontrolliert die Zellproliferation im ZNS ab dem Tag 11,5dpc, indem es den Zellzyklus verlängert und die Ausdifferenzierung der Neuronalen Vorläuferzellen verlangsamt (Hanashima et al., 2002). Außerdem scheint ein möglicher Zusammenhang zwischen BF-1 und dem Shh-Signalweg zu bestehen (Dou et al., 1999).

1.5. Die Funktion der MHB

Um einen voll funktionierenden IsO überhaupt einzurichten, bedarf es einer Grenze zwischen Otx-2 und Gbx-2, die den IsO an der richtigen Stelle positioniert und induziert (Martinez-Barbera et al., 2001, Wurst und Bally-Cuif, 2001).

Mesenzephalon und teile des Metenzephalons entwickeln sich in einem Hirnbläschen, dem mesenzephalischen Bläschen (Bally-Cuif et al., 1995, Bally-Cuif und Wassef, 1995). Die Grenze innerhalb dieses Bläschens wird durch die kaudale Grenze von Otx-2 festgelegt (Bally-Cuif und Wassef, 1995). Das kaudale Limit der Otx-2 Expression ist außerdem verantwortlich für die Anlage des IsO (Broccoli et al., 1999, Millet et al., 1996). Hier ist die Wechselwirkung mit Gbx-2 von Bedeutung, welches direkt benachbart im Rhombenzephalon exprimiert wird (Hidalgo-Sanchez et al., 2005, Kikuta et al., 2003, Millet et al., 1999). Diese Wechselwirkung beruht auf einer Gbx-2 induzierten, dosisabhängigen Repression von Otx-2. Dies wurde durch Experimente, in denen Gbx-2 entweder nicht vorhanden

[Otx-2 ist nach kaudal verschoben und vorderes Hinterhirn fehlt (Wassarman et al., 1997, Millet et al., 1999)] oder überexprimiert war, bestätigt. In beiden Fällen verschob sich der IsO entlang der neuen rostralen/kaudalen Grenze von Gbx-2 mit Otx-2 (Millet et al., 1999). Entscheidend ist hier, dass sich trotz des Fehlens von Gbx-2 eine MHB entwickelt, während dies in Otx^{-/-} Mutanten vollkommen unterbleibt (Acampora et al., 1995). Damit scheint Gbx-2 im Wesentlichen für die Positionierung verantwortlich zu sein und Otx-2 für die Induktion.

Außerdem scheint die Positionierung und Aktivität des IsO in Zusammenhang mit der Fgf-8 Aktivität zu stehen, da Fgf-8 in ektopen Transplantaten die Otx-2 Expression unterdrücken kann (Acampora et al., 1997, Simeone, 1998). In vivo muss aber die Expression von Otx-2 und Gbx-2 der von FGF-8 vorangehen, da sonst die MHB nicht eingerichtet wird (Garda et al., 2001).

Wnt-1 und Fgf-8 bilden jeweils einen Ring rostral und kaudal der MHB (Wurst und Bally-Cuif, 2001). Fgf-8 wird dabei eine zentrale Rolle in der Formation der MHB zugeschrieben: Fgf-8 ist zuständig für die Bildung des Mittelhirns und des vorderen Hinterhirns, respektive des Rhombomers 1. Dies zeigt sich in der spezifischen Expression des Gens an der MHB (Crossley und Martin, 1995, Heikinheimo et al., 1994, Nakamura und Wantanabe, 2005, Ohuchi et al., 1994), die artübergreifend (Fliege, Fisch, Maus) die gleiche ist. Diese Expression ist wichtig für die Bildung der MHB, die ohne Expression von Fgf-8 unterbleibt (Jászai et al., 2003). Dies wurde anhand verschiedener Experimente gezeigt, in denen Gewebe aus der MHB in andere Strukturen verpflanzt wurde und dort Strukturen entwickelte, die ähnlich der MHB und der umliegenden Gewebe sind (Liu et al., 1999, Martinez et al., 1999, Mason et al., 2000). Auch die Genexpression ähnelt der an der MHB (Hidalgo-Sanchez und Alvarado-Mallart, 2002). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei ektopter Expression von Fgf-8, welches eine MHB an der Stelle der Expression induzieren kann (Mason et al., 2000): Heparin-ummantelte Acryl-Perlen, die mit Fgf-8 beschichtet waren, wurden in diesem Experiment ins Mittelhirn oder Vorderhirn eingebracht. Innerhalb 24 h zeigte sich folgendes: Normalerweise induziert Fgf-8 Protein die Expression von Gbx-2, En-1, En-2, Pax-2, Wnt-1, Fgf-8 selbst und verhindert die Expression von Otx-2 (Mason et al., 2000). Ebenso kann in Fgf-8 Null-Mutanten die Bildung der MHB durch ektope Expression von Fgf-8 wieder induziert werden (Jászai et al., 2003). Damit kann man zusammenfassend sagen, dass Fgf-8 auf jeden Fall verantwortlich für Musterung des Mittelhirns ist und auch Hinterhirn-Strukturen, speziell des Cerebellums induzieren kann (Martinez et al., 1995, Nakamura und Wantanabe, 2005) und dass Fgf-8 ein guter Indikator für Musterungs-Aktivität an der MHB darstellt. Neuere Untersuchungen konnten zeigen,

dass Fgf-8 zusammen mit Wnt schon während der Gastrulation einen Einfluss auf die Bildung der MHB nehmen (Olander et al., 2006).

Die Bestimmung der anteroposterioren Identität durch mesodermale Strukturen konnte durch Inaktivierung des Homeobox Gens *Otx2* gezeigt werden (Acampora et al., 1995, Shawlot und Behringer, 1995). *Otx2* wird im anterioren Mesoderm exprimiert und eine Deletion führt zu einem kompletten Verlust des Vorder- und Mittelhirns. Kaudale Strukturen ab dem Rhombomer 2 des Hinterhirns sind hingegen vollständig entwickelt. Diese Studien und weitere Transplantations- und Rotationsexperimente (Marin und Puelles, 1994) deuten auf eine Induktion der AP-Achse durch dorsale mesodermale Schichten hin. Neben der AP-Identität findet im Neuralrohr auch eine Kompartimentierung in dorsale und ventrale Bereiche statt. Das von Chorda dorsalis und Bodenplatte sezernierte Molekül Sonic hedgehog hat einen ventralisierenden Einfluss auf das Neuralrohr und bewirkt die spezifische Induktion von Motoneuronen innerhalb der Grundplatte (Ericson et al., 1996). Dabei ist die rostrale Bodenplatte das Signal-Zentrum, welches über die Sekretion von Shh die dorsoventrale Musterung eingreift. Über die Interaktion mit Fgf-8 und verschiedene, an die Gli-Expression beteiligte Faktoren, wird die anteroposteriore Musterung beeinflusst und damit die MHB und die umliegenden Gehirnanteile räumlich dreidimensional und zeitlich gestaltet (Bayly et al., 2007, Blaess et al., 2006).

1.6. Die Segment-Polaritäts-Gene Ptch, Shh und Gli-1

1.6.1. Shh

Hh Hedgehog wurde ursprünglich während eines genetischen Screens in *Drosophila* entdeckt. Dieser Screen identifizierte mehrere Mutationen, die für die Entwicklung von entscheidender Bedeutung sind (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Nachdem die molekulare Struktur von Hh in *Drosophila* beschrieben worden war (Tabata et al., 1992), wurden mehrere Homologe dieses Gens in vertebraten Arten beschrieben, darunter auch Shh (Sonic Hedgehog) in der Maus (Chang et al., 1994), sowie Desert Hedgehog Dhh und Indian Hedgehog Ihh (Ingham, 1998, Wicking et al., 1999, Ruiz I Altaba, 1999). Hh und seine Homologe nehmen während der Entwicklung eine Schlüsselrolle ein, indem sie in die Zellproliferation eingreifen und verantwortlich für die zelluläre Identität sind (Bitgood und McMahon, 1995, Ruiz I Altaba, 1999, Wicking et al., 1999,). Auch an der Tumorentstehung nimmt Shh eine Schlüsselrolle ein (Chari und McDonnell, 2007). Shh und seine Verwandten agieren dabei durch einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg (Kalderon, 2005). Diese Signaltransduktion von Shh verläuft über den Oberflächenrezeptor Ptch, an

den Shh bindet, und damit die Zielgene Gli-1 sowie auch Ptch selbst aktiviert (Hooper und Scott, 2005, Ingham, 1993, Basler und Struhl, 1994). Siehe dazu auch Kapitel 1.7.

Die Funktion der einzelnen Hh-Homologe ist durch ihre Expressionsmuster festgelegt (Wicking et al., 1999). Shh übt einen proliferativen Effekt auf neuroepitheliale Zellen aus (Cayuso et al., 2006). Dabei ist Shh vor allem für die Entwicklung des Kleinhirns von entscheidender Bedeutung (Dahmane et al., 1999, Ruiz i Altaba et al., 2002, Wechsler-Reya und Scott, 1999). Außerdem besitzt Shh noch eine Reihe von weiteren Aufgaben in der Embryogenese:

Die Expression von Shh beginnt am embryonalen Tag 8dpc kurz nach der Gastrulation im Primitivknoten und ist zunächst entlang der gesamten Chorda dorsalis exprimiert und bewirkt im Neuralrohr eine Ventralisierung, indem es die Entwicklung der Bodenplatte induziert. Im Neuralrohr ist Shh ab Tag 9 auch in der Bodenplatte zu finden, wo Shh die Expression von Ptch ablöst (Chang et al., 1994, Echelard et al., 1995) und bewirkt hier die Entwicklung von Motoneuronen. Diese Entwicklungsschritte sind konzentrationsabhängig (Roelink et al., 1994). Auch im ZNS bewirkt Shh eine Ventralisierung durch Induktion von ventrolateralen Neuronentypen (Hynes et al., 1995, Ericson et al., 1995). Verantwortlich für diesen ventralisierenden Effekt ist die rostrale Bodenplatte, welche ein signalgebendes Zentrum in der dorsoventralen Musterung ist (Blaess et al., 2006, Bayly et al., 2007, Chizhikov et al., 2006). Schließlich ist Shh, welches ebenfalls im Mittellinienmesoderm exprimiert ist, auch verantwortlich für die Musterung des paraxialen Mesoderms (Fan et al., 1995) und der Somiten und dem Kopfmesoderm rostral der Somiten (Hammerschmidt et al., 1996). Insgesamt erstreckt sich die Expression von Shh in der Maus auf Primitivknoten, Kopf, Chorda dorsalis, Bodenplatte, ventrolaterales Mittelhirn, ventrales Vorderhirn, Magenendoderm, Kiemenbögen, posteriores distales Gliedmaßenmesenchym, Epithel von Haaren, Lunge, Magen, Blase, Urethra und Samenstrang (Echelard et al., 1993, Chang et al., 1994).

1.6.2. Ptch1

Ptch wurde ursprünglich in *Drosophila* als Rezeptor in der Plasmamembran (Capdevila et al., 1994) für hedgehog Hh beschrieben (Stone et al., 1996), der die Aktivität von Hh kontrolliert (Hooper und Scott, 1989, Nakano et al., 1989) und in die Segmententwicklung von *Drosophila* eingreift (Ingham et al., 1991). Ptch stellt einen transmembranen Rezeptor dar, der 12 transmembrane Domänen besitzt und Ähnlichkeiten mit einem Kanal oder auch Iontentransporter besitzt (Marigo et al., 1996a). Zwei Homologe wurden auch in vertebra-ten gefunden: Ptch1 und Ptch2 (Goodrich et al., 1996, Hahn et al., 1996, Marigo et al.,

1996a, Motoyama et al., 1998). Dabei übernimmt Ptch1 die Funktion von Ptch in *Drosophila*, während Ptch2 nicht als Substitut für Ptch funktioniert aber in die Modulation der Tumorgenese bei Ptch1 mit eingreift (Goodrich et al., 1997, Hahn et al., 1996, Johnson et al., 1996, Lee et al., 2006). Als Ligand in den vertebraten Arten fungiert Sonic Hedgehog Shh, das schon oben beschrieben wurde und zusammen mit Ptch den Beginn des Shh-Ptch Signalweges darstellt. Dieser Signaltransduktionsweg wird in Kapitel 1.7 unten näher beschrieben. Ptch, im Zusammenspiel mit Shh, ist verantwortlich für Zelldifferenzierung während der Embryogenese (Johnson et al., 1997), v.a. für die Entwicklung des Neuralrohres (Marigo et al., 1996c, Goodrich und Scott., 1998, Wechsler-Reya et al., 2001).

Die Ptch Expression beginnt in der embryonalen Entwicklung mit 7dpc und steigt kontinuierlich an, um zwischen 11 und 15dpc den Expressionshöhepunkt zu erreichen. Danach fällt der Level wieder, bis es ab 17dpc unverändert niedrig bleibt. In folgenden Geweben kann man im Zeitraum von 8 bis 9dpc mit der „whole mount in-situ Hybridisierung“ Ptch nachweisen (Goodrich et al., 1996): Ptch wird am Tag 8 in der Mitte der Kopffalten und im ventralen Neuroepithel nach kaudal bis zum Rest des Primitivknotens, sowie im präsomitischen Mesoderm exprimiert. Ab 8,5dpc wird Ptch in der gesamten ventralen Mittellinie des Neuralrohres mit Ausnahme von zwei transversen Streifen im Gehirn exprimiert. Außerdem findet man Ptch im ventralen präsomitischen Mesoderm, den ventrale Hälften der Somiten sowie dem Seitenplattenmesoderm. Ab dem Tag 9 ist Ptch aus Bodenplatte verschwunden und durch Shh ersetzt worden, aber noch seitlich davon in den Somiten vorhanden. Weitere embryonale Strukturen, in denen Ptch exprimiert ist, sind der vordere (ab 8,5dpc) und der hintere (ab 9dpc) Magen-Darm-Trakt, die Kiemenbögen, Gaumen, Zunge, Zahnknospen und Genitalregion (Aglyamova und Agarwala, 2007, Goodrich et al., 1996). Neben der bereits oben beschriebenen Funktion von Ptch als Transmembranprotein und Rezeptor wird Ptch auch eine Funktion als Tumorsuppressor-Gen zugeschrieben (Hahn et al., 1996, Johnson et al., 1996). Dies zeigte sich zunächst anhand von Untersuchungen, die Ptch in Zusammenhang mit dem NBCCS brachten und von dort ausgehend eine enge Verbindung von Ptch zu Medulloblastomen aufzeigen konnten (Gorlin, 1995, Goodrich et al., 1996, Goodrich et al., 1997). Siehe dazu auch Kapitel 1.8. Auch für Ptch2 konnte eine Funktion als Tumorsuppressor-Gen in Basaliomen und Medulloblastomen nachgewiesen werden (Smyth et al., 1999).

1.6.3. Gli-1

Gli-1 wurde ursprünglich in Glioblastomen entdeckt, in denen es amplifiziert war (Kinzler et al., 1987) und wurde nachfolgend als Zink-Finger-Protein beschrieben, das in die Fami-

lie der Krüppel Proteine fällt (Kinzler et al., 1988). Wegen seiner Expression im Neuralrohr wurde Gli-1 eine wesentliche Rolle während der Neuralentwicklung zugesprochen (Hui et al., 1994). Gli-1 ist eines von mehreren Gli-Genen, die in den Shh-Ptch Signalweg eingebunden sind und als Mediator der Shh-Aktivität auftritt (Hynes et al., 1997). Es ist auch mit verschiedenen Tumoren assoziiert, u.a. Basaliome, Osteosarkome, Glioblastome (Ghali et al., 1999, Werner et al., 1997). Im Signalweg ist Gli verantwortlich für die Aktivierung der Zielgenetranskription.

Gli stellt das vertebrate Homolog zu *ci cubitus interruptus* dar, das in *Drosophila* im Hh-Ptch Signalweg aktiv ist und downstream von Hh agiert (Marigo et al., 1996b). Neuerdings konnte Gli auch eine Funktion als Modulator der Ptch Expression nachgewiesen werden (Agren et al., 2004).

Die Expression von Gli-1 wurde bislang nur in Hühnerembryos beschrieben. Hier zeigt die Expression von Gli eine enge Assoziation mit Ptch1 im Neuralrohr und keine deutliche Expression an der MHB (Aglyamove und Agarwala, 2007).

1.7. Der Shh-Ptch-Signaltransduktionsweg

Die oben dargestellten Gene Shh, Ptch und Gli-1 sind alle, wie bereits erwähnt, in einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg eingebunden. Dieser Signalweg wurde sowohl bei *Drosophila* als auch in Vertebraten beschrieben (Hooper und Scott, 2005, Huangfu und Anderson, 2006, Walthall et al., 2007). Das Grundprinzip des Signalweges lässt sich so begreifen: Ptch bzw. Ptch1 ist als Rezeptor in der Plasmamembran lokalisiert. Hier bindet Ptch Smo Smoothened, ein Plasmamembranrezeptor mit sieben transmembranen Domänen (Alcedo et al., 1996), so dass Smo keinerlei Aktivität ausüben kann. Bindet nun Hh bzw. Shh an den Ptch Rezeptor, so entlässt Ptch Smo aus der Bindung, der inhibierende Einfluss von Ptch fällt weg und die Zielgene von Shh werden indirekt durch Smo aktiviert (siehe Abbildung 3). Dabei modifiziert Ptch das von ihm inhibierte Smo, wenn es dieses aus der Bindung entlässt (Ingham et al., 2000). Zu den Zielgenen, die in diesem Signalweg aktiviert werden zählen *wg* *wingless* (Wnt in vertebraten), *decapentaplegic* (Bone Morphogenetic Proteins BMP in Vertebraten) und *Patched* selbst. Durch die verstärkte *Patched* Expression, und damit zu einer höheren Konzentration von Ptch Rezeptoren in der Plasmamembran, kommt es zu einer Limitierung des Shh Signals (Chen und Struhl, 1996, Goodrich et al., 1999).

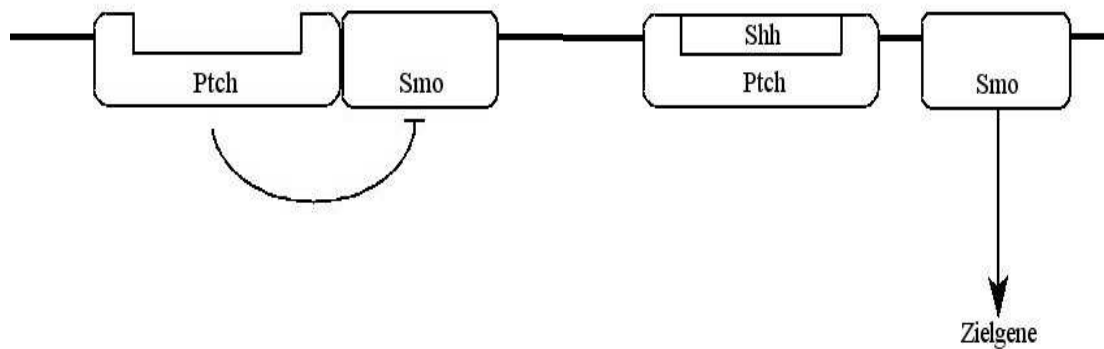


Abbildung 3 Shh/Ptch Signaltransduktionsweg

In der Abbildung kann man das Prinzip des Shh/Ptch Signalweges erkennen. Ist Ptch nicht durch seinen Liganden Shh besetzt, so bindet er Smo und dieses kann die Zielgene nicht aktivieren. Ist jedoch Shh an Ptch gebunden, so entlässt Ptch Smo aus der Bindung und der inhibierende Effekt von Ptch auf Smo fällt weg. Damit kann Smo die Zielgene aktivieren.

Die Aktivierung der Zielgene erfolgt nicht direkt, sondern über einen weiteren Zwischenschritt: cubitus interruptus ci (Gli in Vertebraten), costal 2 cos2, fused fu und suppressor of fused SuFu bilden ein Tetramer, das an Mikrotubuli in der Zelle gebunden sind. Kommt es nun zu einer Aktivierung von Smo, so löst sich dieses Tetramer aus dem Komplex und aktiviert die Zielgentranskription (van den Heuvel und Ingham, 1996a und 1996b).

1.8. Das Basalzellnävussyndrom

Das Basalzellnävussyndrom wurde erstmals von Gorlin und Goltz im Jahre 1960 als Syndrom beschrieben (Gorlin und Goltz, 1960). Das auch als sogenannte fünfte Phakomatose bekannte Syndrom wird autosomal dominant vererbt und ist durch eine Reihe von Fehlbildungen und Tumoren charakterisiert, v.a. multiple Basalzellnävi, die schon in jungen Jahren auftreten und später in Basaliome übergehen, sowie Kieferzysten und verschiedene Skelettanomalien (siehe dazu Tabelle 1).

In den 90ern konnte nachgewiesen werden, dass das BZNS wird durch eine Mutation in Ptch hervorgerufen wird (Farndon et al., 1992, Gailani et al., 1992, Goldstein et al., 1994, Hahn et al., 1996, Johnson et al., 1996, Reis et al., 1992) und damit auch für die Genese von Basaliomen und Medulloblastomen von Bedeutung ist (Pazzaglia, 2006, Vorechovsky et al., 1997, Wetmore et al., 2000). Weitere Forschungen zeigten, dass Ptch nicht nur für das BZNS verantwortlich ist, sondern auch für sporadische Basaliome (Bale und Yu, 2001, Gailani et al., 1996), Basaliome bei Xeroderma pigmentosa (Bodak et al., 1999), bei sporadischen Medulloblastomen (Raffel et al., 1997, Wolter et al., 1997) und desmoplasti-

schen Medulloblastomen (Amlashi et al., 2003). Dies führte zu der Annahme, dass Ptch nicht nur in die Embryogenese durch den Shh-Ptch Signalweg eingebunden ist, sondern auch eine Funktion als Tumorsuppressor-Gen besitzt. Dies konnte an Mäusen gezeigt werden die hemizygot für Ptch waren und daraufhin zu einem höheren Prozentsatz Medulloblastome entwickelten (Goodrich et al., 1997).

Region	Fehlbildungen	Tumoren	
Haut	epidermale Zysten	multiple Basaliome	
	palmar und/oder plantare Grübchen		
Skelett	Gabelrippen		
	Spina bifida occulta		
	Kyphoskoliose		
	Riesenwuchs		
	Pectus excavatum		
	kurzer vierter Metacarpalknochen		
	postaxiale Polydaktylie		
	lymphomesenterische Zysten		
	ZNS	verkalkte Falx cerebri	Medulloblastom
			Meningeom
Kraniofazial	großer Kopfumfang		
	Hypertelorismus		
	Strabismus		
	stark ausgeprägte supraorbitale Knochenwülste		
Oral	Lippen-Kiefer-Gaumenspalte		
	odontogene Keratozysten		
andere Tumoren		Ovarialfibrom	
		Herzfibrom	
		Fibrosarkom	
		Rhabdomyosarkom	

Tabelle 1 Basalzellnävussyndrom

Die Tabelle gibt einen Überblick über die Fehlbildungen und Tumoren die mit dem Basalzellnävussyndrom assoziiert sind (Bale et al., 1991, Cohen, 1999, Gorlin, 1995).

Dabei scheint Ptch die Zentrale Rolle in der Tumor-Genese zuzukommen, da Deletionen der anderen in den Shh-Ptch Signalweg eingebundenen Gene nicht zu Tumoren führt (Oro

et al., 1997, Reifenberger et al., 1998, Zurawel et al., 2000). Inwieweit Ptch Dysregulation in die Tumorgenese eingreift ist noch weitgehend ungeklärt. Neuere Untersuchungen haben diese Zusammenhänge untersucht und zeigen, dass Insulin like growth factor-2 coexprimiert sein muss (Hahn et al., 2000) und die cyclin Genexpression heraufreguliert sein muss (Kenney et al., 2000). Zusätzlich scheint die external granule layer EGL eine entscheidende Rolle zu spielen (siehe Kapitel 1.9).

1.9. Das Medulloblastom

Die Medulloblastome werden in der WHO-Klassifikation der Hirntumoren (siehe Abbildung 4) zu den embryonalen Tumoren des Neuroepithels gerechnet (Louis, D.N. et al, 2007). Obwohl sie deutliche genetische und morphologische Unterschiede aufweisen, zeigen sie ein recht einheitliches histologisches Bild undifferenzierter runder Zellen und werden daher auch als primitive neuroektodermale Tumoren bezeichnet (Gilbertson, 2001). Diese Klassifikation beruht auf der Annahme, dass die Stammzelle der Medulloblastome im „external germinal cell layer“ EGL entspringt, eine primitive neuroepitheliale Schicht des Kleinhirns (VandenBerg et al., 1987). Neuere Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass das Medulloblastom tatsächlich mehr als einen Stammzell-Typ besitzt. Dies würde der Heterogenität der Tumorgruppe Rechnung tragen (Giangaspero et al. 2000). Ein neues Klassifikationssystem teilt diese Gruppe der PNETs entsprechend der Genexpression ein.

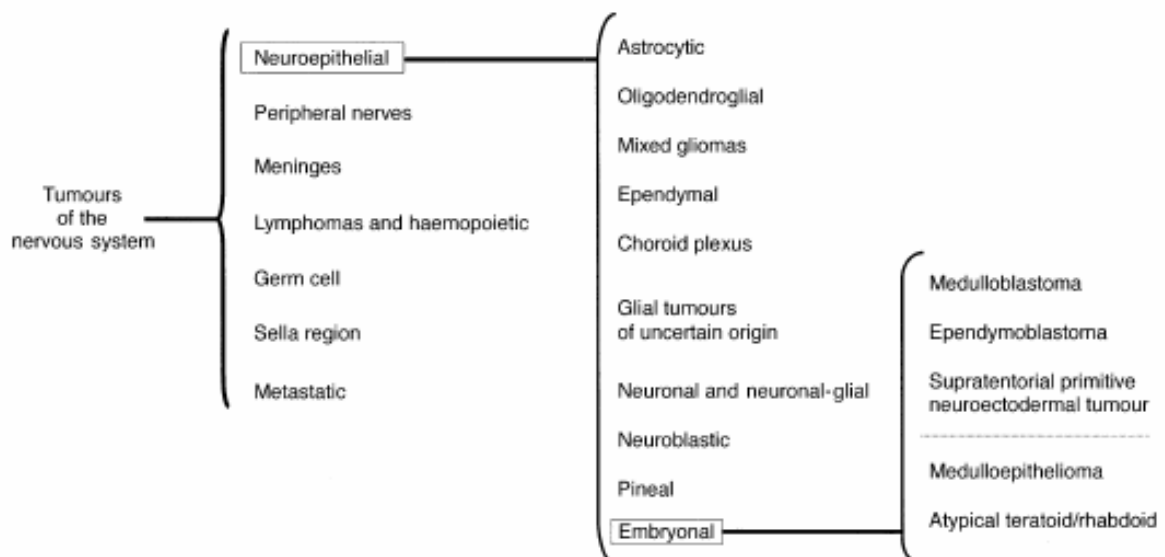


Abbildung 4 WHO Klassifikation der ZNS-Tumoren

Übersicht über die Position der Medulloblastome in der WHO-Klassifikation der Tumoren des ZNS

Medulloblastome umfassen ca. 20% aller Gehirntumoren im Kindesalter. Sie sind häufiger bei Jungen (66%) und treten zu 70% vor dem 10 Lebensjahr auf mit einem Gipfel um das 5 Lebensjahr. 20% aller Medulloblastome treten vor dem 2 Lebensjahr auf, nach dem 50. Lebensjahr sind sie eine Ausnahme (Paulino, 2002). Insgesamt konnte die Inzidenz von Medulloblastomen und anderen primitiven neuroektodermalen Tumoren gesenkt werden, vermutlich durch die bessere Versorgung mit Multivitamin-Präparaten (v.a. Eisen, Calcium und Vitamin C) während der Schwangerschaft (Thorne et al., 1994).

In der Gruppe der Medulloblastome unterscheidet man zunächst angeborene und erworbene Formen, wobei die erworbenen, sporadischen Medulloblastome zahlenmäßig mit 95% die häufigeren sind. Die 5% der angeborenen Medulloblastome präsentieren sich meist mit einem klinisch gut charakterisierten Syndrom (Evans et al., 1993), das auf einer genetischen Deletion beruht. So ist zum Beispiel das Li-Fraumeni Syndrom das Ergebnis einer Inaktivierung von p53, das Turcot Syndrom das Ergebnis einer APC Inaktivierung (Dyer et al., 2004) und das Gorlin-Goltz Syndrom oder Basalzellnävuussyndrom resultiert aus einer Inaktivierung von Ptc1 (Hahn et al., 1996). 1-2% aller Patienten mit Medulloblastomen haben das Gorlin-Goltz-Syndrom, während 3-5% aller Gorlin-Goltz-Patienten Medulloblastome entwickeln (Evans et al., 1991). Obwohl das Ptc1 Gen relativ selten in erworbenen Medulloblastomen inaktiviert ist, so ist die Deletion jedoch auch in sporadischen Medulloblastomen zu finden (Pazzaglia et al., 2006, Raffel et al., 1997). Die Haploinsuffizienz des Ptc-Genes scheint bei der Entstehung der Medulloblastome ausreichend zu sein, konträr zu der bislang gültigen „Two-Hit-Hypothese“ (Zurawel et al., 2000). Um Medulloblastome und deren Entstehung besser zu verstehen wurde ein Mausmodell geschaffen (Fults, 2007). Im Mausmodell konnte der Zusammenhang zwischen hereditärer Ptc-Heterozygotität und der Entstehung von Medulloblastomen nachgewiesen werden (Pazzaglia, 2006, Wetmore et al., 2000). Mutationen in Shh-Rezeptor Ptc haben ein höheres Risiko der Medulloblastomentstehung (Gorlin, 1995, Hahn et al., 1996, Johnson et al., 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Shh-Signalweges, der für die normale Differenzierung der Zellen der EGL im Kleinhirn von entscheidender Bedeutung ist, zu Medulloblastomen führen kann (Dahmane et al., 2001; Villavicencio et al., 2000, Wechsler-Reya und Scott, 1999). Dabei scheinen die granule cell precursors GCP in der external granule layer EGL der Kleinhirnanlage nicht auszudifferenzieren und in die internal granule layer (IGL) zu wandern, sondern in der EGL zu verbleiben und dort ungehemmt zu proliferieren (Corcoran und Scott, 2001). Dabei scheint auch PC3 einen entscheidenden Einfluss zu haben, da es die Proliferation hemmt und die Ausdifferenzierung fördert (Farioli-Vecchioli et al., 2007). In der EGL bilden sich daraus sogenannte praene-

oplastische Zellen, welche einen wichtigen Zwischenschritt in der Entstehung von Medulloblastomen darstellen (Oliver et al., 2005). Ptch heterozygote Mäuse haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko zur Bildung von Medulloblastomen (Goodrich et al., 1997; Hahn et al., 2000), speziell von den aus der EGL entstehenden Körnerzellen (Kim et al., 2003). Daher spricht man dem Shh-Ptch Signalweg eine Schlüsselrolle in der Erforschung von Medulloblastomen zu (Ruiz i Altaba et al., 2004). Schließlich konnte auch dem JC Virus eine Rolle in der Genese von Medulloblastomen nachgewiesen werden (Khalili et al., 1999).

Charakteristischerweise entstehen die Medulloblastome aus dem Vermis, aber in älteren Kindern können auch Medulloblastome in den Kleinhirnhemisphären auftreten. Es entsteht keine Nekrose, Zystenbildung oder Kalzifizierung, die Tumoren bleiben weich. Histologisch unterscheidet man klassische Medulloblastome, sowie desmoplastische und anaplastische Medulloblastome. Man findet hier gliale, neuronale, ependymale und mesenchymale Zellvorläufer. Seltene Varianten des Medulloblastoms sind das melanotische Medulloblastom und das Medullomyoblastom (Paulino, 2002).

Zytogenetisch findet man sehr häufig Deletionen auf 17p, 8p und 11p (Michiels et al., 2002). 17p codiert dabei für ein bekanntes Tumorsuppressor-Gen, das hypermethylated in cancer-1 (HIC-1) Gen (Steichen-Gersdorf et al., 1997). Zudem wurden weitere Deletionen gefunden, u.a. 1p, 3q, 6q, 9q, 11q, 16q (Gilbertson, 2002). Die Signifikanz dieser Deletionen ist weiterhin unklar, lediglich 9q besitzt inzwischen eine deutliche klinische Relevanz (siehe Kapitel 1.6.2). Ebenso findet man eine Amplifikation verschiedener Loci, u.a. der MYC Oncogene ErbB1 (7p12), MYC (8q24) and MYCN (2p24.1), sowie eine Reihe von weiteren Amplifikationen: 7q, 17q, 18q, 7p, 13q und 18p (Fujii et al., 1994, Schutz et al., 1996, Reardon et al., 1997, Wasson et al., 1990, Avet-Loiseau et al., 1999, Nicholson et al., 1999). Ebenso wurden eine Reihe von Signaltransduktionswegen identifiziert, die in Medulloblastomen abnormal aktiviert sind und z.T. mit den oben beschriebenen Gen-Loci korrelieren, darunter fallen der hier untersuchte Shh-Ptch-Signaltransduktionsweg (9q), sowie weitere, wie der Neurotrophin, der ErbB Rezeptor, das APC-Gen und der Wnt/wg Signaltransduktionsweg (Gilbertson, 2002, Pomeroy, 2003).

Diese zytogenetischen Aberrationen korrelieren zum Teil mit der histologischen Aufteilung. So zeigt sich bei anaplastischen eine verstärkte 17q Amplifikation sowie eine verstärkte MYCC Expression (Dyer, 2004), während das desmoplastische Medulloblastom mit einer 9q (der Ptch Locus) und einer 10q (der SuFu Locus) Deletion assoziiert ist. Das bestätigt sich durch die Beobachtung dass die meisten Medulloblastome bei BZNS eine desmoplastische Morphologie aufweisen (Pietsch et al., 1997).

Klinisch präsentiert sich der Tumor als eine Neoplasie des Vermis, der in den 4. Ventrikel einwächst und somit den CSF Fluss behindert. Daraus erwachsen die typischen klinischen Symptome des erhöhten Hirndrucks und Hydrozephalus wie Kopfschmerz, Erbrechen, Lethargie, Papillenödem, Verwirrtheit und schlechte Nahrungsaufnahme (bei Kleinkindern). Auch ein vergrößerter Schädelumfang und eine vorgewölbte vordere Fontanelle sind möglich. Außerdem verursacht der Tumor aufgrund seines Ursprungs im Kleinhirn eine typische Kleinhirn Symptomatik, u.a. wie Ataxie oder Koordinationsverlust. Durch Einwachsen in benachbarte Strukturen kann es zu Hirnnervenschäden kommen oder bei einer leptomeningealen Dissemination zu Rückenschmerzen, Nackensteife, oder Schwäche der Gliedmassen (Paulino, 2002).

Zur Diagnosestellung sind heute MRI und CSF Zytologie unabdingbar, jedoch ist die Chirurgie das Mittel der Wahl zur Diagnosesicherung. Zu beachten ist, dass 1-2% der Tumoren bei Diagnosestellung bereits metastasiert sind, vornehmlich in Knochen, Knochenmark, Leber und Lymphknoten (Paulino, 2002).

Die Therapie des Medulloblastoms ist heute ein multimodaler Ansatz der Chirurgie mit Chemotherapie und Strahlentherapie verbindet. Je nach Risikostratifizierung des Patienten werden diese Therapiemodalitäten in unterschiedlichen Protokollen verwendet, jedoch konnte sich keines bisher davon durchsetzen. Insgesamt konnte aber eine 60%ige Heilungsrate verbucht werden (Paulino, 2002, Ellison et al., 2003).

2. Fragestellung

Wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, ist Ptch als Tumorsuppressor-Gen für die Entstehung des Basalzellnävussyndromes oder Gorlin-Goltz-Syndroms verantwortlich (Corcoran und Scott, 2001, Wicking et al., 1997). Das Basalzellnävussyndrom geht zu einem hohen Prozentsatz mit Medulloblastomen einher (Gorlin, 1995). Medulloblastome sind Tumoren die im Kleinhirn entstehen und zum größten Teil bei Kindern unter 5 Jahren auftreten (Paulino, 2002). Hier ist der Tumor hauptsächlich im Vermis des Kleinhirns lokalisiert. Der Vermis entsteht während der Embryogenese aus dem kaudalen Anteil des Mesenzephalons oder Mittelhirnes (Gilbert, 2000). Dieser kaudale Anteil des Mittelhirnes ist aber auch an der Bildung der Midbrain-Hindbrain Boundary MHB, oder dem „Isthmic Organizer“, beteiligt, der seinerseits verantwortlich für die Entwicklung des Kleinhirnes während der Embryogenese ist (Rhinn und Brand, 2001, Wurst und Bally-Cuif, 2001). Da nun Ptch in Medulloblastomen zu finden ist (Zurawel et al., 2000), welche im Kleinhirn entstehen, das wiederum aus der MHB entsteht, kann eine Beteiligung von Ptch an der Bildung der MHB während der Embryogenese angenommen werden. Dies verdeutlicht

sich an der Expression einiger Gene in Medulloblastomen, die an der Bildung der MHB beteiligt sind (Michiels et al., 1999, Yokota et al., 2004). Außerdem ist die MHB ein Organisationszentrum des Neuroepithels, das eine anteroposteriore Musterung beschreibt (Rhinn und Brand, 2001, Wurst und Bally-Cuif, 2001). Ptch als Rezeptor für Shh ist bisher nur in die dorsoventrale Musterung eingebunden (Cohen, 2003, Hammerschmidt et al., 1997, Ho und Scott, 2002, Ruiz I Altaba et al., 2003).

In der hier vorliegenden Arbeit soll nun der Frage nach der Beteiligung von Ptch an der Bildung der MHB und der damit verbundene Einfluss auf die Entstehung von Medulloblastomen, sowie der Einfluss von Ptch auf die anteroposteriore Musterung nachgegangen werden.

Um diese Zusammenhänge genauer zu untersuchen wurde ein Mausmodell geschaffen, bei dem eines der beiden Ptch Allele inaktiv ist, denn heterozygote Mäuse zeigen einige Symptome, die dem BZNS sehr ähnlich sind (Goodrich et al., 1997): sie werden größer, entwickeln Extremitätenmissbildungen wie Syndaktylie, sowie Rhabdomyosarkome oder Gehirntumoren, vornehmlich Medulloblastome. Dazu wurde das Exon 6 und 7 eines Ptch Allels durch eine NEO-Kassette ersetzt um so eine Deletion eines Allels zu erzeugen. Diese Ptch^{+/-} heterozygoten Mäuse werden untereinander verpaart. Die sich entwickelnden Embryonen sind nach den Mendelschen Regeln zu einem viertel Ptch^{-/-} bzw. Ptch^{+/+} homozygot und zur Hälfte Ptch^{+/-} heterozygot. Da aber Ptch^{+/+} und Ptch^{+/-} Embryonen eine normale Embryogenese durchlaufen und keine alterierte Genexpression zeigen werden alle Untersuchungen an Ptch^{-/-} Embryonen durchgeführt.

Die veränderte Genexpression ist das Resultat einer pathologischen Aktivierung des Shh-Ptch Signalweges. Ist Ptch aufgrund einer Deletion nicht mehr funktionsfähig, so fällt der inhibierende Einfluss auf Smo weg. Daraus resultiert eine Daueraktivierung der Transkription der Shh Zielgene, u.a. Gli und Ptch selbst. So kann man zwar Ptch nachweisen, jedoch ist dieses nicht mehr funktionsfähig.

Die Embryonen werden zum Zeitpunkt 8.5dpc (nach Befruchtung) aus der Maus isoliert. Zu diesem Zeitpunkt findet die Bildung der MHB während der Embryogenese der Maus statt. Die Genexpression von Ptch und der an der Bildung der MHB beteiligten Gene soll nun durch eine in-situ Hybridisierung verdeutlicht werden. Die Schwierigkeit der in-situ Hybridisierung liegt im Todeszeitpunkt der Ptch^{-/-} Embryonen, der mit 9dpc bis 10,5dpc angegeben wird (Goodrich et al., 1997) und sich danach keine Aussage mehr über die Genexpression machen lässt. Als Kontrolle werden jeweils Wildtyp oder Ptch^{+/-} heterozygote Mäuse, im nachfolgenden als Wildtyp bezeichnet, mit den Ptch^{-/-} Embryonen hybridisiert.

3. Material und Methoden

3.1. Methoden

3.1.1. Mäuse

Für alle Versuche wurden heterozygote *Ptch1*^{neo67/+} Mäuse auf CD1 Hintergrund verwendet. Um die Heterozygotie festzustellen, wurde DNA aus der Schwanzspitze isoliert und zum Genotypisieren verwendet (zur Genotypisierung siehe Kapitel 3.1.2).

Wildtyp Mäuse wurden aussortiert. *Ptch1*^{neo67/+} heterozygote Tiere wurden miteinander nach einem festen Schema verpaart. Die Embryonen wurden am Tag 8.5 nach der Befruchtung aus dem Muttertier isoliert. Hierzu wurde als Nullpunkt der Zeitrechnung der Tag um 0.00 Uhr festgesetzt, an dem der vaginale Pfropf (Plug) bei der Muttermaus festgestellt wurde. Wurde am Nachmittag ebenfalls eine Plugkontrolle durchgeführt, so wurde hier 12.00 Uhr als Nullpunkt festgesetzt. Nach festgestelltem Plug wurden die Muttermäuse von den Männchen getrennt und in einem separaten Käfig gehalten.

3.1.2. Genotypisierung von *Ptch1* Mutanten

Zum Genotypisieren wurde aus 1cm Schwanzspitze der Maus DNA extrahiert. Hierzu wurde der DNA-Extraktions Kit von Promega verwendet:

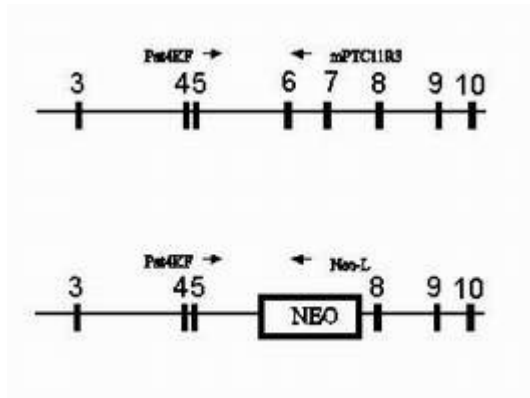


Abbildung 5 *Ptch* Allel

Darstellung des *Ptch* Wildtyp und des *Ptch* neo67 Allels mit den PCR spezifischen Primern

1 cm Schwanzspitze wurde in ein beschriftetes 1.5ml Zentrifugenröhrchen mit 720µl Lyse-Puffer über Nacht bei 55°C im Wasserbad verdaut. Das Protein wurde am nächsten Tag mit 200µl Protein Präzipitation Lösung gefällt und abzentrifugiert. Danach wurde die DNA im Überstand (500µl) mit 500µl Isopropanol gefällt und anschliessend mit 1ml 70% Äthanol gewaschen. Danach wurde das DNA-Pellet kurz getrocknet und in 200µl Rehydratationslösung aufgenommen.

Um die gewonnene DNA zu genotypisieren, wurde eine PCR-Reaktion mit spezifischen Oligonukleotiden („Primer“) durchgeführt, welche das Ptch1 Wild-Typ und mutierte Allel detektieren (siehe Abbildung 5).

Hierzu wurde ein standardisierter PCR-Zyklus mit folgendem Ansatz verwendet:

5,6µl H₂O
1µl 10x PCR-Puffer
1µl Kresol
1µl Primer Pst4KF
0,5µl Primer mPTC11R3
0,5µl Primer Neo-L
0,2µl dNTPs
0,2µl Taq-Polymerase
sowie 1µl DNA pro Ansatz

Die PCR-Reaktion wurde bei einer „Annealing“ (Anlagerung der Primer) Temperatur von 60°C für 1min 15sek. und einer Extensionstemperatur von 72°C für 1min mit folgendem PCR Programm durchgeführt:

94°C	4min	1x
94°C	30sek	
60°C	1min 15sek	35x
72°C	1min	
72°C	5 min	1x

Das Primerpaar Pst4KF und mPTC11R3 amplifizieren ein Fragment von 650 Basenpaaren und detektieren das Wild-Typ Ptch1 Allel. Pst4KF und Neo-L amplifizieren dagegen ein Fragment von 400 Basenpaaren, das nur dann detektiert wird, wenn die Maus das mutierte *Ptch1*^{neo67} Allel besitzt und somit heterozygot *Ptch1*^{neo67/+} oder aber homozygot *Ptch1*^{neo67/neo67} am *Ptch1* Locus ist.

3.1.3. Embryonendissektion

Um die Embryonen zu isolieren wurde die trächtige Maus mit CO₂ und nach Ausbleiben der Atembewegungen mit einem Genickbruch getötet und auf dem Rücken liegend auf einer Korkunterlage mit Stecknadeln an Armen und Beinen fixiert. Dann wurde die

Bauchdecke mit Ethanol desinfiziert und von kaudal nach kranial eröffnet ohne hierbei das Peritoneum zu verletzen. Auf Höhe des oberen Sternumrandes wurde die Haut nach lateral in die vorderen Extremitäten eingeschnitten. Vom Startpunkt wurde auch nach lateral in die hinteren Extremitäten präpariert. Danach wurde die Bauchdecke vom Peritoneum gelöst und mit Nadeln auf der Korkplatte fixiert. Dann wurde, wieder von kaudal beginnend, das Peritoneum eröffnet. Nach der Eröffnung des Peritoneums wurde der Uterus vorsichtig entfernt und in eiskaltem PBT bis zur Embryoisolierung aufbewahrt.

Der Uterus einer Maus besitzt zwei Hörner, die sich als längliche Schläuche darstellen. Hier nisten sich in regelmäßigen Abständen nach der Befruchtung die Eier ein und es kommt zu einer lokalen Proliferation von Endometrium. Der Uterus sieht daher am Tag 8,5 wie eine Girlande aus, an der in kurzen Abständen birnenförmige Auftreibungen hängen. In diesen befinden sich die Embryonen. Diese lokalen Uterusverdickungen wurden von Peritoneum und den anderen umgebenden Hüllen und Membranen befreit und in eine Schale mit frischem PBS auf Eis gelegt. Der einzelne Uterus wurde unter dem Mikroskop bei 25-facher Vergrößerung an der der Plazenta und Embryo gegenüberliegenden Seite vorsichtig mit einer Pinzette eröffnet bis der Embryo in seinen Membranen sichtbar wurde. Dieser wurde dann vorsichtig von allen maternalen Geweben und embryonalen Membranen befreit. Danach wurde er mit Hilfe einer sterilen Pipette in eine neue Schale mit 4% FKS in PBT gegeben. Alle Embryonen wurden auf diese Art und Weise präpariert und wurden dann in ein spezielles Körbchen gegeben. Dieses Körbchen wurde aus einem 1,5 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss hergestellt, dem der Boden entfernt und durch ein dünnes Nylonnetz ersetzt worden war. Das Netz ist wasserdurchlässig aber jedoch so dicht, dass die Embryos nicht durch die Maschen fallen konnten. Pro Körbchen wurden je nach Alter der Embryonen 5 bis 15 Individuen gegeben. Um die verschiedenen Fixierungs-, Wasch- und Hybridisierungsschritte vorzunehmen, wurden 24-Napf-Flachbodenplatten verwendet, in denen jeder Napf 1,5ml der entsprechenden Flüssigkeit enthalten hat. Zunächst wurden die Embryos im Körbchen 3x 5min in PBT gewaschen, dann kurz in 4% Paraformaldehyd in PBS gespült um dann 1,5h in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert zu werden. Danach wurden die Embryonen noch einmal 2x 5min in PBT gewaschen. Abschließend wurden diese dann in 25%, 50%, 75% und 100% Methanol in PBT für je 5min dehydriert um dann in 100% Methanol auf -20°C aufbewahrt zu werden. Alle diese Schritte wurden in einer 24-Napf-Flachbodenplatte ausgeführt, die auf Eis stand. Diese Schritte mussten auch alle auf Eis ausgeführt werden, da eine Bearbeitung der Embryonen bei Raumtemperatur eine Degradierung der RNA zur Folge hätte und eine

„whole mount *in-situ* Hybridisierung“ (WMISH) schlecht bis unmöglich wäre, da diese Technik eine intakte RNA voraussetzt.

3.1.4. Elektronenmikroskopie

Die Aufbereitung der Embryonen für die Elektronenmikroskopie und die Elektronenmikroskopie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. med. U. Heinzmann am Institut für Pathologie der gsf München Neuherberg übernommen und durchgeführt.

3.1.5. Sondengenerierung für Whole-mount *in-situ* Hybridisierung

Die Sonden für die *in situ* Hybridisierungen mit Bf-1 und *lmx1b* wurden selbst hergestellt. Hierzu wurde mit genspezifischen Primern anhand einer embryonalen (9,5 dpc) cDNA die entsprechenden Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die Sequenzen für Bf-1 und *lmx1b*, sowie für deren Primer sind im Anhang zu finden.

Um die entsprechenden Sonden zu generieren wurde die embryonale cDNA mit den für *Lmx1b* und BF-1 spezifischen Primern amplifiziert. Hierzu wurde eine 10 µl PCR-Reaktion angesetzt:

1 µl Kresol
1 µl 10x PCR-Puffer
1 µl cDNA (embryonale, 9,5 dpc)
0,2 µl dNTP einer 10mM Stocklösung
0,2 µl Taq-Polymerase
0,5 µl Primer 1 (Vorwärtsprimer, 10µM Stocklösung)
0,5 µl Primer 2 (Rückwärtsprimer, 10µM Stocklösung)
6,6 µl H₂O

Es wurde folgendes PCR Programm gewählt:

94°C	4min	1x
94°C	30sek	
55°C	1min 15sek	35x
72°C	1min 15sek	
72°C	5min	1x

Am Anschluss an die PCR wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen, aus dem Gel eluiert und in den Vektor pCRII kloniert.

3.1.5.1. DNA Extraktion aus Agarosegel

Die Extraktion der amplifizierten BF-1 und Lmx1b Fragmente wurde mit dem DNA Extraction Kit von Promega durchgeführt:

Hierzu wurden die DNA-Banden mit einem sterilem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1.5 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Gel wurde mit 500µl Lösungspuffer QG für 15min bei 50°C aufgelöst. Dann wurde 500µl Isopropanol hinzugeben, kurz gemischt und die Lösung über Säulchen abzentrifugiert. Die an die Säulen gebundene DNA wurden mit 750µl Waschpuffer PE gewaschen und anschliessend mit 50µl Wasser eluiert.

3.1.5.2. Ligation

Die aus dem Agarosegel gewonnenen PCR Fragmente von Lmx1b und BF-1 mussten in einen Vektor kloniert werden, anhand dessen eine Probe für WMISH hergestellt werden konnte. Hierzu wurde der TA-Klonierungskit von Invitrogen verwendet. In den hierbei verwendeten pCR II Vektor wurden sowohl das aufgereinigte Bf-1 als auch Lmx1b Fragment über TA-Klonierung eingebracht. Der pCR II Vektor besitzt das Resistenzgen für Ampizillin sowie eine Kasette, welche β -Galaktosidase exprimiert. Im Falle einer erfolgreichen Klonierung wird diese Kasette zerstört. Weiterhin besitzt dieser Vektor die für die Herstellung von „antisense“ und „sense“ Proben notwendigen Bindungstellen für die Sp6 und T7 Polymerase (eine genaue Beschreibung des pCR II Vektors ist im Anhang zu finden). In einem 10µl Ansatz wurden wie vom Hersteller beschrieben 1µl 10x Ligationspuffer, 1µl des pCR II Vektors, 7µl des jeweiligen PCR-Fragments und 1µl Ligase über Nacht in einem 14°C kalten Wasserbad inkubiert.

3.1.5.3. Transformation von kompetenten Bakterien

Zur Vervollständigung der Ligation und zur Aufreinigung des neu entstandenen Plasmids muss der Ligationsansatz zunächst in kompetente Bakterien eingeschleusst werden. Hierzu wurde die die Hälfte des Ligationsansatzes (siehe oben) mit 100µl kommerziell erhältlichen kompetenten DH α Bakterien (Gibco, BLR) gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien bei 42°C für 45sec geschockt und direkt danach für 2min auf Eis inkubiert. Dies führt zur einer Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien. Anschliessend wurden die Bakterien in 250µl LB Medium bei 37°C für 50min geschüttelt, so dass die Bakterien die Möglichkeit für eine Teilung hatten.

Um eine erfolgreiche Transformation zu überprüfen, müssen die Bakterien selektiert werden. Hierzu wurde die Hälfte des Transformationsansatzes auf ampizillinhaltigen Agaroseplatten (100µg Ampizillin /ml LB-Agarose) ausplattiert. Nur diejenigen Bakterien

überlebten, die eine Ampizillinresistenz hatten. Diese Ampizillinresistenz wurde über das in das Bakterium eingeschleuste Plasmid vermittelt. Weiterhin wurde schon während des Bakterienwachstums auf den Ampizillinplatten das Plasmid auf die Integration des Inserts hin untersucht. Hierfür wurde die Substanz X-Gal (30µl einer 50mg X-Gal /ml DMSO Stocklösung) mit dem Transformationsansatz ausplattiert. Sollte die Ligation erfolgreich gewesen sein, so wird im pCR II Vektor die Sequenz für die β -Galaktosidase unterbrochen, welche dann nicht mehr in der Lage ist X-Gal in einen blauen Farbstoff umzusetzen.

Die Proben BF-1 und Lmx1b für WMISH sind auf diese Art und Weise selbst kloniert worden. Für alle anderen WMISH Proben war bereits ein fertiges Plasmid vorhanden. Diese mussten jedoch noch in Bakterien transformiert werden um genügend Material für weitere Experimente zu haben. Da es sich hierbei schon um fertige Plasmide handelte wurden zur Transformation nur 100ng Plasmid und 25µl kompetente Bakterien verwendet. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien in 500µl LB Medium geschüttelt und nur 50µl des Ansatzes wurden auf Ampizillinplatten ausplattiert.

3.1.5.4. Plasmid Minipräparation und Plasmidskontrolle mittels Restriktionsverdau

Um aus den auf den Ampizillinplatten gewachsenen Bakterienkolonien die Plasmide zu isolieren und auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen, wurden die weissen Kolonien gepickt und einzeln in 3ml LB Medium/100 µl Ampicillin übernacht im Schüttler angezüchtet. Am nächsten Tag hatten sich die Bakterien in den 3ml vermehrt, so dass eine Plasmid Minipräparation zur Überprüfung des Plasmids vorgenommen werden konnte. Dies geschieht in der Regel vor einer Grossaufreinigung von Plasmiden. Zur Minipräparation wurde der Midiprep-Kit von Qiagen nach einem modifizierten Protokoll verwendet. So wurden 1,5ml LB-Medium / amplifizierte Bakterien abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 200µl P1 Puffer resuspendiert. Dann wurden 200µl P2 Lyse-Puffer zugeben, kurz durch Schütteln gemischt und mit 200µl P3 Neutralisierungs-Puffer versetzt. Das ausgeflockte Protein wurden 10min bei 13000rpm abzentrifugiert. 500µl des plasmidhaltigen Überstands wurde von Restprotein durch Mischen und Abzentrifugieren mit 500µl Phenol befreit. Die Plasmid-DNA wurden durch 2.5 Vol Äthanol präzipitiert (= 1ml Äthanol und 400µl Überstand) und 20min abzentrifugiert. Das Pellet wurden mit 70% Äthanol gewaschen, kurz getrocknet und in 50µl Wasser aufgenommen.

Um nun a) bereits bekannte Plasmide vor der Grossaufreinigung nochmals zu überprüfen oder b) neu klonierte Plasmide auf die Integration des Inserts hin zu überprüfen, wurden ein Teil der Plasmid Minipräparation mit einem Restriktionsenzym verdaut. Beim Plasmiden, welche mittels TA-Klonierung und dem pCR II Vektor hergestellt wurden,

eignet sich besonders das Enzym EcoRI, da die TA-Klonierungsstelle von zwei der entsprechenden Restriktionsstellen flankiert wird. Bei einer erfolgreichen Klonierung wird durch Verdau des Plasmids mit EcoRI somit das Insert herausgeschnitten und erscheint auf dem Agarosegel zusätzlich zum pCR II Vektor-Fragment als separate Bande(n). Von allen Minipräparationen wurden daher je 5µl mit 2µl des 10x Puffers für EcoRI, 1µl EcoRI und 12µl Wasser (insgesamt 20µl) für 2-3 Stunden im Brutschrank bei 37°C verdaut. Nach Zusatz des Ladepuffers wurden die Ansätze auf einem 0.8%igem Agarosegel aufgetrennt und die Banden mittels Ethidiumbromid visualisiert.

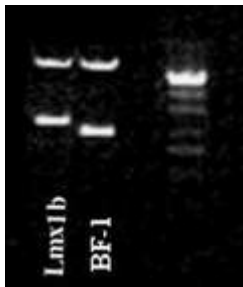


Abbildung 6 Subklonierung

Verdau der klonierten Plasmide BF-1/F1R1 und lmx1b/F1R1 mit EcoRI.

3.1.5.5. Plasmid Midipräparation

In diesem Arbeitsschritt wird aus den Bakterienkulturen der Minipräparationen Plasmid-DNA in ausreichender Menge zum Sequenzieren und für die Markierungsreaktion hergestellt. Nur solche Bakterienkulturen werden verwendet, welche das korrekte Plasmid enthalten. Die entsprechende Kultur wird übernacht bei 37°C in 50 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angezüchtet. Am nächsten Tag wird die Kultur folgendermassen mit dem Midiprep-Kit von Qiagen weiterverarbeitet: Die Kultur wird bei 4500rpm 15min lang abzentrifugiert. Das Baktereinpellet wird in 4ml P1 Puffer resuspendiert. Dann werden 4ml P2 Puffer hinzugeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 4ml P3 Puffer hinzugeben und die Suspension nach Mischen 15min auf Eis inkubiert. Das Protein wird 30min bei 6000rpm abzentrifugiert. In der Zwischenzeit werden die mitgelieferten Säulen mit 4ml QBT Puffer äquilibriert. Der Überstand der Zentrifugation wird auf Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bleibt in der Säule hängen. Sie wird dann 2x mit jeweils 10ml QC Puffer gewaschen bevor sie mit 5ml QF Puffer eluiert wird. Die DNA wird dann mittels 5ml Isopropanol gefällt und für 30min bei 10000rpm abzentrifugiert. Das DNA Pellet wird dann kurz getrocknet und in 300µl Wasser aufgenommen. Wir haben an diese DNA Aufreinigung noch einen weiteren Aufreinigungsschritt angeschlossen. Hierzu wurden die 300µl Wasser/Plasmid Suspension mit 300µl Phenol versetzt und

ausgeschüttelt. Die DNA wurde dann mittels Äthanolpräzipitation gefällt, mit 70% Äthanol gewaschen und in 50µl Wasser aufgenommen.

Die Konzentration des Gehaltes an Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und die Plasmid-DNA auf eine entgültige Konzentration von 1µg/µl Wasser eingestellt. Zur Sicherheit wurde nochmals 1µg des Plasmids mit EcoRI verdaut (siehe Ergebnisse).

3.1.5.6. Sequenzierung

Alle Proben, die für WMISH verwendet wurden, wurden sequenziert. Bei bereits vorhandenen Plasmiden diente dies zur Überprüfung. Bei den neu klonierten Proben diente die Sequenzierung zur Überprüfung der klonierten DNA und auch zur Bestimmung der Orientierung des cDNA-Fragmentes innerhalb des Vektors. Dies ist von besonderer Bedeutung, da man hiermit auch die Polymerase festlegt, mit welcher die „antisense“ oder „sense“ Probe für die WMISH hergestellt werden kann.

Zur Sequenzierung wurde der „Big Dye Terminator“ Sequenzierungskit von Perkin Elmer verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden ca. 600ng des zu sequenzierenden Plasmids mit 1µl T3, T7 oder Sp6 Primer (Stock 1µM) gemischt. Die jeweiligen Primer sind durch die Sequenz des Vektors festgelegt und können im Anhang ersehen werden. Dann wurden 2µl Big Dye Terminator Mix und 0.3µl DMSO (zur Stabilisierung der Reaktion) dazu pipettiert und der Ansatz mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl eingestellt. Die Sequenzierung erfolgte dann in der PCR-Maschine unter folgenden Bedingungen: Die Proben wurden bei 98°C für 10 sek. denaturiert. Danach wurde mit 30 Zyklen für jeweils 94°C für 10 sek, 50°C für 10 sek und 60°C für 4 min die Reaktion amplifiziert. Die fertige Sequenzreaktion wurde dann mit 100µl des fertigen Fällungsmixes (siehe Material) gefällt und 30min bei 4700rpm abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 200µl 70% Äthanol gewaschen und anschliessend 30min im Dunklen getrocknet (wegen Gefahr des Zerfalls der fluoreszierenden Nukleotide).

Die einzelnen Reaktionen wurden in 1.5µl Ladepuffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf das Sequenziergel bei 90°C für 2 min denaturiert. Die Auftrennung der Sequenzreaktion erfolgte auf einer automatisierten Sequenziermaschine von Perkin Elmer (ABI 377). Die Auswertung der Daten wurde mittels “BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool)”, welches über die NCBI Homepage (National Center for Biotechnology Information) über das Netz zugänglich ist, ausgewertet.

3.1.5.7. DIG-Markierung der Sonde

Um nun eine “antisense” oder “sense” Probe für die WMISH herzustellen, mussten die einzelnen Proben zunächst linearisiert werden. Hierzu wurden die Plasmide individuell mit

den entsprechenden Enzymen geschnitten. Die Enzyme für die jeweiligen Plasmide sind im Anhang vermerkt. 5µg DNA wurden mit Enzym und Reaktionspuffer versetzt und in einem 50µl Ansatz bei 37°C für 3h verdaut. Der vollständige Verdau des Plasmides wurde danach anhand 2µl des Reaktionsansatzes überprüft, welcher auf ein 0.8%igen Agarosegel aufgetragen wurde. Der restliche Ansatz wurde nun mit Proteinase K behandelt. Dies ist notwendig um a) das Restriktionsenzym zu entfernen und b) die Reaktion von störenden RNasen zu befreien. Hierzu wurden die restlichen 48µl des Restriktionsverdaus mit 10µl SDS 10%, 4µl Proteinase K (Stock 10mg/ml) und 138µl Wasser versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 200µl RNase-freies Wasser hinzugeben und der Ansatz mit 400µl Phenol/Chloroform ausgeschüttelt. Nach 10min Zentrifugation bei 13000rpm bei Raumtemperatur wurde der Überstand in neues Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 1ml 100% Äthanol und 30µl 3M Natriumazetat gefällt. Dann wurde der Ansatz noch 30min auf Trockeneis oder über Nacht auf -20°C gestellt. Dies fördert die Präzipitation der DNA. Das Pellet wurde dann für 30 min bei 13000rpm abzentrifugiert, mit 500µl 80% Äthanol gewaschen und nach dem Trocknen in 5µl RNase-freies Wasser aufgenommen. Danach wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

Zur Markierung der DNA mit Digoxigenin wurde 1µg Plasmid-DNA in einem 20µl Ansatz mit 2µl 10x DIG RNA Markierungs Mix ("DIG RNA Labeling Mix" von Boehringer), 2µl 10x Puffer, 5µl einer 100mM DTT-Lösung, 2µl Polymerase (entweder T7, T3 oder Sp6 Polymerase aus den "Ampliscribe Transcription Kits" von Epicenter Technologies) für 2h bei 37°C inkubiert. Zur Verstärkung der Markierung wurde nochmals ein Markierungsschritt angeschlossen bei dem nochmals weitere 10µl des Markierungsansatzes (1µl 10x DIG RNA Markierungs Mix, 1µl 10x Puffer, 2.5µl 100mM DTT, 1µl der entsprechende Polymerase, 4.5µl RNase-freies Wasser) für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert wurde.

Dann wurde die markierte DNA durch Zusatz von 1.5µl 0.4M EDTA, 3.75µl 4M Lithiumchlorid und 112.5µl 100% Äthanol 30min auf Trockeneis gefällt. Nach der Zentrifugation 30min bei 13000rpm bei 4°C wurde das Pellet in 200µl 80% Äthanol gewaschen und nach dem Trocknen in 110µl RNase-freies Wasser aufgenommen. Danach schloss sich ein weiterer Fällungsschritt an, der die Reinheit der Probe verbessern sollte. Hierzu wurden 12.5µl 4M Lithiumchlorid und 250µl 100% Äthanol dazupipettiert, der Ansatz auf Trockeneis gefällt und wie oben beschrieben abzentrifugiert und gewaschen. Das Pellet wurde dann in 25µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Um das Ergebnis der Markierungsreaktion zu überprüfen, wurde 1µl der Probe auf einem 0.8%igen Agarosegel überprüft.

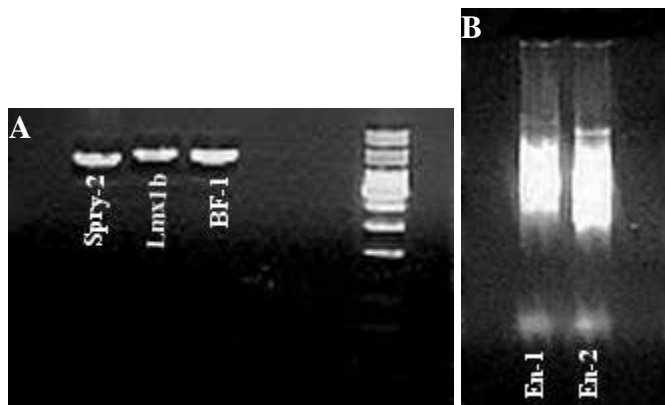


Abbildung 7 DIG-Markierung

(A) Plasmidverdau von BF-1, Lmx1b, Spry-2. Zusätzlich wurde links ein Marker aufgetragen; (B) Ergebnis der Markierungsreaktion für En-1 und En-2. Man erkennt einen deutlichen Schmier, der die unterschiedlich lang abgelesenen RNA Stränge zeigt.

3.1.6. Whole mount in-situ hybridization (WMISH)

Zu Beginn einer WMISH wurde jeweils ein *Ptch1*^{-/-} Embryo mit zwei *Ptch1*^{+/+} Embryonen, die in etwas gleiches Alter haben, in ein neues Körbchen gegeben. Für die genaue Aufteilung der *Ptch1*^{-/-} Mutanten und der *Ptch1*^{+/+} Embryonen siehe Anhang.

Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer 24-Napf-Flachbodenplatte durchgeführt (oder es wird ausdrücklich anders erwähnt).

An Tag eins der WMISH wurden die Embryonen aus dem Gefrierschrank genommen und auf Eis gehalten, bis der Temperaturgleich vollzogen war. Dann wurden sie mit 75% 50% 25% Methanol in PBS für je 10min rehydriert. Um das Methanol vollständig zu entfernen wurden sie 2x je 10min mit PBT und 1x 5min mit PBT auf Eis gewaschen. Da alle Embryonen, die hier verwendet wurden jünger als 10,5dpc waren, war eine Vorbehandlung mit Proteinase K nicht erforderlich. Somit wurden die Embryonen nach den Waschungen 10min in RIPA Puffer auf Eis inkubiert und anschließend 2x 5min mit viel PBT auf Eis gewaschen. Um einer Deformierung während der sich anschließenden Schritte vorzubeugen, wurden die Embryonen exakt 20min mit 0,2% Glutaraldehyd und 4% Paraformaldehyd in PBT fixiert. Das Paraformaldehyd wurde danach mit PBT für 2x 5min wieder ausgewaschen. Danach wurden die Embryos zunächst 10min in Hybridisierungsmix/ PBT (1:1 Mischung) und danach 10min mit Hybridisierungsmix bei Raumtemperatur gewaschen. Dann folgte eine einstündige Prähybridisierung der Embryonen bei 68°C in Hybridisierungsmix, der mit 100µg/ml tRNA versetzt war. Hierzu wurden die Körbchen aus der 24-Napf-Flachbodenplatte entnommen und in ein kleines Glasröhrchen gesetzt, das zuvor mit RNaseZap und sehr viel Millipore-Wasser RNase-frei gemacht wurde. Die Röhrchen wurden auf einem abgeflammt Aluminiumpapier

getrocknet, bevor die Körbchen weiter verwendet wurden. Um die Glasröhrchen vor einem direkten Kontakt mit heißen Metallteilen im Brutschrank zu schützen und um eventuelle Temperaturgradienten auszuschließen, wurden sie in ein Styropor-Ständer gestellt, der seinerseits wiederum auf einen Styropor-Sockel stand, so dass die Glasröhrchen mit den Embryonen sich etwa in der Mitte des Brutschrankes befanden. Die Röhrchen wurden, um einer Verdunstung der Probe vorzubeugen, mit einem RNase-freien Plastikdeckel verschlossen. Nach einer Stunde wurde die Körbchen mit einer RNase-freien Pinzette in neue Röhrchen umgesetzt, welche eine 1:1000 Verdünnung der entsprechenden DIG-markierten RNA-Sonde in Hybridisierungsmix (d.h. 1µl Sonde auf 1ml Hybridisierungsmix) mit tRNA (100µg/ml) enthielten. Die Hybridisierung der Embryonen in dieser Lösung erfolgte bei 68°C über Nacht.

An Tag zwei der WMISH wurde zunächst der Hybridisierungsmix und auch das SSC/FA/Tween20 (siehe Lösungen) auf 65°C erhitzt. Sobald der Temperaturgleich erfolgt war, wurden die Glasröhrchen mit den Embryonen aus dem Brutschrank entnommen und die DIG markierte Sonde mit einer sterilen Einweg Plastik-Pipette entfernt. Die Körbchen mit den Embryonen wurden in den gleichen Glasröhrchen belassen und 2x für 30min bei 65°C mit vorgewärmten Hybridisierungsmix gewaschen wurden. Danach wurden die Glasröhrchen aus dem Brutschrank entnommen und die Embryos in den Glasröhrchen bei offenem Deckel belassen, bis sie auf Raumtemperatur abgekühlt waren. Danach wurden die Körbchen mit einer Pinzette aus den Glasröhrchen entnommen und in eine 24-Napf-Flachbodenplatte gesetzt, in der sie zunächst 5min mit Hybridisierungsmix/RNase Lösung und dann 5min mit RNase Lösung gewaschen wurden. Danach wurden die Körbchen mit den Embryonen 60min in RNase Lösung mit 100µg/ml RNase A auf 37°C inkubiert. Dieser Schritt ist notwendig um nicht gebundene RNA-Proben aus den Embryonen zu entfernen, welche später zu Hintergrundfärbung führen können. Hierzu wurde die 24-Napf-Flachbodenplatte auf einem Styroporständer in den 37°C Brutschrank gestellt. Die Platte wurde nicht abgedeckt. Danach wurden die Embryonen 5min in 1:1 RNase Lösung/ (SSC/FA/Tween20) bei Raumtemperatur gewaschen. Nach diesen Schritten wurden die Embryos wieder aus der 24-Napf-Flachbodenplatte entnommen und in das Glasröhrchen zurückgesetzt, wo sie in SSC/FA/Tween20 auf 65°C erhitzen wurden. Dies wurde wie oben beschrieben im Brutschrank durchgeführt. Nach erfolgtem Temperaturgleich wurden die Embryonen in erhitzten SSC/FA/Tween20 nach folgendem Schema gewaschen: 2x 5min, 3x 10min, 5x 30min. Hier wurde nun nicht- oder schlecht - hybridisierte RNA Proben entfernt. Die benutzten Lösung wurde jeweils mit einer sterilen Plastik-Pipette entfernt und die neue

Lösung mit einer regulären Pipette zugegeben. Nach diesen Waschschrritten wurden die Embryonen auf Raumtemperatur abgekühlt, aus dem Glasröhrchen entfernt, in eine 24-Napf-Flachbodenplatte gesetzt und 5min zunächst in (SSC/FA/Tween20)/ TBST (1:1) sowie 2x 10min in TBST gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation für 60min in TBST + 2% Böhlinger Blocking Reagenz (BBR) bei Raumtemperatur, an die sich eine Inkubation für 60min in TBST + 2% BBR + 20% Ziegenserum bei Raumtemperatur anschloss. Abschließend wurden die Körbchen in TBST + 2% BBR + 20% Ziegenserum + einer 1:2000 Verdünnung des an die Alkaline Phosphatase gekopplten Anti-DIG Antikörpers über Nacht auf 4°C im Kühlschrank inkubiert. Die Platte wurde hierbei nicht abgedeckt.

An nächsten Tag wurden die Embryonen aus dem Kühlschrank entnommen und 3x 5min bei 37°C mit TBST gewaschen. Danach wurden sie 8x 60min mit TBST auf Raumtemperatur gewaschen und danach über 2 Tage bei 4°C in TBST belassen.

Dann wurden die Embryonen 2x 5min mit Alkalinem Phosphatase Puffer gewaschen. Danach wurden die Körbchen mit den Embryonen bei 4°C in ein vorbereitetes Glasröhrchen mit 2ml Färbelösung gestellt. Dort wurden sie unter mehrmaligem Schütteln, um die Embryos zu wenden, bis zum Nachmittag belassen. Dann wurden sie entnommen und die Färbung begutachtet. Bei ausreichender Färbung wurden die Embryonen aus der Färbelösung entnommen, bei noch nicht ausreichender Färbung wurde am Nachmittag die Färbelösung gewechselt und die Embryonen nochmals bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert und eventuell sogar bei Raumtemperatur oder bei 37°C weitergefärbt. Die Färbung wurde erst beendet, wenn sich keine Änderung der Färbeintensität mehr zeigte. Diese wurde bei stark transkribierten Genen schneller erreicht als wie bei schwach transkribierten, die Verteilung im Gewebe bleibt aber davon unbeeinflusst.

Nach erfolgreicher Färbung wurden die Embryonen aus der Färbelösung entfernt, nochmals 2x 10min in Alkalinem Phosphatase Puffer gewaschen und zuguterletzt in 4% Paraformaldehyd in einem 1.5ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss auf 4°C aufbewahrt.

Zum Fotografieren wurden die Embryonen in eine mit PBT gefüllte Petrischale getan, die schräg mit Agarosegel ausgegossen war. Alle Aufnahmen wurden mit einer Digital-Kamera von Leica gemacht.

3.1.7. Northern Blot Analyse

Um die Expression eines Gens der Gehirnentwicklung in einen möglichen Zusammenhang mit der Entwicklung von Medulloblastomen zu bringen, wurde die Expression dieser Gene an adulten Medulloblastomen überprüft. Dies geschah mit Hilfe von Northern Blot

Analysen. Um ein Gel (150ml) herzustellen wurden 1,5g Agarose abgewogen, mit 108ml Wasser in sterilem Erlenmeyerkolben aufgekocht und unter Wasserstrahl langsam abgekühlt. Dann wurden 15ml 10x MOPS RNA Puffer und 27ml einer 37% Formaldehydlösung unter Schwenken zugeben und das Gel in RNase-freiem Gelträger gegossen.

10µg totale RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf 100µl aufgefüllt und zunächst mit 10µl 3M Natriumazetat und 250µl Äthanol für 15min bei 12000rpm und 4°C abzentrifugiert. Das RNA Pellet wurde in 3µl Wasser gelöst, mit 10µl Ladepuffer I versetzt und 5min bei 65°C inkubiert. Dann wurde 3µl Ladepuffer II hinzugegeben und die Probe auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden dann für ca. 3h bei 60V in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt.

Dann wurde das Gel 2x 10min mit Millipore-Wasser gewaschen und mit 10x SSC über Nacht auf eine Nylonmembran geblottet. Die RNA wurde dann mit UV-Licht auf die Membran fixiert.

Die Prähybridisierung als auch die Hybridisierung wurde in bei 42°C im Hybridisierungsöfen durchgeführt. Die Membran wurde zunächst mit 5ml Hybridisierungslösung und 500µg Lachssperma DNA (5min bei 95°C denaturiert) > 2h bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit wurde die radioaktive Probe vorbereitet. Hierzu wurden 50ng DNA Sonde und Wasser in einem Gesamtansatz von 42µl in ein "Random Prime Tube" (Stratagene) pipettiert. Dieses Röhrchen enthält Oligonukleotide (zufällige Hexamere) und Salze in lyophilisierter Form, die für die Herstellung der Probe benötigt werden. Das Röhrchen wurde dann 5min bei 95°C inkubiert um die Probe zu denaturieren und dann auf Eis abgekühlt. Dann wurden 5µl [α -³²P]dCTP und 3µl Magneta Polymerase in den Ansatz gegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Die markierte DNA wurde dann über Säulen aufgereinigt und 5min 95°C bei denaturiert bevor sie in 5ml zuvor gewechselte Hybridisierungslösung (ohne Sperma DNA) pipettiert wurde. Der Blot wurde dann über Nacht bei 42°C mit der Sonde inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Blot zunächst mit SSC (2fach) kurz in der Röhre abgewaschen und dann 10min mit 2fach - 0,1fach SSC mit 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Die Membran wurde in eine Klarsichtfolie eingehüllt. In einer Filmkassette wurde dann ein Film bei -80°C für 1-2 Tage (je nach Stärke der Strahlung) der Strahlung gegenüber exponiert und dann entwickelt.

3.2. Material

3.2.1. Mäuse

Litter Nr.	Tube Nr.	Anzahl Ptch ^{-/-} aus Litter Nr.	Anzahl Ptch ^{+/+} aus Litter Nr.	Färbung
1309	1	1/1309	2/1309	Dll-1
1427	1	1/1427	2/1427	
	2	1/1427	2/1427	Ptch
	3	1/1427	2/1427	Spry-2
	4	1/1427	2/808	Fgf-8
	5	1/1427	1/805, 1/1031	Wnt-1
	6	1/1427	2/1031	DRAL
1298	1	1/1298	2/1298	Shh
	2	1/1298	2/1298	BF-1
1293	1	1/1293	2/1293	Fgf-8
	2	1/1293	2/1293	En-2
	3	1/1293	1/1031, 2/1093	Gbx-2
	4	1/1293	2/1093	Lmx1b
1299	1	1/1299	2/1299	
	2	1/1299	2/1299	Otx-2
	3	1/1299	1/1299	Lmx1b
	4	1/1299	1/1233, 1/1093, 1/808	Krox-20
	5	1/1299	2/1325	Spry-2
	6	1/1299	2/1325	Gli-1
1011	1	1/1011	2/1325	
	2	1/1011	2/1337	En-1
	3	1/1011	2/1337	BF-1
	4	1/1011	1/1337, 1/1233	Otx-2

Tabelle 2 Mäusewürfe

Die verwendeten Mäuse stammen aus dem Tierstall der gsf München-Neuherberg und wurden freundlicherweise von Frau Dr. Hahn zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um heterozygote Ptch Knock-out Mäuse auf einem CD1 Hintergrund. Bei diesen wurden das Exon 6 und 7 in einem Allel durch eine NEO-Kassette ersetzt, so dass dieses Allel funktionslos bleibt. Die Ptch^{neo67/+} Mäuse wurden für 10 Generationen untereinander verpaart. Weibliche Mäuse der 10. Generation wurden nach der Paarung isoliert und nach

8,5dpc die Embryonen präpariert. Entsprechend den Mendelschen Regeln der Vererbung sollten dabei 25% homozygote *Ptch*^{-/-} Knock-out Nachkommen entstehen. Diese wurden mit den zuvor hergestellten Sonden gefärbt. Zur Darstellung der normalen Genexpression wurden parallel dazu gesunde Embryonen mit der gleichen Sonde angefärbt. Die Embryonen der verschiedenen Litter (Wurf einer Maus) wurden wie in Tabelle 2 zu sehen kombiniert und gefärbt.

3.2.2. Medulloblastome

Zur Northern Blot Analyse wurden Medulloblastome aus heterozygoten *Ptch*^{neo67/+} Mäusen auf einem C57BL/6 (B6) Hintergrund verwendet. 72% der B6-*Ptch*^{neo67/+} Mäuse entwickeln innerhalb der ersten 300 Lebenstage bestrahlungs-unabhängige Medulloblastome (Hahn et al., 2004). Diese wurden isoliert, schockgefroren und in flüssigem Stickstoff konserviert. Aus diesen Proben wurde zu einem späteren Zeitpunkt die RNA für die Northern Blot Analysen gewonnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNA von 3 Medulloblastomen verwendet. Die untersuchten Medulloblastome stammen von Mäusen aus dem Tierstall der gsf München-Neuherberg und wurden freundlicherweise von Frau Dr. Hahn zur Verfügung gestellt. Die Präparation der Medulloblastome und die Aufbereitung der Proben wurden freundlicherweise von Frau Samson und Herrn Schnitzbauer übernommen.

3.2.3. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien beschränken sich auf die handelsüblichen Chemikalien der Firmen Sigma, Merck, Gibco und Boehringer. Die verwendeten Kits sind von Promega, Quiagen, Invitrogen und Biozym (Epicenter Technologies).

3.2.4. Lösungen

PBT

PBS (phosphate buffered saline) ohne Mg, Ca

0,1% Tween 20

TBST

1x TBS (tris buffered saline)

0,1% Tween 20

10x PE

100mM Pipes

10mM EDTA

Hybridisierungsmix

50% Formamid

0,75M Natriumchlorid

1x PE

100µg/ml tRNA

0,1% SDS

0,1% Tween 20

DNase, RNase freies Wasser

RIPA Puffer

2,5ml 10% SDS (Natriumdodecylsulfat)

15ml 5M Natriumchlorid

5ml NP40

25ml 10% Deoxycholat

1ml 0,5M EDTA

25ml 1M Tris-HCl pH 8,0

auf 500ml auffüllen

RNase Lösung

1ml 5M NaCl

100µl 1M Tris-HCl pH 7,5

10µl Tween20

auf 10 ml auffüllen

BBR

Boehringer Blocking Reagent

Stock: 10%ige Lösung für 30 min auf 70°C erhitzen und danach einfrieren, löst sich nicht komplett

Alkaline Phosphatase Puffer

1ml 5M Natriumchlorid
2,5ml 1M Magnesiumchlorid
50µl Tween20
5ml 1M Tris-HCl pH 9,5
2mM Levamisol
auf 50ml auffüllen

SSC/FA/Tween20

5ml 20x SSC
25ml Formamid
50µl Tween20
auf 50ml auffüllen

Färbelösung

2ml Boehringer BM Purple AP Substrate
2mM Levamisol
0,1% Tween20
zentrifugieren und Überstand verwenden

Gebrauchslösung

4ml Prähybridisierungslösung
1ml 10% SDS
in Hybridisierungsröhre geben

Prähybridisierungslösung

10ml 20x SSPE
5ml 100x Denhardt's Lösung
25ml deionisiertes Formamid
auf -20°C aufbewahren

Wasch Puffer für Sequenzreaktion:

9ml Äthanol
1.8ml Wasser
0.3ml 3M NaAc

3.2.5. Gebrauchsfertige Puffer

Lyse Puffer

Lösungs- Puffer QG

Wasch- Puffer QE

10x Ligation Puffer

P1, P2 und P3 Puffer

QBT Puffer

QC Puffer

QF Puffer

10x Puffer für Restriktionsenzyme

SSC

Ladepuffer I und II für Northern Blot

Fällungsmix ABI

Ladepuffer für Sequenz Reaktion

Gelansatz für Sequenzreaktion

18g Harnstoff

18ml Wasser

10ml 5xTBE-Puffer

6ml PP

Rühren bis Harnstoff gelöst ist

10% Lösung von Ammoniumpersulfat zu Gelansatz dazugeben

4. Ergebnisse

4.1. Genotypisierung von heterozygoten $Ptch^{+/-}$ und Wildtyp- Mäusen

Da homozygote $Ptch^{-/-}$ Mäuse intrauterin am Tag 9,5 absterben und somit nicht zur Verpaarung eingesetzt werden können, wurden zur Gewinnung von homozygoten $Ptch^{-/-}$ Embryonen zwei heterozygote $Ptch^{+/-}$ Mäuse miteinander verpaart. Der Genotyp der Elterntiere wurde mittels PCR an Schwanzspitzen-DNA festgestellt. In Abbildung 8 ist ein typisches Ergebnis dargestellt. Es wurden 27 Tiere genotypisiert. Das 650bp große Fragment repräsentiert das Wildtyp Allel und das 400bp große Fragment das Knock-out Allel. Somit sind 12 Tiere Wildtypen (wt) und haben kein mutiertes $Ptch$ Allel, 13 Mäuse sind heterozygot für die Mutation ($Ptch^{+/-}$) und 2 Tiere (Nummer 6 und 15 in Abbildung 8) konnten nicht genotypisiert werden.



Abbildung 8 Genotypisierung

Genotypisierung der Mäuse mittels PCR. Das 650bp große Fragment repräsentiert das Wildtyp *Pctch* Allel (wt) und das 400bp große Fragment das mutierte Allel (*Pctch*^{+/}).

4.2. Phänotypisierung von homozygoten *Pctch*^{-/-} Embryonen durch Lichtmikroskopie

Bei der Präparation der Embryonen aus dem Uterus unter dem Lichtmikroskop sind schon deutliche Unterschiede zwischen *Pctch*^{-/-} homozygoten Embryonen und Wildtypembryonen feststellbar. Abbildung 9 A-C zeigt einen *Pctch*^{-/-} homozygotem Embryo, D und E zeigen einen Wildtyp-Embryo. Bezüglich des Alters sind beide Embryonen als ungefähr gleich alt anzusehen, da bei beiden 7 Somiten abzuzählen sind. Dies ist in *Pctch*^{-/-} Embryo deutlich erschwert. Damit entsprechen beide Embryonen einem Alter von 8,5dpc. In der Gesamtansicht (B) ist deutlich zu erkennen, dass der Embryo deutlich größer ist als der Wildtyp Embryo (E). Ebenso in der Gesamtansicht zu erkennen ist, dass beim *Pctch*^{-/-} Embryo die Herzanlage noch auf der Außenseite liegt, während beim Wildtyp Embryo auf der Innenseite. Dies ist auf das fehlende „Turning“ zurückzuführen, welches regulär zum Tag 8,5dpc bei Mäusen erfolgt, jedoch bei *Pctch*^{-/-} homozygoten Embryos ausbleibt. Das „Turning“ ist eine für die Entwicklung der Maus spezifische Drehung des gesamten Embryos. Diese Drehung beginnt um den Tag 8,5 mit ca. 4-6 Somiten und ist bei spätestens 12-14 Somiten abgeschlossen. Dabei dreht sich der Embryo um seine Längsachse. Am Ende des „Turning“ befindet sich der Embryo komplett in der Amnionhöhle, der Embryo krümmt sich zur Herzanlage und das Neuralrohr liegt den embryonalen Membranen zugewandt. Im Bereich der Somiten fällt auf, dass diese nicht gleichmäßig ausgebildet sind und eine homogene Struktur wie in Abbildung 9 E zu sehen nicht erkennbar ist. Die Somiten sind deutlich kleiner und weniger scharf zum benachbarten Somiten abgegrenzt. Ebenso ist gut zu erkennen, dass die Neuralfalten beim Wildtyp geradlinig von kaudal nach kranial durchlaufen, während beim *Pctch*^{-/-} Embryo diese deutlich unregelmäßiger erscheinen mit vielen Tälern und Hügeln. Der *Pctch*^{-/-} Embryo zeigt im Bereich der Gehirnanlage (Abbildung 9 C, A) einige Unterschiede zum Wildtyp. Die deutliche Gliederung der Wildtyp-Gehirnanlage mit den schon erkennbaren Grenzen von Vorder-, Mittel und Hinterhirn ist im *Pctch*^{-/-} Embryo nur mit Mühe nachzuvollziehen. Eine eindeutige Begrenzung ist nicht mehr zu erken-

nen. Die Gliederung der Hirnanlage ist nur anhand der mesodermal ausgebildeten Strukturen und deren räumliche Lage zu den verschiedenen Gehirnanteilen einigermaßen zu beurteilen. Das Vorderhirn ist deutlich atrophiert, während die Mittelhirnanteile deutlich hypertrophiert erscheinen. Auch zeigt sich die Neuralrinne nicht so deutlich ausgeprägt wie im Wildtyp. Die Neuralleisten im $Ptch^{-/-}$ Embryo sind deutlich verplumpt und verdickt. Während sich die Neuralrinne mit den Leisten beim Wildtyp im kaudalen Bereich schon zum Neuralrohr geschlossen hat, ist das Neuralrohr beim $Ptch^{-/-}$ Embryo noch auf der gesamten Länge geöffnet.

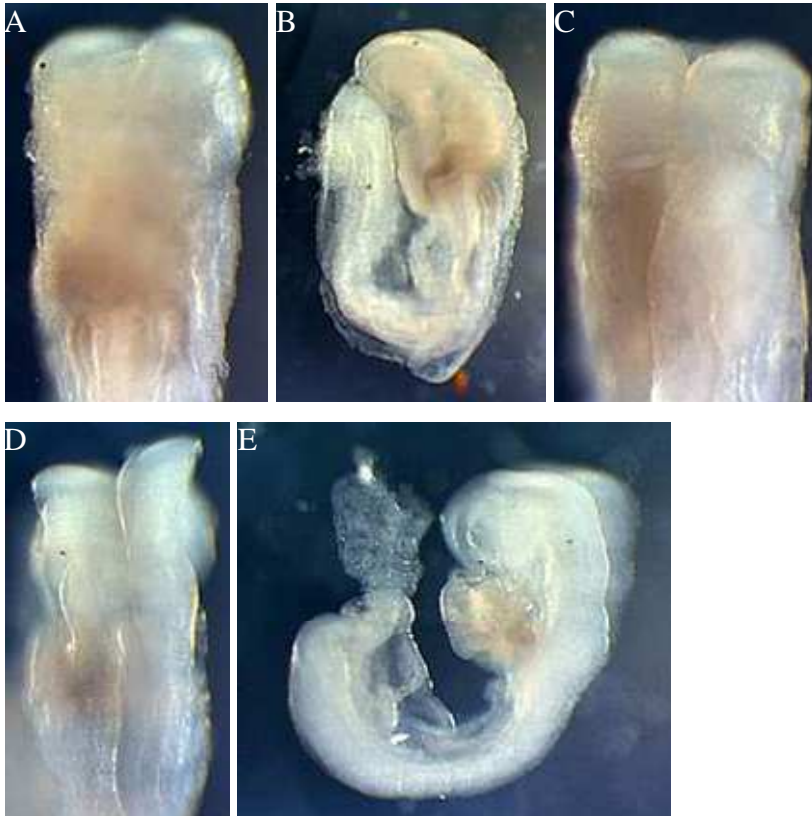


Abbildung 9 Lichtmikroskopie der Embryonen

(A) Gehirnanlage eines $Ptch^{-/-}$ Embryo von ventral (B) $Ptch^{-/-}$ Embryo von lateral Gesamtansicht (C) Gehirnanlage eines $Ptch^{-/-}$ Embryo von dorsal (D) Gehirnanlage wt Embryo von dorsal (E) wt Embryo von lateral Gesamtansicht. Die Hintergrundfärbung ist durch eine fehlgeschlagene Hybridisierung bedingt.

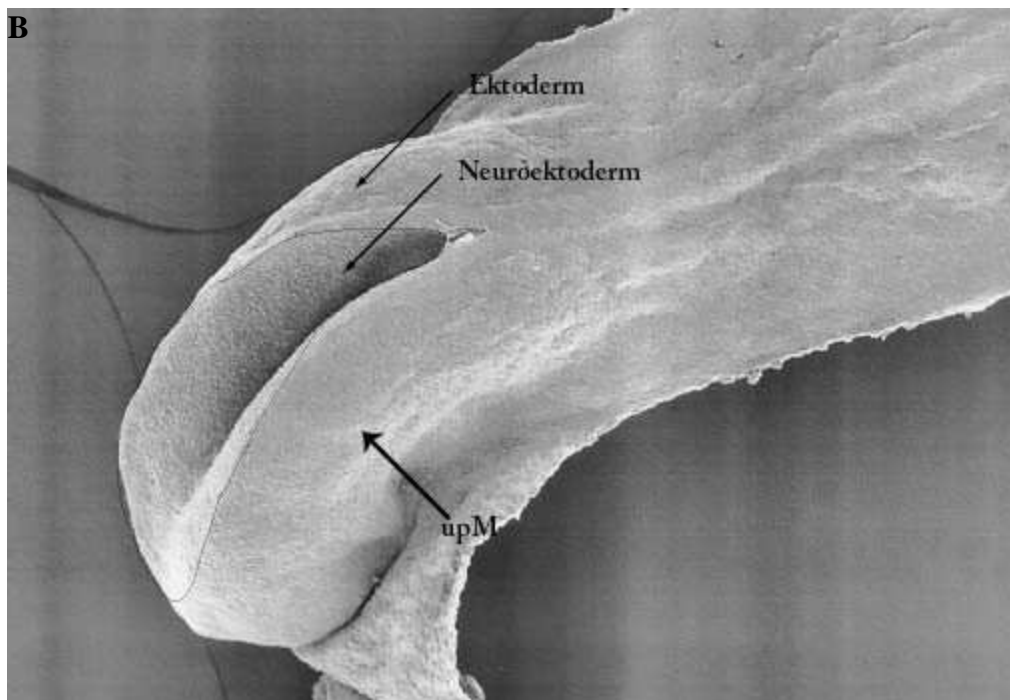
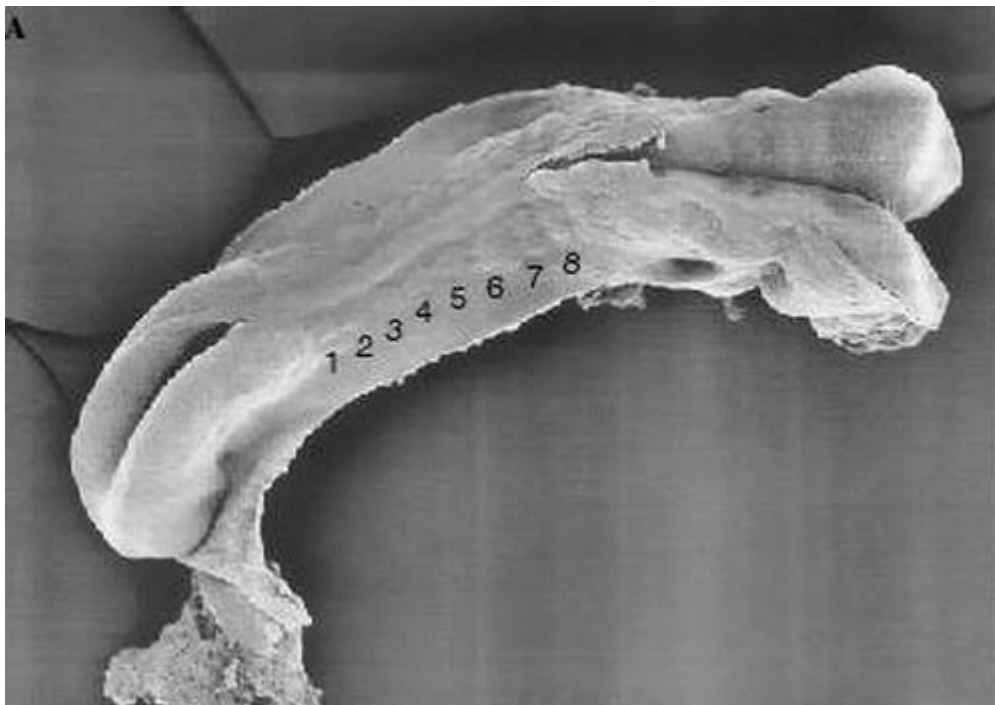
4.3. Phänotypisierung von homozygoten $Ptch^{-/-}$ Embryonen durch Elektronenmikroskopie

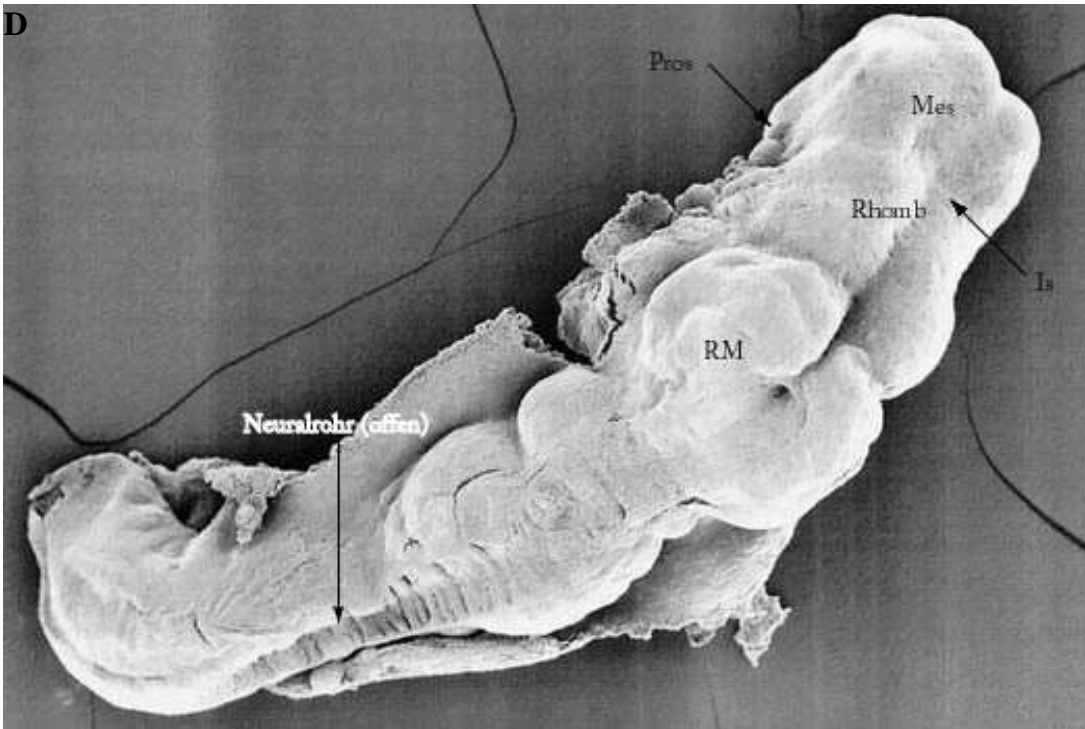
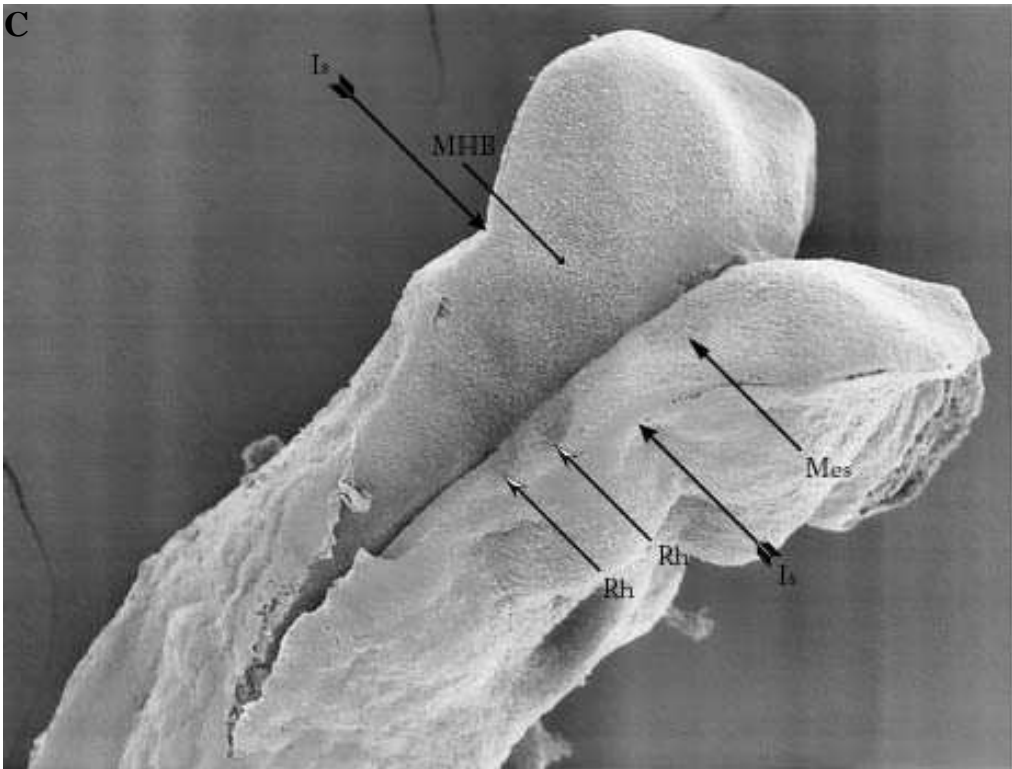
Es wurden Embryonen isoliert, welche durch die Verpaarung zweier heterozygoten $Ptch^{+/-}$ Mäuse entstanden sind. Nach einer solchen Verpaarung sollten entsprechend den Mendelschen Regeln der Vererbung somit in einem Wurf 25% der Embryonen homozygot ($Ptch^{-/-}$) und 50% heterozygot ($Ptch^{+/-}$) für die $Ptch$ Mutation sein; weitere 25% sollten Wild-Typ Embryonen sein.

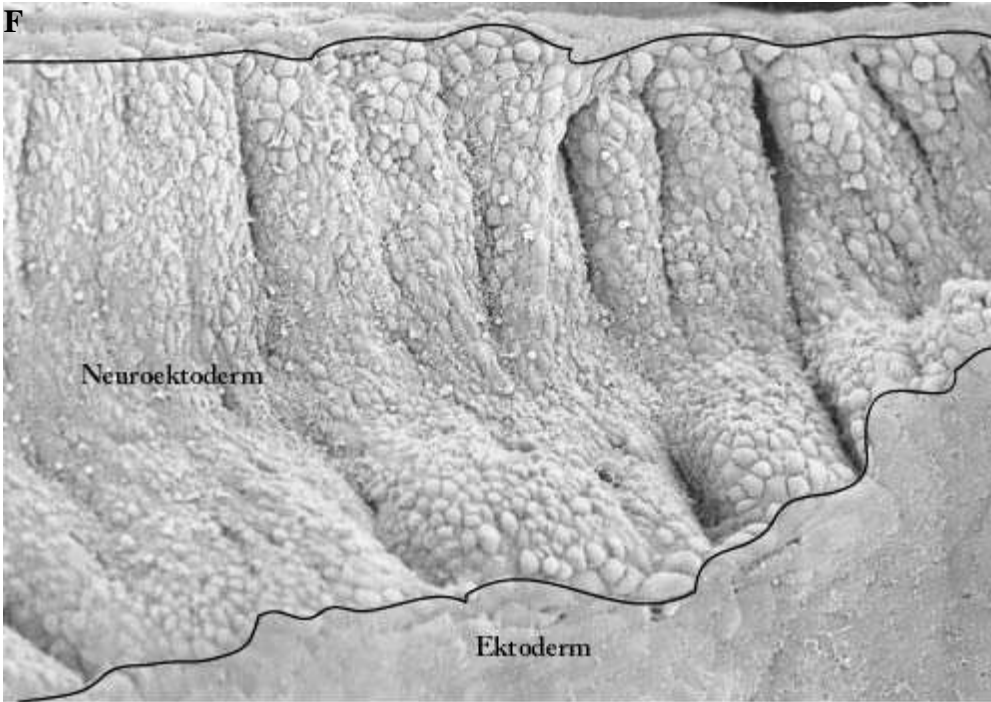
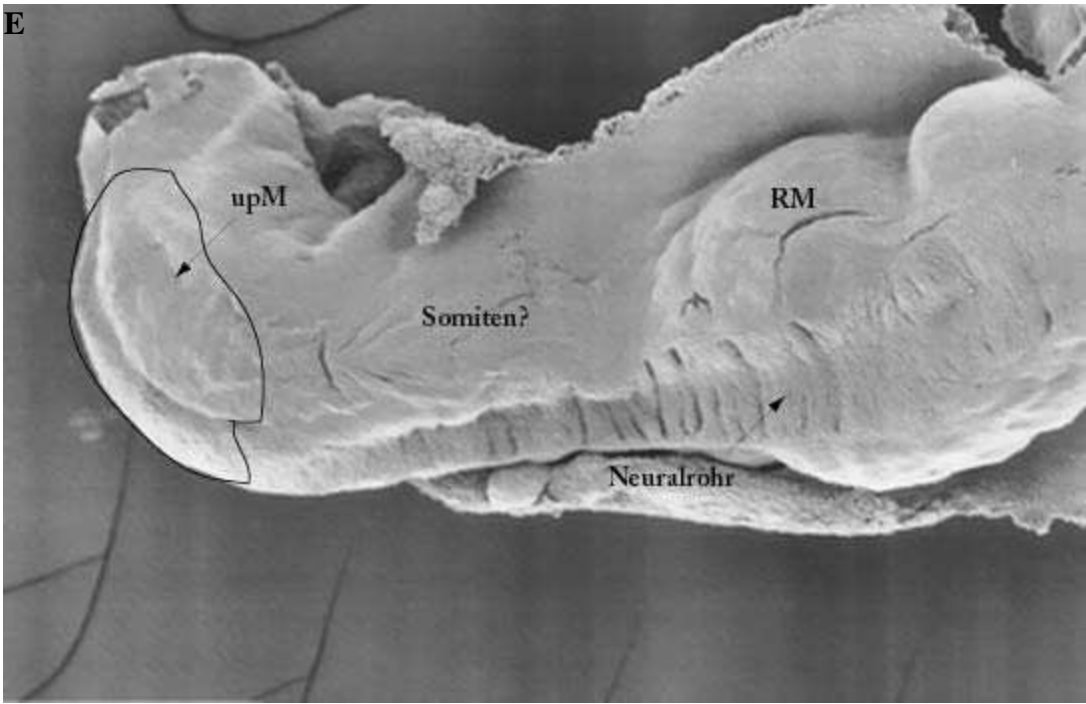
Wie in Abbildung 10 dargestellt ist, unterscheiden sich homozygote $Ptch^{-/-}$ Embryonen in ihrem Phänotyp schon am Tag 8.5 dramatisch von heterozygoten $Ptch^{+/-}$ oder Wildtyp Embryonen. In Abbildung 10 Elektronenmikroskopie der Embryonen A, B und C ist ein Wildtyp Embryo dargestellt, der im Vergleich zu dem in Abbildung 10 D, E und G gezeigten $Ptch^{-/-}$ Embryo deutliche Unterschiede zeigt.

Abbildung 10 A zeigt einen Wildtyp Embryo in 50-facher Vergrößerung von dorsal. Sämtliche embryonalen Membranen wurden entfernt, lediglich das Amnion ist am kaudalen Ende noch zum Teil vorhanden. Man erkennt deutlich die Somiten und kann 8 Somitenpaare abzählen. Damit ist dieser Embryo 8 bis 8,5 Tage alt. Man kann ebenfalls erkennen, dass das „Turning“ schon stattgefunden hat. In Abbildung 10 B ist neben der unterschiedlichen Epithelstruktur zwischen Neuroektoderm und Ektoderm ebenfalls noch das unsegmentierte paraxiale Mesoderm (Pfeil) zu sehen, aus dem sich die Somiten abschnüren. In Abbildung 10 C erkennt man die Strukturierung des Neuroepithels. Auch können die Hirnbläschen sowie der Beginn der Bildung der Rhombomere erkannt werden. Weiterhin ist der Isthmus und die Mittelhirn- Hinterhirn Grenze zu sehen (siehe Pfeile). In diesem Entwicklungsstadium ist die MHB nicht mit dem Isthmus, welcher als bilaterale Konstriktion zu erkennen ist, identisch, wie ursprünglich angenommen. Die MHB liegt rostral des Isthmus, an der kaudalen Grenze der *Otx-2* Expression und fällt erst in einem späteren Entwicklungsstadium (ab ca. 30 Somiten) mit der Konstriktion am Isthmus zusammen. In der Abbildung 10 ist ein $Ptch^{-/-}$ Embryo zu sehen, der deutlich deformiert ist und der am Tag 8,5 aus dem Uterus entfernt wurde. Man kann zunächst sehen, dass der Embryo deutlich größer ist. Deutliche Auffälligkeiten zeigt der Embryo im Bereich der Hirnanlage und des Neuralrohres: das Neuralrohr ist nicht geschlossen, sondern auf der gesamten Länge offen und das Gehirn besitzt keine Neuralfalten (Abbildung 10 D). Eine Detailansicht des Neuroepithels ist in Abbildung 10 E zu sehen. Es ist sehr ungleichmäßig strukturiert. Man erkennt deutlich die Abgrenzung zu umgebenden Ektoderm und dass die Zellen des Neuroektoderms verschiedene Größen aufweisen. Ebenfalls ist zu sehen, dass die Ränder des Neuralrohres nicht wie normal glatt begrenzt sind, sondern ziemlich uneben sind. Das gilt auch für die Somiten, die in Abbildung 10 D nicht klar zu erkennen sind und deutliche interindividuelle Größenunterschiede aufweisen. Außerdem bemerkt man, dass das unsegmentierte paraxiale Mesoderm deutlich verkleinert ist und an Masse und Volumen verloren hat (Abbildung 10 E). Wie man in Abbildung 10 G erkennen kann, sind keine typischen Kopffalten vorhanden und es sieht so aus, als ob die Hirn-Anlage zu einem einzigen Klumpen verschmolzen ist. Dies gilt vor allem für den rostralen Bereich. Im Gegensatz zum Wildtyp Embryonen fehlt eine deutlich sichtbare Neuralrinne, die nur noch im kauda-

len Bereich zu sehen ist. Wie man auch deutlich sehen kann sind die Neuralfaltten massiv vergrößert und die einzelnen Hirnteile wie Prosenzephalon, Mesenzephalon und Rhombenzephalon sind nicht eindeutig voneinander zu unterscheiden. In Abbildung 10 D jedoch könnte man sagen, dass es die Anlage des Prosenzephalons, des Mesenzephalons und auch des Rhombenzephalons vorhanden ist. Daran schließt sich die Anlage des Rückenmarks an, welches durch die stark vergrößerten Neuralfaltten sehr massig erscheint. Die typische Gliederung in die verschiedenen Hirnbläschen ist jedoch nicht zu erkennen.







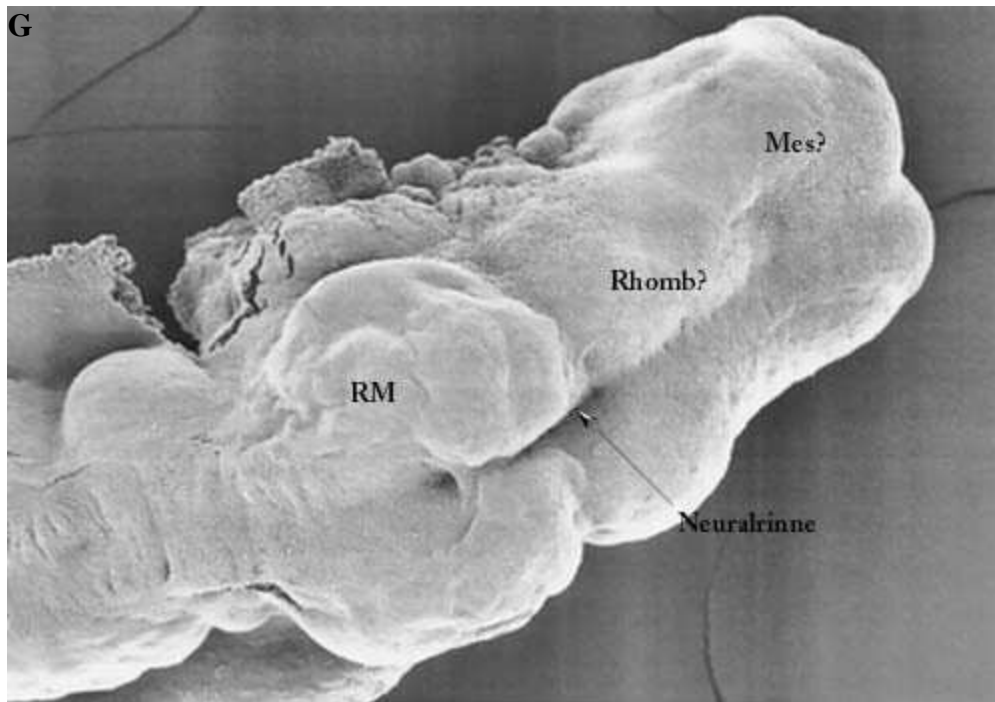


Abbildung 10 Elektronenmikroskopie der Embryonen

(A) Wildtyp Embryo, 50-fache Vergrößerung, (B) Kaudaler Anteil eines Wildtyp Embryos, 100-fache Vergrößerung, (C) kranialer Anteil eines Wildtyp Embryos, 100-fache Vergrößerung (D) $Ptch^{-/-}$ Embryo, 50-fache Vergrößerung, (E) Detailansicht des Neuralrohres von dorsal in 100-facher Vergrößerung, (F) Detailaufnahme des Epithels im Neuralrohr in 400-facher Vergrößerung, (G) ZNS Detailansicht des $Ptch^{-/-}$ Embryos in 100-facher Vergrößerung. RM, Rückenmark, Rhomb, Rhombenzephalon, Mes, Mesenzephalon, Pros, Prosenzephalon, Is, Isthmus, MHB, Mittel- Hinterhirn Grenze, upM, unsegmentiertes paraxiales Mesoderm

4.4. Phänotypisierung von homozygoten $Ptch^{-/-}$ Embryonen durch Whole Mount In-situ Hybridisierung

4.4.1. Whole Mount in-situ Hybridisierung von homozygoten $Ptch^{-/-}$ und Wildtyp Embryonen

4.4.1.1. Expression von Shh

In Abbildung 11 A erkennt man, dass der Embryo normal entwickelt ist und bis zum Tag der Entnahme aus dem Uterus eine reguläre Entwicklung durchlaufen hat. Das „Turning“ ist beendet und anatomisch sind keine Auffälligkeiten zu notieren. In Abbildung 11 C und E erkennt man auch, dass Hirnanlage regelrecht angelegt ist. Der Embryo war am Tag der Entnahme 9 Tage alt, da er 17 Somiten aufweist. Wie in Abbildung 11 A sehr schön dargestellt ist, wird Shh in der gesamten Chorda dorsalis sowie in der Bodenplatte exprimiert. In Abbildung 11 C und E ist die Expression von Shh im ZNS in der Bodenplatte zu sehen. In allen Fällen ist die Abgrenzung zum umliegenden Gewebe sehr gut und deutlich zu erkennen (Goodrich et al. 1996, Lee et al 1997).

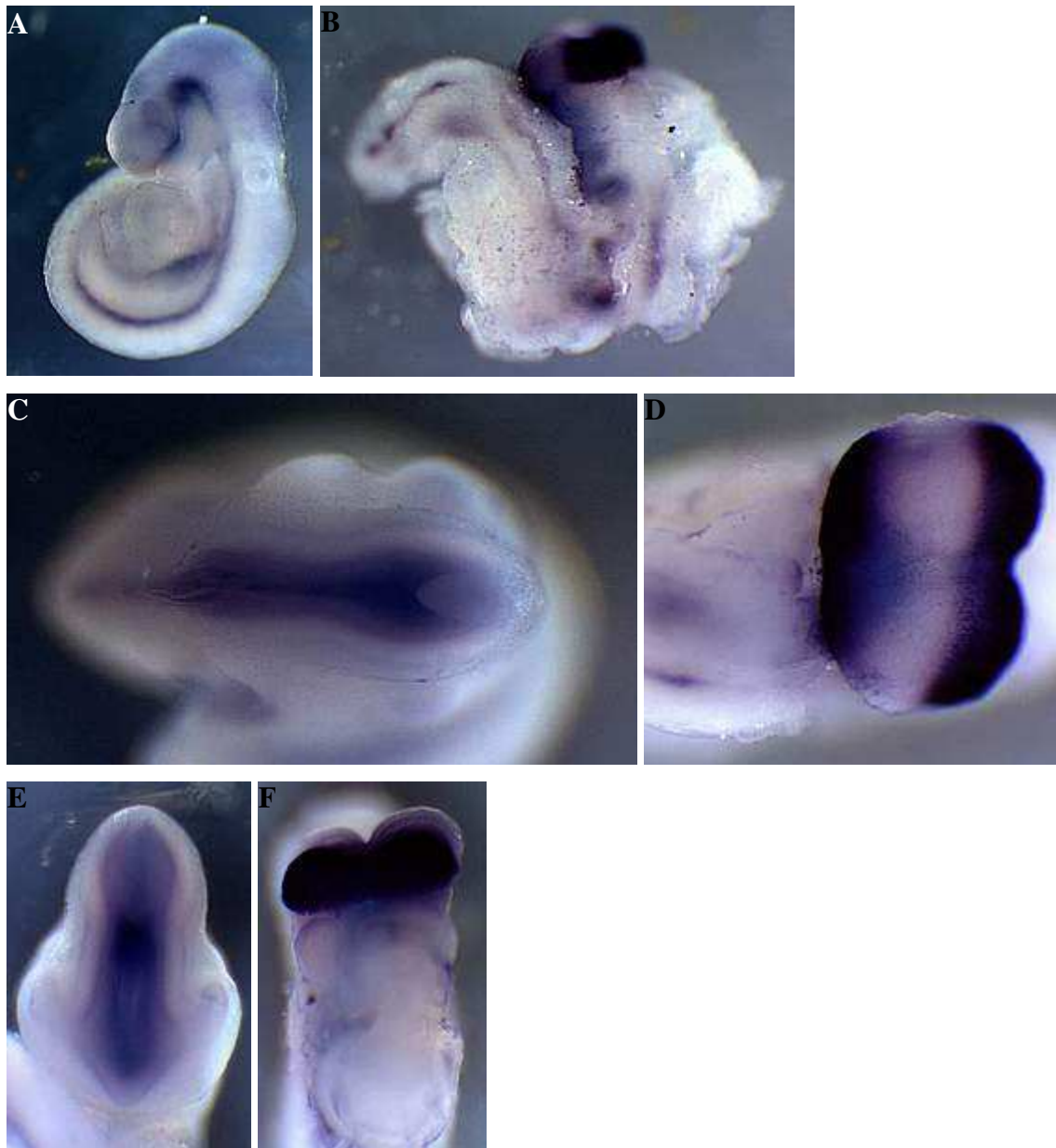


Abbildung 11 Färbung mit der Shh-Sonde

(A, C, E) Wildtyp Embryo, (B, D, F) $Ptch^{-/-}$ Embryo. (A, B) Embryo von lateral im Überblick, (C, D) Embryo von kranial mit Blick auf die Gehirnanlage, (E, F) Gehirnanlage des Embryo von frontal.

In Abbildung 11 B ist die Expression von Shh im $Ptch^{-/-}$ Embryo zu sehen. Man erkennt aufgrund der morphologischen Merkmale, die bereits in Kapitel „Phänotypisierung von homozygoten $Ptch^{-/-}$ Embryonen durch Elektronenmikroskopie“ beschrieben wurden, dass dieser Embryo eine $Ptch^{-/-}$ Mutante ist. Die Altersbestimmung ist bei diesem Embryo etwas schwierig, da die 9 Somiten fast nicht erkennbar sind. Man kann jedoch sehen, dass das „Turning“ noch nicht vollzogen ist, da sich die Herzanlage noch immer auf der Außenseite befindet. Damit ist der Embryo 8 - 8.5 Tage alt. Wie die Färbung der Mutante zeigt, wird Shh weiterhin in der Chorda dorsalis Exprimiert. Bemerkenswerterweise kann im vorderen Teil des Neuralrohres eine extrem starke Expression von Shh erkannt werden (Abbildung

11 B, D und F). Interessant ist auch die Tatsache, dass die Expression in einem sehr dünnen Streifen kaudal der MHB beginnt (B), sich über diese hinwegzieht und danach breiter wird. Mit einer plötzlich einsetzenden scharfen Grenze findet man in einem Bereich, der vermutlich das Dienzephalon darstellt, keine Shh Expression mehr (Abbildung 11 D) Rostral dieses Bereiches findet man im Bereich des Prosenzephalons wiederum eine äußerst starke Expression von Shh, welche in Abbildung 11 F gut zu erkennen ist.

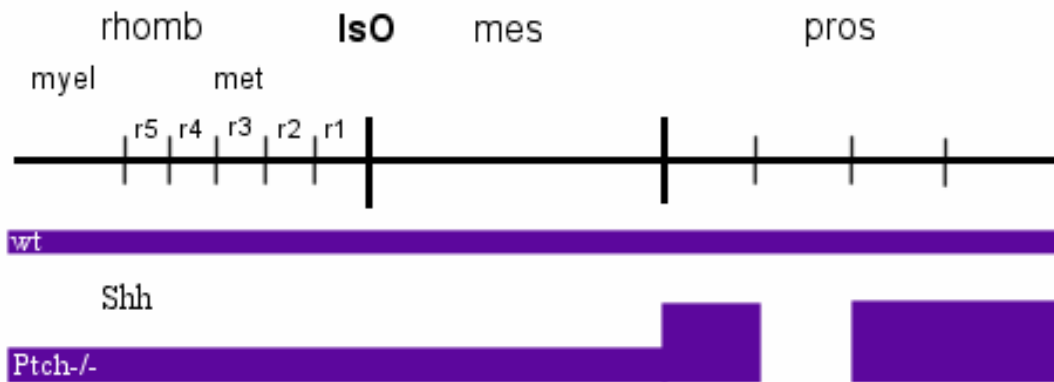


Abbildung 12 Schematische Darstellung der Shh Expression

Schematische Darstellung der Shh Expression in wt und Ptch^{-/-} Mäusen.. im Wildtyp Embryo findet sich eine durchgehende Expression. Im Ptch^{-/-} Embryo ist diese deutlich erhöht. Es findet sich im Prosenzephalon nochmals eine Steigerung der Expression, welche aber für eine kurze Strecke unterbrochen ist. IsO Isthmic organizer, mes Mesenzephalon, met Metenzephalon, myel Myelenzephalon, pros Prosenzephalon, r1-r5 Rhombomer 1-5, rhomb Rhombenzephalon, wt Wildtyp.

4.4.1.2. Expression von Ptch

Der Wildtyp Embryo (Abbildung 13 A, C und D) wurde am Tag 8,5 dpc aus der Muttermaus entfernt. Dem entsprechend besitzt der Embryo auch 9 Somiten. Das Neuralrohr ist schon weitestgehend geschlossen, nur am kranialen Ende sind die Neuralfalten noch nicht verschlossen. Die Färbung mit Ptch ist insgesamt etwas schwach, aber man kann den Hauptexpressionsort von Ptch in Abbildung 13 A und C gut erkennen. Ptch wird im Neuralrohr, speziell im vorderen Anteil bei 8,5dpc alten Embryonen exprimiert. Zudem wird Ptch in Form zweier transverser Streifen im Hirnbläschen exprimiert (sichtbar in Abbildung 13 E). In späteren Entwicklungsstadien wird Ptch dann im paraxialen Mesoderm, dem Seitenplattenmesoderm und in den ventralen Hälften der Somiten exprimiert (Goodrich et al. 1996).

Der Ptch^{-/-} Embryo in Abbildung 13 B unterscheidet sich deutlich von Wildtyp Mausembryonen. Das Alter ist entsprechend der 10 Somiten bei 8,5 dpc festzulegen. Wie in Abbildung 13 B gut zu erkennen ist, wird Ptch im Ptch^{-/-} Embryo deutlich überexprimiert. Betrachtet man auch Abbildung 13 D, so stellt man fest, dass diese Überexpression sehr

stark ist und sich im Wesentlichen auf das Neuralrohr im Bereich der Somiten und des präsomitischen Mesoderms beschränkt. Im Gehirn-Bereich (Abbildung 13 D und E) ist eine schwache diffuse Ptch-Expression zu erkennen. Zusammenfassend zeigen sich somit deutliche Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und Mutante.

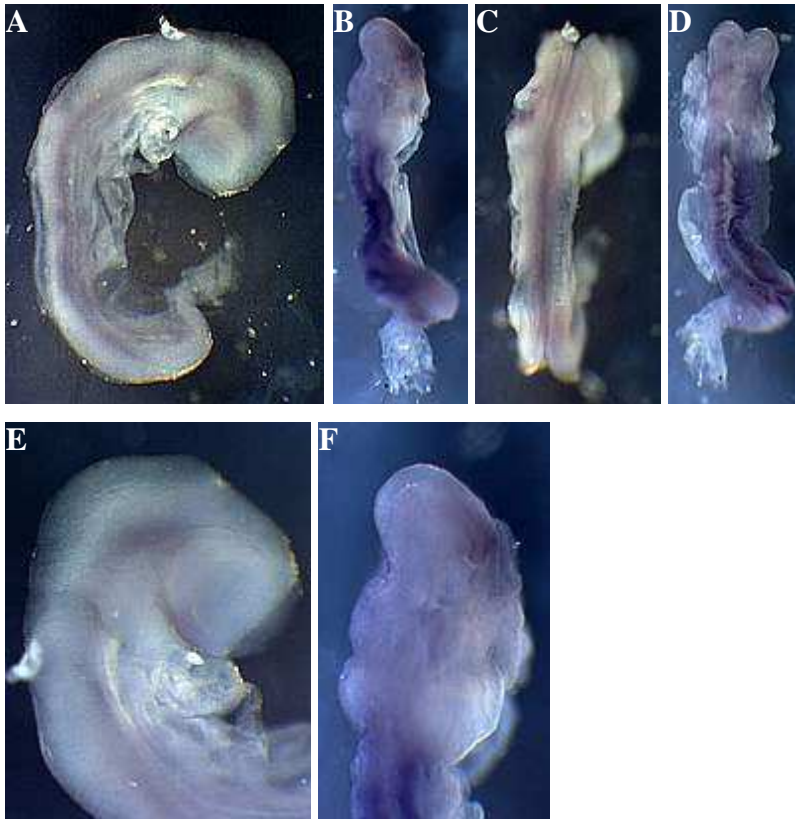


Abbildung 13 Färbung mit der Ptch-Sonde

(A, C, E) Wildtyp Embryo, (B, D, F) $Ptch^{-/-}$ Embryo, (A, B) Embryo von lateral in der Übersicht, (C, D) Embryo von dorsal in der gesamten Länge, (E, F) Detailaufnahmen des ZNS von lateral.

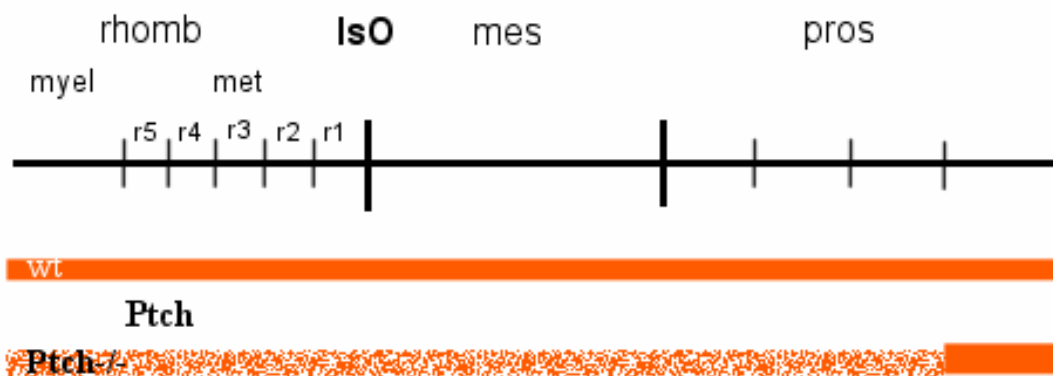


Abbildung 14 Schematische Darstellung der Ptch Expression

Im Wildtyp Embryo zeigt sich eine durchgehende Expression von Ptch. Dies ist auch im $Ptch^{-/-}$ Embryo so, jedoch ist Ptch überexprimiert und diffuser in der Gehirnanlage verteilt, bis auf ein kleines Areal am rostralen Ende des Prosenzephalon. Abkürzungen siehe Abb. 12.

4.4.1.3. Expression von Gli-1

In Abbildung 15 A ist ein Wildtyp Embryo zu sehen, der sich gerade im „Turning“ befindet. Er ist demnach 8,5 Tage alt was durch das Vorhandensein von 7 Somiten bestätigt wurde. Die Färbung von Gli-1 ist im Allgemeinen mäßig intensiv und auf das Neuralrohr beschränkt (Abbildung 15 A und C). Die laterale Grenze der Expression ist zwar deutlich vorhanden, aber nicht scharf begrenzt. Man erkennt auch, dass Gli-1 nicht in der Bodenplatte exprimiert wird. Die Expression von Gli-1 erscheint entlang der Somiten am intensivsten, wogegen sie im Hirnbereich sehr schwach ist (Lee et al. 1997).

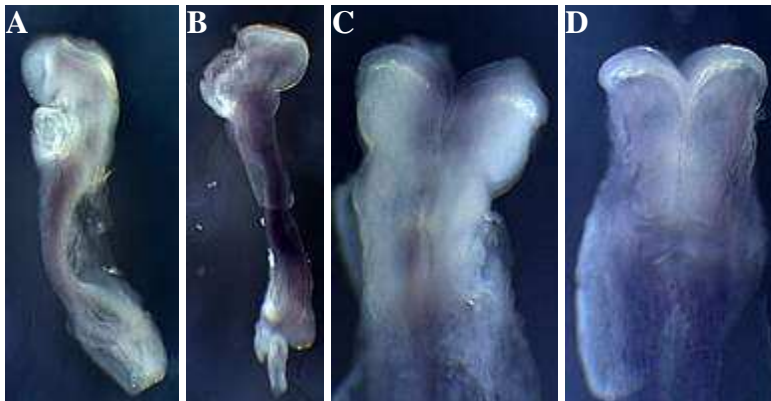


Abbildung 15 Färbung mit der Gli-1-Sonde

(A, C) Wildtyp Embryo, (B, D) $Ptch^{-/-}$ Embryo, (A, B) Embryo von lateral im Überblick, (C, D) Detailaufnahmen der Gehirnanlage.



Abbildung 16 Schematische Darstellung der Gli-1 Expression

Im Wildtyp Embryo findet sich eine durchgehende Expression, welche im $Ptch^{-/-}$ Embryo deutlich erhöht ist. Abkürzungen siehe Abb. 12.

Der $Ptch^{-/-}$ Embryo, der in Abbildung 15 B dargestellt ist, ist 8 bis 8,5 dpc alt (6 Somiten). Neben den schon genannten Missbildungen (verwuchertes Neuralrohr, vergrößerte Kopffalten). wird hier deutlich, dass auch die Herzanlage nicht korrekt angelegt ist. Auch dieser Embryo wurde mit einer Gli-1 Probe angefärbt und zeigt im Vergleich zum Wildtypen eine

wesentlich intensivere Färbung (Abbildung 15 C). Vor allem im Bereich der Somiten ist die Färbung sehr stark. In Abbildung 15 D erkennt man, dass die Expression von Gli-1 nicht auf eine bestimmte Struktur begrenzt ist, sondern vielmehr diffus im Gewebe verteilt ist.

4.4.1.4. Expression von BF-1

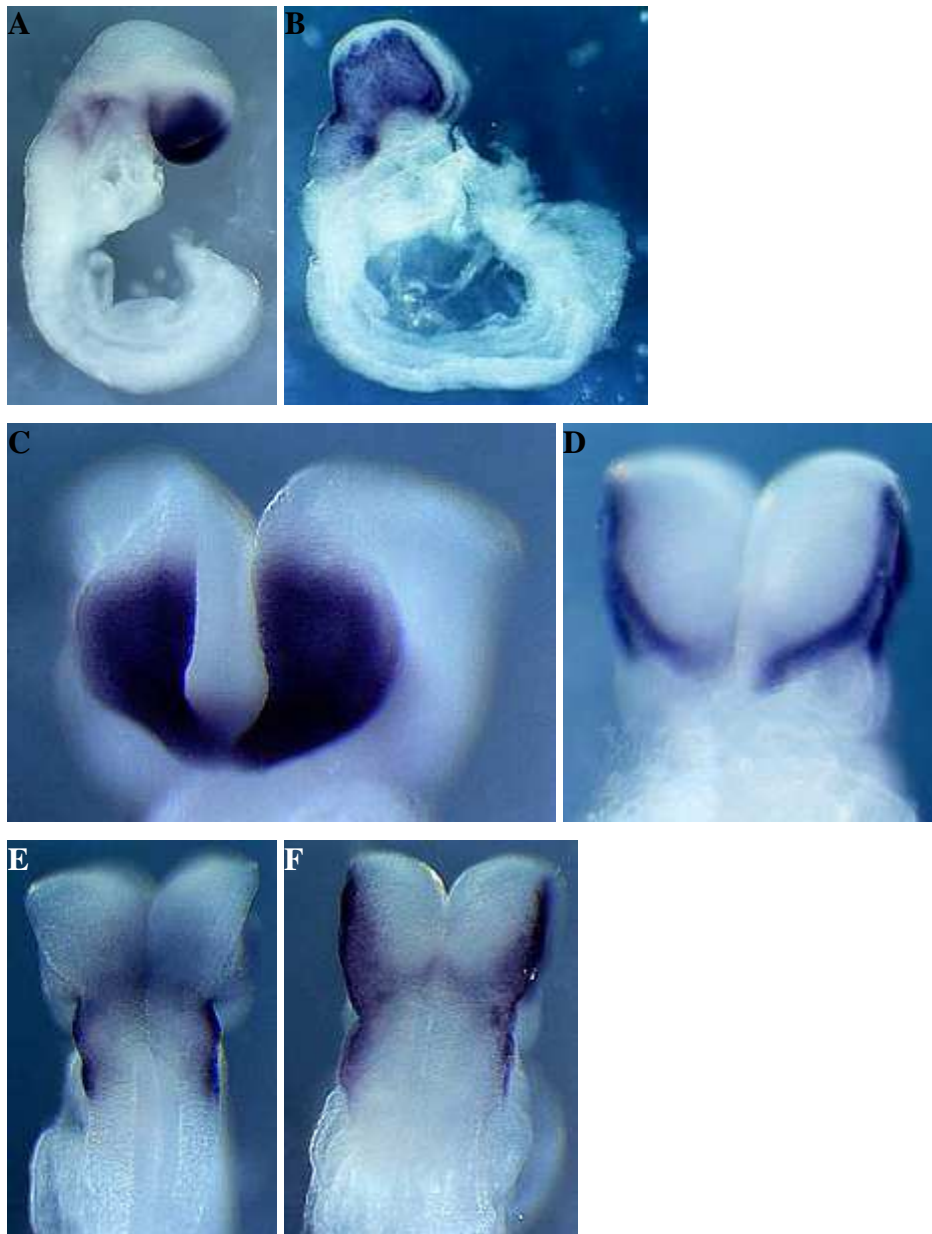


Abbildung 17 Färbung mit der BF-1-Sonde

(A, C, E) Wildtyp Embryo, (B, D, F) *Ptch*^{-/-} Embryo. (A, B) Embryo von lateral in seiner gesamten Größe, (C, D) Detailaufnahmen vom Gehirn von frontal, (E F) von dorsal (Die dunkleren Strukturen in E und F im Bereich des Isthmus sind keine Färbungen, sondern lediglich durch die Fotografie entstandene Artefakte).

Der Wildtyp Embryo in Abbildung 17 ist 8,5 bis 9 Tage alt und besitzt 9 Somiten. Das „Turning“ ist bereits abgeschlossen. In Abbildung 17 A und C erkennt man das für BF-1

typische Expressionsmuster im Telenzephalon, das nach kaudal scharf abgegrenzt ist. Eine weitere Region, in der BF-1 exprimiert ist, ist aus Abbildung 17 A und aus E ersichtlich: die Kiemenbögen. Hier ist die Expression jedoch sehr schwach im Vergleich zu der Expression im Telenzephalon und auch nicht so deutlich zum umliegenden Gewebe abgegrenzt (Dou et al. 1999, Shimamura et al. 1995, Tao et al. 1992).

Die *Ptch*^{-/-} Mutante welche in Abbildung 17 B dargestellt ist, ist mit 9-10 Somiten 8,5 Tage alt und hat das „Turning“ ebenfalls schon abgeschlossen. Dieser Embryo ist wesentlich größer als der Wildtyp-Embryo und zeigt die typischen, schon im Elektronenmikroskop beobachteten und beschriebenen Veränderungen. Wie in Abbildung 17 B und F dargestellt ist, wird BF-1 noch in der Flügelplatte im Telenzephalon exprimiert. Im Gegensatz zum normalen Wildtyp jedoch ist die Expression nach lateral verschoben und nach kaudal ausgebreitet. Auch besteht keine eindeutige Grenze zu den Kiemenbögen (Abbildung 17 F), es ist vielmehr ein fließender Übergang zu beobachten. In Abbildung 17 B sieht man deutlich, dass sich die Färbung für BF-1 über die gesamte laterale Gehirnanlage zieht. Die BF-1 Expression ist im Vergleich zum Wildtyp wesentlich schwächer und scheint sich nur auf eine dünne Zellschicht der Hirnanlage zu beschränken (Abbildung 17 D, F)



Abbildung 18 Schematische Darstellung der BF-1 Expression

Im Wildtyp Embryo ist eine deutliche, starke Expression im Prosenzephalon zu finden. Im *Ptch*^{-/-} Embryo findet sich eine schwächere Expression, welche über die gesamte Gehirnanlage ausgebreitet ist. Abkürzungen siehe Abb. 12.

4.4.1.5. Expression von Otx-2

Der Embryo in Abbildung 19 A ist ein sehr alter Embryo. Er besitzt 17 Somiten und ist deutlich älter als 9,5 Tage. Bei diesem Embryo sieht man die Expression von Otx-2 besonders gut, die sich auf die Gehirnanlage rostral der MHB erstreckt und Mesenzephalon, Dienzephalon und Telenzephalon umfasst. In Abbildung 19 A und G erkennt man deutlich

die scharfe Grenze der Expression an der MHB. Auch im Prosenzephalon in Abbildung 19 D sind deutliche laterale Grenzen zu sehen. Die Intensität ist in allen Bereichen der Expression gleich stark und erstreckt sich auf alle Zellen des Neuroektoderms (Simeone et al. 1992, Simeone, 1998, Suda et al. 1997, Mallamaci et al. 1996). Auch der Embryo in Abbildung 19 B ist ein Wildtyp. Er besitzt jedoch nur 6-7 Somiten und ist daher 8 bis 8,5 Tage alt. Auch bei diesem Embryo sieht man schon deutlich das typische Expressionsmuster von Otx-2, das aber noch nicht ganz so scharf nach kaudal abgegrenzt ist, wie bei Embryo in Abbildung 19 A.

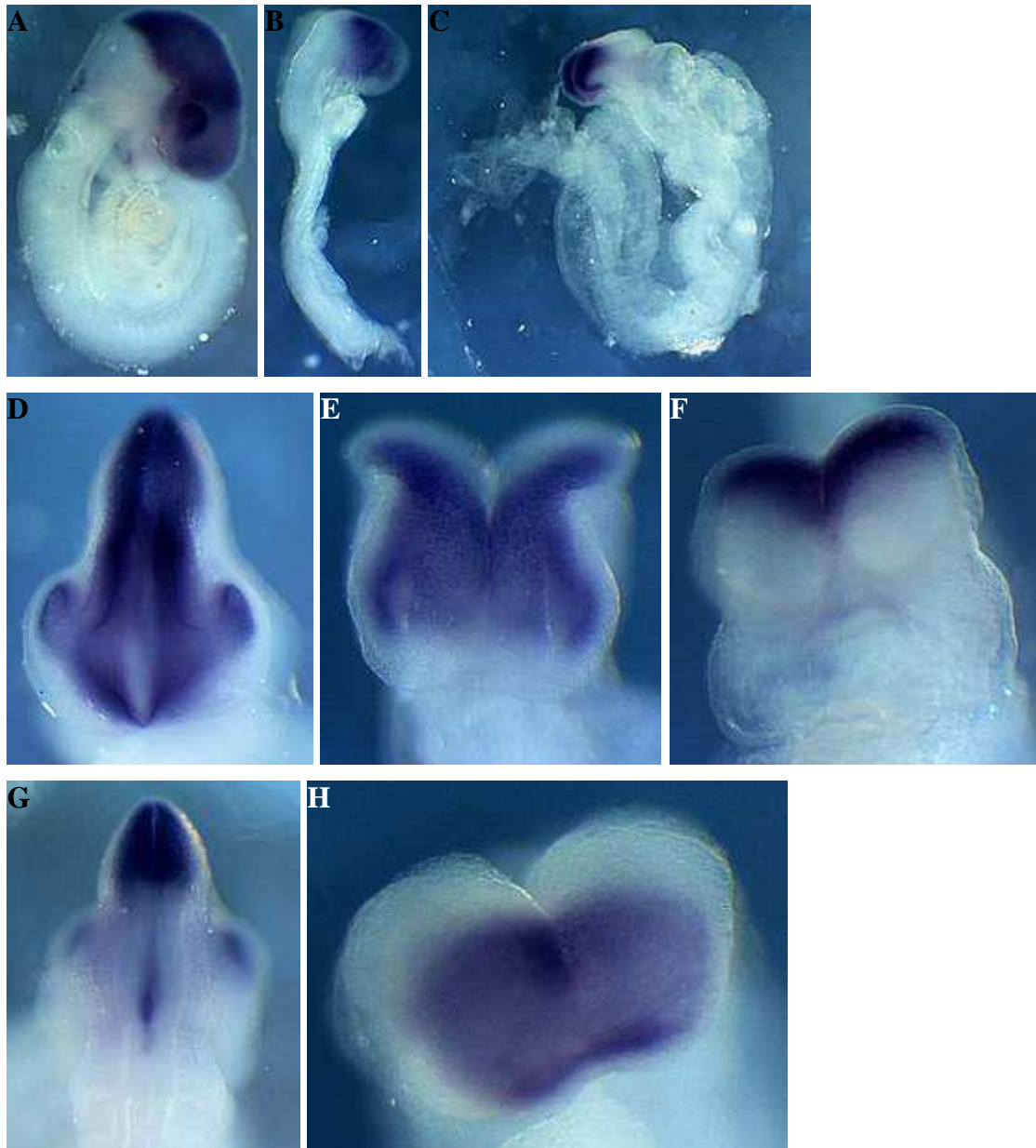


Abbildung 19 Färbung mit der Otx-2-Sonde

(A, D, G) (B, F) zwei verschiedene Wildtyp Embryonen, (C, F, H) $Ptch^{-/-}$ Embryo. (A, B, C) Embryo von lateral in der Übersicht zu sehen, (D, E, F) Aufnahmen der Gehirnanlage von frontal, (G, H) Aufnahmen von dorsal.

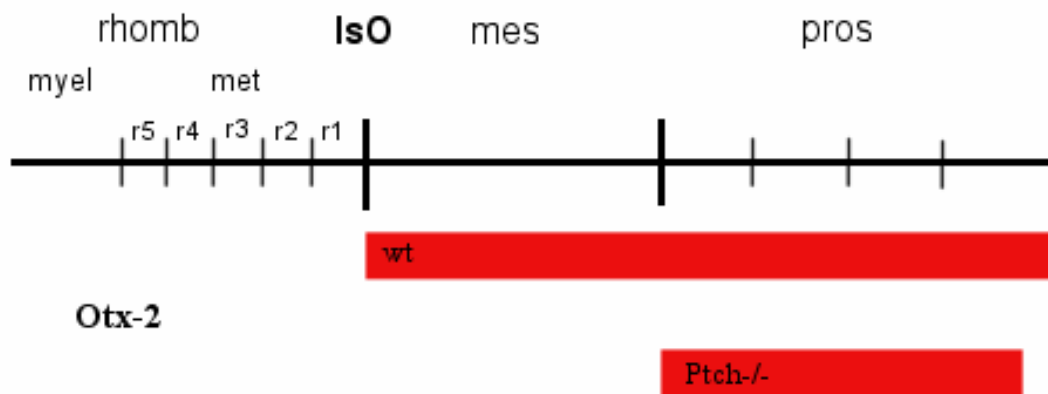


Abbildung 20 Schematische Darstellung der Otx-2 Expression

Im Wildtyp Embryo zeigt sich eine starke Expression vom IsO beginnend bis einschließlich des gesamten Prosenzephalons. Der Ptch^{-/-} Embryo hingegen zeigt eine Expression nur im Prosenzephalon, der rostrale Anteil ist ausgespart. Abkürzungen siehe Abb. 12.

Der Ptch^{-/-} Embryo in Abbildung 19 C ist bezüglich seines Alters zwischen den beiden Wildtyp Embryonen anzusiedeln. Er ist mit 9 Somiten ein wenig älter wie der Wildtyp in Abbildung 19 B, und wird als 8,5 Tage alter Embryo eingeordnet. Dieser Embryo hat, wie einige andere Ptch^{-/-} Embryonen, das „Turning“ noch nicht vollzogen. Man kann das in Abbildung 19 C erkennen: In dieser Fotografie befindet sich die Herzanlage noch auf der Außenseite. Die Expression von Otx-2 ist auf das Prosenzephalon beschränkt und ist im eigentlich exprimierten Mesenzephalon nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 19 C und F; s.a. elektronenmikroskopische Aufnahmen). Auch ist trotzdem die Expression von Otx-2 relativ scharf in allen Ebenen begrenzt.

4.4.1.6. Expression von Gbx-2

Der Wildtyp Embryo in Abbildung 21 A ist ein 8,5 bis 9 Tage alter Embryo, bei dem 15 Somiten abgezählt werden konnten. Der Embryo zeigt die für Gbx-2 erwartete Expression. Die angefärbten Strukturen zeigen das unsegmentierte paraxiale Mesoderm und in der Hirnanlage den Bereich kaudal der MHB, so dass der gesamte Bereich des Mittel- und Großhirns ausgespart bleibt. Weiterhin erkennt man auch die Expression von Gbx-2 in Form zweier longitudinaler Säulen im Hinterhirn und im sich anschließenden Neuralrohr und Rückenmark. Auch erkennt man, dass Gbx-2 in der Anlage der Kiemenbögen exprimiert wird (Wassarman et al 1997, Bouillet et al. 1995).

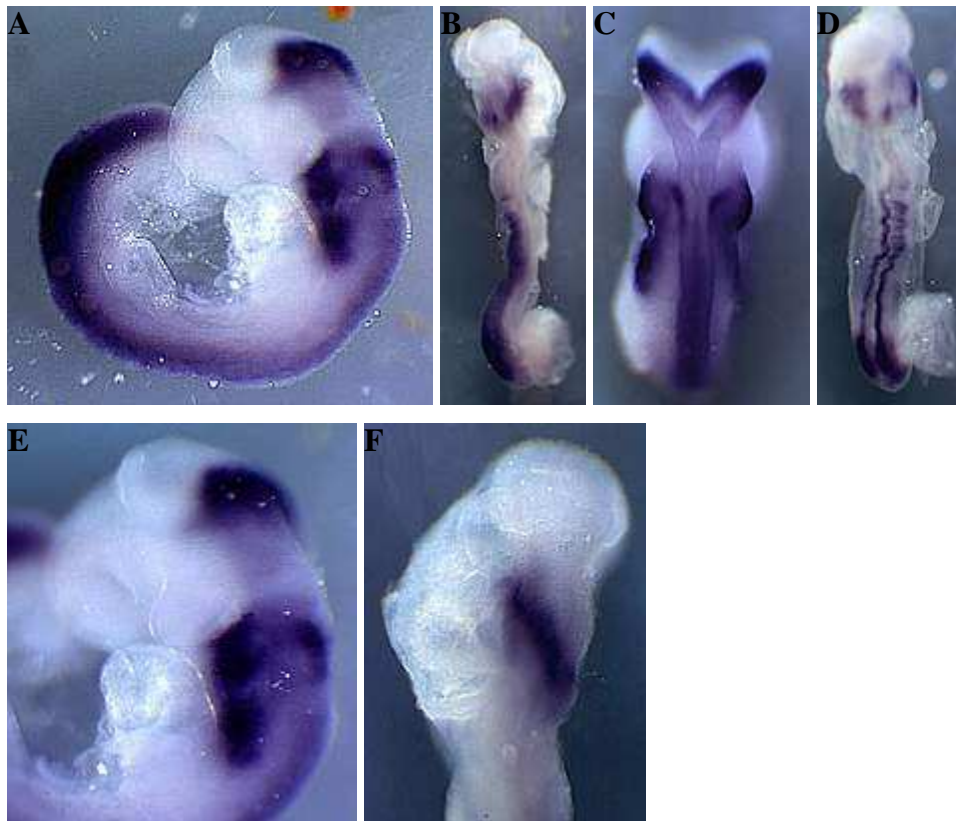


Abbildung 21 Färbungen mit der Gbx-2-Sonde

(A, C, E) Wildtyp Embryo, (B, D, F) *Ptch*^{-/-} Embryo. (A, B) Embryo von lateral in der Übersicht, (C, D) Embryo im Überblick von dorsal. (E, F) Detailaufnahmen der Hirnanlage.

Die *Ptch*^{-/-} homozygote Mutante ist morphologisch entsprechend der beschriebenen Veränderungen. Das Alter ist auf 8,5 bis 9 Tage aufgrund der 9 Somiten festgelegt worden. Das anatomische Erscheinungsbild ist mit dem hier bestimmten Alter kongruent. Aus der Fotografie wird nicht ersichtlich, dass das „Turning“ noch nicht vollzogen wurde, da aufgrund der besseren Übersicht der Embryo im ausgestreckten Zustand fixiert und gefärbt wurde. An diesem Embryo kann man auch besonders gut den unterbliebenen Schluss des Neuralrohres erkennen, der normalerweise am Tag 8 beginnt (Abbildung 21 D). Ebenso erkennt man in der Abbildung 21 D die verwachsenen und vergrößerten Neuralfalten. Der *Ptch*^{-/-} Embryo exprimiert im unsegmentierten paraxialen Mesoderm Gbx-2 (Abbildung 21). Weiterhin erkennt man auch die Expression von Gbx-2 in Form zweier longitudinaler Säulen im restlichen Rückenmark. Die Expression von Gbx-2 in den Strukturen der Kiemenbögen scheint sich auch auf eine sehr kleine Region zu beschränken. Ein sehr markanter Unterschied zur Expression im Wild-Typ Embryo zeigt sich in der Gehirnregion, in der die Expression im Hinterhirn an der Grenze zum Mittelhirn vollständig fehlt (wird deutlich in Abbildung 21 F).

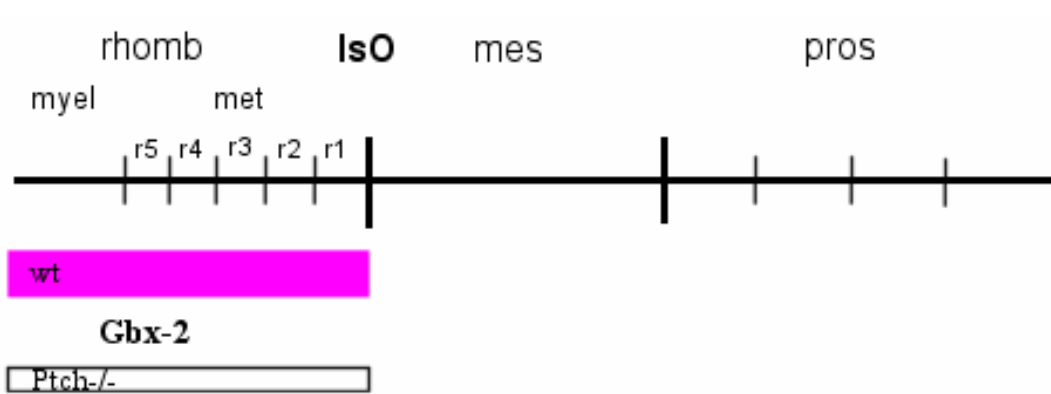


Abbildung 22 Schematische Darstellung der Gbx-2 Expression

Der Wildtyp Embryo zeigt seine Expression kaudal des IsO bis ins Rückenmark reichen. Im *Ptch*^{-/-} Embryo fehlt diese vollständig. Abkürzungen siehe Abb. 12.

4.4.1.7. Expression von Wnt-1

In Abbildung 24 A, C und E erkennt man den für Wnt-1 angefärbten Wildtyp Embryo. Er hat 8 Somiten und ist somit 8,5 Tage alt. Die Abbildungen zeigen, dass Wnt-1 am Tag 8,5 im ZNS exprimiert wird. Wnt-1 wird an der MHB exprimiert, wobei die Expression auf das Mittelhirn reduziert ist. Die rostrale Grenze ist nicht sonderlich genau, sie läuft entlang der Grenze Mittelhirn zu Vorderhirn aus, während die kaudale Grenze mit der Grenze von *Otx-2* an der MHB zusammenfällt. Diese kaudale Grenze nimmt später einen ringförmigen Charakter an. Die Expression im gesamten Rhombenzephalon fehlt vollständig. Wie man ebenso erkennen kann wird Wnt-1 in kaudalen Rhombenzephalon, respektive späteres Myelencephalon exprimiert und vom Mittelhirn beginnend nach kaudal entlang des oberen und mittleren Rückenmarks in der Deckplatte exprimiert (Parr et al. 1993, Wilkinson et al. 1987).

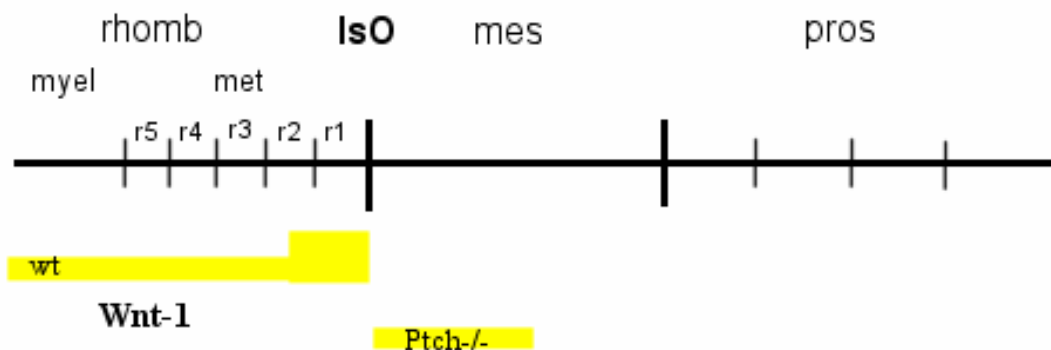


Abbildung 23 Schematische Darstellung der Wnt-1 Expression

Die Expression im Wildtyp ist im gesamten Rhombenzephalon zu finden und nimmt kaudal des IsO an Intensität zu. Im *Ptch*^{-/-} Embryo findet sich lediglich eine kleine Region der Genexpression kranial des IsO. Abkürzungen siehe Abb. 12.

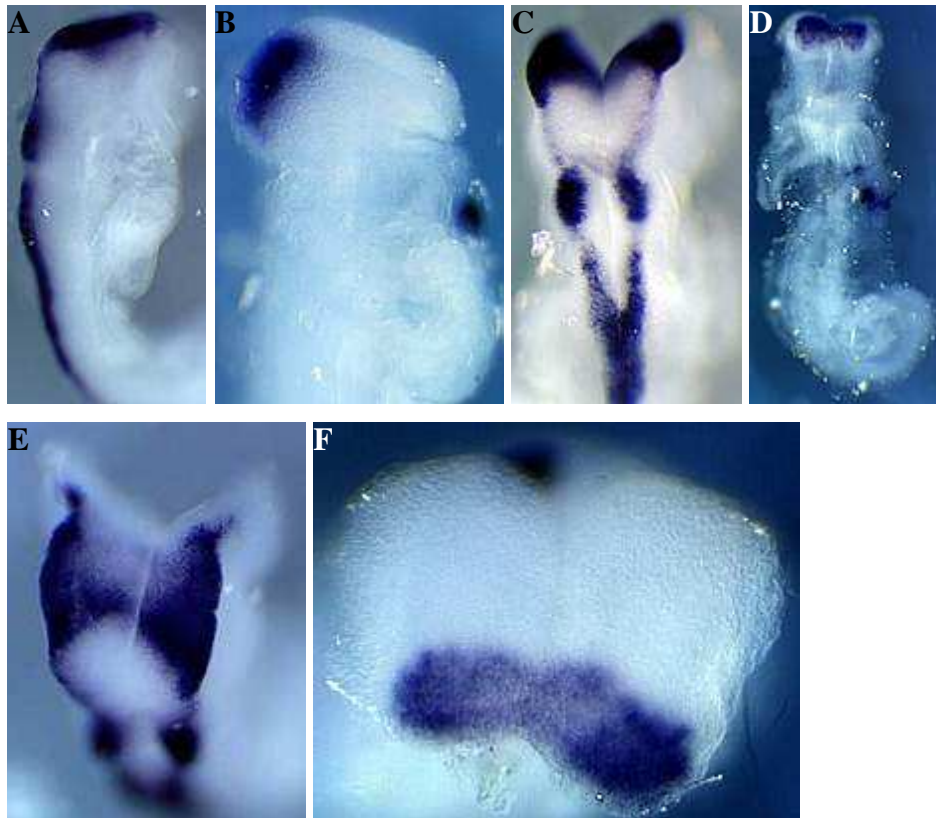


Abbildung 24 Färbungen mit der Wnt-1-Sonde

(A, C, E) Wildtyp Embryo, (B, D, F) $Ptch^{-/-}$ Embryo. (A) Embryo von lateral mit Sicht auf das ZNS und das Neuralrohr, (B) Gehirnanlage des Embryo von lateral, (C) dorsale Sicht auf Gehirn und Neuralrohr, (D) gesamter Embryo von dorsal, (E, F) kraniale Aufnahmen der Gehirnanlage. Der angefärbte Punkt in B und D ist jeweils ein Artefakt und hat keine Bedeutung für die Expression von Wnt-1.

Der in Abbildung 24 B, D und F dargestellte Embryo ist die $Ptch^{-/-}$ Mutante. Der hier dargestellte Embryo ist mit 10 Somiten 8,5 Tage alt. Die Färbung für Wnt-1 ist im Vergleich zum Wildtyp lediglich auf eine sehr kleine Region in einem Hirnbereich rostral der MHB beschränkt. Diese ist sowohl nach kaudal als auch nach rostral sehr scharf begrenzt, aber die Expressionsintensität ist nicht so stark wie im Wildtyp-Embryo. Im Bereich des Rückenmarks und im kaudalen Myelenzephalon wird Wnt-1 nicht exprimiert.

4.4.1.8. Expression von FGF-8

In Abbildung 25 A sieht man einen Wildtyp Embryo, der älter als die bisher beschriebenen Embryonen ist. Er hat 17 Somiten und ist daher 9 bis 9,5 Tage alt. An diesem Embryo kann man die typische FGF-8 Expression besonders gut erkennen. Wie erwartet ist FGF-8 im Gehirn im vorderen Telenzephalons, ringförmig im Bereich kaudal der MHB (erst ab dem 9ten Tag, davor reicht die Expression über die MHB), und im Bereich der Kiemenbögen exprimiert, was sowohl in Abbildung 25 A, als auch in Abbildung 25 E und H sehr gut

zu erkennen ist. Weiterhin ist eine starke FGF-8 Expression im unsegmentierten paraxialen Mesoderm zu finden (Abbildung 25 A). Die Expression kaudal der MHB schließt fast unmittelbar an die ringförmige Wnt-1 Expression rostral der MHB an (Crossley und Martin 1995, Mason et al. 2000).

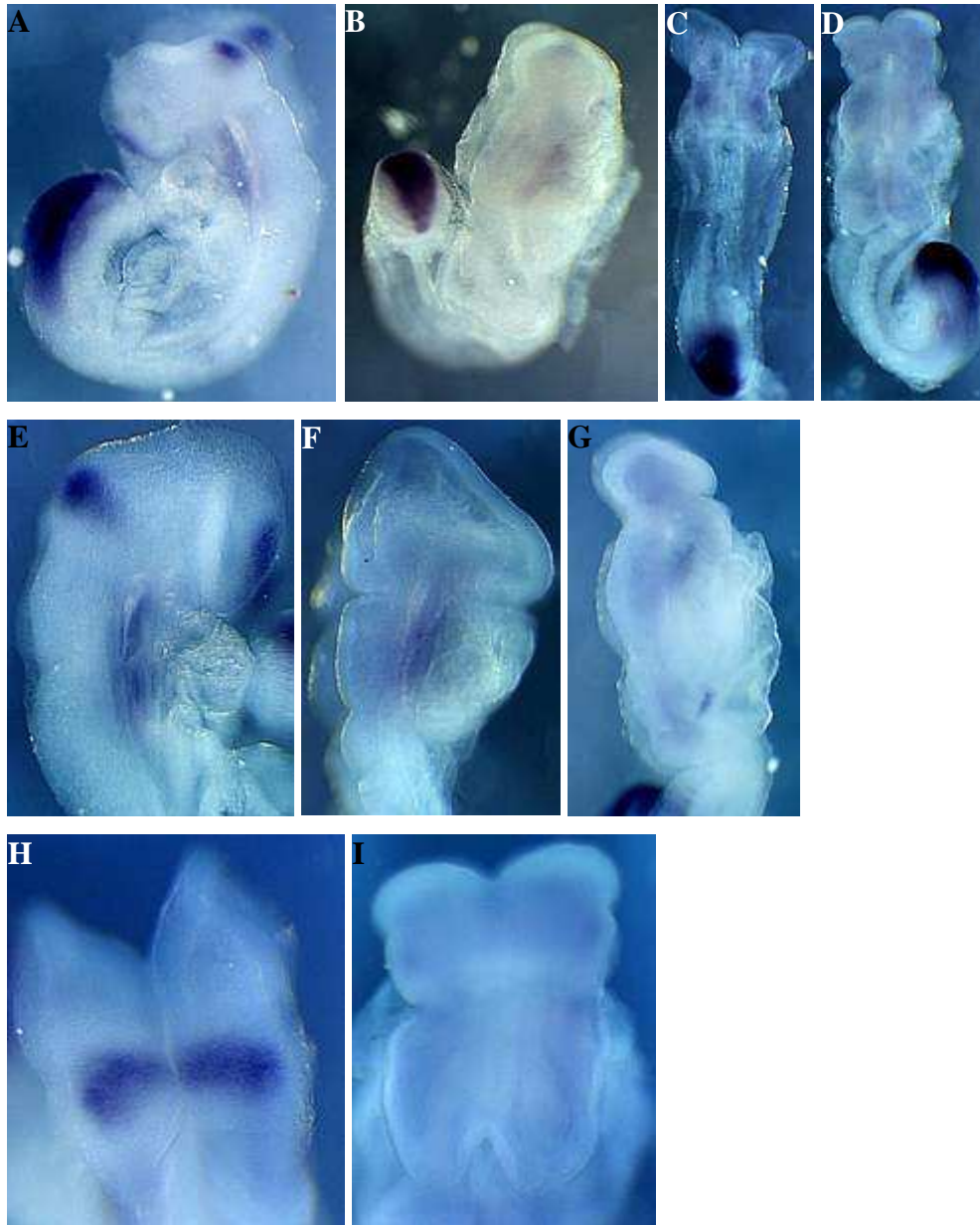


Abbildung 25 Färbungen mit der Fgf-8-Sonde

(A, E, H) zwei verschiedene Wildtyp-Embryonen; (B), (C, F), (D, G, I) drei verschiedene $Ptch^{-/-}$ Embryonen. (A, B) Embryonen von lateral im Überblick, (C, D) Embryonen von dorsal, (E, F, G) Detailaufnahmen der Gehirnanlage von lateral, (H, I) Gehirnanlage von dorsal.

In Abbildung 25 B, C und D sind drei verschiedene $Ptch^{-/-}$ Embryonen dargestellt, die sich auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden. In Abbildung 25 D ist der älteste Embryo mit einem Alter von 8,5 bis 9 Tagen und mit 12 Somiten zu sehen, wogegen in Abbildung 25 B ein 8,5 Tage alter Embryo mit 10 Somiten und in Abbildung 25 C ein 8,5

Tage alter Embryo mit 7 Somiten dargestellt ist. Die Expression von FGF-8 ist in allen dargestellten $Ptch^{-/-}$ Embryonen auf die Kiemenbögen und das unsegmentierte paraxiale Mesoderm beschränkt. Da der mesodermale Bereich, in dem FGF-8 exprimiert wird, im Vergleich zum Wild-Typ Embryo sehr viel kleiner ist, lässt dies auf ein kleineres paraxiales Mesoderm bei der Mutante schließen (s.a. Elektronenmikroskopie). Wie bei allen $Ptch^{-/-}$ Mutanten zu sehen ist, wird FGF-8 zu keinem der gezeigten Entwicklungsstadien in den beim Wildtyp beschriebenen Hirnregionen exprimiert (Abbildung 25 B, C, D, F, G, I).



Abbildung 26 Schematische Darstellung der FGF-8 Expression

Die Expression im Wildtyp Embryo ist auf eine Region kaudal des Iso begrenzt. Diese fehlt vollständig im $Ptch^{-/-}$ Embryo. Abkürzungen siehe Abb. 12.

4.4.1.9. Expression von En-1

Der Wild-Typ Embryo, der in Abbildung 28 A zu sehen ist, ist mit 7 Somiten 8,5 Tage alt. Die Expression von En-1 zeigt sich wie erwartet am Isthmus. In Abbildung 28 C kann man sehr gut erkennen, dass die Färbung sehr intensiv und in alle Richtungen scharf von umliegendem Gewebe abgegrenzt ist und sich rostral und kaudal vom Isthmus ausbreitet (Davidson et al., 1988, Joyner und Martin, 1987, Wurst et al., 1994).

Trotz der enormen Größe des $Ptch^{-/-}$ Embryos, der in Abbildung 28 B zu sehen ist, konnten nur 8 Somiten gezählt werden. Damit ist der Embryo, ebenso wie der Wildtyp, nur 8,5 Tage alt. Trotz seines Alters wurde bei diesem Embryo das „Turning“ noch nicht vollzogen. So befindet sich die Herzanlage noch auf der Außenseite und das Neuralrohr auf der Innenseite des gefalteten Embryos. En-1 ist genauso stark wie im Wildtyp exprimiert und ebenfalls in der Region des Isthmus. Jedoch ist das Areal, in dem En-1 in der Mutante exprimiert ist im Gegensatz zum Wildtyp auf eine sehr kleine Region rostral der MHB beschränkt (sowohl in der dorsoventralen, als auch in der rostrokaudalen Ebene).

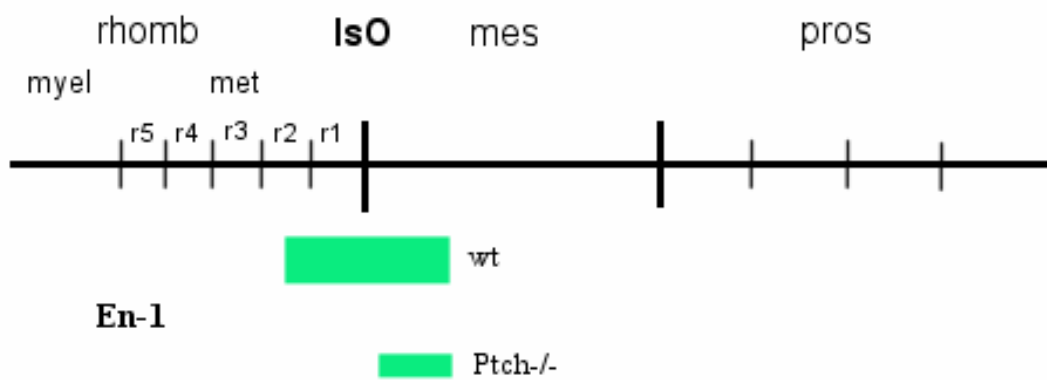


Abbildung 27 Schematische Darstellung der En-1 Expression

Im Wildtyp Embryo findet sich eine starke Expression von En1 vom Metenzephalon beginnend über den IsO bis in das Mesenzephalon. Im $Ptch^{-/-}$ Embryo ist die Expression nur auf ein kleines Areal kranial des IsO begrenzt und deutlich schwächer. Abkürzungen siehe Abb. 12.

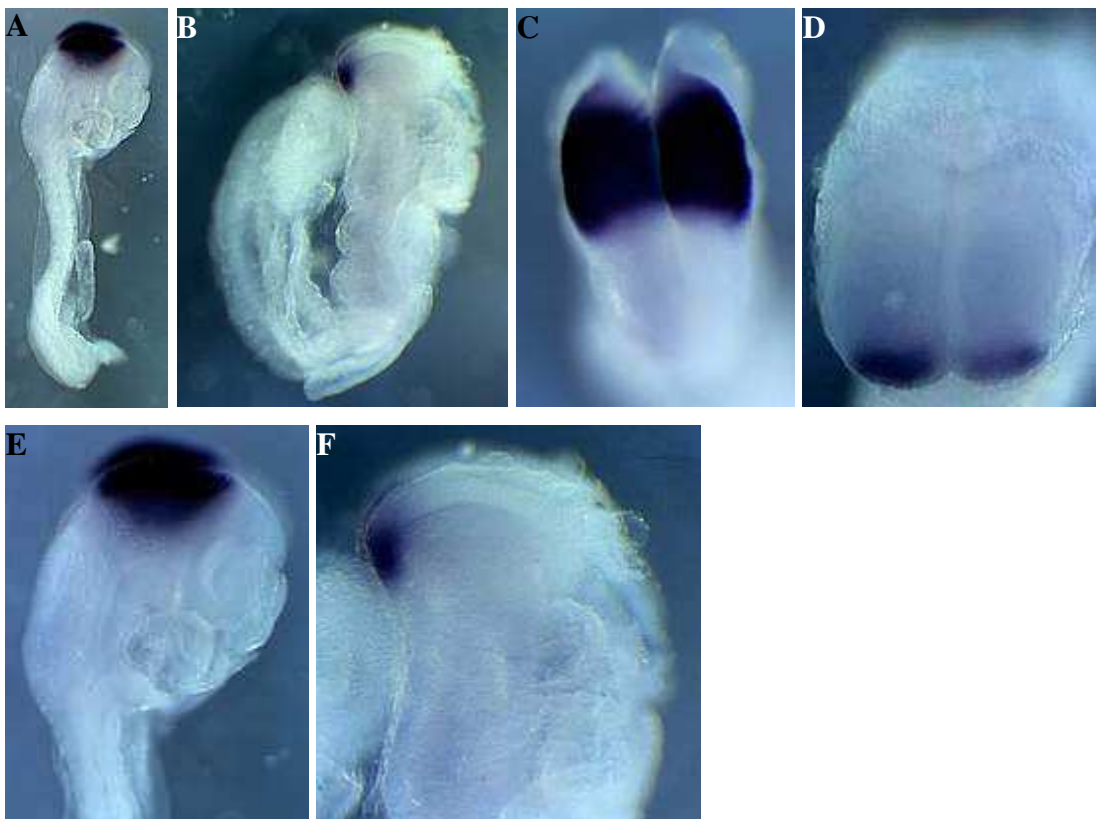


Abbildung 28 Färbungen mit der En-1-Sonde

(A, C, E) Wildtyp Embryo und (B, D, F) $Ptch^{-/-}$ Embryo. (A, B) gesamter Embryo aus lateraler Sicht, (C, D) Detailaufnahmen der Gehirnanlage von dorsokranial, (E, F) Gehirnanlage von lateral.

4.4.1.10. Expression von Krox-20

Der Wildtyp Embryo in Abbildung 30 A ist 9 bis 9,5 Tage alt und besitzt dementsprechend 17 Somiten. Die Expression von Krox-20 ist erwartungsgemäß in den Rhombomeren 3 und 5 (Abbildung 30 C). Dabei zeigt sich Rhombomer 5, das mehr kaudal gelegen ist, als sehr intensiv angefärbt, mit deutlichen Grenzen nach kranial und kaudal. Rhombomer 3 dagegen ist bei dem dargestellten Embryo nur noch sehr schwach gefärbt. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass die Reifung des ZNS von rostral nach kaudal abläuft. Da dieser Embryo schon älter ist, ist Rhombomer 3 schon fast vollständig entwickelt, daher wird Krox-20 in diesem nicht mehr so stark exprimiert (Wilkinson et al. 1989).

Der Embryo in Abbildung 30 C ist ein *Ptch*^{-/-} Embryo, der etwa 8,5 bis 9 Tage alt ist (12 Somiten). Im Gegensatz zum Wildtyp, wird kein Krox-20 exprimiert. Dies bedeutet, dass die Rhombomere 3 und 5 nicht angelegt wurden.

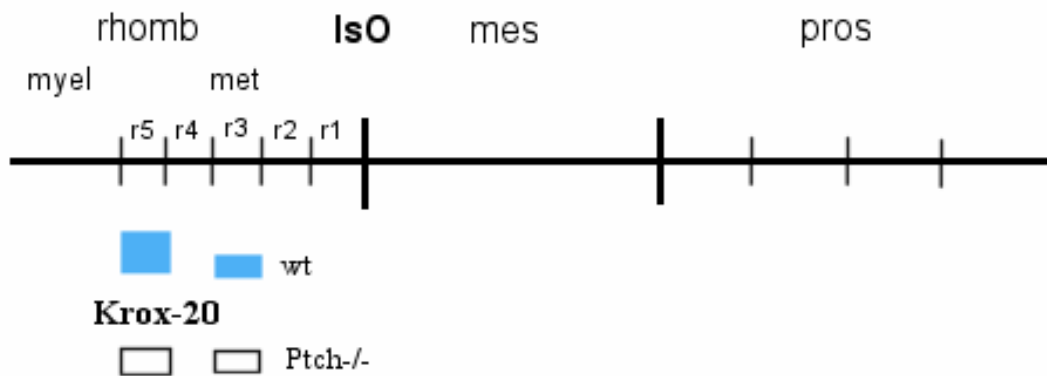


Abbildung 29 Schematische Darstellung der Krox-20 Expression

Die Expression im Wildtyp Embryo findet sich in Rhombomer 3 und 5. Diese fehlt im *Ptch*^{-/-} Embryo vollständig. Abkürzungen siehe Abb. 12.

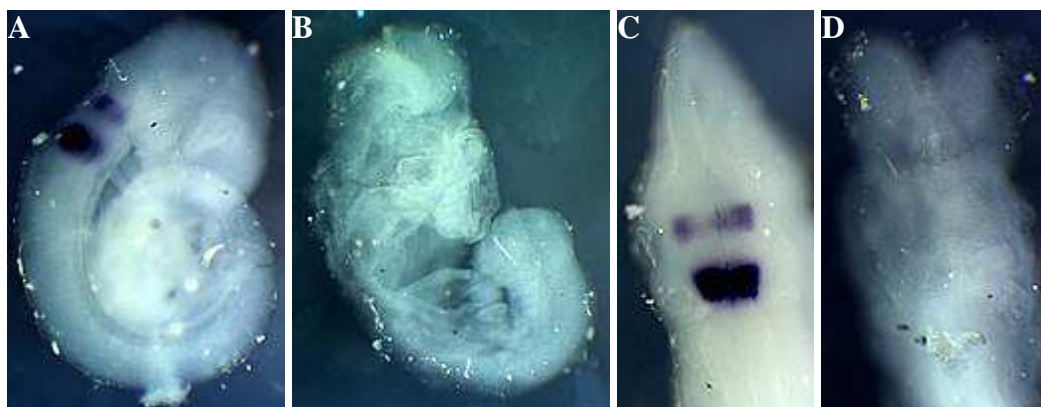


Abbildung 30 Färbungen mit der Krox-20-Sonde

(A, C) Wildtyp Embryo, (B, D) *Ptch*^{-/-} Embryo. (A, B) Überblick von lateral über den gesamten Embryo, (C, D) Detailaufnahme der Gehirnanlage von dorsal. Die weißen Flecken sind Artefakte der Hybridisierung.

4.4.1.11. Expression von Lmx1b

Der Wildtyp-Embryo in Abbildung 32 A ist aufgrund der 9 Somiten zwischen 8,5 und 9 Tagen alt. Zu diesem Zeitpunkt wird Lmx1b im Bereich der MHB exprimiert. Abbildung 32 A zeigt, dass die Expression sehr scharf nach kaudal hin begrenzt ist. Wie in Abbildung 32 C und E dargestellt ist, stellt der Isthmus diese Grenze dar. Rostral reicht die Expression bis fast zum Telenzephalon. In Abbildung 32 C wird auch deutlich, dass die Expression in der Mittellinie erhalten geblieben ist (Adams et al. 2000).

Der Embryo in Abbildung 32 B ist ein $Ptch^{-/-}$ Embryo. Trotz der starken Missbildungen, welche die Alterseinstufung erschweren, konnten 10 Somiten abzählen werden. Daher ist der Embryo 8,5 bis 9Tage alt. Die laterale Ansicht des Embryos in Abbildung 32 B zeigt, dass Lmx1b als breiter Streifen im Bereich des Mittelhirns exprimiert wird. Man könnte in der lateralen Ansicht auch vermuten, dass die Expression im Vergleich zum Wildtyp wesentlich weiter nach kaudal reicht. In Abbildung 32 D wird jedoch deutlich, dass sich die Expression von Lmx1b auf die rostrale Region der MHB beschränkt und nur geringfügig nach kaudal erweitert ist. Die Grenze zum Telenzephalon ist sehr scharf abgegrenzt, wie in F zu sehen, und zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine wesentlich schärfere, deutlichere Grenze. Auch nach lateral ist die Grenze sehr scharf, siehe D und F, und zeigt nicht die ganze Ausdehnung auf die Kopffalten. Dieser Unterschied ist besonders schön im Vergleich der Embryonen in C und D zu sehen.



Abbildung 31 Schematische Darstellung der Lmx1b Expression

Im Wildtyp Embryo findet sich kranial des IsO eine starke Expression von Lmx1b, welche bis fast an das Prosenzephalon heranreicht. Im $Ptch^{-/-}$ Embryo ist die Intensität der Expression nur wenig verringert aber leicht nach kaudal verschoben. Abkürzungen siehe Abb. 12.

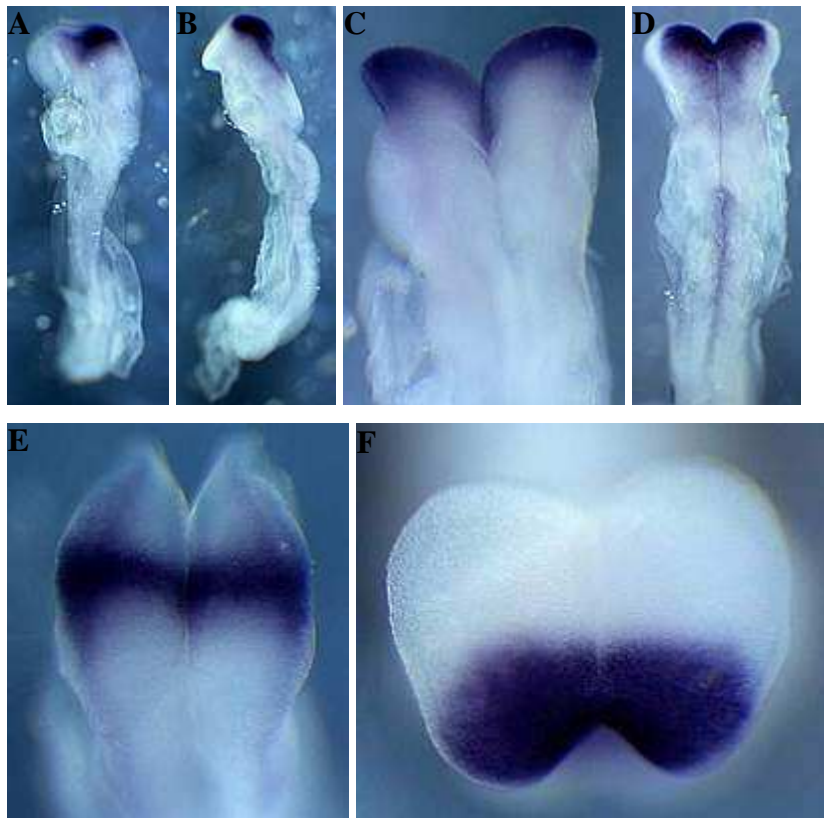


Abbildung 32 Färbungen mit der Lmx1b-Sonde

(A, C, E) Wildtyp Embryo, (B, D, F) $Ptch^{-/-}$ Embryo. (A, B) gesamte Embryonen von lateral, (C, D) von dorsal, (C) nur die Gehirnanlage, (D) Gehirnanlage und oberen Teil des Neuralrohres, (E, F) kraniale Detailaufnahmen der Gehirnanlage.

4.4.1.12. Expression von Spry-2

In Abbildung 34 A erkennt man einen normalen Wildtyp Embryo mit 9 Somiten, der demzufolge 8,5 Tage alt ist. Das „Turning“ ist schon abgeschlossen. Spry-2 wird ähnlich wie FGF-8 im Embryo exprimiert. Man erkennt eine Expression im unsegmentierten paraxialen Mesoderm (Abbildung 34 A), in den Kiemenbögen (Abbildung 34 A und C), die Region kaudal und rostral der MHB (Abbildung 34 A und C) und im rostralen Vorderhirn (Abbildung 34 E) (Minowada et al. 1999, Chambers et al. 2000, Chambers und Mason, 2000, de Maximy et al. 1999).

In Abbildung 34 B ist die Spry-2 Expression im $Ptch^{-/-}$ Embryo zu erkennen. Dieser Embryo ist, ebenso wie der Wildtyp Embryo, 8,5 Tage alt (10 Somiten). Spry-2 wird in der Mutante im kaudalen Bereich des Embryos, im unsegmentierten paraxialen Mesoderm, sehr stark exprimiert. Eine Expression in der Hirnanlage dagegen lässt sich nicht erkennen. Die Kiemenbögen scheinen noch angelegt zu sein, da sich in diesem Bereich eine Expression erkennen lässt. Jedoch ist diese sehr schwach, auf ein kleines Areal zusammengeschrumpft und noch weniger deutlich vom umliegenden Gewebe abzugrenzen (Abbildung 34 B und D). Die Expression im rostralen Vorderhirn fehlt vollständig (Abbildung 34 F),

man kann jedoch eine geringfügige Expression im Neuroepithel der Kopffalten des Prosenzephalon erkennen (Abbildung 34 B und D).

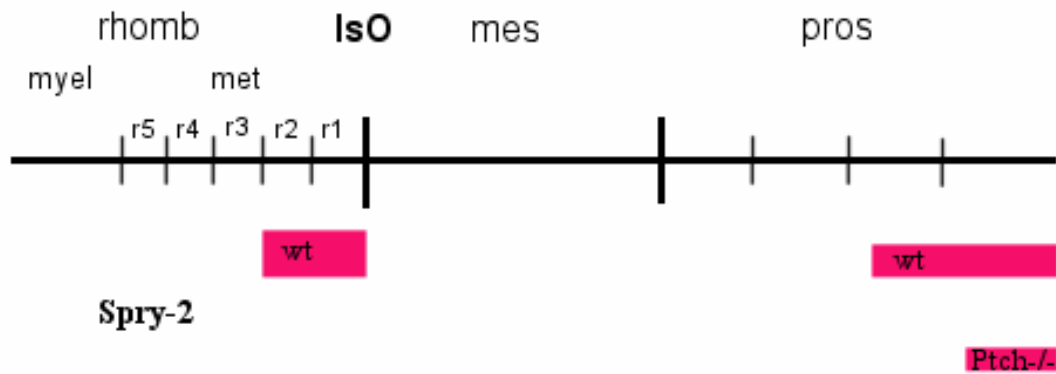


Abbildung 33 Schematische Darstellung der Spry-2 Expression

Im Wildtyp Embryo findet sich eine starke Expression kaudal des IsO und eine nur leicht geringere Expression im Prosenzephalon. Im *Ptch*^{-/-} Embryo ist die Expression am IsO fehlend und im Prosenzephalon deutlich schwächer und auf ein kleineres Areal beschränkt. Abkürzungen siehe Abb. 12.

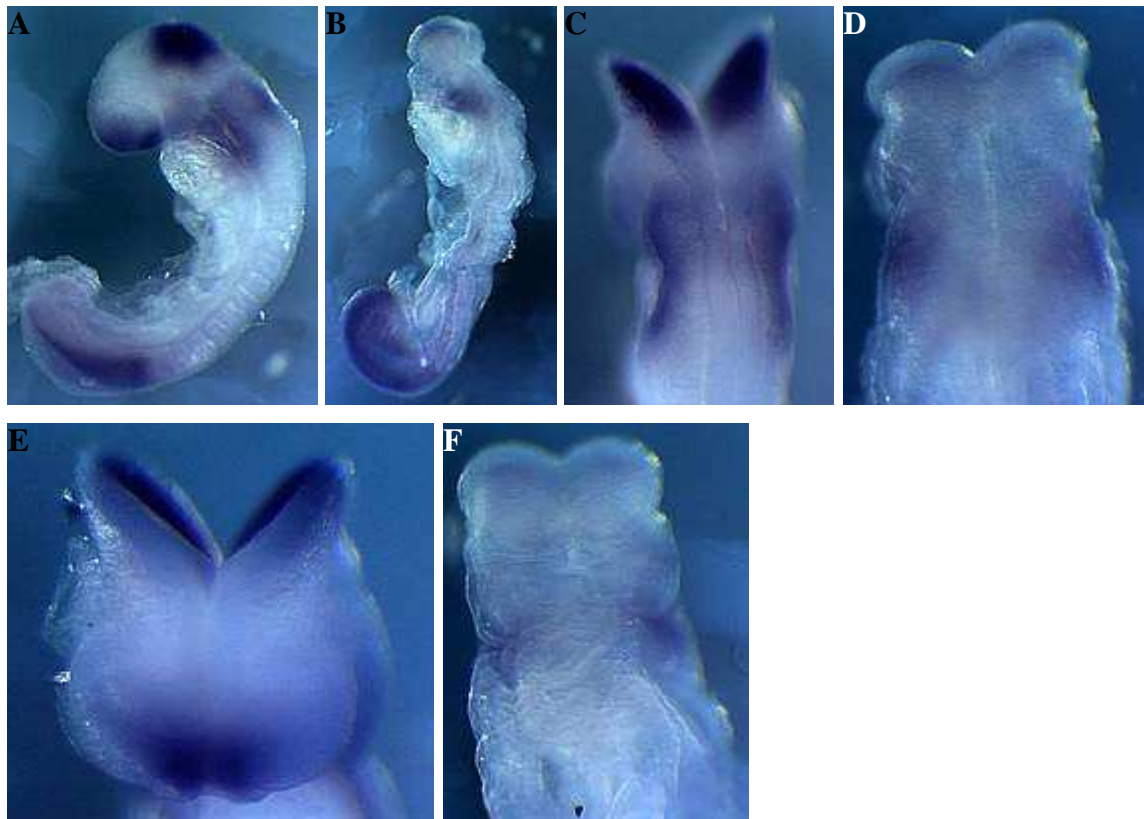


Abbildung 34 Färbungen mit der Spry-2-Sonde

(A, C, E) Wildtyp Embryo, (B, D, F) *Ptch*^{-/-} Embryo. (A, B) gesamter Embryo von lateral, (C, D) dorsale Detailaufnahme der Gehirnanlage, (E, F) Gehirnanlage der Embryonen von frontal.

4.4.1.13. Expression von Dll-1

In Abbildung 35 A erkennt man einen normal entwickelten Wildtyp-Embryo, der 9 Somiten besitzt und somit 8,5 Tage alt ist. Das „Turning“ wurde abgeschlossen. Bis auf die Al-

lantois wurden alle embryonalen Membranen entfernt. Der Embryo in Abbildung 35 A wurde mit einer Fluorescein-gekoppelten RNA-Sonde im Rahmen einer „whole mount *in-situ* Hybridisierung“ für Dll-1 angefärbt. Dabei sieht man, dass Dll-1 nicht ganz entsprechend dem erwarteten Muster exprimiert wird. Normale Expression zeigt sich deutlich im unsegmentierten paraxialen Mesoderm. Alle anderen Expressionsorte sind nicht so stark wie erwartet (Abbildung 35 A und D): die Expression im kaudalen Anteil der Somiten, in Zellgruppen im Neuroepithel in der MHB Region und leichte Expression im Vorderhirn (Bettenhausen et al. 1995, Beckers et al., 1999)

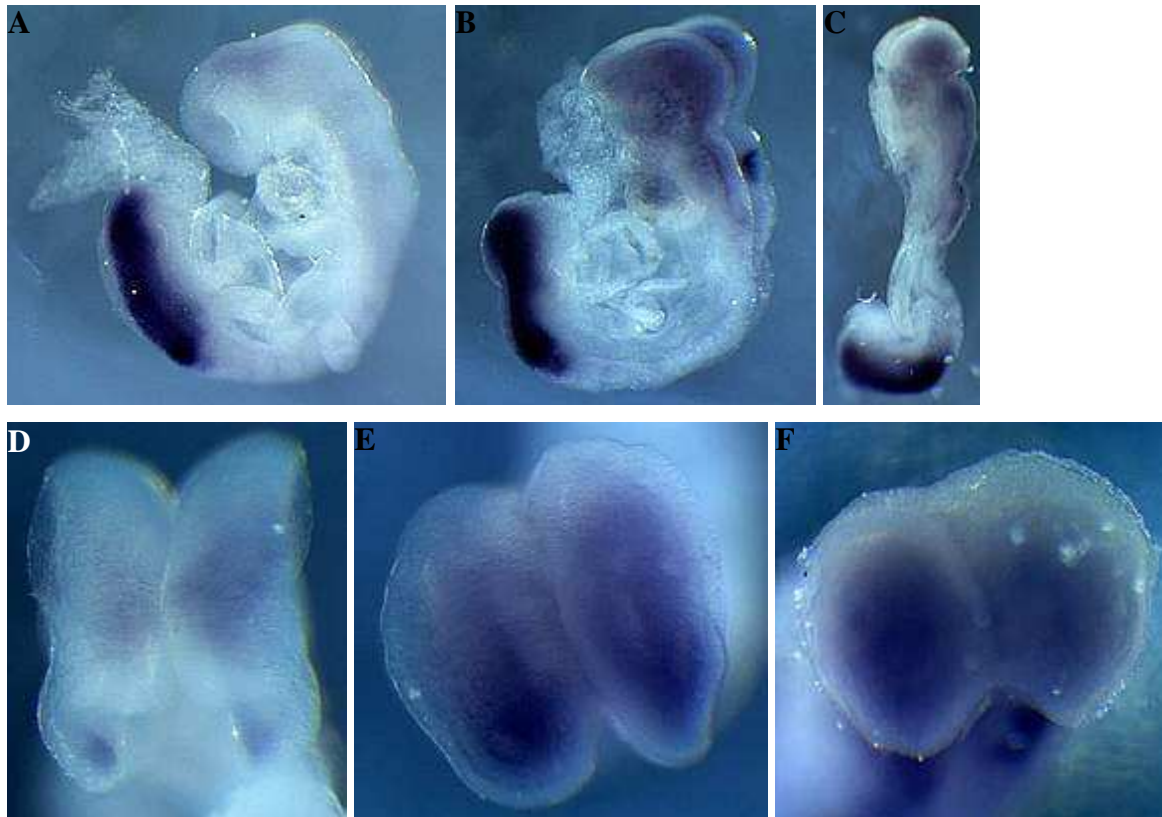


Abbildung 35 Färbungen mit der Dll-1-Sonde

(A, D) Wildtyp Embryo, (B, E) (C, F) zwei verschiedene $Ptch^{-/-}$ Embryonen. (A, B, C) ganze Embryonen von lateral, (D, E, F) Embryonen aus kranialer Sicht auf die Gehirnanlage.

Der $Ptch^{-/-}$ Embryo in Abbildung 35 B ist mit ebenfalls 9 Somiten und 8,5 Tagen gleich alt wie der Wildtyp Embryo. Dieser Embryo zeigt im Vergleich mit den normalen $Ptch^{-/-}$ Mutanten deutlich vergrößerte Kopffalten und nicht so stark überwuchertes Rückenmark. Der Embryo in Abbildung 35 C ist auch eine $Ptch^{-/-}$ Mutante, aber ein wenig älter und ca. 8,5 bis 9 Tage alt, da er bereits 12 Somiten besitzt. Beide $Ptch^{-/-}$ Embryonen zeigen in Abbildung 35 B und C ebenfalls eine Expression im unsegmentierten paraxialen Mesoderm. Die Expression in den Somiten ist äußerst schwach bis nicht vorhanden. Deutliche Unterschiede in der Expression zeigen sich in der Gehirnanlage, in der Dll-1 diffus stark exprimiert wird und zieht sich deutlich über die Mittel-Hinterhirngrenze nach kaudal er-

streckt. Dabei reicht die Expression für Dll-1 bei dem Embryo in Abbildung 35 C weiter kaudal als in Abbildung 35 B. Das in der Gehirnregion stärker angefärbte Gebiet am kaudalen Ende der Expression ist lediglich ein Artefakt der Färbung. E und F zeigen beide Embryonen noch einmal von kranial und lassen keine spezifische Region erkennen, auf die sich Dll-1 wie im Wildtyp begrenzt.

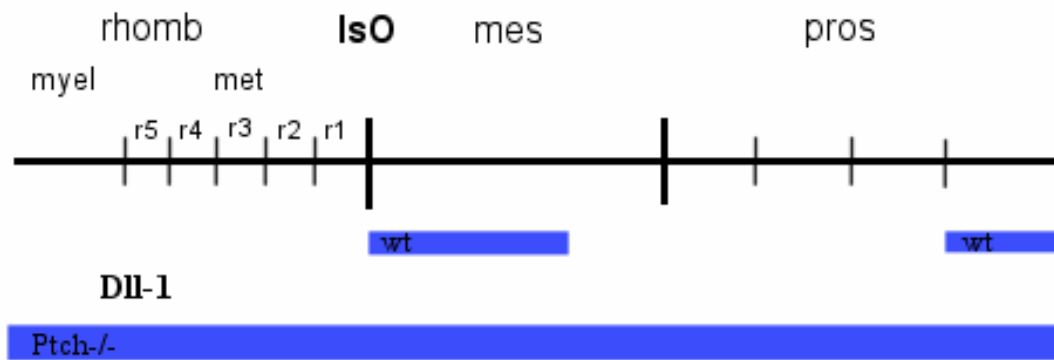


Abbildung 36 Schematische Darstellung der Dll-1 Expression

Die Expression im Wildtyp Embryo ist recht schwach und auf einen größeren Bereich rostral des IsO im Mesenzephalon und auf einen kleinen Bereich im rostralen Prosenzephalon beschränkt. Im Ptch^{-/-} Embryo findet sich eine deutliche Überexpression in der gesamten Gehirnanlage.

4.4.2. Auswertung der Whole Mount in-situ Hybridisierung

Die Hybridisierungen zeigen ein sehr uneinheitliches Muster der Genexpression in der Gehirnanlage. Zur weiteren Quantifizierung der Ergebnisse stand jedoch leider kein passender Antikörper zur Verfügung, so dass lediglich eine semiquantitative Auswertung der Ergebnisse vorgenommen werden konnte.

Überexpression	Gleiche Expression	Unterepression	Fehlend
Shh +++	Lmx1b	Spry-2 - - -	Gbx-2
Dll-1 ++		BF-1 - -	Krox-20
Ptch +		Otx-2 -	FGF-8
Gli-1 +		Wnt-1 -	
		En-1 -	

Tabelle 3 Genexpression WMISH

Es zeigt sich, dass Shh, Ptch, Gli-1 und Dll-1 überexprimiert sind. Lmx1b ist nur unwesentlich schwächer im Ptch^{-/-} Embryo exprimiert als im normalen Wildtyp-Embryo. Deutlich zu sehen ist, dass BF-1, Otx-2, Wnt-1, En-1 und Spry-2 deutlich unterexprimiert sind und Gbx-2, FGF-8 und Krox-20 gänzlich nicht exprimiert sind (siehe auch Tabelle 3). Insgesamt sind wesentlich mehr Sonden geringer oder auch nicht exprimiert als Sonden über-

reexprimiert sind. Vor allen die an der Bildung der MHB beteiligten Gene sind deutlich unterexprimiert, während die des Shh Signaltransduktionsweges und Dll-1 deutlich überexprimiert sind. Hieran lässt sich schon feststellen, dass Ptch in komplexer Art und Weise auf die Bildung der Gehirnanlage einen Einfluss hat.

4.5. Northern Blot Analysen

4.5.1. Blotting

In Abbildung 37 ist das Agarosegel vor dem Blotten dargestellt. Wie man anhand der Banden erkennen kann, wurden gleiche Mengen an RNA eingesetzt. Nach dem Blotten wurde die Membran mit verschiedenen RNA-Sonden hybridisiert.

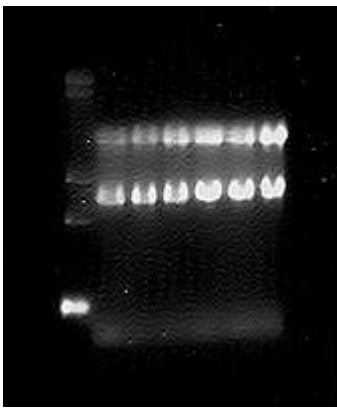


Abbildung 37 Northern Blotting

Agarosegel vor dem Blotten. Die Ethidiumbromidfärbung zeigt, dass gleiche Mengen an RNA untersucht wurden. Proben in den Spuren (von links nach rechts): Marker, DNA aus dem Kleinhirn, DNA aus den Medulloblastomen 53, 72, 675, 729 und 730.

4.5.2. Posthybridisierung

Durch die Northern Blot Analysen wurden nun einige der in den WMISH benutzten Marker auf ihre Expression in Medulloblastomen hin überprüft. Wie man in Abbildung 38 B erkennen kann wird besonders Gli-1 in allen Medulloblastomen im Vergleich zum Kleinhirn deutlich überexprimiert. Auch für Otx-2 (Abbildung 38 C) zeigt sich in 4 von 5 Medulloblastomen eine Überexpression im Gegensatz zum normalen Kleinhirngewebe. Für BF-1 zeigt sich in Abbildung 38 A jeweils nur in einem Medulloblastom eine Überexpression. Für Dll-1, Lmx1b und Spry-2 konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression in Kleinhirn und Medulloblastomen detektiert werden (nicht abgebildet).

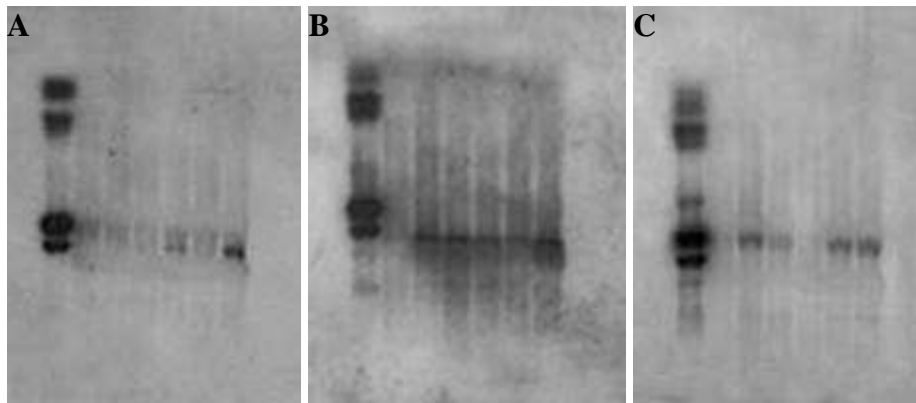


Abbildung 38 Northern Blot Analysen

(A) BF-1; (B) Gli-1; (C) Otx-2.

4.5.3. Quantifizierung

Die Ergebnisse der Northern Blot Analysen für BF-1, Gli-1 und Otx-2 wurden digitalisiert und mittels des Programms Bio Image Intelligent Quantifier, BioQuant, USA quantifiziert. Es wurden dabei nur die Banden ausgewertet, bei welchen ein Signal sichtbar war.

Image/lanes	Intensity	Background	Area	Integral Intensity (I.I.)
BF-1				
lane 6	55.93	80.25	8.84	460.568
Gli-1				
lane 2	22.00	223.00	12.21	255.242
lane 3	36.00	205.00	12.21	395.356
lane 4	31.00	208.00	12.21	306.102
lane 5	21.00	210.00	12.21	215.801
lane 6	53.00	194.00	12.21	606.455
Otx-2				
lane 2	37.00	141.00	14.92	446.380
lane 3	29.00	121.00	14.92	368.429
lane 5	38.00	133.00	14.92	489.198
lane 6	41.00	133.00	14.92	533.442

Tabelle 4 Auswertung Northern Blot

5. Diskussion

5.1. Der Phänotyp von *Ptch*^{-/-} Embryonen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von *Ptch* im Zusammenhang mit der Bildung der MHB und der daraus folgenden Kleinhirnentwicklung untersucht. Hierzu wurden ho-

mozygote $Ptch^{-/-}$ Mausembryonen herangezogen, welche kein funktionelles $Ptch$ Protein exprimieren. Die $Ptch^{-/-}$ Embryonen sind im Vergleich mit den altersentsprechenden Wildtyp Embryonen viel zu groß. Diese Beobachtungen decken sich mit den bisherigen Untersuchungen (Goodrich et al. 1997). Großwuchs ist auch bei dem mit $Ptch$ assoziiertem BCNS bekannt (Gorlin, 1995, Cohen, 1999). Einige der $Ptch^{-/-}$ Embryonen haben auch das „Turning“, welches regulär um den Tag 8dpc stattfindet, nicht vollzogen.

Lichtmikroskopisch fällt bei den $Ptch^{-/-}$ Embryonen vor allem die zunächst deutlich missgebildete Gehirnanlage mit der kaudal anschließenden, ebenfalls missgebildeten Neuralrinne auf. Betrachtet man die Embryonen im Elektronenmikroskop, so bestätigen sich diese Auffälligkeiten. Das Prosenzephalon ist atrophiert und nur noch sehr klein, das Mesenzephalon ist deutlich vergrößert und nach kaudal expandiert, das Rhombenzephalon ist auch deutlich nach vergrößert und nach kaudal verlagert. Dabei haben die verschiedenen Gehirnteile den Charakter der „Bläschen“ verloren und erscheinen als ein klumpiges Gewebe. Die Trennung zwischen den einzelnen Gehirnteilen ist nicht mehr eindeutig nachzuvollziehen. Auch zeigt sich das nicht verschlossene Neuralrohr, dessen Ränder überwachsen sind. Eine Trennung von Boden-, Flügel- und Deckplatte ist nicht mehr wahrzunehmen.

Das Fehlen der Kopffalten im kranialen Gehirnteil im Sinne einer Holoprosenzephalie ist besonders augenfällig. Shh , welches als Morphogen für das Mittelhirn und Vorderhirn beschrieben wurde (Britto et al., 2002), könnte durch seine übermäßige Expression im pathologisch aktivierten Signalweg für einen Teil dieser Veränderungen verantwortlich sein, denn immerhin führt ektop exprimiertes Shh zu einer veränderten MHB (Zhang et al., 2000). Die Veränderungen des Vorderhirns im Sinne einer Holoprosenzephalie sind nicht eindeutig zu erklären. Bisher wurden nur eine fehlende oder verminderte Shh Expression (Chiang et al., 1996, Schell-Apacik et al., 2003) oder eine $Ptch$ Mutation, welche zu einer verminderten Shh Signaltransduktion führt (Ming et al., 2002), beschrieben, welche beide zur Holoprosenzephalie führen. Eine Kombination einer Mesenzephalon-Hypertrophie mit einer begleitenden Prosenzephalon-Atrophie, wie bei den hier untersuchten $Ptch^{-/-}$ Embryonen zu sehen, ist bisher nicht beschrieben und durch die bislang bekannten Tatsachen nur unzureichend zu erklären.

Außerdem ist eine Volumenabnahme in den Strukturen des Mesoderms festzustellen, insbesondere den Somiten und dem unsegmentierten paraxialen Mesoderm. Möglicherweise ist für diesen Effekt auch die Überexpression von Shh verantwortlich, da dieses in die Entwicklung der Somiten involviert ist (Hammerschmidt et al., 1996).

Dies alles zeigt zum Zeitpunkt 8,5dpc einen eindeutig mutierten Embryo, insbesondere im Bereich der Gehirnanlage, der nicht mehr überlebensfähig ist.

5.2. Der Effekt von $Ptch^{-/-}$ auf den Shh-Signaltransduktionsweg

Die Expression des Shh-Ptch Signalweges im Neuroepithel ist bisher gut untersucht und beschrieben (siehe Kapitel 1.7). Shh Expression führt zu einer Ventralisierung des Neuralrohres (Echelard et al., 1993, Roelink et al., 1994), so wie fehlende Ptch Expression einen Verlust von dorsalen Strukturen zur Folge hat (Goodrich et al., 1997). Bei fehlendem Shh kommt es also zu einem fehlen der ventralen Strukturen des Neuralrohres (Chiang et al., 1996). Man kann also sagen, dass beide Faktoren für die korrekte Musterung entlang der dorsoventralen Achse verantwortlich sind (Hammerschmidt et al., 1997). Beide Faktoren verhalten sich aufgrund der beschriebenen Interaktionen (siehe Kapitel 1.7) komplementär, d.h. die Expression des einen entspricht einer fehlenden Expression des anderen.

In den bisherigen Untersuchungen von $Ptch^{-/-}$ Mutanten sind ein deutlicher Verlust von dorsalen Strukturen zugunsten von ventralen im Neuralrohr beschrieben (Goodrich et al., 1997). Eine korrekte Einrichtung der dorsoventralen Achse unterbleibt. Die anteroposteriore Achse schien bisher von diesem Fehler unbeeinflusst zu sein, eine Änderung der Genexpression wurde nicht beschrieben. Man beobachtete jedoch den fehlenden Schluss des Neuralrohres und die daraus fehlende korrekte Gehirnanlage (Goodrich et al., 1997). Ein Einfluss von Shh/Ptch auf die frühen Gehirnorganisationszentren, welche die anteroposteriore Achsen einrichten, war nicht bekannt.

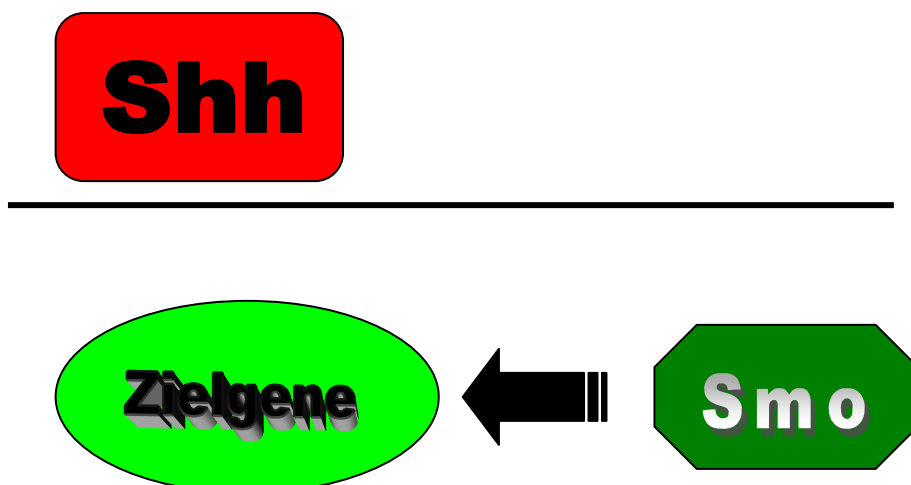


Abbildung 39 Shh/Ptch Signalweg bei $Ptch^{-/-}$ Mutanten

Ungehindert aktivierter Shh/Ptch Signalweg bei Fehlen von Ptch

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, nimmt Ptch einen nicht unerheblichen Einfluss auf die korrekte Bildung der anteroposterioren Achse ein und beeinflusst die Gehirnorganisationszentren (siehe Kapitel 1.3 und unten). Damit scheint die korrekte dorsoventrale Achsenmusterung eine Grundvoraussetzung für die Einrichtung der anteroposterioren Achsenmusterung zu sein.

Die normale Neurulation und Entstehung des ZNS wurden ja schon in Kapitel 1.1 beschrieben. Bevor eine intakte Neurulation stattfinden kann bedarf es einiger Schritte, welche zuvor korrekt ablaufen müssen. Diese wären eine normale Gastrulation mit der Festlegung der Körperachsen (Tam und Behringer 1997) und eine korrekte Bildung des Neuroektoderms während der Gastrulation.

5.2.1. Shh-Signaltransduktionsweg und Gastrulation

Für die Bildung des Neuroektoderms ist die zuvorige Bildung des axialen Mesendoderms während der Gastrulation von entscheidender Bedeutung (Beddington und Robertson, 1998). Dieses kann zwar keine Neuroepithel-spezifischen Gene induzieren, ist aber für die Festlegung der Gehirnabschnitte unerlässlich (Rowan et al. 1999)

Wichtig ist hierbei die Frage ob eine korrekte Gastrulation abgelaufen sein muss um mit der Neurulation zu beginnen. Können auch fehlerhafte Gastrulationen zu der Bildung eines Neuroektoderms und der damit verbundenen Neurulation führen?

Bisher und in dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ptch auf die Gastrulation nicht näher untersucht. Bisherige Untersuchungen zeigten bei Ptch^{-/-} einen phänotypisch korrekt gastrulierten Embryo, der erst mit Beginn der Neurulation große phänologisch relevante Veränderungen zeigt. Auch hinsichtlich der bisher untersuchten Genexpressionen wurde keine Veränderung während der Gastrulation beschrieben, erst mit dem Einsetzen der Neurulation zeigen sich erste Veränderungen im Muster der Verteilung (Goodrich et al., 1997). Von entscheidender Bedeutung ist die Frage, ob bei Ptch^{-/-} Mutanten während der Gastrulation überhaupt ein voll funktionsfähiges Neuroektoderm angelegt wird. So könnten die Missbildungen eigentlich auf einem Gastrulationsdefekt beruhen, welcher zu einem missgebildeten Neuroektoderm führt, das aber bis zum Beginn der Neurulation phänotypisch und in der Genexpression inapparent bleibt, oder ob die Gastrulation und die Bildung des Neuroektoderms normal abläuft und die Veränderungen erst mit Beginn der Neurulation starten.

Bisher konnte Otx-2 eine wichtige Rolle bei der Gastrulation und der Neuroektodermbildung zugewiesen werden:

Das viszerale Endoderm hat Einfluss auf die Musterung und Identität des anterioren Neuroektoderms (Beddington und Robertson, 1998). Im viszeralem Endoderm und im anterioren Mesendoderm ist Otx-2 exprimiert. Fehlexpression von Otx-2 in diesen Geweben führt zu einem Verlust der anterioren neuralen Strukturen (Acampora et al. 1995, Matsuo et al. 1995; Ang et al., 1996). Ein intaktes Mesendoderm scheint damit unabdingbare Voraussetzung für eine korrekte Expression und Entwicklung des Neuroepithels zu sein (Rhinn et al., 1998; Camus et al., 2000), jedoch scheinen die Signale nicht die anteroposteriore Musterung zu induzieren, sondern nur zu verfeinern (Rowan et al., 1999).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das axiale Mesendoderm Otx-2 und En-1 induzieren kann (Camus et al., 2000). Die verminderte Otx-2 und En-1 Expression in Ptch^{-/-} Embryonen ließe daher den Schluss zu, dass das anteriore axiale Mesendoderm nicht korrekt gebildet wird, oder bei intakter Bildung die Funktion eingeschränkt ist. Weitere Untersuchungen hierzu wären notwendig.

Shh ist ebenso schon während der Gastrulation nachzuweisen (Ericson et al., 1995, Chiang et al., 1996), v.a. im anterioren Primitivstreifen und im Henson's Knoten. Ein fehlen desselbigen führt zu einer normalen Bildung der Gastrulation und der Körperachsen, da der Knoten als Organisationszentrum durch das umliegende Gewebe ersetzt wird (Yuan, 1995). Fehlt nun auch das umliegende Gewebe kommt es zu einer Mittellinienspaltung bei korrekter Einrichtung der Körperachsen (Snow, 1981). Man beobachtet hierbei auch eine Überexpression von Shh.

Später findet sich auch eine Expression im axialen Mesoderm der Chorda dorsalis. Hier nimmt Shh während der Gastrulation einen indirekten Einfluss auf die Musterung und Differenzierung des Telenzephalons und des Mesenzephalons (Gunhaga et al., 2000). Da der Shh Signalweg in den Ptch^{-/-} Embryonen ungehindert aktiv ist kommt es vermutlich schon während der Gastrulation zu Defekten in der Bildung des Tel- und Mesenzephalons. Die Telenzephalonatrophie und Fehlanlage (Otx-2 und BF-1 sind vermindert und fehlexprimiert) ist vermutlich auf die Shh Überexpression während der Gastrulation zurückzuführen. Hierdurch könnte der Shh-Signaltransduktionsweg auch Einfluss auf die Spezifizierung der MHB nehmen.

Für weitere Klärung der Sachverhalte wäre eine Untersuchung bezüglich der Otx-2 und Shh Expression während der Gastrulation in Ptch^{-/-} Embryonen notwendig um zu klären, inwieweit überhaupt das Neuroepithel korrekt angelegt wird.

5.2.2. Shh-Signaltransduktionsweg und Neurulation

Erst während der Neurulation kommt es zu einer neuroepithel-spezifischen Genexpression mit der Differenzierung der einzelnen Gehirnabschnitte. Erst jetzt findet eine Differenzierung der zuvor während der Gastrulation festgelegten anteroposterioren und dorsoventralen Achsen statt. Welche Faktoren für die eigentliche Induktion dieser Gene verantwortlich sind, ist bisher nicht geklärt, eine Induktion durch mesodermale Signale ist ausgeschlossen, diese wirken hier nur modifizierend während der Neurulation.

Was in den hier untersuchten Mutanten für eine intakte Gastrulation spricht ist die Tatsache, dass die Neuralrinne in $Ptch^{-/-}$ Mutanten regulär ausgebildet ist und sich auch zunächst regulär schließt sowie $Ptch$ erst dem Tag 8dpc, also nach der Gastrulation, nachweisbar ist. Auch wurden bisher bei $Ptch$ Mutanten keine Fehler in der Gastrulation beschrieben (Goodrich et al., 1997). Erst im kranialen Anteil des Neuroektoderms zeigen sich die beschriebenen überwucherten, nicht mehr funktionsfähigen Neuralfalten. Diese morphologisch eindeutigen Fehler in der Neurulation wurden bereits in Kapitel 4.3 beschrieben und decken sich mit den bereits beschriebenen Fehlbildungen (Goodrich et al., 1997). Bislang wurde jedoch noch kein Zusammenhang von $Ptch$ und einer Fehlexpression von Genen beschrieben, welche für das Neuroepithel spezifisch sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass $Ptch$ einen großen Einfluss auf die korrekte Musterung im Neuroepithel entlang der anteroposterioren Achse nimmt. Diese Zusammenhänge sind detailliert in Kapitel 5.3 beschrieben. Die Zusammenhänge, inwieweit diese Fehlexpressionen nun doch während der Gastrulation indirekt durch $Ptch$, oder während der Neurulation direkt bedingt sind, sind dabei noch weitgehend unklar und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Eine bemerkenswerte Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit gemacht: die Überexpression von Shh in $Ptch^{-/-}$ Embryonen. Shh als Ligand von $Ptch$ hat in den Mutanten keine Funktion mehr, der Signalweg ist ohnehin durch das Fehlen von $Ptch$ schon aktiviert. Möglicherweise ist die Shh Überexpression nur reaktiv wegen des fehlenden Liganden im Sinne eines Rebound, aber auch eine Aktivierung der Shh -Transkription durch den eigenen Signalweg wäre denkbar, wenn auch bisher nicht beschrieben. Bisher konnte nicht geklärt werden, welche Faktoren zu einer Shh -Expression führen, eine Autoinduktion ist nicht bekannt.

Nicht eindeutig erklärbar ist das Fehlen der Expression in einem sehr gut abgegrenzten Gehirnabschnitt (siehe Kapitel 4.4.1.1). Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Shh entlang des gesamten Embryos im axialen Mesendoderm und der Chorda

dorsalis exprimiert ist (Chiang et al., 1996). Dabei wird die Shh Expression abhängig von der Lokalisation und der embryonalen Entwicklungsstufe von verschiedenen anderen Genen begleitet, in der Region um die MHB von einer Otx-2 Expression im Mesoderm (A-campora et al., 1995; Chiang et al., 1996). Der Otx-2 Expressionsverlust an der MHB in Ptch^{-/-} Embryonen könnte darauf hinweisen, dass Shh und Otx-2 in diesem Bereich in Wechselwirkung untereinander treten, so also ein Fehlen von Otx-2 ebenfalls ein Fehlen von Shh bewirkt.

Erstaunlich ist auch die schwach ausgeprägte Wnt-1 Expression. Wnt-1 als Zielgen des Shh-Ptch Signalweges sollte bei Aktivierung des Signalweges in Ptch^{-/-} Mutanten eigentlich überexprimiert sein, in den untersuchten Embryonen zeigt sich aber eine eher verminderte Expression.

5.3. Der Effekt von Ptch^{-/-} auf die MHB

Die schon morphologisch auffälligen und oben beschriebenen Veränderungen im Bereich der Gehirnanlage bestätigten sich durch Verschiebungen der Genexpression in der durchgeführten in-situ Hybridisierung (siehe Kapitel 4.4.1). Zusammenfassend lässt sich die Expression der MHB Marker in Ptch^{-/-} Mutanten folgendermaßen darstellen: kompletter Verlust der Gen-Expression von Gbx-2, Fgf-8, Spry-2 und Krox-20, eine eingeschränkte Expression von Otx-2, Wnt-1, En-1 und BF-1, eine stärkere Expression von Lmx1b und eine Überexpression von Dll-1, Gli-1, Ptch und Shh. Im direkten Vergleich von Ptch Mutanten und Wildtyp Genexpressionsmustern zeigen sich mehrere deutliche Auffälligkeiten:

- alle fehlenden oder unterexprimierten Gene liegen kaudal der MHB. Von besonderer Auffälligkeit sind Gbx-2, Fgf-8 und Spry-2: ihre Expression in der Gehirnanlage ist zwar komplett fehlend, aber im unsegmentierten paraxialen Mesoderm sind alle drei Gene unvermindert und in voller Stärke exprimiert.
- die Grenze zwischen Otx-2 und Gbx existiert nicht mehr, eine Positionierung der MHB wäre nach klassischem Verständnis nicht mehr möglich
- das Fehlen von Fgf-8 lässt eine Induktion der MHB unmöglich werden
- das Vorhandensein von Wnt-1, En-1 und Lmx1b. Bei einer nicht mehr vorhandenen MHB sollten diese Gene auch nicht mehr exprimiert werden.
- die örtliche Diskrepanz von Otx-2 und BF-1 (beide eigentlich im Vorderhirn coexprimiert) und von Otx-2 und Wnt-1 (beide kranial MHB coexprimiert)
- Shh ist extrem stark überexprimiert

Diese Auffälligkeiten sollen nun im Hinblick auf die bereits beschriebene Kleinhirnentwicklung (siehe Kapitel 1.2) und den bekannten Mechanismen bei der MHB-Entstehung (siehe Kapitel 1.5) untersucht werden.

5.3.1. Die Genexpression an der MHB

Die nur am kranialen Ende des der Gehirnanlage beobachtete Expression von Otx-2 ist mit den phänologischen Ergebnissen gut in Übereinstimmung zu bringen (siehe Kapitel 4.3), da das Prosenzephalon zugunsten des Mesenzephalon verkleinert ist. Die Größe des Prosenzephalons deckt sich sehr gut mit der Otx-2 Expression, lediglich im kranialsten Bereich fehlt die Expression. Die im Mesenzephalon zu erwartende Otx-2 Expression fehlt in der Ptch^{-/-} Mutante. Die neue kaudale Grenze von Otx-2 ist somit nicht mehr die Grenze von Mes- und Metenzephalon, wo die MHB lokalisiert ist, sondern die Grenze von Prosenzephalon und Metenzephalon. Das wirft bezüglich der korrekten Positionierung der MHB einige Fragen und Probleme auf: Für eine korrekte Positionierung der MHB ist lediglich das kaudale Ende der Otx-2 Expression verantwortlich (Broccoli et al., 1999), jedoch ist Otx-2 ohne die Expression von Gbx kaudal der MHB wirkungslos (Wassarman et al. 1997). Gbx ist zudem auch für die Aufrechterhaltung und korrekte Positionierung der Fgf-8 und Wnt-1 Expression zuständig (Wassarman et al., 1997). Die in den Ptch^{-/-} Embryonen fehlende Gbx Expression würde nach diesem Verständnis eine Positionierung der MHB nicht möglich machen. In den von Wassarman (Wassarman et al., 1997) untersuchten Gbx^{-/-} Embryonen zeigte Otx-2 ein deutlich nach kaudal verlagerte Expression, bei fehlendem Gbx in den Ptch^{-/-} Embryonen zeigt sich jedoch eine ausgeprägte Rostralisierung von Otx-2, welche nicht zu erwarten war.

Die kaudale Otx-2 Expressionsgrenze in der Mutante ist zumindest nicht auf den normalerweise repressiven Effekt von Gbx-2 und Fgf-8 zurückzuführen. Beide Gene werden hier nicht exprimiert. Damit muss möglicherweise Ptch für die Aufrechterhaltung der Otx-2 Expression im gesamten Bereich rostral der MHB verantwortlich sein. Zudem bestätigt das Fehlen von Fgf-8, dass die MHB nicht voll funktionsfähig eingerichtet wurde. Erstaunlicherweise findet auch eine Verschiebung der MHB nach kaudal, wie es bei einem Fehlen von Gbx-2 beobachtet wurde (Wassarman et al., 1997), nicht statt. Mit dieser Verschiebung nach kaudal ist auch eine nach kaudal expandierte Otx-2 Expression verbunden, die hier ebenfalls nicht zu beobachten ist. Auch eine Verschiebung der MHB nach rostral entsprechend der verschobenen kaudalen Otx2 Expressionsgrenze ist nicht zu beobachten.

Bemerkenswert ist ebenfalls die Wnt-1 Expression, welche unter normalen Umständen in die Otx-2 positive Expressionsregion fällt (Hidalgo-Sanchez et al., 1999). In Ptch^{-/-} Mutan-

ten zeigt sich die Wnt-1 Expression unabhängig von Otx-2 an der Region, wo die MHB lokalisiert sein müsste, die Otx-2 Expression fehlt hier.

Die Expression von Otx-2 im kranialen Anteil des Neuralwulstes ist nicht identisch mit der Expression von BF-1, welches normalerweise in der Flügelplatte des Neuralrohres im Prosenzephalon zu finden ist (Shimamura et al., 1995, Dou et al., 1999). Blicke die Expression von BF-1 in der *Ptch*^{-/-} Mutante ebenfalls auf die Flügelplatte beschränkt, so wäre diese sehr weit nach lateral zugunsten der Bodenplatte verlagert. Die normalerweise auch in der Flügelplatte zu findende Otx-2 Expression (Sineome et al., 1992, Mallamaci et al., 1996) ist in den *Ptch* Mutanten nicht mehr in vollem Umfang vorhanden.

BF-1 kontrolliert die Zellproliferation im Großhirn ab dem Tag 11,5dpc. Eine Expression ist aber schon ab dem Tag 8,5 nachweisbar, hier beeinflusst BF-1 weder die Proliferation noch die Differenzierung (Hanashima et al., 2002). Welche Rolle BF-1 hier spielt ist noch unklar. Möglicherweise demarkiert BF-1 zunächst das Telenzephalon, wo es später eine proliferative Aktivität übernimmt. Diese mögliche duale Rolle entspräche auch der für Gbx-2 beschriebenen (Li et al., 2002). Außerdem scheint BF-1 in die dorsoventrale Musterung im Vorderhirn einzugreifen, da es Shh und BMP (bone morphogenetic proteins) beeinflusst und *BF-1*^{-/-} homozygote Embryonen deutliche Defekte in der dorsoventralen Musterung des Vorderhirns aufweisen (Shimamura et al., 1997): es zeigte sich, dass der Phänotyp von *BF-1*^{-/-} Knock-outs ähnlich dem der *Shh*^{-/-} Knock-outs ist. Hier konnte man einen Verlust ventraler Zellen auf Kosten einer Expansion von dorsalen Zellen im Vorderhirn beobachten (Dou et al 1999).

Morphologisch ist das Mesenzephalon zugunsten eines verkleinerten Metenzephalons nach kaudal gewachsen. Die fehlende korrekte Entwicklung des Metenzephalons bestätigt sich in den *Ptch*^{-/-} Embryonen durch die fehlende Krox-20 Expression (siehe Kapitel 4.4.1.10) und den damit nicht vorhandenen Rhombomeren 3 und 5. Ähnliches wurde bereits für Fgf-8 beobachtet: Fgf-8 ist zu Beginn der Somitogenese für die Spezifizierung der Rhombomere 5 und 6 zuständig. Ein Fehlen von Fgf-8 zu diesem Zeitpunkt bewirkt eine Suppression der normalerweise in den Rhombomeren angelegten Genexpressionen (Wiellette und Sive, 2004). Möglicherweise haben die für diese Rhombomere 3 und 5 spezifischen Zellen die Identität anderer Rhombomere angenommen (Voiculescu et al., 2001).

Fgf-8, welchem eine zentrale Rolle in der Bildung der MHB zukommt (Chi et al., 2003, Lee et al., 1997, Mason et al., 2000, Ye et al., 2001), fehlt in den hier untersuchten *Ptch*^{-/-} Mutanten vollständig. Die fehlende Aktivität von Fgf-8, welches unabhängig von Otx-2

und Gbx-2 eine voll funktionsfähige MHB einrichten kann (Hidalgo-Sanchez et al., 1999, Liu et al., 1999, Martinez et al., 1999), legt nahe, dass in den *Ptch*^{-/-} Embryonen keine funktionierende MHB mehr vorhanden ist. Die in *Fgf-8*^{-/-} Mutanten beobachtete Expansion des Mittelhirns zugunsten der MHB bestätigt sich auch hier (Reifers et al., 1998).

Fgf-8 kann in intaktem Gewebe ektop in *Otx-2*-positivem Gebiet durch Repression von *Otx-2* und Induktion von *Gbx-2*, *En-1* und *Wnt-1*, sowie die Aufrechterhaltung der Expression von *Wnt-1* und *Gbx-2* eine MHB einrichten (Liu et al., 1999). Die ektope MHB organisiert sich hierbei kreisförmig um die *Fgf-8* Expression, die normale anteroposteriore Musterung ist hier aufgehoben (Martinez et al., 1999). Auch nimmt *Lmx1b* einen inhibierenden Einfluss auf *Fgf-8*, induziert es jedoch gleichzeitig in den Nachbarzellen (Adams et al., 2000, Matsunaga et al., 2002).

Umso bemerkenswerter ist die Expression von *En-1*, *Wnt-1* und *Lmx1b* in den *Ptch*^{-/-} Embryonen. Alle drei Gene sind an der normalen Entwicklung der MHB beteiligt (Bally-Cuif et al., 1995, Joyner, 1996, Matsunaga et al., 2002, Panhuysen et al., 2004, Wurst et al., 1994). Eine Expression bei fehlender MHB, bzw. fehlendem *Fgf-8*, wäre bei direktem kausalem Zusammenhang nicht möglich. *Ptch* hat sicherlich keinen direkten Einfluss auf die Induktion oder Aufrechterhaltung der Expression von *En-1*, *Wnt-1*, *Lmx1b* (es ist in den hier vorliegenden Mutanten nicht exprimiert). *Ptch* wirkt aber modifizierend auf die Expression der Gene: *Ptch* hat auf *Lmx1b* einen inhibierenden Effekt, da in den *Ptch*^{-/-} Embryonen die Expression deutlich vergrößert ist, während für *En-1* und *Wnt-1* ein förderlicher Effekt zu verzeichnen ist (die Expression in den Mutanten ist nur noch örtlich sehr begrenzt).

In Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Expression von *Fgf-8* nur dann eintreten kann, wenn das Rhombomer 1 des Metenzephalons in direktem Kontakt zum Mesenzephalon kommt (Irving und Mason, 1999). Im Umkehrschluss wäre dann bei fehlender *Fgf-8* Expression ein derartiger Kontakt nicht mehr vorhanden. Dies könnte viele Ursachen haben, zum einen könnte das Rhombomer 1 nicht mehr angelegt sein, zum anderen könnte bei noch vorhandenem Rhombomer 1 die normale Genexpression gestört sein. Denkbar ist ebenso ein fehlendes Mesenzephalon oder eine dort gestörte Genexpression.

Ebenso bemerkenswert ist die Expression von *Gbx-2*, *Fgf-8* und *Spry-2*: Alle drei Gene haben ihre Expression im kaudalen Bereich der MHB in *Ptch*^{-/-} Embryonen verloren, sind aber trotzdem noch im präsomitischen Mesoderm exprimiert. Ein Zusammenhang zwischen der *Ptch* Expression im Gehirn und der Expression von *Gbx-2*, *Fgf-8* und *Spry-2* an

der MHB wäre demnach denkbar. Ptch würde so auch über die Regulation dieser Gene indirekt in die Bildung der MHB eingreifen. Da diese Gene in den Ptch^{-/-} Embryonen fehlen könnte Ptch einerseits an der Induktion oder an der Aufrechterhaltung dieser Gene an der MHB beteiligt sein. Da aber alle diese Gene im präsomitischen paraxialen Mesoderm exprimiert sind, scheinen diese nicht der direkten Kontrolle durch Ptch zu unterliegen, die Expression müsste dann auch in diesen Strukturen fehlen. Wahrscheinlicher ist die Annahme dass Ptch in Neuroepithel entweder direkt mit einem anderen Cofaktor oder indirekt über Beeinflussung eines weiteren Faktors die Genexpression von Gbx-2, Fgf-8 und Spry-2 entweder induziert oder aufrechterhält. Dieser Faktor ist nicht in den Shh-Ptch-Signalweg eingebunden, weil ansonsten die Expression im Mesoderm ebenfalls beeinflusst wäre.

5.3.2. Die Positionierung der MHB

Die MHB mit dem IsO muss korrekt positioniert sein, und zwar sowohl entlang der anteroposterioren, als auch der dorsoventralen und der lateralen Achse. Die laterale und dorsoventrale Achse sind durch die korrekte Entwicklung und Lage des Neuralrohres festgelegt, die anteroposteriore Achse ist abhängig von der Genexpression von Otx-2 und Gbx-2 (Martinez-Barbera et al., 2001, Joyner et al., 2000, Li und Joyner, 2001, Simeone 2000). Knock-in Experimente von Otx-2 und Gbx-2 haben gezeigt, dass die Grenze der beiden exprimierten Gene für die Positionierung verantwortlich ist (Broccoli et al., 1999, Millet et al., 1999). Bei jeweiliger mehr kaudalen oder mehr rostralen Expression verschob sich die gesamte MHB, blieb aber noch voll Funktionsfähig. Grafting-Experimente zeigten ein ähnliches Bild: eine neue MHB bildete sich an der Grenze von Gbx-2 und Otx-2 (Martinez et al., 1999). Die Polarität bezüglich der anteroposterioren Achse blieb dabei jedoch teilweise nicht erhalten (Marin und Puelles 1994, Martinez et al., 1995).

Bisher waren nur Faktoren aus dem Mesoderm fähig in die dorsoventrale Musterung einzugreifen, z.B. Shh welches dosisabhängig die Motoneuronen des ventralen Neuralrohres induziert (Cohen, 2003, Echelard et al., 1993, Ruiz i Altaba et al., 2003), ein Einfluss auf die anteroposteriore Musterung war lange nicht bekannt und wurde erst kürzlich beschrieben (Patten und Placzek, 2000). Daher sollte eigentlich nach bisherigem Verständnis bei Shh Fehlexpression lediglich die dorsoventrale Musterung beeinflusst werden, die anteroposteriore Musterung bliebe demnach intakt. Gleiches würde für Ptch, als Rezeptor für Shh, gelten. In der vorliegenden Untersuchung ist die anteroposteriore Musterung aber wesentlich gestört. Daher hat Ptch nicht nur einen Einfluss auf die dorsoventrale, sondern auch auf die anteroposteriore Musterung.

Sobald der IsO mit der MHB korrekt positioniert ist beginnt die Funktion der MHB. Diese ist entsprechend bisherigem Verständnis nach die der anteroposterioren Musterung. Einen Einfluss der MHB auf die dorsoventrale und laterale Musterung wurde bislang noch nicht beschrieben. Ein eng umschriebener Teil der MHB, welcher im dorsalen Anteil des kaudalen Mittelhirnes liegt, ist verantwortlich für die Entwicklung der Deckplatte (Alexandre et al., 2003). Im Zebrafisch wurde *Lmx1b* eine Rolle bei der Einrichtung der Deckplatte zugesprochen, welche aber in Mäusen durch *Lmx1a* ersetzt wird (Chizhikov und Millen, 2004). Die Deckplatte ist über die Expression von BMP's in die dorsoventrale Musterung involviert (Lee et al., 1998; Liem et al., 1995; Lee et al., 1999). Folglich ist die MHB also indirekt an der dorsoventralen Musterung beteiligt. Bei fehlerhaft angelegter MHB muss also demnach auch die dorsoventrale Musterung (neben der ohnehin schon bewiesenen anteroposterioren Musterung) fehlerhaft sein. Die MHB ist somit nicht nur eine planares, sondern ein plastisches, zumindest zweidimensionales Organisationszentrum. Wann *Ptch* seinen Einfluss während der Entwicklung auf die anteroposteriore Achse ausübt bleibt zu klären.

Bisher konnte gezeigt werden, dass *Otx-2* konzentrationsabhängig in die Gehirnentwicklung eingreift (Acampora et al., 1997): Ein reduziertes *Otx-2* entlang der MHB führt zu einer Verschiebung der *Fgf-8* Expression, ein reduziertes *Otx-2* entlang der Grenze zwischen Flügel und Bodenplatte (alar-basal-plate-boundary) führt zu einer Verschiebung der *Shh* Expression (Puelles et al., 2003).

Ein Verlust von *Otx-2* im ventrolateralen und posterioren Hinterhirn führt zu einer Dorsalexprimierung von *Shh* sowie zu einer Rotation der MHB nach dorsal und anterior (Puelles et al., 2004). *Otx-2* ist folglich dosisabhängig sowohl in die anteroposteriore Musterung, als auch in die dorsoventrale Musterung involviert.

Gbx-2 scheint neben der Positionierung der MHB (Millet et al., 1999, Wassarman et al., 1997) mehrere Aufgaben während der Entwicklung zu erfüllen: neben der bekannten Positionierung der MHB scheint *Gbx-2* auch auf die Proliferation in Rhombomer 1 Einfluss zu nehmen, aber erst nach dem Tag 9dpc (Li et al., 2002). Damit übernimmt *Gbx-2* im Laufe der Gehirnentwicklung mindestens zwei verschiedene Aufgaben wahrzunehmen.

Bislang konnte demonstriert werden, dass die Genexpression in den *Ptch*^{-/-} Embryonen nicht intakt ist und die MHB aufgrund dessen nicht korrekt angelegt ist. Nun ist jedoch eine teilweise funktionierende MHB auch ohne eine Grenze zwischen *Gbx-2* und *Otx-2*

möglich (Martinez-Barbera et al., 2001). Hierzu ist lediglich der Kontakt von Mesenzephalon zu nicht-Mesenzephalon (Metenzephalon oder Myelenzephalon) notwendig (Millet et al., 1999, Wassarman et al., 1997). Da nun bei den hier untersuchten $Ptch^{-/-}$ Embryonen eine korrekte Positionierung und Funktion der MHB aufgrund der fehlenden Grenze zwischen Gbx-2 und Otx-2 unterbleibt, da ja Gbx-2 nicht exprimiert ist, könnte aber aufgrund der obigen Erkenntnis trotzdem eine teilweise funktionierende MHB möglich sein. Wäre also eine solche MHB eingerichtet, so müssten auch einige Gene bzw. Marker der MHB aktiv sein. Dies bestätigt sich an den hier untersuchten $Ptch^{-/-}$ Embryonen, da Wnt-1, Lmx1b und En-1 noch exprimiert sind. Alle diese Gene sind mit der Bildung oder der Funktion der MHB assoziiert und würden für eine noch teilweise funktionstüchtige MHB sprechen. Damit kann man behaupten, dass Teile des Mesenzephalons und Teile des Metenzephalons noch bei $Ptch^{-/-}$ Embryonen angelegt sind und diese Teile noch zu einer MHB führen können. Allerdings wäre auch möglich, dass die hier noch exprimierten Gene über ein weiteres, noch unbekanntes Gen induziert werden und in diesem Fall unabhängig von einer bestehenden MHB exprimiert würden.

5.3.3. Die Induktion der MHB

Von allen bisher untersuchten Genen, welche einen Einfluss auf die Bildung der MHB haben, konnte keines einen induktiven Effekt auf Fgf-8 vorweisen, erst kürzlich konnte Pax-2 eine induzierende Fähigkeit für Fgf-8 nachgewiesen werden (Ye et al., 2001). Die Positionierung scheint unabhängig von der Induktion zu sein (Li und Joyner, 2001, Simeone, 2000). Lediglich Gbx-2 hat einen Einfluss auf die korrekte Positionierung von Fgf-8, die Induktion ist unabhängig davon (Millet et al., 1999, Wassarman et al., 1997). Fgf-8 kann ja unabhängig von seiner Expressionsposition entlang der anteroposterioren Achse eine ektope MHB induzieren (Martinez et al., 1999).

Ein vollständiges Fehlen von Fgf-8 führt zu einer Fehlentwicklung mit einem Gastrulationsdefekt (Sun et al., 1999), eine Neurulation kann gar nicht erst stattfinden. Lediglich bei selektiv im Neuroektoderm ausgeschaltetem Fgf-8 kommt es bei intakter Gastrulation zu einer fehlerhaften Neurulation (Chi et al., 2003). In $Ptch^{-/-}$ scheint daher die Gastrulation intakt zu sein, somit auch die normale Fgf-8 Expression während der Gastrulation, erst bei der Neurulation greift Ptch in die Expression von Fgf-8 ein.

Ebenso scheint Fgf-8 Expression im Primitivstreifen notwendig für die korrekte Gbx-2 Expression zu sein (Liu und Joyner, 2001). Der Einfluss von Gbx auf die Gastrulation wurde bislang noch nicht untersucht.

Ähnliches wie für Fgf-8 gilt für Otx-2 welches ebenfalls während der Gastrulation exprimiert wird und dort notwendig ist um die anteriore Neuralplatte zu formen (Acampora et al., 1995, Ang et al., 1996, Rhinn et al., 1998). Für Otx-2 Expression im Neuroektoderm ist Otx-2 Expression im anterioren viszeralem Endoderm und dem anterioren Mesendoderm notwendig (Tam und Behringer, 1997). Ein Fehlen von Otx-2 während der Gastrulation führt zu einer vollständigen Absenz der anterioren Neuralplatte, so dass es erst gar nicht zu einer Neurulation kommen kann (Beddington und Robertson, 1998).

Die korrekte Expression von Fgf-8 und Otx-2 während der Gastrulation wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Bei phänotypisch intakten mesodermalen Strukturen scheint die Gastrulation weitgehend normal abzulaufen. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Genexpression während der Gastrulation wären wünschenswert um die Defekte während der Neurulation besser zu verstehen.

Wendet man obige Überlegungen auf die Ptch^{-/-} Embryonen an, dann kann man damit folgende Aussagen treffen: Da Otx-2 in den Ptch^{-/-} Embryonen noch exprimiert ist, auch wenn die Expression auf eine kleinere Region im Gehirn beschränkt ist, wäre eine Induktion der MHB nach obigem Verständnis möglich. Da nun Gbx-2 komplett fehlt, ist daher wohl lediglich die Positionierung der MHB nicht korrekt. Aber da noch eine eindeutige kaudale Grenze von Otx-2 existiert, kann man auch davon ausgehen, dass noch ein Mesenzephalon und ein Metenzephalon angelegt werden. Eine funktionsfähige MHB scheint nicht mehr zu existieren, da ja Fgf8 fehlt. Überreste der MHB scheinen jedoch vorhanden zu sein, da ja noch En-1 und Lmx1b sowie Wnt-1 existieren.

5.4. Der Effekt von Ptch^{-/-} auf die Entstehung von Medulloblastomen

In Kapitel 1.9 wurde der Zusammenhang zwischen Ptch und der Entstehung von Medulloblastomen bereits näher erörtert. Aufgrund der Entwicklungsdefekte im Bereich der Gehirnanlage bei Ptch^{-/-} Mutanten bestand ein begründeter Verdacht, dass der Grundstein für die frühe Entwicklung von Medulloblastomen im Rahmen des Basalzellnävussyndromes möglicherweise schon im der pränatalen Entwicklung gelegt wird. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Medulloblastome von den Körnerzellen des Kleinhirnes abstammen, indem es zu einer Aktivierung des Shh-Signalweges kommt (Pomeroy et al., 2002). Ebenso wurde für SuFu, welches in den Shh-Signalweg eingebunden ist eine Mutation beschrieben, welche zu einer pathologischen Aktivierung des Signalweges führt und somit die Entstehung von Medulloblastomen fördert (Taylor et al., 2002).

Auch eine deutlich erhöhte Konzentration von Otx-2 in Medulloblastomen konnte bereits nachgewiesen werden (Michiels et al., 1999, Yokota et al., 2004).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den bei der Entwicklung der MHB beteiligten Genen und der Entstehung von Medulloblastomen nachzuweisen wurde eine Northern-Blot-Analyse von den exprimierten Genen angefertigt. Neben der bereits bekannten Überexpression von Otx-2 wurde nur für Gli und für BF-1 eine Überexpression detektiert. Für alle weiteren Gene konnte keine Überexpression nachgewiesen werden.

Der Zusammenhang zwischen Otx-2 und Medulloblastomen scheint durchaus begründet: Da Medulloblastome vorzugsweise aus Mesenzephalon entstehen und in der embryonalen Entwicklung auch Otx-2 im Mesenzephalon zu finden ist, könnte hier durchaus ein möglicher Marker für Medulloblastome vorliegen. Zur Verifizierung wären aber größere Fallzahlen notwendig.

6. Zusammenfassung

Ptch spielt eine fundamentale Rolle im Shh-Ptch Signaltransduktionsweg und spielt eine ebenso wichtige Rolle als Tumorsuppressor-Gen und Entwicklungs-Gen. Ptch fungiert dabei als Rezeptor für Shh und wirkt damit in der korrekten Entwicklung verschiedener Organsysteme mit. Mit dieser Arbeit wurde der Einfluss von Ptch auf die Genexpression der Midbrain-Hindbrain Boundary (Mittelhirn-Hinterhirn Grenze, MHB) untersucht. Dazu wurden whole mount in-situ Hybridisierungen von 8,5dpc alten Embryonen untersucht, welche von verpaarten heterozygoten Ptch Knock-out Mäusen stammen. Die an der MHB untersuchten Gene spielen eine wichtige Rolle in der Bildung, Aufrechterhaltung und korrekten Funktion der MHB. Da Ptch für das Basalzellnevussyndrom verantwortlich ist und dies mit einer höheren Rate an Medulloblastomen vergesellschaftet ist, wurde der Einfluss von Ptch auf Medulloblastome und deren Genexpression untersucht.

Da Medulloblastome aus dem Cerebellum hervorgehen und Ptch eine wichtige Rolle in der Organentwicklung spielt, konnte in der frühen Entwicklung eine Empfänglichkeit für Medulloblastome durch den Einfluss von Ptch auf die Kleinhirnentwicklung gelegt werden. Die frühestmögliche Einfluss von Ptch auf die Entwicklung des Cerebellum kann während der Bildung der MHB, welche kranial des zukünftigen Kleinhirns liegt, erfolgen, da die MHB einen wesentlichen Einfluss auf die korrekte Entwicklung des Kleinhirns hat. Damit war das Ziel der Arbeit einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen der Bildung der MHB und der Entwicklung von Medulloblastomen zu zeigen.

Die Hypothese wurde am Mausmodell getestet. Dazu wurden $Ptch^{+/neo67}$ Mäuse miteinander verpaart und die Embryonen am Tag 8,5dpc präpariert, da zu diesem Zeitpunkt die MHB gebildet wird.

Die Embryonen wurden unter dem Licht und Elektronenmikroskop untersucht und zeigten eine bemerkenswerte Anatomie: die Gehirnanlage der Embryonen war vollkommen zerstört. Besonders augenfällig waren der fehlende Neuralrohrschluss und das Fehlen des „Turning“. Die whole mount in-situ Hybridisierung wurde mit Gen-Sonden durchgeführt, welche u.a. am Shh-Ptch-Signaltransduktionsweg (Shh, Ptch, Gli-1) und an der Bildung der MHB (Otx-2, Gbx-2, Fgf-8, Wnt-1, Lmx1b, Spry-2, En-1) beteiligt waren. Zusätzlich wurden Großhirnmarker (BF-1,) und Hinterhirnmarker (Krox-20) untersucht. Die Ergebnisse zeigten ein sehr uneinheitliches Muster. Einige Gene waren deutlich überexprimiert (Shh, Ptch, Gli-1), andere Genexpressionen fehlten völlig (Fgf-8, Krox-20, Gbx-2, Spry-2). Um die Expressionsmuster in $Ptch^{-/-}$ mit den Expressionsmustern der untersuchten Gene in adulten Medulloblastomen zu vergleichen, wurde eine Northern Blot Analyse mit den bereits verwendeten Sonden an adulten Medulloblastomen durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigten zum Teil bereits bekannte Ergebnisse.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus den Hybridisierungen, der Mikroskopie und der Northern Blot Analyse ein sehr verwirrendes Muster der Gehirnentwicklung und Anlage in $Ptch^{-/-}$ Mäusen. einigen Ergebnissen zufolge ist das Cerebellum komplett fehlend, andere Ergebnisse zeigen eine zumindest noch rudimentär vorhandene Anlage. Der Einfluss von Ptch auf die Entwicklung der MHB zeigt eine komplette Aufhebung der regulären Genexpressionsmuster entlang der dorsoventralen und der anteroposterioren Achse. Die könnte auf den direkten Effekt von Ptch zurückzuführen sein, könnte aber auch Gene beinhalten die downstream von Ptch liegen oder mit Ptch interagieren. Die Northern-Blot Analyse konnte die bisher gefundene Überexpression bestätigen. So kann man letztendlich sagen, dass ein kausaler Zusammenhang von Ptch und der Medulloblastomentstehung sehr wahrscheinlich ist, jedoch nicht bewiesen werden konnte, Ptch aber einen deutlichen, wenn auch komplexen Einfluss auf die anteroposteriore und dorsoventrale Musterung des Neuralrohres hat.

7. Summary

Ptch plays a fundamental role in the Shh signalling pathway and was discovered to be a tumour suppressor gene and developmental regulator. Ptch serves as a receptor for its ligand Shh and is responsible for the patterning of different organ systems during development. Within this thesis the impact of Ptch at the midbrain-hindbrain boundary MHB

gene expression pattern was investigated. This was carried out by whole-mount in-situ hybridization of 8,5dpc embryos of interbred heterozygous *Ptch* knock-out mice. The genes studied at the MHB involved some of the important regulators of MHB induction, maintenance and function, including *Otx-2*, *Gbx-2*, *Wnt-1* and *Fgf-8*. Because of the close association of *Ptch* with the formation of medulloblastomas in patients with basal cell nevus syndrome BCNS, its influence in gene expression in medulloblastomas was also studied.

As medulloblastomas arise from cerebellar tissue and *Ptch* is important for organ formation during development there might be an early developmental predisposition for medulloblastoma formation due to the influence of *Ptch* on formation of the cerebellum. The earliest possible involvement of *Ptch* in cerebellar development takes place during MHB formation, which is just cranial to the cerebellar primordium, as MHB function is crucial for correct cerebellar development. The aim of this thesis was to investigate whether there is a direct causality of *Ptch* dysfunction at MHB development and medulloblastoma tumour generation.

Investigations were carried out with a *Ptch*^{+/*neo67*} knock-out mouse model. To investigate the involvement and the effects of *Ptch* within the MHB formation embryos of interbred *Ptch*^{+/*neo67*} mice were harvested at 8,5dpc as this is the time of MHB formation.

Light and electron microscopy revealed a striking discovery: all *Ptch*^{-/-} homozygous mouse embryos exhibited a completely destroyed brain formation. The main feature of all homozygous embryos was the failure of neural tube closure and the failed completion of the “turning”. Hybridization studies were carried out with genes involved in the Shh-*Ptch* signalling pathway (*Shh*, *Ptch*, *Gli-1*), those involved in MHB formation (*Otx-2*, *Gbx-2*, *Fgf-8*, *Wnt-1*, *Lmx1b*, *Spry-2*, *En-1*) as well as forebrain (*BF-1*,) and hindbrain (*Krox-20*) marker genes. Results showed a quite heterogenous expression pattern. While some genes were highly overexpressed (*Shh*, *Ptch*, *Gli-1*) the expression of other genes was completely missing (*Fgf-8*, *Krox-20*, *Gbx-2*, *Spry-2*). To compare the gene expression in *Ptch*^{-/-} mice with the gene expression pattern in adult medulloblastomas northern blot analysis was carried out with probes that were developed and used during in-situ hybridization experiments. The results obtained with northern blot analysis confirmed overexpression of *Otx-2* in medulloblastomas.

The results obtained with hybridisation, light-/ electron microscopy and northern blot analysis show a very heterogeneous pattern of brain development in *Ptch*^{-/-} mice. Some results indicate aplasia of the cerebellum, while others show at least some kind of cerebellar tissue. Overall the impact of absence of *Ptch* at the MHB resulted in the complete dis-

ruption of gene expression patterns along the dorso-ventral and antero-posterior axis. This might either be the direct effect of Ptch or the result of an interaction of Ptch with other unknown signalling molecules, which interfere with the dorso-ventral and antero-posterior patterning at the MHB and brain formation. Examination of gene expression in medulloblastomas showed no new gene expression pattern but confirmed already known patterns. Overall a direct causality of Ptch dysfunction and medulloblastoma formation seems likely, but cannot be proved by this thesis. However, Ptch has a huge even though complex influence in correct dorso-ventral and antero-posterior gene expression pattern on the neural tube.

8. Literaturverzeichnis

- Acampora, D., Avantaggiato, V., Francesca, T., Briata, P., Corte, G., Visceral endoderm-restricted translation of Otx1 mediates recovery of Otx2 requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation, *Dev* 125, 5091-5104, 1998
- Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F., Simeone, A., Genetic control of brain morphogenesis through Otx dosage requirement, *Dev*, 124, 3639-3650, 1997
- Acampora, D., Gulisano, M., Broccoli, V., Simeone, A., Otx genes in brain morphogenesis. *Prog Neurobiol*, 64, 69-95, 2001
- Acampora, D., Mazan, S., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., Brulet, Ph., Forebrain and midbrain regions are deleted in Otx^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation, *Dev*, 121, 3279-3290, 1995
- Acampora, D., Simeone, A., Understanding the roles of Otx1 and Otx2 in the control of brain morphogenesis, *Trends Neurosci*, 22, 116-122, 1999
- Adams, K. A., Maida, J. M., Golden, J. A., Riddle, R. D., The transcription factor Lmx1b maintains Wnt1 expression within the isthmus organizer, *Dev*, 127, 1857-1867, 2000
- Aglyamova, G.V., Agarwala, S., Gene expression analysis of the hedgehog signaling cascade in the chick midbrain and spinal cord, *Dev Dyn*, 236, 5, 1363-73, 2007
- Agren, M., Kogerman, P., Kleman, M.I., Wessling, M., Toftgard, R., Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site, *Gene*, 330, 101-114, 2004
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., Hooper, J.E., The *Drosophila* smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal, *Cell*, 86, 221-231, 1996
- Alexandre, P., Wassef, M., The isthmus organizer links anteroposterior and dorsoventral patterning in the mid/hindbrain by generating roof plate structures, *Dev*, 130, 5331-5338, 2003
- Alexandre, P., Wassef, M., Does the isthmus organizer influence D/V patterning of the midbrain? *Brain Res Rev*, 49, 127-133, 2005
- Almendral, J.M., Sommer, D., Macdonald-Bravo, H., Burckhardt, J., Perera, J., Bravo, R., Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts, *Mol Cell Biol*, 8, 2140-2148 1988
- Altman, J., Bayer, S.A., *The Development of the Cerebellar System: In Relation to its Evolution, Structure, and Functions*. CRC Press, 1997

- Alvarez Otero, R., Sotelo, C., Alvarado-Mallart, R.M., Chick/quail chimeras with partial cerebellar grafts: an analysis of the origin and migration of cerebellar cells, *J Comp Neurol*, 333, 597–615, 1993
- Amlashi, S.F.A., Riffaud, L., Brassier, G., Moranti, X., Nevoid basal cell carcinoma syndrome: relation with desmoplastic medulloblastoma in infancy, *Cancer*, 98, 618-624, 2003
- Ang, S.-L., Jin, O., Rhinn, M., Daigle, N., Stevenson, L., Rossant, J., A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain, *Dev*, 122, 243-252, 1996
- Ang, S.-L., Conlon, R.A., Jin, O., Rossant, J., Positive and negative Signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants, *Dev*, 120, 2979-2989, 1994
- Araki, I., Nakamura, H., *Engrailed* defines the position of dorsal di-mesencephalic boundary by repressing diencephalic fate, *Dev*, 126, 5127-5135, 1999
- Aroca, P., Puelles, L., Postulated boundaries and differential fate in the developing rostral hindbrain, *Brain Res Rev*, 49, 179–190, 2005
- Avet-Loiseau, H., Venuat, A.M., Terrier-Lacombe, M.J., Lellouch-Tubiana, A., Zerah, M., Vassal, G., Comparative genomic hybridisation detects recurrent imbalances in central nervous system primitive neuroectodermal tumours in children, *Br J Cancer*, 79, 1843–1847, 1999
- Baker, J.C., Beddington, R.S., Harland, R.M., Wnt signaling in *Xenopus* embryos inhibits *bmp4* expression and activates neural development, *Genes Dev*, 13, 3149-3159, 1999
- Bale, S.J., Amos, C.I., Parry, D.M., Bale, A.E., The relationship between head circumference and height in normal adults and in the nevoid basal cell carcinoma syndrome and neurofibromatosis type 1, *Am J Med Genet*, 40, 206-210, 1991
- Bale, A.E., Yu, K.-p., The hedgehog pathway and basal cell carcinomas, *Hum Mol Gen*, 10, 757-762, 2001
- Bally-Cuif, L., Cholley, B., Wassef, M., Involvement of *wnt-1* in the formation of the mes/metencephalic boundary, *Mech Dev*, 53, 23-34, 1995
- Bally-Cuif, L., Wassef, M., Ectopic induction and reorganization of *Wnt-1* expression in quail/chick chimeras, *Dev*, 120, 3379-3394, 1994
- Bally-Cuif, L., Wassef, M., Determination events in the nervous system of the vertebrate embryo, *Curr Opin Genet Dev*, 5, 450-458, 1995

- Basilico, C., Moscatelli, D., The FGF family of growth factors and oncogenes, *Adv Cancer Res*, 59, 115-65, 1992
- Basler, K., Struhl, G., Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein, *Nature*, 368, 208-14, 1994
- Bayly RD, Ngo M, Aglyamova GV, Agarwala S. Regulation of ventral midbrain patterning by Hedgehog signaling, *Dev*, 134, 11, 2115-24, 2007
- Beckers, J., Clark, A., Wünsch, K., Hrabè de Angelis, M., Gossler, A., Expression of the mouse *Delta1* gene during organogenesis and fetal development, *Mech Dev*, 84, 165-168, 1999
- Beddington, R.S.P., Robertson, E.J., Anterior patterning in mouse, *Trends Genet*, 14, 277-284, 1998
- Beermann, F., Kaloulis, K., Hofmann, D., Murisier, F., Bucher, P., Trumpp, A., Identification of evolutionarily conserved regulatory elements in the mouse *Fgf8* locus, *Genesis*, 44, 1, 1-6, 2006
- Bettenhausen, B., Hrabè de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J. -L., Gossler, A., Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of *Dll1*, a murine gene closely related to *Drosophila* *Delta*, *Dev*, 121, 2407-2418, 1995
- Bitgood, M.J., McMahon, A.P., Hedgehog and *Bmp* genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo, *Dev Biol*, 172, 126-138, 1995
- Blaess S, Corrales JD, Joyner AL. Sonic hedgehog regulates *Gli* activator and repressor functions with spatial and temporal precision in the mid/hindbrain region. *Dev*, 133, 9, 1799-809, 2006
- Bodak, N., Queille, S., Avril, M.F., Bouadjar, B., Drougard, C., Sarasin, A., Daya-Grosjean, L., High levels of patched gene mutations in basal-cell carcinomas from patients with xeroderma pigmentosum, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5117-22, 1999
- Britto, J., Tannahill, D., Keynes, R., A critical role for sonic hedgehog signaling in the early expansion of the developing brain, *Nat Neurosci*, 5, 103-110, 2002
- Broccoli, V., Boncinelli, E., Wurst, W., The caudal limit of *Otx2* expression positions the isthmus organizer, *Nat*, 401, 164-168, 1999
- Brown, J.D., Moon, R.T., Wnt signaling: why is everything so negative? *Curr Opin Cell Biol*, 10, 182-187, 1998

- Buckles, G.R., Thorpe, C.J., Ramel, M.C., Lekven, A.C., Combinatorial Wnt control of zebrafish midbrain-hindbrain boundary formation, *Mech Dev*, 121, 5, 437-47, 2004
- Camus, A., Davidson, B.P., Billiards, S., Khoo, P.-L., Rivera-Perez, J.A., Wakamiya, M., Behringer, R.R., Tam, P.P.L., The morphogenetic role of midline mesendoderm and ectoderm in the development of the forebrain and the midbrain of the mouse embryo, *Dev*, 127, 1799-1813, 2000
- Canning, C.A., Lee, L., Irving, C., Mason, I., Jones, C.M., Sustained interactive Wnt and FGF signaling is required to maintain isthmic identity. *Dev Biol*, 305, 1, 276-86, 2007
- Capdevila, J., Pariente, F., Sampedro, J., Alonso, J.L., Guerrero, I., Subcellular localization of the segment polarity protein patched suggests an interaction with the wingless reception complex in *Drosophila* embryos, *Dev*, 120, 987-98, 1994
- Casci, T., Vinos, J., Freeman, M., sprouty, an intracellular inhibitor of Ras signalling, *Cell*, 99, 655-665, 1999
- Cayuso; J., Ulloa; F.; Cox; B.; Briscoe; J.; Martí; E.; The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity; *Dev*; 133; 3; 517-28; 2006
- Chambers, D., Mason, I., Expression of sprouty2 during early development of the chick embryo is coincident with known sites of FGF signalling, *Mech Dev*, 91, 361-364, 2000
- Chambers, D., Medhurst, A. D., Walsh, F. S., Price, J., Mason, I., Differential display of Genes expressed at the midbrain - hindbrain junction identifies sprouty2: an FGF8-inducible member of a family of intracellular FGF antagonists, *Mol Cell Neurosci*, 15, 22-35, 2000
- Chang, D.T., Lopez, A., von Kessler, D.P., Chiang, C., Simandl, B.K., Zhao, R., Seldin, M.F., Fallon, J.F., Beachy, P.A., Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene, *Development*, 120, 3339-53, 1994
- Chapman, G., Rathjen, P.D., Sequence and evolutionary conservation of the murine Gbx-2 homeobox gene, *FEBS Letters*, 364, 289-292, 1995
- Chari, N.S., McDonnell, T.J., The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia, *Adv Anat Pathol*, 14, 5, 344-52, 2007

- Chavrier, P., Lemaire, P., Revelant, O., Bravo, R., Charnay, P., Characterization of a mouse multigene family that encodes zinc finger structures, *Mol Cell Biol*, 8, 1319-1326, 1988
- Chen, Y., Struhl, G., Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog, *Cell*, 87, 553-563, 1996
- Chen, H., Lun, Y., Ovchinnikov, D., Kokubo, H., Oberg, K.C., Pepicelli, C.V., Gan, L., Lee, B., Johnson, R.L., Limb and kidney defects in *Lmx1b* mutant mice suggest an involvement of *LMX1B* in human nail patella syndrome, *Nat Genet*, 19, 51-55, 1998
- Chi, C.L., Martinez, S., Wurst, W., Martin, G.R., The isthmic organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum, *Dev*, 130, 2633-2644, 2003
- Chiang, C., Young, K.E., Beachy, P.A., Control of *Drosophila* tracheal branching by the novel homeodomain gene unplugged, a regulatory target for genes of the bithorax complex, *Dev*, 121, 3901-3912, 1995
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A., Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function, *Nature*, 383, 407-13, 1996
- Chizhikov, V.V., Millen, K.J., Control of roof plate development and signaling by *Lmx1b* in the caudal vertebrate CNS, *J Neurosci*, 24, 5694-5703, 2004
- Chizhikov, V.V., Lindgren, A.G., Currie, D.S., Rose, M.F., Monuki, E.S., Millen, K.J., The roof plate regulates cerebellar cell-type specification and proliferation, *Dev*, 133, 15, 2793-804, 2006
- Cohen Jr., M.M., Nevoid basal cell carcinoma syndrome: molecular biology and new Hypotheses, *Int J Maxillofac Surg*, 28, 216-223, 1999
- Cohen Jr., M.M., The Hedgehog signalling network, *Am J Med Gen*, 123A, 5-28, 2003
- Corcoran, R.B., Scott, M.P., A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome, *J Neurooncol*, 53, 3, 307-18, 2001
- Crossley, P.H., Martin, G.R., The mouse *Fgf8* gene encodes a family of polypeptides and is expressed in regions that direct outgrowth and patterning in the developing embryo, *Dev*, 121, 439-451, 1995
- Crossley, P.H., Salvador, M., Martin, G.R., Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo, *Nat*, 380, 66-68, 1996
- Dahmane, N., Ruiz I Altaba, A., Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum, *Dev*, 126, 3089-3100, 1999

- Dahmane, N., Sánchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weimer, H., Ruiz I Altaba, A., The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis, *Dev*, 128, 5201-5212, 2001
- Dale, T.C., Signal transduction by the Wnt family of ligands, *Biochem J*, 329, 209-223, 1998
- Danielian, P.S., McMahon, A.P., Engrailed-1 as a target of the Wnt-1 signalling pathway in vertebrate midbrain development, *Nature*, 383, 332-334, 1996
- Davidson, D., Graham, E., Sime, C., Hill, R., A gene with sequence similarity to *Drosophila engrailed* is expressed during the development of the neural tube and vertebrae in the mouse, *Dev*, 104, 305-316, 1988
- Davis, C.A., Joyner, A.L., Expression patterns of the homeobox containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene int-1 diverge during mouse development, *Genes Dev*, 2, 1736-1744, 1988
- Davis, C.A., Noble-Topham, S.E., Rossant, J., Joyner, A.L., Expression of the homeobox containing gene en-2 delineates a specific region of the developing mouse brain, *Genes Dev*, 2, 361-371, 1988
- de la Pompa, J.L., Wakeham, A., Correia, K.M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R.J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T.W., Rossant, J., Conlon, R.A., Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis, *Dev*, 124, 1139-1148, 1997
- de Maximy, A. A., Nakatake, Y., Moncada, S., Itoh, N., Thiery, J.P., Bellusci, S., Cloning and expression pattern of a mouse homologue of *Drosophila sprouty* in the mouse embryo, *Mech Dev*, 81, 213-216, 1999
- Ding, Y.Q., Marklund, U., Yuan, W., Yin, J., Wegman, L., Ericson, J., Deneris, E., Johnson, R.L., Chen, Z.F., *Lmx1b* is essential for the development of serotonergic neurons, *Nat Neurosci*, 6, 933-938, 2003
- Dou, C.-L., Li, S., Lai, E., Dual role of brain factor 1 in regulating growth and patterning of the cerebral hemispheres, *Cer Cor*, 9, 543-550, 1999
- Dyer, M.A., Mouse models of childhood cancer of the nervous system, *J Clin Pathol*, 57, 561-576, 2004
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Sonic hedgehog, a member of a family of putative secreted signalling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity, *Cell*, 75, 1417-1430, 1993

- Echevarria, D., Belo, J.A., Martinez, S., Modulation of Fgf8 activity during vertebrate brain development, *Brain Res Rev*, 49, 2, 150-7, 2005
- Ellison, D.W., Clifford, S.C., Gajjar, A., Gilbertson, R.J., What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma, *Europ J Paed Neurol*, 7, 53-66, 2003
- Erickson, T., Scholpp, S., Brand, M., Moens, C.B., Waskiewicz, A.J., Pbx proteins cooperate with Engrailed to pattern the midbrain-hindbrain and diencephalic-mesencephalic boundaries, *Dev Biol*, 301, 2, 504-17, 2007
- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T.M., Edlund, T., Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube, *Cell*, 81, 747-756, 1995
- Evans, G., Burnell, L., Campbell, R., Gattamaneni, H.R., Birch, J., Congenital abnormalities and genetic syndromes in 173 cases of medulloblastoma, *Med Pediatr Oncol*, 21, 433-434, 1993
- Evans, D.G., Farndon, P.A., Burnell, L.D., Gattamaneni, H.R., Birch, J.M., The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma, *Br J Cancer*, 64, 959-961, 1991
- Fan, C.M., Porter, J.A., Chiang C., Chang, D.T., Beachy, P.A., Tessier-Lavigne, M., Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: Direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signalling pathway, *Cell*, 81, 457-465, 1995
- Farioli-Vecchioli, S., Tanori, M., Micheli, L., Mancuso, M., Leonardi, L., Saran, A., Ciotti, M.T., Ferretti, E., Gulino, A., Pazzaglia, S., Tirone, F., Inhibition of medulloblastoma tumorigenesis by the antiproliferative and pro-differentiative gene PC3 *FASEB J*, 21, 9, 2215-25, 2007
- Farndon, P.A., Del Mastro, R.G., Evans, D.G., Kilpatrick, M.W., Location of gene for Gorlin syndrome, *Lancet*, 339, 581-582, 1992
- Finkelstein, R., Boncinelli, E., From fly head to mammalian forebrain: the story of odt and Otx, *Trends Genet*, 10, 310-5, 1994
- Fogarty, M.P., Emmenegger, B.A., Grasdeder, L.L., Oliver, T.G., Wechsler-Reya, R.J., Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 8, 2973-8, 2007
- Fujii Y, Hongo T, Hayashi Y. Chromosomal analysis of brain tumours in childhood, *Genes Chrom Cancer*, 11, 205-215, 1994
- Fults, D.W., Modeling medulloblastoma with genetically engineered mice, *Neurosurg Focus*, 19, 5, E7, 2007

- Gailani, M.R., Bale, S.J., Leffell, D.J., Peck, G.L., Poliak, S., Drum, M.A., Pastakia, B., McBride, O.W., Kase, R., et al., Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9, *Cell*, 69, 111-117, 1992
- Gailani, M.R., Stahle-Backdahl, M., Leffell, D.J., Glynn, M., Zaphiropoulos, P.G., Pressman, C., Unden, A.B., Dean, M., Brash, D.E., Bale, A.E., Toftgard, R., The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas, *Nat Genet*, 14, 78-81, 1996
- Garda, A.-L., Echevarria, D., Martinez, S., Neuroepithelial co-expression of Gbx2 and Otx2 precedes Fgf8 expression in the isthmus organizer, *Mech Dev*, 101, 111-118, 2001
- Ghali, L., Wong, S.T., Green, J., Tidman, N., Quinn, A.G., Gli1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulation of mesenchymal cells in normal human skin, *J Invest Dermatol*, 113, 595-9, 1999
- Giangaspero F, Bigner SH, Kleihues P, Pietsch T, Trojanowski J., Medulloblastoma, In Kleihues P, Cavenee WK, eds. *Pathology and Genetics: Tumours of the Nervous System*, Lyon, IARC, 129–137, 2000
- Gilbert, S.F., *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc., 6th Edition, 2000
- Gilbertson, R., Pediatric embryonic brain tumours: biological and clinical relevance of molecular genetic abnormalities, *Europ J Canc*, 38, 675-685, 2002
- Goldstein, A.M., Stewart, C., Bale, A.E., Bale, S.J., Dean, M., Localisation of the gene for nevoid basal cell carcinoma syndrome, *Am J Hum Genet*, 54, 765–773, 1994
- Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A., Scott, M.P., Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by hedgehog, *Gen Dev*, 10, 301-312, 1996
- Goodrich, L.V., Jung, D., Higgins, K.M., Scott, M.P., Overexpression of ptc1 Inhibits Induction of Shh Target Genes and Prevents Normal Patterning in the Neural Tube, *Dev Biol*, 211, 323-334, 1999
- Goodrich, L.V., Milenkovic, L., Higgins, K.M., Scott, M.P., Altered neural cell fates and Medulloblastoma in mouse patched mutants, *Sci*, 277, 1109-1113, 1997
- Goodrich, L.V., Scott, M.P., Hedgehog and patched in neural Development and disease, *Neuron*, 21, 1243-1257, 1998
- Gorlin, R.J., Nevoid basal cell carcinoma syndrome, *Dermatol Clin*, 13, 113-125, 1995
- Gorlin, R.J., Goltz, R.W., Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jawcysts and bifid rib. A syndrome, *N Engl J Med*, 262, 908-912, 1960

- Grandbarbe, L., Bouissac, J., Rand, M., Hrabè de Angelis, M., Artavanis-Tsakonas, S., Mohier, E., Delta-Notch signaling controls generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process, *Dev*, 130, 1391-1402, 2003
- Gunhaga, L., Thomas, M.J., Edlund, T., Sonic hedgehog signaling at gastrula stages specifies ventral telencephalic cells in the chick embryo, *Dev*, 127, 3283-3293, 2000
- Guo, C., Qiu, H.Y., Huang, Y., Chen, H., Yang, R.Q., Chen, S.D., Johnson, R.L., Chen, Z.F., Ding, Y.Q., Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1 expression in the isthmical organizer during tectum and cerebellum development in mice, *Dev*, 134, 2, 317-25, 2007
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., Krasnow, M.A., sprouty encodes a novel antagonist of FGF signalling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways, *Cell*, 92, 253-263, 1998
- Hahn, H., Christiansen, J., Wicking, C., Zaphiropoulos, P.G., Chidambaram, A., Gerrard, B., Vorechovsky, I., Bale, A.E., Toftgard, R., Dean, M., Wainwright, B., A Mammalian patched Homolog Is Expressed in Target Tissues of sonic hedgehog and Maps to a Region Associated with Developmental Abnormalities, *J Biol Chem*, 271, 12125-12128, 1996
- Hahn, H., Nitzki, F., Schorban, T., Hemmerlein, B., Threadgill, D., Rosemann, M., Genetic mapping of a Ptc1-associated rhabdomyosarcoma susceptibility locus on mouse chromosome 2, *Genomics*, 84, 853-858, 2004
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulos, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A.B., Gillies, S., Negus, K., Smyth, I., Pressman, C., Leffel, D.J., Gerrard, B., Goldstein, A.M., Dean, M., Toftgard, R., Chenevix-Trench, G., Wainwright, B., Bale, A.E., Mutations of the human homologue of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome, *Cell*, 85, 841-851, 1996
- Hahn, H., Wojnowski, L., Specht, K., Kappler, R., Calzada-Wack, J., Potter, D., Zimmer, A., Müller, U., Samson, E., Quintanilla-Martinez, L., Zimmer, A., Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma, *J Biol Chem*, 275, 28341-28344, 2000
- Hallonet, M., Alvarado-Mallart, R.M., The chick/quail chimeric system: a model for early cerebellar development, *Perspect. Dev Neurobiol*, 5, 17-31, 1997
- Hallonet, M.E.R., Teillet, M. -A., Le Douarin, N.M., A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system, *Dev*, 108, 19-31, 1990

- Hammerschmidt, M., Bitgood, M.J., McMahon, A.P., Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo, *Genes Dev*, 10, 647-658, 1996
- Hammerschmidt, M., Brook, A., McMahon, A.P., The world according to hedgehog, *Trends Genet*, 13, 14-21, 1997
- Hanashima, C., Shen, L., Li, S., Lai, E., Brain factor-1 Controls the Proliferation and differentiation of Neocortical Progenitor Cells through Independent mechanisms, *J Neurosci*, 22, 6516-6536, 2002
- Hanks, M., Wurst, W., Anson-Cartwright, L., Auerbach, A.B., Joyner, A.L., Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2, *Science*, 269, 679-682, 1995
- Heikinheimo, M., Lawshe, A., Shakleford, G.M., Wilson, D.B., MacArthur, C.A., Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system, *Mech Dev*, 48, 129-138, 1994
- Heitzler, P., Simpson, P., Altered epidermal growth factor-like sequences provide evidence for a role of Notch as a receptor in cell fate decisions, *Dev*, 117, 1113-1123, 1993
- Helmbacher, F., Pujades, C., Desmarquet, C., Frain, M., Rijli, F.M., Chambon, P., Charney, P., Hoxa1 and Krox-20 synergize to control the development of rhombomere 3, *Dev*, 125, 4739-4748, 1998
- Hidalgo-Sánchez, M., Alvarado-Mallart, R.-M., Temporal Sequence of Gene Expression Leading Caudal Prosencephalon to Develop a Midbrain/Hindbrain Phenotype, *Dev Dyn*, 223, 141-147, 2002
- Hidalgo-Sánchez, M., Millet, S., Bloch-Gallego, E., Alvarado-Mallart, R.M., Specification of the meso-isthmo-cerebellar region: the Otx2/Gbx2 boundary, *Brain Res Rev*, 49, 2, 134-49, 2005
- Hidalgo-Sánchez, M., Millet, S., Simeone, A., Alvarado-Mallart, R.-M., Comparative analysis of Otx2, Gbx2, Pax2, Fgf8 and Wnt1 gene expressions during the formation of the chick midbrain/hindbrain domain, *Mech Dev*, 81, 175-178, 1999a
- Hidalgo-Sánchez, M., Simeone, A., Alvarado-Mallart, R.-M., Fgf8 and Gbx2 induction concomitant with Otx2 repression is correlated with midbrain-hindbrain fate of caudal Prosencephalon, *Dev*, 126, 3191-3203, 1999b
- Ho, K.S., Scott, P.W., Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms, *Curr Opin Neurobiol*, 12, 57-63, 2002
- Hooper, J.E., Scott, M.P., The Drosophila patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning, *Cell*, 59, 751-65, 1989

- Hooper, J.E., Scott, M.P., The molecular genetic basis of positional information in insect segments, *Results Probl Cell Differ*,(18)1-48, 1992
- Hooper, J.E., Scott, M.P., Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 306–317, 2005
- Hrabè de Angelis, M., McIntyre II, J., Gossler, A., Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1, *Nature*, 386, 717-721, 1997
- Huangfu, D., Anderson, K.V., Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates, *Dev*, 133, 3–14, 2006
- Hui, C.-C., Slusarski, D., Platt, K.A., Holmgren, R., Joyner, A.L., Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2* and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development, *Dev Biol*, 162, 402-413, 1994
- Hynes, M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D., Tessier-Lavigne, M., Beachy, P.A., Rosenthal, A., Induction of midbrain dopaminergic neurons by sonic hedgehog, *Neuron*, 15, 35-44, 1995
- Hynes, M., Stone, D.M., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Goddard, A., Gurney, A., Rosenthal, A., Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene *Gli-1*, *Neuron*, 19, 15-26, 1997
- Ingham, P.W., Localized hedgehog activity controls spatial limits of wingless transcription in the *Drosophila* embryo, *Nature*, 366, 560-562, 1993
- Ingham, P.W., Transducing Hedgehog: the story so far, *EMBO J*, 17, 3505–3511, 1998
- Ingham, P.W., Nystedt, S., Nakano, Y., Brown, W., Stark, D., van den Heuvel, M., Taylor, A.M., Patched represses the Hedgehog signalling pathway by promoting modification of the Smoothed protein, *Curr Biol*, 10, 1315-1318, 2000
- Ingham, P.W., Taylor, A.M., Nakano, Y., Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling, *Nature*, 353, 184-187, 1991
- Irving, C., Mason, I., Regeneration of isthmus tissue is the result of a specific and direct interaction between rhombomere 1 and midbrain, *Dev*, 126, 3981-3989, 1999
- Irving, C., Mason, I., Signalling from FGF8 from the isthmus patterns anterior hindbrain and establishes the anterior limit of hox gene expression, *Dev*, 127, 177-186, 2000
- Jászai, J., Reifers, F., Picker, A., Langenberg, T., Brand, M., Isthmus-to-midbrain transformation in the absence of midbrain-hindbrain organizer activity, *Dev*, 130, 6611-6623, 2003

- 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., Scott, M.P., Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome, *Science*, 272, 1668-1671, 1996
- Johnson, R.L., Scott, M.P., Control of cell growth and fate by patched genes, *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 62, 555-562, 1997
- Joyner, A.L., Engrailed Wnt and Pax genes regulate midbrain-Hindbrain development, *Trends Genet*, 12, 15-20, 1996
- Joyner, A.L., Liu, A., Millet, S., Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid-hindbrain organizer, *Curr Opin Cell Biol*, 12, 736-741, 2000
- Joyner, A.L., Kornberg, T., Coleman, K.G., Cox, D., Martin, G.R., Expression during embryogenesis of a mouse gene with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene, *Cell*, 43, 29-37, 1985
- Joyner, A.L., Martin, G.R., En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the *Drosophila* engrailed gene: expression during embryogenesis, *Genes Dev*, 1, 29-38, 1987
- Kalderon, D., The mechanism of hedgehog signal transduction, *Biochem Soc Trans*, 33, Pt 6, 1509-12, 2005
- Kenney, A.M., Rowitch, D.H., Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors, *Mol Cell Biol*, 20, 9055-9067, 2000
- Khalili, K., Krynska, B., Del Valle, L., Katsetos, C.D., Croul, S., Medulloblastomas and the human neurotropic polyomavirus JC virus, *Lancet*, 353, 1152-1153, 1999
- Kikuta, H., Kanai, M., Ito, Y., Yamasu, K., gbx2 Homeobox gene is required for the maintenance of the isthmus region in the zebrafish embryonic brain, *Dev Dyn*, 228, 3, 433-50, 2003
- Kim, J.Y.H., Nelson, A.L., Algon, S.A., Graves, O., Sturla, L.M., Goumnerova, L.C., Rowitch, D.H., Segal, R.A., Pomeroy, S.L., Medulloblastoma tumorigenesis diverges from cerebellar granule cell differentiation in patched heterozygous mice, *Dev Biol*, 263, 50-66, 2003
- Kinzler, K.W., Bigner, S.H., Bigner, D., Trent, J., Law, M., O'Brien, S., Wong, A., Vogelstein, B., Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma, *Science*, 236, 70-73, 1987
- Kinzler, K.W., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Vogelstein, B., The GLI gene is a member of the Krüppel family of zinc finger proteins, *Nature*, 332, 371-374, 1988

- Kornberg, T., Compartments in the abdomen of *Drosophila* and the role of the engrailed locus. *Dev Biol*, 86, 363-372, 1981
- Langenberg, T, Brand, M., Lineage restriction maintains a stable organizer cell population at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary, *Dev*, 132, 14, 3209-16, 2005
- Lai, E., Clark, K., Burley, S., Darnell, J., Hepatocyte nuclear factor-3/fork head or "winged helix" proteins: a family of transcription factors of diverse biologic function, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 10421-10423, 1993
- Lee, K.J., Jessell, T.M., The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system, *Annu Rev Neurosci*, 22, 261-294, 1999
- Lee, K.J., Mendelsohn, M., Jessell, T.M., Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord, *Genes Dev*, 12, 3394-3407, 1998
- Lee, S.M.K., Danielian, P.S., Fritsch, B., McMahon, A.P., Evidence that FGF-8 signalling from the midbrain-hindbrain junction regulates growth and polarity in the developing brain, *Dev*, 124, 959-969, 1997
- Lee, Y., Miller, H.L., Russell, H.R., Boyd, K., Curran, T., McKinnon, P.J., Patched2 modulates tumorigenesis in patched1 heterozygous mice, *Cancer Res*, 66, 14, 6964-71, 2006
- Li, J.Y., Lao, Z., Joyner, A.L., Changing requirements for Gbx2 in development of the cerebellum and maintenance of the mid/hindbrain organizer, *Neuron*, 36, 31-43, 2002
- Li, J.Y.H., Joyner, A.L., Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression, *Dev*, 128, 4979-4991, 2001
- Liem, K.F. Jr., Tremml, G., Roelink, H., Jessell, T.M., Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm, *Cell*, 82, 969-979, 1995
- Liu, A., Joyner, A.L., En and Gbx2 play essential roles downstream of Fgf8 in patterning the mouse mid-/hindbrain, *Dev*, 128, 181-191, 2001
- Liu, A., Losos, K., Joyner, A.L., FGF8 can activate Gbx2 and transform regions of the rostral mouse Brain into hindbrain fate, *Dev*, 126, 4827-4838, 1999
- Lorenzi, M.V., Long, J.E., Miki, T., Aaronson, S.A., Expression cloning, developmental expression and chromosomal localization of fibroblast growth factor-8, *Onc*, 10, 2051-2055, 1995

- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P., The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, *Acta Neuropathol*, 114, 97–109, 2007
- Lumsden, A., Krumlauf, R., Patterning the vertebrate neuraxis, *Science*, 274, 1109-1115, 1996
- Mallamaci, A., Di Blas, E., Briata, P., Boncinelli, E., Corte, G., OTX2 homeoprotein in the developing central nervous system and migratory cells of the olfactory area, *Mech Dev*, 58, 165-178, 1996
- Marigo, V., Davey, R.A., Zuo, Y., Cunningham, J.M., Tabin, C.J., Biochemical evidence that patched is the hedgehog receptor, *Nature*, 384, 176-179, 1996a
- Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A., Tabin, C.J., Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development, *Dev Biol*, 180, 273-283, 1996b
- Marigo, V., Tabin, C.J., Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 9346-9351, 1996c
- Marin, F., Puellas, L., Patterning of the Embryonic Avian Midbrain after Experimental Inversions: A Polarizing Activity from the Isthmus, *Dev Biol*, 163, 19-37, 1994
- Martinez, S., Alvarado-Mallart, R.-M., Transplanted mesencephalic quail cells colonize selectively all primary visual nuclei of chick diencephalon: a study using heterotopic transplants, *Dev Brain Res*, 47, 263–274, 1989
- Martinez, S., Crossley, P.H., Cobos, I., Rubenstein, J.L.R., Martin, R., FGF8 induces formation of an ectopic isthmic organizer and isthmocerebellar development via a repressive effect on Otx2 expression, *Dev*, 126, 1189-1200, 1999
- Martinez, S., Marin, F., Nieto, M.A., Puellas, L., Induction of ectopic engrailed expression and fate change in avian rhombomeres: intersegmental boundaries as barriers, *Mech Dev*, 51, 289-303, 1995
- Martinez, S., Wassef, M., Alvarado-Mallart, R.-M., Induction of a mesencephalic phenotype in the 2 day-old chick prosencephalon is preceded by the early expression of the homeobox gene *en*, *Neuron*, 6, 971-981, 1991
- Martinez-Barbera, J.P., Signore, M., Boyd, P.P., Puellas, E., Acampora, D., Gogoi, R., Schubert, F., Lumsden, A., Simeone, A., Regionalisation of anterior neuroectoderm and its competence in responding to forebrain and midbrain inducing activities depend on mutual antagonism between OTX2 and GBX2, *Dev*, 128, 4789-4800, 2001

- Mason, I., Chambers, D., Shamim, H., Walshe, J., Irving, C., Regulation and function of FGF-8 in patterning of midbrain and anterior hindbrain, *Biochem Cell Biol*, 78, 577-584, 2000
- Matsunaga, E., Katahira, T., Nakamura, H., Role of *Lmx1b* and *Wnt1* in mesencephalon and metencephalon development, *Dev*, 129, 5269-5277, 2002
- Matsuo, I., Kuratani, S., Kimura, C., Takeda, N., Aizawa, S., Mouse *Otx2* functions in formation and patterning of rostral head, *Genes Dev*, 9, 2646-2658, 1995
- McMahon, A.P., Bradley, A., The *wnt-1* (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain, *Cell*, 62, 1073-85, 1990
- McMahon, A.P., Joyner, A.L., Bradley, A., McMahon, J.A., The midbrain-hindbrain phenotype of *Wnt-1*/*Wnt-1*- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum, *Cell*, 69, 581-595, 1992
- Meinhardt, H., Cell determination boundaries as organizing regions for secondary embryonic fields, *Dev Biol*, 96, 375-385, 1983
- Miale, I.L., and Sidman, R.L., An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp. Neurol*, 4, 277-296, 1961
- Michiels, E.M., Weiss, M.M., Hoovers, J.M., Baak, J.P., Voute, P.A., Baas, F., Hermsen, M.A., Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization, *J Pediatr Hematol Oncol*, 24, 205-210, 2002
- Michiels, E.M.C., Oussoren, E., van Groeningen, M., Pauws, E., Bossuyt, P.M.M., Voute, P.A., Baas, F., Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain, *Phys Gen*, 1, 83-91, 1999
- Millen, K.J., Millonig, J. H., Wingate, R. J. T., Alder, J., Hatten, M. E., Neurogenetics of the cerebellar system, *J Child Neurol*, 14, 574-582, 1999
- Millet, S., Bloch-Gallego, E., Simeone, A., Alvarado-Mallart, R.-M., The caudal limit of *Otx2* gene expression as a marker of the midbrain/hindbrain boundary: a study using in situ hybridisation and chick/quail homotopic grafts, *Dev*, 122, 3785-3797, 1996
- Millet, S., Campbell, K., Epstein, D.J., Losos, K., Harris, E., Joyner, A.L., A role for *Gbx2* in repression of *Otx2* and positioning in the mid/hindbrain organizer, *Nat*, 401, 161-167, 1999
- Ming, J.E., Kaupas, M.E., Roessler, E., Brunner, H.G., Golabi, M., Tekin, M., Stratton, R.F., Sujansky, E., Bale, S.J., Muenke, M., Mutations in *PATCHED-1*, the receptor for *SONIC HEDGEHOG*, are associated with holoprosenzephalo, *Hum Genet*, 110, 297-301, 2002

- Minowada, G., Jarvis, L.A., Candace, L.C., Neubüser, A., Sun, X., Hacohen, N., Krasnow, M.A., Martin, G.R., Vertebrate Sprouty genes are induced by FGF signalling and can cause chondrodysplasia when overexpressed, *Dev*, 126, 4465-4475, 1999
- Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, K., Hui, C.C., Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic hedgehog, *Nat Genet*, 18, 104-106, 1998
- Nakamura, H., Watanabe, Y., Isthmus organizer and regionalization of the mesencephalon and metencephalon, *Int J Dev Biol*, 49, 2-3, 231-5, 2005
- Nakano, Y., Guerrero, I., Hidalgo, A., Taylor, A., Whittle, J.R., Ingham, P.W., A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene patched, *Nature*, 341, 508-513, 1989
- Nicholson, J.C., Ross, F.M., Kohler, J., Ellison, D.W., Comparative genomic hybridisation and histological variation in primitive neuroectodermal tumours, *Br J Cancer*, 80, 1322-1331, 1999
- Niehrs, C., Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer, *Trends Genet*, 15, 314-319, 1999
- Nonchev, S., Maconochie, M., Vesque, C., Aparicio, S., Ariza-McNaughton, L., Manzanares, M., Maruthainar, K., Kuroiwa, A., Brenner, S., Charnay, P., Krumlauf, R., The conserved role of Krox-20 in directing Hox gene expression during vertebrate hindbrain segmentation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9339-9345, 1996
- Nusse, R., WNT targets. Repression and activation, *Trends Genet*, 15, 1-3, 1999
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E., Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*, *Nature*, 287, 795-801, 1980
- O'Hara, F.P., Beck, E., Barr, L.K., Wong, L.L., Kessler, D.S., Riddle, R.D., Zebrafish Lmx1b.1 and Lmx1b.2 are required for maintenance of the isthmus organizer, *Dev*, 132, 14, 3163-73, 2005
- Ohuchi, H., Yoshioka, H., Tanaka, A., Kawakami, Y., Nohno, T., Noji, S., Involvement of androgen-induced growth factor (FGF-8) gene in mouse embryogenesis and morphogenesis, *Biochem Biophys Res Commun*, 204, 882-888, 1994
- Olander, S., Nordström, U., Patthey, C., Edlund, T., Convergent Wnt and FGF signaling at the gastrula stage induce the formation of the isthmus organizer, *Mech Dev*, 123, 2, 166-76, 2006
- Oliver, T.G., Read, T.A., Kessler, J.D., Mehmeti, A., Wells, J.F., Huynh, T.T., Lin, S.M., Wechsler-Reya, R.J., Loss of patched and disruption of granule cell development in a pre-neoplastic stage of medulloblastoma. *Dev*, 132, 10, 2425-39, 2005

- Oro, A.E., Higgins, K.M., Hu, Z., Bonifas, J.M., Epstein, E.H., Scott, M.P., Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog, *Science*, 276, 817–821, 1997
- Panhuysen, M., Vogt-Weisenhorn, D.M., Blanquet, V., Brodski, C., Heinzmann, U., Beisker, W., Wurst, W., Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region, *Mol Cell Neurosci*, 26, 101-111, 2004
- Parr, B.A., Shea, M.J., Vassileva, G., McMahon, A.P., Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds, *Dev*, 119, 247-261, 1993
- Partanen, J., FGF signalling pathways in development of the midbrain and anterior hindbrain, *J Neurochem*, 101, 5, 1185-93, 2007
- Patapoutian, A., Reichardt, L.F., Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol*, 10, 392-399, 2000
- Patten, I., Placzek, M., The Role of Sonic hedgehog in neural tube patterning, *Cell Mol Life Sci*, 57, 1695-1708, 2000
- Paulino, A.C., Current multimodality management of medulloblastoma, *Curr Probl Cancer*, 26, 317-56, 2002
- Pazzaglia, S., Ptc1 heterozygous knockout mice as a model of multi-organ tumorigenesis *Canc Lett*, 234, 124–134, 2006
- Pazzaglia, S., Tanori, M., Mancuso, M., Gessi, M., Pasquali, E., Leonardi, S., Oliva, M.A., Rebessi, S., Di Majo, V., Covelli, V., Giangaspero, F., Saran, A., Two-hit model for progression of medulloblastoma preneoplasia in Patched heterozygous mice. *Oncogene*, 25, 40, 5575-80, 2006
- Pietsch, T., Waha, A., Koch, A., Kraus, J., Albrecht, S., Tonn, J., Sorensen, N., Berthold, F., Henk, B., Schmandt, N., Wolf, H.K., von Deimling, A., Wainwright, B., Chenevix-Trench, G., Wiestler, O.D., Wicking, C., Medulloblastomas of the desmoplastic variant carry mutations of the human homologue of Drosophila patched, *Cancer Res*, 67, 2085-2088, 1997
- Pomeroy, S.L., Sturla, L.-M., Molecular biology of medulloblastoma therapy, *Pediatr Neurosurg*, 39, 299-304, 2003
- Pomeroy, S.L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L.M., Angelo, M., McLaughlin, M.E., Kim, J.Y., Goumnerova, L.C., Black, P.M., Lau, C., Allen, J.C., Zagzag, D., Olson, J.M., Curran, T., Wetmore, C., Biegel, J.A., Poggio, T., Mukherjee, S., Rifkin, R., Califano, A., Stolovitzky, G., Louis, D.N., Mesirov, J.P., Lander, E.S., Golub, T.R., Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression, *Nature*, 415, 436-442, 2002

- Prakash, N, Wurst, W., Specification of midbrain territory, *Cell Tissue Res*, 318, 5-14, 2004
- Przemeck, G.K.H., Heinzmann, H., Beckers, J., Hrabè de Angelis, M., Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos, *Dev*, 130, 3-13, 2003
- Puelles, E., Acampora, D., Lacroix, E., Signore, M., Annino, A., Tuorto, F., Filosa, S., Corte, G., Wurst, W., Ang, S.L., Simeone, A., Otx dose-dependent integrated control of antero-posterior and dorso-ventral patterning of midbrain, *Nat Neurosci*, 6, 453-460, 2003
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S.L., Wurst, W., Simeone, A., Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain, *Dev*, 131, 2037-2048, 2004
- Raffel, C., Jenkins, R.B., Frederick, L., Hebrink, D., Alderete, B., Fults, D.W., James, C.D., Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations, *Cancer Res*, 57, 842-845, 1997
- Raible, F., Brand, M., Divide et impera- the midbrain-hindbrain boundary and its organizer, *Trends Neurosci*, 27, 12, 727-734, 2004
- Rearson, D.A., Michalkiewicz, E., Boyett, J.M., Sublett, J.E., Entrekin, R.E., Ragsdale, S.T., Valentine, M.B., Behm, F.G., Li, H., Heideman, R.L., Kun, L.E., Shapiro, D.N., Look, A.T., Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridisation, *Cancer Res*, 57, 4042-4047, 1997
- Reifenberger, J., Wolter, M., Weber, R.G., Megahed, M., Ruzicka, T., Lichter, P., Reifenberger, G., Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system, *Cancer Res*, 58, 1798-1803, 1998
- Reifers, F., Bohli H., Walsh, E.C., Crossley, P.H., Stainier, D.Y., Brand, M., Fgf8 is mutated in zebrafish acerebellar mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis, *Dev*, 125, 2381-2395, 1998
- Reis, A., Kuster, W., Linss, G., Gebel, E., Hamm, H., Fuhrmann, W., Wolff, G., Groth, W., Gustafson, G., Kuklik, M., et al., Localisation of gene for the naevoid basal-cell carcinoma syndrome, *Lancet*, 339, 617, 1992
- Rhinn, M., Brand, M., The midbrain-hindbrain boundary organizer, *Curr Opin Neurobiol*, 11, 34-42, 2001

- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R.R., Le Meur, M., Ang, S.-L., Sequential roles for *Otx2* in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and mid-brain induction and specification, *Dev*, 125, 845-856, 1998
- Riddle, R.D., Ensini, M., Nelson, C., Tsuchida, T., Jessell, T.M., Tabin, C., Induction of the LIM homeobox gene *Lmx1* by *WNT7a* establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb, *Cell*, 83, 631-640, 1995
- Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., et al., Floor plate and motor neuron induction by *vhh-1*, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord, *Cell*, 76, 761-775, 1994
- Rowan, A.M., Stern, C.D., Storey, K.G., Axial mesendoderm refines rostrocaudal pattern in the chick nervous system, *Dev*, 126, 2921-2934, 1999
- Ruiz I Altaba, A., Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer, *Trends Genet*, 15, 418-425, 1999
- Ruiz I Altaba, A., Nguyễn, V., Palma V., The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code, *Curr Opin Gen Dev*, 13, 513-521, 2003
- Ruiz i Altaba, A., Palma, V., Dahmane, N., Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain, *Nat Rev Neurosci*, 3, 1, 24-33, 2002
- Ruiz I Altaba, A., Stecca, B., Sánchez, P., Hedgehog-Gli signaling in brain tumors: stem cells and paradevelopmental programs in cancer. *Canc Lett* 204, 145-157, 2004
- Sato, T., Joyner, A.L., Nakamura, H., How does Fgf signaling from the isthmus organizer induce midbrain and cerebellum development? *Develop. Growth Differ*, 46, 487-494, 2004
- Schneider-Maunoury, S., Seitanidou, T., Charnay, P., Lumsden, A., Segmental and neuronal architecture of the hindbrain of *Krox-20* mouse mutants, *Dev*, 124, 1215-1226, 1997
- Schneider-Maunoury, S., Topilko, P., Seitanidou, T., Levi, G., Cohen-Tannoudji, M., Pournin, S., Babinet, C., Charnay, P., Disruption of *Krox-20* results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain, *Cell*, 75, 1199-1214, 1993
- Schell-Apacik, C., Rivero, M., Knepper, J.L., Roessler, E., Muenke, M., Ming, J.E., SONIC HEDGEHOG mutations causing human holoprosencephaly impair neural patterning activity, *Hum Genet*, 113, 170-177, 2003
- Scholpp, S., Lohs, C., Brand, M., *Engrailed* and *Fgf8* act synergistically to maintain the boundary between diencephalon and mesencephalon, *Dev*, 130, 4881-4893, 2003

- Schutz, B.R., Scheurlen, W., Krauss, J., du Manoir, S., Joos, S., Bentz, M., Lichter, P., Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermal tumours by comparative genomic hybridization, *Genes Chrom Cancer*, 16, 196–203, 1996
- Seitanidou, T., Schneider-Maunoury, S., Desmarquet, C., Wilkinson, D.G., Charnay, P., Krox-20 is a key regulator of rhombomere-specific gene expression in the developing hindbrain, *Mech Dev*, 65, 31-42, 1997
- Shamim, H., Mason, I., Expression of Gbx-2 during early development of the chick embryo, *Mech Dev*, 76, 157-159, 1998
- Shawlot, W., Behringer, R.R., Requirement for Lim1 in head-organizer function, *Nature*, 374, 425-30, 1995
- Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martinez, S., Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube, *Dev*, 121, 3923-3933, 1995
- Shimamura, K., Rubenstein, J.L.R., Inductive interactions direct early regionalisation of the mouse forebrain, *Dev*, 124, 2709-2718, 1997
- Simeone, A., Otx1 and Otx2 in the development and evolution of the mammalian Brain, *EMBO J*, 17, 6790-6798, 1998
- Simeone, A., Positioning the isthmic organizer where Otx2 and Gbx2 meet, *Trends Genet*. 16, 237-240, 2000
- Simeone, A., Acampora, D., Gulisano, M., Stornaiuolo, A., Boncinelli, E., Nested expression of four homeobox genes in developing rostral brain, *Nat*, 358, 687-690, 1992
- Smidt, M.P., Asbreuk, C.H., Cox, J.J., Chen, H., Johnson, R.L., Burbach, J.P., A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b, *Nat Neurosci*, 3, 337-341, 2000
- Smyth, I., Narang, M.A., Evans, T., Heimann, C., Nakamura, Y., Chenevix-Trench, G., Pietsch, T., Wicking, C., Wainwright, B.J., Isolation and characterisation of human Patched 2 (PTCH2), a putative tumor suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32, *Hum Mol Gen*, 8, 291-297, 1999
- Snow, M.H.L., Autonomous development of parts isolated from primitive streak stage mouse embryo. Is development clonal? *J Embryol Exp Morph*, 65, 269-287 1981
- Sotelo, C., Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system, *Prog Neurobiol*, 72, 295-339, 2004

- Steichen-Gersdorf, E., Baumgartener, M., Kreczy, A., Maier, H., Fink, F.-M., Deletion mapping on chromosome 17p in medulloblastoma, *Brit J Cancer*, 76, 1284–1287, 1997
- Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., Noll, M., Hooper, J.E., de Sauvage, F., Rosenthal, A., The tumor-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog, *Nature*, 384, 129-134, 1996
- Suda, Y., Matsuo, I., Aizawa, S., Cooperation between Otx1 and Otx2 genes in developmental patterning of rostral brain, *Mech Dev*, 69, 125-141, 1997
- Sun, X., Meyers, E.N., Lewandowski, M., Martin, G.R., Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo, *Genes Dev*, 13, 1834-1846, 1999
- Sutherland, D., Samakovlis, C., Krasnow, M.A., branchless encodes a Drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching, *Cell*, 87, 1091-1101, 1996
- Suzuki-Hirano, A., Sato, T., Nakamura, H., Regulation of isthmus Fgf8 signal by sprouty2, *Dev*, 132, 2, 257-65, 2005
- Swiatek, P.J., Gridley, T., Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox-20, *Gen Dev*, 7, 2071-2084, 1993
- Tabata, T., Eaton, S., Kornberg, T.B., The Drosophila hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed regulation, *Genes Dev*, 6, 2635-45, 1992
- Tam, P.P.L., Behringer, R.R., Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan, *Mech Dev*, 68, 3-25, 1997
- Tao, W., Lai, E., Telencephalon restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head gene family in the developing rat brain, *Neuron*, 8, 957-966, 1992
- 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., Hogg, D., Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma, *Nat Genet*, 31, 306-310, 2002

- Tefft, J.D., Lee, M., Smith, S., Leinwand, M., Zhao, J., Bringas Jr., P., Crowe, D.L., Warburton, D., Conserved function of mSpry-2, a murine homolog of *Drosophila* sprouty, which negatively modulates respiratory organogenesis, *Curr Biol*, 9, 219-222, 1999
- ten Donkelaar, H.J., Lammens, M., Wesseling, P., Thijssen, H.O., Renier, W.O., Development and developmental disorders of the human cerebellum, *J Neurol*, ;250, 1025-36, 2003
- Thorne, R.N., Pearson, A.D., Nicoll, J.A., Coakham, H.B., Oakhill, A., Mott, M.G., Foreman, N.K., Decline in incidence in medulloblastoma in children, *Cancer*, 74, 3240-3244, 1994
- van den Heuvel, M., Ingham, P.W., Smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling, *Nature*, 382, 547-551, 1996a
- van den Heuvel, M., Ingham, P.W., 'Smoothing' the path for hedgehogs, *Trends Cell Biol*, 6, 451-453, 1996b
- VandenBerg, S.R., Herman, M.M., Rubenstein, L.J., Embryonal central neuroepithelial tumours: current concepts and future challenges, *Cancer Metastases Rev*, 5, 343-365, 1987
- Villavicencio, E.H., Walterhouse, D.O., Iannaccone, P.M., The Sonic Hedgehog-Patched-Gli Pathway in Human development and disease, *Am J Hum Genet*, 67, 1047-1054, 2000
- Vogel, A., Rodriguez, C., Warnken, W., Izpisua Belmonte, J.C., Dorsal cell fate specified by chick *Lmx1* during vertebrate limb development, *Nature*, 378, 716-720, 1995
- Voiculescu, O., Taillebourg, E., Pujades, C., Kress, C., Buart, S., Charnay, P., Schneider-Manoury, Hindbrain patterning: *Krox20* couples segmentation and specification of regional identity, *Dev*, 128, 4967-4978, 2001
- Vorechovsky, I., Tingby, O., Hartman, M., Stromberg, B., Nister, M., Collins, V.P., Toftgard, R., Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours, *Oncogene*, 15, 361-366, 1997
- Walthall, S.L., Moses, M., Horabin, J.I., A large complex containing Patched and Smoothed initiates Hedgehog signaling in *Drosophila*, *J Cell Sci*, 120, Pt 5, 826-37, 2007
- Wassarman, K.M., Lewandoski, M., Kenneth, C., Joyner, A.L., Rubenstein, J.L.R., Martinez, S., Martin, G.R., Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid-hindbrain organizer is dependent on *Gbx2* gene function, *Dev*, 124, 2923-2934, 1997

- Wassef, M., Bally-Cuif, L., Alvarado-Mallart, R.M., Regional specification during cerebellar development, *Perspect Dev Neurobiol*, 1, 127-32, 1993
- Wassef, M., Joyner, A.L., Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum, *Perspect Dev Neurobiol*, 5, 3-16, 1997
- Wasson, J.C., Saylor, R.L. 3rd, Zeltzer, P., Friedman, H.S., Bigner, S.H., Burger, P.C., Bigner, D.D., Look, A.T., Douglass, E.C., Brodeur, G.M., Oncogene amplification in paediatric brain tumours, *Cancer Res*, 50, 2987-2990, 1990
- Waters, S.T., Lewandoski, M., A threshold requirement for Gbx2 levels in hindbrain development, *Dev*, 133, 1991-2000, 2006
- Wechsler-Reya, R.J., Scott, M.P., Control of neuronal precursor Proliferation in the Cerebellum by Sonic Hedgehog, *Neuron*, 22, 103-114, 1999
- Werner, C.A., Dohner, H., Joos, S., Trumper, L.H., Baudis, M., Barth, T.F., Ott, G., Moller, P., Lichter, P., Bentz, M., High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms, *Am J Pathol*, 151, 335-42, 1997
- Wetmore, C., Eberhart, D.E., Curran, T., The Normal patched Is Expressed in Medulloblastomas from Mice with Heterozygous Germ-Line Mutation of patched, *Cancer Res*, 60, 2239-2246, 2000
- Wicking, C., Bale, A.E., Molecular basis of the nevoid basal cell carcinoma syndrome, *Ped*, 9, 630-635, 1997
- Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signaling pathway in tumourigenesis and development, *Oncogene*, 18, 7844-7851, 1999
- Wiellette, E.L., Sive, H., Early requirement for fgf8 function during hindbrain pattern formation in Zebrafish, *Dev Dyn*, 229, 393-399, 2004
- Wilkinson, D. G., Bhatt, S., Chavier, P., Bravo, R., Charnay, P., Segment specific expression of a zinc-finger gene in the developing nervous system of the mouse, *Nat*, 337, 461-464, 1989
- Wilkinson, D.G., Bailes, J.A., McMahon, A.P., Expression of the proto-oncogene int-1 is restricted to specific neural cells in the developing mouse embryo, *Cell*, 50, 79-88, 1987
- Wodarz, A., Nusse, R., Mechanisms of Wnt signaling in development, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 59-88, 1998
- Wolter, M., Reifenberger, J., Sommer, C., Ruzicka, T., Reifenberger, G., Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumours of the central nervous system, *Cancer Res*, 57, 2581-2585, 1997

- Wurst, W., Auerbach, A.B., Joyner, A.L., Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid- Hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum, *Dev*, 120, 2065-2075, 1994
- Wurst, W., Bally-Cuif, L., Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer, *Nat Rev Neurosci*, 2, 99-108, 2001
- Xuan, S., Baptista, C.A., Balas, G., Tao, W., Soares, V.C., Lai, E., Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres, *Neuron*, 14, 1141-1152, 1995
- Yachnis, A.T., Rorke, L.B., Cerebellar and brainstem development: an overview in relation to Joubert syndrome, *J Child Neurol*, 14, 570-3, 1999
- Yao, J., Lai, E., Stifani, S., The winged-helix protein brain factor 1 interacts with Groucho and Hes proteins to repress transcription, *Mol Cell Biol*, 21, 1962-1972, 2001
- Ye, W., Bouchard, M., Stone, D., Liu, X., Vella, F., Lee, J., Nakamura, H., Ang, S.L., Busslinger, M., Rosenthal, A., Distinct regulators control the expression of the mid-hindbrain organizer signal FGF8, *Nat Neurosci*, 4, 1175-1181, 2001
- Yokota, N., Mainprize, T.G., Taylor, M.D., Kohata, T., Loreto, M., Ueda, S., Dura, W., Grajkowska, W., Kuo, J.S., Rutka, J.T., Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization, *Oncogene*, 23, 3444-3453, 2004
- Yuan, S., Darnell, D.K., Schoenwolf, G.C., Mesodermal patterning during avian gastrulation and neurulation: experimental induction of notochord from non-notochordal precursor cells, *Dev Genet*, 17, 38-54, 1995
- Zervas, M., Millet, S., Ahn, S., Joyner, A.L., Cell behaviors and genetic lineages of the mesencephalon and rhombomere 1, *Neuron*, 43, 3, 345-57, 2004
- Zhang, X.-M., Lin, E., Yang, X.-J., Sonic hedgehog- mediated ventralization disrupts formation of the midbrain- hindbrain junction in the chick embryo, *Dev Neurosci*, 22, 207-216, 2000
- Zurawel, R.H., Allen, C., Chiappa, S., Cato, W., Biegel, J., Cogen, P., da Sauvage, F., Raffel, C., Analysis of PTCH/SMO/SHH Pathway Genes in Medulloblastoma, *Genes Chromosomes Cancer*, 27, 44-51, 2000
- Zurawel, R.H., Allen, C., Wechsler-Reya, R., Scott, M.P., Raffel, C., Evidence That Haploinsuffizienz of Ptch Leads to Medulloblastoma in Mice, *Genes Chromosomes Cancer*, 28, 77-81, 2000

9. Anhang

9.1. Abkürzungen

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpc	days post coitus
DR Wasser	DNase, RNase freies Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
HCl	Salzsäure
IsO	isthmie organizer
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molar
MeOH	Methanol
MgCl	Magnesiumchlorid
MHB	Midbrain hindbrain boundary
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC	Sodium Saturated Chloride
TBS	Tris Buffered Saline
WMISH	whole mount <i>in-situ</i> hybridization

9.2. BF-1 Sequenz

1	aaaaaacgga	agtagacgcc	cactcatatt	ttctcaatg	tcaagcaaaa	tgaaaatatt
61	tccaggatga	tcgatcgcgg	ctaccggctt	ccagtactgc	ctagaagctg	aagaggaggt
121	ggagtgcccg	aggagacaac	tgccaccggg	tcaccgcgc	gtgagcgcga	ctctgggagt
181	gaagcgagac	ggagggagaa	cacacgtgtt	acctgcttta	tttcgggact	gtttgggtct
241	gtgctcccc	ggggcagctc	tccgccgcc	cgcccgcgtg	cgtggaaggc	ctccacagaa
301	cgcaccacc	gctcagccgc	ccccgctcgc	cgccctcagc	ccagcttcac	agccgagctc
361	gccgcggggc	gcaggaagct	cttttctac	atgccttgcc	agcggcggag	cctgcggctc
421	aactgcgctg	ctgccggagc	gctcagtgcc	gcctccgctg	cccgtcccc	ccgcgcccga
481	ctccgaacc	gctggtcgcc	cgccgcgctg	ctgccccct	cccgtccgc	cgccgccgcc
541	gccgccgccc	cccgacgcct	gggtgatget	ggacatggga	gataggaaag	aggtgaaaat
601	gattccaag	tcctcgttca	gcataaacag	cctgggtccc	gaggccgtcc	agaacgacaa
661	ccaccacgcg	agccacggcc	accacaacag	ccaccacccc	cagcatcacc	atcatcatca
721	ccaccaccac	caccgcgcgc	cgccgcgcgc	ccagccgcct	ccaccgcgc	cccagcagca
781	gcagcagcag	ccgcccccg	ccccgcagcc	cccgcaggcg	cgcggcgccc	cagcagccga
841	cgagcacaag	ggtccccagc	cgctctgct	cccgcctcc	accgcctgg	acggggccaa
901	ggctgacgca	cttgagcca	aaggcgagcc	gggcggcggg	ccggcggagc	tggcgcccgt
961	cgggccggac	gagaaggaga	agggcgcggg	cgccgggggg	gaggagaaga	aagggcgggg
1021	cgagggcggc	aaggacgggg	aggggggcaa	ggagggcgac	aagaagaacg	gcaagtacga
1081	gaagccgccc	ttcagctaca	acgcgctcat	catgatggcc	atcaggcaga	gtcccagaaa
1141	gcgcctgacg	ctcaatggca	tctatgagtt	catcatgaag	aactcccct	actaccgcga
1201	gaacaagcag	ggctggcaga	actccatccg	ccacaacctg	tcctcaaca	agtgttcgt
1261	gaaggtaccg	cgccactacg	acgaccggg	caagggaac	tactggatgc	tcgaccgctc
1321	gagcgacgac	gtgttcacg	gcggcacgac	cggcaagctg	cgcgcccgt	ccaccacgtc
1381	tcgggccaag	ctggccttta	agcgcggggc	gcgcctcacc	tccaccggcc	tcaccttcat
1441	ggaccgcgcc	ggctccctct	actggcccat	gtcgcccttc	ctgtccctgc	accacccccg
1501	cgccagcagc	actttgagtt	acaacgggac	cacgtcggcc	tacccagcc	acccatgcc
1561	ctacagctcc	gtgttgactc	aaaactcgct	gggcaacaac	cactccttct	ccaccgcaa
1621	cgggctgagt	gtggaccggc	tggtaacgg	ggagatcccg	tacgccacgc	accacctcac
1681	ggccgctgcg	ctcgcgcct	cggtgcctg	cggcctgtcg	gtgcctgct	ccgggacctc
1741	ctccctcaac	ccctgctccg	tcaacctgct	cgcgggccag	accagttact	ttttcccaca
1801	cgtcccgcac	ccgtcaatga	cttcgcagac	cagcacgtcc	atgagcgccc	gggccgcgtc
1861	ctcctctacg	tcgccgagg	ccccctcgac	cctgcctgt	gagtctttaa	gacctcttt

1921	gccaaagtttt	acgacaggac	tgtccggggg	actgtctgat	tatttcacac	atcaaaaatca
1981	gggggtcttct	tccaaccctt	taatacatta	acatccgggg	gaccagactg	taagtgaacg
2041	ttttacacac	atttgattg	taaatgataa	ttaaaaaaat	aagtccaggg	atTTTTatt
2101	aagccccccc	tccccattc	tgtacgtttg	ttcagtcitt	agggtcgttt	actattctaa
2161	cacggtgtgg	agtgtcagcg	agggtcaatg	tgggagaata	cattgtagaa	tataaggttt
2221	ggacgtcaaa	ttatagtaga	atgtgtatct	aaatagtac	tgctttgcca	ttcattcaa
2281	acctgacaag	tctatctcaa	caggctgcca	gatttccatg	tgtgcagtat	tataagttat
2341	catggagcta	tctggtggac	gcaggccttg	agaacaacct	aaattatgaa	gagagtttta
2401	aaatgttaaa	ttgtaattg	tatttaagaa	ttttagtaa	agggtcccaa	ggaattatat
2461	tggccattta	ttgtttgtc	ctttcttta	aagaactgtt	tcttcttt	tgtttacttt
2521	tagaccaaaag	attggattct	agcaaatgca	cttgggtatac	taagtattaa	aacaagtaaa
2581	caaacaaacg	aaaaaggaag	gttgttagt	tggcaacact	gccccatcaa	ttgaatccga
2641	aaggacaaaa	ttaaggattg	ccttcagttt	gtgttgtgta	tatttcgatg	tatgtggta
2701	ctaacagtc	acttttattt	tttctaaatg	tagtgaaatg	ttaataccta	ttgtacttat
2761	aggtaaacct	tgcaaatatg	taacctgtgt	tgcgcaaatg	ccgcatcaat	ttgagtgatt
2821	gttaatgttg	tcttaaatt	tcttgattgt	gatactgtgg	tcatatgccc	gtgtttgtca
2881	cttacaaaaa	tgtttactat	gaacacacag	aaataaaaaa	taggctaata	tcat

Gezeigt ist die Sequenz von BF-1 (Li et al, 1995). Die Vorwärtsprimer sind mit roter Schrift, die Rückwärtsprimer mit blauer Schrift dargestellt: F1, F2, R2, R1 (von vorne nach hinten).

9.3. Lmx1b Sequenz

1	atg ttggacg	gcatcaagat	gga ggagcac	gcccttcgcc	ccgggcccgc	caccctgggg
61	gtgctgctgg	gctccgactg	cccgcattcc	gccgtctgcg	agggctgcca	gcggcccac
121	tccgaccgct	tctgatgcg	agtcaacgag	tcgtcctggc	acgaggagtg	tttgactg
181	gcggcatgct	agcaagccct	caccaccagc	tgctact ttcc	gggatcggaa	actgtactgc
241	aaacaagact	accaacagct	cttcgcggca	aagtgcagcg	gctgcatgga	gaagatcgcg
301	cctaccgagt	tcgtcatgcg	ggcgtctggag	tgtgtgtacc	acttgggctg	tttctgctgc
361	tgtgtgtgcg	agaggcaact	gcgcaagggg	gacgagttcg	tgctcaagga	gggccagctg
421	ctgtgcaagg	gtgactatga	gaaggagaaa	gacctgctca	gctccgtgag	cccggacgag
481	tctgactctg	tgaagagtga	ggatgaagat	ggagacatga	agccggccaa	ggggcagggc
541	agccagagta	aaggcagtgg	agatgacggg	aaagaccgga	gaaggcccaa	acggccccga
601	accatcctca	ccacacagca	gcgaagagct	ttcaaggcat	cctttgaggt	ctcctccaag
661	ccctgtcgga	aggctccgaga	gacattggca	gcagagacag	gcctcagcgt	gcgtgtggtc
721	caggtctggg	ttcagaacca	aagagcaaag	atgaagaagc	tggcccggag	acaccagcaa

781	cagcaggagc	agcagaactc	ccagcggctg	ggccaagagg	ttctgtcaag	ccgcatggag
841	ggcatgatgg	cctcctacac	cgcgctggcc	cctccgcagc	agcagatcgt	ggccatggag
901	cagagcccct	acggaagcag	cgacccttc	caacagggcc	tcacgccgcc	ccaaatgcca
961	gggaacgact	ccatcttcca	cgatattgat	agtgatacct	ccctcaccag	cctcagcgac
1021	tgcttctctg	gctctccga	cgtgggctcc	ctgcaggcgc	gcgtggggaa	ccccattgac
1081	cggtctact	ccatgcagag	ctctacttt	gcctctga		

Sequenz für *lmx1b* (Chen et al., 1998). Die Vorwärtsprimer sind mit roter Schrift, die Rückwärtsprimer mit blauer Schrift dargestellt.

9.4. Primer Sequenzen

Name	ID-No.	OD 260	Tm	MW	Sequenz
LMXF1	34641	259,6	59,8	7260,0	5'-TGT TGG ACG GCA TCA AGA TGG A-3'
LMXF2	34642	248,0	58,9	7590,0	5'-TTC CGG GAT CGG AAA CTG TAC TG-3'
LMXR1	34643	258,0	52,2	7260,0	5'-AAA GTA GGA GCT CTG CAT GGA G-3'
LMXR2	34644	268,0	53,9	7920,0	5'-CTG GTG AGG GAG GTA TCA CTA TCA-3'
BF1-F1	34645	227,0	58,3	7260,0	5'-TTC AGC TAC AAC GCG CTC ATC A-3'
BF1-F2	34656	243,0	57,5	7920,0	5'-AAC CTG TCC CTC AAC AAG TGC TTC-3'
BF1-R1	34647	242,0	55,3	7920,0	5'-AAC GTT CAC TTA CAG TCT GGT CCC-3'
BF1-R2	34646	280,0	58,5	7920,0	5'-TAA AGG GTT GGA AGA AGA CCC CTG-3'

MW (Molekulargewicht) ist in g (Gramm) angegeben

OD 260 gilt für 1 µmol/ml

9.5. Restriktionsenzyme

Sonde	Restriktionsenzym	RNA Polymerase	Temperatur- optimum	Vektor
BF-1	XhoI	Sp6 antisense	37°C	pCR II
Dll-1	HindIII	T3 antisense	37°C	pBSIISK
En-1	HindIII	T7 antisense	37°C	
En-2	ClaI	T7 antisense	37°C	
FGF-8	PstI	T7 antisense	37°C	
Gbx-2	HindIII	T7 antisense	37°C	BluescriptII-SK
Gli1	BamHI	T3 antisense	37°C	pCR II
Krox-20	BamHI	T3 antisense	37°C	
Lim_Dral	Not I	Sp6 antisense	37°C	pCR II
lmx1b	XhoI	Sp6 antisense	37°C	pCR II
Otx-2	EcoRI	Sp6 antisense	37°C	
ptch	Not I	Sp6 antisense	37°C	pCR II
shh	HindIII	T3 antisense	37°C	BluescriptII-SK
spo	XhoI	T7 antisense	37°C	pCR II
spry-2	XhoI	Sp6 antisense	37°C	pCR II
wnt-1	HindIII	T7 antisense	37°C	

10. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Manuel Keim
Adresse	Rossinistraße 40 85598 Baldham 08106/5898 sandgrouse@gmx.net
Geburtstag	26. Oktober 1976
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1983 bis 1987	Grundschule Baldham
1987 bis 1996	Gymnasium Vaterstetten
1996	Abschluss des Gymnasiums Vaterstetten mit Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

1996 bis 1997	Naturschutzbund Deutschland e.V., Landesverband Schleswig-Holstein, Naturschutzwart im Naturschutzgebiet Krummsteert/Sulsdorfer Wiek
---------------	--

Studium

1997 bis 2004	Humanmedizin an der TU München
1997 bis 1999	Vorklinischer Abschnitt am Klinikum Biederstein, TU München
August 1999	Ärztliche Vorprüfung
1999 bis 2004	Klinischer Abschnitt am Klinikum Rechts der Isar, TU München
August 2000	1. Ärztliche Prüfung
Mai 2001	USMLE (United States Medical Licensing Examination) Step 1
April 2003	2. Ärztliche Prüfung
April 2003	USMLE (United States Medical Licensing Examination) Step 2
Mai 2004	3. Ärztliche Prüfung
Oktober 2004	Erteilung der Approbation

Klinische Tätigkeit

Pflegepraktikum

<i>Dezember 1996</i>	Emergency Medicine, Bamenda Hospital, Bamenda, Cameroon
<i>März/April 1998</i>	HNO, Klinikum Rechts der Isar, München, Germany
<i>April 1998</i>	Anästhesie und Intensivmedizin, KKH Ebersberg, Ebersberg, Germany

Famulatur

<i>April 2001</i>	Arbeitsmedizin, Betriebsärztliche Dienststelle Siemens Neuperlach, München, Germany
<i>August 2001</i>	Paediatric Cardiology, Gil Medical Center, Inchon, South Korea
<i>September 2001</i>	General Surgery, Tupua Tamasese Meaole Hospital, Apia, Samoa
<i>März 2002</i>	Trauma Unit, Alfred Hospital, Melbourne, Australia
<i>April 2002</i>	Anaesthesia, Maroondah Hospital, Melbourne, Australia

Praktisches Jahr

<i>April/Mai 2003</i>	Infectious Diseases, University Teaching Hospital, Lusaka, Zambia
<i>Juni/Juli 2003</i>	Hämatonkologie, Klinikum Rechts der Isar, München Germany
<i>August/Sep 2003</i>	Plastic Surgery, University of Virginia, Charlottesville, USA
<i>Oktober/Nov 2003</i>	Emergency Medicine, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, USA
<i>Dezember 2003 bis März 2004</i>	Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Klinikum Rechts der Isar, München, Germany

AIP/Assistenzarzt

<i>August 2004 bis September 2005</i>	Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Prof. Dr. med. Günther, Städtisches Klinikum München, Krankenhaus Neuperlach, Germany
<i>Seit Januar 2006</i>	OCM Gemeinschaftspraxis, München, Germany

Promotion

2000 bis 2007 Univ.-Prof. Dr. med. H. Höfler, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Klinikum Rechts der Isar, TU München

PD Dr. med. habil. Dr. med. M. Atkinson PhD, Prof. Dr. med. H. Hahn, Institut für molekulare Pathologie, gsf Forschungszentrum München-Neuherberg

„Das Patched1 Gen und seine Beteiligung an der Entwicklung des ZNS“

Außerakademische Tätigkeiten

Seit 1994 Freiwillige Feuerwehr Vaterstetten FFW Vat

Regelmäßige Teilnahme an Übungen und Einsätzen sowie am Vereinsleben, Ausbildung zum Truppmann/Truppführer und Atemschutzgeräteträger

Seit 1998 Vogel Info Bayern VIB

Mitglied der VIB, Verein und Mailingliste für Vogelbeobachter im bayerischen Raum

1989 bis 1998 Bund Naturschutz in Bayern e.V.

Mitglied in der bestehenden Jugendgruppe und im Ortsverband Vaterstetten

1991 bis 1998 Deutsches Rotes Kreuz DRK und Jugendrotkreuz JRK

Mitglied im DRK, Leiter einer Jugendgruppe im JRK, Fachlehrgang Sanitätsdienst und Fachlehrgang Rettungsdienst erfolgreich abgeschlossen; Mitglied seit 1992 und von 1995 bis 1996 Leiter des Schulsanitätsdienstes am Gymnasium Vaterstetten

1993 bis 2004 Deutsche Pfadfinderschaft Sankt Georg DPSG

Mitglied seit 1993 in der DPSG Stamm Columbus, Neukeferloh, Bezirk München-Ost, Leiter seit 1994, Gruppenleiter für 2 Wölflings-, eine Jungpfadfinder-, eine Pfadfinder und eine Rovergruppe; Vorstand Stamm Columbus 2003 bis 2004

Sonstige Kenntnisse und Interessen

Sprachen Englisch in Wort und Schrift, Latein in Schrift, Grundkenntnisse Spanisch

EDV Bürosoftware MS-Office

Hobbys Birding, Feuerwehr, Reisen, Klettern

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. H. Hahn für das Dissertationsthema und für die Zusammenarbeit während und nach der Durchführung der Experimente und bei der sprachlichen Ausformulierung der Arbeit. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. M. Werner für die Vermittlung der Doktorarbeit. Zu großem Dank bin ich auch Herrn Prof. Dr. med. H. Höfler verpflichtet, der mir die Arbeit am Institut für Pathologie ermöglichte und als Doktorvater während der Zeit am Institut begleitete. Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. med. M. Atkinson für die Übernahme der Dissertation, das Korrekturlesen und die freundliche Betreuung bis zum Abschluss der Arbeit. Herrn Dr. med. U. Heinzmann für die freundliche Unterstützung und für die wertvolle Hilfe während der Arbeit mit den Embryonen und für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Außerordentlichen Dank möchte ich Herrn U. Schnitzbauer für die hervorragende Unterstützung und Beratung während der Laborarbeit aussprechen. Ebenso danken möchte ich Herrn R. Kappler, Frau J. Calzada-Wack sowie der gesamten Belegschaft des Instituts für Pathologie an der gsf München-Neuherberg für das angenehme Arbeitsklima während meiner Laborarbeit.