

Aus dem Institut für Hirnforschung  
der Universität Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Meyermann

**Zur Rolle des Sonic Hedgehog Aktivierungsweges  
in der Entwicklung des humanen fetalen Gehirns**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Julia Frederike Tichy  
aus  
Stuttgart

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Meyermann

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wolburg



# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>Vorwort</b> .....	<b>9</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>10</b>
1.1 Die Entwicklung des menschlichen Zentralen Nervensystems .....	10
1.2 Allgemeine ZNS-Entwicklung.....	10
1.3 Entwicklung der neokortikalen Schichtung.....	12
1.4 Migration im Neokortex .....	15
1.5 Entstehung anderer ausgewählter Hirnstrukturen.....	15
1.6 Entwicklung der Schichten des Cerebellums .....	16
1.7 Migration im Kleinhirnkortex und Sonic Hedgehog .....	18
1.8 Die Hedgehog-Familie .....	20
1.8.1 Desert Hedgehog und Indian Hedgehog .....	20
1.8.2 Sonic Hedgehog.....	20
1.8.2.1 Cholesterol und Sonic Hedgehog .....	22
1.9 Der Sonic Hedgehog-Signalweg .....	24
1.10 Interaktionen zwischen Patched und Smoothened .....	25
1.11 „Short- und long-range“ Signalübertragung .....	27
1.12 Die Weggefährten des Shh im Sonic Hedgehog-Signalweg .....	28
1.12.1 Patched.....	28
1.12.2 Smoothened.....	29
1.12.3 Die Gli-Familie.....	29
1.12.3.1 Gli 1 .....	30
1.12.3.2 Gli 2 .....	30
1.12.3.3 Gli 3 .....	30
1.13 Die Pathologie des Sonic Hedgehog-Signalweges.....	32
1.13.1 Sonic Hedgehog-Signalweg assoziierte Pathologien .....	33
1.13.1.1 Holoprosenzephalie .....	33
1.13.1.2 Smith-Lemli-Opitz-Syndrom .....	34
1.13.2 Patched-Pathologie .....	35
1.13.3 Smoothened-Pathologie.....	35
1.13.4 Gli1-Pathologie.....	35
1.13.5 Gli2-Pathologie.....	36
1.13.6 Gli3-Pathologie.....	36
1.14 Ziele der Arbeit .....	37

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>38</b>
2.1	Patientendaten.....	38
2.2	Makroskopische und histologische Beurteilung .....	39
2.3	Untersuchte Hirnregionen.....	40
2.4	Herstellung von histologischen Präparaten.....	40
2.5	Immunhistochemie.....	41
2.5.1	Verwendete Antikörper.....	41
2.5.1.1	Sonic Hedgehog .....	41
2.5.1.2	Patched.....	41
2.5.1.3	Smoothened.....	41
2.5.1.4	Gli1 .....	41
2.5.1.5	Gli2 .....	42
2.5.1.6	Gli3 .....	42
2.5.2	Durchführung der Immunfärbung .....	42
2.5.3	Verwendete Reagenzien.....	43
2.5.3.1	Farbstoffreagenzien .....	43
2.5.3.2	Lösungen .....	44
2.6	Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung .....	44
2.7	Statistische Auswertung.....	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>46</b>
3.1	Immunhistochemische Verteilung der untersuchten Faktoren im fetalen Großhirn.....	46
3.1.1	Statistische Auswertung der Sonic Hedgehog-Immunhistochemie .....	47
3.1.1.1	Shh-Frequenz .....	47
3.1.1.2	Shh-Intensität.....	47
3.1.1.3	Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Shh.....	48
3.1.1.4	Altersabhängige Shh-Immunreaktivität .....	49
3.1.2	Statistische Auswertung der Patched-Immunhistochemie .....	50
3.1.2.1	Patched-Frequenz .....	50
3.1.2.2	Patched-Intensität .....	51
3.1.2.3	Statistische Auswertung der Frequenz und Intensität für Patched.....	52
3.1.2.4	Altersabhängige Patched-Immunreaktivität .....	52
3.1.3	Statistische Auswertung der Smoothened-Immunhistochemie .....	53
3.1.3.1	Smoothened-Frequenz .....	53

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.1.3.2 Smoothened-Intensität.....	54
3.1.3.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Smoothend.....	55
3.1.3.4 Altersabhängige Smoothened-Immunreaktivität .....	56
3.1.4 Statistische Auswertung der Gli1-Immunhistochemie .....	58
3.1.4.1 Gli1-Frequenz .....	58
3.1.4.2 Gli1-Intensität.....	58
3.1.4.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli1 .....	59
3.1.4.4 Altersabhängige Gli1-Immunreaktivität .....	60
3.1.5 Statistische Auswertung der Gli2-Immunhistochemie .....	61
3.1.5.1 Gli2-Frequenz .....	61
3.1.5.2 Gli2-Intensität.....	61
3.1.5.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli2.....	62
3.1.5.4 Altersabhängige Gli2-Immunreaktivität .....	63
3.1.6 Statistische Auswertung der Gli3-Immunhistochemie .....	64
3.1.6.1 Gli3-Frequenz .....	64
3.1.6.2 Gli3-Intensität.....	65
3.1.6.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli3.....	66
3.1.6.4 Altersabhängige Gli3-Immunreaktivität .....	66
3.2 Immunhistochemische Verteilung der untersuchten Faktoren im fetalen Kleinhirn.....	68
3.2.1 Statistische Auswertung der Shh-Immunhistochemie .....	69
3.2.1.1 Shh-Frequenz .....	69
3.2.1.2 Shh-Intensität.....	69
3.2.1.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Shh.....	70
3.2.1.4 Altersabhängige Shh-Immunreaktivität .....	71
3.2.2 Statistische Auswertung der Patched-Immunhistochemie .....	71
3.2.2.1 Patched-Frequenz .....	71
3.2.2.2 Patched-Intensität .....	72
3.2.2.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Patched .....	72
3.2.2.4 Altersabhängige Patched-Immunreaktivität .....	73
3.2.3 Statistische Auswertung der Smoothened-Immunhistochemie .....	74
3.2.3.1 Smoothened-Frequenz .....	74
3.2.3.2 Smoothened-Intensität.....	74

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.2.3.3	Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Smoothened	75
3.2.3.4	Altersabhängige Smoothened-Immunreaktivität	76
3.2.4	Statistische Auswertung der Gli1-Immunhistochemie	76
3.2.4.1	Gli1-Frequenz	76
3.2.4.2	Gli1-Intensität	77
3.2.4.3	Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli1	78
3.2.4.4	Altersabhängige Gli1-Immunreaktivität	78
3.2.5	Statistische Auswertung der Gli2-Immunhistochemie	79
3.2.5.1	Gli2-Frequenz	79
3.2.5.2	Gli2-Intensität	79
3.2.5.3	Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli2	80
3.2.5.4	Altersabhängige Gli2-Immunreaktivität	81
3.2.6	Statistische Auswertung der Gli3-Immunhistochemie	81
3.2.6.1	Gli3-Frequenz	81
3.2.6.2	Gli3-Intensität	82
3.2.6.3	Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli3	83
3.2.6.4	Altersabhängige Immunreaktivität für Gli3	83
3.3	Rhombische Lippe	86
3.4	Auswertung der Kontrollschnitte	87
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>88</b>
4.1	Proliferation und Differenzierung im Großhirnkortex	89
4.1.1	Proliferation bzw. Differenzierung und Sonic Hedgehog	89
4.1.2	Proliferation bzw. Differenzierung und Patched / Smoothened	90
4.1.3	Proliferation bzw. Differenzierung und die Gli-Familie	92
4.1.4	Proliferation in der Intermediärzone?	94
4.1.5	Zusammenschau	94
4.2	Proliferation und Differenzierung im Kleinhirnkortex	95
4.2.1	Innere Körnerzellschicht	97
4.2.2	Bergmann-Glia und Sonic Hedgehog	98
4.3	Migration	98
4.3.1	Migration im Neokortex	99
4.3.2	Migration im Kleinhirnkortex	101
4.4	Rhombische Lippe und Sonic Hedgehog	103

## **INHALTSVERZEICHNIS**

---

4.5	Medulloblastome und der Sonic Hedgehog-Aktivierungsweg .....	104
4.6	Schlussfolgerung .....	106
4.7	Ausblick .....	107
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>111</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	111
6.2	Literaturverzeichnis.....	112
6.3	Danksagung.....	124
6.4	Lebenslauf .....	125



**Vorwort**

In genetischen Studien über entwicklungsbiologisch wichtige Signalkaskaden konnte gezeigt werden, dass wiederholt eine kleine Anzahl von evolutionär konservierten Signalwegen, wie die des „bone morphogenetic protein“ (Bmp), Wnt (Wingless type), Tyrosinkinaserzeptoren, Notch und der Hedgehog-Familie in einer Vielzahl von Spezies zur Steuerung der Zellzahl in unterschiedlichen Kontexten herangezogen werden.

Dabei wird das Schicksal von einzelnen Zellen oder ganzen Zellverbänden durch die gezielte Aktivierung oder Inhibition dieser Signalwege kontrolliert.

Obgleich die Funktionsweise in unterschiedlichen Spezies verschieden sein kann, deutet die Mehrzahl der Experimente darauf hin, dass die entscheidenden Elemente des Signalweges, wie das Vorhandensein von Ligand, Rezeptor, zytoplasmatischem Signal, Transduktionsmaschinerie und Transkriptionsfaktoren in der Evolution erhalten geblieben sind. Der Sonic Hedgehog-Signalweg ist ein solches Beispiel.

Obwohl der Großteil der hier involvierten Komponenten während der Evolution unverändert blieb, konnte erst vor nicht all zu langer Zeit eine Vielzahl von Proteinen identifiziert werden, die scheinbar essentiell für den Shh-Signalweg in Vertebraten sind (Huangfu und Anderson, 2006). In der nun folgenden Arbeit soll die Wichtigkeit des Sonic Hedgehog-Aktivierungsweges in der Entwicklung des menschlichen Groß- und Kleinhirnes näher beleuchtet werden.

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Die Entwicklung des menschlichen Zentralen Nervensystems

Die Entwicklung des menschlichen Zentralen Nervensystems (ZNS) wird durch eine festgelegte Abfolge von zeitlich und räumlich abhängigen morphogenetischen Ereignissen, die unter der Kontrolle von positionsspezifischen Genen stehen, geprägt. Durch diese festgelegte Genexpression ist die Ausbildung von Zellmustern (Patterning) des sich entwickelnden ZNS möglich. Diese Expressionsmuster sind für die zelluläre Ausreifung und somit das anatomische und funktionelle Wachstum der einzelnen ZNS-Teile essenziell.

Die Ausbildung der einzelnen ZNS-Kompartimente beinhaltet die zeitlich definierte regionsspezifische Zellproliferation und Apoptose, die Beschränkung der Zelldifferenzierung und schlussendlich die Modulation der Zellmigration.

Für jede Spezies besteht ein eigener Zeitplan der embryonalen und fetalen morphologischen Entwicklung. Während die Bildung des menschlichen Telenzephalons bis zum Ende des sechsten Schwangerschaftsmonats fast vollständig abgeschlossen ist, dauert die Ausreifung des Cerebellums bis Monate nach der Geburt an (Abraham et al. 2001).

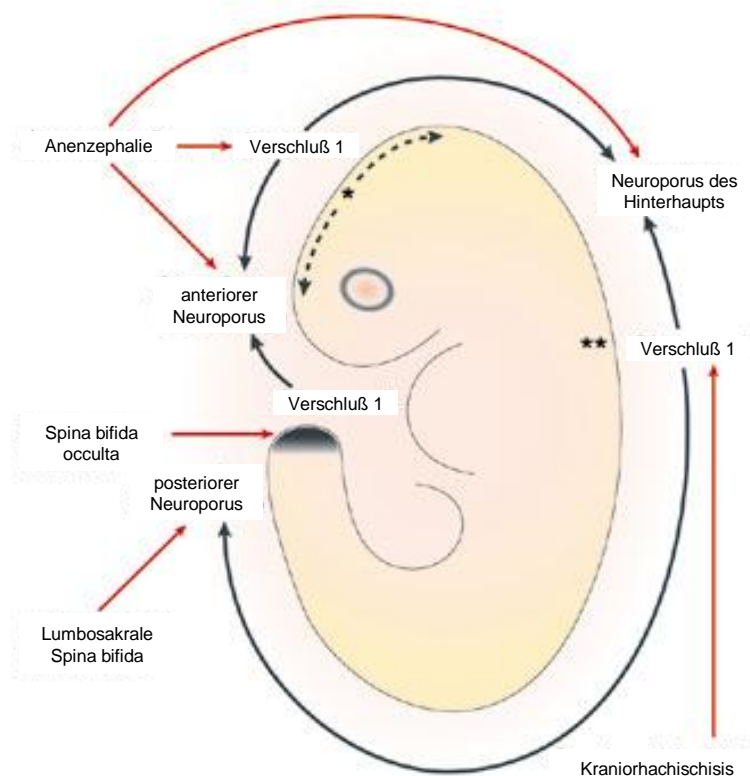
### 1.2 Allgemeine ZNS-Entwicklung

Am 8. Tag der Embryonalphase, nachdem sich die Blastozyste eingenistet hat, beginnt die Differenzierung der Keimblätter. Es bildet sich das innere Keimblatt (primäres Entoderm) und das äußere Keimblatt (primäres Ektoderm). Aus dem Entoderm entstehen der Magen-Darm-Kanal und andere Organe wie Trachea, Lunge, Leber, Pankreas, Schilddrüse sowie die Nebenschilddrüse. Das Ektoderm bildet die Grundlage für die äußere Haut, die Sinnesorgane und das Nervensystem.

Im Laufe des 15. Entwicklungstages formiert sich im hinteren Drittel, in der Mittellinie der zweiblättrigen Keimscheibe, der Primitivstreifen. Aus diesem Zellmaterial entwickelt sich das mittlere Keimblatt, das Mesoderm. Aus dem Mesoderm gehen unter anderem das Herz, Bindegewebe, Knochen, die Skelettmuskulatur und die inneren Keimdrüsen hervor.

In der 3. Entwicklungswoche verdichtet sich das Ektoderm oberhalb des Primitivknotens zur Neuralplatte. Dieser Vorgang wird durch die darunter liegende Chorda

dorsalis induziert. Im mittleren Abschnitt beginnt die Aufrichtung der Neuralwülste zu den Neuralfalten und die Ausbildung der Neuralrinne. Die Neuralfalten wachsen aufeinander zu, verschmelzen miteinander und bilden so am 21. und 22. Entwicklungstag das Neuralrohr. Am kranialen und kaudalen Ende des Embryos erfolgt die Verschmelzung etwas später, da die Verschmelzung in der Halsregion im Bereich des vierten Somiten beginnt.



**Abbildung 1:** Darstellung der Verschmelzung des Neuralrohres. Die wichtigsten Pathologien der Neuralrohrschlusdefekte sind mit roten Pfeilen dargestellt (Copp et al. 2003).

Somit entstehen zwei Öffnungen, die als Neuroporus anterior und Neuroporus posterior bezeichnet werden. Über diese besteht eine kurzzeitige Verbindung zwischen dem Lumen des Neuralrohres und der umgebenden Amnionhöhle. Der Verschluss des anterioren Neuroporus erfolgt am 25. Tag, der des posterioren zwei Tage später (siehe dazu auch Abbildung 1).

Das kraniale Ende des Neuralrohres weist drei primäre Hirnbläschen auf:

- das Prosenzephalon (Vorderhirn),
- das Mesenzephalon (Mittelhirn) und
- das Rhombenzephalon (Rautenhirn).

Zur gleichen Zeit faltet sich das Neuralrohr nach ventral ein, somit entstehen zwei Krümmungen: die Nackenbeuge, als Grenze zwischen Rautenhirn und Rückenmark und die Scheitelbeuge im Bereich des Mesenzephalons.

In der fünften Entwicklungswoche entsteht die Großhirnanlage. Dabei teilt sich das Prosenzephalon in das paarige Telenzephalon (Endhirn) und das unpaarige Diencephalon (Zwischenhirn).

Im Bereich des Rhombenzephalons knickt die Neuralanlage nach ventral ab, so entsteht die Brückenbeuge. Der vordere Abschnitt des Rhombenzephalons wird Metenzephalon (Nachhirn) genannt, der hintere Abschnitt Myelenzephalon (Markhirn).

Die Gehirnventrikel werden aus den embryonalen Hirnbläschen gebildet. Sie sind mit Liquor gefüllt und stehen über den Zentralkanal mit dem Rückenmark in direkter Verbindung.

### **1.3 Entwicklung der neokortikalen Schichtung**

In der 6. Entwicklungswoche beginnt die anfangs dünne Wandung der Endhirnbläschen, durch sich rasch teilende Zellen in der Ventrikulärzone, immer dicker zu werden (Choi 1988, Mollgard und Schuhmacher 1993, Zecevic 1993). Zu diesem frühen Zeitpunkt besteht die Hemisphärenwand aus zwei Schichten, der Ventrikulärzone, in der viele Mitosefiguren zu finden sind (Choi 1988), und einer superfiziell liegenden, wenig zellreichen Zone, die auch „Preplate“ genannt wird. Die Mitosefiguren sind vertikal orientiert, was für eine symmetrische Teilung spricht, bei der beide Tochterzellen wieder in den Mitosezyklus eintreten und dabei die Proliferation vorantreiben. Unterstützt wird diese Annahme durch das Vorhandensein von immunhistochemisch nachweisbarer proliferativer Aktivität (PCNA, proliferation cell nuclear antigen) in der Mehrzahl der Zellkerne der Ventrikulärzone (Mollgard und Schuhmann 1993). Die Ventrikulärzone besteht jedoch nicht nur aus neuronalen Zellen, sondern beherbergt auch radiale Gliazellen, deren Hauptfunktion in der Lenkung der migrierenden Neuronen besteht (Rakic 1995). Die radialen Gliazellen

sind durch die gesamte Zeit der Neurogenese mitotisch aktiv, verschwinden anschließend oder werden zu Astrozyten, wenn die Auswanderung der Neuronen abgeschlossen ist. Zudem wird vermutet, dass die radialen Gliazellen selbst Neurone bilden können (Noctor et al. 2001), und somit vielleicht als Wegbereiter für den Proliferationsgipfel in der Neokortexentwicklung dienen. Die zum Teil durch Gliazellen selbst gebildeten Neuronen (Noctor et al. 2001) nutzen wiederum die Gliazellen als eine Art „Führungsseil“, um zu ihrem Bestimmungsort zu gelangen. Dort bilden sie funktionale kortikale Einheiten.

Die Subventrikulärzone tritt ab der 7. Entwicklungswoche als nicht so zellreiche, aber dennoch proliferative Zellschicht über der Ventrikulärzone in Erscheinung. Aus dieser Zone gehen hauptsächlich neuronale und gliale Zellen hervor (Letinic et al. 2002). Ihre Zellen wandern nicht aus.

Durch die voranschreitende Proliferation von Neuronen aus der Ventrikulärzone formiert sich in der 8. Woche in der bereits bestehenden „Preplate“ die Rindenplatte. Somit ergibt sich ein räumlicher Aufbau, in dem die Marginalzone oberhalb der Rindenplatte und die Intermediärzone unterhalb zu liegen kommt (Marin und Rubenstein 2003).

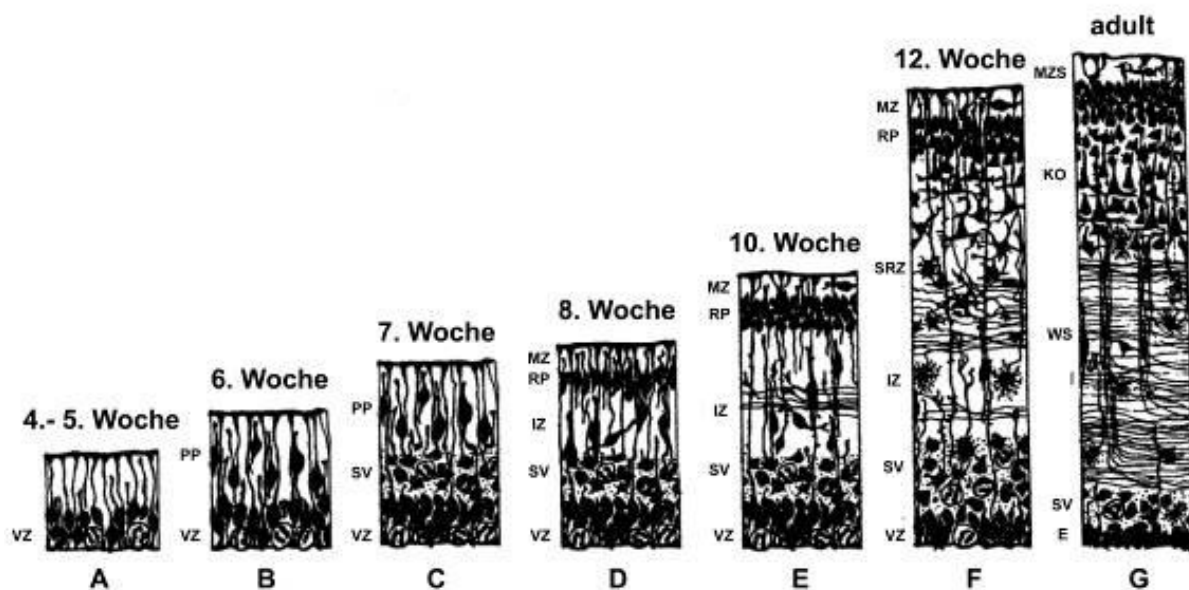
Zudem entsteht unterhalb der Rindenplatte eine weitere zellarme Neokortexschicht, die „sekundäre Rindenplatte“ genannt wird (Choi 1988, Zecevic 1993). Die Zeit bis zur 10. Entwicklungswoche ist von Wachstum und Verdickung der Rindenplatte, sowie der Expansion der Intermediärzone geprägt (Choi 1988). Die weiterhin andauernde Vergrößerung der Ventrikulärzone deutet an, dass die Zahl der proliferierenden Zellen immer noch die Zahl der auswandernden Zellen übersteigt.

Mit der 12. Woche ist der Proliferationsgipfel des humanen Neokortex erreicht (Simonati et al 1999). Ab jetzt nimmt die Ventrikulärzone nicht mehr an Größe zu, die symmetrische Teilung geht in die asymmetrische Proliferation über (Simonati et al. 1999). Die Mitosefiguren sind nun horizontal angeordnet, es bleibt nur noch eine Tochterzelle in der Ventrikulärzone zurück, während die andere Tochterzelle in Richtung der pialen Oberfläche auswandert und dort beginnt sich zu differenzieren (Chenn und McConnell 1995).

Im Gegensatz zur Ventrikulärzone ist die proliferative Aktivität (PCNA) bis zu diesem Zeitpunkt in der Intermediärzone und der sekundären Rindenplatte nur minimal ausgeprägt (Mollgard und Schuhmacher 1993, Simonati et al. 1999).

Auch in der 16. Woche nehmen die Schichtdicke und das Volumen der Ventrikulärzone immer weiter ab, die Teilungsaktivität in der Ventrikulär- und der Subventrikulärzone sinkt stetig (Simonati et al. 1999). Die Mehrzahl der Zellen wandert nun aus.

Dem gegenüber steigt in der Intermediärzone und der sekundären Rindenplatte die Proliferationsaktivität zwischen der 23. und 25. Entwicklungswoche stark an und fällt erst gegen Ende des letzten Trimenons (30. bis 37. Woche) wieder ab (Kendler und Golden 1996), was mit dem Verlust der sekundären Rindenplatte einher geht (Kostovic und Rakic 1990). Einige Zellen der sekundären Rindenplatte bleiben jedoch als permanente interstitielle Zellen in der weißen Substanz bis ins adulte Gehirn erhalten (Kostovic und Rakic 1990). Proliferative Aktivität ist in der Rindenplatte während der Pränatalphase nicht nachweisbar (Simonati et al. 1999). Die Subventrikulärzone verschwindet kurz vor der Geburt fast restlos, jedoch bleibt ein kleiner Teil bis ins Erwachsenenalter mitotisch aktiv (Goldman 1998, Bernier et al. 2000). (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Darstellung der Entwicklung der menschlichen Neokortexschichten: Ventrikulärzone (VZ), Preplate (PP), Subventrikulärzone (SV), Intermediärzone (IZ), Rindenplatte (RP), Marginalzone (MZ), Sekundäre Rindenzone (SRZ), Ependym (E), „weiße Substanz“ (WS), Kortex (K), Molekularzellschicht (MZS) (Modifiziert nach Chan et al. 2002).

#### **1.4 Migration im Neokortex**

Während der Entstehung des ZNS basiert die Auswanderung der neuronalen Vorläuferzellen auf zwei unterschiedlichen Mechanismen, der radialen und der tangentialen Migration. Bei der radialen Migration handelt es sich um eine Punkt-zu-Punkt-Beziehung zwischen der kortikalen Ventrikulärzone und der pialen Oberfläche. Dabei liegen die Zellkörper der glialen Zellen in der Ventrikulärzone und bilden mit ihren Ausläufern eine Art „Führungsseil“. Zur Auswanderung bedarf es erst einer Vorbereitung der Bewegung, dann folgt die Anlagerung der neuronalen Vorläuferzelle an die radiale Gliafaser. Nach der eigentlichen Bewegung kommt es zur Ablösung des Neuroblasten an dessen Zielort und der Eingliederung in die dort entstehende Zellformation (Marin und Rubenstein 2003).

Während die radiale Migration das führende Leitsystem in der ZNS-Entwicklung darstellt, hat man schon früh bemerkt, dass es noch andere Lenksysteme geben muss. Einige Arbeitsgruppen stellten fest, dass sich manche Zellen unabhängig vom glialen „Führungsseil“ ausbreiten (Altmann 1969, Austin und Cepko 1990, Rakic und Sidman 1969). In manchen Fällen benutzen Gruppen von Neuronen sich gegenseitig für die Migration, in anderen Fällen folgen sie wachsenden Axonen um ihren Bestimmungsort zu erreichen. Wieder andere scheinen keiner bestimmten Struktur zu folgen. Insgesamt respektieren tangential auswandernde Zellen keine regionalen Grenzen (Marin und Rubenstein 2003).

#### **1.5 Entstehung anderer ausgewählter Hirnstrukturen**

Während der sechsten und siebten Schwangerschaftswoche bildet sich an der Wand der beiden Seitenventrikel eine Vorwölbung (Protrusion), der Ganglienhügel (Hinrichsen 1990). Dieses zellreiche Areal, das aus Zellen der Ventrikulär- und Subventrikulärzone besteht, lässt sich wieder in zwei Bereiche unterteilen. Dabei bildet der laterale Anteil des Ganglienhügels den Ursprung für den Nucleus caudatus und das Putamen, während sich der Globus Pallidus aus dem medialen Anteil entwickelt. Da Teile des medialen Anteils des Ganglienhügels an der Entstehung der Wand des dritten Ventrikels beteiligt sind, wird davon ausgegangen, dass der Globus Pallidus diencephalen Ursprungs ist (Kuhlenbeck 1954, Richter 1965). Die Amygdala findet ihren Ursprung im kaudalen, ungeteilten Anteil der intraventrikulären Protrusion.

Durch die Entstehung einer kompakten Faserstruktur, auch Capsula interna genannt, wird der Nucleus caudatus vom Putamen getrennt. Zellen, die mit dem Ziel das Pallidum zu bilden, aus dem medialen Teil des Ganglienhügels auswandern, kommen direkt medial neben den Zellen des zukünftigen Putamen zu liegen. Im ausgereiften Gehirn werden Pallidum und Putamen dann als Nucleus lentiformis zusammengefasst. Alle Kerngebiete vereint bilden die sogenannten Basalganglien. Der Entstehung des Diecephalons liegen fünf Zonen zugrunde: der Epithalamus, der dorsale Thalamus, der ventrale Thalamus, der Subthalamus und der Hypothalamus (Kahle 1956, Richter 1965). All diese Strukturen können schon vor dem vollendeten zweiten Schwangerschaftsmonat identifiziert werden (Yamadori 1965, Kostovic 1990). Die Zone des dorsalen Thalamus besteht zu Beginn nur aus einer dünnen Schicht, die sich jedoch im Laufe der Entwicklung durch ein enormes Zellwachstum und Zelldifferenzierung zu einem wichtigen Schaltzentrum entwickelt. Dort werden die Efferenzen und Afferenzen zwischen Telencephalon und Rückenmark moduliert.

### **1.6 Entwicklung der Schichten des Cerebellums**

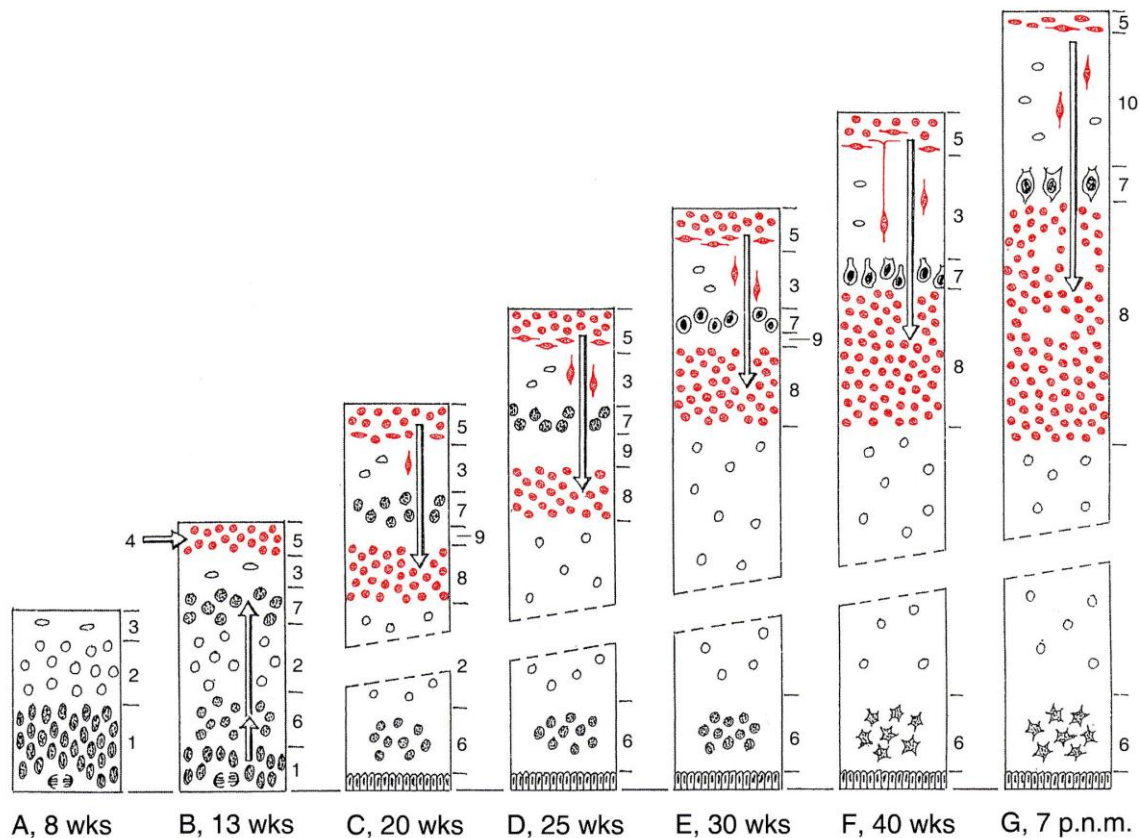
Das Kleinhirn entwickelt sich aus zwei Ausstülpungen der Flügelplatte zu beiden Seiten des Metenzephalons („rhombenzephalale Lippe“), die sich dorsal über den vierten Ventrikel wölben. Die Rautenlippen werden in rostrokaudaler Richtung zur Kleinhirnplatte zusammengedrückt. In der 12. Entwicklungswoche sind der Vermis und die beiden lateralen Hemisphären bereits zu erkennen. Zu Beginn setzt sich die Kleinhirnplatte aus der Ventrikulärzone sowie aus einer Intermediärzone und einer Marginalzone zusammen.

Zwei Zonen, die Ventrikulärzone und die Äußere Körnerzellschicht, sind für die Entstehung der Kleinhirnschichtung verantwortlich (Sidman and Rakic 1973, Rakic 1990, Hatten 1999, Wingate und Hatten 1999, Wingate 2001). Die Ventrikulärzone des Kleinhirns ist hauptsächlich zwischen dem zweiten und dem dritten Entwicklungsmonat aktiv. Sie bringt erst die Zellen der tiefen Kleinhirnkerne und später die Purkinjezellen hervor. Die Ursprünge (primordia) der Kleinhirnkerne entstammen der Kleinhirnplatte und sammeln sich durch tangentielle Migration rostrolateral an. Als eigenständige Masse sind diese ab der 10. Woche erkennbar. Sobald die Neurone der Hirnkerne ausgewandert sind, beginnt die Entwicklung der Purkinjezellen. Diese sammeln sich erst oberhalb der Ventrikulärzone und wandern später in den darüber liegenden Kleinhirnkortex. Um die 10. Woche bilden die



Purkinjezellen innerhalb der Mantelzone eine eigene Schicht. Die einzelnen Purkinjezellen reifen immer weiter und aus der ursprünglich mehrere Zellen dicken Schicht entwickelt sich allmählich die sogenannte Purkinjezellschicht, die nur noch eine Zelllage umfasst. Neben den Purkinjezellen und den Zellen der Kleinhirnkerne werden auch die Korbzellen, die Sternzellen und die Golgi-Zellen von der Ventrikulärzone gebildet (Hatten und Heintz 1995) oder gehen aus freien, in der weißen Substanz liegenden Vorstufen hervor.

Die Äußere Körnerschicht entwickelt sich aus den Rautenlippen des Metenzephalons. Dabei wandern Neuroblasten aus den Rautenlippen durch die Marginalzone an die Oberfläche des Kleinhirns aus und bilden dort die äußere Körnerschicht. Hier entsteht eine Proliferationszone, die im Gegensatz zum Neokortex noch Monate nach der Geburt weiter proliferiert, jedoch die höchste Proliferationsrate zwischen der 28. und 34. Entwicklungswoche der Schwangerschaft aufweist (Abraham et al. 2001). Die späteren Körnerzellen haben ihren Ursprung in der proliferierenden Äußeren Körnerzellschicht und werden in ihrer Wanderung in die tieferen Schichten des Kleinhirns durch die Gliazellen geleitet (Rakic 1971, Sidman und Rakic 1973). Bis zur 28. bzw. 32. Woche der fetalen Entwicklung werden die Purkinje- und die Innere Körnerzellschicht durch eine zellarme Lamina dissecans getrennt, die danach wieder verschwindet (Rakic und Sidman 1970). Die Molekularschicht verändert sich zwischen der 30. und 38. Woche nur geringfügig (Friede 1973) im Vergleich zur der danach einsetzenden Proliferation. Die adulte Schichtdicke wird annäherungsweise zwischen dem achten und neunten postnatalen Monat erreicht (Abraham et al. 2001) (siehe Abbildung 3). Die Schichtdicke der Äußeren Körnerzellschicht bleibt zwischen der 28. Schwangerschaftswoche und dem ersten postnatalen Monat unverändert, danach setzt die Rückbildung ein. Die letzten Überreste der Äußeren Körnerzellschicht verschwinden zwischen dem achten und elften Lebensmonat des Kindes (Abraham et al. 2001).



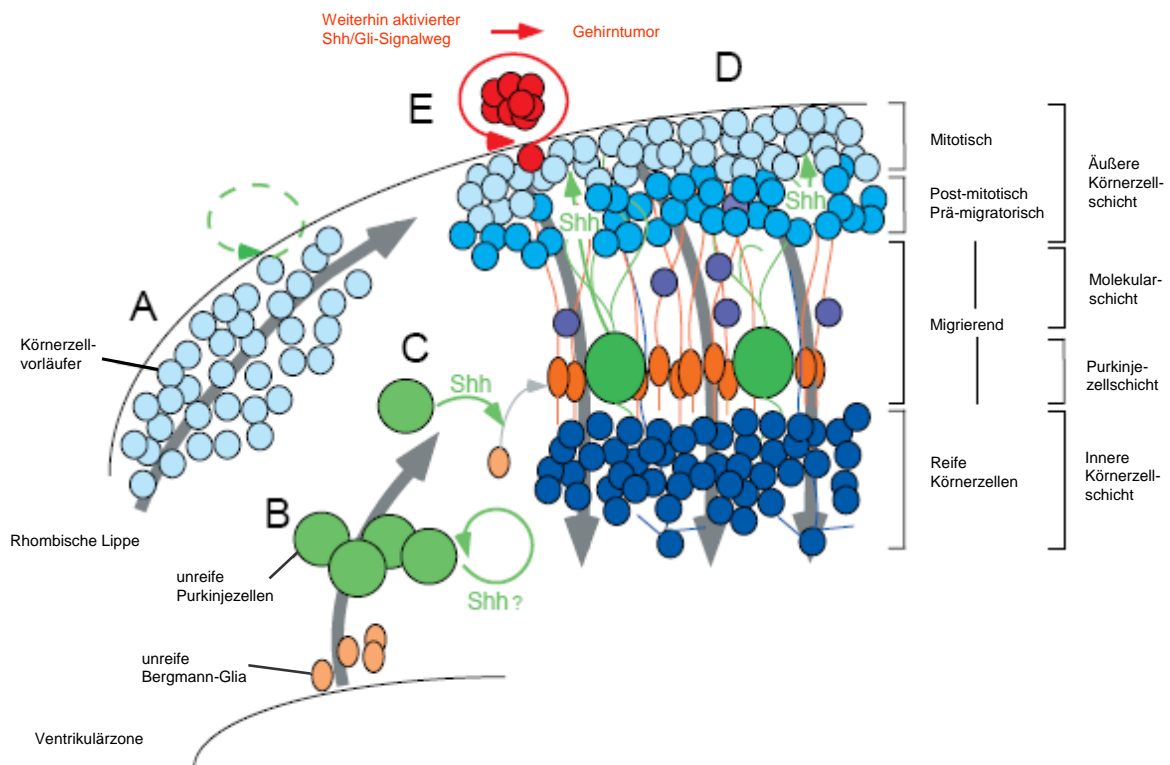
**Abbildung 3:** Darstellung der Histogenese des menschlichen Cerebellums in der achten Schwangerschaftswoche (A), der 13. Woche (B), der 20. Woche (C), der 25. Woche (D), der 30. Woche (E), der 40. Woche (F) und sieben Monate nach der Geburt (G). Die Pfeile stellen die Hauptmigrationsrichtung dar. Die Äußere Körnerzellschicht und ihre Abkömmlinge sind rot dargestellt. Bei den nummerierten Schichten handelt es sich um die Ventrikuläre Matrix (1), die Intermediärzone (2), die Marginalzone (3), die rhombische Lippe (4), die Äußere Körnerzellschicht (5), die tiefen Kleinhirnkerne (6), die Purkinjzellschicht (7), die Innere Körnerzellschicht (8), die Lamina dissecans (9) und die Molekularzellschicht (10) (aus Nieuwenhuys, Voogd, Van Huijzen 4. Auflage, basiert auf der Darstellung von Fujita 1969).

### 1.7 Migration im Kleinhirnkortex und Sonic Hedgehog

Shh scheint den Purkinjzellen bei der Migration von der Ventrikulärzone, dem Geburtsort der Purkinjzellen, gen Äußere Körnerschicht den Weg zu weisen (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999), da das Fehlen des Shh-Signals zur Ausbildung einer desorganisierten Purkinjzellschicht führt (Lewis et al. 2004).

Das Shh-Signal „wandert“ dann in Richtung Äußere Körnerzellschicht, lässt die Vorläuferzellen der Äußeren Körnerzellen proliferieren und belässt diese jedoch in

einer undifferenzierten Form (Stecca und Ruiz i Altaba 2005). Der Ligand Shh fördert nun die Ausreifung der Bergmann-Glia (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999). Die ausgereiften Bergmann-Glia hemmen ihrerseits die Shh-Expression (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999) und ermöglichen somit das Auswandern in die Innere Körnerzellschicht, bzw. die Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999). (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Darstellung der Rolle von Sonic Hedgehog in der Kleinhirnentwicklung. (A-D) Neuronale Körnerzellvorläufer migrieren tangential von der rhombischen Lippe und benutzen dabei wahrscheinlich den Shh-Signalweg in Mäusen in einer „transient autokrinen“ Weise (gestrichelter grüner Pfeile). (B) Purkinjezellen und später auch Bergmann-Glia entwickeln sich aus der Ventrikulärzone und migrieren gen Äußere Körnerzellschicht. Dabei könnten die Purkinjezellen Shh in einer autokrinen Weise nutzen. (C) Shh aus Purkinjezellen induziert die Reifung der Bergmann-Glia. (D) In der späteren Äußeren Körnerzellschicht proliferieren die Körnerzellvorläufer in der äußeren Schicht durch das von Purkinjezellen exprimierte Shh, sobald die Shh-Expression in der Äußeren Körnerzellschicht nachlässt. Zur gleichen Zeit senden ausgereifte Glia ihre Ausläufer in die innere Schicht der Äußeren Körnerzellschicht. Diese oder andere kortikale Zellen könnten dann Faktoren bereitstellen, die die

Differenzierung von Körnerzellvorläufern ermöglichen und somit im Rückschluss die Effekte von Shh antagonisieren. Die Körnerzellen wandern anschließend entlang der glialen Fasern durch die Molekularschicht und die Purkinjezellschicht, um die Innere Körnerzellschicht zu bilden. (D) Das Weiterbestehen des autokrinen Shh-Signals in der Äußeren Körnerzellschicht oder das Unvermögen, die Zelldifferenzierung einzuleiten, könnte die Entstehung von cerebellären Tumoren zur Folge haben (modifiziert nach Dahmane et al.1999).

## **1.8 Die Hedgehog-Familie**

Zum ersten Mal wurde ein Vertreter der Hedgehog-Familie bei der Suche nach Segment-Polaritäts-Mutationen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Später stellte sich heraus, dass der Hedgehog-Signalweg für die Entwicklung von vielen Organismen von entscheidender Bedeutung ist.

Dem Hedgehog-Signalweg wurde eine enorme Bandbreite von Funktionen bei Entwicklungsereignissen in der Fliege, in Wirbeltieren und in menschlichen Embryonen nachgewiesen. Zudem spielt der Signalweg eine zentrale Rolle bei der Tumorgenese (Hammerschmidt et al. 1997, Ingham 1998). Im Gegensatz zur *Drosophila* und anderen Wirbellosen (Invertebrata), die nur ein Hedgehog-Gen besitzen, verfügen Vertebraten über eine Familie von homologen Hedgehog-Genen. Diese umfasst Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh) (Echelard et al. 1993).

### **1.8.1 Desert Hedgehog und Indian Hedgehog**

Desert Hedgehog (Dhh) wirkt regulierend auf die Spermatogenese und beeinflusst die Organisation des Perineuriums, das die peripheren Nerven umhüllt. Indian Hedgehog (Ihh) hingegen ist involviert in die Proliferation und Reifung der Chondrozyten während der Entstehung des Knorpelskeletts (St.-Jacques et al. 1999).

### **1.8.2 Sonic Hedgehog**

Sonic Hedgehog wird von den Purkinjezellen gebildet, zur Proliferation von Körnerzellvorstufen benötigt und induziert die Differenzierung von Bergmann-Glia im Cerebellum. Eine Blockierung der Shh-Funktion führt zu einer mangelhaften

Differenzierung von Körnerzellen und Bergmann-Glia, sowie zu einer abnormen Purkinjezellentwicklung (Dahmane et al. 1999).

Im menschlichen Embryo konnte Shh in der Chorda dorsalis, der Flügelplatte des Neuralrohres, im Gehirn und in Zonen polarisierender Aktivität der sich entwickelnden Extremitäten und des Darms nachgewiesen werden (Odent et al. 1999). Eine gewebespezifische Verteilung der anderen Proteine des Sonic-Hedgehog-Signalweges konnte im menschlichen Embryo bisher noch nicht nachgewiesen werden, jedoch weiß man um die Expression von Gli1, Gli2 und Gli3-RNA in adulten menschlichen Gewebe (Ruppert et al. 1988).

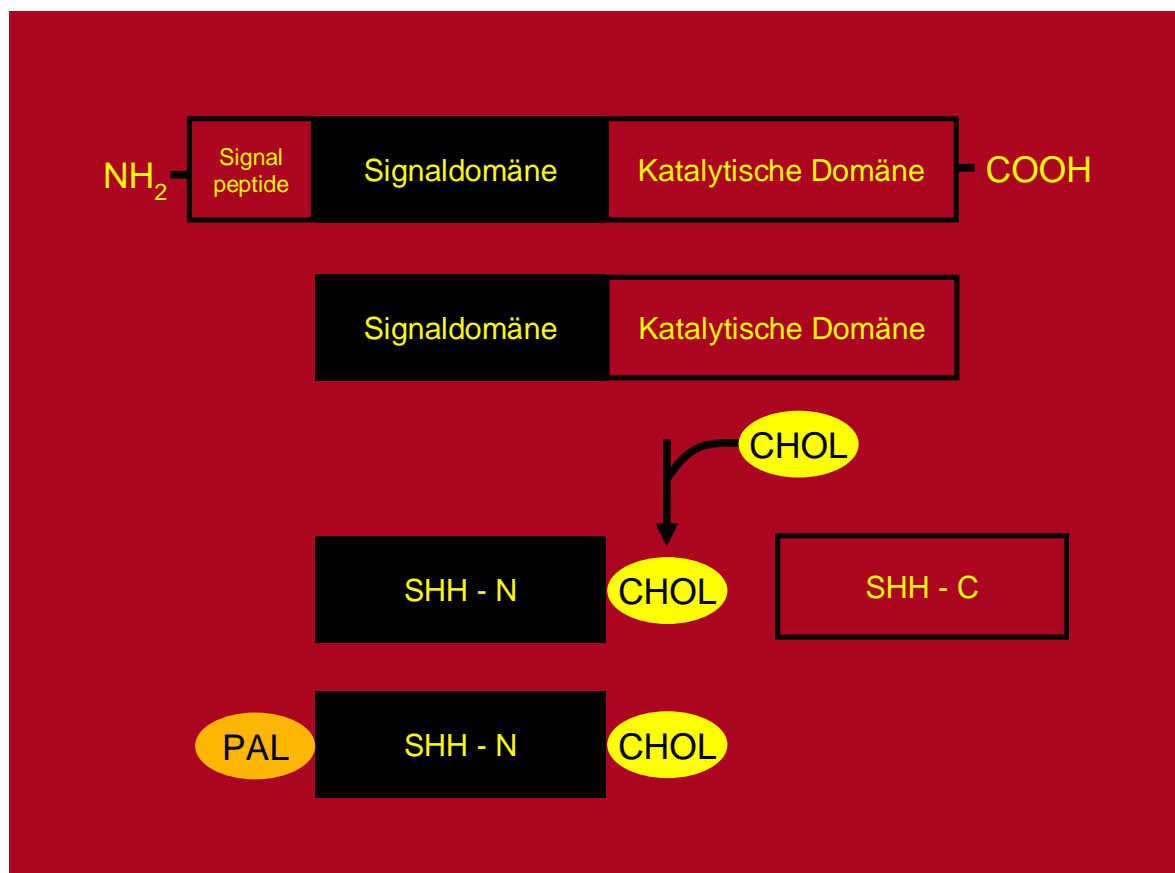
Das Sonic Hedgehog-Gen kodiert Signalmoleküle, die in der Embryonalentwicklung als kontaktabhängige Faktoren, in „short range“-, sowie als diffusionsfähige Morphogene, in „long range“- Prozesse, involviert sind (Johnson et al. 1995).

Eine aktuelle Arbeit von Balordi und Fishell zeigt den Effekt von embryonalem Smoothened-Verlust als Indikator für das Fehlen von Shh in der Subventrikulärzone (SVZ). Dabei wurden Stammzellreihen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Telenzephalon der Maus beobachtet. Auf der Basis von vorliegenden Ergebnissen, dass sowohl im Ruhezustand befindliche adulte neurale Stammzellen (B-Zellen) als auch teilungsaktive Vorläuferzellen (C-Zellen) auf das Hh-Signal reagieren (Ahn und Joyner 2005, Palma et al. 2005), wurden folgende Überlegungen vorgenommen: Die Arbeitsgruppe ging davon aus, dass in Smo-Null-Mutanten sowohl die B- und die C-Zellen, jedoch nicht die A-Zellen (Neuroblasten) beeinflusst sind. Die Studie zeigte eine normale SVZ bei Geburt, jedoch konnte zwei Wochen postnatal eine rapide Verminderung der B- und C-Zellpopulationen, sowie eine Zunahme der Zelltodrate beobachtet werden (Machold et al. 2003). Im Gegensatz dazu waren A-Zellen zu Beginn vermehrt nachweisbar, jedoch kam es nicht zur normalen Migration in die olfaktorischen Bulbi und ab dem 30. Lebensstag war auch hier ein Untergang der Zellpopulation zu beobachten. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass der Hh-Aktivierungsweg für die Aufrechterhaltung der B- und C-Zellpopulationen essenziell ist und des Weiteren indirekt für die Migration der Neuronen, die in der adulten Stammzellnische generiert werden, verantwortlich ist (Balordi und Fishell 2007).

**1.8.2.1 Cholesterol und Sonic Hedgehog**

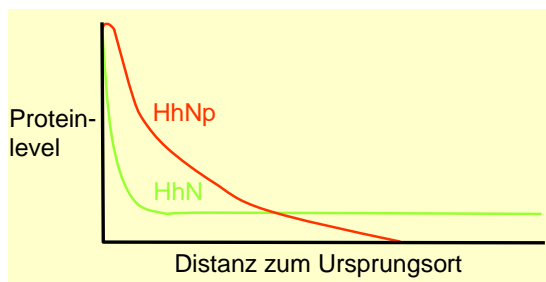
Wie alle Hedgehog-Proteine durchläuft auch Shh eine molekulare Modifikation im Endoplasmatischen Retikulum. Diese beinhaltet die Spaltung des Signalpeptids, gefolgt von einer autokatalytischen Teilung des Shh-Proteinvorläufers in eine ~19 kDa N-terminale Domäne (Shh-N), (Signaldomäne), und eine ~25 kDa C-terminale Domäne (Shh-C), (katalytische Domäne) (Marti et al. 1995). Shh-C besitzt intermolekulare Cholesterol-Transferaseaktivität und ist für die kovalente Bindung des Cholesterolmoleküles an die letzte Aminosäure des Shh-N-Fragments verantwortlich (Nybakken et al. 2002, Porter et al. 1996a). Die Anheftung des Cholesterols spielt eine wichtige Rolle bei der Verankerung in die Zellmembran und könnte bei der Lenkung des intrazellulären Transportes durch das Epithel von Bedeutung sein (Porter et al. 1996b, McMahon 2000).

Nach der Cholesterolanheftung erfolgt eine weitere Modifikation durch die Anknüpfung einer Palmitinsäure (PAL) an das aminoternale Ende (Pepinsky et al. 1998, Chamoun et al. 2001) (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Die Lipidmodifikation des Sonic Hedgehog-Proteins (Cohen 1999, Cohen und Shiota 2002).

Obwohl die duale Lipidmodifikation des Hedgehogproteins die Retention in der Zellmembran begünstigt, wurde paradoxerweise gezeigt, dass die Anheftung des Cholesterols ausschlaggebend für die „long-range“ Aktivität des Hh-Proteins ist. Eine Schlüsselrolle in der „long-range“ Signalübermittlung spielt der spezifische Eintritt in unterschiedliche Phasen des Zellzyklus. Dies geschieht in Abhängigkeit von spezifischen Schwellenwerten der Hh-Aktivität. Deshalb ist nicht nur die Reichweite, sondern auch die Stärke der Hedgehog-Aktivität entscheidend. Eine Abspaltung des Cholesterolrestes vom Protein würde die schnelle und uneingeschränkte Ausbreitung des Proteins ermöglichen und somit zu einer Störung der Verteilung der Signalaktivität führen. Durch den Verlust der Signalaktivitätsstärke kann der für den Eintritt in die verschiedenen Phasen des Zellzyklus benötigte Schwellenwert nicht mehr erreicht werden. Deshalb ist die Verbindung des Cholesterols mit dem Hedgehog-Protein entscheidend für die kontrollierte Diffusion durch Zellkomponenten, um die geeignete räumliche Verteilung der Signalaktivität zu ermöglichen (Ingham 2008) (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Darstellung der Gewebeverteilung der cholesterolabhängigen Signalaktivitätsstärke des Hedgehog-Proteins. Die kontrollierte Diffusion des an Cholesterol gekoppelten Proteins (HhNp) führt zu einer graduierten Verteilung. Dem gegenüber zeigt sich bei der unmodifizierten Form (HhN) ein rapider Abfall der Signalaktivität am Ursprungsort und daraufhin in der Peripherie eine relativ uniforme Verteilung der Signalstärke (Ingham 2008).

Um die Ablösung des Cholesterol-modifizierten Hedgehog-Proteins zu gewährleisten, bedarf es der Aktivität von Dispatched, einem Transmembranprotein (Burke et al.1999). Dispatched vermag den Einbau von Hedgehog-Proteinen in mizellenähnliche Komplexe oder in Lipoproteinpartikel voranzutreiben (Ingham 2008). Beide Funktionseinheiten können den Abtransport des Hedgehog-Moleküls von der produzierenden Zelle ermöglichen (Ingham 2008).

### 1.9 Der Sonic Hedgehog-Signalweg

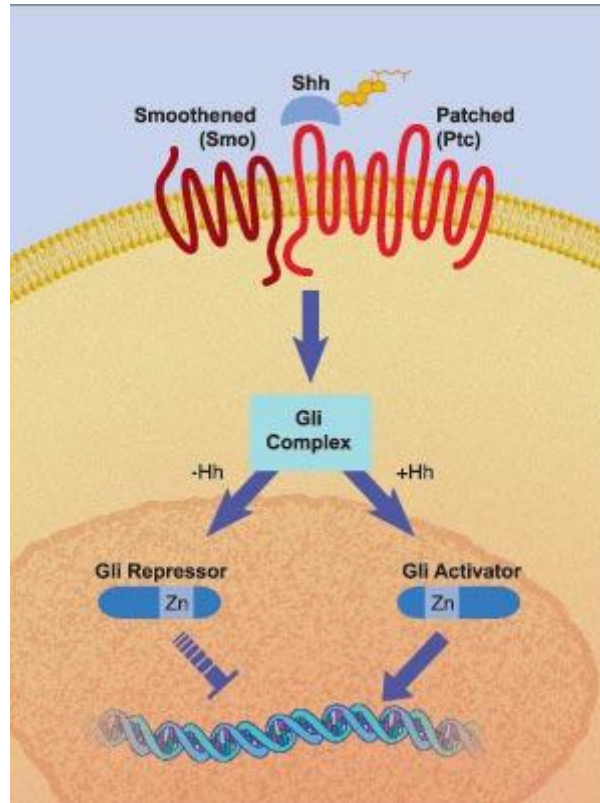
Das Shh-N bindet an das 12-Transmembranprotein Patched (Stone et al. 1996). Säugetiere besitzen zwei Patched-Proteine, die Hh jedoch mit der gleichen Affinität binden (Carpenter et al. 1998). Liegt kein Shh-Ligand vor, interagiert Patched mit dem 7-Transmembranprotein Smoothened und inhibiert dieses. Ob diese Inhibition durch die direkte Interaktion zwischen Patched und Smoothened oder durch weitere Proteinkomponenten geschieht, ist bis jetzt noch ungeklärt (Nakano et al. 2004, Huangfu und Anderson 2006). Bindet jedoch Shh an Patched, wird die inhibierende Funktion von Patched unterdrückt und somit die Hemmung von Smoothened aufgehoben. Zudem kommt es zu einer Anreicherung von Smoothened in der Plasmamembran (Incardona et al. 2002, Deneff et al. 2000). Es folgt eine Ligand unabhängige Signalweiterleitung von Smoothened. Smoothened interagiert nun mit dem Transkriptionsfaktor Cubitus interruptus (Ci) in Drosophila und der Gli-Familie in Vertebraten. Die Gli-Familie besteht aus 3 Mitgliedern: Gli1, Gli2 und Gli3, die in den Zellkern diffundieren und dort unterschiedliche Aufgaben als Transkriptionsfaktoren ausüben. Liegt der Hedgehog-Ligand vor, kommt es zu einer Modulierung der Aktivität der Gli-Familie (Ingham 2008) (siehe hierzu auch Abbildung 7). Die Rolle der einzelnen Familienmitglieder der Gli-Familie ist noch nicht eindeutig geklärt. In einem Modell wirken Gli1 (Lee et al. 1997) und Gli2 (Huangfu und Anderson 2006) aktivierend auf die Shh-Zielgene, während Gli3 eher hemmend wirkt (Ruiz i Altaba 1997). Ein anderes Modell geht davon aus, dass, analog zu Cubitus interruptus (Ci) in Drosophila, unterschiedliche Domänen des Gli3-Proteins gegensätzliche Effekte hervorrufen. Dabei vermittelt das Ci-75, welches im Zellkern lokalisiert ist, die Repressoraktivität und das „full-length“ Molekül (Ci-155), das im Zytoplasma beheimatet ist, übernimmt die aktivierende Wirkung (Biesecker 1997, Wang et al. 2000) (siehe auch Abbildung 9).

Studien mit Mausmutanten, in denen jeweils zwei Mitglieder der Gli-Familie ausgeschaltet wurden (double mutant mice), haben gezeigt, dass eine genetische Interaktion zwischen Gli1 und Gli2 in der Region des Dienzephalons (Park et al. 2000), Gli2 und Gli3 in der Skelettentwicklung (Mo et al. 1997), sowie in einer Reihe anderer Entwicklungsprozesse besteht. Jedoch konnten die Interaktionsmechanismen der Gli-Familie bis dato nicht eindeutig geklärt werden.

Im Gegensatz zur Signalweiterleitung in Drosophila spielen bei der Signaltransduktion in Vertebraten Zilien eine Rolle. Bei Untersuchungen von Maus-



mutanten, bei denen Zilien abwesend waren, zeigte sich eine stark reduzierte Prozessierung von Gli3 und ein Verlust der Gli2-Aktivität (Haycraft et al. 2005, Huangfu und Anderson 2005, Liu et al. 2005).



**Abbildung 7:** Der Sonic Hedgehog-Signalweg beinhaltet zwei Transmembranproteine, Patched (Ptch) und Smoothened (Smo). Shh bindet an Ptch, während Smo als Signalübermittler fungiert. Liegt kein Ligand vor, hemmt Ptch Smo. Durch diese Hemmung wird der Repressor der Transkriptionsfaktor-Familie Gli aktiviert. In der Anwesenheit des Shh-Liganden wird die Hemmung von Smo durch Ptch aufgehoben. Daraufhin dringen die Gli-Proteine in den Zellkern ein und führen dort ihre Aufgabe als Transkriptionsfaktoren aus (Gilbert 2000).

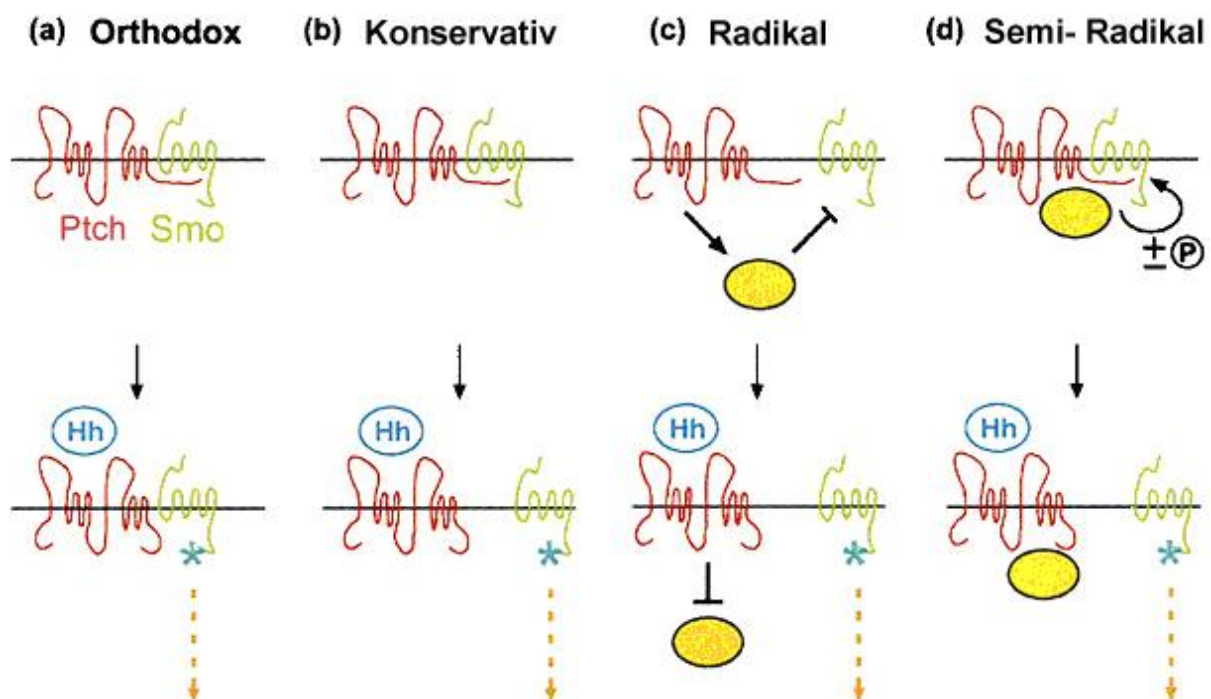
### 1.10 Interaktionen zwischen Patched und Smoothened

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, besteht bisher keine Klarheit über den genauen Interaktionsmechanismus zwischen Patched und Smoothened.

Häufig wird eine Hemmung des Smoothened-Proteins durch Patched innerhalb eines gemeinsamen Komplexes beschrieben. Bindet nun ein Molekül der Hh-Familie an Patched, kommt es zu einer Konformationsänderung des Patched-Smoothened-Komplexes und Smoothened kann nun das Hh-Signal übermitteln (Stone et al. 1996) (siehe Abbildung 8-a). Kalderon beschrieb in einem Review aus dem Jahre 2000 den

konventionellen Ansatz, sowie drei weitere Möglichkeiten der Interaktion der beiden Transmembranmoleküle.

Im zweiten Modell verursacht die Bindung von Hh an Patched eine Spaltung des Patched-Smoothened-Komplexes und es kommt somit zur Aktivierung von Smoothened (Chen und Struhl 1996) (Abbildung 8-b). Dem gegenüber hemmt im dritten Modell Patched mit Hilfe eines diffusionsfähigen Botenstoffes Smoothened. Der Botenstoff wiederum wird in der Anwesenheit eines Hedgehogmoleküls seinerseits gehemmt (Abbildung 8-c) und Smoothened somit aktiviert. Im letzten Modell inaktiviert ein an Patched gebundenes Enzym (vielleicht eine Kinase oder Phosphatase), Smoothened innerhalb des Patched-Smoothened-Komplexes. Jedoch katalysiert das Enzym die folgende Abspaltung von Smoothened, die durch eine Bindung mit Hedgehog ausgelöst wird. Als Folge der Verbindung mit Hh dissoziiert Smoothened von Patched und dessen assoziierten Enzym ab (Abbildung 8-d) (Kalderon 2000).



**Abbildung 8:** Modell der Regulierung der Smoothened-Aktivität durch Patched (Ptch) und Hedgehog (Hh). Zu (a): Patched inhibiert Smoothened innerhalb eines gemeinsamen Komplexes. Durch die Interaktion mit Hedgehog kommt es zu einer Konformationsänderung und somit zur Aktivierung von Smoothened. (b): Hedgehog aktiviert Smoothened durch eine Abspaltung von Smo aus dem Patched-Smoothened-Komplex. (c): Patched hemmt Smoothened mit Hilfe eines Botenstoffes

(gelbes Oval). Die Hh-Bindung hemmt wiederum die Wirkung des Botenstoffes.

(d): Ein mit Patched assoziiertes Enzym (vielleicht eine Kinase oder Phosphatase)

(gelbes Oval) hemmt Smoothened. Durch eine Hh-Bindung katalysiert das Enzym

die Abspaltung von Smoothened aus dem gemeinsamen Komplex und bewirkt somit dessen Aktivierung (modifiziert nach Kalderon 2000).

### **1.11 „Short- und long-range“ Signalübertragung**

Sowohl in Drosophila, als auch in Vertebraten, agiert Sonic Hedgehog in der Mehrheit durch eine Kombination aus „short- und long-range“ Signalübermittlung.

Dabei spielt in beiden Fällen das N-terminale Peptid die entscheidende Rolle bei der Signalmodulierung (Roelink et al. 1995, Porter et al. 1995, Porter et al. 1996a). Auf dem Signalweg kommt es zur Anheftung von Cholesterol an das N-Shh. Durch die Lipophilie bleibt das Fragment direkt mit der Zellmembran verbunden (Roelink et al. 1995).

„Short-range“ Vorgänge lassen sich über die Distanz von ein bis zwei Zelldurchmessern und durch eine kontaktabhängige Kommunikation erklären. Schwieriger gestaltet sich die Vorstellung, wie ein membranständiges Peptid auch in der Ferne interagieren soll. Dabei kommen mehrere Überlegungen in Betracht: Die einfache Diffusion von Shh, ein Schaltmechanismus, bei dem Shh ein zweites System aktiviert oder die direkte Übertragung von Shh über zytoplasmatische Ausläufer (Zeng et al. 2001). Sowohl in Zellkulturen, als auch in vivo konnte das Modell der einfachen Diffusion bestärkt werden.

In Studien wurde ein lösliches, am N-terminalen Ende verändertes Shh verwendet. Hierbei konnte im Hühnerembryo gezeigt werden, dass dieses veränderte Gen in der Lage ist, die Induktion von Motoneuronen via „long-range“ Effekten zu steuern (Roelink et al. 1995). Auch in der Entwicklung der Extremitätenknospen der Maus ist die Anheftung des Cholesterols für die normale Signalweiterleitung von großer Bedeutung. Zusätzlich konnte auch hier die einfache Diffusion von Shh über mehrere Hundert Mikrometer dargestellt werden (Lewis et al. 2001).

Einer Arbeitsgruppe aus Ohio gelang es, eine frei diffusionsfähige, biologisch potente und cholesterolmodifizierte (n-ShhNp) Shh-Form nachzuweisen. Zudem konnte die Notwendigkeit eines Gradientenaufbaus von Shh gezeigt werden, der für die „long-range“ Signalübermittlung von hoher Bedeutung ist (Zeng et al. 2001). Studien mit dem Fokus auf die Entwicklung des Neuralrohres von Hühnerembryonen konnten dies ebenfalls bestätigen. Hierfür wurden durch Deletion veränderte Patched-Gene

zur Blockierung des Hedgehog-Signalweges verwendet (Briscoe et al. 2001). Die Visualisierung des Shh-Signals, durch die Verwendung von immunhistochemischen Verfahren in der Maus, ließ den Schluss zu, dass zur „long-range“ Signalübermittlung keine sekundären Mediatoren notwendig sind. Die Signalreichweite konnte in Abhängigkeit von jeweiligem Gewebe über beachtliche Strecken nachgewiesen werden. Jedoch gelang dies nur nach der Konservierung von Proteoglykanen/Glycosaminoglykanen (PG/GAG), was den Schluss nahe legt, dass PG/GAG einen Einfluss auf die Shh-Signalübermittlung besitzen (Gritli-Linde et al. 2001).

## **1.12 Die Weggefährten des Shh im Sonic Hedgehog-Signalweg**

### **1.12.1 Patched**

Das 12-Transmembranprotein Patched (Ptch) (Patched protein homolog 1) ist ein Rezeptor für Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh). In Vertebraten gibt es zwei Patched-Formen, Ptch1 und Ptch2. Beide binden mit der gleichen Affinität an Hedgehog (Carpenter et al.1998). Ptch1 ist beschränkt auf Zielzellen des Signalweges und wird in Abhängigkeit von Shh herauf reguliert. Im Gegensatz dazu ist Ptch2 mit Shh coexprimiert und die Transkription ist unabhängig vom Shh-Signalweg (St.Jacques et al. 1998).

Ptch interagiert mit dem Smoothened-Protein (Smo) (Murone et al. 1999), um die Hedgehog-Proteine zu modifizieren bzw. den Hedgehog-Signalweg herunterzu-regulieren (Taipale et al. 2002). Zusätzlich wird die Ausbreitung von Shh reduziert (Martin et al. 2001). Jedoch wird in Anwesenheit von Shh die Inhibition von Smoothened aufgehoben und somit der Signalweg wieder aktiviert (Murone et al.1999).

Die Ausbreitung des Hedgehog-Signals wird über ein negatives Feedback gesteuert. Hedgehog bewirkt eine Heraufregulierung der Expression des Transmembranproteins Patched. In Vertebraten wird zusätzlich das Transmembranprotein Hip (Hedgehog interacting protein) (Chuang und McMahon 1999) heraufreguliert, welches ebenfalls die Fähigkeit besitzt Hedgehog zu binden. Beide spalten Shh ab und erhöhen gleichzeitig die rezeptorvermittelte Endozytose, was zu einer Aufnahme von Shh in die Zelle führt. Auf diesem Wege können Zellen, die auf das Hh-Signal reagieren, die Ausbreitung des Signals dämpfen (Chuang und McMahon 1999, Chuang et al. 2003). Dieser Effekt kann im Prinzip über zwei Wege moduliert

werden, einmal durch die Endozytoserate und zum anderen durch die Stärke der Transkriptionsantwort von Patched und Hip auf die Aktivität des Hedgehog-Signalweges (Ingham 2008).

### **1.12.2 Smoothened**

Das Smoothened-Protein, ein 7-Transmembranprotein, ist mit dem Patched-Protein assoziiert, um die zelluläre Antwort des Sonic Hedgehog-Proteins zu vermitteln (Murone et al. 1999). Dabei wird das Protein für die Transduktion des Hedgehog-Proteinsignals über die Zellmembran in die Zelle benötigt. Patched besitzt die Möglichkeit Smoothened zu blockieren und somit die Signalübermittlung von Shh zu stoppen, jedoch kann diese Blockierung durch die Verbindung mit Shh wieder aufgehoben werden. Onkogene Formen (Stone et al. 1996, Xie et al. 1998) des Smoothened Proteins können wiederum durch Patched nicht blockiert werden (Murone et al. 1999). Obwohl eine Ähnlichkeit zu G-Protein-bindenden Rezeptoren besteht, ist sowohl die molekulare Basis der Smoothened Aktivität als auch die endgültige Regulation noch unklar (Nakano et al.2004).

### **1.12.3 Die Gli-Familie**

Das Gli-Protein wurde als Gliom assoziiertes Onkogen benannt, da es mehr als 50-fach verstärkt in malignen Gliomen zu finden ist (Kinzler et al 1987). Das Gen beinhaltet fünf Wiederholungen der Zink-Finger-Sequenz und gehört somit in die Krüppel-Familie (Kr) der Zink-Finger-Proteine. Drei Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3 sind die Schlüsselregulatoren in der Ziel-Gen-Expression, in Verbindung mit dem Shh-Signal. Dabei vermitteln die Transkriptionsfaktoren der Polymerase, welches Gen aktiviert bzw. reprimiert werden soll. Damit die Transkription beginnen kann, tragen sie dazu bei, die RNA-Polymerase am Promoter in die richtige Position zu bringen und die beiden DNA-Stränge zu trennen. Die Aktivatoren funktionieren nach zwei Prinzipien: Sie binden entweder an den RNA-Polymerasekomplex und verleihen der Polymerase somit eine höhere Bindungsaffinität zum aktivierenden Promoter oder sie haben eine Histon-Acetyl-Transferase-Funktion. Durch die Acetylierung von Histonen wird das Chromatin aufgelockert, womit die RNA-Polymerase einen besseren Zugang zur DNA bekommt und damit effizienter binden bzw. transkribieren kann. Bei den Repressoren verhalten sich die Prinzipien genau gegenläufig - die Histon-

Deacetylasen führen zu einer dichteren Verpackung der DNA, und durch die Blockade von Polymerasebindungsstellen folgt das Absenken der Bindungsaffinität. Somit ist die Aktivierung bzw. Inhibition der Transkription das Ende einer langen Signalübertragungskette, die durch den Liganden Shh ausgelöst werden kann.

### **1.12.3.1 Gli 1**

Es konnte gezeigt werden, dass das humane Gli1 eine C-terminale Aktivierungsdomain besitzt und als Aktivator in Sachen Transkription fungiert (Lee et al. 1997). Eine hemmende Wirkung von Gli1 konnte nicht nachgewiesen werden (Lee et al. 1997, Yoon et al. 1998, Dai et al. 1999). In der Maus kommt Gli 1 im ventralen Neuralrohr vor, wobei die Expression vom Shh-Signal abhängig ist (Bai et al. 2002). Jedoch zeigen Mausmutanten, denen die Gli1 Expression komplett fehlt, keine Entwicklungsdefekte (Park et al. 2000, Bai und Joyner 2001), zumal eher Gli2 initial auf die Shh-Signal bedingte Zellenantwort reagiert als Gli1 (Bai et al. 2002).

### **1.12.3.2 Gli 2**

Bisher wird davon ausgegangen, dass humanes Gli2 nur als Aktivator fungiert, während das Gli2-Protein der Maus sowohl die Aufgaben der Aktivierung (C-terminale Domäne), als auch der Inhibition (N-terminale Domäne) übernimmt (Sasaki et al. 1997, Tanimura 1998, Dai et al. 1999, Ruiz i Altaba 1999, Shin et al. 1999).

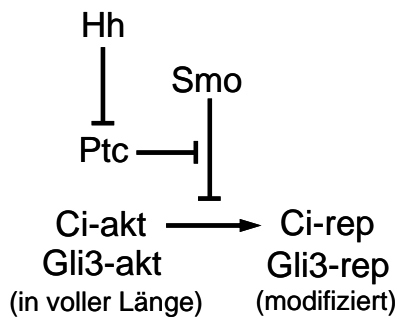
Mausmutanten ohne Gli2-Funktion zeigen Störungen bei der Bildung der Bodenplatte (Matisse et al. 1998) und des ventralen Neuralrohres (Ding et al. 1998, Park et al. 2000). Gli2 und auch Gli3 spielen bei der Entstehung vieler Organe eine Rolle, unter anderem der Lunge, der Trachea und dem Ösophagus (Mo et al. 1997, Grindley et al. 1997, Motoyama et al. 1998).

Roessler et al. schloss aus seiner Studie, dass die N-terminale Repressionsdomäne eine wichtige Rolle in der Modulation der Funktion des Wildtyp Gli2-Proteins spielt und deshalb essenziell für die dominant-negative Aktivität des Gli2-Mutanten in der Verbindung mit humanen Erkrankungen sein könnte (Roessler et al. 2005).

### **1.12.3.3 Gli 3**

Unterschiedliche Arbeitsgruppen zeigten, dass Gli3 sowohl aktivierend (Dai et al. 1999), als auch inhibierend (Wang et al. 2000) auf die Gli1-Transkription und die Proteinaktivität wirkt. Das Gli3-Protein der Maus hat eine C-terminale Aktivierungs-

domäne, sowie eine N-terminale Repressions-Domain (Kim et al. 2003), die im Modell scheinbar die Funktionen des Aktivators, als auch des Inhibitors der Gene HNF-3 $\beta$  (Sasaki et al.1999), Gli1 (aktivieren: Dai et al. 1999, inhibieren: Wang et al. 2000) und Patched (Villavicencio 2000) innehat (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Ci/Gli3 kann entweder als aktivierende (Gli3-akt) oder hemmende (Gli3-rep) Form agieren. Das Hh-Signal hemmt die Prozessierung von Gli3, in dem es die Funktion von Patched als Unterdrücker der Smoothened-Funktion hemmt. Ohne Patched hält Smoothened Gli3 in der aktivierenden Form (Motoyama 2006).

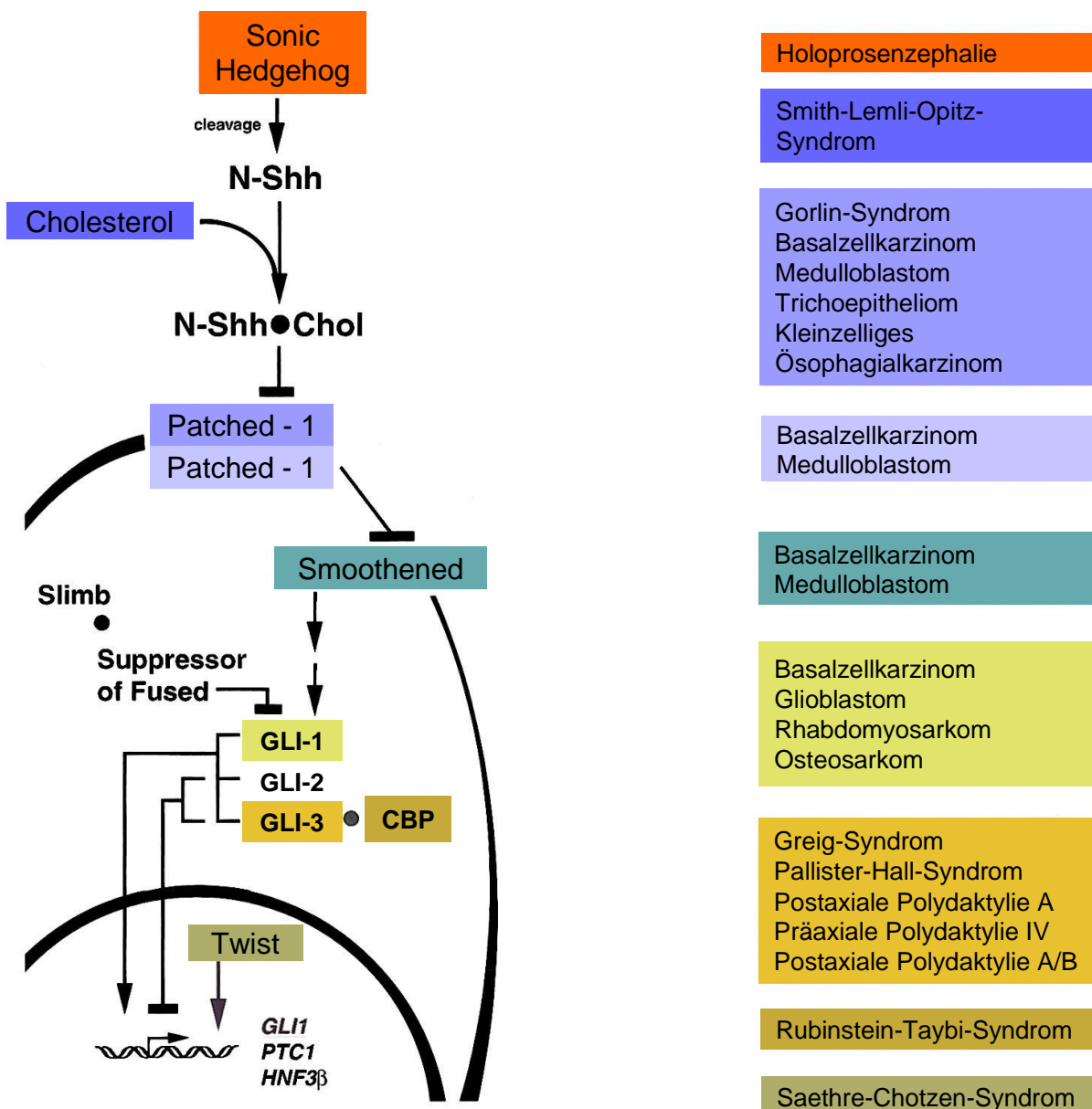
Im Mausembryo wurde gezeigt, dass die Balance zwischen Shh-Signal und der Gli3 Inhibition für die Entwicklung des Neuralrohrzellmusters entscheidend ist (Litingtung und Chiang 2000, Persson et al. 2002, Meyer and Roelink 2003). Interessanterweise kommt es durch eine Mindereexpression von Gli3 im Mausembryo im intermediären Neuralrohr zu einer dorsalen Expansion (Persson et al. 2002).

Mäuseembryonen, in welchen keines der 3 Gli-Proteine exprimiert wird, weisen mehrere Unterbrechungen in der Organisation des ventralen Neuralrohres auf (Bai et al. 2004, Lei et al. 2004). In diesen Embryonen fehlt die Mehrzahl der ventralen Zelltypen, genauso wie die räumlich festgelegte Genexpression, die für die Ausbildung des ventralen Neuralrohres essentiell ist. Somit reifen die notwendigen, für ihr Zellmuster charakteristischen Zellen nicht mehr an ihrer richtigen Position aus und es kommt zu einer extrem vermischten Verteilung der unterschiedlichen neuronalen Zellsubtypen entlang der dorsal-ventral-Achse des Neuralrohres. Diese Entdeckung lässt den Schluss zu, dass die Entwicklung des dorsal-ventralen Zellmusters des ventralen Rückenmarks entscheidend vom Vorhandensein der Gli-Proteine abhängig ist (Stamatakis et al. 2005).

Um die Funktion der einzelnen Proteine des Signalweges besser verstehen zu können, bedarf es eines Blickes auf deren Fehlfunktionen bzw. das Resultat beim Ausfall der einzelnen Proteine.

Aus diesem Grund widmet sich das folgende Kapitel der Shh-Signalweg assoziierten Pathologie.

**1.13 Die Pathologie des Sonic Hedgehog-Signalweges**



**Abbildung 10:** Der bisher bekannte, im Menschen anzutreffende Shh-Signalweg, wird links dargestellt. Die mit dem Signalweg assoziierten Erkrankungen kommen rechts zur Darstellung. Die Assoziation der Erkrankungen mit den einzelnen Proteinen des Signalweges wird durch die gleiche Farbe dargestellt. Die Abfolge des



Signalweges, sowie die Funktion als Aktivator (Pfeil) oder als Repressor (Querbalken), konnte im Menschen nachgewiesen werden.

Ausnahmen stellen dar: Die Interaktion zwischen Gli3 und CREB-Binding Protein (CBP), die durch CBP aus der Maus nachgewiesen wurde (Dai et al. 1999). Die humanen Gli-Gene wurden in Maus- und Froschzellen getestet (Ruiz i Altaba 1998, Dai et al. 1999). Der Vollständigkeit halber wurden die Funktionen des Gli2-Proteins der Maus dargestellt, da im Menschen noch keine spezifischen Erkrankungen nachgewiesen werden konnten (Tamimura et al. 1998, Sasaki et al. 1999). (modifiziert nach Villavicencio et al. 2000).

### **1.13.1 Sonic Hedgehog-Signalweg assoziierte Pathologien**

#### **1.13.1.1 Holoprosenzephalie**

Holoprosenzephalie (HPE) ist eine häufige Ursache für intrauterinen Fruchttod beim Menschen. HPE kann in 1/250 Schwangerschaften, aber nur bei 1/16 000 Lebendgeburten nachgewiesen werden (Cohen 1989). Es besteht ein Mittelliniendefekt mit Lippenkieferraumenspalte, fehlerhafte Teilung der Hemisphären, Fehlen der Riechkolben und des Corpus callosum, Hypotelorismen bis hin zum Zyklopenauge.

Sporadische und vererbte Mutationen im menschlichen Shh-Gen verursachen Holoprosenzephalie (Roessler et al. 1996, Roessler et al. 1997, Vargas et al. 1998, Odent et al. 1999, Nanni et al. 1999) (siehe auch Abbildung 10). Dennoch spielen auch andere Mutationen bei der Entstehung eine Rolle, z. B. ZIC2 (Brown et al. 1998,2001), SIX3 (Wallis et al. 1999), TGIF (Gripp et al. 2000), Ptch (Ming et al. 2002), Gli2 (Dubourg et al. 2007 und TDGF1 (De La Cruz et al. 2002). Jedoch konnte eine Mutation des Shh-Gens als häufigster Einzel-Gendefekt ausgemacht werden (Nanni et al. 1999). Es werden verschiedene Formen der HPE unterschieden. Zu ihnen zählen:

- **alobäre Holoprosenzephalie**

Es besteht keine Trennung des Telenzephalons in zwei Hemisphären, kein Interhemisphärenspalt und nur ein Hirnventrikel ist ausgebildet (Cohen 1989 [Part III]). Der Thalamus und das Corpus striatum verlaufen ungeteilt über die Mittellinie. Die Riechkolben sowie der Tractus olfactorius fehlen, auch das Corpus callosum ist nicht ausgebildet. Jedoch können ein paar einzelne Kommissurenfasern die Mittellinie überkreuzen (Cohen 2006). Zudem können

verschiedene kraniofaziale Anomalien wie Zyklopie oder prämaxillare Agenesie bestehen (DeMyer 1964, Nanni et al. 2000).

- semilobäre Holoprosenzephalie

Eine teilweise Trennung des Telenzephalons ist vorhanden, daraus ergibt sich ein hinterer Interhemisphärenspalt mit rudimentären Hemisphären, jedoch besteht weiterhin nur ein Hirnventrikel. In den meisten Fällen fehlen der Riechkolben und der Tractus olfactorius. Diese können jedoch auch hypoplastisch ausgebildet sein. Das Corpus striatum läuft ungetrennt über die Mittellinie. Das Corpus callosum ist kein vollständiges Bündel, dennoch kreuzen einige Kommissurenfasern die Mittellinie (Cohen 2006).

- lobäre Holoprosenzephalie

Bei dieser Form ist die Trennung in zwei Hemisphären größtenteils erfolgt, ein kompletter Interhemisphärenspalt ist vorhanden. Es bestehen zwei Seitenventrikel mit einer rudimentären Verbindung. Die Riechkolben und der Tractus olfactorius können fehlen oder sind hypotroph, das Corpus callosum kann fehlen, hypoplastisch oder normal sein. Die Trennung des Thalamus und des Corpus striatum kann an der Mittellinie weiterhin unvollständig sein (Cohen 2006).

### **1.13.1.2 Smith-Lemli-Opitz-Syndrom**

Defekte bei der Cholesterolanheftung an das Shh-Protein führen zum autosomal rezessiv vererbten Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (SLOS) (siehe auch Abbildung 10). Diese Erkrankung hat einige Gemeinsamkeiten mit Defekten der anderen Proteine des Shh-Signalweges. Dies legt die Überlegung nahe, ob das Syndrom einfach ein Produkt aus dem gestörten Signalweg darstellt (Donnai et al. 1987, Tintet al.1994, Kelley et al.1996). Erkrankte weisen eine Syndaktylie, antevertierte Nasenhöhlen, Ptosis, Kryptorchismus (Hodenhochstand), ZNS-Hypoplasie, Gedeihstörungen, gelegentlich eine Polydaktylie und eine Holoprosencephalie auf. Der Großteil der Patienten verstirbt im ersten Lebensjahr (Kelley et al. 1996).

Aktuelle Studien zeigen des Weiteren eine Beziehung zwischen primären Zilien und dem Hedgehog-Signalweg der Maus. Diese Ergebnisse regen zu der Überlegung an, ob Fehler im Hh-Signalweg auch im Menschen Defekte der Zilien hervorrufen und somit eine Assoziation mit dem Bardet-Biedl-Syndrom, dem Kartagener-Syndrom,

den polyzystischen Nierenerkrankungen und der retinalen Degeneration besteht (Pan et al. 2005).

### **1.13.2 Patched-Pathologie**

Mutationen im Tumorsuppressorprotein Patched wurden in Patienten mit Basalzell-Nävus-Syndrom und in Basalzellkarzinomen identifiziert (Stone et al. 1996, Ora et al. 1997, Reifenberger et al. 2005). Patienten mit vererbten Ptch-Mutationen leiden am autosomal dominanten Nävoid-Basalzell-Karzinom-Syndrom, auch Gorlin-Syndrom genannt (Hahn et al. 1998, Fujii et al. 2003). Dieses Syndrom führt zu einer erhöhten Rate an malignen Entartungen der Basalzell-Nävi und zu einem erhöhten Risiko an Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen zu erkranken (siehe auch Abbildung 10). Zusätzlich besteht ein erhöhtes Risiko für ein übermäßiges Körperwachstum, Entwicklungsstörungen in Form von kurzen Metakarpalknochen, Rippendefekten, einem breiten Gesicht und Zahnmissbildungen (Bale et al. 1991, Gorlin 1995). Zudem wird vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Medulloblastomen (Dahmane et al. 1999) bzw. Rhabdomyosarkomen sowie dem Verlust des funktionsfähigen Proteins Patched und somit der Überexpression von Shh besteht.

### **1.13.3 Smoothened-Pathologie**

Aktivierten Smoothenedmutanten wurde die Funktion als Onkogene nachgewiesen (Stone et al. 1996, Xie et al. 1998). Zusätzlich ließen sich Smoothened-Mutationen in Basalzellkarzinomen (Xie et al. 1998, Tojo et al. 1999, Reifenberger et al. 2005) und Medulloblastomen ausmachen. Zudem resultiert eine Mutation des Smoothened-Proteins in einer Dysregulation des weiteren Signalweges und somit der nachfolgenden Gli-Familie (Villavicencio et al. 2000). In Studien mit Mausmutanten, in denen die Funktion von Shh und Smo ausgeschaltet war, zeigten sich unter anderem Fehlbildungen bei der Herz- und Darmanlage, zudem konnte ein Zyklopenauge beobachtet werden (Zhang et al. 2001).

### **1.13.4 Gli1-Pathologie**

Gli1 wurde erstmals als amplifiziertes Gen im Glioblastom entdeckt. Später wurde es dann auch in einigen Osteosarkomen, Rhabdomyosarkomen und B-Zelllymphomen detektiert (Roberts et al. 1989, Werner et al. 1997) (siehe auch Abbildung 10).

Zudem konnte eine Überexpression von Gli1 in Basalzellkarzinomen im Vergleich zur normalen Haut des Erwachsenen nachgewiesen werden (Dahmane et al. 1997, Ghali et al. 1999). Der Grad der Überexpression korreliert (unabhängig ob durch Amplifikation oder Mutation) mit dem Tumorgrad in adulten Knochen oder im Weichteilsarkom (Stein et al. 1999). Gli1 wurde als Onkogen klassifiziert, da es die Fähigkeit besitzt, in Interaktion mit dem Adenovirus E1A Zellen zu transformieren (Ruppert et al. 1991).

Die Expression von Gli1 in transgenen Mäusen resultierte in einer Reihe von Entwicklungsstörungen, in Form von Gedeihstörungen und Morbus Hirschsprung-ähnlichen Dilatationen im Gastrointestinaltrakt (Yang et al. 1997).

### **1.13.5 Gli2-Pathologie**

Bis jetzt wurden keine spezifischen Erkrankungen im direkten Zusammenhang mit Gli2 nachgewiesen. Dennoch ist durch Studien mit Mäusen bei einer Gli2-Unterfunktion ein Zusammenhang mit Basalzellkarzinomen, Skelettdefekten, Lungendefekten und anderen Fehlbildungen wahrscheinlich (Sasaki et al. 1999, Grachtchouk et al. 2000, Park et al. 2000, Mullor et al. 2002).

### **1.13.6 Gli3-Pathologie**

In diversen Geburtsdefekten konnten Mutationen von Gli3 identifiziert werden. Translokationen, Deletionen und Punktmutationen im Gli3-Gen verursachen das „Greig Cephalopolysyndactyly Syndrom“ (GCPS) (siehe auch Abbildung 10). Dieses Syndrom setzt sich aus einer Syndaktylie, einer prädominanten präaxialen Polydaktylie, breiten Daumen und Großzehen, sowie fazialen Anomalien in Form von Hypertelorismen und einer deutlich erhöhten Stirnpartie zusammen (Vortkamp et al. 1991, Wild et al. 1997, Freese et al. 2003). Gli3 frameshift und nonsense Mutationen sind mit dem Pallister-Hall-Syndrom (PHS) assoziiert. Das autosomal dominant vererbte Syndrom beinhaltet hypothalamische Hamartome, zentrale oder postaxiale Polydaktylie, Syndaktylie, einen verschlossenen Anus, antevertierte Nasenhöhlen, andere faziale Anomalien und gelegentlich bestehen eine assoziierte Holoprosenzephalie sowie Malformationen des axialen Skeletts (Kang et al. 1997, Kalff-Suske et al. 2004). Entgegen früheren Veröffentlichungen korrelieren die Art und der Ort der Gli3-Mutation nicht mit dem klinischen Phänotyp der Erkrankung (Kalff-Suske et al. 1999).

In aktuellen Studien konnte die Verbindung zwischen einer Mutation in Gli3 und dem NDH-Syndrom hergestellt werden. Dieses Syndrom zeichnet sich durch die Hauptsymptome neonatalen Diabetes mellitus und einen kongenitalen Hypothyroidismus aus (Taha et al. 2003, Senee et al. 2006).

#### **1.14 Ziele der Arbeit**

Bisher ist zu der Verteilung von Sonic Hedgehog und den Proteinen seines Signalweges im Menschen noch sehr wenig bekannt. Dennoch weiß man, dass ein Verlust der Shh-Aktivität zu einer Reihe von fetalen Missbildungen wie Holo-prosenzephalie, Polydaktylie, kraniofazialen Defekten und Skelettfehlbildungen führt (McMahon et al. 2003). Verminderte Aktivität des Hedgehog-Signals ist assoziiert mit Basalzellkarzinomen, Medulloblastomen und Rhabdomyosarkomen. Zudem konnte auch eine Verbindung zu anderen Neoplasien nachgewiesen werden (Pasca di Magliano und Hebrok 2003).

Da bis jetzt über die Verteilung der Moleküle des Shh-Signalweges im gesunden, sich entwickelnden humanen Gehirn wenig bekannt ist, soll in dieser Arbeit eine umfangreiche Darstellung der im Shh-Signalweg hauptsächlich involvierten Moleküle hinsichtlich ihrer räumlich-zeitlichen Verteilung erfolgen. Im Fokus der Dissertation stehen das Sonic Hedgehog-Protein selbst, sowie Patched, Smoothed und die Moleküle der Gli-Familie mit ihren im humanen Gewebe vorkommenden Vertretern Gli1, Gli2 und Gli3. Dabei werden die Großhirnrindenschichten und die Kleinhirnschichtung in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien im gesunden fetalen ZNS-Gewebe, in Abhängigkeit der Proteinexpression des Shh-Signalweges, betrachtet. Zusammenfassend soll diese Arbeit einen Beitrag zu den Kenntnissen über die räumlich-zeitliche Verteilung des Shh-Proteins und seinen Signalmolekülen im sich entwickelnden menschlichen Gehirn leisten, und somit eine Voraussetzung für ein besseres Verständnis pathologischer Alterationen darstellen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Patientendaten

Für die vorliegende Arbeit wurden ZNS-Gewebeproben aus einem Kollektiv von 22 Feten zwischen der 12. und der 28. Schwangerschaftswoche, aus dem Institut für Hirnforschung Tübingen, ausgewählt. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, unter dem Vorsitz von Prof. Dr. D. Luft, liegt vor.

In die Arbeit gingen nur Gewebeproben ein, die sowohl histologisch als auch makroskopisch keine neuropathologischen Auffälligkeiten aufwiesen und bei welchen keine Chromosomenstörungen nachgewiesen wurden. Bei entzündlichen Grunderkrankungen der Mutter oder speziell inflammatorischen Veränderungen der Plazenta wurde explizit darauf geachtet, dass das fetale ZNS-Gewebe nicht mit betroffen war.

**Tabelle 1:** Patientendaten mit Ursache des Todes

Fall-Nr.	Hirnregion	SSW-Alter	Ursache des Aborts
1	Kleinhirn/ Cortex frontal	26	Nach Sectio bei vorzeitiger Plazentalösung postpartal verstorben
2	Kleinhirn/Hirnstamm/ Cortex frontal	13	intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
3	Kleinhirn/Hirnstamm/ Cortex frontal	18	intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis
4	Kleinhirn/Hirnstamm/ Hemisphäre	19	intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
5	Kleinhirn/Hirnstamm/ Hemisphäre	21	intrauteriner Fruchttod bei Chorioamnionitis und Plazentitis
6	Kleinhirn/Hirnstamm/ Hemisphäre	19	Interruptio bei Anhydramnion und Geminigravidität
7	Kleinhirn/Hirnstamm/ Hemisphäre	19	Interruptio bei Anhydramnion und Geminigravidität
8	Kleinhirn/ Hemisphäre	17	intrauteriner Fruchttod bei vorzeitiger Plazentalösung
9	Hirnstamm/ Hemisphäre	13	intrauteriner Fruchttod bei vorzeitiger Plazentalösung

10	Hirnstamm/ Parietallappen	14	Interruptio auf Wunsch der Eltern
11	Hirnstamm/ Hemisphäre	16	Interruptio auf Wunsch der Eltern
12	Kleinhirn/Hirnstamm Cortex frontal	28	intrauteriner Fruchttod bei fetofetalen Transfusionssyndrom
13	Kleinhirn/ Cortex frontal	21	Interruptio bei Anhydramnion und Verdacht auf Nierenagenesie
14	Hirnstamm/ Hemisphäre	22	Interruptio nach vorzeitigem Blasen- sprung und Anhydramnion
15	Kleinhirn/Hirnstamm Hemisphäre	18	Interruptio nach vorzeitigem Blasen- sprung
16	Kleinhirn/Hirnstamm Hemisphäre	14	Interruptio nach vorzeitigem Blasen- sprung
17	Hirnstamm/ Hemisphäre	13	Ausstoßung in 13. SSW
18	Kleinhirn/ Hirnstamm Hemisphäre	22	Frühgeburt postpartal verstorben
19	Kleinhirn/ Hemisphäre	12	intrauteriner Fruchttod bei rupturierter Gravidität
20	Kleinhirn/ Hemisphäre	14	Interruptio nach vorzeitigem Blasen- sprung
21	Kleinhirn/ Hemisphäre	16	intrauteriner Fruchttod bei kollabierter Fruchtblase
22	Hirnstamm/ Cortex frontal	20	Interruptio bei schweren kardialen Fehlbildungen

## 2.2 Makroskopische und histologische Beurteilung

Die verwendeten Hirnpräparate wurden von zwei Fachärzten der Neuropathologie sowohl makroskopisch als auch histologisch (Hämatoxylin-Eosin Färbung) beurteilt. In die Studie gingen nur Feten ein, die keine Hinweise auf pathologische Alterationen der ZNS aufwiesen. Kein Ausschlusskriterium stellten leichte hypoxische Veränderungen des Hirngewebes dar, die als natürliche auftretende präterminale Vorgänge angesehen werden.

### **2.3 Untersuchte Hirnregionen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vor allem zwei Regionen des ZNS, die Großhirn- und die Kleinhirnrinde, untersucht. Die Rindenareale wurden wiederum hinsichtlich ihrer spezifischen altersabhängigen Schichtung beurteilt.

#### 1.) Großhirnrinde

- Marginalzone
- Rindenplatte
- Sekundäre Rindenzone
- Intermediärzone
- Subventrikulärzone
- Ventrikulärzone

#### 2.) Kleinhirnrinde

- Äußere Körnerzellschicht
- Molekularzellschicht
- Innere Körnerzellschicht

### **2.4 Herstellung von histologischen Präparaten**

In 4%-igem Formalin werden die Gehirne in phosphatgepufferter Kochsalzlösung fixiert (pH 7,4). Dies geschieht bevor die entnommenen Hirnareale in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%, 100%, 100%), zweifach in einem 100%-igen Alkohol- und Chloroformgemisch (1:1), sowie zweifach in einem Chloroformbad entwässert werden.

Danach werden diese in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom (Microm HM 355 S, Walldorf, Deutschland) in ca. 3µm dicke Scheiben geschnitten und auf 'Superfrost Plus Objektträger' der Firma R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik (Teningen, Deutschland) aufgezogen.

Die Vorbehandlung der Präparate für die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgt durch Entparaffierung in 3 mal 10 Minuten Chloroform, und die anschließende Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 70%, destilliertes Wasser) für jeweils 2 Minuten.



## **2.5 Immunhistochemie**

### **2.5.1 Verwendete Antikörper**

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden Antikörper verwendet, die sich gegen die untenstehenden Antigene richten.

Die Färbungen wurden bei allen oben aufgeführten Fällen, sowohl bei den Kleinhirn- wie auch bei den Großhirnschnitten, durchgeführt.

#### **2.5.1.1 Sonic Hedgehog**

Der verwendete Antikörper ist erneut ein polyklonales Immunglobulin der Klasse IgG und stammt aus der Ziege. Die Verdünnung des Primärantikörpers mit TBS betrug in dieser Arbeit 1:240. Der Antikörper wurde von der Firma Biozol, Eching, Deutschland geliefert und hatte eine Konzentration von 1.00 mg/ml.

#### **2.5.1.2 Patched**

Bei dem Antikörper gegen Patched handelt es sich um ein polyklonales Immunglobulin aus dem Hasen, das der Klasse IgG angehört. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung mit TBS von 1:50 verwendet. Die Konzentration betrug 1.00 mg/ml. Der Antikörper wurde von der Firma Biozol, Eching, Deutschland bezogen.

#### **2.5.1.3 Smoothened**

Der Antikörper gegen Smoothened wurde von der Firma Biozol, Eching, Deutschland hergestellt. Es handelt sich dabei um ein polyklonales Immunglobulin der Klasse IgG, wurde im Hasen hergestellt und in einer Konzentration von 1.00 mg/ml geliefert. Der Primärantikörper fand in einer TBS-Verdünnung von 1:200 Anwendung.

#### **2.5.1.4 Gli1**

Der Transkriptionsfaktor Gli1 wurde mit einem polyklonalen Immunglobulin der Klasse IgG detektiert. Die Herstellung des Antikörpers erfolgte im Hasen (Biozol, Eching, Deutschland). Es wurde eine Verdünnung mit TBS von 1:300 verwendet.

### 2.5.1.5 Gli2

Von der Firma Abcam (Cambridge, England) wurde das polyklonale Immunglobulin der Klasse IgG, das im Hasen gezüchtet wurde, bezogen. Die Konzentration betrug 2.00 mg/ml und die verwendete TBS-Verdünnung betrug 1:100.

### 2.5.1.6 Gli3

Der Antikörper, der gegen das Antigen von Gli3 gerichtet ist, ist ein monoklonales Immunglobulin der Klasse IgG2a Kappa. Es handelt sich dabei um den Klon 2C9 und dieser wurde in der Maus hergestellt. Die Firma Biozol, Eching, Deutschland lieferte das Produkt in einer Konzentration von 1.00 mg/ml, das in dieser Arbeit in einer Verdünnung von 1:200 Verwendung fand.

**Tabelle 2:** Verwendete Antikörper und ihre Eigenschaften (\* Bei Gli1 handelt es sich um die Proteinkonzentration)

Antikörper	Verdünnung	Antikörper - konzentration	Spezifität	Vorbehandlung	Entwicklungszeit	Sekundär Antikörper
SHH	1:240	1 mg/ml	polyklonal	Mikrowelle	2'30''	Anti-Ziege
Patched	1:50	1 mg/ml	polyklonal	Mikrowelle	11'00''	Anti-Hase
Smoothened	1:200	1 mg/ml	polyklonal	Mikrowelle	11'00''	Anti-Hase
Gli1	1:300	70 mg/ml*	polyklonal	Mikrowelle	10'00''	Anti-Hase
Gli2	1:100	2 mg/ml	polyklonal	Mikrowelle	10'00''	Anti-Hase
Gli3	1:200	1 mg/ml	monoklonal	Mikrowelle	11'00''	Anti-Maus

## 2.5.2 Durchführung der Immunfärbung

Die zuvor entparaffinierten Schnitte werden einer Mikrowellenvorbehandlung unterzogen, um die Antigene freizulegen. Dazu werden diese für 15 min in einem Citratpuffer bei 750 Watt gekocht.

Nach dem Abkühlen erfolgt die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität mit einem Gemisch aus 60 ml Wasserstoffperoxid und 190 ml 100%-igem Methanol für 15 Minuten.

Um die unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, werden die Schnitte mit 1:10 verdünntem Schweineserum in TBS/BSA-Lösung inkubiert.

Danach erfolgt bei 4° Celsius die Inkubation über Nacht mit dem TBS/BSA verdünnten Primärantikörper (Verdünnung siehe Tabelle).

Nach der TBS-Spülung wird der 1:400 (TBS/BSA) verdünnte, entsprechende biotnylierte F(ab')<sub>2</sub>-Brückenantikörper (DAKO) (siehe Tabelle) für 30 min auf die Schnitte gegeben. Die Wahl des Sekundärantikörpers ist von der Spezies des Primärantikörpers und dessen Klonalität abhängig.

Es folgt ein weiterer Waschgang mit TBS, nach dem das Gewebe für weitere 30 Minuten mit einem Peroxidase-gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (ABC, DAKO) inkubiert wird. Nach einer erneuten Spülung werden die spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als Chromogen sichtbar gemacht (Hsu et al. 1981).

Durch die Gegenfärbung mit Hämatoxylin werden anschließend die Zellkerne sichtbar gemacht, zur besseren Differenzierung erfolgt noch eine Spülung in 0,1%-igem HCl-Alkohol. Zur Entwässerung durchläuft das Gewebe eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, 100%, je zwei Minuten), sowie drei mal fünf Minuten das Xylolbad, wonach die Schnitte mit einem Deckglas bestückt werden. Für die Überprüfung der durchgeführten Methode wurden bei jeder Färbung Negativkontrollen (Fötenhirn) sowie Positivkontrollen (Colon CA) mitgeführt. Zur Herstellung der Negativkontrollen wurden diese über Nacht nur mit einer TBS-Lösung inkubiert.

### **2.5.3 Verwendete Reagenzien**

#### **2.5.3.1 Farbstoffreagenzien**

- **DAB- Lösung**

95 mg DAB (3,3 Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Quelle: DAKO, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)) wurden in 180 ml Aqua dest. gelöst, es folgten 20 ml Substratpuffer (10-fach) und 700 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt).

- **Avidin-Biotin-Komplex**

Reagenzien: Avidin (A), biotinylierte Meerrettichperoxidase (B), pH 7,2, 5 µl Lösung (A) und 5 µl Lösung (B) wurden mit 1000 µl TBS-Gebrauchslösung 30 Minuten vor Gebrauch angesetzt.

Quelle: DAKO, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

### 2.5.3.2 Lösungen

- Citratpuffer-Stammlösung  
21,1 g Zitronensäure-Monohydrat (Merck 244, Darmstadt) gelöst in 1000 ml Aqua dest. = 0,1 M und auf pH 6 eingestellt.
- Citratpuffer-Gebrauchslösung  
Citratpuffer-Stammlösung wurde mit Aqua dest. 1:10 verdünnt.
- Schweineserum (Blockierungslösung)  
Gebrauchslösung: Verdünnung 1:10 mit TBS/ Albuminpuffer
- Substratpuffer (10-fach)  
21 g Zitronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt), 34 g Imidazol (Fluka, Neu-Ulm) und 29,2 g NaCl wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst. Kontrolle des pH-Wertes auf 7,0.
- TBS-Stammlösung  
60,6 g Tris und 163,6 g NaCl wurden in 1500 ml Aqua dest. gelöst und mit 25 % HCl auf pH 7,5 eingestellt.  
Danach wurde die Lösung auf 2 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt.
- TBS-Gebrauchslösung  
TBS-Stammlösung wurde mit Aqua dest. 1:10 verdünnt.
- TBS/ BSA- Puffer  
50 mg Albumin Bovine Fraction V (Serva) gelöst in 50ml TBS-Puffer.

### 2.6 Lichtmikroskopische Auszählung und Auswertung

Die Auszählung der sechs Antikörper erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus, VANOX, Hamburg, Deutschland) bei einer 40-fachen Vergrößerung, anhand eines histologischen Scores (siehe Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Histologischer Score

	1	2	3	4
Intensität	schwach	mittel	stark	-----
Frequenz	1% - 10%	10% - 25%	25% - 50%	> 50%

Die Auswertung der zu untersuchenden Hirnschichten erfolgte in der Erfassung der Frequenz sowie der Intensität. Die Beurteilung der Intensität wurde anhand der Farbintensität der positiv gefärbten Zellen vorgenommen. Die Frequenz wurde durch

den prozentualen Anteil der positiv gefärbten Zellen ermittelt. Die Erfassung, sowohl der Frequenz, als auch der Intensität, erfolgte dann mit Hilfe eines Score-Systems. Zuerst wurde jeder Antikörper mit den für die Region typischen Rindenschichten separat betrachtet. Danach schloss sich die Gegenüberstellung der einzelnen Rindenschichten, sowohl für das Großhirn, als auch für das Kleinhirn, an. Um eine Assoziation mit dem Alter detektieren zu können, wurde anschließend die Expressionsfrequenz als auch die Expressionsintensität mit der Schwangerschaftswoche und somit dem Alter des Feten ins Verhältnis gesetzt.

Zuerst werden die Daten des fetalen Großhirns dargestellt, danach, nach denselben Kriterien, die des fetalen Kleinhirns.

Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden mit einer Digitalkamera, einer DP 72 der Firma Olympus (Hamburg, Deutschland), aufgenommen.

## **2.7 Statistische Auswertung**

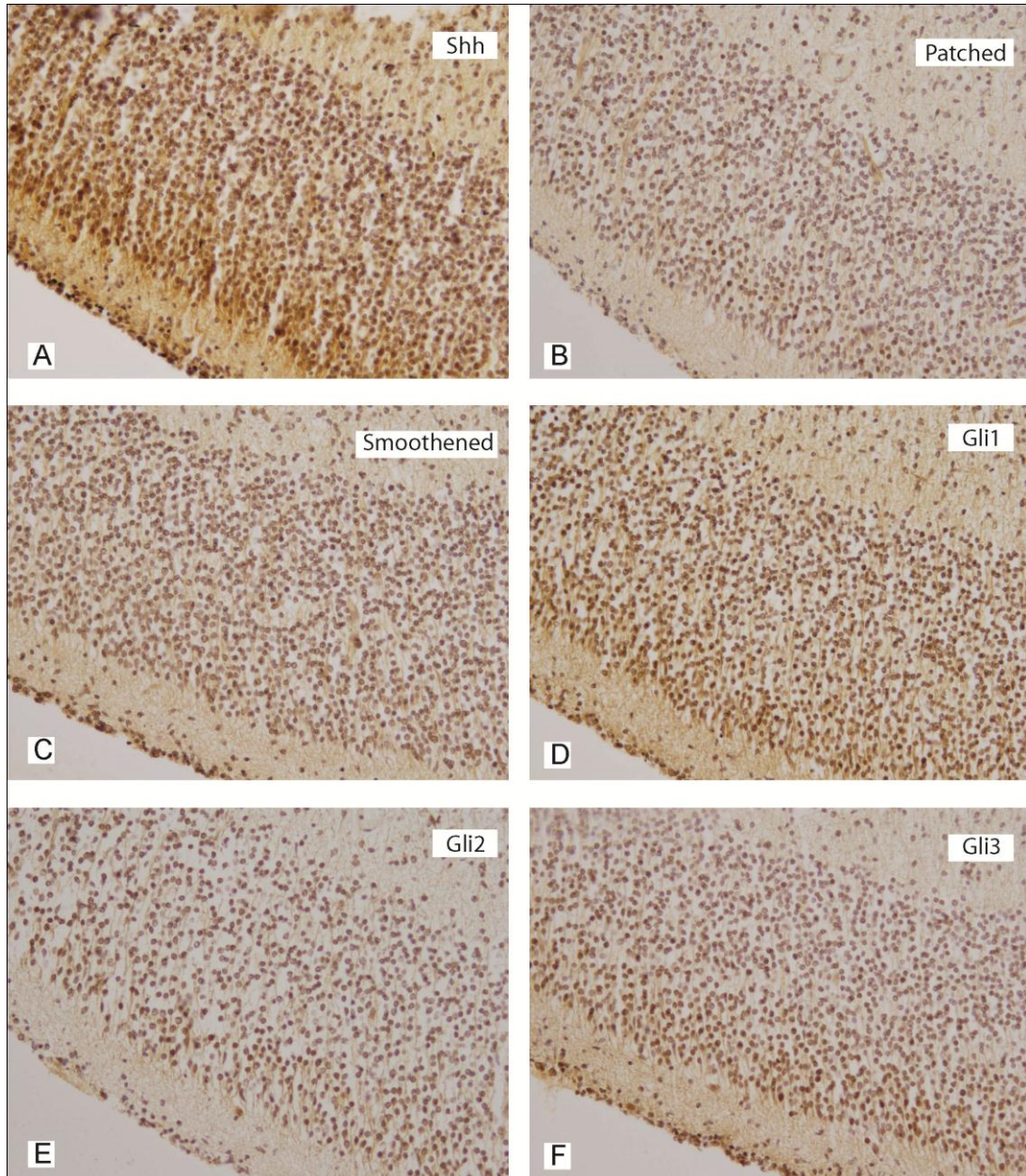
In einem linearen Regressionsmodell wurden die Zielvariablen (Frequenz und Intensität) in Abhängigkeit von der erklärenden Variablen (Region) beschrieben und mittels einer anschließenden einfaktoriellen Varianzanalyse auf Unterschiede getestet. Als Schätzmethode wurde die Methode der kleinsten Quadrate angewandt und anschließend individuelle paarweise Vergleiche für die Mittelwerte der kleinsten Quadrate mittels Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Um eine Assoziation des fetalen Alters mit der Zielvariablen (Frequenz und Intensität) zu untersuchen, wurde eine ordinale logistische Regression durchgeführt. Anschließend wurde mittels des likelihood-ratio Chi-Quadrat Tests die Hypothese überprüft, dass die x-Variable (Schwangerschaftswoche) keinen Effekt auf die Zielvariable hat. Der Vergleich des Expressionslevels der untersuchten Faktoren in verschiedenen Regionen wurde mittels Kontingenz-Analyse und nachfolgendem likelihood-ratio Chi-Quadrat Test durchgeführt. Für alle Untersuchungen wurde ein alpha-Signifikanzniveau von 0,05 gewählt. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms JMP 7.0.

Die graphische Darstellung der statistischen Ergebnisse erfolgte innerhalb der Tabellen anhand einer Skala von:

\* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Immunhistochemische Verteilung der untersuchten Faktoren im fetalen Großhirn



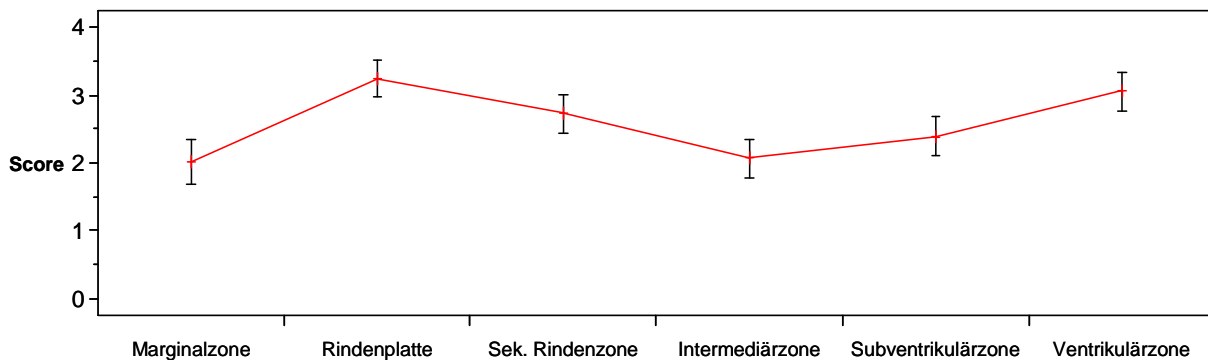
**Abbildung 11:** Darstellung der Marginalzone, der Rindenplatte, der sekundären Rindenzone und Teilen der Intermediärzone für die Großhirnhirne (14.SSW.) aller sechs Antikörper (A – F). 20-fache Vergrößerung.

### 3.1.1 Statistische Auswertung der Sonic Hedgehog-Immunhistochemie

#### 3.1.1.1 Shh-Frequenz

Die Rindenplatte mit einem Mittelwert von 3,23 (95%-KI von 2,92 bis 3,53) bildet den höchsten Wert in der 6-Schichtung, jedoch dicht gefolgt von der Ventrikulärzone mit einem Wert von 3,05 (95%-KI von 2,73 bis 3,37) und der sekundären Rindenzone mit 2,71 (95%-KI 2,42 bis 3,01). Überträgt man dies auf den Score, der der Auswertung zu Grunde lag, ergibt sich eine Immunreaktivitätsrate im Bereich von 25-50%.

Wobei die anderen drei Schichten mit Werten von 2,36 (95%-KI von 2,01 bis 2,71) in der Subventrikulärzone, 2,05 (95%-KI von 1,78 bis 2,31) in der Intermediärzone und dem Mittelwert von 2,00 (95%-KI 1,74 bis 2,25) in der Marginalzone, im Scorebereich einer Frequenz von 10-25% liegen (siehe dazu auch Tabelle 3).



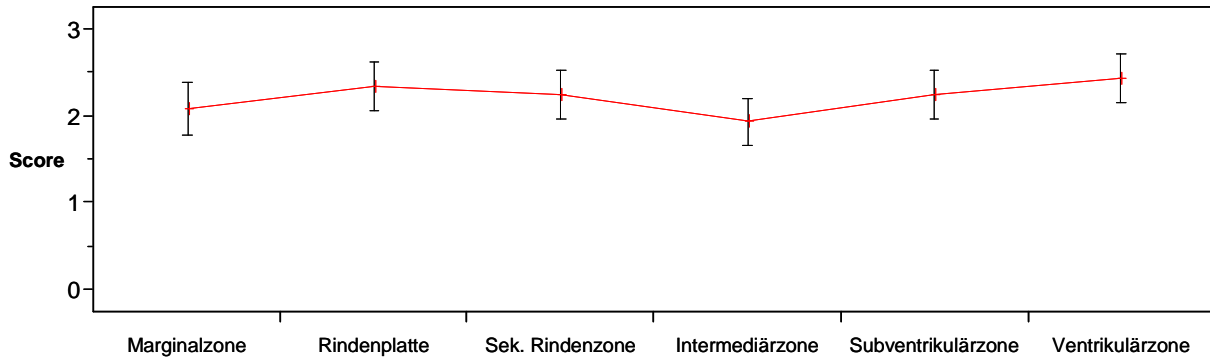
**Abbildung 12:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate von Shh, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Großhirnes.

Im Kurvenverlauf der Immunreaktivitätsrate zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Frequenz zwischen der Marginalzone und der Rindenplatte ( $p < 0,0001$ ). Es folgt ein Abfall der Werte in der sekundären Rindenzone ( $p < 0,05$ ). Der Tiefpunkt zeigt sich in der Intermediärzone ( $p < 0,01$ ). In der Subventrikulärzone fällt eine jedoch nicht signifikante Zunahme der Werte auf. Die Kurve endet mit einem weiteren Anstieg der Frequenz in der Ventrikulärzone ( $p < 0,01$ ).

#### 3.1.1.2 Shh-Intensität

Betrachtet man nun die Intensität, ergibt sich der höchste Mittelwert in der Ventrikulärzone mit einem Wert von 2,41 (95%-KI von 2,11 bis 2,07), danach folgt die Rindenplatte mit 2,31 (95%-KI von 2,07 bis 2,57). Gleichauf liegen bei einem Mittelwert von 2,23 die Subventrikulärzone (95%-KI von 1,96 bis 2,50) und die

sekundäre Rindenzone (95%-KI von 1,92 bis 2,53). Die Marginalzone erreicht einen Wert von 2,06 (95%-KI von 1,38 bis 2,37) und die Intermediärzone ein Mittel von 1,91 (95%-KI von 1,74 bis 2,37).



**Abbildung 13:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität von Shh, aufgetragen über die einzelnen Schichten des fetalen Neokortex

Bei der Betrachtung der Abbildung 13 zeigt sich, im Vergleich zur Marginalzone, eine diskrete Erhöhung der Immunreaktivitätsintensität in der Rindenplatte. Es folgt ein Abfall der Intensität bis in die Intermediärzone, der Wert ist jedoch nicht signifikant niedriger, als die danach wieder ansteigenden Werte in der Subventrikulär- und der Ventrikulärzone.

### 3.1.1.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Shh

Bei der Beurteilung des Shh-Proteins ergaben sich bei der Gegenüberstellung der einzelnen Rindenschichten folgende Werte für Frequenz und Intensität:



**Tabelle 4:** Gegenüberstellung der Großhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Shh. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

Frequenz Intensität	Marginal- zone	Rinden- platte	Sek. Rinden- zone	Intermediär- Zone	Subventrikulär- zone	Ventrikulär- zone
<b>Marginal- Zone</b>						
<b>Rinden- Platte</b>	<,0001 *** 0,2105					
<b>Sek. Rinden- Zone</b>	0,0014 ** 0,4121	0,0132 * 0,6469				
<b>Intermediär- Zone</b>	0,8275 0,4840	<,0001 *** 0,0409 *	0,0016 ** 0,1105			
<b>Subventrikulär- Zone</b>	0,0946 0,4121	<,0001 *** 0,6469	0,0881 1,0000	0,1238 0,1105		
<b>Ventrikulär- Zone</b>	<,0001 *** 0,0927	0,3687 0,6469	0,1070 0,3601	<,0001 *** 0,0128 *	0,0010 ** 0,3601	

Bei der statistischen Auswertung, mittels Varianzanalyse der Immunreaktivitätsfrequenzen für Shh, unterscheidet sich die Marginalzone signifikant von der Rindenplatte ( $p < 0,001$ ), der sekundären Rindenplatte ( $p < 0,01$ ) und der Ventrikulärzone ( $p < 0,001$ ). Die Rindenplatte ihrerseits weist einen statistisch relevanten Unterschied zur sekundären Rindenzone ( $p < 0,05$ ), zur Intermediärzone ( $p < 0,001$ ) und zur Subventrikulärzone ( $p < 0,001$ ) auf. In der Gegenüberstellung der sekundären Rindenzone mit der Intermediärzone ( $p < 0,01$ ) zeigt sich auch hier eine signifikante Differenz. Sowohl die Intermediärzone ( $p < 0,001$ ), als auch die Subventrikulärzone ( $p < 0,01$ ) zeigen beim Vergleich mit der Ventrikulärzone für die Immunreaktivitätsrate ein signifikantes Ergebnis.

Bei der statistischen Beurteilung der Immunreaktivitätsintensität für Shh ließ sich hingegen ein signifikantes Ergebnis zwischen der Rindenplatte und der Intermediärzone ( $p < 0,05$ ), sowie zwischen der Ventrikulärzone und der Intermediärzone ( $p < 0,05$ ) darstellen.

### 3.1.1.4 Altersabhängige Shh-Immunreaktivität

Hier wurde nun das fetale Alter zum einen in Verbindung mit der Frequenz und zum anderen mit der Intensität analysiert, um eine mögliche Assoziation der Proteinexpression mit dem Alter des menschlichen Feten zu ermitteln. Dabei ergaben sich folgende Werte:

**Tabelle 5:** Darstellung der P-Werte der Großhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für das Signalmolekül Shh. Zusätzliche Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

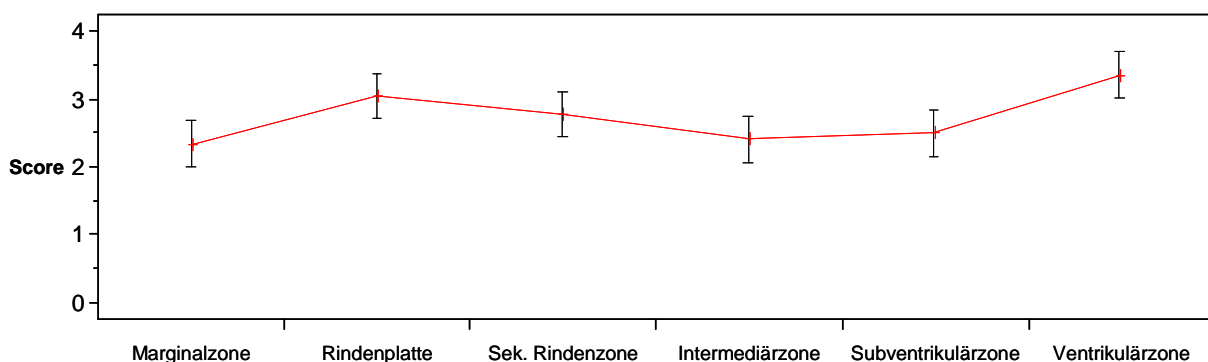
	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Marginalzone	1,0000	—	0,7764	↑
Rindenplatte	0,0652	↓	0,1912	↑
Sek. Rindenzone	0,4140	↓	0,1566	↑
Intermediärzone	0,7356	↓	0,4422	↑
Subventrikulärzone	0,4315	↓	0,1498	↓
Ventrikulärzone	0,1800	↓	0,0478	↓*

Bei der Betrachtung der altersabhängigen Immunreaktivitätsrate und –intensität zeigt sich für die Frequenz eine stetige Abnahme der Werte, jedoch ohne signifikante Relevanz. Für die Shh-Intensität lässt sich aber in den Ventrikel fernen Schichten eine Zunahme, in den Ventrikel nahen Schichten eine Abnahme, die in der Ventrikulärzone ( $p < 0,05$ ) einen statistisch relevanten Wert erreicht, beobachten.

### 3.1.2 Statistische Auswertung der Patched-Immunhistochemie

#### 3.1.2.1 Patched-Frequenz

Der höchste Mittelwert mit 3,36 (95%-KI von 2,99 bis 3,74) ergibt sich in der Ventrikulärzone, gefolgt von der Rindenplatte mit einem Wert von 3,05 (95%-KI von 2,65 bis 3,44) und der sekundären Rindenzone mit 2,77 (95%-KI 2,41 bis 3,13). Die Subventrikulärzone zeigt Werte von 2,50 (95%-KI von 2,20 bis 2,80), die Intermediärzone von 2,41 (95%-KI von 2,11 bis 2,71) und die Marginalzone ein Mittel von 2,33 (95%-KI von 1,94 bis 2,72) (siehe Tabelle 3).

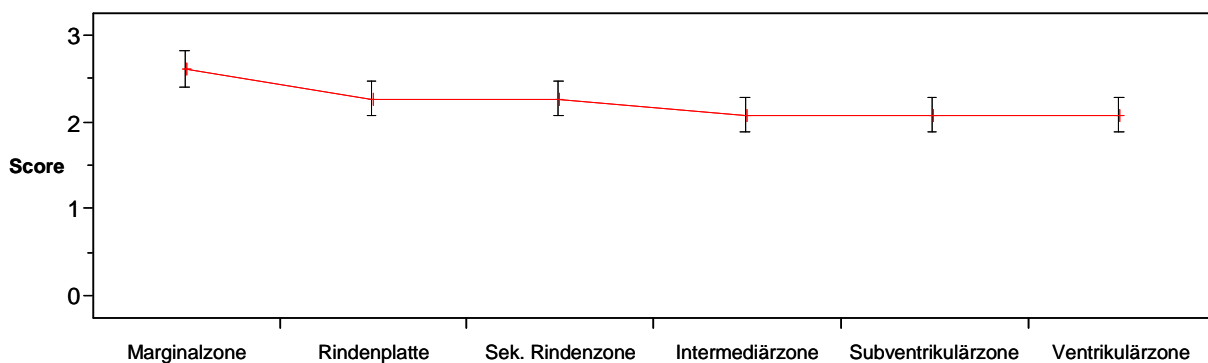


**Abbildung 14:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate des Rezeptor Patched, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Großhirnes.

In Abbildung 14 lässt sich ein zweigipfliger Verlauf erkennen. Der erste Höhepunkt zeigt sich in der Rindenplatte ( $p < 0,01$ ), danach fallen die Werte, jedoch nicht mit einem signifikanten Unterschied bis zur Intermediärzone weiter ab. Es kommt zu einem minimalen Anstieg in der Subventrikulärzone und endet im zweiten Gipfel der Patched-Immunreaktivitätsrate in der Ventrikulärzone ( $p < 0,001$ ).

### 3.1.2.2 Patched-Intensität

Bei der Auswertung konnte die höchste Intensität in der Marginalzone mit einem Mittelwert von 2,62 (95%-KI von 2,35 bis 2,89) errechnet werden. Im Kontrast dazu wurden alle anderen fünf Schichten mit den Werten 2,27 (95%-KI von 2,03 bis 2,52) für die Rindenplatte, 2,27 (95%-KI von 2,03 bis 2,52) für die sekundäre Rindenzone, 2,09 (95%-KI von 1,90 bis 2,28) für die Intermediärzone und einem Mittel von 2,09 (95%-KI von 1,96 bis 2,22), sowohl für die Subventrikulärzone, als auch für die Ventrikulärzone, mit der Intensität „mittel“ eingestuft.



**Abbildung 15:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität von Patched, aufgetragen über die einzelnen Schichten des fetalen Neokortex.

Bei der graphischen Beurteilung der Immunreaktivitätsintensität ergibt sich eine stetige Abnahme der Intensitätsstärke. Die höchste Intensität bietet die Marginalzone, mit einem signifikanten Abfall zur Rindenplatte ( $p < 0,05$ ). Es folgt ein Plateau zwischen der Rindenplatte und der sekundären Rindenzone, der sich ein weiterer, jedoch nicht signifikanter Abfall in der Intermediärzone anschließt. Der Kurvenverlauf endet in einem erneuten Plateau. Dieses erstreckt sich von der Intermediär-, über die Subventrikulär-, bis zur Ventrikulärzone.

**3.1.2.3 Statistische Auswertung der Frequenz und Intensität für Patched**

Bei der Auswertung von Patched ergab sich im Vergleich der Rindenschichten:

**Tabelle 6:** Statistische Analyse der Frequenz und Intensität in Bezug auf die kortikale Schichtung für den Rezeptor Patched. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

Frequenz Intensität	Marginal- zone	Rinden- platte	Sek. Rinden- zone	Intermediär- zone	Subventrikulär- zone	Ventrikulär- zone
<b>Marginal- Zone</b>						
<b>Rinden- Platte</b>	0,0040 ** 0,0162 *					
<b>Sek. Rinden- Zone</b>	0,0731 0,0162 *	0,2586 1,0000				
<b>Intermediär- Zone</b>	0,7559 0,0003 ***	0,0091 ** 0,1980	0,1327 0,1980			
<b>Subventrikulär- Zone</b>	0,4943 0,0003 ***	0,0249 * 0,1980	0,2586 0,1980	0,7058 1,0000		
<b>Ventrikulär- Zone</b>	<,0001 *** 0,0003 ***	0,1879 0,1980	0,0153 * 0,1980	0,0001 *** 1,0000	0,0005 *** 1,0000	

Zur Immunreaktivitätsfrequenz ergab sich bei der statistischen Auswertung ein signifikanter Unterschied zwischen der Marginalzone und der Rindenplatte ( $p < 0,01$ ), sowie der Ventrikulärzone ( $p < 0,001$ ). Die Rindenplatte ihrerseits unterschied sich von der Intermediär- ( $p < 0,01$ ) und der Subventrikulärzone ( $p < 0,05$ ) in statistisch interessantem Maße. Zudem ließ sich ein statistisch relevanter Unterschied der Immunreaktivitätsrate zwischen der Ventrikulärzone und der sekundären Rindenzzone ( $p < 0,05$ ), der Intermediärzone ( $p < 0,001$ ) und der Subventrikulärzone ( $p < 0,001$ ) zeigen.

Bei der statistischen Beurteilung der Intensität ergab die Gegenüberstellung der Marginalzone mit jeweils allen anderen fünf Schichten des Neokortex signifikante Werte, Rindenplatte ( $p < 0,05$ ), sekundäre Rindenzzone ( $p < 0,05$ ), Intermediärzone ( $p < 0,001$ ), Subventrikulärzone ( $p < 0,001$ ) und Ventrikulärzone ( $p < 0,001$ ).

**3.1.2.4 Altersabhängige Patched-Immunreaktivität**

**Tabelle 7:** Darstellung der P-Werte der Großhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für den Rezeptor Patched. Zusätzliche Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Marginalzone	0,9582	—	0,6864	↓
Rindenplatte	0,8638	↓	1,0000	—
Sek. Rindenzone	0,9352	—	0,5202	↑
Intermediärzone	0,0398	↑ *	0,0384	↑ *
Subventrikulärzone	0,0032	↓ **	0,2881	↑
Ventrikulärzone	0,0003	↓ ***	0,2881	↑

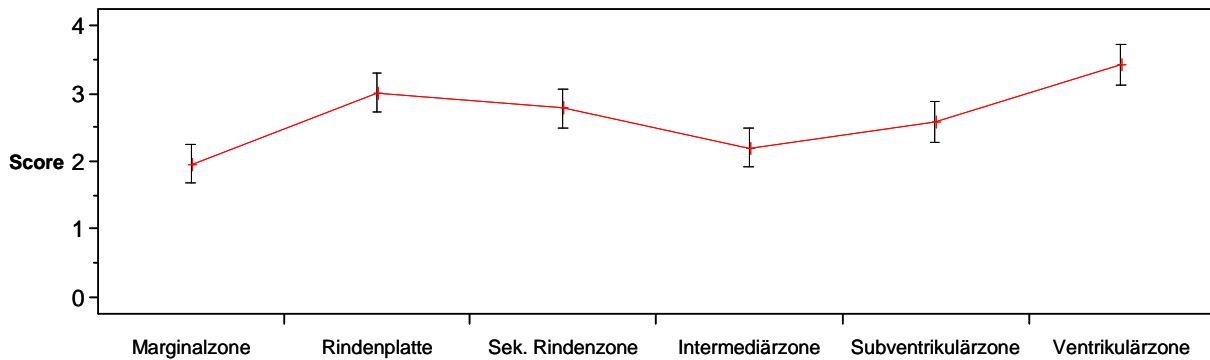
Bei der Einbeziehung des fetalen Alters zeigte sich in der Rindenplatte eine nicht signifikante Abnahme über den Verlauf der Zeit. Eine signifikante Zunahme der Immunreaktivitätsrate bietet die Intermediärzone ( $p < 0,05$ ). Gefolgt von statistisch relevant fallenden Frequenzwerten in den Ventrikel nahen Schichten, Subventrikulärzone ( $p < 0,01$ ), Ventrikulärzone ( $p < 0,001$ ).

Die Immunreaktivitätsintensität zeigt in der Marginalzone einen Abfall der Werte. In der Rindenplatte ist keine Veränderung zu detektieren, jedoch bietet die Intermediärzone ( $p < 0,05$ ) eine statistisch interessante Zunahme im Verlauf über die Schwangerschaft. Auch in der Subventrikulär- und der Ventrikulärzone ist eine Zunahme zu verzeichnen.

### 3.1.3 Statistische Auswertung der Smoothened-Immunhistochemie

#### 3.1.3.1 Smoothened-Frequenz

Die Ventrikulärzone stellt in der Auswertung des Antikörpers für Smoothened mit einem Mittelwert von 3,40 (KI von 3,02 bis 3,78) die höchste relative Immunreaktivitätsrate für Smoothened dar. Es folgt die Rindenplatte mit einem Wert von 3,00 (KI von 2,66 bis 3,35), die sekundäre Rindenzone mit 2,77 (KI von 2,47 bis 3,08) und die Subventrikulärzone mit 2,57 (KI von 2,26 bis 2,88). Die Intermediärzone mit 2,18 (KI von 1,96 bis 2,40) und die Marginalzone mit einem Mittel von 1,95 (KI von 1,73 bis 2,18) erreichen, übertragen auf den Auswertungsscore, eine Frequenz von 10-25% (siehe dazu auch Tabelle 3).

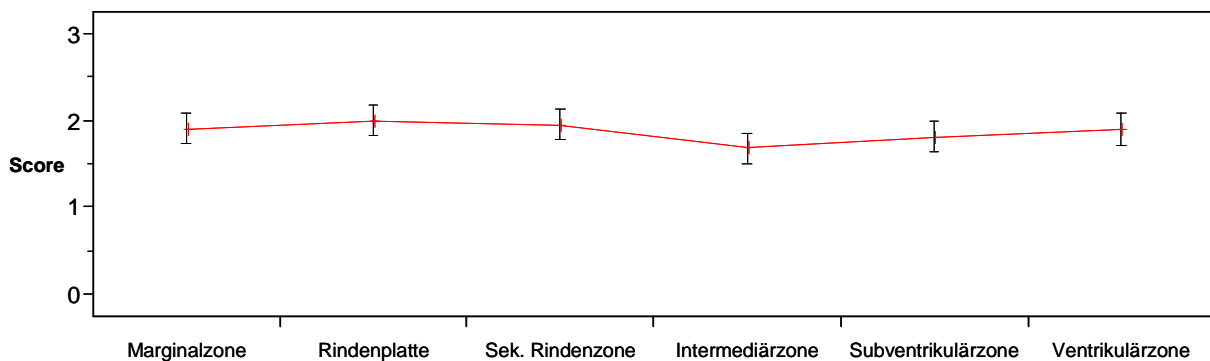


**Abbildung 16:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate von Smoothened, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Großhirnes.

Die Immunreaktivitätsrate für Smoothened, in der Verteilung über die kortikalen Rindenschichten, zeigt in Abbildung 16 einen Anstieg der Werte in der Rindenplatte ( $p < 0,001$ ) gegenüber der Marginalzone. Dieser Wert fällt im weiteren Verlauf bis zur Intermediärzone ( $p < 0,01$ ) wieder ab. Bei steigender räumlicher Nähe zum Ventrikel nimmt die Immunreaktivität wieder zu und übertrifft in der Ventrikulärzone ( $p < 0,001$ ) dabei sogar den Wert der Rindenplatte.

### 3.1.3.2 Smoothened-Intensität

Der höchste Mittelwert konnte bei der Rindenplatte mit einem Wert von 2,00 (95%-KI von 1,87 bis 2,13) festgestellt werden. Die sekundäre Rindenzone erbrachte einen Wert von 1,95 (95%-KI von 1,79 bis 2,12), die Marginalzone von 1,90 (95%-KI von 1,71 bis 2,10), sowie die Ventrikulärzone von 1,90 (95%-KI von 1,69 bis 2,11). Aus der Subventrikulärzone ließ sich ein Mittel von 1,81 (95%-KI von 1,63 bis 1,99) und aus der Intermediärzone von 1,68 (KI von 1,47 bis 1,89) errechnen.



**Abbildung 17:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität des Rezeptor Smoothened, dargestellt über die einzelnen Schichten des fetalen Neokortexes.

Auffällig bei der graphischen Betrachtung ist die sehr gleichmäßige Ausprägung der Immunreaktivitätsintensität über alle sechs Neokortexschichten. Es zeigt sich nur ein geringfügiger Abfall über der Intermediärzone ( $p < 0,05$ ).

**3.1.3.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Smoothend**

**Tabelle 8:** Gegenüberstellung der Großhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Smoothened. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

Frequenz Intensität	Marginal- zone	Rinden- platte	Sek. Rinden- zone	Intermediär- zone	Subventrikulär- zone	Ventrikulär- zone
<b>Marginal- Zone</b>						
<b>Rinden- Platte</b>	<,0001 *** 0,4419					
<b>Sek. Rinden- Zone</b>	0,0001 *** 0,6906	0,2610 0,7100				
<b>Intermediär- Zone</b>	0,2673 0,0764	<,0001 *** 0,0102 *	0,0044 ** 0,0288 *			
<b>Subventrikulär- Zone</b>	0,0036 ** 0,4520	0,0374 * 0,1254	0,3302 0,2474	0,0608 0,3081		
<b>Ventrikulär- Zone</b>	<,0001 *** 0,9703	0,0549 0,4254	0,0032 ** 0,6667	<,0001 *** 0,0867	0,0001 *** 0,4803	

Bei der statistischen Beurteilung der Immunreaktivitätsrate für den Rezeptor Smoothened ergibt sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen der Marginalzone und der Rindenplatte ( $p < 0,001$ ), der sekundären Rindenzone ( $p < 0,001$ ), der Subventrikulär- ( $p < 0,01$ ) und der Ventrikulärzone ( $p < 0,001$ ). Zusätzlich besteht eine signifikante Differenz zwischen der Rindenplatte mit der Intermediär- ( $p < 0,001$ ) und der Subventrikulärzone ( $p < 0,05$ ). Die sekundäre Rindenzone zeigt einen statistisch interessanten Unterschied zur Intermediär- ( $p < 0,01$ ) und zur Ventrikulärzone ( $p < 0,01$ ). Zusätzlich ist noch ein signifikantes Ergebnis zwischen der Ventrikulärzone und der Intermediär- ( $p < 0,001$ ), sowie der Subventrikulärzone ( $p < 0,001$ ) zu vermerken.

Demgegenüber ließ sich bei der statistischen Auswertung der Immunreaktivitätsintensität ein signifikanter Unterschied zwischen der Intermediärzone und der Rindenplatte ( $p < 0,05$ ), sowie der sekundären Rindenzone ( $p < 0,05$ ) darstellen.

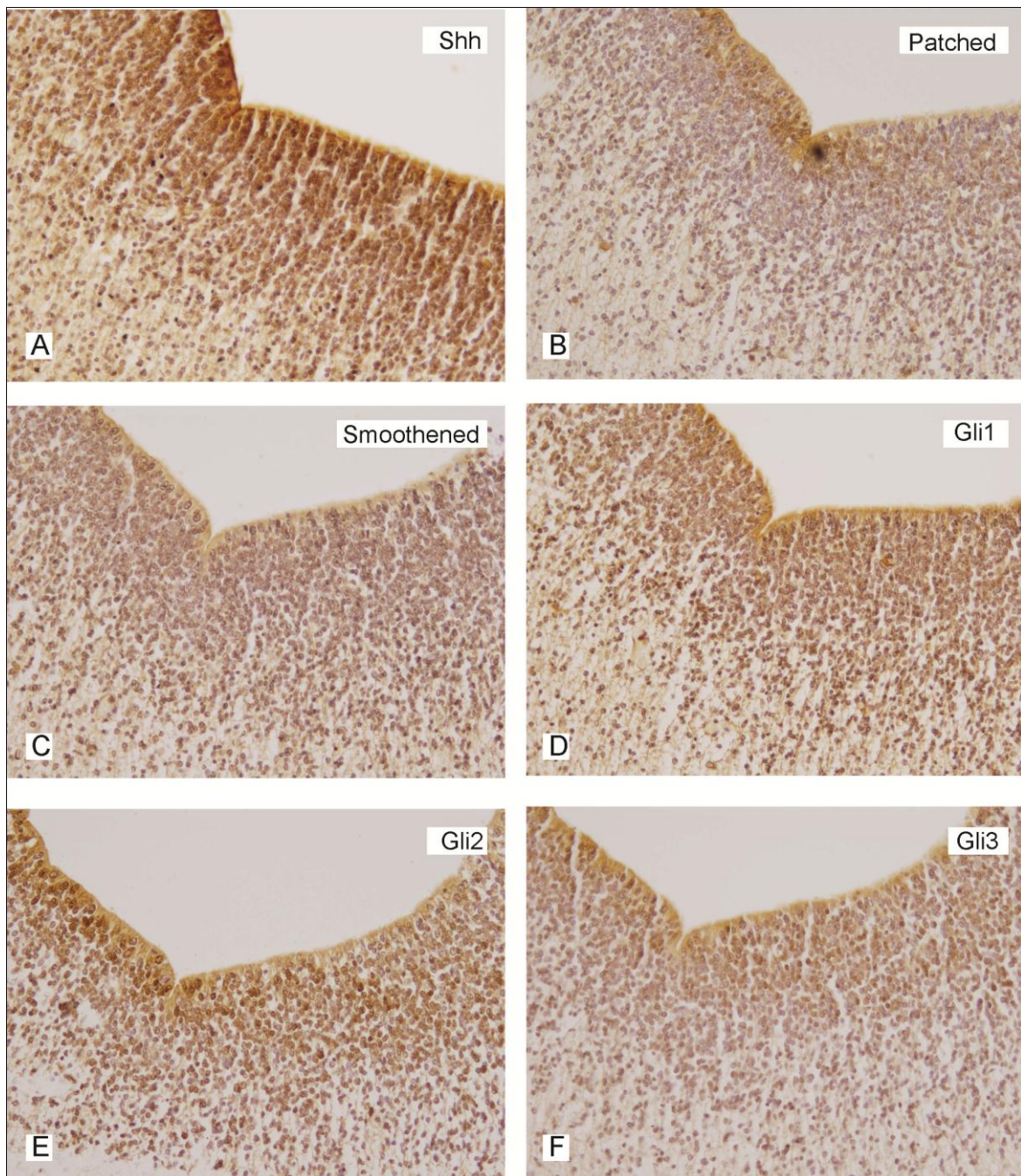
**3.1.3.4 Altersabhängige Smoothened-Immunreaktivität**

**Tabelle 9:** Darstellung der P-Werte der Großhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für Smoothened. Zusätzliche Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Marginalzone	0,7642	↓	0,1035	↑
Rindenplatte	0,9125	—	0,0696	↑
Sek. Rindenzone	0,7037	↓	0,1368	↑
Intermediärzone	0,4169	↑	0,4770	↑
Subventrikulärzone	0,6495	↓	0,1230	↑
Ventrikulärzone	0,1577	↓	0,2505	↓

Es zeigt sich für die Smoothened Immunreaktivitätsrate sowie -intensität keine statistisch relevante Assoziation mit dem fetalen Alter. Bei der Frequenz ist erst eine Abnahme über die Schichten zu vermerken, in der Intermediärzone kommt es dann zu einer Zunahme, jedoch gefolgt von einer weiteren Abnahme in den Ventrikel nahen Schichten. Die Intensität zeigt eine durchgehende Abnahme der Werte über den Verlauf der SSW, nur in der Ventrikulärzone ist das Gegenteil zu beobachten.





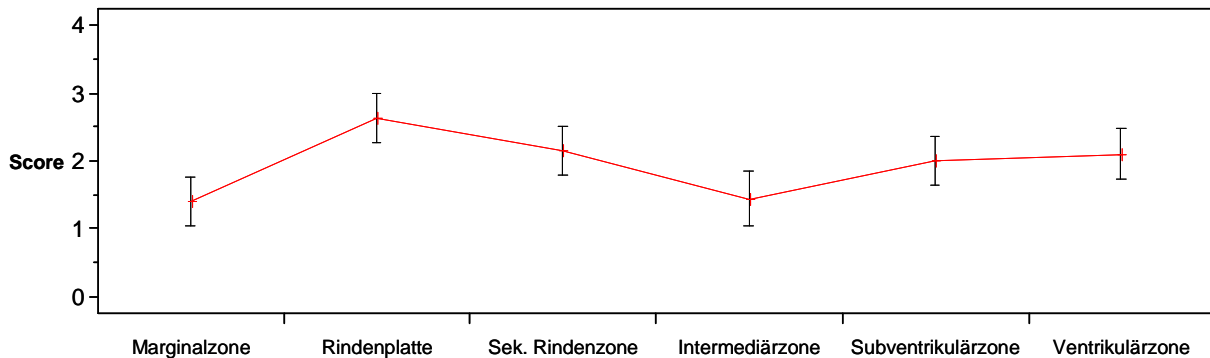
**Abbildung 18:** Darstellung der Ventrikulärzone, der Subventrikulärzone und von Teilen der Intermediärzone der Großhirnrinde (14.SSW.) für Shh (A), Patched (B), Smoothed (C), Gli1 (D), Gli2 (E) und Gli3 (F). 20-fache Vergrößerung.

### 3.1.4 Statistische Auswertung der Gli1-Immunhistochemie

Die isolierte Betrachtung des ersten Vertreters der Transkriptionsfaktorfamilie Gli ergab:

#### 3.1.4.1 Gli1-Frequenz

Die Rindenplatte erreichte mit einem Mittelwert von 2,62 ( 95%-KI von 2,23 bis 3,01) den höchsten Wert, dicht gefolgt von der sekundären Rindenzone mit 2,14 (KI von 1,73 bis 2,56), der Ventrikulärzone mit 2,10 (KI 1,65 bis 2,55) und der Subventrikulärzone mit dem Mittel von 2,00 (KI von 1,57 bis 2,43). Geringere Mittelwerte finden sich bei der Intermediärzone mit 1,44 (KI von 1,09 bis 1,79) und der Marginalzone mit 1,40 (KI von 1,12 bis 1,68) (siehe Tabelle 3).



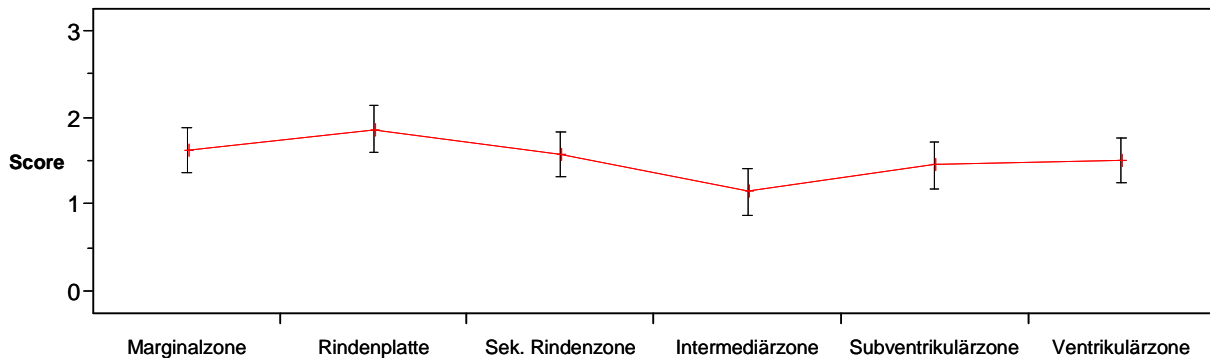
**Abbildung 19:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Gli1-Immunreaktivitätsrate, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Großhirns.

In Abbildung 19 zeigt sich ein zweigipfliger Verlauf in der Betrachtung der Immunreaktivitätsrate. Der erste Anstieg findet sich in der Rindenplatte ( $p < 0,001$ ). Es folgt ein Abfall bis zur Intermediärzone ( $p < 0,05$ ) und dann ein erneuter Anstieg in der Subventrikulärzone ( $p < 0,05$ ), der seinen Höhepunkt in der Ventrikulärzone findet.

#### 3.1.4.2 Gli1-Intensität

Auch hier erbrachte die Rindenplatte mit 1,86 (95%-KI von 1,60 bis 2,12) den höchsten Mittelwert im Vergleich mit den fünf anderen Schichten. Es folgt die Marginalzone mit 1,62 (95%-KI von 1,35 bis 1,89), die sekundäre Rindenzone mit 1,57 (95%-KI von 1,30 bis 1,84) und die Ventrikulärzone mit einem Wert von 1,50 (95%-KI von 1,22 bis 1,78). Sie alle wurden mit einer „mittleren“ Intensität bewertet. Die Subventrikulärzone ergab ein Mittel von 1,45 (95%-KI von 1,17 bis 1,73) und die

Intermediärzone von 1,14 (95%-KI von 0,84 bis 1,44) womit beide als „schwach“ eingeordnet wurden.



**Abbildung 20:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität von Gli1, aufgetragen über die einzelnen Schichten des fetalen Neokortex.

Bei der Betrachtung der Intensität in der Abbildung 20 zeigt sich erst ein Anstieg von der Marginalzone zur Rindenplatte ( $p < 0,05$ ). Gefolgt von einem Abfall über die sekundäre Rindenzone bis zum niedrigsten Wert im Verlauf der Kurve, in der Intermediärzone ( $p < 0,05$ ). In Ventrikelnähe ergibt sich jedoch wieder eine Zunahme der Intensität für Gli1, jedoch ohne statistische Relevanz.

**3.1.4.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli1**

**Tabelle 10:** Gegenüberstellung der Großhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Gli1. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz	Marginal- zone	Rinden- platte	Sek. Rinden- zone	Intermediär- zone	Subventrikulär- zone	Ventrikulär- zone
Marginal- Zone							
Rinden- Platte	<,0001 *** 0,0247 *						
Sek. Rinden- Zone	0,0055 ** 0,7991	0,0690 0,1286					
Intermediär- Zone	0,8710 0,0120 *	<,0001 *** 0,0002 ***	0,0110 * 0,0235 *				
Subventrikulär- Zone	0,0259 * 0,3730	0,0201 * 0,0333 *	0,5876 0,5219	0,0443 * 0,1068			
Ventrikulär- Zone	0,0096 ** 0,5300	0,0506 0,0613	0,8707 0,7062	0,0180 * 0,0613	0,7075 0,7943		

Bei der statistischen Auswertung der Immunreaktivitätsrate unterscheidet sich die Marginalzone signifikant von der Rindenplatte ( $p < 0,001$ ), der sekundären Rindenzone ( $p < 0,01$ ), der Subventrikulär- ( $p < 0,05$ ) und der Ventrikulärzone ( $p < 0,01$ ). Die Rindenplatte unterschied sich wiederum signifikant von der Intermediär- ( $p < 0,001$ ) und der Subventrikulärzone ( $p < 0,05$ ). Es zeigte sich des Weiteren eine statistisch interessante Differenz zwischen der sekundären Rindenzone und der Intermediärzone ( $p < 0,05$ ). Die Intermediärzone unterscheidet sich ihrerseits von der Subventrikulär- ( $p < 0,05$ ) und der Ventrikulärzone ( $p < 0,05$ ) signifikant.

Die statistische Bewertung der Intensität ergab im Vergleich zwischen der Marginalzone mit der Rindenplatte ( $p < 0,05$ ) und der Intermediärzone ( $p < 0,05$ ) einen statistisch relevanten Wert. Die Rindenplatte unterschied sich zusätzlich noch von der Intermediärzone ( $p < 0,001$ ), sowie der Subventrikulärzone ( $p < 0,05$ ). Auch die sekundäre Rindenzone bietet einen signifikanten Unterschied zur Intermediärzone ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4.4 Altersabhängige Gli1-Immunreaktivität

**Tabelle 11:** Darstellung der P-Werte der Großhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für den Transkriptionsfaktor Gli1. Zusätzliche Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

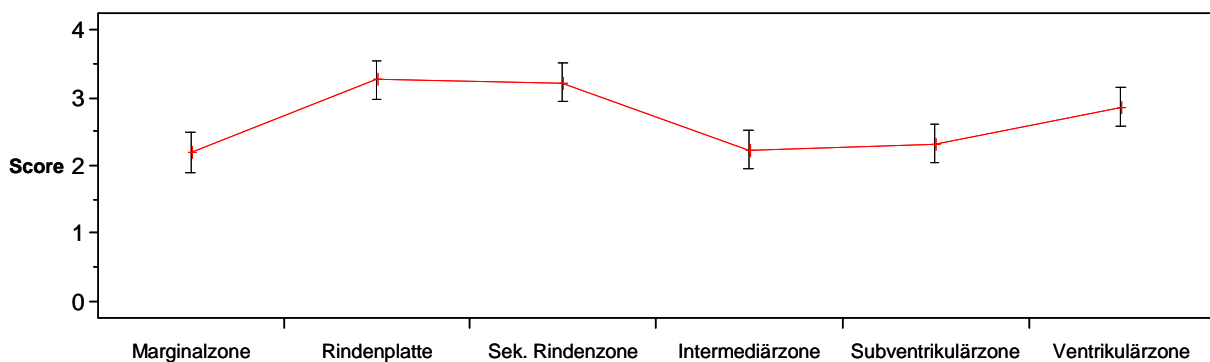
	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Marginalzone	0,2790	↓	0,7324	↓
Rindenplatte	0,3122	↓	0,3628	↓
Sek. Rindenzone	0,4735	↑	0,7199	↑
Intermediärzone	0,0475	↑ *	0,2241	↑
Subventrikulärzone	0,3003	↓	0,6441	↓
Ventrikulärzone	0,5630	↑	0,3935	↓

Für die Immunreaktivitätsrate zeigt sich im Verlauf über die Zeit eine Abnahme der Werte in der Marginalzone und der Rindenplatte. Die sekundäre Rindenzone und die Intermediärzone ( $p < 0,05$ ) erfahren eine Frequenzerhöhung. In Ventrikelnähe zeigt sich für die Subventrikulärzone eine Ab- und für die Ventrikulärzone eine Zunahme der Werte. Die Immunreaktivitätsintensität weist ein sehr ähnliches Muster wie die Immunreaktivitätsrate im Verlauf über die SSW auf. Der einzige Unterschied ist in der Ventrikulärzone zu finden, in der es zu einer Abnahme der Intensität im Verlauf über die Zeit kommt.

### 3.1.5 Statistische Auswertung der Gli2-Immunhistochemie

#### 3.1.5.1 Gli2-Frequenz

Den höchsten Mittelwert mit 3,32 (KI von 3,00 bis 3,64) erreicht auch hier die Rindenplatte, des Weiteren erreicht die Sek. Rindenzone einen Wert von 3,27 (KI von 2,93 bis 3,61) und die Ventrikulärzone ein Mittel von 2,91 (KI von 2,52 bis 3,29). Damit liegen diese 3 Rindenzonen im Scorebereich von 25-50%. Im Gegensatz dazu weisen die drei anderen Zonen Werte von 2,36 (KI von 2,11 bis 2,62) in der Subventrikulärzone, 2,27 (KI 2,03 bis 2,52) in der Intermediärzone und Werte von 2,25 (KI von 2,04 bis 2,46) in der Marginalzone auf.



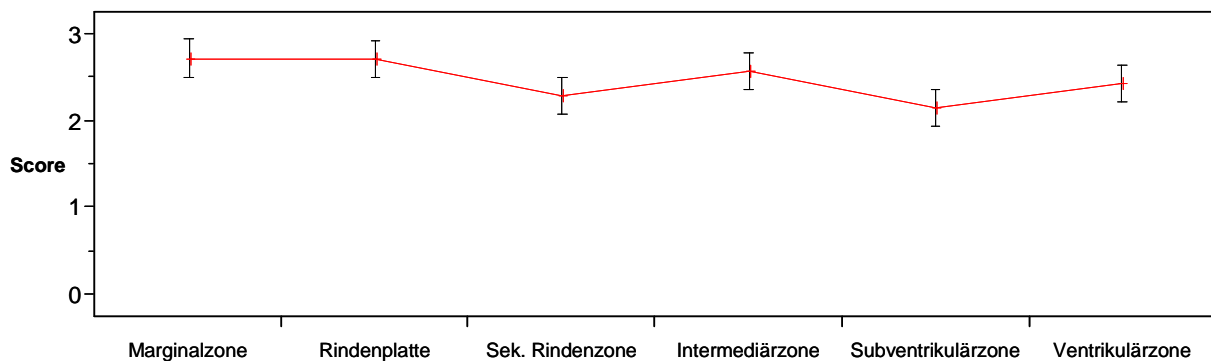
**Abbildung 21:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate von Gli2, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Großhirnes.

In der Betrachtung der Abbildung 21 zeigt sich zwischen der Marginalzone und der Rindenplatte ( $p < 0,001$ ) eine signifikante Zunahme der Immunreaktivitätsrate. Im weiteren Kurvenverlauf fällt eine fast als Plateau zu bezeichnende Ebene zwischen der Rindenplatte und der sekundären Rindenplatte auf. Die Ebene endet mit dem Abfall in der Intermediärzone ( $p < 0,001$ ). Es kommt zu einem geringen Anstieg der Werte in der Subventrikulärzone und einer statistisch relevanten Zunahme in der Ventrikulärzone ( $p < 0,01$ ).

#### 3.1.5.2 Gli2-Intensität

Die Marginalzone ließ sich hier als Zone mit der höchsten Intensität ermitteln. Dabei erreichte sie einen Mittelwert von 2,70 (95%-KI von 2,48 bis 2,92). Die Rindenplatte erbrachte ein Mittel von 2,68 (95%-KI von 2,47 bis 2,89) und die Intermediärzone einen Wert von 2,55 (95%-KI von 2,32 bis 2,77). Während die Ventrikulärzone einen Wert von 2,41 (95%-KI von 2,15 bis 2,67), die sekundäre Rindenzone 2,27 (95%-KI

von 2,03 bis 2,52) und die Subventrikulärzone ein Mittel von 2,14 (95%-KI von 1,98 bis 2,29) bot.



**Abbildung 22:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität von Gli2, aufgetragen über die einzelnen Schichten des fetalen Neokortex.

In der Abbildung 22 zeigt sich erst ein Plateau zwischen der Marginalzone und der Rindenplatte. Es ergibt sich eine Abnahme der Immunreaktivitätsintensität in der sekundären Rindenzone ( $p < 0,01$ ), auf die eine Zunahme in der Intermediärzone folgt. Der weitere Kurvenverlauf zeigt einen erneuten Abfall der Intensität in der Subventrikulärzone ( $p < 0,01$ ), gefolgt von einem Zuwachs in der Ventrikulärzone.

### 3.1.5.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli2

**Tabelle 12:** Gegenüberstellung der Großhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Gli2. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

Frequenz Intensität	Marginal- zone	Rinden- platte	Sek. Rinden- zone	Intermediär- zone	Subventrikulär- zone	Ventrikulär- zone
Marginal- Zone						
Rinden- Platte	<,0001 *** 0,9060					
Sek. Rinden- Zone	<,0001 *** 0,0063 **	0,8231 0,0073 **				
Intermediär- Zone	0,9131 0,3167	<,0001 *** 0,3651	<,0001 *** 0,0715			
Subventrikulär- Zone	0,5857 0,0004 ***	<,0001 *** 0,0004 **	<,0001 *** 0,3651	0,6549 0,0073 **		
Ventrikulär- Zone	0,0019 ** 0,0608	0,0459 * 0,0715	0,0756 0,3651	0,0021 ** 0,3651	0,0082 ** 0,0715	

Die Varianzanalyse, die zur statistischen Bewertung der Immunreaktivitätsrate verwendet wurde, zeigte aus der Sicht der Marginalzone, sowohl gegenüber der Rindenplatte ( $p < 0,001$ ), der sekundären Rindenzone ( $p < 0,001$ ), als auch der Ventrikulärzone ( $p < 0,01$ ), einen signifikanten Unterschied auf. Betrachtet man nun die Rindenplatte, so weist diese eine signifikante Differenz zur Intermediärzone ( $p < 0,001$ ), zur Subventrikulärzone ( $p < 0,001$ ), sowie zur Ventrikulärzone ( $p < 0,05$ ) auf. Auch die sekundäre Rindenzone unterscheidet sich signifikant, sowohl von der Intermediär- ( $p < 0,001$ ), als auch von der Subventrikulärzone ( $p < 0,001$ ). Die Ventrikulärzone ihrerseits bietet noch zusätzlich einen statistisch interessanten Unterschied zur Intermediär- ( $p < 0,01$ ) und zur Subventrikulärzone ( $p < 0,01$ ).

Bei der statistischen Auswertung der Immunreaktivitätsintensität von Gli2 unterschied sich die Marginalzone signifikant von der sekundären Rindenzone ( $p < 0,01$ ) und der Subventrikulärzone ( $p < 0,001$ ). Die Rindenplatte zeigte eine relevante Differenz, sowohl zur sekundären Rindenzone ( $p < 0,01$ ), als auch zur Subventrikulärzone ( $p < 0,01$ ). Zusätzlich fiel ein weiterer Unterschied zwischen der Intermediär- und der Subventrikulärzone ( $p < 0,01$ ) auf.

### 3.1.5.4 Altersabhängige Gli2-Immunreaktivität

**Tabelle 13:** Darstellung der P-Werte der Großhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für den Transkriptionsfaktor Gli2. Zusätzliche Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Marginalzone	0,1070	↓	0,6375	↑
Rindenplatte	0,2219	↑	0,6771	↑
Sek. Rindenzone	0,2950	↑	0,6304	↑
Intermediärzone	0,8103	↓	0,0041	↑ **
Subventrikulärzone	0,8201	↑	0,9500	—
Ventrikulärzone	0,0820	↓	0,2094	↓

Die Betrachtung der Immunreaktivitätsrate, im Verlauf über die Zeit, zeigte in der Marginalzone eine Abnahme der Werte. Demgegenüber kam es in der Rindenplatte und der Sekundären Rindenzone zu einem Zuwachs. In der Intermediärzone ließ sich eine Abnahme verzeichnen, gefolgt von einer Zunahme der Frequenz in der Subventrikulärzone. Die Ventrikulärzone zeigte im Verlauf eine Abnahme.

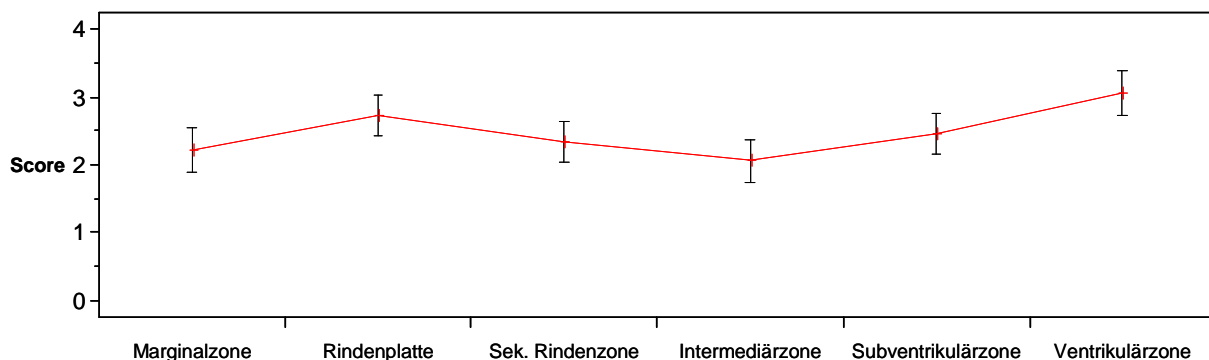
Die Immunreaktivitätsintensität ergab bei der Auswertung des zeitlichen Zusammenhangs einen Zuwachs der Werte für die Marginalzone, die Rindenplatte, die sekundäre Rindenzone und die Intermediärzone ( $p < 0,01$ ). In der Subventrikulärzone ließ sich keine Veränderung über die Zeit ausmachen, wobei es in der Ventrikulärzone zu einer Abnahme kam.

### 3.1.6 Statistische Auswertung der Gli3-Immunhistochemie

#### 3.1.6.1 Gli3-Frequenz

Es fällt auf, dass sich bei der Färbung des Transkriptionsfaktors Gli3 in der Ventrikulärzone der höchste Mittelwert mit 3,05 (KI von 2,61 bis 3,49) ergibt. In der Rindenplatte ist ein Wert von 2,71 (KI 2,36 bis 3,07) erhebbar.

Dem gegenüber siedeln sich die Subventrikulärzone bei einem Mittel von 2,45 (KI von 2,21 bis 2,69), die sekundäre Rindenzone von 2,33 (KI von 2,03 bis 2,63), die Marginalzone mit einem Mittelwert von 2,21 (KI von 1,83 bis 2,59) und die Intermediärzone von 2,05 (KI von 1,82 bis 2,27) an.



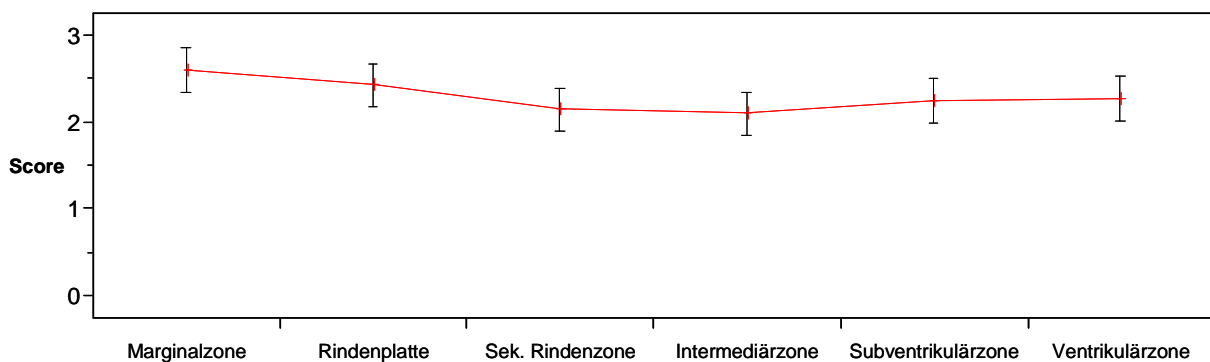
**Abbildung 23:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate des Transkriptionsfaktors Gli3, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Großhirns.

Der Kurvenverlauf in der Abbildung 23 zeichnet sich durch einen eher flachen Verlauf aus. Dabei lässt sich ein erster Anstieg zwischen der Marginalzone und der Rindenplatte ( $p < 0,05$ ) verzeichnen, gefolgt von einem Abfall bis in die Intermediärzone. Daraufhin steigt die Kurve jedoch noch einmal an und findet ihren höchsten Punkt in der Ventrikulärzone ( $p < 0,01$ ).



**3.1.6.2 Gli3-Intensität**

Bei der Auswertung der Intensität ließ sich der höchste Mittelwert in der Marginalzone, mit einem Wert von 2,60 (95%-KI von 2,25 bis 2,95), ermitteln. Im Kontrast dazu ergaben die anderen fünf Schichten, mit der Rindenplatte mit einem Wert von 2,43 (95%-KI von 2,20 bis 2,66), der Ventrikulärzone mit 2,26 (95%-KI von 2,04 bis 2,48), der Subventrikulärzone mit 2,25 (95%-KI von 1,99 bis 2,51), der sekundären Rindenzone mit 2,14 (95%-KI von 1,88 bis 2,40) und der Intermediärzone mit dem Wert 2,10 (95%-KI von 1,85 bis 2,34) eine Einstufung im Auswertungsscore in der mittleren Intensität.



**Abbildung 24:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität von Gli3, aufgetragen über die einzelnen Schichten des fetalen Neokortexes.

Bei der Betrachtung der Abbildung 24 zeigt sich eine abfallende Tendenz im Verlauf über die Rindenschichten. Die höchste Immunreaktivitätsintensität bietet die Marginalzone, es folgt ein stetiger Abfall bis zur Intermediärzone. In Ventrikelnähe ist ein minimaler Anstieg zu verzeichnen. Dabei ließ sich bei keinem der Werte ein signifikanter Unterschied zeigen.

**3.1.6.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli3**

**Tabelle 14:** Gegenüberstellung der Großhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Gli3. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

Frequenz Intensität	Marginal- zone	Rinden- platte	Sek. Rinden- zone	Intermediär- zone	Subventrikulär- zone	Ventrikulär- zone
<b>Marginal- Zone</b>						
<b>Rinden- Platte</b>	0,0257 * 0,3382					
<b>Sek. Rinden- Zone</b>	0,5826 0,0116 *	0,0821 0,1074				
<b>Intermediär- Zone</b>	0,4662 0,0055 **	0,0027 ** 0,0608	0,1910 0,7873			
<b>Subventrikulär- Zone</b>	0,2904 0,0548	0,2319 0,3185	0,5967 0,5490	0,0699 0,3871		
<b>Ventrikulär- Zone</b>	0,0003 *** 0,0679	0,1317 0,3617	0,0016 ** 0,5068	<,0001 *** 0,3545	0,0086 ** 0,9427	

Die Immunreaktivitätsrate ergab bei der statistischen Bewertung einen signifikanten Unterschied zwischen der Rindenplatte und der Marginal- ( $p < 0,05$ ), sowie der Intermediärzone ( $p < 0,01$ ). Die Ventrikulärzone zeigte eine statistisch relevante Differenz zur Marginalzone ( $p < 0,001$ ), zur sekundären Rindenzone ( $p < 0,01$ ), zur Intermediär- ( $p < 0,001$ ) und zur Subventrikulärzone ( $p < 0,01$ ).

Die statistische Auswertung der Intensität erbrachte signifikante Ergebnisse für den Vergleich zwischen der Marginalzone mit der sekundären Rindenzone ( $p < 0,05$ ), sowie der Intermediärzone ( $p < 0,01$ ).

**3.1.6.4 Altersabhängige Gli3-Immunreaktivität**

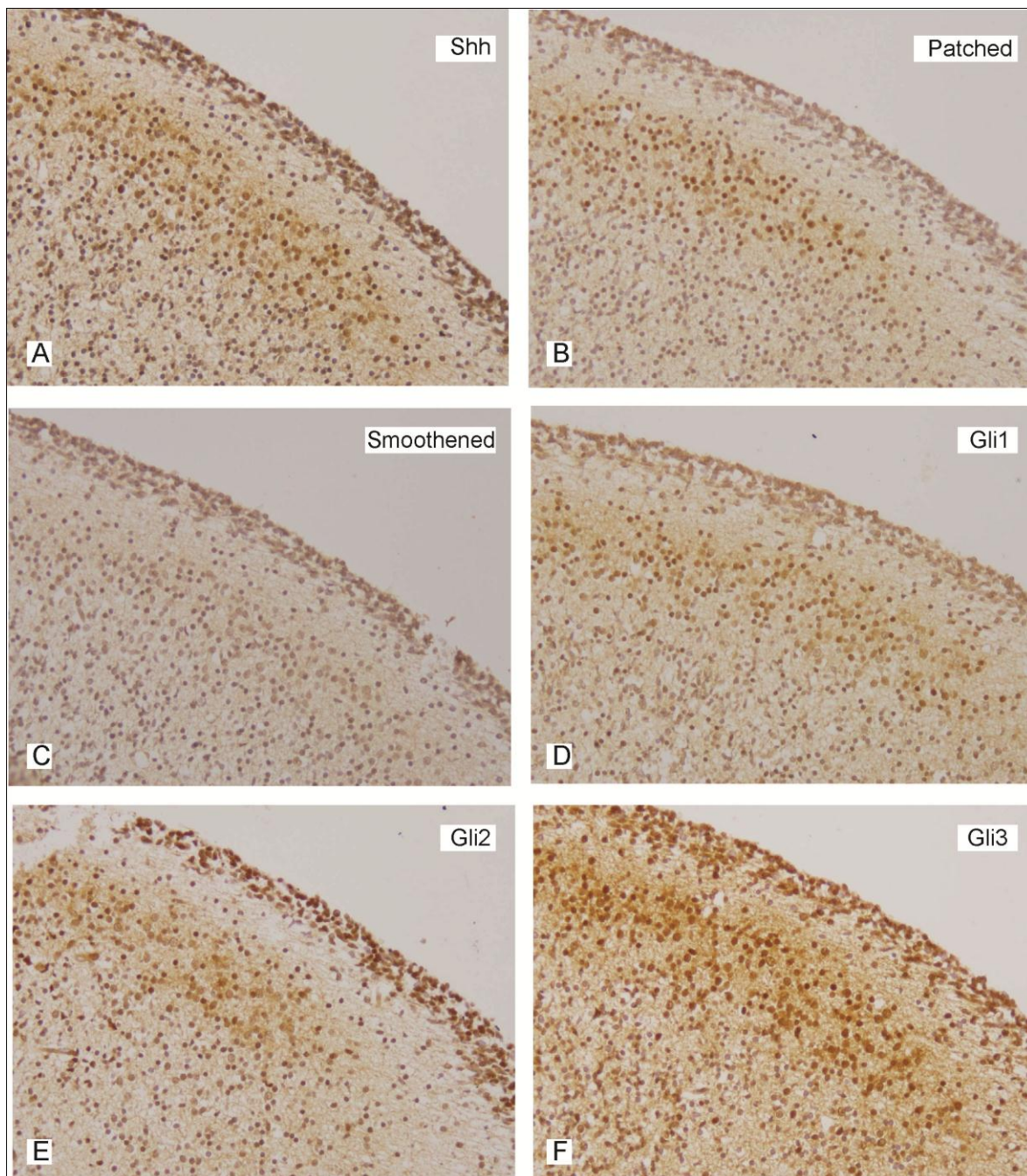
**Tabelle 15:** Darstellung der P-Werte der Großhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für Gli3. Zusätzliche Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
<b>Marginalzone</b>	0,6432	↓	0,1087	↑
<b>Rindenplatte</b>	0,9857	—	0,5229	↑
<b>Sek. Rindenzone</b>	0,3018	↑	0,9903	—
<b>Intermediärzone</b>	0,9178	—	0,1640	↑
<b>Subventrikulärzone</b>	0,0751	↑	0,3872	↑
<b>Ventrikulärzone</b>	0,3843	↑	0,4418	↑

Für Gli3 war bei der statistischen Bewertung keine signifikante Veränderung in Verbindung mit der altersabhängigen Immunreaktivitätsrate und –intensität ermittelbar. Die Frequenz bietet in der Marginalzone eine Abnahme der Werte über den Zeitverlauf. Die Rindenplatte sowie die Intermediärzone zeigen keine Veränderungen, wobei es in der räumlich dazwischen liegenden sekundären Rindenzone zu einer Zunahme kommt. Auch die Subventrikulär- und die Ventrikulärzone zeigen einen Zuwachs im Verlauf über die Zeit.

Bei der Betrachtung der Intensität ergibt sich im Zusammenhang mit der Zeit eine Zunahme der Intensität in allen Rindenschichten, außer in der sekundären Rindenzone, in der keine Veränderung auszumachen ist.

### 3.2 Immunhistochemische Verteilung der untersuchten Faktoren im fetalen Kleinhirn

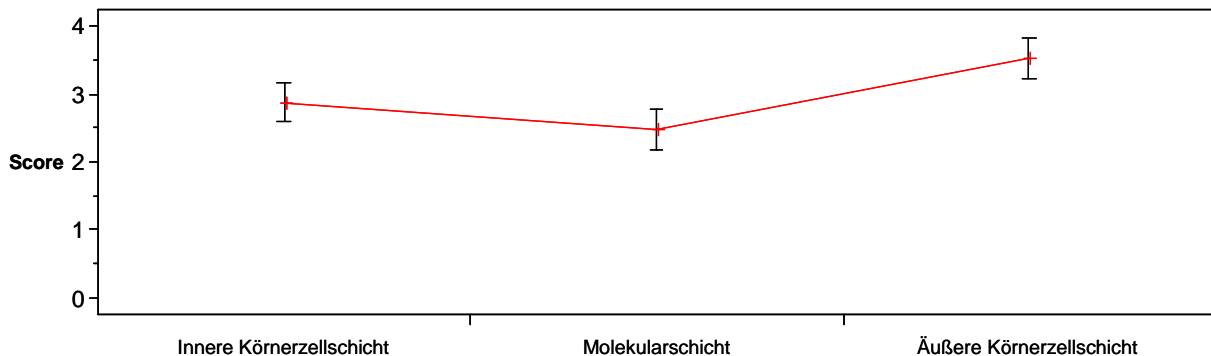


**Abbildung 25:** Darstellung der Äußeren Körnerzellschicht, der Molekularschicht und der Inneren Körnerzellschicht der Kleinhirnrinde (18.SSW.) für Shh (A), Patched (B), Smoothed (C), Gli1 (D), Gli2.(E) und Gli3 (F). 20-fache Vergrößerung.

### 3.2.1 Statistische Auswertung der Shh-Immunhistochemie

#### 3.2.1.1 Shh-Frequenz

Die Äußere Körnerzellschicht ergab einen Mittelwert von 3,50 (95%-KI von 3,22 bis 3,78), die Innere Körnerzellschicht erbrachte einen Wert von 2,85 (95%-KI von 2,54 bis 3,16). Dem gegenüber steht die Molekularschicht mit einem Wert von 2,45 (95%-KI von 2,13 von 2,77) (siehe auch Tabelle 3).

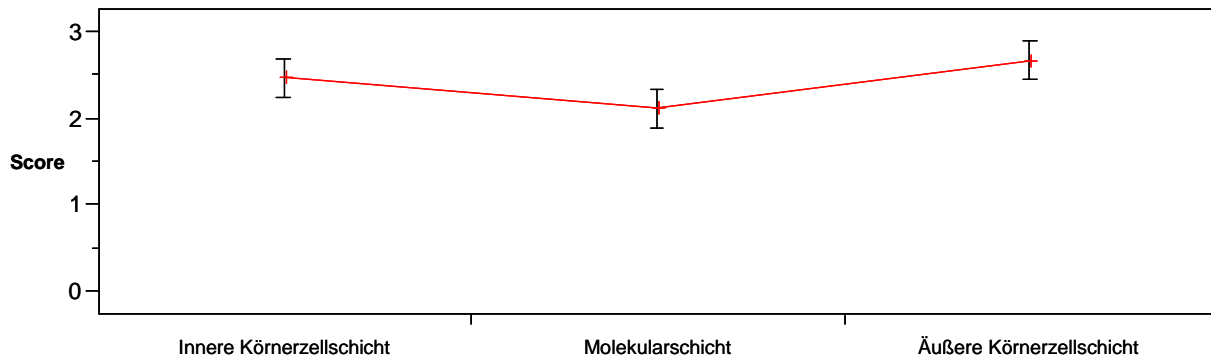


**Abbildung 26:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate des Liganden Shh, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Kleinhirns.

Es zeigt sich ein leichter Abfall zwischen der Inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht. Gefolgt von einem starken Anstieg zur Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ).

#### 3.2.1.2 Shh-Intensität

Der höchsten Mittelwert ist in der Äußeren Körnerzellschicht mit 2,65 (95%-KI von 2,42 bis 2,88) zu finden und erreicht somit eine „starke“ Intensität. Die Innere Körnerzellschicht erreicht einen Wert von 2,45 (95%-KI von 2,17 bis 2,73) und die Molekularschicht ein Mittel von 2,10 (95%-KI von 1,96 bis 2,24).



**Abbildung 27:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität von Shh, aufgetragen über die einzelnen Schichten der fetalen Kleinhirnrinde.

Der Kurvenverlauf stellt sich hier eher flach dar. Es ist ein leichter Abfall zur Molekularschicht ( $p < 0,05$ ) und dann ein Anstieg zur Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ) zu beobachten.

### 3.2.1.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Shh

**Tabelle 16:** Gegenüberstellung der Kleinhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Shh. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz	Innere Körnerzellschicht	Molekularschicht	Äußere Körnerzellschicht
Innere Körnerzellschicht				
Molekularschicht		0,0587 0,0257 *		
Äußere Körnerzellschicht		0,0027 ** 0,1957	<,0001 *** 0,0007 ***	

Bei der statistischen Bewertung der Frequenz ergab sich eine signifikante Differenz zwischen der Inneren und der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,01$ ), sowie zwischen der Molekularschicht und der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ).

Bei der Auswertung der Immunreaktivitätsintensität ließ sich im Vergleich zwischen der Inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht ( $p < 0,05$ ) und des Weiteren zwischen der Äußeren Körnerzellschicht und der Molekularschicht ( $p < 0,001$ ) eine Differenz detektieren.

**3.2.1.4 Altersabhängige Shh-Immunreaktivität**

**Tabelle 17:** Darstellung der P-Werte der Kleinhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für das Signalmolekül Shh, sowie der Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Innere Körnerzellschicht	0,6879	↑	0,2429	↑
Molekularschicht	0,3442	↑	0,1789	↓
Äußere Körnerzellschicht	0,2233	↓	0,0150	↓*

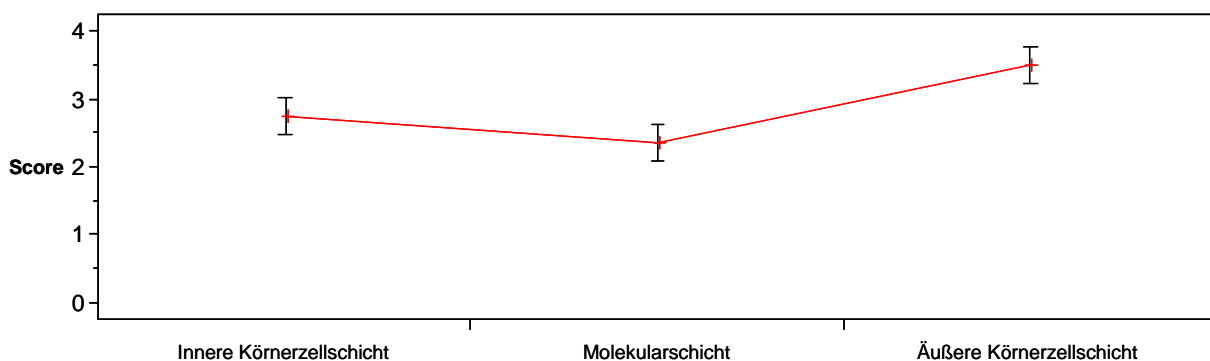
Die Beurteilung der Altersabhängigkeit mit der Immunreaktivitätsrate zeigte für die Innere Körnerzellschicht und die Molekularschicht eine Zunahme der Werte im Zeitverlauf. In der Äußeren Körnerzellschicht kam es zu einer Abnahme.

Die Immunreaktivitätsintensität ergab für Shh eine Zunahme in der Inneren Körnerschicht, jedoch einen Abfall in der Molekularschicht und eine signifikante Abnahme in der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,05$ ) im Verlauf über die Schwangerschaft.

**3.2.2 Statistische Auswertung der Patched-Immunhistochemie**

**3.2.2.1 Patched-Frequenz**

Die Äußere Körnerzellschicht bildet mit einem Wert von 3,48 (95%-KI von 3,20 bis 3,75) den höchsten Mittelwert der drei Kleinhirnschichten. Die Innere Körnerzellschicht ergab einen Wert von 2,71 (95%-KI von 2,42 bis 3,01), die Molekularschicht erbrachte hingegen einen von Wert 2,33 (95%-KI von 2,07 bis 2,60).

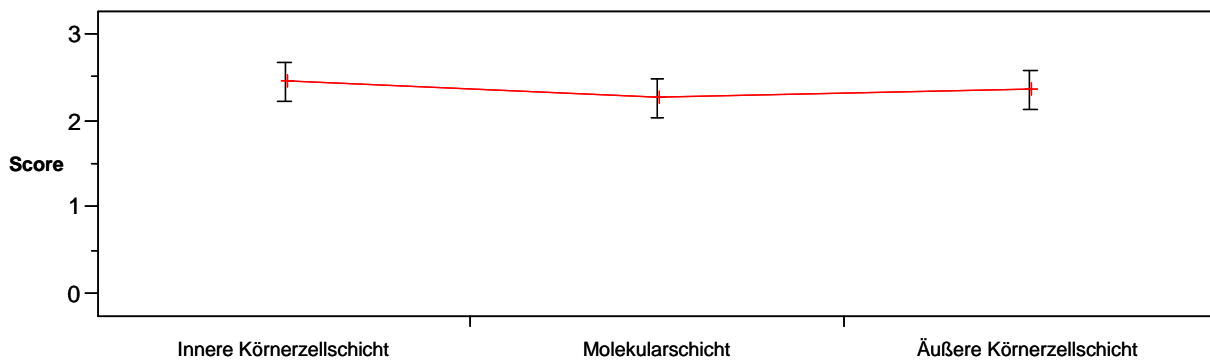


**Abbildung 28:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate von Patched, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Kleinhirns.

Bei der Betrachtung der Abbildung 28 zeigt sich über den Verlauf der Rindenschichten erst eine geringe Abnahme der Immunreaktivitätsrate im Vergleich zwischen der Inneren Körnerzellschicht zur Molekularschicht ( $p < 0,05$ ), jedoch gefolgt von einem Anstieg in der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.2.2 Patched-Intensität

Bei der Ermittlung der Mittelwerte für die Intensität ergab sich der höchste Wert in der Inneren Körnerzellschicht mit 2,43 (95%-KI von 2,20 bis 2,66), gefolgt von der Äußeren Körnerzellschicht mit 2,33 (95%-KI von 2,07 bis 2,60) und der Molekularschicht mit 2,24 (95%-KI von 2,04 bis 2,44).



**Abbildung 29:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität von Patched, aufgetragen über die einzelnen Schichten der fetalen Kleinhirnrinde.

Hier zeigt sich bei der Beurteilung der Kurve, die die Immunreaktivitätsintensität darstellt, eine leicht abfallende Tendenz. Diese beginnt in der Inneren Körnerzellschicht und fällt dann kontinuierlich zur Molekularschicht ab, endet jedoch mit einem minimalen Anstieg in der Äußeren Körnerzellschicht. Dabei ergaben sich keine statistisch relevanten Unterschiede.

### 3.2.2.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Patched

Hier wurden folgende Werte erhoben:

**Tabelle 18:** Gegenüberstellung der Kleinhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Patched. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).



Frequenz Intensität	Innere Körnerzellschicht	Molekular- schicht	Äußere Körnerzellschicht
Innere Körnerzellschicht			
Molekular- schicht	0,0468 * 0,2311		
Äußere Körnerzellschicht	0,0001 *** 0,5476	<,0001 *** 0,5476	

Mit Hilfe der Varianzanalyse ließ sich für die Frequenz ein signifikanter Unterschied zwischen der Inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht ( $p < 0,05$ ), sowie der Äußeren Körnerschicht ( $p < 0,001$ ) zeigen. Zudem unterscheidet sich die Molekularschicht signifikant von der Äußere Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ).

Die statistische Bewertung der Immunreaktivitätsintensität ergab für die Daten von Patched keine signifikanten Unterschiede.

### 3.2.2.4 Altersabhängige Patched-Immunreaktivität

**Tabelle 19:** Darstellung der P-Werte der Kleinhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für den Rezeptor Patched, sowie der Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

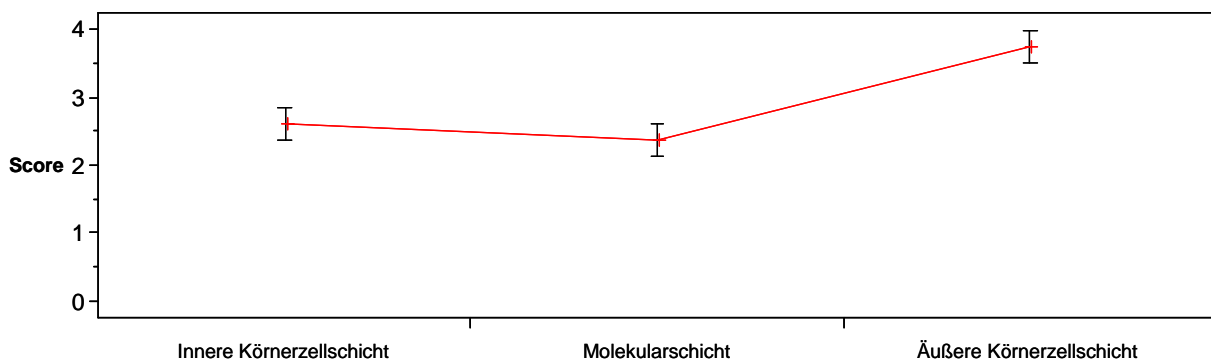
	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Innere Körnerzellschicht	0,9471	—	0,2409	↑
Molekularschicht	0,2931	↑	0,9740	—
Äußere Körnerzellschicht	0,7132	↓	1,0000	—

Auch bei der Auswertung der Kleinhirnschichten ließ sich keine statistisch relevante Zu- oder Abnahme der Patched-Immunreaktivität im Zusammenhang mit der SSW errechnen. Dabei zeigte sich für die Immunreaktivitätsrate keine Veränderung der Werte in der Inneren Körnerzellschicht im Verlauf über die Zeit, wobei es in der Molekularschicht zu einer Zunahme und in der Äußeren Körnerzellschicht zu einer Abnahme kam. Die Immunreaktivitätsintensität zeigte für Patched eine Zunahme in der Inneren Körnerzellschicht. Für die beiden anderen untersuchten Rindenschichten ließ sich kein Unterschied im Verlauf erkennen.

### 3.2.3 Statistische Auswertung der Smoothened-Immunhistochemie

#### 3.2.3.1 Smoothened-Frequenz

Die Äußere Körnerzellschicht zeichnet sich durch einen sehr hohen Mittelwert von 3,74 (95%-KI von 3,52 bis 3,95) aus. Somit ergibt sich aus der Übertragung in den Auswertungsscore eine Immunreaktivitätsrate von durchschnittlich mehr als 50%. Die Innere Körnerzellschicht bietet einen Wert von 2,60 (95%-KI von 2,32 bis 2,88), während die Molekularschicht ein Mittel von 2,34 (95%-KI von 2,13 bis 2,61) erreicht.

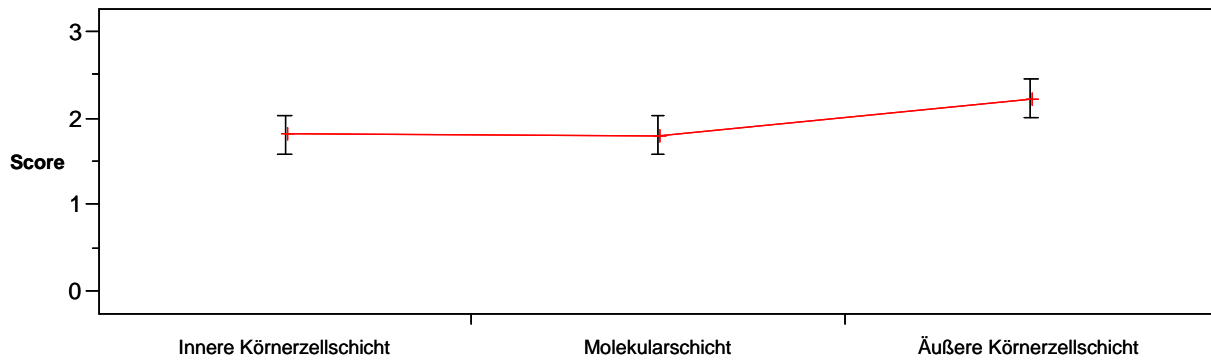


**Abbildung 30:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate von Smoothened, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Kleinhirns.

Im Verlauf der Immunreaktivitätsrate zeigt sich für Smoothened erst ein geringer Abfall zwischen der Inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht. Jedoch kommt es in der an der Kleinhirnoberfläche gelegenen Äußeren Körnerzellschicht zu einem massiven Anstieg ( $p < 0,001$ ).

#### 3.2.3.2 Smoothened-Intensität

Die Intensität erreicht bei der Auswertung des Antikörpers für Smoothened in der Äußeren Körnerzellschicht mit 2,21 (95%-KI von 1,95 bis 2,47) den höchsten Mittelwert. Die Innere Körnerzellschicht ergab einen Wert von 1,80 (95%-KI von 1,56 bis 2,04) und die Molekularschicht ein Mittel von 1,79 (95%-KI von 1,59 bis 1,99).



**Abbildung 31:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsintensität von Smoothened, aufgetragen über die einzelnen Schichten der fetalen Kleinhirnrinde.

Zwischen der Inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht zeigt sich in der Abbildung 31 keine Veränderung der Immunreaktivitätsintensität, jedoch kommt es in der Äußeren Körnerzellschicht zu einer Zunahme ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Smoothened

Die Auswertung des Antikörpers für Smoothened bei der Betrachtung der Kleinhirnschichtung ergab:

**Tabelle 20:** Gegenüberstellung der Kleinhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Smoothened. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz Intensität	Innere Körnerzellschicht	Molekular- schicht	Äußere Körnerzellschicht
Innere Körnerzellschicht				
Molekular- schicht		0,1706 0,9474		
Äußere Körnerzellschicht		<,0001 *** 0,0124 *	<,0001 *** 0,0114 *	

Bei dem hier betrachteten Antikörper zeigte sich bei der statistischen Auswertung der Immunreaktivitätsrate ein signifikanter Unterschied zwischen der Inneren Körnerzellschicht und der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ), sowie zwischen der Molekularschicht und der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ). Auch die Immunreaktivitätsintensität der Äußeren Körnerzellschicht von Smoothened unterscheidet sich von den

beiden anderen Schichten in signifikantem Maße, Innere Körnerzellschicht ( $p < 0,05$ ) und Molekularschicht ( $p < 0,05$ ).

**3.2.3.4 Altersabhängige Smoothened-Immunreaktivität**

**Tabelle 21:** Darstellung der P-Werte der Kleinhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für den Rezeptor Smoothened, sowie der Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Innere Körnerzellschicht	0,3090	↓	0,4912	↑
Molekularschicht	0,7324	↑	0,2371	↑
Äußere Körnerzellschicht	0,4980	↓	0,1210	↑

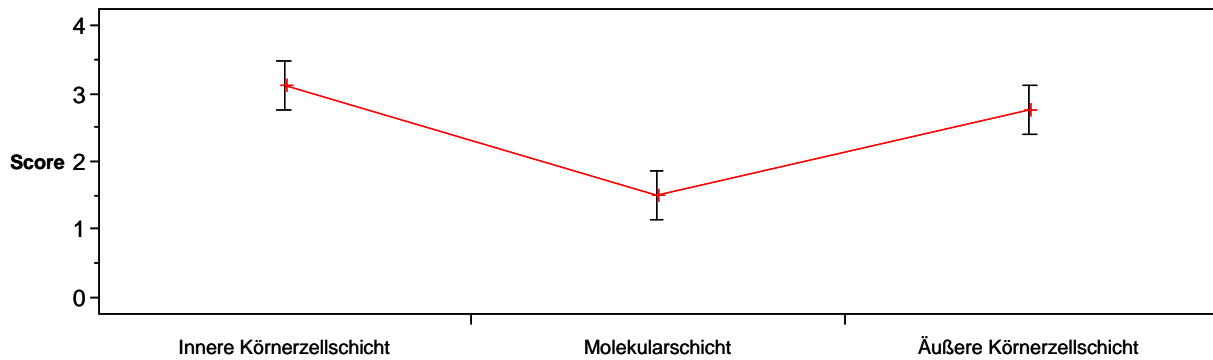
Bei der Betrachtung der altersabhängigen Frequenz zeigte sich eine Abnahme der Werte in der Inneren und der Äußeren Körnerzellschicht. Dem gegenüber wies die Molekularschicht einen Zuwachs über den Verlauf der Zeit auf. Bei der Intensität ergab sich eine allgemeine Zunahme in allen drei Rindenschichten.

Für keine der Kleinhirnrindenschichten ließ sich ein signifikante Zu- oder Abnahme im Zusammenhang mit dem fetalen Alter zeigen.

**3.2.4 Statistische Auswertung der Gli1-Immunhistochemie**

**3.2.4.1 Gli1-Frequenz**

Bei der Beurteilung von Gli1 zeigte sich der höchste Mittelwert mit 3,10 (95%-KI von 2,76 bis 3,44) in der Inneren Körnerzellschicht. Die Äußere Körnerzellschicht bot einen Wert von 2,75 (95%-KI von 2,27 bis 3,23), während die Molekularschicht ein Mittel von 1,50 (95%-KI von 1,22 bis 1,78) erbrachte (siehe auch Tabelle 3).

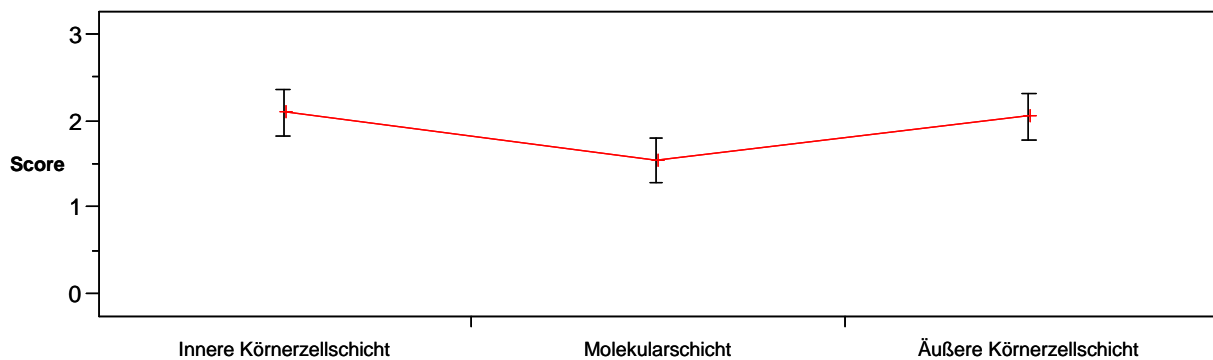


**Abbildung 32:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate von Gli1, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Kleinhirns.

Bei der Betrachtung der Abbildung 32 zeigt sich ein starker Abfall zwischen der Inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht ( $p < 0,01$ ), gefolgt von einer starken Zunahme der Immunreaktivitätsrate in der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.4.2 Gli1-Intensität

Die Innere Körnerzellschicht ergibt einen Mittelwert von 2,10 (95%-KI von 1,89 bis 2,31), die Äußere Körnerzellschicht einen Wert von 2,05 (95%-KI von 1,69 bis 2,41) und die Molekularschicht von 1,55 (95%-KI von 1,31 bis 1,79).



**Abbildung 33:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsintensität von Gli1, aufgetragen über die einzelnen Schichten der fetalen Kleinhirnrinde.

Die Innere Körnerzellschicht bildet den höchsten Punkt in der Kurve, die den Verlauf der Immunreaktivitätsintensität für Gli1 darstellt. Es zeigt sich ein Abfall zur

Molekularschicht ( $p < 0,01$ ) hin, der dann aber in der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,01$ ) wieder in eine Zunahme der Werte übergeht.

**3.2.4.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli1**

Es folgt die Betrachtung des ersten Transkriptionsfaktors der Gli-Familie:

**Tabelle 22:** Gegenüberstellung der Kleinhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Gli1. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz Intensität	Innere Körnerzellschicht	Molekular- schicht	Äußere Körnerzellschicht
Innere Körnerzellschicht				
Molekular- schicht		<,0001 *** 0,0045 **		
Äußere Körnerzellschicht		0,1723 0,7889	<,0001 *** 0,0094 **	

Bei der statistischen Bewertung der Frequenz besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Molekularschicht und der Inneren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ), sowie zwischen der Molekularschicht und der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ).

Die Beurteilung der Immunreaktivitätsintensität ergibt ebenfalls ein signifikantes Ergebnis zwischen der Molekularschicht und der Inneren Körnerzellschicht ( $p < 0,01$ ) und des Weiteren zwischen der Molekularschicht und der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,01$ ).

**3.2.4.4 Altersabhängige Gli1-Immunreaktivität**

**Tabelle 23:** Darstellung der P-Werte der Kleinhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für das Signalmolekül Gli1, sowie der Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

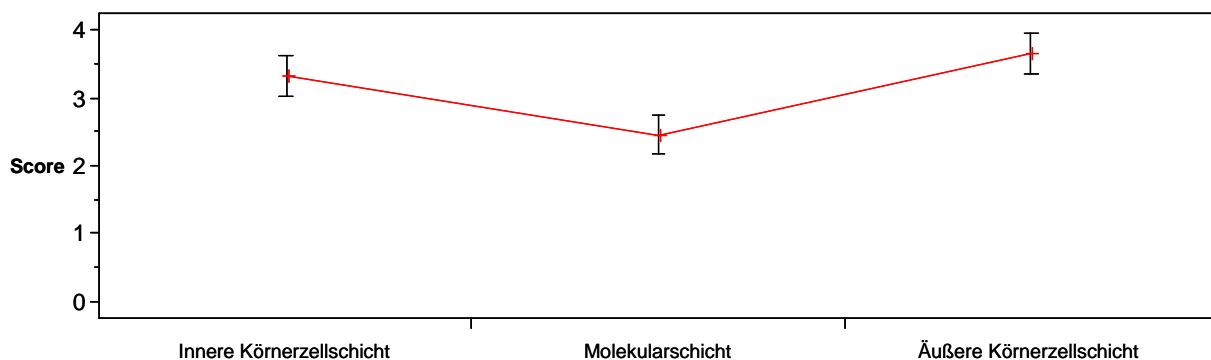
	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Innere Körnerzellschicht	0,5052	↓	0,7794	↓
Molekularschicht	0,0502	↓	0,0019	↓ **
Äußere Körnerzellschicht	0,0014	↓ **	0,0221	↓ *

Zwischen dem fetalen Alter und der Gli1 Immunreaktivität zeigt sich eine Abnahme der Immunreaktivitätsfrequenz im Zeitverlauf, um dann in der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,01$ ) in einer signifikanten Abnahme zu enden. Auch bei der Erfassung der Intensität über den Schwangerschaftsverlauf ergibt sich eine kontinuierliche Abnahme, die sowohl in der Molekularschicht ( $p < 0,01$ ), als auch in der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,05$ ) ein statistisch relevantes Ergebnis zeigt.

### 3.2.5 Statistische Auswertung der Gli2-Immunhistochemie

#### 3.2.5.1 Gli2-Frequenz

Die Auswertung der Daten erbringt für die Äußere Körnerzellschicht einen Mittelwert von 3,62 (95%-KI von 3,31 bis 3,92) und somit eine Immunreaktivitätsrate von über 50%. Die Innere Körnerzellschicht bietet einen Wert von 3,29 (95%-KI von 2,99 bis 3,58). Die Molekularschicht ergibt ein Mittel von 2,43 (95%-KI von 2,12 bis 2,74) (siehe Tabelle 3).



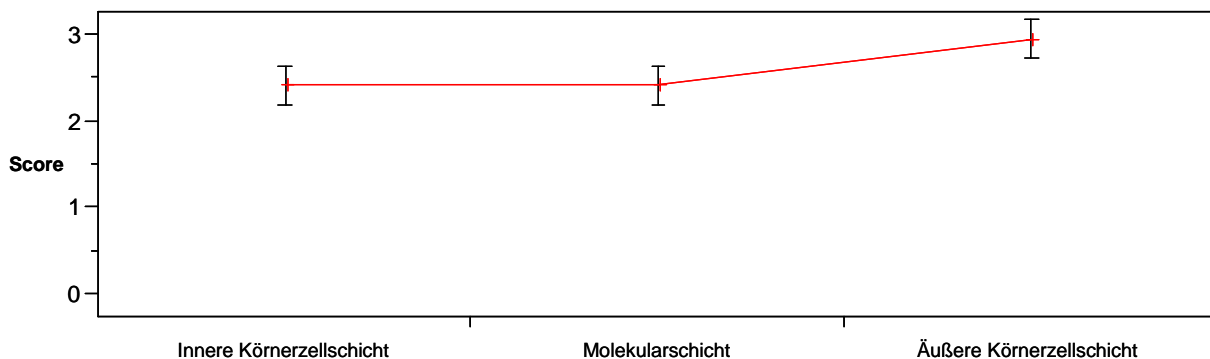
**Abbildung 34:** Darstellung der Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate von Gli2, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Kleinhirns.

Der Kurvenverlauf in der graphischen Darstellung in der Abbildung 34 zeigt zu Beginn eine Abnahme bis zum Erreichen der Molekularschicht ( $p < 0,001$ ), gefolgt von einer erneuten Zunahme der Immunreaktivitätsrate in der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ).

#### 3.2.5.2 Gli2-Intensität

Für die Intensität von Gli2 lassen sich folgende Werte ermitteln: Die Äußere Körnerzellschicht bietet einen Mittelwert von 2,90 (95%-KI von 2,77 bis 3,04), die

Innere Körnerzellschicht einen von 2,38 (95%-KI von 2,11 bis 2,65) und die Molekularschicht ein Mittel von 2,38 (95%-KI von 2,11 bis 2,65).



**Abbildung 35:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsintensität von Gli2, aufgetragen über die einzelnen Schichten der fetalen Kleinhirnrinde.

Die Abbildung 35 zeichnet sich durch ein Plateau zwischen der Inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht aus. Dem Plateau folgt ein Anstieg zur Kleinhirnoberfläche, der Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,01$ ), hin.

### 3.2.5.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli2

Legt man nun den Fokus auf den Antikörper für Gli2, ergibt sich:

**Tabelle 24:** Gegenüberstellung der Kleinhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Gli2. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

Frequenz Intensität	Innere Körnerzellschicht	Molekular- schicht	Äußere Körnerzellschicht
Innere Körnerzellschicht			
Molekular- schicht	<,0001 *** 1,0000		
Äußere Körnerzellschicht	0,1086 0,0016 **	<,0001 *** 0,0016 **	

Hier bietet sich bei der statistischen Auswertung der Immunreaktivitätsrate das gleiche Bild wie bei Gli1. Die Äußere Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ), sowie die Innere Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ) unterscheiden sich signifikant von der Molekularschicht.



Die statistische Analyse der Intensität zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Äußeren Körnerzellschicht und der Inneren Körnerzellschicht ( $p < 0,01$ ), sowie zwischen der Äußeren Körnerzellschicht und der Molekularschicht ( $p < 0,01$ ).

### 3.2.5.4 Altersabhängige Gli2-Immunreaktivität

**Tabelle 25:** Darstellung der P-Werte der Kleinhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für Gli2, sowie der Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

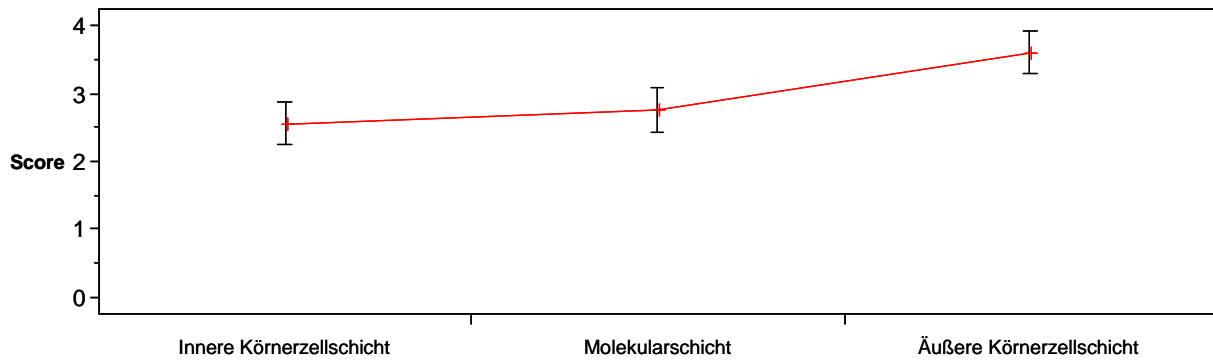
	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Innere Körnerzellschicht	0,8248	↓	0,1425	↑
Molekularschicht	0,5898	↓	0,6194	↑
Äußere Körnerzellschicht	0,1077	↓	0,8312	↑

Bei der Bewertung der erstellten Daten von Gli2, unter der zusätzlichen Beachtung des fetalen Alters, lässt sich eine allgemeine Abnahme der Expressionsfrequenz über alle drei Kleinhirnschichten zeigen, jedoch ohne statistischen Zusammenhang. Dem gegenüber weist die Intensität einen Zuwachs im Verlauf über die Zeit in allen Schichten auf.

## 3.2.6 Statistische Auswertung der Gli3-Immunhistochemie

### 3.2.6.1 Gli3-Frequenz

Den höchsten Mittelwert bei der Auswertung erbringt die Äußere Körnerzellschicht mit 3,57 (95%-KI von 3,34 bis 3,80), die Molekularschicht zeigt einen Wert von 2,71 (95%-KI von 2,33 bis 3,10), die Innere Körnerzellschicht ein Mittel von 2,52 (95%-KI von 2,15 bis 2,89) (Tabelle 3).

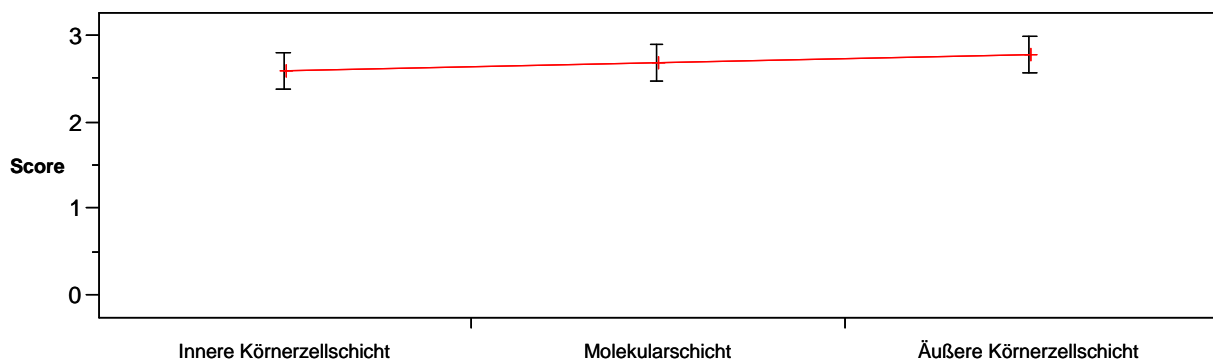


**Abbildung 36:** Darstellung der Mittelwerte, mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall für die Immunreaktivitätsrate von Gli3, über die einzelnen Rindenschichten des fetalen Kleinhirns.

Der Kurvenverlauf zeigt den niedrigsten Wert für die Immunreaktivitätsrate von Gli3 in der Inneren Körnerzellschicht. Es folgt ein erst geringer, dann etwas größerer Anstieg im Verlauf über die Molekularschicht bis zur Äußeren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.6.2 Gli3-Intensität

Beim Vergleich der drei Kleinhirnschichten erbringt die Äußere Körnerzellschicht mit 2,76 (95%-KI von 2,56 bis 2,96) den größten Mittelwert. Die Molekularschicht ergibt ein Mittel von 2,67 (95%-KI von 2,45 bis 2,89) und die Innere Körnerzellschicht einen Wert von 2,57 (95%-KI von 2,34 bis 2,80).



**Abbildung 37:** Mittelwerte mit zugehörigem 95%-Konfidenzintervall, für die Immunreaktivitätsintensität von Gli3, aufgetragen über die einzelnen Schichten der fetalen Kleinhirnrinde.

Die graphische Darstellung der Immunreaktivitätsintensität für Gli3 zeigt einen minimalen Anstieg im Verlauf zwischen der Inneren Körnerzellschicht, der Molekularschicht und der Äußeren Körnerzellschicht, ohne jegliche statistische Relevanz.

**3.2.6.3 Statistische Beurteilung von Frequenz und Intensität für Gli3**

Für Gli3 ließen sich aus der Gegenüberstellung der Rindenschichten folgende Werte ermitteln:

**Tabelle 26:** Gegenüberstellung der Kleinhirnschichten unter Beachtung der Frequenz und der Intensität. Erhebung der Daten für Gli3. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

	Frequenz Intensität	Innere Körnerzellschicht	Molekular- schicht	Äußere Körnerzellschicht
Innere Körnerzellschicht				
Molekular- schicht	0,4062 0,5169			
Äußere Körnerzellschicht	<,0001 *** 0,2001		0,0004 *** 0,5169	

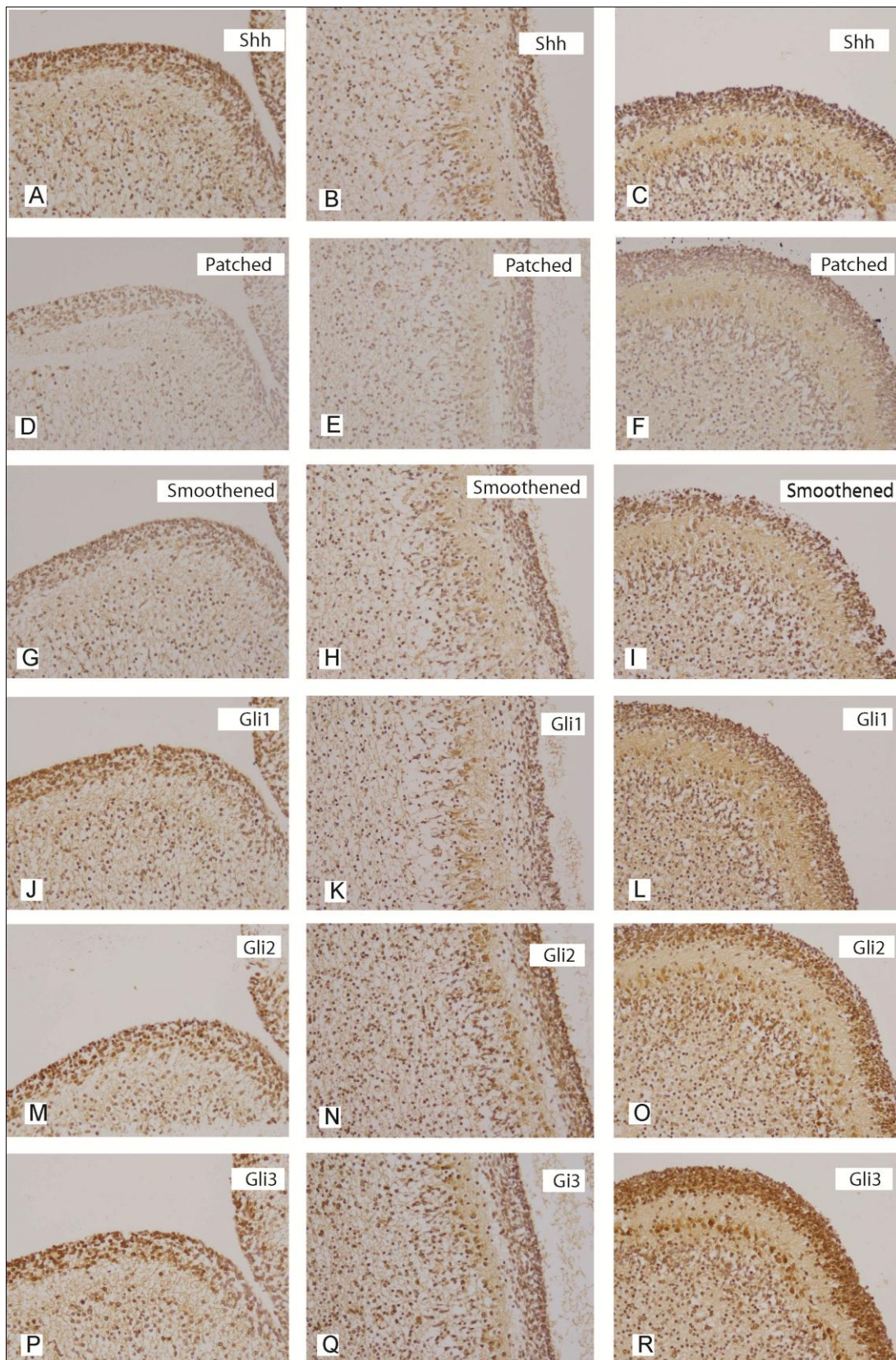
Es lässt sich bei der statistischen Auswertung der Immunreaktivitätsrate mit Hilfe der Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied zwischen der Äußeren Körnerzellschicht und der Inneren Körnerzellschicht ( $p < 0,001$ ), sowie zwischen der Äußeren Körnerzellschicht und der Molekularschicht ( $p < 0,001$ ) ermitteln. Die statistische Beurteilung der Intensität lässt keine signifikanten Werte detektieren.

**3.2.6.4 Altersabhängige Immunreaktivität für Gli3**

**Tabelle 27:** Darstellung der P-Werte der Kleinhirnschichten in Verbindung mit der Frequenz und der Schwangerschaftswoche, sowie der Intensität und der Schwangerschaftswoche für das Signalmolekül Gli3, sowie der Darstellung des Zeitverlaufes über die Schwangerschaft. (\*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ )).

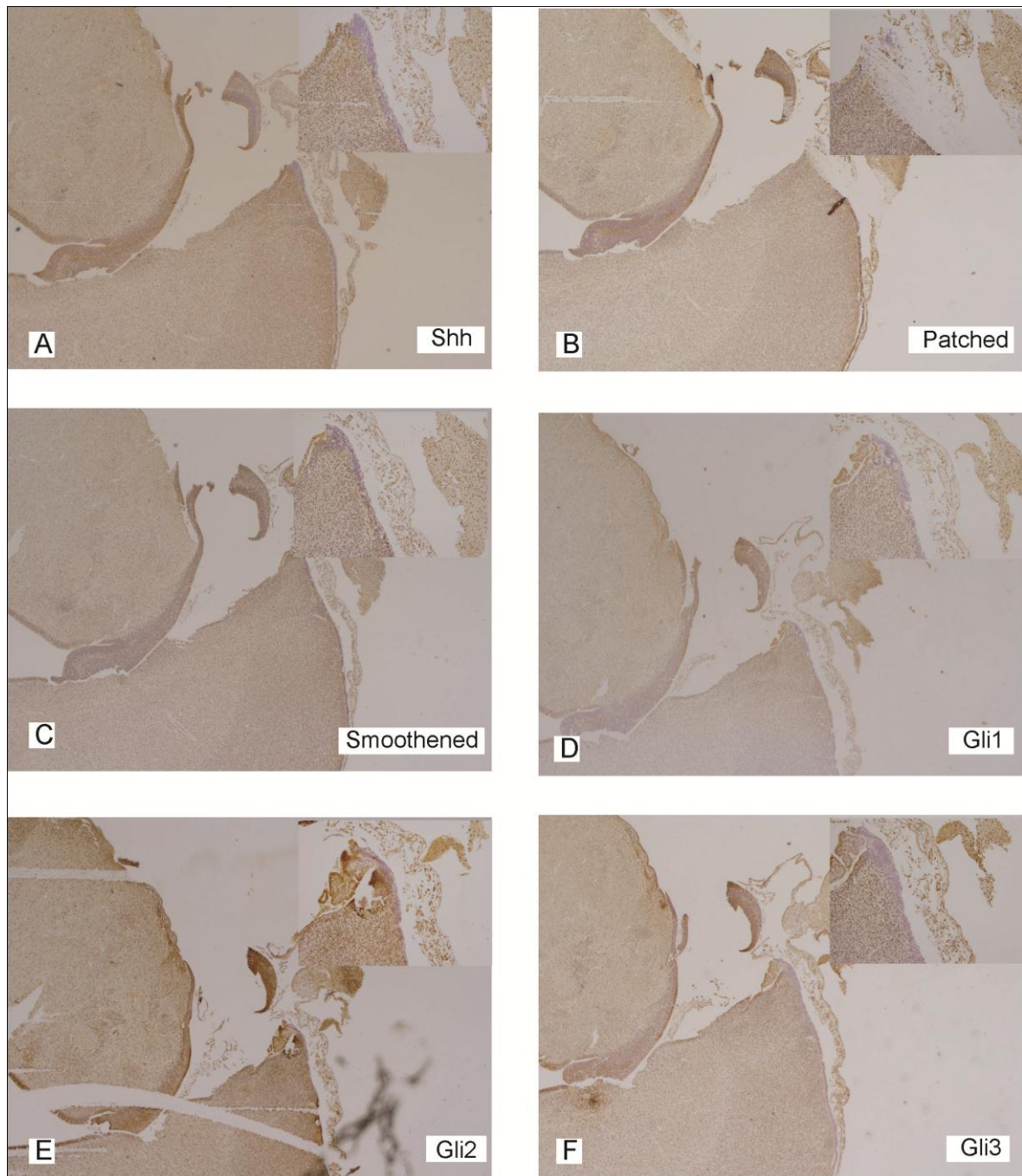
	Frequenz & SSW	Frequenz im Verlauf über die SSW	Intensität & SSW	Intensität im Verlauf über die SSW
Innere Körnerzellschicht	0,1582	↑	0,0765	↑
Molekularschicht	0,3439	↑	0,0199	↑ *
Äußere Körnerzellschicht	0,6422	↓	0,8447	↑

Die Auswertung des Antikörpers für Gli3, unter der zusätzlichen Betrachtung der altersabhängigen Immunreaktivität, ergab für die Immunreaktivitätsrate eine Zunahme der Werte in der Inneren Körnerzellschicht und der Molekularschicht, während sich in der Äußeren Körnerzellschicht eine Abnahme im Verlauf über die Zeit zeigt. Legt man aber den Fokus auf die Intensität, ergibt sich eine allgemeine Zunahme der Werte, wobei sich in der Molekularschicht ( $p < 0,05$ ) ein signifikantes Ergebnis zeigen lässt.



**Abbildung 38:** Darstellung der Kleinhirnrindenschichtungen im Zeitverlauf für alle sechs Antikörper. (A,D,G,J,M,P) Kleinhirnschichtung in der 12.SSW. (B,E,H,K,N,Q) Kleinhirnschichtung in der 19.SSW. (C,F,I,L,O,R) Kleinhirnschichtung in der 28.SSW. 20-fache Vergrößerung.

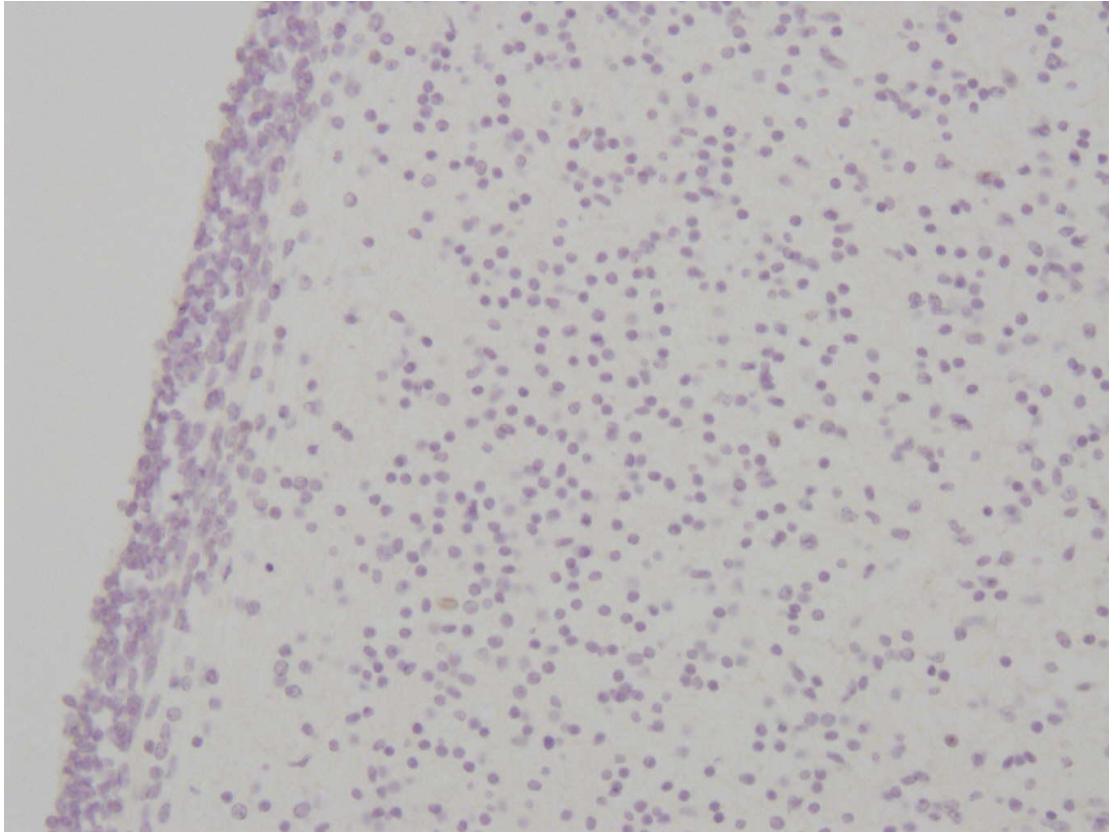
### 3.3 Rhombische Lippe



**Abbildung 39:** Darstellung der rhombischen Lippe in der 12. SSW. für Shh (A), Patched (B); Smoothed (C), GLi1 (D), Gli2 (E) und Gli3 (F). Große Bilder in 2-facher Vergrößerung, kleine Bilder im Bild in 10-facher Vergrößerung.

### 3.4 Auswertung der Kontrollschnitte

Die Negativkontrollen der jeweiligen Antikörper für Sonic Hedgehog, Patched, Smoothed, Gli1, Gli2 und Gli3 ergibt kein positives Signal auf den parallel mitgefärbten Kontrollschnitten.



**Abbildung 40:** Negativkontrolle exemplarisch für Gli1. 20-fache Vergrößerung.

#### 4 DISKUSSION

Da bis dato sehr wenig über die physiologische Verteilung von Sonic Hedgehog und seinen Hauptsignalmolekülen im sich entwickelnden menschlichen ZNS bekannt ist, war das Ziel dieser Arbeit eine möglichst genaue zeitlich-räumliche Darstellung der Verteilung zu erarbeiten.

Dabei wurde die Großhirn- und Kleinhirnschichtung von gesunden menschlichen Feten zwischen der 12. und der 28. Schwangerschaftswoche betrachtet. Der Arbeit liegt die Erhebung der Immunreaktivitätsrate und der Immunreaktivitätsintensität der positiv angefärbten Zellen der einzelnen Rindenschichten im Verlauf über die Schwangerschaftswochen zugrunde. Dazu wurde jedes Signalmolekül getrennt voneinander beurteilt. In die Arbeit gingen folgende Moleküle mit ein: Sonic Hedgehog selbst, die membranständigen Moleküle Patched und Smoothened sowie die Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3.

Die bisherigen Arbeiten befassten sich hauptsächlich mit der Betrachtung von Mausembryonen. Unter Einbeziehung der Veröffentlichungen soll nun die physiologische Verteilung im humanen ZNS diskutiert werden. Dabei werden jedoch das Großhirn und das Kleinhirn getrennt voneinander betrachtet.

Die Diskussion wird das Hauptaugenmerk auf die Immunreaktivitätsrate und somit auf die Anzahl der exprimierenden Zellen legen, da die Immunreaktivitätsrate eine schlüssigere Aussage über die Aktivität des Signalweges im Vergleich zu der Immunreaktivitätsintensität zu geben scheint. Dennoch ist die Aussage für die Aktivität nur eingeschränkt zu sehen, da mit der hier verwendeten Methode nur eine Aussage über das Vorhandensein des Moleküls zu machen ist. Über den Aktivierungszustand und das Bindungsverhältnis kann keine Aussage gemacht werden, eine Quantifizierung ist ebenfalls nicht möglich.

##### Zu hohe Bewertung der Immunreaktivitätsintensität?

Durch die gleichbleibenden Werte der Immunreaktivitätsintensität im Verlauf über die einzelnen Rindenschichten, sowohl im Kleinhirn, als auch im Großhirn, kann man davon ausgehen, dass wenn eine Überbewertung der Immunreaktivitätsintensität in den zellreicheren Rindenschichten vorhanden sein sollte, diese sehr gering ausfällt.



#### **4.1 Proliferation und Differenzierung im Großhirnkortex**

Bereits Choi, der sich in den 80iger Jahren des letzten Jahrhunderts mit den Proliferationszonen im physiologischen embryonalen bzw. fetalen Großhirn beschäftigte, konnte in der Ventrikulärzone, der Subventrikulärzone und der Intermediärzone mit dem Lichtmikroskop mitotische Figuren erkennen (Choi 1988). Simonati und seine Arbeitsgruppe zeigte 1999 ebenfalls die proliferative Aktivität der drei Rindenzonen in dem er sowohl den immunhistochemischen Nachweis des „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), als auch den Nachweis von Teilungsfiguren erbrachte (Simonati et al. 1999). Kendler und Golden beschrieben 1996 jedoch zusätzlich eine erhöhte Proliferationsrate gegen Mitte der Schwangerschaft in der Intermediärzone und der sekundären Rindenplatte, die dann zum Ende der Schwangerschaft hin wieder stark abfällt (Kendler und Golden 1996).

In der vorliegenden Arbeit ließen sich in den proliferationsreichen Rindenschichten (Ventrikulärzone, Subventrikulärzone) sowie in der Rindenplatte und der sekundären Rindenzone die höchsten Färbesignale detektieren. Dabei ist zu bedenken, dass die Ventrikulärzone direkt am Seitenventrikel und auch die Rindenplatte nahe am Gewebsrand liegen.

Somit lässt sich eine zu hohe Einstufung der Frequenz nicht ausschließen, da durch die verwendete Färbemethode im Randbereich mit vermehrt unspezifischen Färbungen zu rechnen ist. Der niedrigste Frequenzbereich ließ sich im Gegensatz dazu immer in der Intermediär- oder der Marginalzone ermitteln. Da die Marginalzone überwiegend die Randzone des Gewebstückes bildet und einen niedrigen Frequenzbereich aufweist, ist die Gefahr der Überbewertung von randständigen Hirnschichten nur relativ zu sehen.

##### **4.1.1 Proliferation bzw. Differenzierung und Sonic Hedgehog**

Mehrere Arbeitsgruppen konnten darstellen, dass Shh für die Proliferation von Vorläuferzellen zuständig ist (Rowitch et al. 1999, Lai et al. 2003, Machold et al. 2003, Palma et al. 2005). Rowitch beobachtete im Vergleich zum Wildtyp eine enorme Hyperplasie des dorsalen Rückenmarks und der Ventrikulärzone im Kortex von transgenen Shh-Mäuseembryonen (Rowitch et al. 1999). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es sich nur um ein erhöhtes Proliferationsniveau handelte und nicht um eine Verminderung des programmierten Zelltodes. Die Zellen in der vergrößerten Ventrikulärzone wiesen eine verzögerte oder gar gehemmte

Differenzierung auf, zudem zeigte sich eine Hochregulation von Patched und Gli1 (Rowitch et al. 1999). Im Gegenzug ergaben die Versuche von Palma 2005 mit einem selektiven Shh-Inhibitor eine Verminderung der Subventrikulärzone im signifikanten Bereich (Palma et al. 2005). Konsistent zu diesen Ergebnissen konnte Dahmane 2001 in den Großhirnen von Shh-/-Mäusemutanten eine verringerte Proliferation in der Subventrikulär- und Ventrikulärzone detektieren (Dahmane et al. 2001).

Diese Erkenntnisse lassen sich gut mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten vereinbaren. Es zeigt sich eine hohe Immunreaktivität von Shh und seinen synergistisch wirkenden Signalmolekülen, sowohl in der Ventrikulärzone, als auch in der Subventrikulärzone. Die Shh-Signalantwort nimmt im Schwangerschaftsverlauf ab. Dabei ergibt sich für die Ventrikulärzone sogar eine signifikante Reduktion der Immunreaktivitätsintensität. Shh scheint somit auch in der humanen Ventrikulär- und Subventrikulärzone für die Proliferation nötig zu sein. Die Abnahme der Immunreaktivität im Verlauf der fetalen Entwicklung lässt sich gut mit dem Rückgang der proliferativen Aktivität und der Zuwendung der Zellen zur Migration in die oberflächlicheren Rindenschichten erklären.

In der Intermediärzone ist, im Gegensatz zu den oben genannten Veröffentlichungen, eher ein niedriger Wert zu beobachten. Jedoch lässt sich im zeitlichen Verlauf eine Zunahme der Immunreaktivitätsintensität für alle sechs Signalmoleküle beobachten. Dies könnte dem Zustand Rechnung tragen, dass der untersuchte Zeitraum nur Feten bis zur 28.SSW einschließt, der von Kendler und Golden beschriebene Proliferationsanstieg jedoch erst zwischen der 23. und 25.SSW beginnt (Kendler und Golden 1996). Übereinstimmend mit diesen Daten konnte Harter, der den gleichen Patientenstamm wie in dieser Arbeit verwendete, mit Hilfe der Anfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67-Antigen die proliferative Aktivität in der Ventrikulärzone, der Subventrikulärzone und der Intermediärzone aufzeigen (Har08).

#### **4.1.2 Proliferation bzw. Differenzierung und Patched / Smoothened**

Für Patched, der in Anwesenheit von Shh inhibiert wird, zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster wie für Shh. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnte die Arbeitsgruppe um Charytoniuk eine Expression von Patched und Smoothened mRNA in der Subventrikulärzone der adulten Ratte, in der Anwesenheit von Shh

darstellen (Charytoniuk et al. 2002). Konsistent hierzu ergab sich bei der Shh-/Mutante ein Rückgang der Patched-Expression in der RT-PCR (Palma und Ruiz i Altaba 2004). In einer Veröffentlichung von 1996 interpretiert Chen die erhöhte Transkription von Patched, verursacht durch Shh, mit der zusätzlichen Fähigkeit von Patched, das extrazelluläre Shh wie einen Schwamm aufzusaugen und somit das „long-range-Signaling“ von Shh unterbinden zu können (Chen und Struhl 1996). Somit könnten Zellen mit einer erhöhten Expression von Patched oder Hip (Hedgehog interacting protein) das Ansprechen auf Shh vermindern und damit anderen Signalwegen eine Regulation ermöglichen (Ruiz i Altaba et al. 2004). Die Überlegung der „Schwamm-Funktion“ von Patched ließe sich mit der erhöhten Immunreaktivität in der Rindenplatte vereinbaren. Damit würde Patched die hohe Expression von Shh „aufsaugen“ und somit den Zellen in der Rindenplatte die Möglichkeit der Differenzierung gewähren (Rowitch et al. 1999).

Dennoch lässt sich mit dieser These die hochsignifikante Reduktion der Patched-Immunreaktivitätsrate in der humanen Ventrikulär- und Subventrikulärzone im Zeitverlauf nicht erklären. Es kommt zwar auch bei Shh zu einem Rückgang der Immunreaktivitätsrate, jedoch nicht in einem signifikanten Rahmen. Für dieses Ungleichgewicht zwischen Ligand und Rezeptor könnte es viele unterschiedliche Ursachen geben. Es besteht die Möglichkeit, dass beide Partner gemeinsam herunterreguliert werden, jedoch kann es auch nur zur Verminderung eines der beiden Partner kommen. Zusätzlich gilt es jedoch zu bedenken, dass, wie bereits erwähnt, durch die immunhistochemische Methode nur eine Aussage über das Vorhandensein, jedoch keine Aussage über den Aktivierungszustand bzw. das Bindungsverhältnis gemacht werden kann. Somit kann das durch die verwendete Methode gewonnene Patched-Signal nur die Gegenwart des membranständigen Rezeptors eindeutig belegen.

In einer Arbeit über die Funktion von DCC (deleted in colorectal cancer) als „dependence“-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass es durch die Herabregulation des Liganten Netrin-1 zur Apoptose im Darmlumen kommt (Bernet und Mehlen 2007). Auch dem Rezeptor Patched wird die Funktion als „dependence“-Rezeptor zugesprochen (Thibert et al. 2003). Somit könnte eine einseitige Herabregulation des Liganten Shh zur Apoptose der Zellen führen (Jenkins 2009).

Rowitch beschreibt jedoch auch eine enorme Überexpression von Patched und Gli1 in der hyperplastischen Ventrikulärzone der transgenen Shh-Mausmutante (Rowitch

et al. 1999). Dies deutet Rowitch als Hinweis, dass die Zellen im undifferenzierten, jedoch postmitotischem Stadium immer noch auf das Shh-Signal reagieren. Dabei wird die Hochregulation von Patched darauf zurückgeführt, dass es bei Patched-Mutationen zu hochproliferativen cerebellären Tumoren kommen kann (Goodrich et al. 1997).

Hier könnte nun das Vorhandensein eines „non-canonical“ Shh-Signalweges ins Spiel kommen (Jenkins 2009). Dabei konnte in der embryonalen Entwicklung der Nieren eine Regulation des Zellzykluses durch die direkte Interaktion zwischen Patched und Cyclin B1 beobachtet werden (Barnes et al. 2001), wobei es bei Abwesenheit des Liganten Shh zu einer Hemmung der späten G2-Phase und somit zum Stopp der Proliferation kommt (Jenkins 2009).

Somit scheint Patched nicht nur für die Interaktion mit Smoothened zu stehen, sondern auch noch in einer Reihe von anderen Steuerungsmechanismen involviert zu sein, die sowohl den Zellzyklus (Barnes et al. 2001), als auch die Regulation der Apoptose (Thibert et al. 2003) einbeziehen. Dabei könnte eine These dieser zusätzlichen Aufgaben von Patched im Rahmen der „non-canonical“ Signalwege sein, dass diese den herkömmlichen Signalweg vor möglichen Fluktuationen bzw. Störungen der Signalübermittlung schützen oder als eine Art Kontrollinstanz fungieren (Jenkins 2009).

Für den Transmembranrezeptor Smoothened, welcher in Anwesenheit von Shh aktiviert wird, zeigt sich, wie erwartet das gleiche Verteilungsmuster wie für Shh. Die selektive Inhibition von Smoothened durch Cyclopamine (Chen et al. 2002, Palma und Ruiz i Albata 2004) oder durch genetische Ablation vom Smoothened in neuronalen Vorläufern aus der Subventrikulärzone (Stecca 2005) zeigen die gleichen Ausfälle wie die Inhibition von Shh selbst (Stecca 2005).

#### **4.1.3 Proliferation bzw. Differenzierung und die Gli-Familie**

Die Transkriptionsfaktoren Gli1 und Gli2, denen im Menschen aktivierende Funktionen nachgesagt werden, zeigen sich in dieser Arbeit in einem ähnlichen Verteilungsmuster wie Shh. Bai spricht Gli1 in seiner Arbeit von 2002 eine Schlüsselrolle als Transkriptionsfaktor zu, da Gli1 die Funktion von Shh in der Anregung der Proliferation und die Aktivierung der Shh-Target-Gene übernehmen kann, aber für diese nicht zwingend notwendig ist (Matise et al. 1998, Bai et al. 2002). Das ähnliche Verteilungsmuster von Gli1 und Shh lässt sich durch die

Beobachtung von mehreren Arbeitsgruppen weiter untermauern, die die Expression von Gli1 in der Nähe von Shh sowie die Erhöhung der Gli1-Transkription durch Shh belegen konnten (Grindley et al. 1997, Hynes et al. 1997, Lee et al. 1997). Übereinstimmend zu den in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten, konnte Dahmane die Expression von Gli1 und Gli2 in der Subventrikulär- sowie der Ventrikulärzone des perinatalen Neokortex der Maus darlegen (Dahmane et al. 2001). Trotz Studien, die darstellen, dass die Hochregulation von Gli1 zu einer verstärkten Proliferation im neonatalen Mäusehirn führt (Hynes et al. 1997), konnte Rowitch aufzeigen, dass die Hochregulation von Gli1 alleine nicht ausreichend für die Proliferation von neuronalem Gewebe ist (Rowitch et al. 1999).

Die Gli2<sup>-/-</sup> Mausmutante von Palma zeigte vor allem in den Proliferationszonen eine erhebliche Verminderung. Die größte Reduktion ließ sich in der Subventrikulärzone beobachten. Die Neuroblasten und SVZ/VZ spezifischen Zellen waren bis zu 50% im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Zudem ließen sich in der mittleren und späten Schwangerschaft weniger Vorläuferzellen im Kortex nachweisen, was die Vermutung von Defekten sowohl neuronaler, als auch glialer Zellpopulationen nahe legt (Palma und Ruiz i Altaba 2004).

Der Transkriptionsfaktor Gli3, der sowohl eine aktivierende, als auch eine inhibierende Form besitzt (Kim et al. 2003), weist ebenfalls ein vergleichbares Muster zum Kurvenverlauf des Liganden Shh über die Großhirnrinde auf. Somit muss man davon ausgehen, dass während des untersuchten Zeitraums mehrheitlich die aktivierende Form überwiegt. Auch die Literatur belegt einen Zusammenhang zwischen der Gli3-Expression und der Proliferation. So konnten Palma und Ruiz i Altaba, wie auch die Arbeitsgruppe um Franz und Theil vor ihnen, bei ihren Gli3<sup>-/-</sup> Mutanten einen stark verminderten Neokortex der Maus zeigen (Franz et al. 1994, Theil et al. 1999, Palma und Ruiz i Altaba 2004).

Der nicht signifikante Zuwachs der Immunreaktivitätsrate sowie der Immunreaktivitätsintensität in den Proliferationszonen bei der Betrachtung über die Zeit ließe sich mit der inhibierenden Form von Gli3 (Wang et al. 2000) erklären. Diese Form wird in Abwesenheit von Shh stärker exprimiert, ist jedoch in der hier gewählten Methode nicht separat zu erfassen.

#### **4.1.4 Proliferation in der Intermediärzone?**

In der Literatur wird im Zuge der proliferationsreichen Rindenschichten auch immer die Intermediärzone als solche beschrieben (Choi 1988, Simonati et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit ließ sich diese generelle proliferative Aktivität, anhand einer hohen Shh-Immunreaktivitätsrate in der Intermediärzone, jedoch nicht beobachten. Dabei zeigten die ermittelten Werte aller sechs untersuchten Signalmoleküle übereinstimmend, im Vergleich zu den anderen Rindenschichten der Großhirnrinde, mit die niedrigste Immunreaktivitätsrate. Ein Erklärungsversuch könnte sein, dass es sich bei der Intermediärzone um eine Mischpopulation handelt. Es zeigen sich unter anderem Populationen von Neuroblasten und Radiärglia. Die Neuroblasten könnten weniger Shh exprimieren und somit eine Ursache der niedrigen Signalantwort sein. Zudem übernehmen die glialen Fasern hauptsächlich die Funktion der Führungsstruktur und stehen somit vordergründig nicht mit der Shh-Expression im Zusammenhang.

Jedoch lässt sich bei der Betrachtung über die Zeit für Shh und Gli2 ein Zugewinn in der Signalintensität (für Gli2 hoch signifikant) beobachten. Für Patched ist ein signifikanter Zuwachs sowohl der Immunreaktivitätsrate, als auch der Immunreaktivitätsfrequenz zu erkennen. Smoothed und Gli1 erbringen eine signifikante Zunahme der Signalrate. Somit könnte diese über den Schwangerschaftsverlauf beobachtete Entwicklung gut mit dem in der Literatur beschriebenen Proliferationshöhepunkt zwischen der 23. bzw. 25. SSW (Kendler und Golden 1996) in Einklang gebracht werden.

#### **4.1.5 Zusammenschau**

Bei der generellen Übersicht über die Verteilung der untersuchten Signalwegmoleküle zeigt sich ein stetiges Vorhandensein aller Moleküle über alle Großhirnschichten. Dies ist zusätzlich über den kompletten untersuchten Zeitraum darzustellen. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass die einzelnen Komponenten, vor allem die Transkriptionsfaktoren, nicht nur über den „canonical“ Shh-Signalweg direkt reguliert werden, sondern auch über andere Regulationsmechanismen wie die „non-canonical“ Shh-Signalwege (Jenkins 2009) und zusätzlich über andere Signalkaskaden, wie z. B. den Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweg (Mullor JL et al. 2001, Watt FM 2004, Ulloa F et al. 2007) gesteuert werden. Dabei kommt es teilweise zu einer Aufregulierung der Gli-Funktion, z. B. durch die Kinase

Dyrk1 (Mao J et al. 2002) oder das Actin-Bindungsprotein MIM (Missing in Metastasis) (Callahan CA et al.2004). Eine Negativ-Regulation kann z.B. durch Numb, eigentlich ein Notch-Inhibitor (Di Marcotulli L et al. 2006), Sufu (Suppressor of fused) (Kogermann P et al.1999, Svard J et al.2006) bzw. REN (Di Marcotulli L et al. 2004) eintreten.

#### **4.2 Proliferation und Differenzierung im Kleinhirnkortex**

Wechsler-Reya und Scott stellten in ihrer Arbeit dar, dass Shh mitogen auf Körnerzell-Vorläuferzellen wirkt. Zudem konnten sie zeigen, dass es bei einer Blockierung von Shh in vivo zu einer Reduzierung der Äußeren Körnerzellschicht kommt (Wechsler-Reya und Scott 1999). In vitro konnte derselbe Effekt der verminderten Proliferation an Vorläuferzellen der Äußeren Körnerzellschicht aus der Maus bestätigt werden (Dahmane und Ruiz i Albata 1999). Übereinstimmend ergab eine in situ Hybridisierung von Wallace im sich entwickelnden Mäusekleinhirn, dass Shh von den Purkinjezellen exprimiert wird und die sich teilenden Zellen in der Äußeren Körnerzellschicht darauf mit einer Exprimierung von Patched und Gli1 reagieren (Wallace et al.1999). Die Wissenschaftlerin führt somit den Hinweis, dass Shh die Proliferation von Vorläuferzellen der Äußeren Körnerzellschicht induziert. Des Weiteren vertritt sie die These, dass das von den Projektionsneuronen gebildete Shh die Teilung der neuronalen Vorläuferzellen vorantreibt, die im Verlauf zu Neuronen ausreifen. Sie sieht darin einen gängigen Entwicklungsmechanismus, da sich derselbe Mechanismus auch in der Entwicklung der Retina (Jensen und Wallace 1996) darstellen ließ.

Ein ähnliches Bild zeigen die Daten, die in dieser Arbeit ermittelt wurden. Dabei ließ sich ebenfalls wie in anderen Studien (Wallace et al.1999, Dahmane und Ruiz i Albata 1999) eine Expression von Shh, Patched, Smoothed, Gli1, Gli2 und Gli3 in der Äußeren Körnerzellschicht darstellen. Passend zu der These aus der Literatur lässt sich bei der Betrachtung über den zeitlichen Verlauf eine Abnahme der Immunreaktivitätsrate von allen untersuchten Signalmolekülen in der Äußeren Körnerzellschicht, der Proliferationszone des Kleinhirns, zeigen. Bunz konnte bei der Untersuchung des gleichen Patientenstamms die proliferative Aktivität der Äußeren Körnerzellschicht anhand des Nachweises des Proliferationsmarkers Ki-67-Antigen erbringen (Bun09).

In der hier vorliegenden Arbeit lässt sich für Shh, zusätzlich zur Abnahme der Immunreaktivitätsrate im Zeitverlauf, ein signifikanter Rückgang der Immunreaktivitätsintensität ausmachen. Im Konsens damit sind der hochsignifikante Rückgang der Gli1-Immunreaktivitätsrate und die signifikante Abnahme der Intensität für Gli1 zu sehen.

Im Kontrast dazu steht die Veröffentlichung von Abraham, die den Proliferationshöhepunkt der Äußeren Körnerzellschicht zwischen der 28. und 34. Entwicklungswoche der Schwangerschaft ausweist (Abraham et al. 2001).

Da die Daten in der vorliegenden Arbeit nur den Zeitraum von der 12. bis zur 28. SSW umfassen, wäre eine Zunahme des Shh- bzw. Gli1-Signals zum Ende des untersuchten Zeitraumes zu erwarten. Ein Erklärungsversuch könnte ein zweigipfliger Expressionsverlauf über die Schwangerschaft sein. Dabei könnte der erste Expressionshöhepunkt eher im ersten bzw. zu Beginn des zweiten Trimenons liegen, wenn die bereits differenzierten Projektionsneuronen Shh exprimieren, um die Teilung der neuronalen Vorläuferzellen voranzutreiben (Wallace 1999). Der zweite Expressionshöhepunkt könnte dann der erhöhten Proliferation gegen Ende der Schwangerschaft Rechnung tragen (Abraham et al. 2001).

Der zweite Erklärungsversuch bezieht sich auf den Umstand, dass die proliferative Aktivität der Äußeren Körnerzellschicht bis weit nach der Geburt anhält (Abraham et al. 2001), und dass es somit ein zusätzliches Signal geben muss, welches die Differenzierung der Körnerzellen während der Schwangerschaft vermittelt. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die Drosselung der Proliferation nicht alleine mit der Verminderung des Shh-Konzentrationsniveaus zu erklären ist. Das extrazelluläre Matrixglykoprotein Vitronectin besitzt die Fähigkeit, das Ansprechen von Vorläufern der Äußeren Körnerzellschicht auf Shh zu reduzieren. Dieser Vorgang involviert zusätzlich die Phosphorylierung des „cAMP response element binding protein“ (CREB), welches die Shh vermittelte Proliferation terminiert und die Differenzierung der Körnerzellen vorantreibt (Pons et al. 2001). Jedoch sind auch andere Mechanismen zur Beendigung der Proliferation der Äußeren Körnerzellschicht denkbar. In embryonalen Nierenzellen lässt sich zum Beispiel, wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, eine direkte Interaktion zwischen Patched und Cyclin B1 beobachten, welche dort die Zellzyklusprogression reguliert (Barnes et al. 2001).



#### 4.2.1 Innere Körnerzellschicht

Die hohen Mittelwerte, sowohl der Immunreaktivitätsrate, als auch der -intensität, die in der Inneren Körnerzellschicht für Shh, Patched, Smoothened, Gli1 und Gli2 ermittelt wurden, lassen sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf neuronale Zellen, der späteren Purkinjezellschicht, zurückführen. Die Purkinjezellschicht wurde hier nicht getrennt ausgewertet, da diese zu Beginn des untersuchten Zeitraumes, ab der 12.SSW, noch nicht zu erfassen ist (siehe hierzu Abbildung 38, (A,D,G,J,M,P)). Jedoch lässt sich in reiferen Großhirnschichten eine Schicht mit sich beginnend differenzierenden Purkinjezellen ausmachen (siehe hierzu Abbildung 38, (B,E,H,K,N,Q) für die 19.SSW, sowie (C,F,I,L,O,R) für die 28. SSW).

Bemerkenswert erscheint bei der Betrachtung der Inneren Körnerzellschicht der hohe Mittelwert der Gli1-Immunreaktivitätsrate, der sogar noch den der Immunreaktivitätsrate der Äußeren Körnerzellschicht übersteigt. Auch in der Literatur lässt sich eine Expression von Gli1 in der Inneren Körnerzellschicht der Maus- und des Hühnerembryos finden (Lin und Cepko 1998, Dahmane und Ruiz i Altaba 1999). Da sich diese Anreicherungen in der Literatur eher auf die frühe Phase der Entwicklung beziehen (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999), und es auch in dieser Arbeit zu einer Frequenzreduktion von Gli1 im Schwangerschaftsverlauf kommt, könnte dies als frühe Proliferationsreaktion, z. B. der Bergmann-Glia (Wallace 1999, Dahmane und Ruiz i Altaba 1999), auf das Shh-Signal gewertet werden. Zudem fand Wallace in der Purkinjezellschicht kleine runde Zellen, die Gli1 und Patched exprimierten, jedoch war es ihr nicht möglich diese Zellen zu charakterisieren (Wallace 1999).

Gli2 zeigt einen ähnlichen Verlauf wie Shh, was sich gut mit der Funktion als Aktivator des Signalweges (Shin SH et al. 1999, Sasaki H et al. 1999) vereinbaren lässt. Gli3 hingegen weist in der Inneren Körnerzellschicht, im Gegensatz zu den anderen fünf untersuchten Signalmolekülen, einen niedrigeren Wert als die Molekularschicht auf. Passend dazu beschreibt Dahmane auch nur ein schwaches Signal (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999), während Wallace Gli3 in der Purkinjezellschicht gar nicht nachweisen konnte (Wallace 1999). Dies legt die Vermutung nahe, dass hier die antagonistischen Wirkungen von Gli3 (Wang et al. 2000) zum Tragen kommen, was die Beobachtung des Anstieges von Gli3 im Zeitverlauf noch unterstützt.

#### **4.2.2 Bergmann-Glia und Sonic Hedgehog**

Dahmane und Ruiz i Altaba konnten in einer Arbeit von 1999 darlegen, warum, wie schon Arbeitsgruppen (Fisher et al. 1993, Sotelo et al. 1994) vor ihnen beschrieben hatten, die Purkinjezellen für die Ausreifung Bergmann-Glia notwendig sind (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999). Die Bergmann-Glia benötigen das von den Purkinjezellen exprimierte Shh-Signal zu deren Ausdifferenzierung. Daraus ergab sich die These, ob Bergmann-Glia, die durch das Shh-Signal ausgereift sind, ihrerseits einen negativen Effekt auf das Shh-Signal besitzen. Dieses negative Feedback könnte dann die Proliferation in der Äußeren Körnerzellschicht drosseln und somit die Zellzahl kontrollieren (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999). Diese Überlegung ist vereinbar mit dem hemmenden Effekt von Bergmann-Glia auf die Vorläuferzellen der Äußeren Körnerzellschicht in vitro (Gao et al. 1991). Dahmane kommt in ihrer Arbeit zu diesem Gedankenspiel: Somit würde Shh einen Regulationskreislauf betreiben, in dem er direkt die Proliferation der oberflächlich liegenden Körnerzellvorläufer der Äußeren Körnerzellschicht vorantreibt und gleichzeitig indirekt die Differenzierung der tiefer liegenden Körnerzellvorläufer in reifere Zellstufen induziert. Diese Differenzierung erfolgt dann mediatorvermittelt durch Nachbarzellen, zum Beispiel Bergmann-Glia, die ihrerseits das Shh-Signal zur Ausreifung benötigen (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999).

Der Nachweis von Shh und seinen Signalmolekülen in Rindenzonen, in denen keine proliferative Aktivität nachgewiesen werden konnte, wie der Marginalzone, sekundären Rindenzone, sowie der Rindenplatte (Har08) lässt schon erahnen, dass die Rolle des Shh-Signalweges weit über die der Proliferation hinausgeht. Deshalb befasst sich der folgenden Abschnitt mit den Aufgaben von Shh im Rahmen der Auswanderung der Zellen.

#### **4.3 Migration**

Lange Zeit ahnte man, dass der Shh-Signalweg in die Migration involviert sein muss, da man zeigen konnte, dass ein fehlerhafter Shh-Signalweg Migrationsdefekte nach sich zieht (Roessler et al. 1996, Vargas et al. 1998, Cohen 2006). Jedoch ließ sich ein eindeutiger Nachweis lange nicht erbringen. Nun konnte Angot in einer aktuellen Arbeit die Notwendigkeit von Shh bei der Migration von Neuroblasten aus der Subventrikulärzone in den Riechkolben der adulten Maus darstellen (Angot et al.

2008). Dabei zeigt die Arbeitsgruppe, dass migrierende Neuroblasten der SVZ, den Shh-Rezeptor Patched exprimieren und somit auf dessen Signal reagieren können. Konsistent zu diesen Beobachtungen zeigte sich bei Überexpression von Shh eine erhöhte Anzahl von Neuroblasten im Riechkolben und bei Blockierung des Shh-Signalweges das gegenläufige Verhalten. Im Einklang dazu konnte die Arbeitsgruppe bei der Beobachtung der aus der SVZ stammenden Neuroblasten ein Abweichen der auswandernden Zellen auf die ektope Shh-Überexpression hin darstellen (Angot et al. 2008).

Im folgenden Abschnitt werden die möglichen Funktionen des Shh-Signalweges im Rahmen der Migration im sich entwickelnden menschlichen Gehirn dargestellt.

#### **4.3.1 Migration im Neokortex**

Betrachtet man die Mittelwerte der Immunreaktivitätsrate von Shh im Verlauf über die Rindenschichten, so bietet sich eine zweigipflige Kurve. Den ersten Höhepunkt bildet die Ventrikulärzone, den zweiten die Rindenplatte. Dies lässt nun die Überlegung einer bereits in der Entwicklung des Rückenmarks beschriebenen Möglichkeit der Zellmigration anhand eines Shh-Gradienten zu (Goulding und Lamar 2000, Ho und Scott 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass die im dorsalen Teil des Rückenmarks gebildeten Axone gen Bodenplatte und somit auf das wachsende Shh-Niveau zu migrieren (Briscoe und Ericson 2001). Dort angekommen drehen die Kommissurenfasern ab und migrieren von hohen Shh-Gradienten weg gen rostral (Bourikas V et al. 2005, Jenkins 2009). Dieses Migrationsmodell könnte auch in der Großhirnrinde zum Tragen kommen. Dabei würde der vorliegende hohe Level von Shh in der Ventrikulärzone als repulsiver Faktor dienen und damit das Abwandern der Zellen bei abfallendem Gradienten bedingen. In der Intermediärzone angelangt, dem niedrigsten Shh-Niveau, könnte nun Shh seine konträre Funktion nutzen und als Chemoattraktor die auf der Wanderschaft befindlichen Zellen, anhand eines nun steigenden Gradienten, in die Rindenplatte locken.

Bei der Betrachtung der Immunreaktivitätsintensität über den Schwangerschaftsverlauf zeigt sich für Shh eine Abnahme der Intensität in den proliferationsreichen Schichten des Neokortex, der Subventrikulär- und der Ventrikulärzone, wobei in den anderen vier eher ventrikelfernen Kortexschichten die Shh-Intensität zunimmt. Hierzu passend zeigt sich eine Zunahme der Patched-Signal-Intensität in den

Proliferationszonen, welche durch die Abwesenheit der inhibitorischen Wirkung von Shh zu erklären wäre. Somit ginge die Proliferation zurück und die Migration würde beginnen.

Die Migration, weg von den Proliferationszonen hin zur Rindenplatte, könnte sich in einer Erhöhung der Immunreaktivitätsintensität im Verlauf der Schwangerschaft darstellen. Für Shh ergibt sich ab der Intermediärzone bis hin in die Marginalzone eine Zunahme mit steigendem fetalen Alter. Synchron zeigt sich dieses Muster auch für Smoothed, Gli1 und Gli2. Dabei fällt auf, dass eine steigende Immunreaktivitätsintensität für Gli1 nur bis zur sekundären Rindenplatte zu beobachten ist. Dies führt zu dem Gedankenspiel, ob Gli1 nur für die räumlich nähere Migration zuständig sein könnte. Durch die Abnahme der Gli1-Immunreaktivität in der Rindenplatte und der Marginalzone könnte sich während des Schwangerschaftsverlaufs der Migrationsradius der auf der Auswanderung befindlichen Zellen verringern. Diese Überlegung ließe sich durch die Veröffentlichungen stützen, in denen das Vorkommen von Gli1 eher in räumlich näheren Regionen zum Shh-Expressionsort beschrieben wird, während Gli2 und Gli3 in weiterer Entfernung zum Shh-Expressionsort zu finden sind (Hui et al. 1994, Marigo et al. 1996, Lee et al. 1997). Gegen diesen Gedankengang einer isolierten Funktion von Gli1 in der Migration spricht zumindest im Tiermodell die Beobachtung, dass es bei Versuchen mit Gli1-/- Mutanten zu keinen detektierbaren Entwicklungsstörungen kam (Ding et al. 1998, Park et al. 2000). Somit geht man zumindest im Tiermodell davon aus, dass die DNA-Bindungsaktivität von Gli1 nicht für die Shh-Signalverarbeitung notwendig ist (Matise et al. 1998, Bai et al. 2002). Passend dazu ließ sich in den Neuroblasten der SVZ der Maus ebenfalls eine Abwesenheit der Gli1-Expression zeigen (Ahn und Joyner 2005, Balordi und Fishell 2007).

Für Gli3 trifft dieses oben beschriebene Verteilungsmuster nur teilweise zu, da über alle sechs Großhirnschichten eine Zunahme oder ein Gleichbleiben der Immunreaktivitätsintensität im Zeitverlauf zu verzeichnen ist. Hier ergibt sich wieder das technische Problem, dass die immunhistochemische Methode keine Differenzierung zwischen dem aktivierenden und dem hemmenden Gli3-Molekül zulässt. Somit könnte die Zunahme der Immunreaktivitätsrate und der Immunreaktivitätsintensität in den Proliferationszonen im Schwangerschaftsverlauf auch auf die inhibierende Form des Gli3-Moleküls zurückgehen.

Jedoch zeigt sich bei der Betrachtung der Mittelwerte der Immunreaktivitätsrate bzw. -intensität für Gli3 und den dazugehörigen Kurvenverläufen in der Großhirnrinde im Vergleich zu Shh sowie den synergistisch wirkenden Signalmolekülen Smoothed, Gli1 und Gli2 ein ähnlicher Kurvenverlauf. Somit handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei dem detektierten Signal hauptsächlich um die aktivierende Form, da man bei einem Überwiegen der hemmenden Form von Gli3 einen gegenläufigen Kurvenverlauf im Vergleich zu den aktivierenden Kurvenverläufen erwarten würde.

#### **4.3.2 Migration im Kleinhirnkortex**

Betrachtet man die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Immunreaktivitätsrate sowie zur Intensität im Kleinhirn, so zeigt sich für Shh eine ähnliche Verteilung wie im Großhirn. In der Äußeren Körnerzellschicht, die im Kleinhirn die Proliferationszone darstellt, zeigt sich eine Verminderung der Shh-Frequenz und eine signifikante Abnahme der Shh-Intensität im Verlauf der Schwangerschaft. Somit werden auch hier die Abnahme der Proliferation und ein Auswandern der Zellen deutlich. Zusätzlich ist in der Molekularschicht eine Abnahme der Immunreaktivitätsintensität zu verzeichnen, was dafür sprechen könnte, dass die Zellen nicht in der zellarmen Molekularschicht verharren, sondern weiter in die Innere Körnerzellschicht ziehen. Wie bereits von Dahmane und Ruiz i Altaba 1999 beschrieben, konnte auch in dieser Arbeit die Expression von Shh durch Purkinjezellen dargestellt werden. Somit könnte ein weiterer Erklärungsversuch für die Abnahme des Shh-Signals in der Intermediärzone die Reduktion der Shh-Expression der Purkinjezellen, durch das negative Feedback der Bergmann-Glia sein (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999). Damit würden, wie bereits im Text erwähnt, die durch das Shh-Signal ausgereiften Bergmann-Glia ihrerseits das Auswandern bzw. die Ausdifferenzierung der Vorläuferzellen ermöglichen (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999). Vor diesem Hintergrund scheint der Beitrag von Sonic Hedgehog zur Migration der Vorläuferzellen in der Ausreifung der Bergmann-Glia zu liegen.

Überraschenderweise zeigt sich, im Gegensatz zum Verteilungsmodell von Dahmane und Ruiz i Altaba (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999), in der Inneren Körnerzellschicht eine Zunahme, sowohl der Shh-Frequenz, als auch der Shh-Intensität. Dies führt zu der Überlegung, ob auch hier eine Migration der Zellen auf

eine Shh-Anreicherung zu von Bedeutung ist. Dies wurde schon von Angot im Großhirn der adulten Maus beobachtet (Angot et al. 2008). Ebenfalls passend dazu wäre die Hypothese der Auswanderung der Zellen anhand eines konzentrationsabhängigen Shh-Niveaus (Lipinski et al. 2008).

Für Gli1 ergeben sich ähnliche Werte wie für Shh, wobei in allen drei Schichten eine Abnahme über die Zeit zu beobachten ist, die in der Äußeren Körnerzellschicht und in der Molekularschicht signifikante Werte erbringt. Die Abnahme der Gli1-Rate und Intensität in der Inneren Körnerzellschicht würde zu der These aus den Beobachtungen im Großhirn passen, dass die Verminderung des Gli1-Signales eine Reduktion des Migrationsradiuses zur Folge haben könnte und somit die Gli1-Expression nur für die Migration in räumlicher Nähe zum Shh-Expressionsort eine Rolle spielt (Hui et al. 1994, Marigo et al. 1996, Lee et al. 1997).

Bei der Betrachtung der anderen Signalmoleküle wie Smoothened, Gli2 und Gli3 kommt es zwar zu der erwarteten Abnahme der Immunreaktivitätsrate in den proliferationsreichen Schichten im Zeitverlauf, jedoch zeigt sich eine durchgehende Zunahme der Intensität. Dies führt zu der Vermutung, dass die Migration im Kleinhirn anderen Regulationsmechanismen als im Großhirn unterliegt. Wobei auch hier wieder die Problematik zu Buche schlägt, dass keine Differenzierung der möglicherweise hemmenden Moleküle des Gli3-Signales möglich ist.

Jedoch gilt es bei der Interpretation der Verteilung der Gli-Transkriptionsfaktoren die Möglichkeit zu bedenken, dass diese überhaupt keine Rolle in der Migration, sowohl des Großhirnes, als auch des Kleinhirnes, spielen könnten. Hierzu konnte Lipinski in seinen Beobachtungen des Hh induzierten Migrationsverhaltens von Fibroblasten der Maus einen entscheidenden Hinweis geben.

Lipinski zeigte 2008 in seiner Arbeit mit embryonalen Gli2<sup>-/-</sup> und Gli3<sup>-/-</sup> Mausmutanten, dass in der Muskelzelle generell Gli2 oder Gli3 für die transkriptionale Signalantwort von Shh notwendig ist. Die Hh induzierte Migration der Fibroblasten jedoch unabhängig von der Gli-Transkriptionsfaktoraktivität stattfindet (Buttitta et al. 2003, McDermott et al. 2005, Lipinski et al. 2006). Die Migration wird dabei durch einen alternativen Signalweg vermittelt, der weiterhin von der Smoothened-Funktion abhängig ist, jedoch keine Transkription durch die Gli-Familie benötigt (Bijlsma et al. 2007, Bijlsma et al. 2008). Der alternative Signalweg vermittelt die Auswanderung der Zellen durch ein konzentrationsabhängiges Shh-Niveau (Lipinski et al. 2008).

Wie im Text bereits erwähnt, ließ sich auch im ZNS der Maus zumindest für Gli1 keine isolierte Aufgabe im Rahmen der Migrationsvorgänge nachweisen (Ding et al. 1998, Park et al. 2000, Ahn und Joyner 2005, Balordi und Fishell 2007).

#### **4.4 Rhombische Lippe und Sonic Hedgehog**

Die Rhombische Lippe liegt, wie bereits beschrieben, im Rhombencephalon und setzt sich aus einem oberen und einem unteren Anteil zusammen. Aus der unteren rhombischen Lippe entstehen verschiedene präcerebelläre Nuclei (Harkmark 1954, Rodriguez und Dymecki 2000). Der obere Anteil beinhaltet drei proliferative Zonen, aus denen die Körnerzellvorläufer stammen, die dann entlang der pialen Oberfläche auswandern, um die Äußere Körnerzellschicht zu bilden (Lin et al. 2001, Wingate und Hatten 1999).

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen für Shh und seinen Signalweg ließ sich für alle sechs untersuchten Signalmoleküle ein Fehlen des Anfärbesignals in der oberen und unteren rhombischen Lippe beobachten (siehe hierzu Abbildung 39). Dieses Phänomen konnte bei einem Feten in der 12.SSW dargestellt werden. Da dieser Fall dem frühesten Zeitpunkt des hier untersuchten Zeitraumes entspricht, ist leider keine Aussage über die früheren Entwicklungsstadien möglich. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass zumindest zu diesem Zeitpunkt der Shh-Signalweg in der rhombischen Lippe des humanen ZNS nicht aktiviert ist.

In einer aktuellen Studie an Mäusen konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden. Dabei zeigte die Arbeitsgruppe um Huang in der in situ Hybridisierung ein Fehlen von Shh in der unteren rhombischen Lippe und die zusätzliche Abwesenheit des Shh-Proteins. Die in der Publikation veröffentlichten Bilder zeigen die untere rhombische Lippe in der E12.5 (Huang et al. 2009). Dies entspricht nach den Carnegie Stadien dem Stadium 16, und somit dem 40. Entwicklungstag (6. SSW), in der humanen Embryonalentwicklung (O’Rahilly 1979, Theiler 1972). Daraus könnte sich im Hinblick auf oben beschriebene Daten der Hinweis ableiten, dass der Shh-Signalweg auch zu einem früheren Entwicklungszeitpunkt im Menschen nicht aktiv sein könnte.

Übereinstimmend mit den in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten konnte die Arbeitsgruppe um Huang bei Mäusen zusätzlich ein negatives Signal für Gli1 in der unteren rhombischen Lippe, sowohl in E12.5, E14.5, als auch in E16.5 zeigen.

Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit ließ sich jedoch für Gli3 in E14 ein positives Signal detektieren (Huang et al. 2009). Daraus könnte geschlossen werden, dass in der Maus der Transkriptionsfaktor Gli3 in diesem Zusammenhang von anderen Signalwegen stimuliert wird.

Zusammenfassend könnten die Beobachtungen in der rhombischen Lippe den Hinweis geben, dass die Körnerzellvorläufer erst bei der Migration entlang der pialen Oberfläche, wie Dahmane vermutet (Dahmane et al. 1999), oder gar erst in der Äußeren Körnerzellschicht selbst mit dem Shh-Signal in Berührung kommen.

Die Wichtigkeit eines funktionsfähigen und somit fehlerfrei funktionierenden Signalweges, weit über die embryonale Entwicklung des Gehirnes hinaus, zeigt der folgende Abschnitt.

#### **4.5 Medulloblastome und der Sonic Hedgehog-Aktivierungsweg**

Die erste Verbindung zwischen dem Shh-Aktivierungsweg und der Entstehung von Tumoren ergab sich Mitte der 90er Jahre aus der Entdeckung, dass Patienten mit Gorlin- oder Basalzellnävus-Syndrom vermehrt Medulloblastome, Rhabdomyosarkome und Basalzellkarzinome entwickeln (Gorlin 1995). In diesen Tumoren ließ sich zusätzlich eine Patched-Mutation nachweisen (Hahn et al. 1996, Johnson et al. 1996). Passend dazu zeigten Mäuse mit nur einem funktionsfähigen Patchedallel eine abnorm hohe Frequenz an Tumoren des Kleinhirns und der Muskeln (Goodrich et al. 1997, Hahn et al. 1998). Der Verlust der Patched-Funktion führt zu einer Aktivierung des Shh-Signalweges (Goodrich et al. 1997, 1998) und somit konsequenterweise zu einer Aktivierung der Gli1-Funktion (Lee et al. 1997). Dies konnte durch den Zustand, dass Patched-/- Mäuse und Menschen ohne funktionsfähiges Patchedallel Medulloblastome entwickeln weiter untermauert werden (Johnson et al. 1996, Hahn et al. 1996, Goodrich et al. 1996).

Eckpfeiler im Verständnis der Entstehung dieser Tumorentität bildet die Entdeckung der Shh-induzierten Proliferation und dem mitogenen Effekt von Shh auf Körnerzellvorläufer (Wechsler-Reya und Scott 1999) im sich physiologisch entwickelnden Kleinhirn. Somit könnte die Entstehung von Medulloblastomen durch das Unvermögen, den Shh-Aktivierungsweg herunter zu regulieren und eine damit verbundene übermäßige Proliferation der Körnerzellvorstufen induziert werden.

In aktuelleren Studien ließ sich beobachten, dass das Shh-Signal auch für das Wachstum und die Erhaltung von Stammzellen notwendig ist (Ahn und Joyner 2006,



Balordi und Fishell 2007), und viele Medulloblastome Stammzellmarker exprimieren (Hemmati et al. 2003, Singh et al. 2003). Dies wirft nun die Frage auf, ob Medulloblastome ihren Ursprung aus Körnerzellvorstufen oder aus Stammzellen nehmen. Die Arbeitsgruppe um Yang konnte in einer Studie aus dem Jahre 2008 zeigen, dass sowohl Körnerzellvorläufer, als auch Stammzellen Ursprung des Shh-Aktivierungsweges assoziierten Medulloblastoms sein können (Yang et al. 2008).

Jedoch wurden auch andere Mutationen innerhalb des Shh-Aktivierungsweges in Medulloblastomen und in primitiven neuroektodermalen Tumoren des ZNS nachgewiesen. Es wurde berichtet, dass Kinder mit Medulloblastomen teilweise Mutationen in Suppressor of Fused (SUFU) zeigten. SUFU stellt eine weitere Komponente des Shh-Signalweges dar, der für die Verteilung von Gli1 innerhalb der Zellen verantwortlich gemacht wird (Ding et al. 1999, Pearse et al. 1999, Stone et al. 1999). Einige Mutationen von SUFU scheinen in einem mutierten Protein zu enden, das unfähig ist, Gli aus dem Zellkern zu transportieren und somit der Shh-Signalweg in einem ständig aktivierten Zustand verbleibt (Taylor et al. 2002).

Die Arbeitsgruppe um Kool beschäftigte sich 2008 ebenfalls mit dem Medulloblastom und dessen genetischen bzw molekularen Hintergrund. Dabei erarbeiteten sie fünf genetische Subtypen, welche sich durch unterschiedliche Aktivität von Signalwegen unterscheiden ließen. Der Subtyp A zeigte einen aktiven WNT (wingless type) und TGF(Transforming growth factor)-Signalweg. Dabei ließen sich zusätzlich  $\beta$ -catenin-Mutationen darstellen. Die Subgruppe B zeichnet sich durch die Aktivität des Shh-Signalweges und Mutationen in Transmembranprotein Patched aus. Die Subtypen C und D erbrachten eine Aktivität von neuronal differenzierten Zellen, wobei sich die Subtypen D und E durch eine Aktivität der Fotorezeptorgene auszeichneten (Kool et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass es in den Medulloblastomen des Subtypen B zu einer Überexpression der in den Shh-Signalweg involvierten Gene wie Patched, Gli2 und Gli1 kommt. Zudem zeigte sich eine Hochregulation der für den Zellzyklus spezifischen Gene, sowie eine vermehrte Proteinbiosynthese.

Interessanterweise ließ sich in der Gruppe B das niedrigste durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung (3.0 Jahre) ermitteln (Kool et al. 2008). In der Histologie der Medulloblastome mit hochreguliertem Shh-Signalweg fiel überwiegend ein desmoplastischer Tumor auf (Thompson et al. 2006, Kool et al. 2008). Studien an

desmoplastischen Tumoren im Säuglingsalter zeigen eine sehr gute Prognose (Giangaspero et al. 1999, McManamy et al. 2007), was sich wiederum gut mit der Abwesenheit des Oncogenes OTX2 in den Medulloblastomen des Subtypen B vereinbaren lässt (Kool et al. 2008).

In der pharmakologischen Behandlung des Medulloblastoms mit aktivem Shh-Signalweg beschreiben die ersten Studien vielversprechende Erfolge mit dem Shh-Signalweg-Hemmer GDC-0449 (Rudin et al. 2009, Dlugosz und Talpaz 2009). Dabei konnten durch die Hemmung von Smoothed sowohl bei metastasierten Medulloblastomen, wie auch bei metastasierten Basalzellkarzinomen eine Verkleinerung des Tumors sowie ein Rückgang der Symptome erreicht werden (Rudin et al. 2009, Dlugosz und Talpaz 2009).

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Aus der hier vorliegenden Arbeit ergeben sich folgende entscheidende Schlussfolgerungen:

- Sonic Hedgehog und seine in dieser Studie untersuchten Signalmoleküle konnten zu jeder Zeit, in jeder der untersuchten embryonalen Rindenschichten nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Anwesenheit des Signalweges in der physiologischen Ausbildung des menschlichen Gehirnes von Bedeutung ist.
- Die vermehrte Anwesenheit von Shh und seinen Signalmolekülen in den proliferationsreichen Rindenschichten und die Reduktion der Immunreaktivität im Schwangerschaftsverlauf könnten einen Hinweis auf die Wichtigkeit in der Zellproliferation, auch im humanen ZNS, geben.
- Die bereits in früheren Studien beschriebene Bedeutung von Patched, in der direkten Interaktion mit Cyclin B1, zur Steuerung der Zellzyklusprogression, sowie die zusätzliche Funktion von Patched als „dependence“-Rezeptor in der Regulation der Apoptose, könnte, durch die gemeinsame Expression mit Shh, noch weiter unterstrichen werden.
- Die hohe Immunreaktivitätsrate von Gli1 zu Beginn des untersuchten Zeitraumes in der Inneren Körnerschicht des Kleinhirnes könnte als eine frühe Proliferationsreaktion, z.B. der Bergmann-Glia auf das Shh-Signal, gewertet werden.

- In der Studie kann gezeigt werden, dass die Zellmigration im Rückenmark anhand eines konzentrationsabhängigen Shh-Niveaus erfolgt. Dabei agiert Shh sowohl als repulsiver Faktor, als auch als Chemoattraktor, wobei die Zellen entlang eines Shh-Gradienten auswandern. In der hier vorliegenden Arbeit kann sowohl in der Großhirnrinde, als auch der Kleinhirnrinde, ein Shh-Gradient dargestellt werden. Dies könnte somit Hinweis auf ein vergleichbares Migrationsverhalten geben.
- Da in der 12.SSW in der rhombischen Lippe keines der sechs untersuchten Signalmoleküle des Shh-Signalweges dargestellt werden konnte, könnte dies Anhalt für die Hypothese sein, dass zu diesem Zeitpunkt der Shh-Signalweg inaktiv ist und die Körnerzellvorläufer erst zu einem späteren Zeitpunkt dem Shh-Signal exponiert sind.

#### 4.7 Ausblick

Inhalte bzw. Fragestellungen zukünftiger Studien im Zusammenhang mit dem Sonic Hedgehog-Signalweg könnten sein:

- Lassen sich die in dieser Arbeit erhobenen Daten durch andere Methoden, z.B. Western Blot, oder durch eine höhere Fallzahl bestätigen?
- Welches Ausmaß umfasst die Rolle von Shh als „non-canonical“ Signalweg? Lässt sich hierzu eine genaue Charakterisierung erarbeiten?
- Wie werden die unterschiedlichen Funktionen von Patched reguliert, insbesondere die dichotome Rolle, sowohl als „dependence receptor“ bei der Apoptose, als auch bei der Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen, da beides in Abwesenheit des Liganden Shh erfolgt?
- Wodurch wird die Migrationsrichtung der auswandernden Zellen in der Intermediärzone beeinflusst, da in den beiden angrenzenden Rindenschichten ein ansteigender Gradient von Shh zu erkennen ist, die Zellen jedoch meist nur in eine Richtung migrieren?
- Migrieren die Zellen auch in anderen ZNS-Arealen (außer dem Rückenmark) anhand eines Shh-Gradienten?
- Welche weiteren Signalwege stehen in einem Zusammenhang mit dem Shh-Signalweg und wie interagieren sie mit diesem?
- Welche Zusammenhänge bzw. Gegensätze ergeben sich zwischen der physiologischen Verteilung des Shh-Signalweges über die embryonalen

Rindenschichten im Vergleich zu der Verteilung in einem an Holoprosencephalie erkrankten menschlichen Gehirn?

- Ließe sich durch einen gezielten Einsatz von Shh als proliferationsfördernder Faktor eine Proliferation von Zellen in zerstörtem Gewebe, z. B. dem Kleinhirn bei Zustand nach Schlaganfall, induzieren? Oder könnten vorhandene Stammzellen zum Wachstum animiert werden?
- Welche weiteren Ansatzpunkte ergeben sich in der Therapie des Shh-Aktivierungsweg assoziierten Medulloblastom? Ließen sich durch die mögliche Stimulation von anderer Signalmolekülen oder Steuerelementen des Shh-Aktivierungsweges Nebenwirkungen der Therapie umgehen? Und wie lassen sich mögliche Resistenzen gegenüber pharmakologischen Behandlungs-regimen vermeiden?

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Dem Sonic Hedgehog-Signalweg kommt in der embryonalen Entwicklung sowohl des Menschen, als auch des Tieres, eine enorme Bedeutung zu. Gleichmaßen können jedoch auch Neoplasien mit Fehlfunktionen im Shh-Signalweg in Einklang gebracht werden. Im zentralen Nervensystem umfassen die Aufgaben von Shh die Zellproliferation, die Migration, sowie die Steuerung der Apoptose.

Bislang existieren jedoch kaum Daten über die Verteilung von Sonic Hedgehog (Shh) und seinen Signalmolekülen im sich entwickelnden normalen humanen ZNS. Deshalb wurden in der vorliegenden Studie 22, neuropathologisch unauffällige, humane Groß- und Kleinhirne zwischen der 12.-28. Schwangerschaftswoche die zeitlich-räumliche Verteilung dieser Moleküle untersucht. Dabei wurden neben dem Liganden Shh, auch dessen Transmembranrezeptoren Patched und Smoothened, sowie die Transkriptionsfaktoren Gli1, Gli2 und Gli3 mittels immunhistochemischen Methoden untersucht.

In den fetalen Rindenschichten des Großhirnes lässt sich eine stärkere Immunreaktivität, für alle untersuchten Signalmoleküle, in der Ventrikulär- und Subventrikulärzone zeigen. Diese nimmt, mit steigender Schwangerschaftswoche signifikant ab. Das auf den Shh-Signalweg hemmend wirkende Patched zeigt, im Vergleich zu Shh und seinen synergistisch wirkenden Signalmolekülen, ein ähnliches Verteilungsmuster. Dies macht die zusätzliche Funktion von Patched, als direktes sowie indirektes Steuerelement im Verlauf des Zellzyklus und der Apoptose deutlich. Smoothened sowie Gli1, Gli2 und Gli3 ergeben ein zu Shh analoges Verteilungsmuster über die Rindenschichten des Großhirns. Der Anstieg der Gli3-Immunreaktivitätsintensität, in den proliferationsreichen Schichten, zum Ende des untersuchten Zeitraumes lässt sich am ehesten mit dem hemmenden Anteil des Transkriptionsfaktors Gli3 erklären.

Das Migrationsverhalten der Zellen des Großhirnes, in Abhängigkeit von Shh, weist Parallelen zu einem bereits beschriebenen Muster in der Entwicklung des Rückenmarks auf. Auch in der Großhirnrinde könnten die auswandernden Zellen von der Ventrikulärzone, wo sich eine starke Shh Immunreaktivität zeigt, entlang eines fallenden Shh-Gradienten in Richtung Intermediärzone migrieren. Von dort würden sie, aufgrund eines nun ansteigenden Gradienten, auf die Rindenplatte zuwandern.

Die Hypothese zur Migrationsrichtung könnte durch die Beobachtung des Abfalls der Immunreaktivitätsintensität des Shh-Signalweges über den proliferationsreichen Zonen im Großhirn gestützt werden. Im zeitlichen Verlauf folgt ein Anstieg der Intensitätswerte in den ventrikelfernen Schichten, mit den höchsten Mittelwerten in der Rindenplatte. Gli1 scheint dabei eine Sonderstellung ein-zunehmen, da es als Transkriptionsfaktor seinen Intensitätsgipfel in der sekundären Rindenplatte zeigt und möglicherweise für eine räumlich nähere Migration zuständig sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Moleküle des Shh-Signalweges in der humanen Kleinhirnentwicklung ein zur murinen Verteilung analoges Muster. Die Äußere Körnerzellschicht, als Proliferationszone, zeichnete sich durch eine starke Immunreaktivität aller untersuchten Signalmoleküle aus. Das von den Projektionsneuronen gebildete Shh könnte dabei mitogen auf die Körnerzellvorläufer wirken. Möglicherweise nutzen die Purkinjezellen das Shh-Signal, um sich als eigene Rindenschicht zu formieren und anschließend selbst Shh zu exprimieren. Dieses Shh-Signal könnte daraufhin die Ausdifferenzierung der Bergmann-Glia induzieren. In der Folge würden diese, im Sinne eines negativen Feedbacks, hemmend auf die Shh-Expression und somit auf die Proliferation wirken, um den Vorläuferzellen die Ausreifung zu ermöglichen. Der Abschluss der Proliferationsphase zeichnet sich durch einen Rückgang der Immunreaktivität von Shh und Gli1 aus.

Die Zellen wandern physiologischerweise an den Purkinjezellen vorbei und könnten anhand des aufsteigenden Shh-Gradienten auf die Innere Körnerzellschicht zu migrieren. Dem gegenüber verringern überraschenderweise die restlichen synergistisch wirkenden Signalmoleküle ihre Signalintensität in der Proliferationszone nicht. Fraglich ist, ob sie durch andere Signalwege mit reguliert werden, oder wie in anderen Teilen des ZNS, keine isolierte Funktion bei der Migration übernehmen.

Das Shh-Signal wirkt mitogen auf Körnerzellvorstufen und ist auch für das Wachstum und die Erhaltung von Stammzellen essentiell. Dies belegt, dass beide Zelltypen Ursprung des Shh-Aktivierungsweg assoziierten Medulloblastom sein können. Erste Studien beschreiben Erfolge in der pharmakologischen Behandlung dieses Medulloblastomsubtyps durch den Shh-Signalweg-Hemmer GDC-0449. Hieraus ergibt sich die enorme Wichtigkeit der genauen Kenntnis des Shh-Aktivierungsweges und zeigt darüber hinaus die Notwendigkeit für weiterführende Forschung am Shh-Signalweg selbst, sowie seine Interaktion mit anderen Signalwegen.

**6 ANHANG****6.1 Abkürzungsverzeichnis**

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
CBP	CREB-Binding Protein
Ci	Cubitus interruptus
DAB	3,3 Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DCC	deleted in colorectal cancer
Dhh	Desert Hedgehog
Disptch	Dispatched
GAG	Glycosaminoglykanen
GCPS	Greig Cephalopolysyndactyly Syndrome
Gli	Gliom assoziiertes Onkogen
Hh	Hedgehog
HhN	unmodifizierte Form des Hedgehogproteins
HhNp	Cholesterol gekoppeltes Hedgehogprotein
Hip	Hedgehog interacting protein
HPE	Holoprosenzephalie
IgG	Immunglobulin G
Ihh	Indian Hedgehog
IZ	Intermediärzone
Kr	Krüppel-Familie
mRNA	messenger Ribonucleid acid
n-ShhNp	frei diffusionsfähige, biologisch potente und cholesterolmodifizierte Shh-Form
PAL	Palmitinsäure
PCNA	proliferation cell nuclear antigen
PG	Proteoglykanen
PHS	Pallister-Hall-Syndrom
PP	Preplate
Ptch	Patched
RNA	Ribonucleid acid
RP	Rindenplatte
RT-PCR	Real time Polymerase Kettenreaktion

Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened
SLOS	Smith-Lemli-Opitz-Syndrom
Sufu	Suppressor of fused
SRZ	Sekundäre Rindenzone
SSW	Schwangerschaftswoche
SVZ	Subventrikulärzone
VZ	Ventrikulärzone
wks	weeks
Wnt	wingless type
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 6.2 Literaturverzeichnis

- 1.) **Abrahám** H, Tornóczky T, Kosztolányi G, Seress L. (2001). Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum. *Int J Dev Neurosci.* 19(1):53-62
- 2.) **Ahn** S, Joyner AL. (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437:894–897.
- 3.) **Angot** E, Loulier K, Nguyen-Ba-Charvet KT, Gadeau AP, Ruat M, Traiffort E. (2008). Chemoattractive activity of sonic hedgehog in the adult subventricular zone modulates the number of neural precursors reaching the olfactory bulb. *Stem Cells.* 26(9):2311-20.
- 4.) **Austin** CP, Cepko CL. (1990). Cellular migration patterns in the developing mouse cerebral cortex. *Development.* 110(3):713-32.
- 5.) **Bai** CB, Joyner AL. (2001). Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development,* 128, 5161–5172.
- 6.) **Bai** CB, Auerbach W, Lee JS, Stephen D, Joyner AL. (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development.* 129(20):4753-61.
- 7.) **Bai** CB, Stephen D, Joyner AL. (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev. Cell* 6: 103–115.
- 8.) **Balordi** F, Fishell G. (2007). Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci.* 27(22):5936-47.
- 9.) **Bale** SJ, Amos CI, Parry DM, Bale AE. (1991). Relationship between head circumference and height in normal adults and in the nevoid basal cell carcinoma syndrome and neurofibromatosis type I. *Am J Med Genet* 40:206–210
- 10.) **Barnes** EA, Kong M, Ollendorff V, Donoghue DJ. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J.* 20(9):2214-23.
- 11.) **Bernet** A, Mehlen P. (2007). Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. *Bull Cancer.* 94(4):E12-7
- 12.) **Bernier** PJ, Vinet J, Cossette M, Parent A. (2000). Characterization of the subventricular zone of the adult human brain: evidence for the involvement of Bcl-2. *Neurosci Res.* 37(1):67-78.
- 13.) **Biesecker** LG. (1997). Strike three for GLI3. *Nat Genet.* 17(3):259-60. Erratum in: *Nat Genet* 1998 Jan;18(1):88.



- 14.) **Bijlsma** MF, Borensztajn KS, Roelink H, Peppelenbosch MP, Spek CA. (2007). Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cell Signal* 19:2596-2604.
- 15.) **Bijlsma** MF, Peppelenbosch MP, Spek CA, Roelink H. (2008). Leukotriene Synthesis is Required for Hedgehog-dependent Neurite Projection in Neuralized Embryoid Bodies but not for Motor Neuron Differentiation. *Stem Cells* 2008.
- 16.) **Bourikas** D, Pekarik V, Baeriswyl T, Grunditz A, Sadhu R, Nardó M, Stoeckli ET. (2005). Sonic hedgehog guides commissural axons along the longitudinal axis of the spinal cord. *Nat Neurosci.* 8(3):297-304.
- 17.) **Briscoe** J, Chen Y, Jessell TM, Struhl G. (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Mol Cell.* 7(6):1279-91.
- 18.) **Briscoe** J, Ericson J. (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Curr Opin Neurobiol.* 11(1):43-9.
- 19.) **Brown** LY, Odent S, David V, Blayau M, Dubourg C, Apacik C, Delgado MA, Hall BD, Reynolds JF, Sommer A, Wieczorek D, Brown SA, Muenke M. (2001). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2: alanine tract expansion mutations may be caused by parental somatic recombination. *Hum Mol Genet.* 10(8):791-6.
- 20.) **Brown** SA, Warburton D, Brown LY, Yu CY, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S, Hennekam RC, Muenke M. (1998). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nat Genet.* 20(2):180-3.
- 21.) **Bunz** Benedikt: Expression des axonalen Lenkungsfaktors Netrin-1 und dessen Rezeptors DCC im sich entwickelnden humanen Hirnstamm und Kleinhirn. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Institut für Hirnforschung, 2009.
- 22.) **Burke** R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K. (1999). Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell.* 99(7):803-15.
- 23.) **Buttitta** L, Mo R, Hui CC, Fan CM. (2003). Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction. *Development* 130:6233-6243.
- 24.) **Callahan** CA, Ofstad T, Horng L, Wang JK, Zhen HH, Coulombe PA, Oro AE. (2004). MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes Dev.* 18(22):2724-9.
- 25.) **Carpenter** D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, de Sauvage FJ. (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(23):13630-4.
- 26.) **Chamoun** Z, Mann RK, Nellen D, von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA, Basler K. (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science.* 293(5537):2080-4
- 27.) **Chan** WY, Lorke DE, Tiu SC, Yew DT. (2002). Proliferation and apoptosis in the developing human neocortex. *Anat Rec* 267(4):261-276.
- 28.) **Charytoniuk** D, Traiffort E, Hantraye P, Hermel JM, Galdes A, Ruat M. (2002). Intrastratial sonic hedgehog injection increases Patched transcript levels in the adult rat subventricular zone. *Eur J Neurosci.* 16(12):2351-7.
- 29.) **Chen** JK, Taipale J, Cooper M K, Beachy PA. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev.* 16: 2743-8.
- 30.) **Chen** Y, Struhl G. (1996). Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87:553–563.
- 31.) **Chenn** A, McConnell SK. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell.* 82(4):631-41.
- 32.) **Choi** BH. (1988). Developmental events during the early stages of cerebral cortical neurogenesis in man. A correlative light, electron microscopic, immunohistochemical and Golgi study. *Acta Neuropathol.* 75(5):441-7.

- 33.) **Chuang** PT, McMahon AP. (1999).Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein.Nature. 397(6720):617-21
- 34.) **Chuang** PT, Kawcak T, McMahon AP. (2003).Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung.Genes Dev. 17(3):342-7.
- 35.) **Cohen** MM Jr. (1989). Perspectives on holoprosencephaly:Part I. Epidemiology, genetics, and syndromology. Teratology 40(3):211–35
- 36.) **Cohen** MM Jr. (1989). Perspectives on holoprosencephaly: Part III. Spectra, distinctions, continuities, and discontinuities.Am J Med Genet. 34(2):271-88.
- 37.) **Cohen** MM Jr. (1999).Nevoid basal cell carcinoma syndrome: molecular biology and new hypotheses. Int J Oral Maxillofac Surg. 28(3):216-23.
- 38.) **Cohen** MM Jr. Shiota K. (2002).Teratogenesis of holoprosencephaly.Am J Med Genet. 109(1):1-15.
- 39.) **Cohen** MM Jr. (2006).Holoprosencephaly: clinical, anatomic, and molecular dimensions.Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 76(9):658-73.
- 40.) **Copp** AJ, Greene ND, Murdoch JN. (2003). The genetic basis of mammalian neurulation. Nat Rev Genet. 4(10):784-93.
- 41.) **Dahmane** N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. Nature 389:876–881 (erratum: Nature 390:536 [1997])
- 42.) **Dahmane** N, Ruiz i Altaba A. (1999). Sonic hedgehog regulates the growth and patterning of the cerebellum. Development. 126(14):3089-100
- 43.) **Dai** P, Akimaru H, Tanaka Y, Maekawa T, Nakafuku M, Ishii S. (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. J Biol Chem 274:8143–8152
- 44.) **Denef** N, Neubüser D, Perez L, Cohen SM. (2000).Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothed.Cell. 102(4):521-31.
- 45.) **DeMyer** W, Zeman W, Palmer CG. (1964).The face predicts the brain: Diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly ( arhinencephaly).Pediatrics. 34:256-63.
- 46.) **De la Cruz** JM, Bamford RN, Burdine RD, Roessler E, Barkovich AJ, Donnai D, Schier AF, Muenke M. (2002).A loss-of-function mutation in the CFC domain of TDGF1 is associated with human forebrain defects.Hum Genet. 110(5):422-8. Epub 2002 Apr 10
- 47.) **Di Marcotullio** L, Ferretti E, De Smaele E, Argenti B, Mincione C, Zazzeroni F, Gallo R, Masuelli L, Napolitano M, Maroder M, Modesti A, Giangaspero F, Screpanti I, Alesse E, Gulino A. (2004). REN(KCTD11) is a suppressor of Hedgehog signaling and is deleted in human medulloblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(29):10833-8.
- 48.) **Di Marcotullio** L, Ferretti E, Greco A, De Smaele E, Po A, Sico MA, Alimandi M, Giannini G, Maroder M, Screpanti I, Gulino A. (2006). Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. Nat Cell Biol. 8(12):1415-23.
- 49.) **Ding** Q, Motoyama J, Gasca S, Mo R, Sasaki H, Rossant J, Hui CC. (1998). Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice. Development 125, 2533– 2543.
- 50.) **Ding** Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C. (1999). Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. Curr Biol. 9(19):1119-22
- 51.) **Dlugosz** AA, Talpaz M. (2009). Following the hedgehog to new cancer therapies. N Engl J Med. 361(12):1202-5.
- 52.) **Donnai** D, Burn J, Hughes H. (1987). Smith-Lemli-Opitz syndromes: do they include the Pallister-Hall syndrome? Am J Med Genet 28:741–743
- 53.) **Echelard** Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. (1993).Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity.Cell. 75(7):1417-30.

- 54.) **Fisher M**, Trimmer P, Ruthel G. (1993). Bergmann glia require continuous association with Purkinje cells for normal phenotype expression. *Glia*.8(3):172-82
- 55.) **Franz T**. (1994). Extra-toes (Xt) homozygous mutant mice demonstrate a role for the Gli-3 gene in the development of the forebrain. *Acta Anat (Basel)*.150(1):38-44.
- 56.) **Freese K**, Driess S, Bornholdt D, Shoenle EJ, Seidel H, Tinschert S, Grzeschik KH, Kalff-Suske M. (2003).Gene symbol: GLI3. Disease: Pallister-Hall syndrome.*Hum Genet*.112(1):103.
- 57.) **Friede RL**. (1973).Dating the development of human cerebellum.*Acta Neuropathol*.23(1):48-58.
- 58.) **Fujii K**, Kohno Y, Sugita K, Nakamura M, Moroi Y, Urabe K, Furue M, Yamada M, Miyashita T. (2003).Mutations in the human homologue of Drosophila patched in Japanese nevoid basal cell carcinoma syndrome patients.*Hum Mutat*. 21(4):451-2
- 59.) **Gao WO**, Heintz N, Hatten ME. (1991). Cerebellar granule cell neurogenesis is regulated by cell-cell interactions in vitro. *Neuron*.6(5):705-15.
- 60.) **Ghali L**, Wong ST, Green J, Tidman N, Quinn AG. (1999). 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* 113:595–599
- 61.) **Giangaspero F**, Perilongo G, Fondelli MP, Brisigotti M, Carollo C, Burnelli R, Burger PC, Garrè ML. (1999). Medulloblastoma with extensive nodularity: a variant with favorable prognosis. *J Neurosurg*.91(6):971-7.
- 62.) **Gilbert**, SF. (2000). *Developmental Biology*. Sechste Auflage. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- 63.) **Goodrich LV**, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev*.10(3):301-12
- 64.) **Goodrich LV**, Milenković L, Higgins KM, Scott MP. (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science*. 277(5329):1109-13
- 65.) **Goodrich LV**, Scott MP. (1998). Hedgehog and patched in neural development and disease. *Neuron*. 21(6):1243-57.
- 66.) **Goldman SA**. (1998). Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J Neurobiol*. 36(2):267-86
- 67.) **Gorlin RJ**. (1995). Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin* 13:113–125
- 68.) **Goulding M**, Lamar E. (2000). Neuronal patterning: Making stripes in the spinal cord. *Curr Biol*. 10(15):R565-8.
- 69.) **Grachtchouk M**, Mo R, Yu S, Zhang X, Sasaki H, Hui CC, Dlugosz A. (2000). Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. *Nat Genet* 24:216–217
- 70.) **Grindley JC**, Bellusci S, Perkins D, Hogan BL. (1997). Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. *Dev Biol*. 188(2):337-48.
- 71.) **Gripp KW**, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, Richieri-Costa A, Zackai EH, Massagué J, Muenke M, Elledge SJ. (2000).Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination.*Nat Genet*. 25(2):205-8.
- 72.) **Gritli-Linde A**, Lewis P, McMahon AP, Linde A. (2001).The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of hedgehog signaling peptides.*Dev Biol*. 236(2):364-86.
- 73.) **Hahn H**, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE. (1996). Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome.*Cell*. 85(6):841-51
- 74.) **Hahn H**, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, Potter D, Zimmer A, Müller U, Samson E, Quintanilla-Martinez L, Zimmer A. (2000). Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem*. 275(37):28341-4

- 75.) **Hahn H**, Wojnowski L, Zimmer AM, Hall J, Miller G, Zimmer A. (1998). Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med.* 4(5):619-22.
- 76.) **Hammerschmidt M**, Brook A, McMahon AP. (1997). The world according to hedgehog. *Trends Genet.* 13(1):14-21.
- 77.) **Harkmark, W** (1954). Cell migrations from the rhombic lip to the inferior olive, the nucleus raphe and the pons; a morphological and experimental investigation on chick embryos. *J Comp Neurol* 100, 115-209.
- 78.) **Harter**, Patrick: Expression des axonalen Lenkungsmoleküls Netrin-1 und seines Rezeptors DCC im humanen fetalen Telencephalon. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Institut für Hirnforschung, 2008.
- 79.) **Hatten ME**. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci.* 22:511-39.
- 80.) **Hatten ME**, Heintz N. (1995). Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci.* 18:385-408.
- 81.) **Haycraft CJ**, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK. (2005). Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 1(4):e53.
- 82.) **Hemmati HD**, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(25):15178-83.
- 83.) **Hinrichsen KV**. (1990). Humanembryologie. Lehrbuch und Atlas der vorgeburtlichen Entwicklung des Menschen Springer, Berlin
- 84.) **Ho KS**, Scott MP. (2002). Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol.* 12(1):57-63.
- 85.) **Hsu SM**, Raine L, Fanger H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 29(4):577-80.
- 86.) **Hu MC**, Mo R, Bhella S, Wilson CW, Chuang PT, Hui CC, Rosenblum ND. (2006). GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1, Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. *Development* 133:569-578.
- 87.) **Huang X**, Ketova T, Fleming JT, Wang H, Dey SK, Litingtung Y, Chiang C. (2009). Sonic hedgehog signaling regulates a novel epithelial progenitor domain of the hindbrain choroid plexus. *Development.* 136(15):2535-43.
- 88.) **Huangfu D**, Anderson KV. (2005) Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(32):11325-30.
- 89.) **Huangfu D**, Anderson KV. (2006). Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. *Development.* 133(1):3-14.
- 90.) **Hui CC**, Joyner AL. (1993). A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toesJ mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nat Genet* 3:241-6.
- 91.) **Hynes M**, Stone D, Dowd M, Pitts-Meek S, Goddard A, Gurney A, Rosenthal A. (1997). Control of cell pattern in the neural tube by the zinc finger transcription factor and oncogene Gli-1. *Neuron* 19: 15–26.
- 92.) **Incardona JP**, Gruenberg J, Roelink H. (2002). Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothened in endosomes. *Curr Biol.* 12(12):983-95.
- 93.) **Ingham PW**. (1998). Transducing Hedgehog: the story so far. *EMBO J.* 17(13):3505-11
- 94.) **Ingham PW**, McMahon AP. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15(23):3059-87.
- 95.) **Ingham PW**. (2008). Hedgehog signalling. *Curr Biol.* 18(6):R238-41.
- 96.) **Jenkins D**. (2009). Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal.* 21(7):1023-34.
- 97.) **Johnson RL**, Tabin C. (1995). The long and short of hedgehog signaling. *Cell.* 81(3):313-6.

- 98.) **Johnson** RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 272(5268):1668-71
- 99.) **Kahle** W. (1956). Development of the human diencephalon; studies on the phases of the matrix and the local differences in maturation in the human embryonic brain. *II.Dtsch Z Nervenheilkd*. 175(3):259-318.
- 100.) **Kalderon** D. (2000). Transducing the Hedgehog Signal. *Cell* 103, 371–374
- 101.) **Kalff-Suske** M, Wild A, Topp J, Wessling M, Jacobsen EM, Bornholdt D, Engel H, Heuer H, Aalfs CM, Ausems MG, Barone R, Herzog A, Heutink P, Homfray T, Gillissen-Kaesbach G, König R, Kunze J, Meinecke P, Müller D, Rizzo R, Streng S, Superti-Furga A, Grzeschik KH. (1999). Point mutations throughout the GLI3 gene cause Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum Mol Genet*. 8(9):1769-77
- 102.) **Kalff-Suske** M, Paparidis Z, Bornholdt D, Cole T, Kalff-Suske M, Grzeschik KH. (2004). Gene symbol: GLI3. Disease: Pallister-Hall syndrome. *Hum Genet*. 114(4):403.
- 103.) **Kang** S, Graham JM Jr, Olney AH, Biesecker LG. (1997). GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* 15:266–268
- 104.) **Kelley** RL, Roessler E, Hennekam RC, Feldman GL, Kosaki K, Jones MC, Palumbos JC, Muenke M. (1996). Holoprosencephaly in RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog? *Am J Med Genet* 66:478–484
- 105.) **Kendler** A, Golden JA. (1996). Progenitor cell proliferation outside the ventricular and subventricular zones during human brain development. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55(12):1253-8
- 106.) **Kim** YS, Nakanishi G, Lewandoski M, Jetten AM. (2003). GLIS3, a novel member of the GLIS subfamily of Kruppel-like zinc finger proteins with repressor and activation functions. *Nucleic Acids Res*. 31: 5513-5525
- 107.) **Kinzler** K. W.; Bigner, S. H.; Bigner, D. D.; Trent, J. M.; Law, M. L.; O'Brien, S. J.; Wong, A. J.; Vogelstein, B. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236: 70-73
- 108.) **Kogerman** P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol*. 1(5):312-9.
- 109.) **Kool** M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrsić A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R. (2008). Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*. 3(8):e3088.
- 110.) **Kostovic** I, Rakic P. (1990). Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol*. 297(3):441-70.
- 111.) **Kostovic** I. (1990) Zentralnervensystem In: Hinrichsen KV. (1990). Humanembryologie. Lehrbuch und Atlas der vorgeburtlichen Entwicklung des Menschen Springer, Berlin.
- 112.) **Kuhlenbeck** H. (1954). The human diencephalon; a summary of development, structure, function, and pathology. *Confin Neurol*. 14:1-230.
- 113.) **Lai** K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*. 6(1):21-7.
- 114.) **Lee** J, Platt KA, Censullo P, F i Altaba A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124:2537–2552
- 115.) **Lei** Q, Zelman AK, Kuang E, Li S, Matise MP. (2004). Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development* 131: 3593–3604.
- 116.) **Letinic** K, Zoncu R, Rakic P. (2002). Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature*. 417(6889):645-9.

- 117.) **Lewis** PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell*. 105(5):599-612.
- 118.) **Lewis** PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP. (2004). Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol*. 270(2):393-410.
- 119.) **Lin** JC, Cepko CL. (1998). Granule cell raphes and parasagittal domains of Purkinje cells: complementary patterns in the developing chick cerebellum. *J Neurosci*. 18(22):9342-53.
- 120.) **Lin** JC, Cai L, Cepko CL. (2001) The external granule layer of the developing chick cerebellum generates granule cells and cells of the isthmus and rostral hindbrain. *J Neurosci*. 21(1):159-68
- 121.) **Lipinski** RJ, Gipp JJ, Zhang J, Doles JD, Bushman W. (2006). Unique and complimentary activities of the Gli transcription factors in Hedgehog signaling. *Exp Cell Res*. 312(11):1925-38.
- 122.) **Lipinski** RJ, Bijlsma MF, Gipp JJ, Podhaizer DJ, Bushman W. (2008). Establishment and characterization of immortalized Gli-null mouse embryonic fibroblast cell lines. *BMC Cell Biol*. 9:49.
- 123.) **Litingtung** Y, Chiang C. (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci*. 3(10):979-85
- 124.) **Liu** A, Wang B, Niswander LA. (2005). Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development*. 132(13):3103-11
- 125.) **Machold** R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* 39:937–950.
- 126.) **Mao** J, Maye P, Kogerman P, Tejedor FJ, Toftgard R, Xie W, Wu G, Wu D. (2002). Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J Biol Chem*. 277(38):35156-61. Epub 2002 Jul 22.
- 127.) **Marigo** V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ. (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol*. 180(1):273-83.
- 128.) **Marín** O, Rubenstein JL. (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci*. 26:441-83.
- 129.) **Martí** E, Bumcrot DA, Takada R, McMahon AP. (1995). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature*. 375(6529):322-5.
- 130.) **Martín** V, Carrillo G, Torroja C, Guerrero I. (2001). The sterol-sensing domain of Patched protein seems to control Smoothed activity through Patched vesicular trafficking. *Curr Biol*. 11(8):601-7
- 131.) **Matise** MP, Epstein DJ, Park HL, Platt KA, Joyner AL. (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* 125:2759-2770.
- 132.) **McDermott** A, Gustafsson M, Elsam T, Hui CC, Emerson CP Jr, Borycki AG. (2005). Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation. *Development* 132:345-357.
- 133.) **McMahon** AP. (2000). More surprises in the Hedgehog signalling pathway. *Cell*. 100(2):185-8.
- 134.) **McMahon** AP, Ingham PW, Tabin CJ. (2003). Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol*. 53, 1-114.
- 135.) **McManamy** CS, Pears J, Weston CL, Hanzely Z, Ironside JW, Taylor RE, Grundy RG, Clifford SC, Ellison DW; Clinical Brain Tumour Group. (2007). Nodule formation and desmoplasia in medulloblastomas-defining the nodular/desmoplastic variant and its biological behavior. *Brain Pathol*. 17(2):151-64.

- 136.) **Meyer NN**, Roelink H. (2003). The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Dev. Biol.* 257, 343–355.
- 137.) **Ming JE**, Roessler E, Muenke M. (1998). Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Mol Med Today.* 4(8):343-9.
- 138.) **Ming JE**, Kaupas ME, Roessler E, Brunner HG, Golabi M, Tekin M, Stratton RF, Sujansky E, Bale SJ, Muenke M. (2002). Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Hum Genet.* 2002 Apr;110(4):297-301. Epub 2002 Mar 2. Erratum in: *Hum Genet* 111(4-5):464.
- 139.) **Mo R**, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HH, Chik KW, Shi XM, Tsui LC, Cheng SH, Joyner AL, Hui C. (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development.* 124(1):113-23.
- 140.) **Møllgård K**, Schumacher U. (1993). Immunohistochemical assessment of cellular proliferation in the developing human CNS using formalin-fixed paraffin-embedded material. *J Neurosci Methods.* 46(3):191-6
- 141.) **Motoyama J.** (2006). Essential roles of Gli3 and sonic hedgehog in pattern formation and developmental anomalies caused by their dysfunction. *Congenit Anom (Kyoto).* 46(3):123-8.
- 142.) **Mullor JL**, Dahmane N, Sun T, Ruiz i Altaba A. (2001). Wnt signals are targets and mediators of Gli function. *Curr Biol.* 11(10):769-73.
- 143.) **Mullor JL**, Sánchez P, Ruiz i Altaba A. (2002). Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol.* 12(12):562-9
- 144.) **Murone M**, Rosenthal A, de Sauvage FJ. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothened receptor complex. *Curr Biol.* 9(2):76-84.
- 145.) **Nakanishi G**, Kim YS, Nakajima T, Jetten AM. (2006). Regulatory role for Krüppel-like zinc-finger protein Gli-similar 1 (Glis1) in PMA-treated and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol.* 126(1):49-60.
- 146.) **Nakano Y**, Nystedt S, Shivdasani AA, Strutt H, Thomas C, Ingham PW. (2004). Functional domains and sub-cellular distribution of the Hedgehog transducing protein Smoothened in *Drosophila*. *Mech Dev.* 121(6):507-18
- 147.) **Nanni L**, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, Giannotti A, Imaizumi K, Jones KL, Campo MD, Martin RA, Meinecke P, Pierpont ME, Robin NH, Young ID, Roessler E, Muenke M. (1999). The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet.* 8(13):2479-88.
- 148.) **Nanni L**, Schelper RL, Muenke MT. (2000). Molecular genetics of holoprosencephaly. *Front Biosci.* 5:D334-42.
- 149.) **Nieuwenhuys R**, Voogd J, van Huijzen C. (2008) *The Human Nervous System.* Springer 4. Auflage
- 150.) **Noctor SC**, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* 409(6821):714-20
- 151.) **Nüsslein-Volhard C**, Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 287(5785):795-801
- 152.) **Nybakken K**, Perrimon N. (2002). Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Genet Dev.* 12(5):503-11.
- 153.) **Odent S**, Atti-Bitach T, Blayau M, Mathieu M, Aug J, Delezo de AL, Gall JY, Le Marec B, Munnich A, David V, Vekemans M. (1999). Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum Mol Genet.* 8(9):1683-9.
- 154.) **O'Rahilly R.** (1979). Early human development and the chief sources of information on staged human embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 9(4):273-80.
- 155.) **Oro AE**, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH Jr, Scott MP. (1997). Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science.* 276(5313):817-21

- 156.) **Palma V**, Ruiz i Altaba A. (2004). Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*.131(2):337-45.
- 157.) **Palma V**, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335–344.
- 158.) **Pan J**, Wang Q, Snell WJ. (2005). Cilium-generated signaling and ciliarelated disorders. *Lab. Invest.* 85, 452-463.
- 159.) **Park HL**, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui C, Nakashima M, Joyner AL. (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 127:1593–1605
- 160.) **Pasca di Magliano M**, Hebrok M. (2003). Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer.* 3(12):903-11.
- 161.) **Pearse RV 2nd**, Collier LS, Scott MP, Tabin CJ. (1999). Vertebrate homologs of Drosophila suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev Biol.* 212(2):323-36
- 162.) **Pepinsky RB**, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, Bixler SA, Ambrose CM, Garber EA, Miatkowski K, Taylor FR, Wang EA, Galdes A. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem.* 273(22):14037-45.
- 163.) **Persson M**, Stamatakis D, te Welscher P, Andersson E, Bose J, Ruther U, Ericson J, Briscoe J. (2002). Dorsal–ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes Dev.* 16, 2865– 2878.
- 164.) **Pons S**, Trejo JL, Martínez-Morales JR, Martí E. (2001). Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development.* 128(9):1481-92.
- 165.) **Porter JA**, von Kessler DP, Ekker SC, Young KE, Lee JJ, Moses K, Beachy PA. (1995). The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature*.374(6520):363-6.
- 166.) **Porter JA**, Ekker SC, Park WJ, von Kessler DP, Young KE, Chen CH, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV, Beachy PA. (1996a). Hedgehog patterning activity: role of a lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell*.86(1):21-34.
- 167.) **Porter JA**, Young KE, Beachy PA. (1996b). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science.* 274(5285):255-9.
- 168.) **Rakić P**, Sidman RL. (1969). Telencephalic origin of pulvinar neurons in the fetal human brain. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 129(1):53-82
- 169.) **Rakic P**, Sidman RL. (1970). Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J Comp Neurol*.139(4):473-500.
- 170.) **Rakic P**. (1971). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol*.141(3):283-312
- 171.) **Rakic P**. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia*.15;46(9):882-91.
- 172.) **Rakic P**. (1995). Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(25):11323-7
- 173.) **Reifenberger J**, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C, Kumar K, Blaschke B, Ruzicka T, Reifenberger G. (2005). Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 152(1):43-51
- 174.) **Richter E**. (1965). Die Entwicklung des Globus Pallidus und des Corpus Subthalamicum. Springer, Berlin.
- 175.) **Roberts WM**, Douglass EC, Peiper SC, Houghton PJ, Look AT. (1989). Amplification of the gli gene in childhood sarcomas. *Cancer Res* 49:5407–5413
- 176.) **Rodriguez CI**, Dymecki SM. (2000). Origin of the precerebellar system. *Neuron.* 27(3):475-86



- 177.) **Roelink** H, Porter JA, Chiang C, Tanabe Y, Chang DT, Beachy PA, Jessell TM. (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell*. 81(3):445-55.
- 178.) **Roessler** E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet*. 14(3):357-60.
- 179.) **Roessler** E, Belloni E, Gaudenz K, Vargas F, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M. (1997). Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum Mol Genet*. 6(11):1847-53.
- 180.) **Roessler** E, Ermilov AN, Grange DK, Wang A, Grachtchouk M, Dlugosz AA, Muenke M. (2005). A previously unidentified amino-terminal domain regulates transcriptional activity of wild-type and disease-associated human GLI2. *Hum. Molec. Genet*. 14: 2181-2188
- 181.) **Rowitch** DH, S-Jacques B, Lee SM, Flax JD, Snyder EY, McMahon AP. (1999). Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci*. 19(20):8954-65.
- 182.) **Rudin** CM, Hann CL, Lattera J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, LoRusso PM, Von Hoff DD, de Sauvage FJ, Low JA. (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med*. 361(12):1173-8.
- 183.) **Ruiz i Altaba** A. (1998). Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development*. 125(12):2203-12
- 184.) **Ruiz i Altaba** A. (1999). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 126:3205–3216
- 185.) **Ruppert** JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao FT, Law ML, Seunemann HN, O'Brien SJ, Vogelstein B. (1988). The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol*. 8(8):3104-13
- 186.) **Ruppert** JM, Vogelstein B, Kinzler KW. (1991). The zinc finger protein GLI transforms primary cells in cooperation with adenovirus E1A. *Mol Cell Biol* 11:1724–1728
- 187.) **Sasaki** H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. (1997). A binding site for Gli proteins is essential for *HNF-3 $\beta$*  floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124:1313–1322
- 188.) **Sasaki** H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* 126:3915–3924
- 189.) **Senee** V, Chelala C, Duchatelet S, Feng D, Blanc H, Cossec JC, Charon C, Nicolino M, Boileau P, Cavener DR, Bougneres P, Taha D, Julier C. (2006). Mutations in GLIS3 are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. *Nature Genet*. 38: 682-687
- 190.) **Shin** SH, Kogerman P, Lindstrom E, Toftgard R, Biesecker LG. (1999). GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila* cubitus interruptus protein functions and localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2880–2884
- 191.) **Sidman** RL, Rakic P. (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res*. 62(1):1-35.
- 192.) **Simonati** A, Tosati C, Rosso T, Piazzola E, Rizzuto N. (1999). Cell proliferation and death: morphological evidence during corticogenesis in the developing human brain. *Microsc Res Tech*. 45(6):341-52
- 193.) **Singh** SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 63(18):5821-8.
- 194.) **Sotelo** C, Alvarado-Mallart RM, Frain M, Vernet M. (1994). Molecular plasticity of adult Bergmann fibers is associated with radial migration of grafted Purkinje cells. *J Neurosci*. 14(1):124-33
- 195.) **Stecca** B, Ruiz i Altaba A. (2005). Brain as a paradigm of organ growth: Hedgehog-Gli signaling in neural stem cells and brain tumors. *J Neurobiol*. 64(4):476-90.

- 196.) **Stein** U, Eder C, Karsten U, Haensch W, Walther W, Schlag PM. (1999). GLI gene expression in bone and soft tissue sarcomas of adult patients correlates with tumor grade. *Cancer Res* 59:1890–1895
- 197.) **St-Jacques** B, Hammerschmidt M, McMahon AP. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13(16):2072-86. Erratum in: *Genes Dev* 1999 Oct 1;13(19):2617.
- 198.) **Stone** DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature.* 384(6605):119-20.
- 199.) **Stone** DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A. (1999). Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 23):4437-48.
- 200.) **Svärd** J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergström A, Ericson J, Toftgård R, Teglund S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell.* 10(2):187-97.
- 201.) **Taha** D, Barbar M, Kanaan H, Williamson Balfe J. (2003). Neonatal diabetes mellitus, congenital hypothyroidism, hepatic fibrosis, polycystic kidneys, and congenital glaucoma: a new autosomal recessive syndrome? *Am. J. Med. Genet.* 122A: 269-273
- 202.) **Taipale** J, Cooper MK, Maiti T and Beachy PA. (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418, 892–897
- 203.) **Tanimura** A, Dan S, Yoshida M. (1998). Cloning of novel isoforms of the human Gli2 oncogene and their activities to enhance tax-dependent transcription of the human T-cell leukemia virus type 1 genome. *J Virol.* 72(5):3958-64.
- 204.) **Taylor** MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet.* 31(3):306-10.
- 205.) **Theil** T, Alvarez-Bolado G, Walter A, Ruther U. (1999) Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* 126: 3561–3571.
- 206.) **Theiler** (1972). *The house mouse.* Springer-Verlag, NY
- 207.) **Thibert** C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM, Mehlen P. (2003). Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science* 301: 843-6.
- 208.) **Thompson** MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A, Gilbertson RJ. (2006). Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol.* 24(12):1924-31.
- 209.) **Tint** GS, Irons M, Elias ER, Batta AK, Frieden R, Chen TS, Salen G. (1994). Defective cholesterol biosynthesis associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Engl J Med* 330:107–113
- 210.) **Tojo** M, Mori T, Kiyosawa H, Honma Y, Tanno Y, Kanazawa KY, Yokoya S, Kaneko F, Wanaka A. (1999). Expression of sonic hedgehog signal transducers, patched and smoothened, in human basal cell carcinoma. *Pathol Int.* 49(8):687-94
- 211.) **Ulloa** F, Itasaki N, Briscoe J. (2007). Inhibitory Gli3 activity negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Curr Biol.* 17(6):545-50.
- 212.) **Vargas** FR, Roessler E, Gaudenz K, Belloni E, Whitehead AS, Kirke PN, Mills JL, Hooper G, Stevenson RE, Cordeiro I, Correia P, Felix T, Gereige R, Cunningham ML, Canún S, Antonarakis SE, Strachan T, Tsui LC, Scherer SW, Muenke M. (1998). Analysis of the human Sonic Hedgehog coding and promoter regions in sacral agenesis, triphalangeal thumb, and mirror polydactyly. *Hum Genet.* 102(4):387-92.

- 213.) **Villavicencio** EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. (2000). The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet.* 67(5):1047-54.
- 214.) **Vortkamp** A, Gessler M, Grzeschik KH. (1991). GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352:539–540
- 215.) **Wallis** DE, Roessler E, Hehr U, Nanni L, Wiltshire T, Richieri-Costa A, Gillessen-Kaesbach G, Zackai EH, Rommens J, Muenke M. (1999). Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet.* 22(2):196-8
- 216.) **Wang** B, Fallon JF, Beachy PA. (2000). Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423–434
- 217.) **Watt** FM. (2004). Unexpected Hedgehog-Wnt interactions in epithelial differentiation. *Trends Mol Med.* 10(12):577-80.
- 218.) **Wechsler-Reya** RJ, Scott MP. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron.* 22(1):103-14
- 219.) **Werner** CA, Dohner H, Joos S, Trumper LH, Baudis M, Barth TF, Ott G, Moller P, Lichter P, Bentz M. (1997). High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms. *Am J Pathol* 151:335–342
- 220.) **Wild** A, Kalff-Suske M, Vortkamp A, Bornholdt D, Konig R, Grzeschik KH (1997). Point mutations in human GLI3 cause Greig syndrome. *Hum Mol Genet* 6:1979–1984
- 221.) **Wingate** RJ, Hatten ME. (1999). The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development.* 126(20):4395-404.
- 222.) **Wingate** RJ. (2001). The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol.* 11(1):82-8.
- 223.) **Xie** J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH, Jr, de Sauvage FJ. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* 391:90–92
- 224.) **Yamadori** T. (1965). Development of the thalamic nucleus with its primary fiber system in the human embryo. *J Hirnforsch.* 7(5):393-41
- 225.) **Yang** JT, Liu CZ, Villavicencio EH, Yoon JW, Walterhouse D, Iannaccone PM (1997). Expression of human GLI in mice results in failure to thrive, early death, and patchy Hirschsprung-like gastrointestinal dilatation. *Mol Med* 3:826–835
- 226.) **Yang** ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourbonoulas M, Schüller U, Machold R, Fishell G, Rowitch DH, Wainwright BJ, Wechsler-Reya RJ. (2008). Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell.* 14(2):135-45.
- 227.) **Yoon** JW, Liu CZ, Yang JT, Swart R, Iannaccone P, Walterhouse D (1998). GLI activates transcription through a herpes simplex viral protein 16-like activation domain. *J Biol Chem* 273:3496–3501
- 228.) **Zecević** N. (1993). Cellular composition of the telencephalic wall in human embryos. *Early Hum Dev.* 32(2-3):131-49.
- 229.) **Zeng** X, Goetz JA, Suber LM, Scott WJ Jr, Schreiner CM, Robbins DJ. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature.* 411(6838):716-20.
- 230.) **Zhang** XM, Ramalho-Santos M, McMahon AP. (2001). Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. *Cell* 105: 781-792

### 6.3 Danksagung

**Danke** sagen möchte ich...

... den gesamten Mitarbeitern des Instituts für Hirnforschung, für die vielen netten Gespräche, kleinen Tipps und Tricks im Labor und die Bereitschaft, mir bei all meinen Anliegen behilflich zu sein. Dabei möchte ich mich im Speziellen ganz herzlich bei Frau Ott, Herrn Nguyen, Frau Albrecht und Frau Trautmann bedanken.

...Herrn Prof. Dr. Meyermann, für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit, das Institut zu jeder Zeit nutzen zu dürfen.

...meinen Mitdoktoranden, für die netten gemeinsamen Stunden im Labor und die tatkräftige Unterstützung. Ein spezieller Dank dabei an Patrick Harter für die Überlassung der Fetenbank und den dazugehörigen Daten.

...Herrn PD Dr. Rudi Beschorner und Dr. Jens Schittenhelm, die mich als Doktorandin „adoptiert“ haben und mir bei all meinen Fragen und Nöten zur Seite standen. Vielen Dank für die grenzenlose Geduld, das offene Ohr und das Augenzwinkern.

...Herrn PD Dr. Michel Mittelbronn, für das wachsame Auge aus der Ferne, die unzähligen Stunden gemeinsamen Denkens und Arbeitens und seinen persönlichen Einsatz, der weit über diese Arbeit hinaus ging.

...meinem Cousin Holger, für die Hilfe beim Kampf mit dem PC und meinem Vater, für die Unterstützung in stilistischen und grammatikalischen Fragen.

...meinen Eltern, die durch ihre jahrelange Unterstützung mir erst die Möglichkeit eröffnet haben.

...meinem Freund Mark, der mir nicht nur bei all meinen graphischen Problemen in dieser Zeit zur Seite stand. Vielen Dank für die unendliche Geduld, das Verständnis und die aufmunternden Worte in dunklen Stunden.

**6.4 Lebenslauf**

29. Juli 1982	geboren in Stuttgart
1989 bis 1993	Grundschule, Stuttgart-Stammheim
1993 bis 1999	Park-Realschule, Stuttgart-Zuffenhausen
1999 bis 2002	Johann Friedrich von Cotta-Schule, Stuttgart Wirtschaftsgymnasium
2002 bis 2003	einjähriger Aufenthalt in Australien
seit April 2004	Studium der Humanmedizin an der Eberhard- Karls-Universität Tübingen
März 2006	Erste Ärztliche Vorprüfung
seit April 2007	Arbeit an meiner Dissertation im Institut für Hirnforschung an der Universität Tübingen „Zur Rolle des Sonic Hedgehog Aktivierungsweges in der Entwicklung des humanen fetalen Gehirns“

**Famulaturen:**

August 2006	Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinik Tübingen
September 2007	Innere Medizin, Devanbu and Joseph Memorial Christian Mission Hospital, Chittoor, Indien
März 2008	Neurologie, Universitätsklinik Tübingen
August 2008	Gynäkologie, Onandjokwe Lutheran Hospital, Ondangwa, Namibia

**Praktisches Jahr:**

Februar bis Mai 2009	Neurologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz
Juni/ Juli 2009	Innere Medizin, Christian Medical College Vellore, Indien
August/ September 2009	Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Sigmaringen
Oktober 2009 bis Januar 2010	Chirurgie, Kreiskrankenhaus Sigmaringen

**Examen:**

06.05.2010	Ärztliche Prüfung ( 2.Staatsexamen)
------------	-------------------------------------