

Aus der Klinik für Neurochirurgie
(Prof. Dr. med. V. Rohde)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Bedeutung der Hedgehog-Signalkaskade in der Tumorgenese von spinalen und kraniellen Chordomen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Amanda Angelika Klemer-Harcej

aus

Hannover

Göttingen 2016

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. med. V. Rohde

Ko-Referentin: PD Dr. Imke Metz

Drittreferentin: PD Dr. Anja Uhmann

Datum der mündlichen Prüfung: 17.07.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Bedeutung der Hedgehog-Signalkaskade in der Tumorgenese von spinalen und kraniellen Chordomen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeine Pathologie der Chordome	1
1.2. Die Hedgehog- Signalkaskade.....	3
1.3. Zielsetzung der Arbeit.....	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1. Patientenkollektiv und Gewebematerialien.....	9
2.2. Einbetten von Geweben	10
2.3. Immunhistochemie.....	11
2.4. <i>in situ</i> - Hybridisierung.....	12
2.5. Auswertungskriterien	14
3. Ergebnisse	15
3.1. Immunhistochemie.....	15
3.2. <i>in situ</i> - Hybridisierung.....	17
4. Diskussion.....	20
4.1. Mögliche Bedeutung der <i>Shh</i> - Signalkaskade bei der Entstehung von kraniellen und spinalen Chordomen	21
4.2. Einsatz von <i>Hh</i> - Signalweg- Inhibitoren in der Tumorthherapie	23
4.3. Limitationen der Arbeit	25
5. Zusammenfassung	25
6. Anhang	26
6.1. Patientenkollektiv und Tumormaterialübersicht	26
6.2. Aktenzeichen der Ethikkommission	27
6.3. Laborgeräte.....	28
6.4. Gebrauchswaren.....	28
6.5. Chemikalien und Reagenzien.....	29
6.6. Stammlösungen	31
7. Literaturverzeichnis.....	33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die HE- Färbung eines kraniellen Chordomes zeigt die typischen lappenförmig angeordneten, physaliformen Zellen mit randständigen kleinen Zellkernen (Siegelringzellen) und interzellulärer Schleimhautbildung.....	3
Abbildung 2: <i>Shh</i> - Signalkaskade in der „inaktiven“ Form (modifiziert nach Justilien und Fields 2015, S. 507).	5
Abbildung 3: <i>Shh</i> - Signalkaskade in der „aktiven“ Form (modifiziert nach Justilien und Fields 2015, S. 507).....	6
Abbildung 4: Gegenseitige Wechselbeziehungen innerhalb der <i>Shh</i> - Signalkaskade. ...	7
Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung der <i>Gli1- Expression</i> bei einem spinalen Chordom.....	16
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung der <i>Gli1- Expression</i> bei einem kraniellen Chordom.....	17
Abbildung 7: Gegenüberstellung einer kraniellen Chordomprobe von einem Patienten nach positiver <i>in situ</i> - Hybridisierung (<i>Ptch1 (+)</i> , <i>Gli1 (+)</i>) und immunhistochemischer Färbung (<i>Shh (+)</i> und <i>Gli1 (+)</i>) im Vergleich	19
Abbildung 8: Schlüsselpositionen der <i>Hh</i> - Signalkaskade-Inhibitoren (modifiziert nach Justilien und Fields 2015, S. 507).	24

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Fehlregulationen der <i>Shh</i> - Signalkaskade, die zur Neubildung einer Neoplasie führen (modifiziert nach Hooper und Scott 2005, S. 306).....	8
Tabelle 2:	Übersicht des Patientenkollektivs (n= 20)	9
Tabelle 3:	Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie	12
Tabelle 4:	Scoring-System nach Rüschoff et al. 2009 für die Immunhistochemie in den Tumorzellen.	14
Tabelle 5:	Immunhistochemie: Verteilung und Reaktionsstärke der kraniellen Chordome bei acht Patienten und 14 Proben, unterteilt in sieben Primärtumoren, fünf erste Rezidive und zwei zweite Rezidive.....	15
Tabelle 6:	Immunhistochemie: Verteilung und Reaktionsstärke der spinalen Chordome bei sechs Patienten und 18 Proben, unterteilt in zwölf Primärtumoren und sechs erste Rezidive.....	16
Tabelle 7:	<i>in situ</i> - Hybridisierung: Reaktion der kraniellen Chordome bei acht Patienten und 14 Proben, unterteilt in sieben Primärtumoren, fünf erste Rezidive und zwei zweite Rezidive.	17
Tabelle 8:	<i>in situ</i> - Hybridisierung: Reaktion der spinalen Chordome bei sechs Patienten und 18 Proben, unterteilt in zwölf Primärtumoren und sechs erste Rezidive.....	18
Tabelle 9:	Patientenkollektiv und Tumormaterialübersicht der Patienten mit kraniellen Chordomen (n= 12).....	26
Tabelle 10:	Patientenkollektiv und Tumormaterialübersicht der Patienten mit spinalen Chordomen (n= 8).	27
Tabelle 11:	Stammlösungen	31

Abkürzungsverzeichnis

AEC	2, 3- Amino- 9- Ethylcarbazol
AS	Anti- Sense
BBR	Böhringer Blocking Reagent
BCIP	5- Brom- 4- Chlor- 3- Indoxylphosphat
Bcl 2	B- cell lymphoma 2
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCND1/ 2	Cyclin D1/ D2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Dhh	Desert Hedgehog
Dig	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DMFA	Dimethylformamid
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
ED	Erstdiagnose
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FCS	Fetal Calf Serum
Fu	Fused
GANT	Gli Transcription Factor Inhibitor
Geschl.	Geschlecht
Gli	Glioma- Associated Oncogene Homolog
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin- Eosin
Hh	Hedgehog
HNa ₂ O ₄ P	Dinatriumhydrogenphosphat
HPI	Hh Pathway Inhibitors
ICH	Immunhistochemie
IGF	Insulin- Like Growth Factors
Ihh	Indian Hedgehog

ISH	<i>In situ</i> - Hybridisierung
J.	Jahre
Kif 7	Kinesin- family member 7
l	Liter
m	männlich
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μ	mikro
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NBT	Nitro- Blue Tetrazolium Chloride
Nr.	Nummer
NTM	Natriumchlorid- Tris- Magnesiumchlorid
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
OP	Operation
Pat.	Patient
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid- 3- Kinase
PM	Primärtumor
Ptch	Patched
RAS	Rat Sarcoma Proto- Onkogen
Rez.	Rezidiv
RNA	Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuklease
RU-SKI	2-[(2-Methylbutyl)amino]-1-[4-[(3-methylphenoxy)methyl]-6,7-dihydrothieno[3,2-c]pyridin-5(4H)-yl]ethanon
S	Sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shh	Sonic hedgehog
Ski/ HHAT	Skinny Hh/ Hh Acyltransferase
Smo	Smoothened

SSC	Standard Saline Citrate
SuFu	Suppressor of Fused
TBS	Tris- gepufferte Salzlösung
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TR	Teilresektion
TRIS	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w	weiblich
Wnt	Wingless

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Pathologie der Chordome

Chordome sind seltene, langsam wachsende und maligne Knochenneoplasien, die aus Resten der nicht zurückgebildeten Chorda dorsalis entstehen (Han et al. 2009). Sie zählen zu der Gruppe der embryonalen Restgewebstumoren und machen einen bis vier Prozent aller Knochentumoren aus (al-Mefty und Borba 1997). Von ihrem Ursprung ausgehend, sind die Chordome besonders in der Schädelbasisregion und im Bereich des Sakrums anzutreffen (Fletcher 2013; Freyschmidt et al. 2010; Walcott et al. 2012). Pathohistologisch stellen sich Chordome als lappenförmig angeordnete physaliforme Zellen dar, die kleine Kerne, Pleomorphismus und interzelluläre Schleimhautbildung zeigen. Die hypochromatischen Zellkerne sind randständig verlagert und ähneln dem Bild einer Siegelringzelle (Seifert und Donath 1998) (*Abbildung 1*).

Obwohl es sich um einen langsam wachsenden Tumor handelt, wächst er lokal invasiv und destruktiv (Mendenhall et al. 2005). Unbehandelt versterben die Betroffenen binnen zwölf Monaten an der lokal progressiven Ausbreitung (Di Maio et al. 2011). Die Therapie der Wahl besteht zum jetzigen Zeitpunkt aus radikaler chirurgischer Resektion mit anschließender Bestrahlung. Trotz dieser Maßnahmen ist die Rezidivrate dieser Tumoren ausgesprochen hoch (Stacchiotti und Sommer 2015; Walcott et al. 2012). Dabei weisen 30 bis 40 % der Erkrankten, häufig im späten Krankheitsverlauf oder nach lokalen Rezidiven, bevorzugt Metastasen im Bereich der Lunge, Leber, Knochen, Subkutis oder Lymphknoten auf (Fletcher 2013). Die Fünf- Jahres- Überlebensrate liegt bei 78,4 %, das Fünf- Jahre- Progressionsfreie- Überleben bei 50,5 % (Di Maio et al. 2011; Stacchiotti und Sommer 2015). Somit ist die Prognose bei Rezidiven als schlecht einzustufen (Tzortzidis et al. 2006). Die Behandlung von Chordomen bleibt daher eine Herausforderung.

Aktuelle Studien zeigen, dass die Chordomentstehung in der dritten embryonalen Woche aus dem Notochord (Chorda dorsalis) stattfindet (Sun et al. 2015; Wacker et al. 2002). Des Weiteren sondert der Notochord während dieser frühen Embryogenese diverse Signalmoleküle ab, unter anderem das Sonic- Hedgehog- Molekül (*Shh*), um die Proliferation, Diffe-

renzierung und das Überleben der embryonalen Zellen zu regulieren (Cates et al. 2010; Hooper und Scott 2005; Kozmikova et al. 2013; Satoh et al. 2012; Sun et al. 2015).

Shh ist als wesentlicher Aktivator der Hedgehog- Signalkaskade essentiell für die Entwicklung diverser Organe wie Gehirn, Herz, Thymus, Lunge und Gliedmaßen (Chiang et al. 1996; Shah et al. 2004). Zahlreiche Studien zeigten bereits eine Beteiligung der Hedgehog- Signalkaskade am Tumorwachstum wie auch an Metastasenbildung in einer Vielzahl von menschlichen Tumoren, beispielsweise dem adamantinösen Kraniopharyngeom, Glioblastom, Medulloblastom und Rhabdomyosarkom (Andoniadou et al. 2012; Bar et al. 2007; Hooper und Scott 2005; Theunissen und Sauvage 2009; Yang et al. 2010).

An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob extrazelluläre Signalwege wie der Hedgehog- Signalweg bei der Entstehung von Chordomen und deren Rezidiven involviert sind. Derzeit herrscht für die Behandlung von Chordomen und ihren Rezidiven keine chemotherapeutische Empfehlung, da sich bei lokal fortgeschrittenen und metastasierenden Chordomen bis dato kein Medikament bewährt hat (Stacchiotti und Sommer 2015). Beim Nachweis einer solchen Signalkaskade wäre eventuell ein therapeutischer Ansatz im Sinne eines Chemotherapeutikums denkbar.

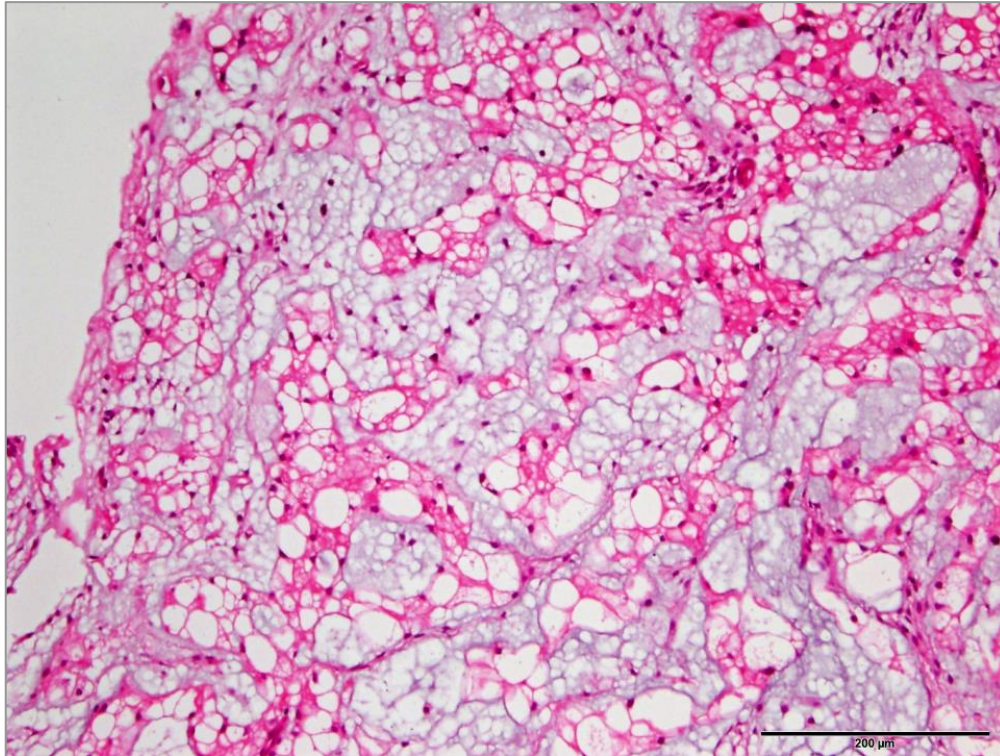


Abbildung 1: Die HE- Färbung eines kraniellen Chordomes zeigt die typischen lappenförmig angeordneten, physaliformen Zellen mit randständigen kleinen Zellkernen (Siegelringzellen) und interzellulärer Schleimhautbildung.

1.2. Die Hedgehog- Signalkaskade

Die Hedgehog (*Hh*)- Proteine sind extrazelluläre Signalmoleküle, die während der Embryonalentwicklung vieler Organismen eine zentrale Rolle spielen (Theunissen und Sauvage 2009). Sie wurden 1980 erstmals von Nüsslein-Volhard und Wieschaus in *Drosophila melanogaster* beschrieben (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Neben einer Vielzahl von Signalkaskaden reguliert die *Hh*- Signalkaskade während der Embryogenese die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen. Auch im adulten Gewebe werden die Bildung und das Verbleiben von bestimmten Stamm- und Vorläuferzellen gesteuert (Hooper und Scott 2005) und Wundheilungsreaktionen moduliert (Justilien und Fields 2015; Omenetti et al. 2011).

Bereits bei diversen anderen Tumoren, wie sowohl beim Basalzell-, Ovarial-, Prostata-, Mammakarzinom, beim klarzelligen Nierenzell- und Lungenkarzinom als auch beim Glioblastom, Medulloblastom, Rhabdomyosarkom und adamantinösen Kraniopharyngeom, wurde eine Überfunktion der *Hh*- Signalkaskade nachgewiesen (Andoniadou et al. 2012; Briscoe und Théron 2013; Dormoy et al. 2009; Hahn et al. 1996; Hooper und Scott 2005; Kubo 2004; Lin et al. 2010; Liu et al. 2006; Low und Sauvage 2010; Wen et al. 2010). Somit ist die *Hh*- Signalkaskade am Tumorwachstum, als auch an der Metastasenbildung bei diversen Tumoren entscheidend beteiligt (Andoniadou et al. 2012).

Bei menschlichen Embryonen und Wirbeltieren besteht *Hh* aus drei Untereinheiten, dem Sonic hedgehog (*Shh*), Desert hedgehog (*Dhh*) und Indian hedgehog (*Ihh*) (Katoh und Katoh 2006). *Shh* als wichtigstes *Hh*- Homolog ist essentiell für die Entwicklung diverser Organe wie Gehirn, Herz, Thymus, Lunge und Gliedmaßen (Chiang et al. 1996; Shah et al. 2004). Während *Ihh* hauptsächlich die Proliferation und Reifung von Chondrozyten während der Entstehung der Knorpelstrukturen reguliert (Razzaque et al. 2005), beeinflusst *Dhh* primär die Spermatogenese (Bitgood et al. 1996).

Für *Hh* existiert ein Rezeptor namens Patched (*Ptch*), der in *Ptch1* und *Ptch2* unterteilt wird (Justilien und Fields 2015; Smyth et al. 1999). Obwohl beide Untereinheiten ein ähnliches Reaktionsmuster aufweisen und mit gleicher Affinität an *Hh* binden, unterscheiden sie sich in ihren funktionellen Eigenschaften (Holtz et al. 2013; Rahnama et al. 2004). *Ptch1* besitzt eine inhibierende Wirkung auf ein Sieben-Transmembranprotein (Smoothed (*Smo*)) (Corbit et al. 2005; Kim et al. 2009). Im inaktiven Zustand verbleibt das Zink-Finger-Transkriptions-Protein (*Gli*) an einen Komplex aus Proteinen Fused (*Fu*), Suppressor of Fused (*SuFu*) und Kinesin family member 7 (*Kif7*) im Zytoplasma der Zelle gebunden (Hui und Angers 2011; Katoh und Katoh 2006) (Abbildung 2).

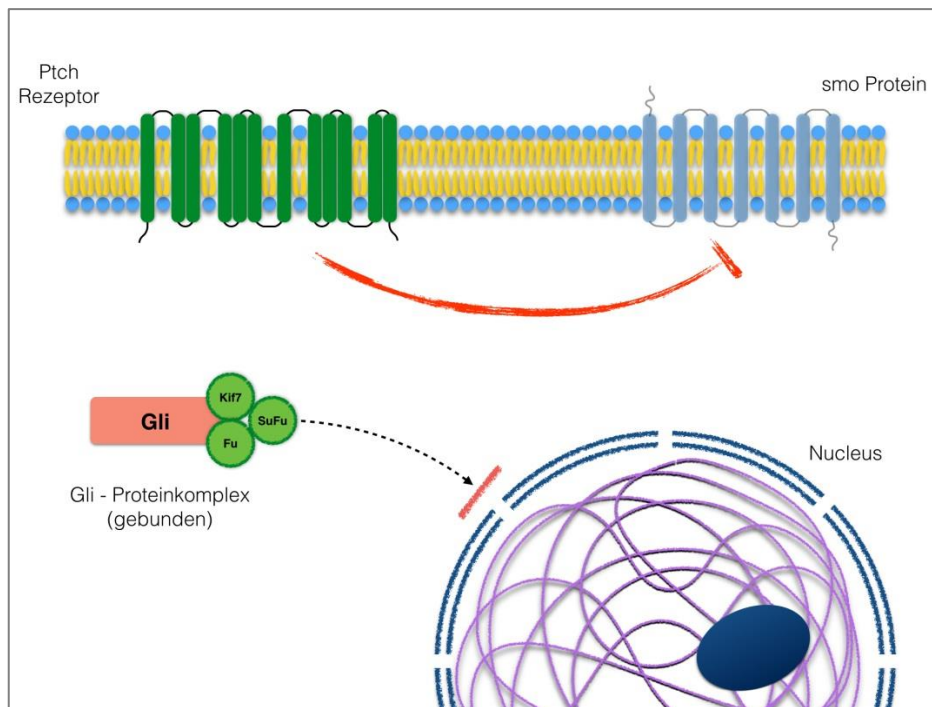


Abbildung 2: *Shh*- Signalkaskade in der „inaktiven“ Form (modifiziert nach Justilien und Fields 2015, S. 507).

Durch die Bindung von *Hh* an den Rezeptor *Ptch1* wird die inhibitorische Wirkung von *Smo* aufgehoben, wodurch der Signalweg aktiviert wird (Katoh und Katoh 2006; Kim et al. 2009; Omenetti et al. 2011). Dabei kommt es zu einer Anreicherung von *Smo* in der Plasmamembran (Corbit et al. 2005; Incardona et al. 2002). Das Signal wird über das Zink-Finger-Transkriptions-Protein *Gli*, eingeteilt in *Gli1*, *Gli2* und *Gli3*, ins Zellinnere transportiert (Hooper und Scott 2005; Hui und Angers 2011). Erst jetzt werden die *Gli*- Transkriptionsfaktoren freigesetzt, diffundieren in den Nucleus, um dort die Transkription ihrer Zielgene auszuüben (Nybakken und Perrimon 2002; Wen et al. 2010) (*Abbildung 3*). Zielgene sind unter anderem Apoptose (*bcl2*)- und Zellzyklus (*CCND1*, *CCND2*)- regulierende Gene, aber auch eigene Gene des Signalweges (*Ptch* und *Gli1*) (Ok et al. 2012).

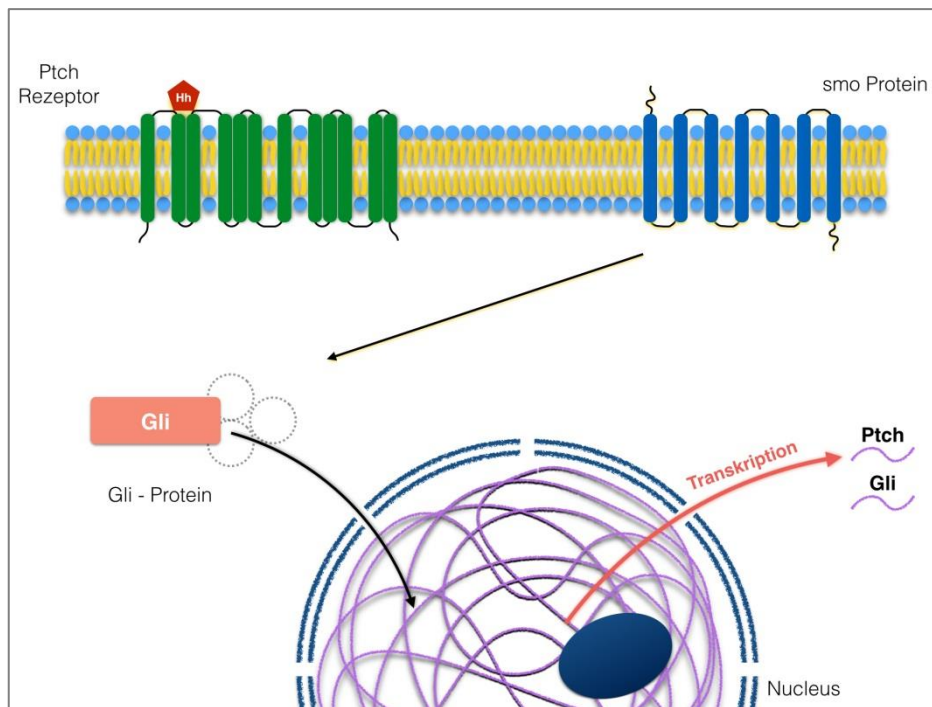


Abbildung 3: *Shh*- Signalkaskade in der „aktiven“ Form (modifiziert nach Justilien und Fields 2015, S. 507).

Um eine aktive *Hh/Ptch*- Signalkaskade nachzuweisen, werden sowohl *Gli1* als auch *Ptch1* als Marker genommen (Gu und Xie 2015; Katoh und Katoh 2006). Dafür eignet sich unter anderem die *in situ*- Hybridisierung (ISH), eine Untersuchungstechnik zur Lokalisation von DNA- oder RNA- Molekülen durch eine spezifische Anlagerung eines Nukleinsäurefragments (sogenannte Sonde) an die komplementäre Nukleinsäurezielsequenz im zu untersuchenden Präparat (Romeis 2010). Die Bezeichnung *in situ* (lateinisch *am Ort*) deutet darauf hin, dass der Nachweis der Sequenz in ursprünglicher Lokalisation, also im biologischen Präparat, erfolgt (Lang 2013). Ebenfalls kann immunhistochemisch durch die Expression von *Hh*- Proteinen während der Signalkaskade, wie zum Beispiel *Shh* und *Gli1*, eine Aktivität nachgewiesen werden (Freier et al. 2009).

Nach heutigem Wissensstand wirken *Gli1* und *Gli2* hauptsächlich als Aktivatoren der Zielgene, da sie den negativen Regulator *Ptch1* inaktivieren. *Gli3* wird als Repressor der *Shh*-Zielgene eingestuft (Kasper et al. 2006; Omenetti et al. 2011; Varjosalo et al. 2006). Jedoch aktiviert *Gli3* durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus wiederum die *Gli1*-Transkription (Kappler 2006; Kasper et al. 2006). Da *Gli1* zudem noch die *Ptch*- Transkription stimuliert, können sowohl *Gli1* als auch *Ptch1* als Zielgene und somit als zuverlässige

Marker für eine aktive *Hh/ Ptch*-Signalkaskade angesehen werden (Katoh und Katoh 2006) (Abbildung 4).

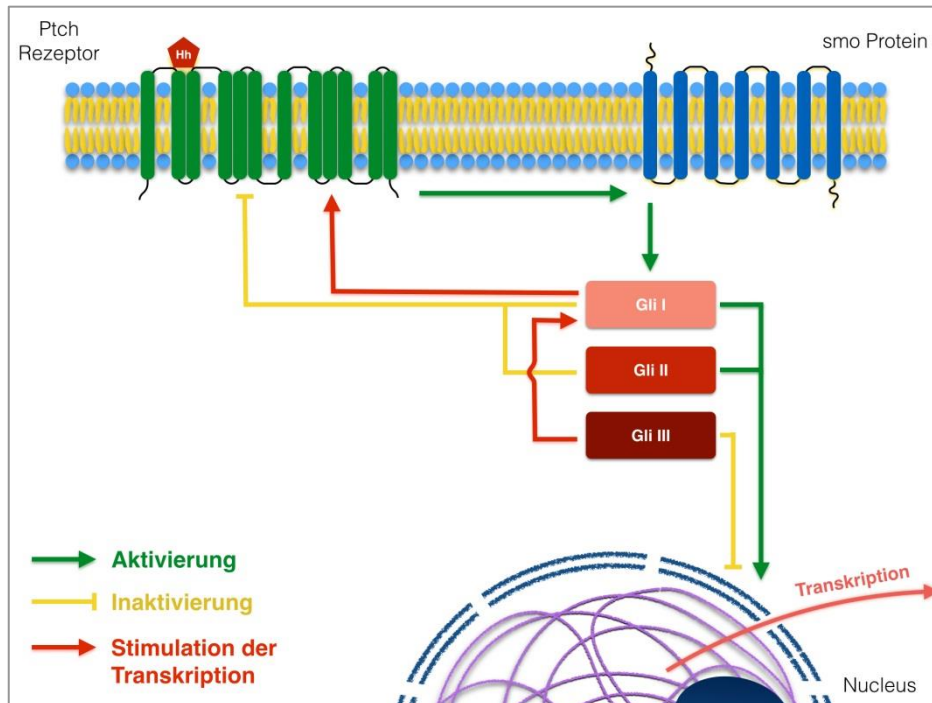


Abbildung 4: Gegenseitige Wechselbeziehungen innerhalb der *Shh*- Signalkaskade.

Es ist bereits bewiesen, dass Fehlfunktionen der *Shh*- Signalkaskade zur Ausbildung diverser Erkrankungen beziehungsweise zur Neubildung einer Neoplasie führen (Andoniadou et al. 2012) (Tabelle 1). Dabei ist *Ptch1* als Tumorsuppressorgen (Ryan und Chiang 2012; Svärd et al. 2006) und *Smo* als Protoonkogen anzusehen (Hooper und Scott 2005; Rudin et al. 2009).

Neben dem beschriebenen regulären (kanonischen) Signalweg existieren auch nicht kanonische Mechanismen, die eine *Gli1*- Transkription aktivieren. Jedoch geschieht dies nicht über die Ebene von *Hh* und *Smo*, sondern über andere Signalwege, wie zum Beispiel durch die RAS (Rat Sarcoma)- und die TGF β (Transforming Growth Factor Beta)- Signalkaskade (Gu und Xie 2015; Lauth und Toftgård 2007).

Tabelle 1: Fehlregulationen der *Shh*- Signalkaskade, die zur Neubildung einer Neoplasie führen (modifiziert nach Hooper und Scott 2005, S. 306).

Fehlregulation in der <i>Shh</i>- Signalkaskade	Assoziierte Defekte bzw. Neoplasien
• <i>Shh</i> - Mutation	➤ Holoprosencephalie (Hooper und Scott 2005)
• <i>Shh</i> - Überexprimierung (<i>gain of function</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Adamantinoses Kraniopharyngeom (Andoniadou et al. 2012) ➤ Glioblastom (Bar et al. 2007) ➤ Klarzelliges Nierenzellkarzinom (Dormoy et al. 2009) ➤ Kleinzelliges Lungenkarzinom (Justilien und Fields 2015) ➤ Leukämie (Lin et al. 2010) ➤ Mammakarzinom (Liu et al. 2006) ➤ Neoplasien des Verdauungstraktes (Colon, Magen, Ösophagus, Pankreas) (Berman et al. 2003; Varnat et al. 2009) ➤ Ovarialkarzinom (Steg et al. 2012) ➤ Prostatakarzinom (Karhadkar et al. 2004)
• <i>Ptch1</i> - Funktionsverlust (<i>loss of function</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Basalzellkarzinom (Hahn et al. 1996; Reifenberger et al. 2005) ➤ Gorlin- Goltz- Syndrom (Hahn et al. 1996) ➤ Medulloblastom (Hooper und Scott 2005) ➤ Rhabdomyosarkom (Theunissen und Sauvage 2009)
• <i>SuFu</i> - Funktionsverlust (<i>loss of function</i>)	➤ Medulloblastom (Hooper und Scott 2005)
• <i>Smo</i> - Überexprimierung (<i>gain of function</i>)	➤ Basalzellkarzinom (Hahn et al. 1996)

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Anhand der durchgeführten Untersuchung soll eine mögliche Involvierung der *Shh*- Signalkaskade bei der Entstehung von Chordomen und deren Rezidiven nachgewiesen werden. Da zurzeit für die Therapie von Chordomen und deren Rezidiven keine standardisierte chemotherapeutische Empfehlung besteht, wäre beim Nachweis einer aktiven *Shh*- Signalkaskade eventuell ein chemotherapeutischer Ansatz zur Behandlung dieser Patienten denkbar.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv und Gewebematerialien

In den Jahren 1982 bis 2012 wurden insgesamt zwölf (60 %) Patienten an einem kranialen und acht (40 %) Patienten an einem spinalen Chordom operiert. Von den zwölf kranial erkrankten Patienten erlitten fünf (42 %) Patienten ein kraniales erstes Rezidiv und zwei (17 %) Patienten ein kraniales zweites Rezidiv. Von den acht spinal erkrankten Patienten wiesen fünf (63 %) Patienten ein spinales erstes Rezidiv auf, weswegen eine erneute Operation durchgeführt werden musste. Von allen genannten Patienten befanden sich 15 (75 %) von der Diagnosestellung bis zur letzten Operation in der vollständigen Therapie der Neurochirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Fünf (25 %) von 20 Patienten wurden von anderen Krankenhäusern, in denen die erste Operation stattfand, zur Weiterbehandlung überwiesen. Die Folgeoperationen und die gesamte Weiterbehandlung fanden in der Universitätsmedizin Göttingen statt. Sechs (50 %) der kranial erkrankten Patienten waren weiblich und sechs (50 %) männlich, bei den spinal erkrankten Patienten waren fünf (62 %) weiblich und drei (38 %) männlich. Das Durchschnittsalter der kranial erkrankten Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag bei 49 Jahren, dabei war der jüngste Patient zehn, die älteste Patientin 89 Jahre alt. Das Durchschnittsalter bei den spinal erkrankten Patienten lag bei 57 Jahren, dabei war der jüngste Patient 18, die älteste Patientin 80 Jahre alt (*Tabelle 2*).

Tabelle 2: Übersicht des Patientenkollektivs (n= 20)

	Kranielles Chordom	Spinales Chordom
Patientenanzahl (n= 20)	12 (60 %)	8 (40 %)
weiblich	6 (50 %)	5 (62 %)
männlich	6 (50 %)	3 (38 %)
1. Rezidiv - Gesamtzahl	5 (42 %)	5 (63 %)
weiblich	4 (80 %)	2 (40 %)
männlich	1 (20 %)	3 (60 %)
2. Rezidiv - Gesamtzahl	2 (17 %)	0
weiblich	1 (50 %)	0
männlich	1 (50 %)	0
Durchschnittsalter	49 J.	57 J.
Alterspanne	10 J.- 89 J.	18 J.- 80 J.

Von insgesamt 14 (70 %) Patienten war im neuropathologischen Zentralarchiv der Universitätsmedizin Göttingen brauchbares Tumormaterial vorhanden, welches für die Immunhistochemie und *in situ*-Hybridisierung verwendet wurde.

Die 14 Patienten unterteilten sich in acht (57 %) kraniell und sechs (43 %) spinal erkrankte Patienten. Von den acht (57 %) Patienten mit einem kraniellen Chordom waren insgesamt 14 Tumorblöcke vorhanden, davon sieben Primärtumoren, fünf erste Rezidive und zwei zweite Rezidive (*Anhang 6.1 Tabelle 9*). Von den sechs (43 %) Patienten mit einem spinalen Chordom waren insgesamt 18 Tumorblöcke vorhanden, davon zwölf Primärtumoren und sechs erste Rezidive (*Anhang 6.1 Tabelle 10*).

2.2. Einbetten von Geweben

Intraoperativ entnommene Proben wurden routinemäßig im neuropathologischen Labor der Universitätsmedizin Göttingen im Gewebereinbettautomat Shandon Excelsior™ zunächst in aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 80 %, 96 %, 100 %, 100 %) entwässert, mit Xylol behandelt und in Paraffin eingebettet. Nach der Gesamteinbettdauer im Automaten von circa 16 Stunden, wurden die Biopsien in Einbettförmchen mit flüssigem Paraffin ausgegossen und auf einer Kühlplatte abgekühlt.

Für die *in situ*-Hybridisierung, welche zur Markierung sowohl von spezifischen DNA- als auch RNA-Molekülen dient (Romeis 2010), gilt ein RNasen-freies Arbeiten als Voraussetzung. Somit soll eine mögliche hydrolytische Spaltung der RNA-Ketten verhindert werden (Mülhardt 2009). Für die Inaktivierung der ungewünschten RNasen wurden die Wasserbäder über Nacht mit Dimethylpyrocarbonat (DMPC) behandelt und anschließend autoklaviert. Das DMPC zerfällt nach diesem Schritt zu CO₂ und Ethanol. DMPC bindet an primäre und sekundäre Amine und führt zu kovalenten Bindungen, sodass die RNasen-Aktivität zerstört wird (Mülhardt 2009). Generell wurden bei allen Vorgängen nur neue, unbenutzte oder mit entsprechender Desinfektion (RNase away®) behandelte Geräte und Materialien benutzt, um eine Kontamination mit RNasen auszuschließen beziehungsweise zu vermeiden.

Aus den abgekühlten Paraffinblöcken wurden am Schlittenmikrotom Schnitte von circa 1 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aus dem kalten Wasser aufgezogen. Daraufhin wurden die aufgezogenen Objektträger im warmen Wasser (56- 58°C) behandelt und mit Filterpapier vom restlichen Wasser befreit. Anschließend wurden die Paraffinschnitte in Glasküvetten über Nacht bei 57°C getrocknet, bevor sie für die Immunhistochemie und *in situ*- Hybridisierung benutzt wurden.

2.3. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an allen Proben von kraniellen und spinalen Chordomen mit folgenden Antikörpern durchgeführt: Anti- SHH (rabbit) (1: 500), Anti- Gli1 (rabbit) (1: 100), EnVision Polyclonal rabbit/ mouse (1: 1) (Tabelle 3). Alle Schnitte, sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen, wurden unter identischen Bedingungen bearbeitet. Als Negativkontrolle dienten die Schnitte ohne Inkubation mit dem Primärantikörper.

Die Gewebeschnitte wurden drei Mal für zehn Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholgefolge (96 %, 96 %, 75 %, 50 %, 30 % bis DMPC- H₂O) rehydriert. Für den Primärantikörper *Shh* wurden die Gewebeschnitte zur Antigendemaskierung (Antigen Retrieval) 20 Minuten lang mit Citrat pH 6,0 in der Mikrowelle bei 80°C vorbehandelt, anschließend für 30 Minuten in TBS/ 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Für den Primärantikörper *Gli1* war keine weitere Vorbehandlung notwendig, da hierfür das Epitop frei zugänglich war.

Um unspezifische Bindungsstellen zu vermeiden, wurden die Gewebeschnitte für 20 Minuten in H₂O₂/ TBS 3 %, für zehn Minuten in TBS/ 0,1 % Triton X-100 und anschließend für 20 Minuten mit 0,2 % Casein geblockt. Der Primärantikörper wurde für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf das Gewebe appliziert und mit TBS/ 0,1 % Triton X-100 gespült. Danach wurde der Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgetragen. Nach erneutem Spülen mit TBS/ 0,1 % Triton X-100 erfolgte die Farbreaktion für fünf bis 30 Minuten mit einer AEC-Färbelösung. Nach einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Schnitte mit einem wässrigen Eindeckmittel zur Konservierung (Aqua-

tex®) eingedeckt. Für die Immunhistochemie benötigte Stammlösungen, Chemikalien, Laborwaren und -geräte sind im Anhang (*Kapitel 6.3; 6.4; 6.5; 6.6*) aufgelistet.

Tabelle 3: Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Verdünnung
Anti- SHH (rabbit), abcam, Cambridge, ab 73958	1: 500 in TBS/ 0,1 % Triton X-100
Anti- Gli1 (rabbit), Rockland Immunochemicals Inc., Gilbertsville, 100-401-223	1: 100 in TBS/ 0,1 % Triton X-100
EnVision Polyclonal rabbit/mouse HRP, Dako GmbH, Hamburg, K5007	1: 1 in TBS

2.4. *in situ*-Hybridisierung

Die für die *in situ*-Hybridisierung benötigten Digoxigenin- markierten Sonden *Ptch1* und *Gli1* wurden im Institut für Humangenetik der Universitätsmedizin Göttingen hergestellt und freundlicherweise für die *in situ*-Hybridisierung zur Verfügung gestellt. Alle Schnitte, sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen, wurden unter identischen Bedingungen bearbeitet. Als Negativkontrolle dienten die Schnitte, die mit den Sonden *Ptch1 Sense* und *Gli1 Sense* inkubiert wurden.

Die Paraffinschnitte wurden für zwei Stunden bei 57°C im Hybridisierungsöfen inkubiert, zweimal für 20 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (96 %, 96 %, 75 %, 50 %, 30 %, DMPC- H₂O) jeweils für drei Minuten rehydriert. Anschließend folgte eine Fixierung in 4 % PFA bei 4°C für 20 Minuten. Bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten in 0,2 M HCl zur Proteindenaturierung überführt und daraufhin dreimal für zehn Minuten in TBS-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit Proteinase K- Puffer für 30 Minuten bei 37°C im Hybridisierungsöfen versehen. Es folgten erneute Waschvorgänge im TBS- Puffer, einmal für fünf Minuten bei -20°C zum Stoppen der Proteinase K- Reaktion und dreimal bei Raumtemperatur für jeweils zehn Minuten. Zur Inaktivierung der endogenen alkalischen

Phosphatase wurden 0,5 % Essigsäureanhydrid für zehn Minuten hinzugegeben. Die Gewebeschnitte wurden erneut dreimal für zehn Minuten in TBS- Puffer bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 %, 50 %, 75 %, 96%, 96 %, Chloroform) dehydriert. Die Schnitte wurden am selben Tag für die Hybridisierung verwendet. Pro 1 ml Hybridisierungsmix wurden 50 µl Lachsspermien- DNA hinzugegeben und sowohl die Sense- als auch die Antisense- Sonden *Ptch1* und *Gli1* 1: 500 in diesem Hybridisierungspuffer verdünnt. 50 µl Hybridisierungsmix wurde auf jeden Gewebeschnitt pipettiert und luftblasenfrei mit einem Deckgläschen abgedeckt. Zusammenfassend wurden pro Gewebebiopsie vier Paraffinschnitte genommen: *Ptch1 Sense (Ptch1 S)*, *Ptch1 Antisense (Ptch1 AS)*, *Gli1 Sense (Gli1 S)* und *Gli1 Antisense (Gli1 AS)*. Alle Gewebeschnitte wurden in eine feuchte Kammer mit DMPC- H₂O aufbewahrt und für vier Minuten auf eine 95°C warme Heizplatte gestellt. Nach Auflösen der RNA- Sekundärstruktur und Hemmung der endogenen Phosphatase wurde die feuchte Kammer über Nacht bei 62°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kammer geöffnet und die Deckgläschen vorsichtig entfernt. Es folgten zwei Waschvorgänge für zehn Minuten bei Raumtemperatur im Waschpuffer I, zwei im weniger konzentrierten Waschpuffer II für zehn Minuten bei 62°C und zwei in TBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler. Zum Vermeiden von unspezifischen Bindungen wurden 120 µl Block-Mix pro Gewebeschnitt aufgetragen und diese in der feuchten Kammer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der überschüssige Blockmix wurde vorsichtig entfernt und 120 µl des Anti-Digoxigenin Fab fragments/ AP-Mix pro Gewebeschnitt pipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Gewebeschnitte nochmals dreimal in TBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und zum Anfärben in NBT/ BCIP- NTM- Substratpuffer solange im Dunkeln bei 4°C gelagert, bis eine ausreichende Signalintensität erreicht wurde. Dabei erfolgte ein täglicher Wechsel der Lösung. Abschließend wurden die Gewebeschnitte zur Konservierung mit einem wässrigen Eindeckmittel (Aquatex®) eingedeckt. Die bei der *in situ*- Hybridisierung verwendeten Stammlösungen, Chemikalien, Laborwaren und -geräte sind im Anhang (Kapitel 6.3; 6.4; 6.5; 6.6) aufgelistet.

2.5. Auswertungskriterien

Alle immunohistochemisch untersuchten Gewebeproben wurden mikroskopisch anhand ihrer Färbungsintensität im Zytoplasma und in der Membran der Tumorzellen mittels eines Scoring-Systems nach Rüschoff et al. (Rüschoff et al. 2009) bewertet (Tabelle 4). Somit wurde jeweils der Score für *Shh* und *Gli1* in den Tumorzellen bestimmt und alle Ergebnisse gegeneinander zum Vergleich aufgestellt.

Tabelle 4: Scoring-System nach Rüschoff et al. 2009 für die Immunhistochemie in den Tumorzellen.

Score 0	Keine Färbung
Score 1	Kaum sichtbare Färbung im Zytoplasma/ in der Membran < 10 %
Score 2	Schwach- mäßige, ringförmige Färbung im Zytoplasma/ in der Membran > 10 % und < / = 30 %
Score 3	Starke, ringförmige Färbung im Zytoplasma/ in der Membran > 30 %

Die Gewebeschnitte der *in situ*-Hybridisierung wurden, jeweils für *Ptch1* und *Gli1*, mit einer sichtbaren Kernfärbung in den Tumorzellen als positiv (+) bewertet. Eine fehlende Kernfärbung in den Tumorzellen wurde mit negativ (-) vermerkt. Anschließend wurden die Ergebnisse beider Verfahren miteinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Immunhistochemie

Insgesamt wurden 14 (100 %) kranielle Chordome von acht Patienten immunhistochemisch auf die Proteinexpression von *Shh* und *Gli1* untersucht. Die 14 Tumorproben teilten sich in sieben Primärtumoren, fünf erste Rezidive und zwei zweite Rezidive auf. Es reagierten zehn (71 %) Proben, genauer alle sieben Primärtumoren und drei erste Rezidive von sieben (87,5 %) Patienten sowohl mit *Shh* (+) als auch *Gli1* (+). Die übrigen vier (29 %) kraniellen Proben, die von zwei (25 %) Patienten stammen, waren zwei erste und zwei zweite Rezidive und zeigten lediglich eine positive *Gli1*- Reaktion. Insgesamt reagierte *Gli1* mit 14 (100 %) positiven Ergebnissen bei allen acht (100 %) Patienten geringfügig stärker als *Shh* mit zehn (71 %) positiven Proben bei sieben (88 %) Patienten (Tabelle 5).

Tabelle 5: Immunhistochemie: Verteilung und Reaktionsstärke der kraniellen Chordome bei acht Patienten und 14 Proben, unterteilt in sieben Primärtumoren, fünf erste Rezidive und zwei zweite Rezidive.

<i>Kranielle Chordome</i>	<i>Shh (+) Primärtumoren</i>	<i>Gli1 (+) Primärtumoren</i>	<i>Shh (+) 1. Rezidive</i>	<i>Gli1 (+) 1. Rezidive</i>	<i>Shh (+) 2. Rezidive</i>	<i>Gli1 (+) 2. Rezidive</i>
Score 0	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (40 %)	0 (0 %)	2 (29 %)	0 (0 %)
Score 1	3 (43 %)	2 (29 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (50 %)
Score 2	1 (14 %)	1 (14 %)	3 (60 %)	2 (40 %)	0 (0 %)	1 (50 %)
Score 3	3 (43 %)	4 (57 %)	0 (0 %)	3 (60 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

Zudem wurden 18 (100 %) spinale Chordome, davon zwölf Primärtumoren und sechs erste Rezidive, von sechs Patienten immunhistochemisch auf die Expression von *Shh* und *Gli1* untersucht. Es reagierten 17 (94 %) Proben, genauer elf Primärtumoren und alle sechs ersten Rezidive, von allen sechs Patienten sowohl *Shh* (+) als auch *Gli1* (+). Eine spinale Probe (6 %) von einem (17 %) Patienten zeigte lediglich für *Shh* ein positives Ergebnis, dabei handelte es sich um einen Primärtumor. Ferner reagierte bei allen sechs Patienten *Shh* (+) mit 18 Proben geringfügig häufiger als *Gli1* (+) mit 17 Proben (Tabelle 6).

Tabelle 6: Immunhistochemie: Verteilung und Reaktionsstärke der spinalen Chordome bei sechs Patienten und 18 Proben, unterteilt in zwölf Primärtumoren und sechs erste Rezidive.

<i>Spinale Chordome</i>	<i>Shh (+) Primärtumoren</i>	<i>Gli1 (+) Primärtumoren</i>	<i>Shh (+) 1. Rezidive</i>	<i>Gli1 (+) 1. Rezidive</i>
Score 0	0 (0 %)	1 (8 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Score 1	5 (42 %)	5 (42 %)	2 (33 %)	1 (17 %)
Score 2	5 (42 %)	5 (42 %)	1 (17 %)	2 (33 %)
Score 3	2 (16 %)	1 (8 %)	3 (50 %)	3 (50 %)

Zusammenfassend zeigten alle 19 kranielle und spinale Primärtumoren von insgesamt 14 Patienten eine positive immunhistochemische Reaktion für *Shh* und/ oder *Gli1*. Ebenfalls wiesen sowohl alle elf kraniellen und spinalen ersten Rezidive als auch die zwei kraniellen zweiten Rezidive, von insgesamt 14 Patienten, eine positive immunhistochemische Reaktion für *Shh* und/ oder *Gli1* auf.

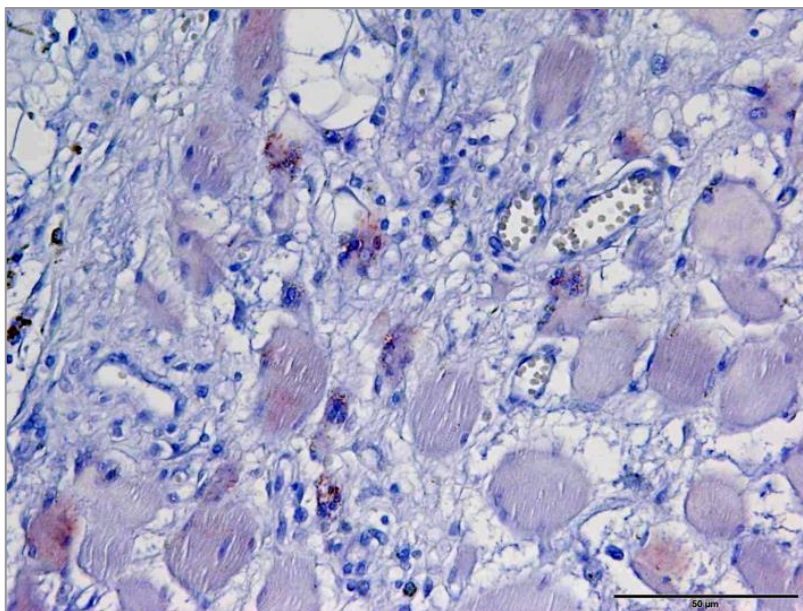


Abbildung 5: Immunhistochemische Färbung der *Gli1*- Expression bei einem spinalen Chordom. Die Expressionsstärke der zytoplasmatischen granulären Färbung der Tumorzellen entspricht dem Score 1 (Vergrößerung 400 x).

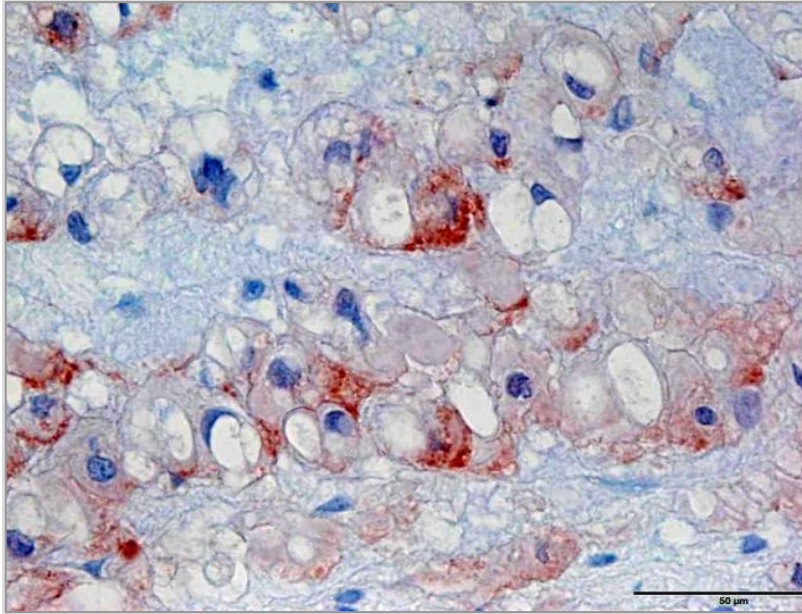


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung der Gli1- Expression bei einem kraniellen Chordom. Die Expressionsstärke der zytoplasmatischen granulären Färbung der Tumorzellen entspricht dem Score 3 (Vergrößerung 400 x).

3.2. *in situ*- Hybridisierung

Insgesamt wurden 14 kraniale Chordome, unterteilt in sieben Primärtumoren, fünf erste Rezidive und zwei zweite Rezidive von acht (100 %) Patienten mittels *in situ*- Hybridisierung auf die Expression von *Ptch1* und *Gli1* untersucht. Bei vier (57 %) kranialen Primärtumoren von drei (38 %) Patienten war eine positive Reaktion sichtbar. Davon reagierten zwei (29 %) Primärtumoren *Ptch1* (+) und zwei (29 %) Proben *Gli1* (+).

Die ersten und zweiten kranialen Rezidive zeigten keine Reaktion auf die Marker *Ptch1* und *Gli1* (Tabelle 7).

Tabelle 7: *in situ*- Hybridisierung: Reaktion der kranialen Chordome bei acht Patienten und 14 Proben, unterteilt in sieben Primärtumoren, fünf erste Rezidive und zwei zweite Rezidive.

Kranielle Chordome	Primärtumoren n= 7	1. Rezidive	2. Rezidive
<i>Ptch1</i> (+)	2 (29 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>Gli1</i> (+)	2 (29 %)	0 (0 %)	0 (0 %)

Außerdem wurden 18 spinale Chordome, unterteilt in zwölf Primärtumoren und sechs erste Rezidive, von sechs (100 %) Patienten auf die Expression von *Ptch1* und *Gli1* mittels *in situ*-Hybridisierung getestet. Davon zeigten acht (67 %) Primärtumoren von drei (50 %) Patienten eine positive Reaktion, drei (25 %) Proben von zwei (33 %) Patienten *Ptch1* (+) und fünf (42 %) Proben von drei (50 %) Patienten *Gli1* (+). Auch bei den ersten spinalen Chordomrezidiven fiel die Reaktion für *Ptch1* und *Gli1* negativ aus (Tabelle 8).

Sowohl bei den kraniellen als auch bei den spinalen Primärtumoren und Rezidiven war die Expression von *Ptch1* und *Gli1* nur im Kern der Tumorzellen sichtbar (Abbildung 7). Die benachbarten Stromazellen zeigten keine positive Expression für *Ptch1* und *Gli1*.

Tabelle 8: *in situ*-Hybridisierung: Reaktion der spinalen Chordome bei sechs Patienten und 18 Proben, unterteilt in zwölf Primärtumoren und sechs erste Rezidive.

<i>Spinale Chordome</i>	<i>Primärtumoren</i> <i>n= 12</i>	<i>1. Rezidive</i>
<i>Ptch1 (+)</i>	3 (25 %)	0 (0 %)
<i>Gli1 (+)</i>	5 (42 %)	0 (0 %)

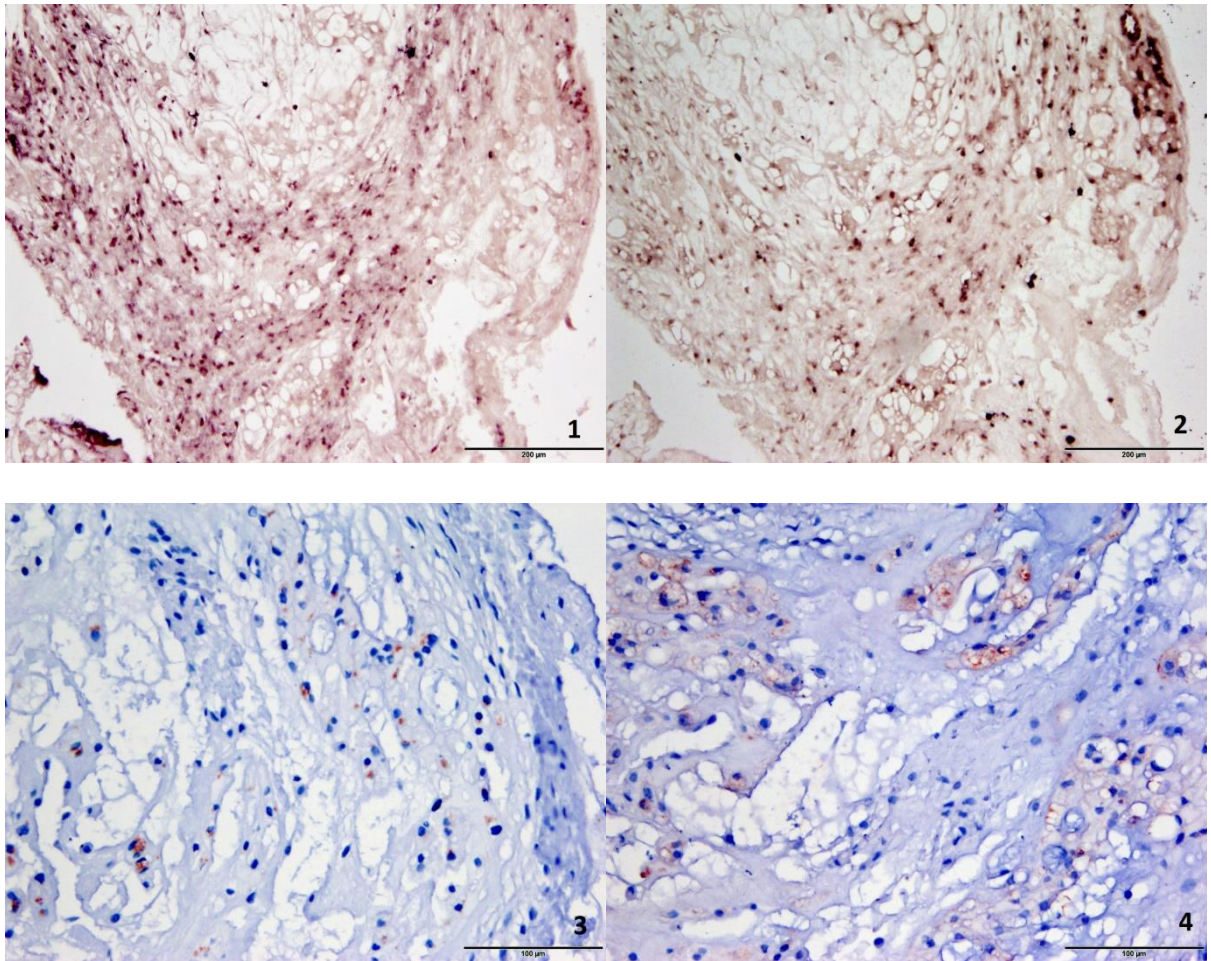


Abbildung 7: Gegenüberstellung einer kraniellen Chordomprobe von einem Patienten nach positiver *in situ*-Hybridisierung (*Ptch1* (+), *Gli1* (+)) und immunhistochemischer Färbung (*Shh* (+) und *Gli1* (+)) im Vergleich:

Bild 1: *in situ*-Hybridisierung *Ptch1* (+) in 100 x Vergrößerung.

Bild 2: *in situ*-Hybridisierung *Gli1* (+) in 100 x Vergrößerung.

Bild 3: Immunhistochemie *Shh* (+), Score 2, in 200 x Vergrößerung.

Bild 4: Immunhistochemie *Gli1* (+), Score 2, in 200 x Vergrößerung.

Chordome sind seltene, langsam wachsende und maligne Knochenneoplasien, die während der Embryogenese aus Resten der nicht zurückgebildeten Chorda dorsalis (Notochord) entstehen (Han et al. 2009; Wacker et al. 2002). Die Betroffenen versterben unbehandelt binnen zwölf Monaten am lokal invasiven, destruktiven Wachstum und der lokal progressiven Ausbreitung des Tumors (Di Maio et al. 2011; Mendenhall et al. 2005). Die Therapie der Wahl bei der Behandlung von Chordomen ist derzeit die chirurgische Resektion mit anschließender Bestrahlung (Stacchiotti und Sommer 2015). Dabei bietet die klassische Strahlentherapie mit hochenergetischen Photonen den Erkrankten eine kurzfristige Verbesserung des Krankheitsbildes (Schulz-Ertner et al. 2004). Für eine begleitende Chemotherapie in der Behandlung von Chordomen und deren Rezidiven besteht bisher aufgrund der Seltenheit der Tumoren keine evidenzbasierte Studie (Ptaszyński et al. 2009; Stacchiotti und Sommer 2015).

Der Notochord, aus dem unter anderem die Chordome hervorgehen, exprimiert diverse Signalmoleküle, unter anderem das Sonic- Hedgehog- Molekül, um die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von embryonalen Zellen zu steuern (Cates et al. 2010; Kozmikova et al. 2013; Satoh et al. 2012; Sun et al. 2015; Hooper und Scott 2005). Das Sonic- Hedgehog- Molekül gehört den Hedgehog (*Hh*)- Proteinen an, welche extrazelluläre Signalmoleküle sind, die während der Embryonalentwicklung vieler Organismen eine zentrale Rolle spielen (Theunissen und Sauvage 2009). Bereits bei diversen anderen Tumoren wie sowohl beim Basalzell-, Ovarial-, Prostata- und Mammakarzinom, beim klarzelligen Nierenzell- und Lungenkarzinom als auch beim Glioblastom, Medulloblastom, Rhabdomyosarkom und adamantinösen Kraniopharyngeom konnte sowohl das Tumorstadium, als auch die Metastasenbildung durch eine aktive *Hh*- Signalkaskade nachgewiesen werden (Andoniadou et al. 2012; Briscoe und Théron 2013; Dormoy et al. 2009; Hahn et al. 1996; Hooper und Scott 2005; Kubo 2004; Lin et al. 2010; Liu et al. 2006; Low und Sauvage 2010; Wen et al. 2010) (Tabelle 1). Daher stellte sich die Frage, ob intrazelluläre Signalwege, wie zum Beispiel der Hedgehog-Signalweg, auch bei der Entstehung von Chordomen und deren Rezidiven involviert sind. Beim Nachweis einer solchen Signalkaskade wäre neben der chirurgischen Resektion und Bestrahlung eventuell ein

chemotherapeutischer Einsatz von *Hh*- Inhibitoren denkbar. Hierzu wurden immunhistochemisch die Expression von *Shh* und *Gli1* an verfügbaren Formalin- fixierten, operativ gewonnenen Präparaten von 14 kraniellen und 18 spinalen Tumorblöcken von insgesamt 14 Patienten untersucht (Kapitel 2.1). Zusätzlich wurden diese Proben mittels *in situ*- Hybridisierung auf eine *Ptch1*- und *Gli1*- Expression überprüft, um eine aktive *Shh*- Signalkaskade zu ermitteln.

4.1. Mögliche Bedeutung der *Shh*- Signalkaskade bei der Entstehung von kraniellen und spinalen Chordomen

Eine pathologische Aktivierung der *Shh*- Signalkaskade, bedingt durch eine Überexprimierung, Mutation oder einen Funktionsverlust der Signalmoleküle, führt zur Entstehung von Neoplasien (Tabelle 1). Teglund und Toftgård diskutieren drei verschiedene Signaltransduktionsmöglichkeiten der Beteiligung der *Hh*- Kaskade an der Tumorgenese.

Das erste (nicht kanonische) Modell beschreibt die intrinsische, Liganden (*Shh*)- unabhängige Weiterleitung durch Mutationen, die einen Funktionsverlust (*loss of function*) oder eine Überexprimierung (*gain of function*) und somit erhöhte Aktivität mit sich führen (Blotta et al. 2012; Teglund und Toftgård 2010). Dabei kann zum Beispiel eine geringere *Ptch*- Expression auf eine mögliche *Ptch*- Mutation oder einen *Ptch*- Funktionsverlust hinweisen, wie es bereits beim Basalzellkarzinom, Gorlin- Goltz- Syndrom, Medulloblastom und Rhabdomyosarkom untersucht wurde (Hahn et al. 1996; Reifenberger et al. 2005; Rudin et al. 2009; Tostar et al. 2006). *Ptch* kann in diesem Fall *Smo* nicht mehr inhibieren, und es kommt zur Aktivierung der Signalkaskade (Katoh und Katoh 2006; Omenetti et al. 2011; Wen et al. 2010).

Der zweite, kanonische Typ ist autokrin, sowie Liganden (*Shh*)- abhängig und geht von einer autonomen *Hh*- Liganden- Produktion durch die Tumorzellen aus (Blotta et al. 2012; Teglund und Toftgård 2010). Dieser Mechanismus wurde unter anderem in Glioblastomen, Melanomen, Mamma-, Prostata-, Kolon-, Pankreas-, und kleinzelligen Lungenkarzinom entdeckt (Bar et al. 2007; Berman et al. 2003; Karhadkar et al. 2004; Liu et al. 2006; Stecca et al. 2007; Varnat et al. 2009; Watkins et al. 2003).

Beim dritten, kanonischen, parakrinen Modell exprimieren die Tumorzellen die *Hh*-Liganden, die den *Hh*-Signalweg in den benachbarten Stromazellen aktivieren (Blotta et al. 2012). Diese wiederum regen die Tumorzellen durch einen parakrinen Feedback-Mechanismus, wie zum Beispiel durch Produktion von Angiogenesefaktoren (IGF, VEGF), von Interleukin 6 und dem Wnt-Signalweg, zur weiteren Ligandenproduktion an (Justilien und Fields 2015). Ein überwiegend parakriner Weg wurde im multiplen Myelom und Lymphom nachgewiesen (Blotta et al. 2012; Dierks et al. 2007). Lungen-, Pankreas-, Ösophagus-, Colon- und Prostatakarzinome weisen sowohl den autokrinen als auch den parakrinen Weg auf (Justilien und Fields 2015). Zusammenfassend wird die Tumorprogression durch alle drei genannten Vorgänge gefördert (Gu und Xie 2015; Teglund und Toftgård 2010).

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass von 19 untersuchten Primärtumoren (kraniell und spinal) alle Proben für *Shh* (+) und 18 Proben (95 %) für *Gli1* (+) eine positive Reaktion zeigten. Auch von den elf untersuchten ersten Rezidiven (kraniell und spinal) reagierten neun (81%) Proben *Shh* (+) und alle Proben *Gli1* (+). Aufgrund der starken Expression von *Shh* und *Gli1* in den Tumorzellen scheint eine Liganden (*Shh*)-abhängige, kanonische Aktivierung der *Shh*-Signalkaskade in kraniellen und spinalen Chordomen und deren Rezidiven denkbar zu sein. Ob hierfür ein auto- und/ oder parakriner Mechanismus zuständig ist, kann nicht vollständig abgeleitet werden. Bei einer potentiellen parakrinen Aktivierung korreliert die Liganden (*Shh*)-Expression in den Tumorzellen mit einer erhöhten Expression von *Ptch1* und *Gli1* in den benachbarten Stromazellen (Theunissen und Sauvage 2009), welche in dieser Versuchsreihe nicht zu erkennen war. Während der *in situ*-Hybridisierung wurde die Expression von *Ptch1* und *Gli1* lediglich im Kern der Tumorzellen, nicht in den umliegenden Stromazellen, beobachtet. Eine mögliche autokrine Aktivierung ist daher sehr naheliegend. Ein intrinsischer, Liganden (*Shh*)-unabhängiger Weg ist aufgrund der vorliegenden hohen *Shh*-Expression in den Primärtumoren und ersten Rezidiven nicht zu erwarten (Teglund und Toftgård 2010). Da auch gleichzeitig *Gli1* in allen untersuchten Proben positiv war, scheint *Shh* als Ligand die Kaskade und somit auch die Transkription des Faktors *Gli1* zu aktivieren. Ferner müsste man zum Ausschluss einer möglichen *Ptch*-Fehlfunktion durch gezielte DNA-Sequenzierung die Chordomproben auf bekannte Mutationen weiter untersuchen (Shendure und Ji 2008). Somit ist ein nicht kanonischer Ablauf der *Hh*-Signalkaskade bei Chordomen, der möglicherweise parallel zum

klassischen *Shh*- Signalweg aktiv ist und mit diesem interagiert (Gu und Xie 2015; Jenkins 2009), nicht auszuschließen (Singh et al. 2011).

4.2. Einsatz von *Hh*- Signalweg- Inhibitoren in der Tumorthherapie

In den letzten Jahren wurde durch die bereits bekannte Beteiligung der *Hh*- Signalkaskade an der Tumorgenese eine besondere Priorität auf die Forschung und Erstellung von Substanzen gesetzt, die diesen Signalweg therapeutisch inhibieren können.

Für eine effektive Blockade sind mehrere Schlüsselpositionen im aktiven Ablauf denkbar (Abbildung 8). Die erste Möglichkeit ist das Unterdrücken der Bindung vom *Shh*- Ligand an seinen Rezeptor *Ptch1*. Neben dem *Hh*- Antikörper 5E1 ist Robotnikinin, ein synthetisch hergestelltes Molekül, für einen inhibitorischen Einfluss auf die weiterführende Signalkaskade durch extrazelluläre Bindung an *Shh* bekannt (Hassounah et al. 2012; Stanton et al. 2009). Es besteht ferner die Möglichkeit, den *Shh*- Liganden in seiner Funktion zu hemmen und somit die Bindung an den Rezeptor *Ptch1* zu verhindern (Petrova et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit bietet die Hemmung des *Smo*- Proteins (Hyman et al. 2009). Sogenannte *Smo*- Inhibitoren, wie unter anderem Cyclopamin oder Vismodegib, werden derzeit aufgrund vielversprechender präklinischer Ergebnisse in klinischen Studien zur Bekämpfung von Medulloblastomen und Basalzellkarzinomen als Monotherapie eingesetzt (Justilien und Fields 2015; Rudin et al. 2009; Stanton und Peng 2010; von Hoff et al. 2009). Die letzte Option beläuft sich auf die Aktivitätshemmung von *Gli*. Das kann indirekt über Inhibition des *Smo*- Transports (HPI-1-4) und direkt durch Bindungsstörung von *Gli* an den Promotor (GANT 58, GANT 61) erfolgen (Agyeman et al. 2014; Hassounah et al. 2012; Hyman et al. 2009; Lauth und Toftgård 2007).

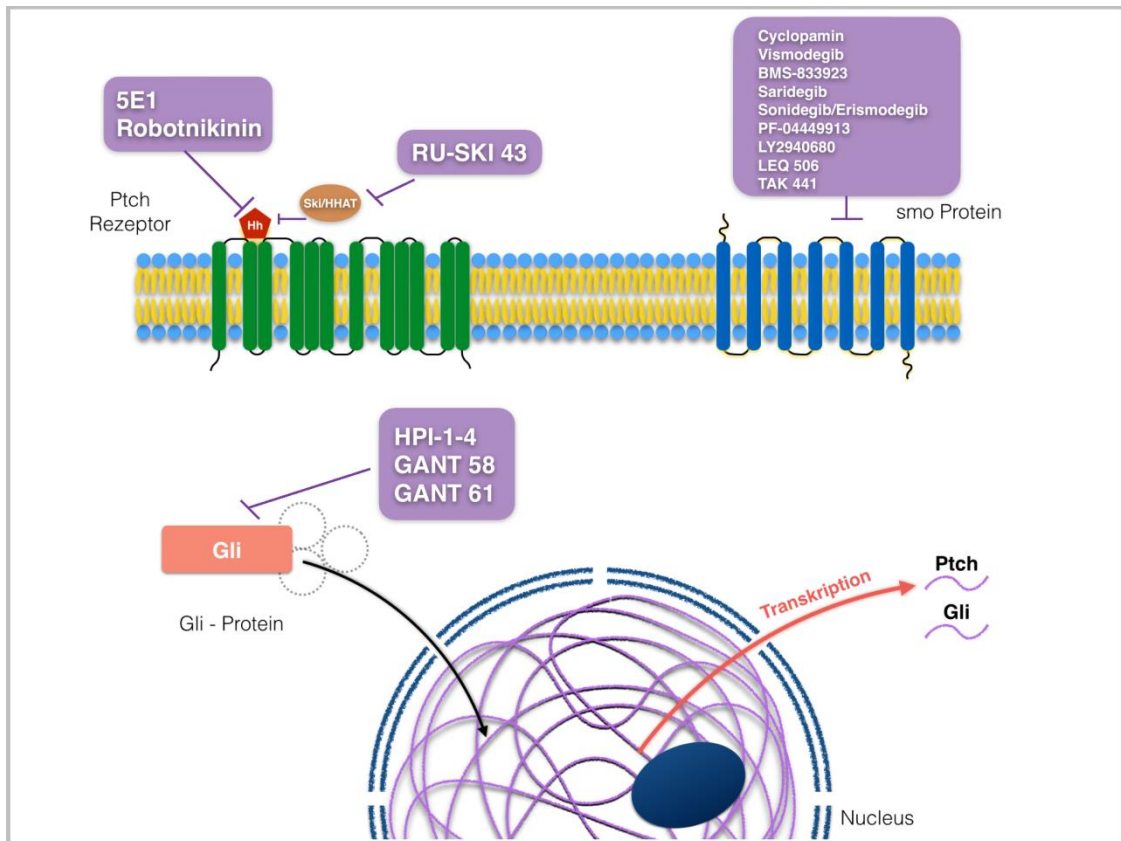


Abbildung 8: Schlüsselpositionen der *Hh*- Signalkaskade-Inhibitoren (modifiziert nach Justilien und Fields 2015, S. 507).

Robotnikinin und *Hh*- Antikörper 5E1 inhibieren die Bindung des Liganden *Hh* an seinen Rezeptor *Ptch1*, während RU-SKI 43 den *Hh*- *Ptch*- Verbund durch Ski/ HHAT-Inhibition verhindert. Cyclopamin, Vismodegib und weitere Moleküle wirken inhibierend auf die Signalkaskade durch die Hemmung von *Smo*. Eine Aktivitätshemmung von *Gli* wird mittels HPI-1-4, GANT 58 und GANT 61 erreicht.

Aufgrund der hohen *Shh*- und *Gli1*- Expression in allen untersuchten Chordomproben lassen die vorliegenden Ergebnisse eine Liganden- abhängige, kanonische Aktivierung der *Shh*- Signalkaskade in kraniellen und spinalen Chordomen sowie deren Rezidiven vermuten (Kapitel 4.1.). Ein Unterdrücken der Bindung des Liganden *Shh* an *Ptch1* durch 5E1, Robotnikinin oder RU-SKI 43 könnte in unseren untersuchten Chordomen somit eine Tumorprogression potentiell stoppen. Blotta et. al. diskutieren einen gleichzeitigen Einsatz von *Gli*- und *Smo*- Inhibitoren als wirkungsvollere Kombinationstherapie beim multiplen Myelom, um die *Hh*- Signalkaskade an mehreren Schnittstellen zu inhibieren (Blotta et al. 2012). Basierend auf unseren Ergebnissen könnte der Einsatz von *Gli*- Inhibitoren wie GANT 58, GANT 61 und HPI-1-4, die direkt am Zielprotein wirken, ein weiteres Tumorstadium der Chordome möglicherweise verhindern. Auch die indirekte Hemmung von

Gli durch *Smo*-Inhibitoren könnte die aktive *Hh*- Signalkaskade möglicherweise unterbrechen und wäre genauer zu untersuchen (Agyeman et al. 2014; Gu und Xie 2015; Jenkins 2009).

4.3. Limitationen der Arbeit

Die Gesamtzahl von 20 untersuchten Patienten lässt keine endgültige Schlussfolgerung zu, welche durch die ausgesprochen niedrige Inzidenz der kraniellen und spinalen Chordome zu erklären ist. Da eine Vielzahl der untersuchten Tumormaterialien über einen längeren Zeitraum routinemäßig in Paraffin eingebettet worden war, konnte eine strikte RNase- freie Behandlung erst ab dem Zeitpunkt der Untersuchungen gewährleistet werden. Daher sind mögliche „falsch negative Ergebnisse“ bei der *in situ*- Hybridisierung denkbar.

5. Zusammenfassung

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Vermutung zu, dass die *Hh*- Signalkaskade auch bei kraniellen und spinalen Chordomen sowie deren Rezidiven eine wichtige Rolle spielt. Aufgrund der hohen *Shh*- und *Gli1*- Expression in allen untersuchten Chordomproben suggeriert die Studie eine mögliche autokrine Liganden- abhängige Aktivierung der kanonischen *Hh*- Signalkaskade. Ein nicht kanonischer, aber auch ein parakriner Mechanismus, die möglicherweise parallel ablaufen und zur Tumorprogression führen, ist aufgrund unserer Ergebnisse ebenfalls denkbar.

Eine Chemotherapie mit *Hh*- Inhibitoren - im Sinne von *Shh*-, *Gli*- und *Smo*- Inhibitoren - könnte einen therapeutischen Ansatz bei vielen Chordompatienten mit mehrfachen Rezidiven darstellen. Die Durchführung einer multizentrischen Studie wäre daher sinnvoll.

6. Anhang

6.1. Patientenkollektiv und Tumormaterialübersicht

Tabelle 9: Patientenkollektiv und Tumormaterialübersicht der Patienten mit kraniellen Chordomen (n= 12). Von acht (67 %) Patienten war brauchbares Tumormaterial vorhanden (14 Tumorblöcke, davon sieben Primärtumoren, fünf erste Rezidive und zwei zweite Rezidive). Legende: ED= Erstdiagnose; J.= Jahre; Geschl.= Geschlecht; w= weiblich; m= männlich; PT= Primärtumor; Rez.= Rezidiv, OP= Operation; TR= Teilresektion.

	Alter bei ED	Ge- schl.	Lokalisation	ED	PT	1. Rez.	2. Rez.	1. OP	2. OP	3. OP	Radiatio
1.	89 J.	w	Fossa cranii anterior	1998	ja	-	-	1998	-	-	- abgelehnt
2.	38 J.	w	Clivus	2001	ja	ja	-	2001	2001	-	Post 2. OP
3.	37 J.	m	Clivus	1998	ja	-	-	1998 (TR)	1998	-	Post 2. OP
4.	25 J.	w	Clivus	2002	-	ja	-	2002 (alio loco)	2002	-	Post 2. OP
5.	66 J.	w	Sella turcica	1995	ja	ja	-	1995	2003	-	- abgelehnt
6.	10 J.	m	Clivus	1998	ja	-	-	1998 (TR)	1998	-	Post 2. OP
7.	56 J.	m	Clivus	1985	-	ja	ja	1985	1988	1988	Post 3. OP
8.	72 J.	m	Clivus	1997	ja	-	-	1997	-	-	Post 1. OP
9.	36 J.	w	Clivus	1982	ja	ja	ja	1982	1984	1985	Post 1. OP
10.	70 J.	w	Cerebellum	1983	ja	-	-	1983	-	-	Post 1. OP
11.	24 J.	m	Basis cranii anterior	1985	ja	-	-	1985	-	-	Post 1. OP
12.	98 J.	m	Clivus	2003	ja	-	-	2003	-	-	Post 1. OP

Tabelle 10: Patientenkollektiv und Tumormaterialübersicht der Patienten mit spinalen Chordomen (n= 8). Von sechs (75 %) Patienten war brauchbares Tumormaterial vorhanden (18 Tumorblöcke, davon zwölf Primärtumoren und sechs erste Rezidive).

Legende: ED= Erstdiagnose; J.= Jahre; Geschl.= Geschlecht; w= weiblich; m= männlich; PT= Primärtumor; L= Lumbal; Th= Thorakal; S= Sakral; PT= Primärtumor; Rez.= Rezidiv, OP= Operation; TR= Teilresektion.

	Alter bei ED	Geschl.	Lokalisation	ED	PT	1. Rez.	2. Rez.	1. OP	2. OP	3. OP	Radiatio
1.	66 J.	w	WS L5	1999	ja	ja	-	1999	2003	-	Post 1. OP
2.	18 J.	m	WS (Th2/ 3)	1990	-	ja	-	1990 (alio loco)	1993	-	Post 1. OP
3.	46 J.	m	WS (S3- 5)	1987	ja	ja	-	1987	1988	-	Post 2. OP
4.	53 J.	w	WS (Sakral)	2010	ja	-	-	2010	-	-	Post 1. OP
5.	63 J.	m	WS (Sakral)	2010	ja	ja	-	2010 (TR)	2010	-	Post 2. OP
6.	64 J.	w	WS (L4)	1992	ja	-	-	1992	-	-	Post 1. OP
7.	80 J.	w	WS (L1/ L2)	1993	ja	-	-	1993	-	-	Post 1. OP
8.	62 J.	w	WS (Sakral)	1997	-	ja	-	1997 (alio loco)	2007	-	Post 1. OP

6.2. Aktenzeichen der Ethikkommission

Das Aktenzeichen des Ethikkommissionsvotums für dieses Studiendesign lautet 1/11/15.

6.3. Laborgeräte

-80°C Schrank	Sanyo Sales & Marketing GmbH, München
Feinwaagen	Sartorius AG, Göttingen
Heißluftsterilisator	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Heizplatte	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Hochdrucksterilisator	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Hybridisierungs-ofen	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Kamera Olympus DP71	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Mikroskop Olympus BX51	Olympus Europa GmbH, Hamburg
pH-Meter	Sartorius AG, Göttingen
Reinstwassersystem	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Schlittenmikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar
Vortexer	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf AG, Hamburg

6.4. Gebrauchswaren

Deckgläser	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Dispensionspipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Färbekästen nach Hellendahl	Schott AG, Mainz
Folded Filter	GE Healthcare, Freiburg
Objektträger	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellstofftupfer	Fuhrmann GmbH, Much

6.5. Chemikalien und Reagenzien

Anti- Digoxigenin Fab fragments/ AP- Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 11093274910
Aquatex	Merck KgaA, Darmstadt, No. 1.08562.0050
BBR (Boehringer Blocking Reagent)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 11096176001
BCIP (5- Bromo- 4- Chloro- 3- Indolyl- Phospat)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 11585002001
CaCl ₂ + 2 H ₂ O	Fluka Chemie GmbH, Buchs, 21098
Chloroform	Merck KgaA, Darmstadt, No. 1.02445.100
Citronensäure Monohydrat	Merck KgaA, Darmstadt, No. 1.00244.0500
Deionisiertes Formamid	Merck KgaA, Darmstadt, No. 1.09684.1000
Denhardt's Solution	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D2532
Dextran 50 %	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D8906
Dig RNA Labeling Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 11 277 073 910
DMFA (Dimethylformamid)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D4551
DMPC (Dimethylpyrocarbonat)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D5520
Eisessig 100 %	Merck KgaA, Darmstadt, 1.00063.1000
Essigsäureanhydrid (Reagent Plus)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, 3.201.02
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt, No. 1.000583.2500
FCS (Fetal Calf Serum)	Biochrom Ag, Berlin, Cat. No. 50015
Formamid	Merck KgaA, Darmstadt, No. 1.09684.1000
Glycergel Mounting Medium	Dako GmbH, Hamburg, REF C0563 LOT 10064606
H ₂ O ₂ 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, A2473, 1000
HCl 1 M	Merck KgaA, Darmstadt, 109057.1000
Immu- Mount	Shandon, Frankfurt, 198569
Lachs- Sperma DNA Natriumsalz 1 g	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, 9002-49-2
Mayers Hämalaunlösung	Merck KgaA, Darmstadt, 1.09249.0500)
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, 1112180835
Natriumacetat- Trihydrat	Merck KgaA, Darmstadt, 1.06267.1000
Natriumcitrat	Merck KgaA, Darmstadt, 1.06448.1090
NaCl (Natriumchlorid)	Merck KgaA, Darmstadt, No. 1.06404.100
Natriumhydroxid Pellets	Merck KgaA, Darmstadt, No. 1.06482.1000

Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, No. 4360.2
NBT (Nitrotetrazolium Blue Chloride)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, 6876
Nylonmembran	Hybond- XL, Amersham, RPN 203S
PBS (Phosphate Buffered Saline)	AppliChem GmbH, Darmstadt, A0965, 9050
PFA (Paraformaldehyd)	Merck KgaA, Darmstadt, 1.04005.1000
Proteinase K	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, No. P2308
RNase AWAY™	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, A998.1
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, 4855.2
Triton X- 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, A.3051.2
Tropix I- Block	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, T2015
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, No. 9127.2
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co.KG, Renningen, No. 326.2500

6.6. Stammlösungen

Tabelle 11: Stammlösungen

10 x NaCl	87,66 g	NaCl
	1000 ml	DMPC- H ₂ O
20 x SSC (pH 7,0)	175,3 g	NaCl
	88,2 g	NaCitrat
	1000 ml	Aqua dest.
Acetatpuffer (pH 5,2)	300 ml	Lösung A
	700 ml	Lösung B
AEC- Stammlösung	12,5 g	3- Amino-9 Ethylcarbazol
	250 ml	Dimethylformamid
AEC- Färbelösung	56 ml	Acetatpuffer pH 5,2
	4 ml	AEC-Stammlösung
	20 µl	30 % H ₂ O ₂
Anti- Digoxigenin Fab fragments/ AP-Mix (1:250)	6,5 µl	Anti- Digoxigenin Fab fragments/ AP
	1560 µl	Block-Mix
BBR- Puffer 0,1 % (pH 7,5)	0,5 g	BBR
	40 ml	DMPC- H ₂ O
	5 ml	10 x NaCl,
	5 ml	Tris
BCIP	1 g	BCIP
	20 ml	DMFA 100 %
Block- Mix	1357 µl	BBR
	156 µl	FCS
	47 µl	Humanes Serum
CaCl₂ + 2 H₂O	1,47 g	CaCl ₂ + 2 H ₂ O
	100 ml	DMPC- H ₂ O
Casein 0,2 %	1 g	Tropix I- Block
	500 ml	PBS
	500 µl	Tween 20
Citrat pH 6,0	2,1 g	Zitronensäure- Monohydrat
	3 Pellets	Natriumhydroxid- Pellets
	1000 ml	Aqua dest.
Dextran 50 %	5 g	Dextran
	10 ml	DMPC- H ₂ O
DMPC- H₂O	1 ml	DMPC
	1000 ml	Aqua dest.
Essigsäureanhydrid 0,5 %	225 µl	Essigsäureanhydrid
	45 ml	Tris-Puffer 0,1 M, pH 8,0
HCL 0,2 M	10 ml	HCL 1 M
	40 ml	DMPC- H ₂ O
Hybridisierungspuffer (1: 500 Sondenkonzentration)	2 ml	20 x SSC
	200 µl	50 x Denhardts
	1,8 ml	DMPC- H ₂ O

	4 ml	Formamid
	2 ml	Gelöstes Dextransulfat
Lösung A	5,75 ml	Eisessig
	1000 ml	Aqua dest.
Lösung B	13,61 g	Natriumacetat- Trihydrat
	1000 ml	Aqua dest.
NBT	75 mg	NBT
	1 ml	DMFA 70 %
NBT/ BCIP- NTM- Substratpuffer	225 µl	BCIP
	175 µl	NBT
	50 ml	NTM- Substratpuffer
NTM- Substratpuffer	2 ml	NaCl 5 M
	5 ml	MgCl ₂ 1 M
	10 ml	Tris 1 M, pH 9,5
	33 ml	Aqua bidest.
PBS- Puffer	9,6 g	PBS
	1000 ml	Aqua dest.
Proteinase K- Puffer	800 µl	CaCl ₂
	357 µl	Protein K- Stocklösung
	34,2 ml	TBS
SDS 10 %	10 g	Natriumlaurylsulfat
	100 ml	DMPC- H ₂ O
Sörensenpuffer (pH 7,4)	1 l	DMPC- H ₂ O
	28,464 g	HNa ₂ O ₄ P x 2 H ₂ O
	5,516 g	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
TBS- Puffer	100 ml	10 x NaCl
	50 ml	Tris 1 M, pH 7,5
	850 ml	DMPC-H ₂ O
TBS/ 0,1 % Triton X- 100	1 ml	Triton X- 100
	1000 ml	Aqua dest.
TRIS- Puffer 0,1 M, pH 8,0	1 l	DMPC- H ₂ O
	12,11 g	Tris/ HCl
TRIS- Puffer 1 M, pH 7,5	1 l	DMPC- H ₂ O
	121,1 g	Tris/ HCl
TRIS- Puffer 1 M, pH 9,5	1 l	DMPC- H ₂ O
	121,1 g	Tris/ HCl
Waschpuffer I	141 ml	DMPC- H ₂ O
	1,5 ml	10 % SDS
	7,5 ml	20 x SSC
Waschpuffer II	98 ml	DMPC- H ₂ O
	1 ml	10 % SDS
	1 ml	20 x SSC

7. Literaturverzeichnis

Agyeman A, Jha BK, Mazumdar T, Houghton JA (2014):

Mode and specificity of binding of the small molecule GANT61 to GLI determines inhibition of GLI-DNA binding. *Oncotarget* 5, 4492–4503

al-Mefty O, Borba LA (1997):

Skull base chordomas: a management challenge. *J Neurosurg* 86, 182–189

Andoniadou CL, Gaston-Massuet C, Reddy R, Schneider RP, Blasco MA, Le Tissier P, Jacques TS, Pevny LH, Dattani MT, Martinez-Barbera JP (2012):

Identification of novel pathways involved in the pathogenesis of human adamantinomatous craniopharyngioma. *Acta Neuropathol* 124, 259–271

Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A et al. (2007):

Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* 25, 2524–2533

Berman DM, Karhadkar S, Maitra A, Montes de Oca R, Gerstenblith, Briggs K, Parker A, Shimada Y, Eshleman, JR., Watkins D et al. (2003):

Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 425, 846–851

Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP (1996):

Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6, 298–304

Blotta S, Jakubikova J, Calimeri T, Roccaro AM, Amodio N, Azab AK, Foresta U, Mitsiades CS, Rossi M, Todoerti K et al. (2012):

Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 120, 5002–5013

Briscoe J, Théron PP (2013):

The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 416–429

Cates JM, Itani DM, Coffin CM, Harfe BD (2010):

The sonic hedgehog pathway in chordoid tumours. *Histopathology* 56, 978–979

Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996):

Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413

Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DYS, Reiter JF (2005):

Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature* 437, 1018–1021

Di Maio S, Temkin N, Ramanathan D, Sekhar LN (2011):

Current comprehensive management of cranial base chordomas: 10-year meta-analysis of observational studies. *J Neurosurg* 115, 1094–1105

Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo G, Veelken H, Engelhardt M, Mertelsmann R, Kelleher JF et al. (2007):

Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med* 13, 944–951

Dormoy V, Danilin S, Lindner V, Thomas L, Rothhut S, Coquard C, Helwig J, Jacqmin D, Lang H, Massfelder T (2009):

The sonic hedgehog signaling pathway is reactivated in human renal cell carcinoma and plays orchestral role in tumor growth. *Mol Cancer* 8, 123

Fletcher C:

WHO classification of tumours of soft tissue and bone (World Health Organization classification of tumours). 4. Auflage; IARC Press, Lyon 2013

Freier K, Pungs S, Flechtenmacher C, Hofele C (2009):

Aktivierung des Sonic-hedgehog-Signalwegs in keratozystischen odontogenen Tumoren: HNO. *HNO* 57, 345–350

Freyschmidt J, Ostertag H, Jundt G, Freyschmidt-Ostertag-Jundt:

Knochtumoren mit Kiefertumoren: Klinik, Radiologie, Pathologie. 3. Auflage; Springer, Berlin 2010

Gu D, Xie J (2015):

Non-Canonical Hh Signaling in Cancer-Current Understanding and Future Directions. *Cancers* 7, 1684–1698

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S et al. (1996):

Mutations of the Human Homolog of Drosophila patched in the Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Cell* 85, 841–851

Han S, Polizzano C, Nielsen GP, Hornicek FJ, Rosenberg AE, Ramesh V (2009):

Aberrant hyperactivation of akt and Mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in sporadic chordomas. *Clin Cancer Res* 15, 1940–1946

Hassounah NB, Bunch TA, McDermott KM (2012):

Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling. *Clin Cancer Res* 18, 2429–2435

Holtz AM, Peterson KA, Nishi Y, Morin S, Song JY, Charron F, McMahon AP, Allen BL (2013):

Essential role for ligand-dependent feedback antagonism of vertebrate hedgehog signaling by PTCH1, PTCH2 and HHIP1 during neural patterning. *Development* 140, 3423–3434

Hooper JE, Scott MP (2005):

Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 306–317

Hui C, Angers S (2011):

Gli Proteins in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 513–537

Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, Sun M, Rack PG, Sinha S, Wu JJ et al. (2009):

Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14132–14137

Incardona JP, Gruenberg J, Roelink H (2002):

Sonic Hedgehog Induces the Segregation of Patched and Smoothed in Endosomes. *Curr Biol* 12, 983–995

Jenkins D (2009):

Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal* 21, 1023–1034

Justilien V, Fields AP (2015):

Molecular pathways: novel approaches for improved therapeutic targeting of Hedgehog signaling in cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 21, 505–513

Kappler R:

Zur Rolle der Hedgehog-Signalkaskade bei der Tumorentstehung. *Med. Habil. -Schr. Göttingen* 2006

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA (2004):

Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 431, 707–712

Kasper M, Regl G, Frischauf A, Aberger F (2006):

GLI transcription factors: Mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer* 42, 437–445

Katoh Y, Katoh M (2006):

Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review). *Int J Mol Med* 18, 1019–1023

Kim J, Kato M, Beachy PA (2009):

Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothened in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21666–21671

Kozmikova I, Candiani S, Fabian P, Gurska D, Kozmik Z (2013):

Essential role of Bmp signaling and its positive feedback loop in the early cell fate evolution of chordates. *Dev Biol* 382, 538–554

Kubo M (2004):

Hedgehog Signaling Pathway is a New Therapeutic Target for Patients with Breast Cancer. *Cancer Res* 64, 6071–6074

Lang G:

Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2. Auflage; Springer, Wien 2013

Lauth M, Toftgård R (2007):

Non-canonical activation of GLI transcription factors: implications for targeted anti-cancer therapy. *Cell Cycle* 6, 2458–2463

Lin TL, Wang QH, Brown P, Peacock C, Merchant AA, Brennan S, Jones E, McGovern K, Watkins DN, Sakamoto KM et al. (2010):

Self-renewal of acute lymphocytic leukemia cells is limited by the Hedgehog pathway inhibitors cyclopamine and IPI-926. *PloS one* 5, 15262

Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn N, Jackson KW, Suri P, Wicha MS (2006):

Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 66, 6063–6071

Low JA, Sauvage FJ de (2010):

Clinical Experience With Hedgehog Pathway Inhibitors. *J Clin Oncol* 28, 5321–5326

Mendenhall WM, Mendenhall CM, Lewis SB, Villaret DB, Price Mendenhall N (2005):

Skull base chordoma. *Head Neck* 27, 159–165

Mülhardt C:

Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. 7. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980):

Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795–801

Nybakken K, Perrimon N (2002):

Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Gen Dev* 12, 503–511

Ok CY, Singh RR, Vega F (2012):

Aberrant activation of the hedgehog signaling pathway in malignant hematological neoplasms. *Am J Pathol* 180, 2–11

Omenetti A, Choi S, Michelotti G, Diehl AM (2011):

Hedgehog signaling in the liver. *J Hepatol* 54, 366–373

Petrova E, Rios-Esteves J, Ouerfelli O, Glickman JF, Resh MD (2013):

Inhibitors of Hedgehog acyltransferase block Sonic Hedgehog signaling. *Nat Chem Biol* 9, 247–249

Ptaszyński K, Szumera-Ciećkiewicz A, Owczarek J, Mrozkowiak A, Pekul M, Barańska J, Rutkowski P (2009):

Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in chordoma. *Pol J Pathol* 60, 81–87

Rahnama F, Toftgård R, Zaphiropoulos PG (2004):

Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J* 378, 325–334

Razzaque MS, Soegiarto DW, Chang D, Long F, Lanske B (2005):

Conditional deletion of Indian hedgehog from collagen type 2alpha1-expressing cells results in abnormal endochondral bone formation. *J Pathol* 207, 453–461

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, 43–51

Romeis B:

Mikroskopische Technik. 18. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, München, Wien 2010

Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B et al. (2009):

Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 361, 1173–1178

Rüschoff J, Nagelmeier I, Hofmann M, Henkel T, Stoss O (2009):

Aktuelles zur ErbB2-Diagnostik beim Mammakarzinom. *Pathologe* 30, 147–155

Ryan KE, Chiang C (2012):

Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates. *J Biol Chem* 287, 17905–17913

Satoh N, Tagawa K, Takahashi H (2012):

How was the notochord born? *Evol Dev* 14, 56–75

Schulz-Ertner D, Nikoghosyan A, Thilmann C, Haberer T, Jäkel O, Karger C, Kraft G, Wannenmacher M, Debus J (2004):

Results of carbon ion radiotherapy in 152 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 631–640

Seifert G, Donath K (1998):

Kraniale und zervikale Chordome. *MKG* 2, 153–159

Shah DK, Hager-Theodorides AL, Outram SV, Ross SE, Varas A, Crompton T (2004):

Reduced thymocyte development in sonic hedgehog knockout embryos. *J Immunol* 172, 2296–2306

Shendure J, Ji H (2008):

Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1135–1145

Singh S, Wang Z, Liang Fei D, Black KE, Goetz JA, Tokhunts R, Giambelli C, Rodriguez-Blanco J, Long J, Lee E et al. (2011):

Hedgehog-producing cancer cells respond to and require autocrine Hedgehog activity. *Cancer Res* 71, 4454–4463

Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G, Pietsch T, Wicking C, Wainwright BJ (1999):

Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet* 8, 291–297

Stacchiotti S, Sommer J (2015):

Building a global consensus approach to chordoma: a position paper from the medical and patient community. *Lancet Oncol* 16, 71–83

Stanton BZ, Peng LF (2010):

Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mol Biosyst* 6, 44–54

Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, Nakai K, Wang X, Duffner JL, Taveras KM, Hyman JM, Lee SW, Koehler AN et al. (2009):

A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol* 5, 154–156

Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz i Altaba A (2007):

Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5895–5900

Steg AD, Katre AA, Bevis KS, Ziebarth A, Dobbin ZC, Shah MM, Alvarez RD, Landen CN (2012):

Smoothed Antagonists Reverse Taxane Resistance in Ovarian Cancer. *Mol Cancer Ther* 11, 1587–1597

Sun X, Hornicek F, Schwab JH (2015):

Chordoma: an update on the pathophysiology and molecular mechanisms. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 344–352

Svärd J, Heby-Henricson K, Henricson KH, 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, 187–197

Teglund S, Toftgård R (2010):

Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1805, 181–208

Theunissen J, Sauvage FJ de (2009):

Paracrine Hedgehog Signaling in Cancer. *Cancer Res* 69, 6007–6010

Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom L, Toftgård R, Undén AB (2006):

Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol* 208, 17–25

Tzortzidis F, Elahi F, Wright D, Natarajan SK, Sekhar LN (2006):

Patient outcome at long-term follow-up after aggressive microsurgical resection of cranial base chordomas. *Neurosurgery* 59, 230–237

Varjosalo M, Li S, Taipale J (2006):

Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between *Drosophila* and mammals. *Dev Cell* 10, 177–186

Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, Ruiz i Altaba A (2009):

Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med* 1, 338–351

von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Yauch RL, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, Hann CL, Brahmer JR et al. (2009):

Inhibition of the Hedgehog Pathway in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 361, 1164–1172

Wacker A, Stadler P, Pless M (2002):

Chordome - diagnostische Schritte und therapeutische Konsequenzen. *Dtsch med Wochenschr* 127, 1774

Walcott BP, Nahed BV, Mohyeldin A, Coumans J, Kahle KT, Ferreira MJ (2012):

Chordoma: current concepts, management, and future directions. *Lancet Oncol* 13, 69–76

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB (2003):
Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer.
Nature 422, 313–317

Wen X, Lai CK, Evangelista M, Hongo J, Sauvage FJ de, Scales SJ (2010):
Kinetics of hedgehog-dependent full-length Gli3 accumulation in primary cilia and subsequent degradation. Mol Cell Biol 30, 1910–1922

Yang L, Xie G, Fan Q, Xie J (2010):
Activation of the hedgehog-signaling pathway in human cancer and the clinical implications. Oncogene 29, 469–481

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Veit Rohde, Klinik für Neurochirurgie, für die Überlassung des Themas und Herrn PD Dr. med. Reza Akhavan-Sigari, Klinik für Neurochirurgie, für die fachliche, umfangreiche und hilfsbereite Betreuung und für die Gespräche und Anregungen während des gesamten Zeitraums.

Herrn PD Dr. med. Walter Schulz-Schaeffer, Institut für Neuropathologie, danke ich für seine wissenschaftliche Unterstützung, das Ermöglichen der Laborversuche und das entgegenbrachte Interesse an meiner Arbeit. Zudem danke ich Herrn Dr. med. Arne Wrede für die hilfsbereite Unterstützung.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. med. Heidi Hahn, Frau Dr. rer. nat. Frauke Nitzki und Frau Dr. rer. nat. Penelope Pelczar für die hilfsbereite, fachliche Unterstützung und für die Bereitstellung der *in situ*-Hybridisierungssonden.

Ein weiterer großer Dank gilt Frau Manuela Becker, Frau Tatjana Pfander, Frau Kerstin Brekerbohm, Frau Katja Schulz und Frau Kerstin Lorentsen für die gute Zusammenarbeit, gründliche Einarbeitung in alle Labortätigkeiten und guten Ratschläge.