Universität Ulm Institut für Pathologie Direktor: Prof. Dr. med. Peter Möller

Etablierung eines Chordom-Kollektivs und Analyse von Chordom-Zelllinien inklusive Definition eines Responder-Phänotyps für eine Inhibition des CDK4/CDK6 Signalwegs

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Adrian von Witzleben geboren in Konstanz vorgelegt im Jahr 2015

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. T. Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. T. Barth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Barth
Tag der Promotion:	22.06.2017

Die Dissertation widme ich meinem Bruder Lenard.

"Ein Weg entsteht, indem man ihn geht."

Chinesisches Sprichwort

Inhaltsverzeichnis

Ab	kürzung	sverzeichnis	VI
1	E	inleitung	1
	1.1.1	Definition und Fakten	1
	1.1.2	Biologische Aspekte	2
	1.1.3	Histogenetische Aspekte	2
	1.1.4	Klinische und morphologische Präsentation	4
	1.1.5	Chordom- <i>in-vitro</i> -Modelle	5
	1.1.6	Chordoma Foundation	6
	1.1.7	Therapie	7
	1.1.8	Risikostratifikation	8
	1.1.9	Ziele meiner Arbeit	9
2	Ν	laterial und Methoden	10
:	2.1 N	laterial	10
	2.1.1	Reagenzien	10
	2.1.2	Puffer/Lösungen/Medien	13
	2.1.3	Geräte	16
	2.1.4	Software	18
	2.1.5	Weitere Produkte	19
	2.1.6	Antikörper	20
	2.1.7	Zelllinien	21
	2.2 N	1ethoden	22
	2.2.1	Kollektiverstellung	22
	2.2.2	Statistik	23
	2.2.3	Etablierung von Chordom-Zelllinien	24
	2.2.4	Zelllinien Propagation	27
	2.2.5	Zellzählung mit der überarbeiteten Neubauer Zählkammer	28
	2.2.6	Zellzählung und fotografische Archivierung	28
	2.2.7	Kryoasservierung von Zellkulturen	29
	2.2.8	Anlage eines Paraffinblocks aus einer Zellkultur	29
	2.2.9	RNA-Extraktion	29
	2.2.10	Zellzyklus-Analyse mittels Fluorescence-activated-cell-sorting	31
	2.2.11	Protein-Extraktion	32
	2.2.12	Western Blot	33
	2.2.13	AlamarBlue	35
	2.2.14	MTS-Zellproliferations-Assay	36
	2.2.15	STR-Analyse	36
	2.2.16	FISH-Analyse (Fluorescence- <i>in-situ</i> -Hybridization)	37
	2.2.17	Immunhistochemie	37
	2.2.18	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	40
	2.2.19	Azan-Färbung	40
	2.2.20	Microarray basierte Gen-Expressions-Analyse	40
	2.2.21	Inhibition mit Palbociclib (PD-0332991)	41
	2.2.22	Inhibition mit Abemaciclib (Ly2835219)	42

3		Ergebnisse	. 43
	3.1	Chordom-Kollektiv	. 43
	3.1.1	Deskriptive Statistik	. 43
	3.1.2	Histologie	. 44
	3.1.3	Immunhistologie	. 46
	3.1.4	Metastasen und Rezidive	. 48
	3.1.5	Überleben und Therapie	. 48
	3.1.6	Korrelation von histopathologischen Parametern mit den klinischen Daten	. 50
	3.2	Chordom-Zelllinien	. 55
	3.2.1	Charakterisierung von Chordom-Zelllinien	. 55
	3.2.2	Analyse des CDK4/CDK6 Signalwegs in den Chordom-Zelllinien	. 64
	3.2.3	Inhibition der Chordom-Zelllinien mit Palbociclib	. 67
	3.2.4	Definition eines potentiellen Responder-Phänotyps für die Palbociclib-	
	Inhik	bition	. 74
4		Diskussion	. 77
	4.1	Chordom-Kollektiv	. 77
	4.2	Chordom-Zelllinien. Wachstumsinhibition und Definition von potentiellen	
		Responder-Phänotypen	. 80
5		Zusammenfassung	. 85
6		Literaturverzeichnis	. 86
~	ankaan		IV
υ	anksagi	ung	IA
Le	ebensla	uf	X
Ei	igene V	orträge und Publikationen	XI
	Gehalte	ene Vorträge	XI
	Veröffe	ntlichte Arbeiten und urheberrechtliche Genehmigungen	XII

Abkürzung Erklärung °C Grad Celsius Α Ampere AACR American Association for Cancer Research AP Alkalische Phosphatase ATCC American Type Culture Collection BSA N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid BWK Brustwirbelkörper c-met HGFR; Hepatozyten Wachstumsfaktor Rezeptor CD Cluster of differentiation CDK4 Cyclin-abhängige Kinase 4 CDK6 Cyclin-abhängige Kinase 6 CDKN2A (p16) Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2 A (Gen) **cDNA** copy-Desoxyribonukleinsäure CGH **Comparative Genome Hybridization** (komparative genomische Hybridisierung) ChipSeq Chromatin Immuno-Precipitation DNA-Sequencing Zentimeter cm cm^2 Quadratzentimeter cRNA Copied RNA; kopierte RNA CTP Cytidintriphosphat DAPI Diamindinophenylindol DMSO Dimethylsulfoxid Desoxyribonukleinsäure DNA dNTP Desoxynukleotidtriphosphat DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DTT Dithiothreitol dTTP Desoxythymidintriphosphat dUTP Desoxyuridintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF2	Elongationsfaktor 2
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	Epitheliales Membranantigen
et al.	Et alii/et aliae (und andere)
FACS	Fluoreszence-activated-cell-sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluorescence-in-situ-Hybridisation
g	Gramm
G-Phase	Gap-Phase im Zellzyklus
GEO	Gene Expression Omnibus
Gli1	Protein des Hedgehog Signalwegs
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin Färbung
НЕК	"Human Embryonic Kidney"-Zelllinie
HeLa	"Henrietta Lacks"-Zelllinie
HPR	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
НЖК	Halswirbelkörper
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
ICC	Immunzytochemie
ID	Identifikationsnummer
IE	Internationale Einheit
lgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ISCN	International System for Human Cytogenetic
	Nomenclature
IU	International Unit
kDa	Kilodalton; Größenangabe von Proteinen
LDS	Lithium Dodecyl Sulfat

LWK	Lendenwirbelkörper
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinpropanylsulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomografie
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxym-
	ethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
n	Anzahl
N ₂	Stickstoff
NA	Nicht analysiert
NCI	National Cancer Institute
nM	Nanomolar
NOS	Not otherwise specified
OP	Operation
р	p-Wert; Signifikanzwert
p16	Protein des CDKN2A-Gens
PARP	Poly ADP Ribose Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
	(Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction
	(Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	Platelet derived growth factor
pRb	Phosphoryliertes Rb
R-Status	Resektionsrand
Rb	Retinoblastom-Protein
RIN	RNA Integrity Number; RNA Reinheit
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Sekunde
S-Phase	Synthese-Phase im Zellzyklus
S100	S100-Protein
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SKT	Schnellkochtopf
SNP	Single Nukleotid Polymorphismen
STR	Single Tandem Repeats
T-Gen	Brachyury codierendes Gen
TAE	Tris Acetat EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
ΤΝFα	Tumor Nekrose Faktor α
TNT	Tris NaCl Tween
U-CH	"Ulm"-"Chordom"; Zelllinie
UCL	University College London
UK	United Kingdom
WB	Western Blot
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μΜ	Mikromolar
μm	Mikrometer

1.1.1 Definition und Fakten

Die Definition des Chordoms nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO): "A malignant tumor showing notochordal differentiation" [26]

Chordome sind sehr seltene Tumoren der Wirbelsäule, die laut WHO eine der Chorda dorsalis ähnliche Differenzierung aufweisen. Sie haben eine jährliche Inzidenz von 0,8:1 Millionen. In Deutschland werden folglich circa 65 neue Chordompatienten pro Jahr diagnostiziert. Sie werden daher als eine sogenannte "rare disease" oder auch "orphan disease" klassifiziert und machen lediglich 1%- 3% aller Sarkome aus. Man geht davon aus, dass sie histogenetisch aus Resten der Chorda dorsalis in der Wirbelsäule entstehen [26,76]. Hauptlokalisationen sind die Sakrum-, Lenden-, Brust-, Zervikal-Wirbelkörper und die Schädelbasis in der Clivus-Region. In Ausnahmefällen ist die Entstehung auch extraspinal möglich [72]. Die prozentuale Verteilung der am häufigsten auftretenden Chordome entlang der Wirbelsäule ist mit 32% für den Clivus, mit 32% für die mobile Wirbelsäule und mit 28% für den Sakrumbereich beschrieben [48,50].

Obwohl Chordome biologisch hochdifferenzierten mesenchymalen Tumoren entsprechen, sind sie häufig durch langwierige Verläufe mit Rezidiven, durch kurzes tumorfreies Überleben und durch verhältnismäßig kurzes medianes Überleben charakterisiert, das bei durchschnittlich 6-7 Jahren nach Diagnosestellung liegt [8,37,66]. Dies liegt in den meist schwierigen anatomischen Operationsverhältnissen und der daraus resultierenden, oft nicht kompletten Resektion begründet. Chordome haben zudem ein hohes Metastasierungspotential, sodass sie durchaus mit Sarkomen verglichen werden [6]. Die Metastasierungsrate von Nicht-Clivus-Chordomen wird mit bis zu 40% angegeben [26]. Außerdem zeigen Chordome ein knochen-destruierendes Wachstum, folglich sind sie auch lokal maligne Tumoren. Nur eine Minderheit der Patienten wird durch eine chirurgische Intervention komplett geheilt. Das krankheitsfreie Überleben nach dem chirurgischen Eingriff ist aufgrund der klinischen Parameter nicht immer abschätzbar. Verschiedene histologische Parameter, wie histologische Subtypen oder auch die Proliferationsrate werden für eine Risikostratifikation von Chordompatienten diskutiert [2,6,21,39,51,60,69].

Die Hoffnung ist, dass es aufgrund dieser Parameter möglich sein wird, die Chordompatienten anhand der Tumorbiopsien oder am Resektat in verschiedene Risikogruppen zu stratifizieren, um so den weiteren postoperativen Verlauf hinsichtlich einer adjuvanten/neoadjuvanten Chemo- und/oder Radio-Therapie abschätzen zu können.

1.1.2 Biologische Aspekte

Chordome sind langsam wachsende Tumoren, die laut Angaben aus der Literatur einen durchschnittlichen immunhistologisch erhobenen Ki-67 Proliferationsindex von ca. 5% haben [39]. Sie können seit der Beschreibung der hoch charakteristischen Expression von Brachyury durch Flanagan et al. (2006) immunhistologisch verhältnismäßig sicher von anderen ähnlichen Tumoren abgegrenzt werden.

Das Protein Brachyury war vor seiner Erstbeschreibung in Chordomen im Jahr 2006 ein spezifischer Marker der Chorda dorsalis und wird von dem T-Gen, lokalisiert in der chromosomalen Region 6q27, codiert. Das Protein erhielt den Namen 1927 von seinen Erstbeschreibern. Damals entdeckte man bei Mäusen, deren Schwänze kürzer waren, eine Mutation im Brachyury-Gen. Der Wortstamm kommt aus dem Griechischen (brachys=kurz; ourá=Schwanz). Das Gen wird auch T-Gen genannt nach engl. Tail (Schwanz) [20,36]. Doch große immunhistologische Studien haben diesen Marker inzwischen auch in kleinzelligen Lungenkarzinomen und Keimzelltumoren, beispielsweise Seminomen, nachweisen können [49,75].

Folglich ist neben der Expression von Brachyury als diagnostischer positiver Marker auch eine immunhistologisch nachgewiesene Koexpression von S100-Protein, EMA und Vimentin wesentlich, wobei diese Marker fallweise unterschiedlich exprimiert werden und nicht ausschließlich in Chordomen zu finden sind.

Dieses Profil weist auf die besondere Biologie von Chordomen hin, die diese mesenchymalen, epithelialen und neuroephithelialen Marker simultan exprimieren können.

1.1.3 Histogenetische Aspekte

Es wird heute davon ausgegangen, dass Chordome aus Resten der Chorda dorsalis entstehen. Diese Struktur ist eine embryonale Leitstruktur in der axialen Entwicklung von Chordaten, das heißt von Schädel- und Wirbeltieren, zu denen auch der Mensch als Säugetier gehört.

Die Chorda dorsalis stellt die entscheidende Leitstruktur für die Bildung des Neuralrohrs dar und bestimmt die Anterior-Posterior-Achse des Embryos [33,45]. Diese Struktur bildet sich während der Ontogenese meist vollständig zurück und wird durch die Anlage der Ur-Wirbel verdrängt.

Die Chorda dorsalis besteht aus Einzelzellen mit einer typischen zytoplasmatischen Vakuole, welche einen Turgor aufrechterhält (Abbildung 1). Dieser Turgor ist Ausdruck der physikalischen Steifigkeit der Chorda dorsalis. Die Vakuolen sind in Chordomen noch erhalten und stellen eine histologische Reminiszenz zur Chorda dorsalis dar. Dieses bläschenförmige Zytoplasma wird mit dem Begriff "physaliform" (aus dem Griechischen: "bläschenförmig") in der zytologischen Beschreibung von Chordomen wiedergegeben.



Abbildung 1:

Immunhistologische Färbung mit einem spezifischen Brachyury Antikörper eines Fötus im Horizontalschnitt. Während das Neuralrohr und die Wirbelsäulenanlage nicht angefärbt sind, ist die Chorda dorsalis kräftig rot gefärbt. Im oberen Insert erkennt man die Zellen mit der typischen Vakuole in einer immunhistologischen Gli1 Färbung.

Größenstandards: 200μm (Bild), 50μm (Insert unten), 10μm (Insert oben). (Eigene Abbildung)

Normalerweise werden alle Zellen der Chorda dorsalis im Rahmen der Entwicklung durch den Chondrozyten ähnliche Zellen ersetzt. Allerdings können Residuen der Chorda dorsalis in der Wirbelsäule persistieren.

Daten aus der Literatur legen nahe, dass sich Reste der Chorda dorsalis vor allem im Nucleus pulposus der Zwischenwirbelscheiben wiederfinden können. Man geht heute davon aus, dass sich diese Zellreste der Chorda dorsalis zunächst in einen benignen notochordalen Tumor weiterentwickeln können. Dieser wird als Vorstufe des Chordoms angesehen [63,83].

1.1.4 Klinische und morphologische Präsentation

Klinisch präsentieren sich Chordome lokalisationsabhängig unterschiedlich. Clivus-Chordome werden aufgrund ihrer oft direkten Beziehung zum Spinalkanal häufig früher symptomatisch und werden daher auch früher operiert. Die Sakrum- und Lendenwirbelkörper-Chordome können im Gegensatz dazu sehr groß werden. Aufgrund ihres generell langsamen Wachstums, im Vergleich zu anderen malignen Neoplasien, kompensiert das umliegende Gewebe die verdrängende Ausbreitung länger, sodass auch Tumoren erheblichen Ausmaßes entstehen können. Paradigmatisch dafür ist im Ulmer Chordom-Kollektiv ein Sakrum-Chordom mit 6 kg Gewicht und einem maximalen Durchmesser von 50 cm (Abbildung 2). Histologisch stellen sich Chordome in typischer Ausprägung als charakteristische Zellen mit physaliformem, d.h. bläschenförmigem Zytoplasma in trabekulärer Anordnung dar (Abbildung 3).

Die "WHO 2013 Klassifikation" beschreibt mehrere Subtypen, die anderen Tumoren morphologisch ähneln können. So gibt es Subtypen, die einem Leberzellkarzinom oder einem klarzelligen Nierenzellkarzinom, einem Lipom, oder auch adultem Knorpel histologisch ähnlich sein können. Außerdem werden anaplastische Typen und das dedifferenzierte Chordom mit hochgradig atypischer Zytologie beschrieben [26].





Typische Histologie eines Chordoms mit physaliformem

Zytoplasma, trabekulärer Struktur und extrazellulärer

Größenstandard: 100µm. (Eigene Abbildung)

Abbildung 2: Sagittale MRT Bildgebung eines großen sakralen Chordoms. Das Resektat maß im maximalen Durchmesser 50 cm und hatte ein Gewicht von 6 kg.

With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]

1.1.5 Chordom-in-vitro-Modelle

1.1.5.1 Chordom-Zelllinien

Aufgrund der Seltenheit und des langsamen Wachstums gibt es nur wenige gut charakterisierte Chordom-Zelllinien. Daraus resultiert, dass es grundsätzlich wenig Erfahrung mit präklinischen Zellmodellen zu Chordomen gibt [10,55,73]. Die erste Chordom-Zelllinie der Welt, genannt U-CH1, wurde 2001 von Dr. hum. biol. Silke Brüderlein aus dem Institut für Pathologie der Universität Ulm publiziert; "U" steht dabei für Ulm, "CH" für Chordom [61]. Neben dieser Chordom-Zelllinie wurden zusätzliche Linien publiziert oder von der

Abbildung 3:

Matrix. H.E.-Färbung.

Chordoma Foundation validierte Sakrum-Chordom-Zelllinien, wie MugChor1 [57], JHC7 [40] und eine noch nicht publizierte Clivus-Chordom-Zelllinie UM-Chor1 [54] für die Forschung zur Verfügung gestellt. Im Jahr 2011 wurde von Brüderlein et al. eine weitere Chordom-Zelllinie etabliert und publiziert; diese Linie wurde U-CH2 genannt [9].

Die fundamentale wissenschaftliche Bedeutung dieser Zelllinien zeigen erste Publikationen, die gezielt diese beiden Linien zur Definition möglicher pharmakologisch angehbarer Zielstrukturen nutzten [81]. Dieses Screening ergab neue Erkenntnisse für potentielle Zielstrukturen einer möglichen Chordomtherapie. So konnte neben vielen weiteren vielversprechenden Molekülen gezeigt werden, dass der PDGF-Rezeptor und Brachyury selbst als Angriffspunkte für einen pharmakologischen Ansatz in Frage kommen können [1,7,32,35].

1.1.5.2 Zebrafisch Modell

Diese Fischart ist in frühen Entwicklungsstufen transparent und daher geeignet für *in vivo* Studien, da am lebendem Organismus unter dem Inversionsmikroskop Organe und auch Tumoren mikroskopisch untersucht werden können. Außerdem ist es möglich an lebenden Organismen eine Inhibition des Tumorwachstums zu verfolgen [10].

Es bietet sich eine neue Möglichkeit durch Mutationen entstehende chordomähnliche Tumoren in den Fischen hinsichtlich eines Ansprechens auf einen neunen Wirkstoff in pharmakologischen Studien zu testen. Dieser Ansatz wird aktuell als vielversprechend betrachtet und von der Chordoma Foundation gefördert.

(www.chordomafoundation.org/grants/developing-zebrafish-chordoma-model-high-throughput-drug-screening _{18.11.2015})

1.1.6 Chordoma Foundation

Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten gibt es wenig spezialisierte Zentren für die Chordomforschung und Chordomtherapie. Daher ist es wichtig synergistisch nationale und internationale Kontakte zu schaffen, um global die Kräfte zu bündeln. Die aktuell wichtigste internationale Gruppe in der Organisation der

Chordomforschung und Koordinierung von Patienteninformationsgruppen ist die Chordoma Foundation mit ihrem Sitz in Boston, MA, USA.

Der Geschäftsführer Josh Sommer war an einem Chordom erkrankt und gilt aktuell als geheilt. Der europäische Vertreter der Chordoma Foundation war der Niederländer Hans Keulen, der selbst auch an einem Clivus-Chordom litt und kürzlich am 29.10.2015 an den Folgen dieser Erkrankung verstarb.

Die Chordoma Foundation betreut Chordompatienten in Selbsthilfegruppen, fördert die Chordomforschung aktiv durch internationale Treffen. Sie unterstützt gezielt Projekte auch finanziell und stellt validierte Chordom-Zelllinien weltweit für *in vitro* Analysen zur Verfügung: (www.chordomafoundation.org _{18.11.2015}) Da die Definition einer stabilen Chordom-Zelllinie in der Literatur diskutiert wird und insbesondere die Abgrenzung von einer Kurzzeitkultur schwierig sein kann, setzt sich die Chordoma Foundation für die standardisierte Charakterisierung von Chordom-Zelllinien ein. Die Kontrollfunktion der Chordoma Foundation ist deswegen notwendig, weil in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnte, dass jahrelang mit vermeintlichen Chordom-Zelllinien wissenschaftlich gearbeitet wurde, die per Definition nicht aus einem Chordom stammten und teilweise nicht humanen, sondern murinen Ursprungs waren [9].

1.1.7 Therapie

Aktuelle Empfehlung ist die chirurgische Intervention, mit möglichst vollständiger Exzision des Chordoms, teilweise kombiniert mit der adjuvanten Strahlentherapie. Aufgrund des langsamen Wachstums von Chordomen ist die Chemotherapie keine Standardtherapie. Bei Residualtumoren und bei Rezidiven ist die Hochdosis-Radiotherapie aktuell das Mittel der Wahl [4,15,29,41,53,71].

Bei Patienten, die an einem metastasierten und/oder rezidivierenden Chordom leiden, welches primär nicht operativ oder durch Strahlentherapie angegangen werden kann, besteht folglich ein großer Bedarf an einem systemischen und chemotherapeutischen oder zielgerichteten Therapieansatz.

Unter aggressiver Chemotherapie (Ifosfamid oder Kombination von 6 Chemotherapeutika) wurde in seltenen Fällen bei dedifferenzierten Chordomen ein Ansprechen beobachtet [27]. Es zeigte sich dabei eine eingeschränkte Wirksamkeit für alkylierende Substanzen (Ifosfamid), Anthraycline (Doxorubicin) und Cisplatin [16,62]. In einer prospektiven Phase-II-Studie mit 15 Chordompatienten, die mit 9-Nitrocamptothecin behandelt wurden, konnte nur bei einem Patienten eine partielle Remission nachgewiesen werden [14].

Beschrieben sind erste Ansätze mit zielgerichteten Therapien, beispielsweise Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), wie Erlotinib, Cetuximab, Gefitinib, Sunitinib und Lapatinib [38,47,65,68].

Imatinib wurde in ersten Studien bei progressiver Chordomerkrankung mit nachgewiesener Expression von platelet derived growth factor receptor β (PDGFR β) als experimentelle Therapieform eingesetzt. Es konnte bei einem Patienten ein partielles Ansprechen und bei 70% der Patienten (n=50) eine stabile Chordomerkrankung erreicht werden [12,67,70]. Da diese möglichen Ansätze noch nicht den erhofften Erfolg in der Chordom-Therapie gebracht haben, gibt es trotzdem immer noch ein großen Bedarf an Therapiemöglichkeiten; vor allem zur Behandlung der metastasierten und/oder rezidivierenden Chordomerkrankung.

1.1.8 Risikostratifikation

Für das Abschätzen von klinischen Parametern, wie dem krankheitsfreien Überleben eines Chordompatienten nach erfolgter Operation oder zur Risikostratifizierung dieser Patienten an präoperativen Biopsien, bedarf es einer Definition von histologischen Risikofaktoren, die eine mögliche prognostische Aussagekraft haben. Dahinter steht folgende Überlegung: Chordompatienten, welche eventuell von einer neo- oder adjuvanten Chemotherapie, einer zielgerichteten Therapie oder von einer Hochdosis Radiotherapie - beziehungsweise Protonenbestrahlung - profitieren würden, sollen anhand von bestimmten histologischen Merkmalen wie Differenzierung und Tumorzellproliferation an diagnostischen Biopsien oder an den Resektaten erkannt werden.

Beispiel für eine Prognoseabschätzung an Gewebe von Chordompatienten ist die histomorphologische Beschreibung von sogenannten fibrösen Septen, die mit einer besseren Prognose vergesellschaftet sind [51]. Die Bestimmung des Ki-67 Index und die Erhebung des VEGFR-Status [2,59,60] scheinen für eine Risikoabschätzung hinsichtlich des Überlebens oder einer möglichen zielgerichteten Therapie ebenso eine Rolle zu spielen, wie das BMP4/SMAD-Molekül, dem im Signalweg oberhalb von Brachyury in der Embryogenese eine Bedeutung zukommt. Die Expression von BMP4/SMAD ist wahrscheinlich mit einer schlechteren Prognose assoziiert [21]. Verschiedene weitere Parameter, wie z.B. die Tumorgröße, ein infiltratives Wachstum oder der R-Status wurden als Faktoren für die Prognoseabschätzung bei

Die Quantifizierung der Brachyury-Expression auf Proteinebene mittels

immunhistologischer Färbungen wurde ebenfalls im Hinblick auf die Prognose der Patienten untersucht, wobei hierfür keine signifikante Korrelation bezüglich der Prognose festgestellt werden konnte [77].

1.1.9 Ziele meiner Arbeit

- 1. Erhebung einer Chordom-Gewebebank aus dem Probenarchiv des Pathologischen Instituts der Universität Ulm.
- Morphologische, histochemische und immunhistologische Charakterisierung des Kollektivs und Korrelation mit einer klinischen Datenmatrix wie dem Gesamtüberleben, der Metastasierungstendenz und der Rezidivhäufigkeit.
- Charakterisierung und Etablierung von Chordom-Zelllinien inklusive einer Analyse von möglichen Zielstrukturen für eine Inhibition *in vitro* inklusive einer möglichen Definition eines potentiellen Responder-Phänotyps auf diese Inhibition anhand der Gewebeproben aus der Chordom-Gewebebank *in situ*.

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller	Ort
AlamarBlue	AbD Serotec	Oxford, UK
Antibody Diluent	Zytomed Systems	Berlin, Deutschland
AP Substrate Buffer	Dako	Hamburg, Deutschland
Aquatex (Eindeckmedium)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Azan-Färbelösung	Merck	Darmstadt, Deutschland
H.EFärbelösung	Waldeck	Münster, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Bortezomib	Santa Cruz	Dallas, USA
BSA	Roth	Karlsruhe, Deutschland
C-met FISH-Sonde	Kreatech, Leica-	Nussloch, Deutschland
	Biosystems	
CaCl2	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Color Plus Protein Größenstandard	New England Biolabs	Ipswich, USA
10-230kDa (P7711S)		
DAPI	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Detection System, Alkaline	Dako	Hamburg, Deutschland
Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse		
EDTA	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
EGF (E-9644)	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Ethanol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Eukitt	O. Kindler	Freiburg, Deutschland
EUKOBROM Papierentwickler (sw)	Tetenal	Norderstedt, Deutschland
FastRed Neufuchsin	Dako	Hamburg, Deutschland
FCS	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
First Strand Buffer (5x)	Thermo Scientific	Waltham, USA
Fixierer Roentogen Superfix	Tetenal	Norderstedt, Deutschland
Formalin (4%)	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Gene Expression Wash Buffer Kit	Agilent	Santa Clara, USA
H2O	Merck	Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Merck	Darmstadt, Deutschland
HCI	Merck	Darmstadt, Deutschland
IMDM Medium	Lonza	Basel, Schweiz
Isopropanol	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
KCI	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kollagenase Typ 1A	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
L-Glutamin	Lonza	Basel, Schweiz
Link, biotinylated secondary	Dako	Hamburg, Deutschland
antibodies		
May-Grünwald-Giemsa Lösung	Merck	Darmstadt, Deutschland
MgCl2	Merck	Darmstadt, Deutschland
microRNA Spike In Kit	Agilent	Santa Clara, USA
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, Deutschland
miRNA Complete Labeling and	Agilent	Santa Clara, USA
Hybridisation Kit		
MOPS	Merck	Darmstadt, Deutschland
Na2HPO4-2H2O	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
NaH2PO4-2H2O	Merck	Darmstadt, Deutschland
NaOAc	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Nu-Page Sample Buffer 4x	life technologies	Carlsbad, USA
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 12 Well	life technologies	Carlsbad, USA
NuPaGE LDS Sample Buffer	InVitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Oligo-dT Primer	Thermo Scientific	Waltham, USA
Palbociclib (PD0332991) isoethionate	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Panceau-S Staining	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Penicillin/Streptomycin	Lonza	Basel, Schweiz
Pepsin	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Pronase	Sigma-Aldrich	St.Louis, USA

Protein Assay Dye Reagent	BioRad	Hercules, USA
Protease und Phosphatase Inhibitor	Thermo Scientific	Waltham, USA
Single-Use Cocktail		
Proteinaseinhibitor	Roche	Mannheim, Deutschland
QIAshredder	Qiagen	Hilden, Deutschland
Quick Amp Labeling Kit, one-color	Agilent	Santa Clara, USA
RIPA (Radio-Immunoprecipitation	Roche	Mannheim, Deutschland
Assay)-Puffer		
RNase A	Thermo Scientific	Waltham, USA
Rnase-Free Dnase Set	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNAsin	Thermo Scientific	Waltham, USA
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Lonza	Basel, Schweiz
SDS	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin Alkalische Phosphatase	Dako	Hamburg, Deutschland
Super RX medical x-ray film (18x24)	FUJI	Tokyo, Japan
SuperSignal West Dura (HRP-Substrat)	Thermo Scientific	Waltham, USA
ΤΝFα	PeproTech	Rocky Hill, USA
Tris	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich	St. Luis, USA
Trypsin/EDTA	Lonza	Basel, Schweiz
TWEEN 20	Merck	Darmstadt, Deutschland
Vectashild	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
Vysis-Kit	Abbott	Wiesbaden, Deutschland
Whatman Filterpapier	BioRad	Hercules, CA, USA
Xylol	Merck	Darmstadt, Deutschland

2.1.2	Puffer/Lösung	en/Medien
-------	---------------	-----------

Puffer	Reagenzien	Menge
Citrat-Puffer	Citrat	10mM
	рН	6
DAPI-Lösung	DAPI-Stocklösung	70µl (200µg/ml)
MOPS 20x NuPAGE SDS	MOPS	104,6g
Laufpuffer	Tris	60,6g
	SDS	10g
	EDTA	3g
	H ₂ O	ad 500ml
PBS 10x	NaCl	80g
	КСІ	2g
	KH ₂ PO ₄	2g
	$Na_2HPO_4*2H_2O$	11,5g
	рН	7,4
PBS	10x PBS	1 Teil
	H ₂ O Millipore	9 Teile
Sörensen-Puffer	0,2M NaOH	25ml
	0,2M KH ₂ PO ₄	58ml
	H ₂ O	ad 2l pH6,8

SSC 20x	NaCl	175,3g
	Tri-Natriumcitrat-	88,2g
	dihydrat	
	HCI 25%	bis pH=7,0
	H ₂ O	ad 1L
TAE 10x	Tris	96,8g
	$C_2H_4O_2$	22,8ml
	EDTA	7,44g
TBS 10x	NaCl	106g
	Tris	48,8g
	HCI 25%	ca. 40m
	рН	7,4
	H ₂ O	ad 2000ml
TBS-T	Tween 20	0,5ml
	10x TBS	100ml
	H ₂ O	ad 1000ml
	рН	7,4
TNT	Tris HCl	1ml 20mM pH 8,0
	NaCl	2ml 200mM
	Triton X100	0,5% (1%)
	dH ₂ O	ad 50ml (46,5ml)
	Leupeptin	50µl 2mM
	DTT	50µl 1M
	NaF	1ml 1M
	β-Glycerophosphat	1ml 1M
	MSF	500µl

2. Material und Methoden

Transfer-Puffer 10x	Tris	58g
	Glycin	29g
	20% SDS	18,5ml
	H ₂ O	ad 1L
Transfer-Puffer	10x Transfer Buffer	100ml
	Methanol	100ml
	H ₂ O	ad 1L
WASH A	Formamid	150ml
	20x SSC	30ml
	H ₂ O	ad 300ml
WASH B	20x SSC	2,5ml
	H ₂ O	ad 500ml
Zellkultur-Medium	IMDM/RPMI (4:1),	
	10% fetales	
	Kälberserum (FCS)	
	100 U/ml Penicillin G,	
	100mg/ml	
	Streptomycin	
	200mM Glutamin	

2.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
-80 °C Schrank	Heraeus	Osterode, Deutschland
Bioanalyser RNA 6000 Nanokit	Agilent	Santa Clara, USA
Brutschrank	Heraeus	Osterode, Deutschland
CCD-Kamera (charge-coupled	Hamamatsu	Haga, Japan
device)		
Chip Reader 2100 BioAnalyser	Agilent	Böblingen, Deutschland
Digitale Spiegelreflexkamera	Canon	Tokyo, Japan
Eismaschine	Inco Ziegra	Isernhagen, Deutschland
Elektrische Pipettierhilfe	Thermo Scientific	Waltham, USA
Finnpipette		
Elektrophorese Power Supply	Pharmacia Biotech, GE	Freiburg, Deutschland
	Healthcare	
Entwickler	AGFA	Bonn, Deutschland
Finnpipette, Multi-channel (8)	Thermo Scientific	Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Heizblock	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Hybridisierungsofen	Agilent	Santa Clara, USA
Immunhistochemie-AutoStainer	Dako	Hamburg, Deutschland
Inversionsmikroskop	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr	Biberach, Deutschland
Laminar-Flow Werkbank	BDK	Sonnenbühl-Genkingen,
		Deutschland
Magnetischer Rührer	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Microarray Scanner	Agilent	Santa Clara, USA
Mikrotom	Leica-Biosystems	Nussloch, Deutschland
Mikrozentrifuge	Neolab	Heidelberg, Deutschland
N2-Tanks	Cryoson/consarctic	Schöllkrippen/Westerngrund,
		Deutschland
Nadeldrucker für Photometer	Epson	Meerbusch, Deutschland

LQ-850+

Nanodrop 1000	Thermo Scientific	Waltham, USA
Spectrophotometer		
Objektträgerstift	Marienfeld Superior	Lauda-Königshofen,
		Deutschland
pH-Meter	WtW	Weilheim, Deutschland
Photometer Ultrospec 2100pro	GE Healthcare	Freiburg, Deutschland
Photomikroskop	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Platereader (SPECTRAmax 190)	Molecular Devices	Sunnyvale, USA
Schüttler	Köttermann	Edison, USA
Semi-dry Electro-Blotter	cti	Idstein, Deutschland
Semi-dry-Blot	Hartenstein	Würzburg, Deutschland
SpeedVac RVC2-18	Christ	Osterode am Harz,
		Deutschland
Steamer, Multi Gourmet	Braun	Kronberg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries	Bohemia, USA
Waage	Sartorius	Göttingen, Deutschland
XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Scientific	Waltham, USA
Electrophoresis System		
Zentrifuge	Heraeus	Osterode, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge kühlend (5417R)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zytospin Zentrifuge Cytospin3	Shandon, Thermo	Waltham, USA
	Scientific	

2.1.4 Software

Software	Hersteller	Ort
Pathologiesoftware	Goeser	Ulm, Deutschland
DC Pathos	dc-systeme Informatik	Heiligenhaus, Deutschland
DISKUS 5.5.	Hilgers	Königswinter, Deutschland
FACS Software BD CellQuest	Becton, Dickinson and	New Jersey, USA
	Company	
Genespring 12.1	Agilent	Santa Clara, USA
ISIS	Meta-Systems	Altlussheim, Deutschland
Prism, Version 6	GraphPad	La Jolla, USA
SAP	Siemens Healthcare	Eschborn,
	Diagnostics	Deutschland
SPECTRAmax 190 Software	Molecular Devices	Sunnyvale, USA
SPSS Statistics, Version 21	IBM	Armonk, USA
UTHSCSA Image Tool Version 3.0	S. Brent Dove , Dental	San Antonio, USA
	Diagnostic Science	
Word, Excel, PowerPoint 2013	Microsoft	Redmond, USA
für Windows		
Word, Excel, PowerPoint 2011/2016		
für OS X		

2.1.5 Weitere Produkte

Produkt	Hersteller	Ort
6, 12, 96 Well Nunc-Platten	ThermoScientific	Waltham, USA
Bechergläser	Schott	Zwiesel, Deutschland
Deckgläser	Menzel	Braunschweig, Deutschland
Einmal-Küvetten (polystyrol)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Filterpapier	VWR	Radnor, USA
Handschuhe	Semperit	Wien, Österreich
Kulturflaschen Nunc EasYFlask	ThermoScientific	Waltham, USA
25cm ²		
Microcappilary Pipettenspitzen für	VWR	Radnor, USA
Gele		
Mini PAP Pen	InVitrogen	Karlsruhe, Deutschland
mRNA-Messzelle für Photometer	Implen	München, Deutschland
Neubauer Improved	LO-LaborOptik	Lancing, UK
Nitrocellulose Membran	Whatman	Freiburg, Deutschland
Nunc Petrischalen für Zellkultur	ThermoScientific	Waltham, USA
Objektträger Superfrost	Menzel	Braunschweig, Deutschland
Oligonucleotide Microarrays G412F	Agilent	Santa Clara, USA
Parafilm	Bemis	Oshkosh, USA
Pasteurpipetten	Ratiolab	Dreieich, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reagiergefäße	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Röntgenfilm	FujiFilm	Düsseldorf, Deutschland
Serologische Pipetten (2-25ml)	Nunc GmbH	Wiesbaden, Deutschland
Standardreaktionsgefäß	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Vliespapier	Kimberley-Clark	Koblenz, Deutschland
	GmbH	
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Klon	Verdünnung für	Vorbehandlung/	Hersteller	Ort
		IHC/WB	Größe im WB		
		r=rabbit			
		m=mouse			
Anti-mouse	-/-	-/1:1000	-/-	Sigma-	St. Luis, USA
(HRP)				Aldrich	
Anti-rabbit	-/-	-/1:50000	-/-	Santa Cruz	Dallas, USA
(HRP)					
β-Actin	AC74	-/1:1000-10000m	-/37-42kDa	Sigma-	St. Luis, USA
				Aldrich	
Brachyury	H-210	1:100/1:1000r	SKT(Citrat)/	Santa Cruz	Dallas, USA
			47kDa		
CDK4	QDCS-	1:100/1:1000m	SKT(Citrat)/	Zytomed	Berlin,
	31.2		34kDa	Systems	Deutschland
CDK6	NA	1:500/1:1000m	SKT(Citrat)/	Abcam	Cambridge,
			37kDa		England
Cleaved	NA	-/1:1000r	-/17, 19kDa	Cell	Danvers, USA
Caspase 3				Signaling	
(Asp 175)					
Cleaved	D64 E10	-/1:1000r	-/89kDa	Cell	Danvers, USA
PARP				Signaling	
(Asp214)					
C-MET	D1C2	1:300/-	SKT(Citrat)/-	Cell	Danvers, USA
				Signaling	
Cyclin D1	SP4	1:50/-	SKT(Citrat)/-	DCS	Hamburg,
					Deutschland
EMA	E29	1:500/-	Pronase/-	Dako	Hamburg,
					Deutschland
Gli1	Poly	1:100	SKT(Citrat)/-	Santa Cruz	Dallas, USA
Mib-1	MIB1	1:200/-	SKT(Citrat)/-	Dako	Hamburg,
(Ki-67					Deutschland
Antigen)					

2. Material ur	nd Methode	n			
p16	JC8	1:100/1:500m	SKT(Citrat)/	Santa Cruz	Dallas, USA
			16kDa		
pRb	NA	1:500/1:1000r	SKT(Citrat)/	Cell	Danvers, USA
(Ser780)			110kDa	Signaling	
Rb	4H1	1:100/1:2000m	SKT(Citrat)/	Cell	Danvers, USA
		(5% Milchpulver)	110kDa	Signaling	
S100-	Poly	1:1000/-	Pronase/-	Dako	Hamburg,
Protein					Deutschland
Zytokeratin	AE1/3	1:100/-	Pronase/-	Dako	Hamburg,
					Deutschland

2.1.7 Zelllinien

Zelllinien	Hersteller/Bezugsquelle	Ort
U-CH1, 2 [9,61]	Dr. hum. biol. Silke Brüderlein	Ulm, Germany
U-CH3, 6, 7, 10, 11, 12	Dr. hum. biol. Silke Brüderlein	Ulm, Germany
MugChor1 [57]	Beate Rinner et al.	Graz, Österreich
SK-LMS-1	Leibniz-Institut DSMZ	Bochum, Germany
CaCo2	ATCC	Manassas, Virginia, USA
HEK-293	Leibniz-Institut DSMZ	Bochum, Germany
HeLa	Leibniz-Institut DSMZ	Bochum, Germany

2.2 Methoden

2.2.1 Kollektiverstellung

Für die Etablierung des Chordomgewebekollektivs aus dem Paraffinblockarchiv des Instituts für Pathologie an der Universität Ulm wurden Befundberichte von 1986 bis 2014 mittels eines Computerprogramms durchsucht. Dafür wurde die aktuelle Software "dcPathos" und das System "Goeser" des Instituts für Pathologie verwendet. Durch die Suche nach dem Stichwort "Chordom" konnten Fallnummern zusammengestellt werden. Durch diese war ein Zugriff auf die archivierten Blöcke möglich. Diese konnten dann wiederum in den Systemen nachgeschlagen werden, um Originalberichte über diese Tumoren zu erhalten. Oftmals gelang dabei die Identifikation weiterer Blocknummern, falls der Patient mehrfach biopsiert wurde. Diese Blocknummern wurden in eine Excel Tabelle eingefügt und mit Namen, Geburtsdatum, Diagnosedatum, Lokalisation (Clivus-, HWK-, BWK-, LWK-, Sakrum- und Extraaxiales Chordom) eingetragen. Wichtig für die weitere statistische Auswertung war, dass mittels des Programms Excel die Zeilen fest verankert wurden, damit eine definierte Zeile einen Patientenfall wiederspiegelt. Außerdem wurde für jeden Fall eine Identifikationsnummer vergeben, sortiert nach Eingangsdatum in die Pathologie (AW1-43). Falls eine Blocknummer nicht mehr in dem System vorhanden war, wurde manuell im Archiv der Pathologie der jeweilige Befundbericht gesucht und abfotografiert. Es konnten auf diese Art und Weise insgesamt eine Datenmatrix von 51 potentiellen Chordompatienten für das Kollektiv erhoben werden. Zu allen primären Chordompatientenproben wurden folgende Variablen hinzugefügt: Primärdiagnosen-Blocknummer, alternative Blocknummern, Vorname, Nachname, Geburtsdatum, Geschlecht, Eingangsdatum im Institut für Pathologie der Universität Ulm, Diagnose, Metastasen und Lokalisation, Rezidive, genaue Tumorlokalisation, Größe und Gewicht, Diagnosedatum, Alter bei Diagnose, R-Status, chirurgisches Vorgehen, Bestrahlung und immunhistochemische Expressionsprofile von S100-Protein, Zytokeratin, Vimentin, EMA und der Ki-67 Index. Das immunhistochemische Profil wurde für S100-Protein und EMA jeweils komplettiert, ebenso wurde für alle Fälle der immunhistologische Status von Brachyury erhoben. Dabei ergab sich, dass in 5 Fällen Brachyury nicht nachweisbar war. Diese wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Weitere 3 Fälle mussten ausgeschlossen werden, da keine Schnitte und/oder Blöcke zu finden waren. Abschließend konnten 43 Patienten mit Brachyury-positiven Chordomen

eingeschlossen werden.

Für diese Patienten wurde mittels des digitalen Patientenarchivs des Universitätsklinikums (SAP Klinik Software) nach Überlebensdaten gesucht und so die Datenmatrix bezüglich des Gesamtüberlebens erhoben. Da zahlreiche Patienten nicht mehr in diesem Archiv abgelegt waren, wurden die Hausärzte der Patienten ausfindig gemacht und die Adressen der Hausärzte aufgelistet. Diese Liste wurde an Frau Dr. Mayer-Steinacker aus der Abteilung Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm übermittelt. Sie schickte an diese Adressen ein vorgefertigtes Formular zur Erhebung der Überlebensdaten. Durch diese Recherchen konnten dann von insgesamt 40 Patienten Überlebensdaten erhoben werden. Der Tod eines Chordompatienten wurde über eine Todesanzeige ermittelt. Mit Hilfe von diesen Daten konnten dann Kaplan-Meier-Kurven erstellt werden, wobei hierfür das Diagnosedatum und das Datum der letzten Information über den Lebensstatus benötigt werden. Aus der Differenz von beiden Daten kann dann das Überleben in Jahren berechnet werden. Dazu wird der Lebensstatus in einen binären Code umgeschrieben. 0 bedeutet: der Fall wird zensiert, d.h. kein Ereignis. 1 bedeutet: es ist ein Ereignis eingetreten, in diesem Fall also der Tod des Patienten. Um die Kaplan-Meier-Kurve der Chordome zu erstellen, wurden die Werte in ein spezielles Computerprogramm übertragen (GraphPrism, Version 6). X-Werte entsprechen dabei den Überlebenszeiten; weiter wird der binäre Lebensstatuscode in zusätzliche Spalten übertragen. Anschließend kann mit diesen Daten eine Überlebensanalyse durchgeführt werden. Man erhält somit eine statistische Auswertung und die dazugehörige Kaplan-Meier-Kurve. Um anschließend zwei bestimmte Gruppen vergleichen zu können, muss man die Überlebenszeit und die Lebensstatusspalten nach dem jeweiligen Parameter sortieren. Man fügt die Überlebenszeit wieder als X-Werte ein und füllt für jede Variable passend zu der Überlebenszeit den Lebensstatus in eine neue Spalte ein.

2.2.2 Statistik

Es wurden die Statistikprogramme *GraphPad Prism (Version 6)* und *SPSS (Version 21)* verwendet. Die Überlebensanalysen wurden mit *Prism* durch Verwendung der Kaplan-Meier-Schätzers dargestellt und berechnet. Zum Vergleich zweier Kurven miteinander, wurde die programminterne "curve comparison" durchgeführt. Dieser Vergleich wurde mittels des log-rank (Mantel-Cox)-Test berechnet.

Die weiteren statistischen Korrelationen der Variablen wurden auch mit *Prism* durchgeführt. Dabei wurden zweiseitige t-Tests durchgeführt. Als signifikant galt ein 2-seitiger Test mit einem p-Wert unter 0,05. Die Inhibitions-ergebnisse mit MTS konnten mit *Prism* dargestellt werden. Eine Inhibitionskurve konnte mit der Nichtlinearen Regression durch die Messpunkte gelegt werden und die IC50-Werte wurden danach vom Programm ausgegeben. Balkendiagramme und andere darstellende Statistikgraphen wurden mit *Prism* und mit *SPSS* erstellt und die dazugehörige Standardabweichung ausgerechnet. Um die Daten in *SPSS* zu verwenden, mussten davor alle Variablen in Zahlencodes umgewandelt werden.

2.2.3 Etablierung von Chordom-Zelllinien

Voraussetzung für eine Etablierung von Zelllinien ist die Verfügbarkeit von nativem Chordomgewebe. Dieses Material erhalten die Mitarbeiter des Instituts für Pathologie direkt von den Chirurgen aus dem Operationssaal ausgehändigt. Dies geschieht im Schnellschnittlabor, das an der Universitätsklinik Ulm direkt neben den OP-Sälen lokalisiert ist. Alternativ kann das frische Tumormaterial auch in einer Kulturflasche mit sterilem Medium aus einem entfernteren Labor zugesendet werden. Dies erfolgte für die Linien U-CH3, U-CH6 und U-CH7 mit Chordomgewebe geschickt von Prof. A. Flanagan aus London, UK. Chordomzellen überleben auch einen längeren, möglicherweise 2-3 Tage dauernden Transport in sterilem Medium.

Für eine Chordom-Zellkultur ist Bedingung, dass die Diagnose eines Chordoms vorher oder spätestens während des Kulturprozesses gestellt wird. Die Diagnose wird in der Zusammenschau mit den Daten aus der Klinik, inklusive der Anamnese, der Bildgebung und den Laborparametern zunächst als Verdachtsdiagnose formuliert. Zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose, idealerweise nach Diskussion in einem interdisziplinären Sarkomboard, ist eine Biopsie mit nachfolgender histopathologischer inklusive einer immunhistologischen Aufarbeitung unumgänglich. Wenn die Diagnose "Chordom" definitiv auch histologisch mit den entsprechenden immunhistologischen Zusatzfärbungen gesichert ist und auch die klinischen Parameter, die Histologie und das immunhistologische Profil bezüglich der Diagnose übereinstimmen, wird die Operationsindikation fallweise unterschiedlich gestellt.

Während der Operation kann an dem Resektat, bei weiterer diagnostischer Unklarheit wegen beispielsweise fehlender diagnostischer Biopsie, auch intraoperativ mittels Schnellschnittdiagnostik über einen Kryostatschnitt eine annähernde Diagnose gestellt werden. Durch diese intraoperative Diagnostik kann dem Chirurgen neben der Schnellschnittdiagnose, auch der Status der Randsituation (R-Status) direkt in den OP-Saal innerhalb von 20 min nach Probenentnahme telefonisch übermittelt werden. Dieses Vorgehen hat den weiteren Vorteil, dass das gesamte native Tumorgewebe sofort und kontrolliert für die Zellkultur, für die Asservierung von Kryomaterial oder für die Paraffinhistologie entsprechend weiterverarbeitet werden kann.

Der nächste Schritt ist die Übergabe des Frischmaterials in die Zellkultur. Das Gewebe wird dort steril zerkleinert, in Zellmedium überführt und mit 1'000 IU Kollagenase versetzt. Die Kollagenasemenge richtet sich nach der Menge und Beschaffenheit des Tumormaterials. Die Kollagenase spaltet das Gewebe enzymatisch weiter auf. Das Zellmedium besteht aus IMDM/RPMI (4:1), 10% fetalem Kälberserum (FCS) und wird mit Antibiotika (100 U/ml Penicillin G, 100 mg/ml Streptomycin) sowie 200 mM Glutamin versetzt. Die Antibiotika verhindern eine bakterielle sowie mykotische Kontamination. Für eine optimale Enzymaktivität wird der Ansatz mindestens 3 h oder über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wird anschließend in Zellkulturflaschen überführt. Die Zellsuspension kann ab diesem Zeitpunkt bezüglich einer potentiellen Kontamination und des Wachstums mittels Inversionsmikroskopie beobachtet und die Zytologie der Tumorzellen auch fotografisch dokumentiert werden.

Die Chordom-Zelllinien haben, parallel zu den Tumoren *in vivo*, ein langsames Wachstum. Die initialen Verdopplungszeiten liegen zwischen Wochen bis Monaten und stellen die sensibelste Phase der Etablierung einer Chordom-Zelllinie dar. Als ein akzeptiertes Prinzip der Etablierung von Zelllinien gilt, dass neben der Sterilität, die anfänglich präsenten weiteren Zelltypen wie Endothelien und Zellen des Bindegewebes seneszent werden und kontinuierlich absterben, bis nur die immortalisierten Tumorzellen in der Reinkultur übrig bleiben. Die Chordoma Foundation setzt sich für die einheitliche Charakterisierung und

Validierung der Chordom-Zelllinien ein. Um hier eindeutige Richtlinien für die daraus resultierenden wissenschaftlichen Arbeiten an Zelllinien festzulegen, wurden obligate Kriterien aufgestellt, die eine Chordom-Zelllinie erfüllen muss (Tabelle 1).

Tabelle 1:

Liste obligater Kriterien der Chordoma Foundation zur Definition einer Chordom-Zelllinie.

Kriterien	Analyse/Bestimmung
Alle benötigt:	
Histopathologisch bestätigte Chordom-	Original Tumor mittels IHC für
Diagnose inklusive entsprechender	Brachyury, EMA und Zytokeratin positiv
Immunhistologie	
Bewiesener humaner Ursprung des Gewebes	Karyotyp, humanspezifische PCR oder
	Hybridisierung auf einem humanem
	Oligonukleotid Array
Genotypische Charakterisierung	Karyotyp, CGH, aCGH oder SNP Array
Genotyp entspricht nicht bekannten Zelllinien	STR Profil und Verifizierung mit der
	ATCC Datenbank
Mindestens 2 benötigt:	
Rearrangiertes Genom ist überprüft identisch	Karyotyp, CGH, aCGH oder SNP Array
mit dem des Parentaltumors	
Expression von T (Brachyury)	PCR, Gen-Expressions-Analyse,
	Immufluoreszenz oder Immunoblot
Expression von CD24, Cytokeratin 19 und	PCR, Gen-Expressions-Analyse,
Col2A1	Immufluoreszenz oder Immunoblot
Physaliforme Morphologie der Tumorzellen	In vitro Lichtmikroskopie

Als weiteres wesentliches Kriterium gilt zudem, dass sich der entsprechende Patient vertraglich einverstanden erklärt, dass aus seinem Tumor eine Zelllinie etabliert und diese formal der Chordoma Foundation übereignet wird. Dafür bedarf es einer Unterschrift des Patienten unter einer vorformulierten und juristisch überprüften Übereignungserklärung. Davor ist eine ausführliche Aufklärung des Patienten durch einen behandelnden Arzt notwendig.

Diese Aufklärung und Erklärung erfolgt z.B. in Ulm nach einem vorgegebenen Formular des Comprehensive Cancer Centers der Universität Ulm (CCCU), die auch eine Einverständniserklärung zur Asservierung der Tumorproben in der Biobank des CCCU beinhaltet.

2.2.4 Zelllinien Propagation

Ab dem Zeitpunkt, an dem in einer Kulturflasche der Boden restlos von Zellen bedeckt wird, kommt es zur sogenannten Kontaktinhibition der Zellen untereinander. Das Wachstum der Zellen wird fast komplett gehemmt. Um die Kultur weiter zu vervielfältigen, muss eine neue Kultur angelegt werden.

Entsprechend dazu wurde die ursprüngliche Zellpopulation auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt. Dazu mussten die adhäsiven Zellen mit Trypsin (1-2 ml) gelöst werden. Sie lagen durch diesen Schritt vereinzelt vor. Dieser Schritt wurde mit dem Inversionsmikroskop überprüft. Bei starker Adhäsion der Zellen konnte die Trypsinaktivität durch Inkubation der Kulturflasche bei 37 °C unterstützt werden. Anschließend wurde die Trypsin-Zellsuspension in ein 15 ml Gefäß pipettiert, mit PBS versetzt und für 5 min bei 1'000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet erneut in PBS aufgelöst. Die zwei vorbereiteten neuen Kulturflaschen wurden mit jeweils ca. 6 ml Medium (4xIMDM:1xRPMI) unter Einsatz eines batteriebetriebenen Pipettierhelfers und einer 10 ml oder 20 ml Pipette aufgefüllt. Die suspendierten Zellen konnten dann mit 1 ml Medium versetzt werden; jeweils die Hälfte des Volumens wurde anschließend in die neuen Kulturflaschen pipettiert.

Alternativ konnten die Schritte auch reduziert werden, indem man die Hälfte der trypsinierten Zellen direkt und ohne erneutes Waschen in eine neue mit 6 ml Medium gefüllte Kulturflasche überführte.
2.2.5 Zellzählung mit der überarbeiteten Neubauer Zählkammer

Die Zählkammer besteht aus einem Objektträger, auf den ein angefeuchtetes, spezielles Deckglas positioniert wird, um einen Kapillar-Sog zu erzeugen. In weiteren Schritten wurde ein Aliquot der Kultur mit Trypanblau 1:1 gemischt. 10µl Zellsuspension wurden mit 10µl Trypanblau versetzt. Anschließend wurden 10µl dieser Lösung an die Kante zwischen Deckglas und Objektträger pipettiert. Diese Menge wurde in die Zählkammer gesogen und konnte dann unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

In der Kammer wurden 4 Felder á 16 Quadrate ausgezählt und mit folgender Formel die Zellkonzentration berechnet:

 $Zellkonzentration\left(x \times \frac{10^4}{ml}\right) = \frac{4 \times (Zellen \text{ in einem 16er Quadrat})}{4} x2 (Verdünnungsfaktor)$

2.2.6 Zellzählung und fotografische Archivierung

Für diese Art der Zellzählung wurde ein Inversionsmikroskop mit einer *Canon* Spiegelreflexkamera und ein *Windows*-PC mit der Software *UTHSCSA Image Tool Version 3.0 Final* benutzt.

Die Zellen wurden dazu in 96-Well-Platten ausgesät und mit 10 nM, 100 nM und 1'000 nM Palbociclib für definierte Zeiten bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Parallel wurde eine Kontrollkultur ohne Palbociclib ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Jedes Feld dieser Platte wurde zu mehreren Zeitpunkten immer an genau der gleichen Stelle fotografiert. Pro Ansatz wurden zwischen 3 und 6 Felder ausgezählt.

Dieser Schritt wurde mit der Software *Image Tool* und dem 'taq and count' Modus an einem Computer durchgeführt. Die Daten wurden in Excel übertragen und der Median sowie die Standardabweichung errechnet.

Dadurch konnte man anhand der verschiedenen Zeitpunkte der Messung eine Wachstumskurve über mehrere Tage generieren.

2.2.7 Kryoasservierung von Zellkulturen

Um die Zelllinien einzufrieren, musste man wiederum die adhäsiven Zellen trypsinieren und wie beschrieben, mit PBS gründlich waschen. Anschließend wurden Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt (1,5 ml). Dieses wurde entsprechend beschriftet (Datum, Zelllinien-Bezeichnung) und für 5 min bei 1'000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand komplett entfernt. Anschließend konnte das Pellet trocken bei -80 °C tiefgefroren werden.

Diese Pellets können dann, bei Bedarf, aufgetaut und für DNA-, RNA- oder Protein-Assays verwendet werden. Eine Rekultivierung der Zelllinien ist nach dem Einfrieren mit dieser Methode nicht möglich.

2.2.8 Anlage eines Paraffinblocks aus einer Zellkultur

Diese Methode ist wichtig, um auch Zytoplasma- und Kernantigene immunzytologisch zu visualisieren, da an herkömmlichen Zytospinpräparaten verlässlich nur membranständige Antigene nachgewiesen werden können.

Dazu wurden die Zellen trypsiniert und 1 mal in PBS suspendiert (Beschreibung siehe oben). Nach Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 1 ml verworfen, das Pellet wurde mit einer Pipette im Überstand aufgelöst und mit 3 Tropfen Hämalaun versetzt. Anschließend wurde das 1,5 ml Reagenzgefäß kopfüber auf ein Filterpapier gebracht und solange gewartet, bis die Flüssigkeit aufgesogen ist. Man konnte diesen Schritt beschleunigen, indem man mit einer heißen Nadel ein Loch in das Gefäß sticht, um so das Ablaufen der Flüssigkeit zu erleichtern. Das Zellpellet konnte anschließend durch Faltung des Filterpapiers geschützt werden. Dieses Briefchen wurde in eine Blockkammer gelegt, in ein Glasgefäß mit 100% Ethanol eingetaucht und konnte dann im Routinelabor nach Standardverfahren in Paraffin eingebettet werden. Anschließend wurden, ebenfalls nach einem Standardverfahren, Paraffinschnitte von circa 3-4 µm Dicke angefertigt. Diese Schnitte konnten ebenso wie normales Paraffineingebettetes Tumormaterial mit immunhistologischen Antikörpern gefärbt und ausgewertet werden.

2.2.9 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden mindestens 4x10⁶ Zellen benötigt, so dass in der Regel auf eine Zellkulturflasche zurückgegriffen wurde, die längere Zeit nicht subkultiviert

worden war. Zunächst wurde das Medium aus der Flasche verworfen und mit PBS (1-2 ml) gespült. Anschließend wurden 1-2 ml Trypsin in die Flasche pipettiert und diese für ca. 5 min in einem 37 °C Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mechanisch durch leichtes Klopfen vom Boden gelöst. Das Ablösen der Zellen wurde mittels Inversionsmikroskopie überprüft. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült, indem man die Suspension in ein geeignetes Tube überführte und dort mit PBS versetzte. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1′000 rpm für 5 min. Dieser Schritt wurde fallweise bis zur kompletten Ablösung der Zellen wiederholt. Ein Aliquot der gewaschenen Zellen wurde mit PBS verdünnt und wie oben Kapitel 2.2.4 beschrieben mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die Ziel-Menge an Zellen errechnet. Das benötigte Volumen der Suspension wurde in ein Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die eigentliche RNA-Extraktion. Insgesamt wurden ca. 4x10⁶ Zellen für ungefähr 3 μg RNA benötigt.

Die Suspension wurde anschließend dann bei 1'000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA Aufreinigung erfolgte an dem trockenen Zellpellet nach dem Protokoll des *Qiagen RNeasy Plus Mini Kits* unter einer desinfizierten Abzugsbank. Das Pellet wurde mit 350 µl β-Mercaptoethanol-haltigen *RLT*-Puffer (10 µl/1 ml) lysiert und - unterstützt durch einen Mikroschüttler - homogenisiert. Das Lysat wurde im *QIAShredder* weiter homogenisiert und durch die Zentrifugation bei 14'000 rpm für 2 min von Zellmembranrückständen getrennt.

Die RNA befand sich anschließend in Suspension im Durchfluss und wurde mit 350 µl in 70% Ethanol versetzt. Dieses Gemisch (700 µl) wurde auf die RNeasy-Säule pipettiert und für 30s bei 10000 rpm zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA an die Säulenmatrix gebunden und wurde mit 350 µl Waschpuffer *RW1* durch Zentrifugation (10'000 rpm, 30 s) abgelöst.

Um eine mögliche DNA-Verunreinigung zu vermeiden, wurde die Probe mit RNasefree-DNase in *RDD*-Puffer (10μl+70μl=80μl pro Probe) für 15-30min bei Zimmertemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die RNA mit 350 μl Waschpuffer *RW1* durch Zentrifugation (10'000 rpm, 30 s) und zweimal mit 500 μl *RPE*-Puffer zunächst für 30 s dann für 2 min bei jeweils 10'000 rpm gereinigt. Zum Trocknen der RNA wurde die Säule anschließend ohne Puffer für 2 min bei 14'000 rpm zentrifugiert. Die RNA wurde mit 28 µl RNase-freiem Wasser durch 2 min Inkubation und nachfolgender Zentrifugation für 1 min bei 14'000 rpm aus der Säule in ein neues Gefäß überführt und auf Eis gelagert.

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch mit dem *Ultrospec 2100 pro* und dem *Nanodrop* bestimmt. Für den *Ultrospec* Photometer wurde die Messzelle von *Implen* verwendet, um geringe Probenvolumina ohne Küvette zu messen. Für diese Messzelle wurde der Deckel mit einer "10-fachen-Dilution" verwendet. Als Referenz-Probe wurden 3 µl RNase-freies Wasser und 3 µl von der Probe simultan auf die Messzelle pipettiert.

2.2.10 Zellzyklus-Analyse mittels Fluorescence-activated-cell-sorting

Für die FACS-Analyse wurden 3 Kulturflaschen einer Kontroll-Zelllinie und 3 Kulturflaschen von jeder Kultur mit entsprechender Inhibitionskonzentration angesetzt. Nach der Inhibitionszeit wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche, wie oben beschrieben, abgelöst und gewaschen. Es wurden jeweils 10⁶ Zellen (mittels Neubauer Zählkammer gezählt) bei 1′500 rpm für 2 min zentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis in 1 ml PBS resuspendiert. Während des Ablösens der Kultur wurden tropfenweise 3 ml Ethanol (-20 °C) dazu pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 1 h auf Eis, besser über Nacht bei -20 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (1′400 rpm, 2 min), der Überstand wurde anschließend verworfen, das Pellet aufgelockert und in 940 µl PBS und 40 µl Propidiumiodid (1 mg/1 ml, versetzt mit 10 µl RNase A (10 mg/ml)) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde anschließend für 30 min bei 37 °C oder für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Propidiumiodid ist ein Interkalator und hat eine hohe Affinität für DNA. Bei der FACS-Analyse wird dessen Fluoreszenzintensität, die direkt proportional zum DNA-Gehalt der untersuchten Zellen ist, gemessen.

In der anschließenden FACS-Analyse zeigte der sogenannte Vorwärtsscatter auf der X-Achse die DNA-Menge der untersuchten Zellen an. Man konnte so die einzelnen Phasen des Zellzyklus ableiten und die analysierte Kultur den verschiedenen Zyklusphasen zuordnen: subG₁-Phase (weniger als der diploide Chromosomensatz, Ausdruck einer Apoptose), G₁-Phase (diploider Chromosomensatz), S-Phase (Synthese des doppelten DNA-Satzes) und die G2-Phase (tetraploider Chromosomensatz; Abbildung 4).



Abbildung 4:

Darstellung einer FACS-Analyse am Beispiel von U-CH2. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Zellen, die X-Achse den DNA-Gehalt der gezählten Zellen. Zellen mit einem geringen DNA-Gehalt haben einen einfachen Chromosomensatz (G1-Phase). Zellen mit einem hohem Gehalt an DNA weisen einen doppelten Chromosomensatz (G₂-Phase) auf. Dazwischen gibt es einen Übergangsbereich, in dem die DNA synthetisiert wird (S-Phase). Zu den Zellfragmenten, die sehr wenig DNA enthalten, zählen unter anderem die apoptotischen Körperchen (subG₁-Phase).

Die FACS-Zellzyklus-Analyse wurde nach dem Durchführungsprotokoll des Herstellers an dem Excalibur FACS-Gerät durchgeführt und mit der CellQuest Software ausgewertet. Dazu wählte man den entsprechenden DensityBlot aus, stellte die Messwolke dar und legte ein sogenanntes Messtor ("Gate") fest. Das Koordinatensystem wurde für die Y-Achse entsprechend der Fläche und für die X-Achse entsprechend der Intensität der Signale eingestellt.

2.2.11 Protein-Extraktion

Zur Protein-Extraktion wurden die Zellen wie beschrieben gelöst und in PBS resuspendiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in PBS gelöst und bei 4°C bei 8'000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die Proben wurden dabei konstant auf Eis gehalten. Anschließend wurde der Überstand verworfen und ein Lysepuffer (ca. doppeltes Volumen des Pellets) hinzugegeben.

Zu Beginn der Arbeit wurde die Protein-Extraktion mit dem Lysepuffer RIPA durchgeführt, dann aber im Verlauf die TNT-Lösung verwendet, da die phosphorylierten Proteine nach TNT-Lyse im Western Blot eindeutig besser detektierbar waren. Das Pellet wurde dafür im Lysepuffer gelöst und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (3-5 min). Danach wurde die Lösung aufgetaut und mindestens 10 min lang inkubiert. Nachfolgend wurde die Probe bei 14'000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden neue Reagenzgefäße vorbereitet, entsprechend beschriftet und der Überstand in die Probengefäße überführt.

Für die Konzentrationsbestimmung wurde anschließend die Biorad-Lösung (1:5 verdünnt mit destilliertem Wasser) verwendet. Es wurden jeweils 1 ml Biorad-Lösung in Einmalküvetten pipettiert und dann von jeder Probe 1 μl der Proteinlösung hinzugefügt. Eine Küvette blieb ohne Protein als Negativkontrolle. Nach dieser Messung wurde spektrophotometrisch die Standardkurve für Proteine ausgewählt und als Referenz die Leerprobe gemessen. Für die Berechnung der Konzentration, wurde der Wert bei λ595 nm mal 10 genommen, die Einheit ist μg/μl.

2.2.12 Western Blot

Zunächst mussten die initialen Proben für die Analyse auf die gleiche Konzentration gebracht werden. Dafür wurde als Zielkonzentration 1 µg/µl angenommen und ein bestimmtes Zielvolumen festgelegt. Setzt man z.B. als Zielgröße ein Volumen von 40 µl an, werden folglich 40 µg benötigt; der Ansatz wurde anschließend in einem Ladepuffer wie 4x NuPage verdünnt, wobei in diesem Fall für 40 µl Endvolumen 10 µl von dem Puffer eingesetzt werden. Diese Konzentration wird für jede Probe gleich eingestellt. Dafür wird die festgelegte Proteinmenge, in diesem Fall also 40 µg, durch die Konzentration der Proteinprobe geteilt. Das Ergebnis ist das Volumen der Proteinprobe, welches in 40 µl Endansatz einer Konzentration von 1 µg/µl entspricht. Das fehlende Volumen wird mit dem jeweiligen Lysepuffer auf 40 µl aufgefüllt.

Dann wurden die Proteine in den Proben für 10 min bei 70 °C denaturiert, sie bleiben durch das im Lysepuffer enthaltene β-Mercaptoethanol und dem SDS linear. Für die Elektrophorese benötigt man eine Kammer, einen sogenannten Schlitten und einen Deckel. Die Proben wurden in die 12 Taschen des Bis-Tris-Gels eingefüllt. Die Gele werden durch Abziehen einer weißen Schutzfolie für die Elektrophorese leitend gemacht, in die Kammer gestellt und mit dem Schlitten festgeklemmt. Falls man nur ein Gel laufen lässt, wird eine Gel-Attrappe aus Plastik in die 2. Gelposition mit eingespannt.

Als Laufpuffer wurden 20x MOPS Puffer auf die vorgegebene Konzentration (1x) verdünnt (190 ml Aqua dest. + 10 ml 20x MOPS). Dieser frische Puffer wurde in die

innere Kammer zwischen die Gele gefüllt. Die äußere Kammer wurde mit MOPS-Puffer gefüllt und der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. Eventuell sollten die Geltaschen mittels einer Spritze mit Kanüle gespült werden, damit Luftblasen vermieden werden. In die Taschen des Gels wurden 10 µl der Protein-NuPage-Probe pipettiert. In die erste Spur wurde der Standard als Leiter pipettiert. Danach wurde die Reihenfolge der Proben notiert. Dann wurde der Deckel der Kammer aufgesetzt und die Kabel an dem Elektrophoresegerät angeschlossen. Dieses wurde auf 130-140 V eingestellt. Die Dauer der auftrennenden Elektrophorese war ca. 1h und 20 min.

Für das sogenannte "Blotten", d.h. den Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Membran, benötigte man eine Nitrocellulosemembran (6x8 cm) und 8 Filterpapiere (7x8 cm). Die Membran wurde in einer definierten Ecke markiert und in den Transferpuffer überführt. Anschließend wurden 4 Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran auf die untere Platte gelegt.

Nachdem Proteine im Gel aufgetrennt waren, wurde der Plastikrahmen des Gels vorsichtig auf jeder Seite mechanisch geöffnet. Das Gel wurde geschnitten und vorsichtig abgezogen. Danach wurde das Gel, entsprechend der markierten Ecke auf die Nitrozellulosemembran gelegt. Anschließend wurden weitere 4 Filterpapierlagen und die obere Blotter-Platte aufgelegt. Die Platte wurde dann an das Elektrophoresegerät angeschlossen. Das Gel wurde mit 1 mA/1 cm² mindestens 1 h an den Stromkreis angeschlossen und damit die Proteine auf die Membran überführt. Währenddessen wurde eine 5 %ige Magermilchlösung mit TBS-T hergestellt und die Membran nach Beschriftung für mindestens 30 min bei 37 °C in diese Lösung gelegt, um die Membran bezüglich unspezifischer Bindungen abzublocken. Danach wurde mit TBS-T die weißliche Lösung von der Membran gewaschen.

Die Primärantikörper für die Western Blot Analyse wurden mit TBS-T (5 ml; teilweise mit 5 % Milchpulver) verdünnt und in 50 ml Gefäße gefüllt. Die Inkubation konnte entweder 1 h bei Raumluft oder über Nacht bei 4 °C stattfinden. Danach wurde die Membran in TBS-T 3 mal 5 min gewaschen und mit dem HRP-markierten Sekundärantikörper (Anti-Rabbit oder Anti-Mouse, 1 h Raumtemperatur oder über Nacht) inkubiert. Anschließend erfolgte wieder ein Waschschritt über 3 mal 5 min mit TBS-T.

Für die Entwicklung wurde eine Glasplatte, Filterpapier, Frischhaltefolie und eine Röntgen-Kassette benötigt. Die Membran wurde auf die gereinigte Glasplatte gelegt

und die Flüssigkeit mit dem Filterpapier aufgesogen. Anschließend wurd die Substratlösung angesetzt (1:1 Puffer und Substrat, 150 µl jeweils pro Membran). Diese Lösung wurde auf die Membran pipettiert und mit der Pipettenspitze verstrichen. Die Frischhaltefolie wurde glatt über die Membran gespannt und in die Kassette gelegt. Eine Ecke wurde mit einem Leuchtkleber markiert, damit der Film später wieder passend aufgelegt werden konnte, um den Größenstandard zu markieren. Die Röntgenkassette wurde geschlossen und in die Dunkelkammer gebracht. Dort wurden die Filme aufgelegt, wobei sich die Entwicklungszeiten je nach Antikörper und Proteinmenge auf 30s bis 30 min beliefen. Danach wurde der belichtete Film in das Entwicklerbad (1:5 verdünnt mit destilliertem Wasser) transferiert und solange entwickelt, bis Banden und/oder der Leuchtkleber sichtbar waren. Anschließend erfolgte nach einer Spülung mit Wasser abschließend die Fixierung für 1 min. Falls die Membran nach Entwicklung überentwickelt, d.h. schwarz ist oder verschiedene Antikörper mit ungefähr gleicher Größe verwendet werden kann die Membran durch sogenanntes "strippen" rezykliert werden. Dazu wurde diese zuerst mit TBS-T für 20 min und dann mit 200 mM NaOH für 5 min gewaschen, sowie anschließend mit Aqua dest. für 5 min inkubiert. Danach wurde sie nochmals in TBS-T für 20 min gewaschen; ab diesem Zeitpunkt konnte die Membran mit dem Primärantikörper erneut inkubiert werden.

Bei der Analyse von pRb(S780) konnte bei den ersten Western Blots zunächst keine Bande in der Positivkontrolle dargestellt werden. Daraufhin wurde der Lysepuffer von RIPA auf TNT umgestellt und zur weiteren Verbesserung ein Zwischenschritt mit einem Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff eingeführt. Außerdem wurde zusätzlich zu dem TNT-Lysepuffer ein Proteinase-Phosphatase-Inhibitor-Mix gegeben, der die Serin/Threonin-Phosphatasen hemmt, was sich positiv in der Auswertung des Blots auswirkte.

2.2.13 AlamarBlue

Für die Analyse wurden Zellen in einer 96-Well-Platte ausgesät und bei 37 °C im Brutschrank für 24h wachsen gelassen. Danach wurde in den Vertiefungen der Platte die Inhibition oder Stimulation der Zellen direkt durchgeführt.

Folgende Messpunkte waren für eine Untersuchung notwendig: Kontrolle (unbehandelte Zellen), behandelte Zellen (verschiedene Konzentrationen des Inhibitors) und eine Leerkontrolle (ohne Zellen).

Vor der Messung mit AlamarBlue musste das alte Medium in den Wells verworfen werden. Der Farbstoff *AlamarBlue* wurde 1:10 mit dem Medium vermischt. Für die 96-Well Platte wurde 9 ml Medium und 1 ml AlamarBlue in einem 15 ml Gefäß angesetzt. Diese Lösung wurde in eine kleine Petrischale gegossen, um dann mittels einer 8er Pipette die Vertiefungen mit 100 µl *AlamarBlue*-Medium-Mischung wieder zu befüllen. Wichtig war hierbei, dass keine Bläschen entstehen.

Die so vorbereitete Platte wurde bei 37°C für mindestens 3 h inkubiert. Wenn Zellwachstum stattfindet, wirkt das Medium als eine reduzierte Umgebung, wodurch ein Farbumschlag von *AlamarBlue* nach fluoreszierendem Rot erfolgt.

Wenn kein Wachstum stattfindet erfolgt kein Farbumschlag. Das Medium bleibt blau und ist nicht fluoreszierend.

Die Messung fand bei 570 nm und 600 nm in einem Analysegerät statt. Die Werte wurden ausgedruckt und die Proliferations/Inhibitions-Verhältnisse mit einem frei im Netz verfügbaren Rechner bestimmt: (www.abdserotec.com/colorimetric-calculatorfluorometric-alamarblue.html 18.11.2015)

2.2.14 MTS-Zellproliferations-Assay

Der "CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay" von Promega wurde zu Bestimmung der Zell-Viabilität nach Inhibition verwendet. Dafür wurden mindestens 1'000 Zellen der Chordom-Zelllinien und der Zelllinien MCF7 (Positivkontrolle für Palbociclib) und CAL51 (Negativkontrolle für Palbociclib) [22] in den Platten ausgesät und mit steigenden Palbociclib-Konzentrationen (0–1'000 nmol/L) inkubiert. MTS wurde nach 3 Tagen Inkubation bei 37 °C zum Medium hinzugegeben. Anschließend wurde die Absorption bei 490 nm mit einem Microtiter Plate Reader gemessen [28].

2.2.15 STR-Analyse

Um die Zelllinien U-CH1, U-CH2, U-CH3, U- CH6, U-CH7 und U-CH12 zu genotypisieren, wurde eine single tandem repeat (STR) Analyse mit dem *PowerPlex 16* und *Power Plex ESX 17 Kit* von *Promega* durchgeführt. Für U-CH10 und U-CH11 wurde das *Genome-Lab* Human STR Primer Set Kit von Beckman Coulter und die Amplitaq GOLD DNA Polymerase von Life Technologies verwendet. Die Analyse wurde nach dem Handbuch des Herstellers durchgeführt.

2.2.16 FISH-Analyse (Fluorescence-in-situ-Hybridization)

Die FISH-Analyse wurde an circa 4 µm dicken Schnitten von Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte durch dreimaliges Lösen in Xylol und 100% Alkohol für jeweils 10 min. Danach folgte eine Behandlung in absteigender Alkoholreihe mit abschließendem Waschen in destilliertem Wasser. Anschließend folgte die Vorbehandlung in einem Dampfgarer mit Citratpuffer für 15 min. Für die FISH-Analyse wurden die Kerne durch einen Pepsin- oder Proteinase K-Verdau aufgeschlossen (Dauer: 30 min). Die Digoxigenin-gekoppelten Proben wurden mit Cy3-conjugiertem monoklonalem Maus-Antidigoxigenin-Antikörper (IgG; Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) visualisiert. Biotingekoppelte Proben wurden mit Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertem Avidin (Vector, Burlingame, CA, USA) dargestellt.

Untersucht wurden die Region des *CDKN2A* Gens. Für die Analyse von *CDKN2A* wurde eine *ZytoLight* SPEC CDKN2A/CEN9 DUAL COLOR Sonde von *Vysis/Abbott* verwendet. Schwellenwerte für die Analyse wurden zuvor durch die Hybridisierungen an menschlichen Tonsillen definiert. Die Signale wurden an mindestens 100-200 Kernen an einem *Zeiss Axioskop* Mikroskop ausgezählt, welches mit einer CCD-Kamera ausgestattet und direkt mit der *ISIS* Software verbunden war (*MetaSystems*).

2.2.17 Immunhistochemie

In Paraffin-eingebettetes Nativgewebe oder Zellpellets wurden mit einem Mikrotom in 3-4 µm dünne Schnitte aufgearbeitet und auf einem Objektträger fixiert. Zur weiteren immunologischen Färbung wurden die Schnitte zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Zur weiteren Behandlung gehörte die Demaskierung der Antigene, bevor der Schnitt mit dem Primärantikörper inkubiert werden konnte.

2.2.17.1 Entparaffinierung:

Die Schnitte wurden mindestens 3 mal 5 min in Xylol (abgedeckt mit Alufolie) inkubiert und kurz in 100% Ethanol gespült. Danach folgte eine Überführung in eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 70% Ethanol) für jeweils 5 min. Abschließend erfolgte eine mehrfache Spülung in demineralisiertem Wasser.

2.2.17.2 Vorbehandlungen zur Antigendemaskierung

Schnellkochtopf:

Die Schnitte wurden in kochendem 10mM Citratpuffer pH6,0 in einem handelsüblichen Schnellkochtopf für 20min unter maximalem Dampfdruck inkubiert. Dann wurde der Druck abgelassen, der Topf geöffnet und für 20min abgekühlt. Anschließendes Spülen der Schnitte mit demineralisiertem Wasser.

Pronase:

Bei Handfärbung musste jeder Schnitt mit einem Fettstift umrandet werden. Dann wurden die Schnitte mit 100 µl Pronase für genau 5 min inkubiert. Danach erneute Spülung der Schnitte mit demineralisiertem Wasser.

Alle Schnitte mussten bei Handfärbung vorsichtig mit einem Tuch getrocknet und mit dem Fettstift (PAP-Pen) umrandet werden, um eine optimale Antikörperinkubation zu gewährleisten; anschließend erfolgte eine Spülung in PBS.

2.2.17.3 Primärantikörper

Die verwendeten Antikörper (100 µl pro Schnitt) und Vorbehandlungen sind in der Materialien Tabelle 2.1.6 Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung aufgelistet. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Bei neuen, noch nicht etablierten Antikörpern musste die optimale Verdünnung zunächst über eine Positivkontrolle ermittelt werden. Diese Färbung wurde mehrmals mit unterschiedlichen Konzentrationen und teilweise auch verschiedenen Vorbehandlungen durchgeführt. Danach wurden die Schnitte unter dem Mikroskop betrachtet, um die beste Kombination aus Konzentration und Vorbehandlung zu ermitteln.

2.2.17.4 Nachweisreaktion

Bei allen Schritten wurden 100 µl Primär- und anschließend Sekundärantikörper pro Schnitt in entsprechender Verdünnung verwendet (Verdünnungen mit Antikörper Diluent in Materialien Tabelle 2.1.6 Antikörper).

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter anti-Maus, -Hase oder -Ziege (je nach Ursprung des Primärantikörpers) Antikörper verwendet, welcher für weitere 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schnitt inkubiert wurde. Anschließend wurde der Schnitt in PBS gewaschen und mit Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschritt mit PBS. Für den farbigen Nachweis der gebundenen Antikörper wurde das Substrat der alkalischen Phosphatase verwendet. Dafür wurde als Chromogen eine "RED" Lösung eingesetzt, die von der alkalischen Phosphatase in einen roten Farbstoff umgewandelt wird. Dieser präzipitiert genau an der Stelle, an der der spezifische Primärantikörper gebunden hat. Nach genau 16 min wurde diese Reaktion durch einen weiteren Waschvorgang mit PBS-Puffer gestoppt.

Zum Gegenfärben der Zellkerne wurde Hämalaun verwendet, die Schnitte wurden dazu für 5-10 min bei Raumtemperatur in Hämalaunlösung inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte kurz unter fließendem Leitungswasser abgewaschen, um so die Hämalaun Kern-Färbung zu verstärken.

2.2.17.5 Eindecken

Zuletzt wurden die Schnitte mit einem Deckglas unter Verwendung von Aquatex wässrig eingedeckt. Anschließend ließ man die Schnitte vor der mikroskopischen Auswertung trocknen.

2.2.17.6 Auswertung

Unter dem Mikroskop wurden die Schnitte begutachtet und die Anzahl der positiven Chordomzellen von einem Facharzt für Pathologie semiquantitativ ermittelt. Die Immunreaktivität wurde wie folgt eingeteilt: "Keine Immunreaktivität" (-); "Immunreaktivität bis 30%" (+); "Immunreaktivität von 30% bis 70%" (++) und "Immunreaktivität über 70%" (+++) bezogen auf die Gesamtzahl der analysierten Chordom-Zellen [5,78].

2.2.18 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Der entparaffinierte Schnitt wurde für 3 min in Hämalaun gefärbt und anschließend für 3 min mit Leitungswasser gewässert. Danach wurde der Schnitt in 1% angesäuertes Eosin für 15-30 s gestellt. Nach diesem Schritt wurden die Präparate kurz in Wasser, dann in 80% Ethanol sowie in 100% Ethanol gespült und in Xylol überführt. Abschließend erfolgte eine Versiegelung mit einem Deckglas unter Verwendung von Eukitt.

2.2.19 Azan-Färbung

Die Reagenzien dieser Färbung sind Azokarmin G und Anilinblau-Goldorange. Dabei färben sich die retikulären und kollagenen Fasern blau an. Die entparaffinierten Schnitte wurden zuerst in Azokarminlösung gestellt, mit destilliertem Wasser gespült und die Kerne mit Ethanol gefärbt. Nach dem Beizen und Entfärben des Bindegewebes mit Phosphorsäure wurden die Schnitte mit Anilinblau-Orange gefärbt, mit destilliertem Wasser gespült und die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Abschließend erfolgte, nach Eintauchen in Xylol, das Abdecken des Schnittpräparates durch ein Deckglas mit Eukitt.

2.2.20 Microarray basierte Gen-Expressions-Analyse

Die Analyse wurde nach dem Protokoll von Agilent mit dem Namen "One-color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Quick Amp Labeling) with Tecan HS Pro Hybridization" durchgeführt.

Für die Analyse der Expression der mRNA muss diese, nach Umschreiben in cDNA, mit Cyanine-3 markiert werden. Diese kann dann mit den korrespondieren RNA-Oligonukleotiden auf dem Objektträger des Arrays hybridisieren.

Dazu wurde zunächst die Konzentration mit dem *Nanodrop* und die Reinheit (RIN-Wert, RNA Integrity Number) bestimmt. Diese Bestimmung erfolgte für die Ermittlung des RIN Werts mit dem *Chip Reader 2100 BioAnalyser* unter Verwendung des *Agilent RNA 6000 Nano Assay Kits.*

Dieser Wert trifft eine Aussage über die Reinheit und Integrität der gemessenen RNA. Es können sich Werte zwischen 1 bis 10 ergeben.

Bestenfalls sollten die Proben einen RIN-Wert über 9 haben; bei RIN <7 wird von einer Microarray Analyse abgeraten. Die RIN-Werte sollten in den zu untersuchenden Proben ungefähr gleich groß sein.

Die Konzentration der Ausgangs-mRNA sollte bei mindestens 100 ng/µl liegen. Pro Probe müssen 500 ng mRNA vorhanden sein, allerdings können nur maximal 5 µl der mRNA-Lösung verwendet werden. Falls die mRNA Konzentration zu gering ist, kann man die Probe mit einer *SpeedVac* von der Firma *Christ* konzentrieren.

Nach Umschreiben der RNA in cDNA, wurde diese erneut in cRNA zusammen mit Cyanine-3 markierten CTPs (Cytosintriphosphat=Nukleotid) umgeschrieben und dadurch markiert. Diese cRNA wurde mit dem *QIAgen- RNeasy Mini Kit* aufgereinigt. Mit der zweimaligen Transkription nacheinander kann man auf einfachem Weg RNA markieren.

Anschließend wurde die markierte cRNA in Fragmentationspuffer gelöst und bei 60°C fragmentiert. Die fragmentierte cRNA wurde in Hybridisierungspuffer gelöst und auf den Objektträger in der Hybridisierungskammer pipettiert.

Nach ca. 17 h bei 65 °C in dem Hybridisierungsofen, wurden die Proben entnommen und in Triton X-102 (10%)-Puffer gewaschen. Zur Fluoreszenzmessung wurden die Präparate in den *Agilent SureScan Microarray Scanner* analysiert.

Das gescannte one-color-.tif-Bild ist extrem hochauflösend. Diese Daten wurden in einem zweiten Schritt von der Software *"Feature Extraction (FE)"* ausgelesen. Anschließend wurden die generierten Daten mithilfe des Programms *GeneSpring 12.1* ausgewertet.

2.2.21 Inhibition mit Palbociclib (PD-0332991)

Palbociclib ist ein selektiver Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6. Er hemmt die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb). Wenn Rb hypophosphoryliert vorliegt, kann der Elongationsfaktor 2 (EF2) den Zellzyklus nicht starten.

Palbociclib ist auch als PD-0332991 bekannt. Dieses Reagenz wurde bei *Sigma-Aldrich Inc.* (Missouri, USA) als PD-0332991-isethionate bestellt. Palbociclib wurde in destilliertem Wasser gelöst und in Konzentrationen von 10 nM, 100 nM and 1'000 nM verdünnt. Diese Konzentrationen entsprechen den Angaben aus der Literatur zu Inhibitionsversuchen [22,58]. Die Inkubation mit dem Inhibitor wurde 3 Tage (72 h) lang durchgeführt. Für die Erstellung der IC50-Werte wurde Palbociclib in folgenden Konzentrationen verwendet:

3, 6, 10, 30, 60, 100, 300, 600 und 1'000 nmol/L.

Die Ausgangslösung von dem CDK4/CDK6 Inhibitor Palbociclib hat eine Konzentration von 5 mg/ml. Palbociclib besitzt ein Molekulargewicht von 573,66 g/mol. Daraus lässt sich berechnen, dass der Ansatz eine Molarität von 8,7 nM aufweist. In dem folgenden Pipettierschema (Abbildung 5) ist die Herstellung von verschiedenen Konzentrationsansätzen aus der Ausgangslösung dargestellt.



Abbildung 5:

Verdünnungsreihe des CDK4/CDK6 Inhibitors Palbociclib zur Herstellung von verschiedenen Endkonzentrationen im Medium. Ausgangslösung (Stock) ist das gelieferte Pulver, gelöst in destilliertem Wasser nach dem Protokoll des Herstellers. Daraus ergibt sich eine 8,7 nM Lösung.

2.2.22 Inhibition mit Abemaciclib (Ly2835219)

Abemaciclib ist ein alternativer selektiver CDK4/CDK6 Inhibitor und wurde von *Sellekchem* erworben [31]. Abemaciclib wurde ebenso in Wasser gelöst und für die IC50-Wert-Bestimmung in den Konzentrationen 3, 6, 10, 30, 60, 100, 300, 600, 1'000, 10'000 nmol/L verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Chordom-Kollektiv

3.1.1 Deskriptive Statistik

Die Chordom-Gewebebank enthält aktuell Gewebematerial von 43 Patienten mit unterschiedlichen Lokalisationen des Primärtumors, welche im Zeitraum von 1986 bis 2014 archiviert wurden. Das Kollektiv besteht aus 26 männlichen und 17 weiblichen Patienten. Der Median des Alters beträgt 69 Jahre (17 bis 84 Jahre). Die Tumorgrößen der Chordome betrugen zwischen 0,5 bis 50 Zentimeter (Abbildung 2). Die Chordome des Kollektivs waren wie folgt auf die Wirbelsäule verteilt: Am Clivus (Schädelbasis; n=5), zervikal und thorakal (n=7), lumbal (n=6) und in der Sakrumregion (n=24). Eines der Chordome zeigte eine extraaxiale Lokalisation im Nasenseptum (Abbildung 6). Bei dem Vergleich der Größen zeigte sich ein Zusammenhang mit der Lokalisation: Die Clivus-Chordome waren deutlich kleiner als die Sakrum-Chordome. Das größte Chordom maß 50 cm und war im Bereich des Sakrums lokalisiert (Abbildung 2, Abbildung 7).



Lokalisationsverteilung Chordome Ulm 1986-2014

Abbildung 6:

Lokalisationsverteilung der Chordome des Ulmer Kollektivs.

Es wird eine Prädominanz der sakralen Chordome deutlich, sowie die Besonderheit eines extraaxialen Chordoms der Nasenscheidewand.



Lokalisation und der durchschnittlichen Größe der Chordome. With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]

3.1.2 Histologie

Die Diagnose und die Subtypisierung wurde anhand der "WHO 2013 Klassifikation" durchgeführt. 23 von den 43 Chordomen wurden als reine 'not otherwise specified' (NOS) Subtypen mit klassischer physaliformer Zytologie klassifiziert. Ein sakrales und ein zervikales Chordom zeigten fokale Lipom-ähnliche Areale. Diese Läsionen werden als benigne notochordale Tumoren bezeichnet, die als Vorläuferläsionen von Chordomen diskutiert werden (Abbildung 3F).

In der Histologie wurden in 20 Chordomen fokal chondroide (n=4), Nierenzellkarzinomähnliche (n=6) und Leberzellkarzinom-ähnliche (n=3) Differenzierungen gefunden. Sechs der Chordome zeigten anaplastische Abschnitte (Abbildung 8). Ein Chordom zeigte durchweg eine chondroide Differenzierung.

Diese histologischen Subtypen sind unabhängig von der Lokalisation des Chordoms entlang der Wirbelsäule verteilt. Also scheint es keinen Zusammenhang zwischen histologischem Subtyp und der Lokalisation zu geben. 3. Ergebnisse



Abbildung 8:

Histomorphologische Varianten von Chordomen und Morphologie des benignen notochordalen Tumors (H.E.-Färbung). Größenstandard: 100μm.

- **A:** Klassische Variante, nicht anders spezifiziert (not otherwise specified, NOS) Subtyp (ID: 17); **Insert**: Immunhistologische Färbung mit einem Brachyury-spezifischen Antikörper.
- B: Chondroider Subtyp (ID: 1).
- C: Nierenzellkarzinom-ähnlicher Typ (ID: 28).
- D: Leberzellkarzinom-ähnlicher Typ (ID: 29).
- E: anaplastischer Typ (ID: 33).
- F: Benigner notochordaler Tumor (ID: 9).

With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]

3.1.3 Immunhistologie

Alle Chordomproben exprimierten in der Immunhistologie konstant nukleär Brachyury (Abbildung 9).

Außerdem zeigten die meisten der Proben eine Koexpression für das S100-Protein, das epitheliale Membranantigen (EMA) und für Vimentin (Tabelle 2).



Abbildung 9:

H.E.-Färbung (links) und Immunhistochemie mit einem spezifischen Antikörper gegen Brachyury (rechts) eines Chordoms. Man erkennt die deutliche Färbung der Zellkerne. Größenstandard: 100μm. With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]

Tabelle 2:

Zusammengefasste klinische, immunhistologische und therapeutische Daten. Jede Probe war positiv für Brachyury. (NOS, not otherwise specified, Standardtyp eines Chordoms; ECM, extrazelluläre Matrix; ID, Identifikationsnummer; NA, nicht analysiert; R-Status, Resektions-Status). With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]

(-	usation Nector	bei p.	e in		ıyury Protein	Tro-	stasen Historia	eve		Isstat	ntihe.	tus	d,			Irgie	ahi.	duning
Nasensentum	oka	iescl	Ulter	iröß	Iraci	100	MA	Meta. Rezic	Ú-67	CM	epei	resal	l-Sta	ubty	d	Q	hiru	3est1	
e wasenseptum	~		84	24	~~	<u>~</u> ~	4	~ ~	~	-4	7	5.00		Chondroid	keine	~		~	Ľ
r ne			35	0.4			+				_	5,18	×	NOS	keine	2	2	2	
Clivus			45	2,3			Т			2		2,72	×	NOS	hepatoid	3	NA	NA	
Not?			49	0,9								5,04	x	NOS	keine	4	3	2	
100			81	1,4								3,19	x	NOS	keine	5	NA	NA	
			79	1,7								0,47	x	NOS	anaplastisch	6	2	3	
Zervikal			75	3			Τ			2		8,25	1	NOS	keine	7	4 +DS	0	
200			57	8								6,23	1	NOS	chondroid	8	NA	NA	
2	1.		64	4,3								3,22	x	NOS	lipomähnl.	9	6 +DS	0	
Zervikal/Thorakal	_		47	7								2,01	×	NOS	chondroid	10	NA	NA	
0.65			17	3								1,18	x	NOS	keine	11	NA	NA	
5	1		77	2			Т					0,28	x	NOS	keine	12	5	0	
	1.1		50	1,8			+					1,35	x	NOS	keine	13	4	0	
			41	9			Т					11,34	x	NOS	hepatoid	14	NA	NA	
			77	5			Т					12,86	0	NOS	keine	15	6 +DS	1	
22	i		75	4,5			Т					7,36	x	NOS	keine	16	DS	1	
a la			72	1,5			Т					5,31	0	NOS	keine	17	4	0	
			69	3			Т					4,63	×	NOS	keine	18	6 + DS	1	
Thorakal			44	3			+					4,07	×	NOS	keine	19	0+5	1	
			79	12			Т					NA	x 1	NOS	linomähnl	20	NA	NA	
			50	10			Т					15.04	0	NOS	renal	21	7	0	
			74	7								NA	×	NOS	anaplastisch	23	NA	NA	
-05			45	7			Т					19,5	1	NOS	keine	24	8	0	
			68	6			Т					3,67	1	NOS	anaplastisch	25	7	1	
			69	17								1,88	1	NOS	renal	26	8+9	0	
			45	20						2		1,03	1	NOS	renal	27	9 + RE	1	
			70	13,6								3,96	0	NOS	renal	28	8	0	
			76	6								12,6	×	NOS	hepatoid	29	8	1	
Lumbal			74	13			Т			2		4,64	1	NOS	renal	30	8 + RP	0	
Lumbar			71	18								1,86	1	NOS	chondroid	31	10	0	
			70	3						2		0,04	×	NOS	keine	32	2	0	
(a)			67	6						2		5,26	×	NOS	anaplastisch	33	7	1	
			75	6,5								6,73	1	NOS	keine	34	7	0	
			49	5,2								2,65	NA	NOS	keine	35	8	1	
Sakrai			78	2,5								0,48	X 1	NOS	keine	30	вр 7	1	
ALL S			54	45								3.64	*	NOS	renal	38	,	4	
ted 1			47	2						2		3.6	x	NOS	keine	39	PAL	2	
NJ S			29	2,9								3,01	1	NOS	keine	40	7	1	
¥ f			71	8						2		0,77	0	NOS	keine	41	7	0	
//			83	50								0,54	2	NOS	keine	42	7	0	
ý			79	15								0,07	0	NOS	anaplastisch	43	8	0	

weiblich	IHC positiv	Ki-67<10%	ECM≥50%	Lebensstatus: lebend
männlich	IHC negativ	Ki-67≥10%	ECM<50%	Lebensstatus: tot

keine Metastasen /Rezidive	1	Nasenseptumsresektion	DS	Dorsale Spondylodese
eine Metastase /ein Rezidiv	2	Transnasale Resektion	RE	Rektumexstirpation
>1 Metastase />1 Rezidiv	3	Transsphenoidale Kürretage	RP	Rektotomie posterior
	4	Hemilaminektomie	BP	Biopsie
	5	Laminektomie	PAL	Palliative Tumorresektion
	6	Korporektomie	0	Keine Bestrahlung
	7	Partielle Sakrumresektion	1	Bestrahlung
	8	Sakrumresektion	2	Schwerionen
	9	Abdominoperineale Resektion	3	Protonen
	10	Laparotomie	4	Photonen

3.1.4 Metastasen und Rezidive

In unserer Kohorte wurden bei 10 von 43 Patienten (23%) eine oder mehrere Metastasen nachgewiesen. Diese waren in der Lunge (n=5), in Lymphknoten (n=3) und in der Leber (n=3) lokalisiert. Die Metastasen traten in unserem Kollektiv nur bei zervikalen, zervikal/thorakalen und sakralen Chordomen auf (Abbildung 10, Tabelle 2). 21 (49%) Patienten zeigten nach OP ein lokales Rezidiv. Diese traten in unserem Kollektiv zervikal, zervikal/thorakal, lumbal und sakral auf (Abbildung 10, Tabelle 2). Bei Clivus- und thorakalen Chordomen wurden keine Metastasen oder Rezidive nachgewiesen. Die resezierten Tumoren wurden nach der histologischen Aufarbeitung der Resektionsränder hinsichtlich des R-Status wie folgt klassifiziert: komplette Resektion, R0 (n=7); fragmentiertes Gewebe, keine Aussage über den Resektionsrand, Rx (n=22); mikroskopische Reste von Chordomgewebe im Resektionsrand, R1 (n=12); makroskopische Reste von Chordomgewebe im Resektionsrand, R2 (n=1). Der Rx-Status war, verglichen mit den anderen Lokalisationen, am häufigsten bei Clivus- und thorakalen Chordomen nachweisbar (Abbildung 10).

3.1.5 Überleben und Therapie

Der Nachbeobachtungszeitraum ist von 40 Patienten vorhanden (0,5 bis 234 Monaten) (Abbildung 11, Tabelle 2). Die klinischen Daten mit Angaben zur chirurgischen Therapie und der adjuvanten Radiotherapie sind ebenso in Tabelle 2 dargestellt. Von 34 Patienten konnten Informationen zu der Bestrahlung erhoben werden: 17 Patienten wurden nicht bestrahlt, 12 haben eine Bestrahlung erhalten. In drei Fällen wurden Schwerionen eingesetzt. Eine Photonen- oder Protonenbehandlung wurde jeweils ein Mal durchgeführt. Die chirurgischen Interventionen waren von der Lokalisation des Chordoms abhängig. Die Clivus-Chordome wurden durch transnasale oder transsphenoidale Resektionen entfernt, während die Chordome der mobilen Wirbelsäule durch (Hemi-)Laminektomien oder gesamte Korporektomien operiert wurden. Diese mussten anschließend durch eine dorsale Spondylodese stabilisiert werden. Die Sakrum-Chordome wurden entweder komplett oder als Teilresektionen entfernt. Die Zugangswege waren entweder abdomino-perineal oder durch eine Laparotomie.





Abbildung 10:

Säulendiagramme der topografischen Lokalisation im Bezug auf Metastasen, Rezidive und Resektions-Status. With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]



Chordome Ulmer Kollektiv 1986-2014

Abbildung 11:

Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben der 40 Chordom-Patienten. Das mediane Überleben liegt bei 8,25 Jahren. With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]

3.1.6 Korrelation von histopathologischen Parametern mit den klinischen Daten

Mit dieser Korrelation wurde nachgewiesen, dass die Chordompatienten mit Metastasierung ein signifikant verringertes Gesamtüberleben aufzeigen (p<0,01; Abbildung 12).

Der positive R-Status hatte einen Effekt auf die Metastasierungsrate, das bedeutet, dass nicht komplett entfernte Chordome häufiger metastasieren. Eine Korrelation mit der Metastasierung und dem R-Status bestätigte, dass R0 resezierte Chordome keine Metastasen entwickelten (im Vergleich zu R1 und R2: p=0,0284; Abbildung 12). Außerdem zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Rezidivanzahl und der Metastasierungsrate (Abbildung 12).

In der Ulmer Kohorte konnte bezüglich des Alters der Patienten kein Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt werden. Es konnte zudem kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Rezidiven und dem R-Status nachgewiesen werden. Die histologischen Subtypen zeigten keinen signifikanten Einfluss in Bezug auf das Gesamtüberleben. In der Kaplan-Meier-Kurve kann man lediglich einen Trend erkennen, dass der anaplastische Typ eine schlechtere Prognose bezüglich des Gesamtüberlebens aufweist.

Nach der mikroskopischen Analyse des Kollektivs wurde für jede Probe der extrazelluläre Matrixgehalt (ECM) bestimmt. Dieser wurde durch eine Azan-Färbung

3. Ergebnisse

ermittelt. Ein extrazellulärer Matrixgehalt von ≥50% wurde als matrixreich, und ein Gehalt <50% als matrixarm definiert (Abbildung 13). Diese beiden Kategorien wurden mit dem Gesamtüberleben korreliert, wobei sich ein statistisch signifikant geringeres Überleben für matrixarme Tumoren zeigte (Abbildung 14).

Die Proliferation wurde mit dem Ki-67 Antigen durch eine immunhistologische Färbung bestimmt. In dem neu etablierten Chordom-Kollektiv, hatte der Ki-67 Index Werte von unter 1% bis 50% mit einem Median von 5%. Dieser korrelierte negativ mit dem Gesamtüberleben bei einem Schwellenwert von 10% . Bei einem Wert ≥10% verliefen die Kaplan-Meier-Kurven statistisch signifikant unterschiedlich (p≤0,05), wobei eine höhere Proliferation und ein schlechteres Gesamtüberleben zusammenhing. Bei einer Stratifizierung des Index in 1%, 5% und 10% bestätigte sich ebenfalls ein proliferationsabhängig schlechteres Überleben für Chordompatienten in unserem Kollektiv (Abbildung 15).

Weiter zeigte sich eine signifikante Korrelation des Ki-67 Index mit dem ECM-Gehalt (p≤0,05), d.h. eine höhere Proliferation ging mit weniger extrazellulärer Matrix einher. Ebenso zeigte sich ein Zusammenhang zwischen höherer Proliferation (Ki-67≥10%) und Metastasierung (p≤0,05; Abbildung 16).



Abbildung 12:

A: Kaplan-Meier-Kurve für Metastasen vs. keine Metastasen.

B: XY-Flächen Darstellung der Korrelation von Metastasen mit Rezidiven (p<0,03).
C: Säulendiagramm von Metastasen und R-Status. Hier wurden nur n=9 Metastasen verwendet, da bei einem Patienten mit Metastase kein R-Status zur Verfügung stand.

With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]



Abbildung 13:

Matrixreicher und matrixarmer Chordomtyp. H.E.-Färbung (links), Azan-Färbung (rechts); Größenstandard: 250 μm (links) und 200 μm (rechts). **A:** Matrixreicher Typ (ID: 42). **B:** Matrixarmer Typ (ID: 3), als intrinsische Positivkontrolle kann man in der unteren linken Ecke die positive Azan-Färbung der Tumorkapsel erkennen. With kind permission of Springer Science and Business Media. **[80]**



Abbildung 14:

Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des extrazellulären Matrixgehaltes <50 % und ≥50 %. With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]



Abbildung 15:

Ki-67 Immunhistologie. Größenstandard: 100 μm. **A**: Chordom mit niedrigem Ki-67 Index (ID: 35). **B**: niedriger Ki-67 Index (ID: 32) Kaplan-Meier-Kurve in Abhängigkeit des Ki-67 Index:

C: <10% und $\geq 10\%$. D: <1%, >1%-10% und $\geq 10\%$. With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]



Abbildung 16:

Die Säulendiagramme stellen den Zusammenhang zwischen dem Ki-67 Index und dem Auftreten von Metastasen (A), sowie dem ECM-Gehalt dar (B). With kind permission of Springer Science and Business Media. [80]

3.2 Chordom-Zelllinien

3.2.1 Charakterisierung von Chordom-Zelllinien

Im Labor des Instituts für Pathologie der Universität Ulm wurden 8 Chordom-Zelllinien nach Standardprotokoll etabliert (siehe Material und Methoden). Ebenso wurden STR-Analysen von den Primärtumoren und den Zelllinien durchgeführt, um die Herkunft der Zelllinien von dem entsprechenden Parentaltumor zu bestätigen.

Die Linien U-CH1 und U-CH2 sind bereits publiziert; U-CH1 war die erste Chordom-Zelllinie weltweit und wurde im Jahr 2001 publiziert. 2011 wurde die zweite Ulmer Chordom-Zelllinie U-CH2 publiziert. Diese beiden Zelllinien stammen aus Sakrum-Chordomen.

Die neu etablierten Chordom-Zelllinien sind: U-CH3, U-CH6, U-CH7, U-CH10, U-CH11 und U-CH12. Diese wurden ebenfalls aus Gewebe von Sakrum-Chordomen etabliert. Da die Zelllinien an die Chordoma Foundation weitergegeben wurden, kann man dort zusätzliche Informationen für die Linien U-CH1, U-CH2, U-CH10 und U-CH11 erhalten und diese Zelllinien bei Bedarf auch dort bestellen.

Alle 8 Chordom-Zelllinien sind stabil und zeigen die typische Zytologie mit einem klassischen physaliformen Zytoplasma (Abbildung 17).

Mittels Western Blot Analyse konnte auf Proteinebene die Expression von Brachyury in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Brachyury erscheint als Bande mit einer Größe von 47 kDa. Als Negativkontrolle wurde die Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo2 verwendet (Abbildung 18).

Die Expression von Brachyury konnte auch immunzytologisch mit konstanter Positivität der Zellkerne bestätigt werden (Abbildung 19).

Die Verdopplungszeiten der Chordom-Zelllinien betrugen zwischen 2 Tagen (U-CH1) und 14 Tagen (U-CH6, U-CH10; Tabelle 3).

3. Ergebnisse



Abbildung 17:

Inversionsmikroskopische Bilder der Chordom-Zelllinien U-CH1, U-CH2, U-CH3, U-CH6, U-CH7, U-CH10, U-CH11 und U-CH12. Die Zellen zeigen die für Chordome typische physaliforme Zytologie. Größenstandard: 100μm. Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]



Abbildung 18:

Ergebnis der Western Blot Analyse von 8 Chordom-Zelllinien, die alle eine Brachyury Expression bei 47 kDa zeigen. Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]



Abbildung 19:

Immunzytologische Färbung für Brachyury von allen Chordom-Zelllinien nach Paraffineinbettung. Man erkennt die starke Färbung der Zellkerne. Größenstandards: 100µm.

Tabelle 3:

Zusammengefasste Daten der Patienten und der entsprechenden Chordom-Zelllinien. U-CH3, U-CH6, U-CH7 wurden aus Gewebe von A. Flanagan, UCL, London, UK etabliert. <u>Abkürzungen:</u> NOS= Not otherwise specified; renal= Nierenzellkarzinom-ähnlich; m=männlich, w= weiblich; NA= Nicht erhoben; R=Rezidiv, P=Primärtumor, M=Metastase (Haut)

		Klinisch	e Daten		Kinetik			
Zelllinie	Lokali- sation	Primär- tumor/ Rezidiv	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Größe in cm	Histologie des Primarius	Gewebe erhalten	Verdopp- lungszeit in Tagen
U-CH1	Sakrum	R	m	45	20	NOS / renal	8/1998	2
U-CH2	Sakrum	Ρ	w	70	13,6	NOS / renal	9/2000	4
U-CH3	Sakrum	Р	w	65	11	NOS	6/2010	8
U-CH6	Sakrum	М	m	NA	NA	NOS	11/2010	14
U-CH7	Sakrum	Ρ	m	67	9	NOS	5/2011	7
U-CH10	Sakrum	R	W	74	13	NOS / renal	7/2000	14
U-CH11	Sakrum	Ρ	m	71	8	NOS	9/2012	10
U-CH12	Sakrum	Р	m	83	50	NOS	1/2013	7

Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

Die CGH-Daten der Zelllinien (für die Chordom-Zelllinien U-CH1, U-CH2, U-CH3, U-CH6, U-CH7 und U-CH10 bereits in der Doktorarbeit von Tsepo Goerttler aus dem Institut der Universität UIm beschrieben) zeigen ebenso wie publizierte Daten mit Chordomgewebe, dass die Chordom-Zelllinien rekurrente Aberrationen auf genomischer Ebene aufweisen. Die Zugewinne und Verluste von chromosomalem Material sind in Tabelle 4 dargestellt Außerdem zeigt Abbildung 20 die typischen Aberrationen von Chordomen. Rekurrente Zugewinne wurden auf Chromosom 7q (75%), Verluste auf Chromosom 3 (75%), 9p und 10p (jeweils 60%) nachgewiesen. Über die FISH-Analyse mit einer spezifischen Sonde für *CDKN2A* konnte festgestellt werden, dass bei den Chordom-Zelllinien eine 50%ige bis 86%ige Deletion dieser Region auftritt. Die Chordom-Zelllinie U-CH10 wies in dieser Untersuchung eine biallelische Deletion auf. Durch eine parallele Analyse des Parentaltumors der jeweiligen Linie konnte ebenso gezeigt werden, dass dieser *CDKN2A*-Verlust schon in den Primarien der jeweiligen Zelllinien vorlag (Tabelle 4).

Tabelle 4:

Detaillierte CGH Karyogramme der Chordom-Zelllinien, wie in Abbildung 20 gezeigt. (Gemäß ISCN: International System for Human Cytogentic Nomenclature) Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

	Zugewinn	Verlust
U-CH1	7p11-p22; 7q11-q36	1p21-p36.3; 3p11-p26; 3q11-q29; 4q13- q25; 9p13-p24; 10p11-p15; 10q11-q26; 11p11-p15; 11q11-q25; 14q11-q32.3; 18p11-p11.3; 18q11-q23; 22q11-q12.3
U-CH2	1p36.1-p36.3; 7p11-p22; 7q11-q36; 12q11-q13.3; 15q11-q26.3; 19q11- q13.3; Xq21.1-q28	1p11-p33; 3p11-p26; 6p11-p25; 6q11-q22; 8p11.1-p23; 9p11-p24; 9q11-q34.3; 10p11-p15; 11p11.2-p15; 17p11.2-p13; 20p11-p13
U-CH3	1q21-q25; 4q21-q36; 7p11-p22; 7q11- q36; 12q11-q13.3; 16q12.1-q22; 17p11-p13; 17q11-q26	1p21-p31; 3p11-p26; 3q11-q29; 9p11-p24; 9q11-q34; 10p11-p15; 10q11-q26; 13q11- q34; 21q11.2-q22.3
U-CH6	1q21-q25; 7q11-q11.2; 7q33-q35; 12p11-p13.2; 12q11-q12; 18p11-p11.2	
U-CH7	1q21-q22; 6q25-q27	1q42-q44; 3p11-p36; 3q11-q25.1; 9p23- p24; 10p11-p15; 10q11-q26; 18p11-p11.3; 18q11-q23
U-CH10	1q11-q44; 5q11-q35.5; 7p11-p22; 7q11-q36; 13p31-p34; 15q21-q26	3q13.1-q29; 10p11-p15; 10q11-q26
U-CH11	1q21-q44; 5q14Q21; 8q11-q24	3p11-p26; 6q14-q27; 11q23-q25; 12p12- p13; 13q11-q34; 18q22-q23
U-CH12	7p11-p22; 7q11-q36; 12p11-p13.3; 12q11-q24; 17p11-p13; 18p11-p11.3; 19p11-p13.3	3q13.2-q29; 9p11-p24

Chordom-Zelllinien CGH-Daten



Abbildung 20:

Ideogramm der CGH-Daten der 8 Chordom-Zelllinien im Überblick. Jede Zelllinie entspricht einer Farbe. Die vertikalen Linien auf der linken Seite des Chromosoms entsprechen Verlusten und diejenigen rechts davon entsprechen Zugewinnen des chromosomalen Materials. Der Pfeil markiert die CDK6 Region auf Chromosom 7q und die CDKN2A Region auf Chromosom 9p.

Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

Durch die mRNA-Expression Analyse zeigte sich, dass die Chordom-Zelllinien eine hohe Expression von typischen Markern wie Brachyury, Kollagen 2A1 und CD24 auf mRNA-Ebene aufwiesen. Diese Marker sind, im Vergleich zu den Daten des NCI-60 Panels, in allen Linien statistisch signifikant höher exprimiert. Das NCI-60 Panel ist eine Sammlung von mRNA-Expressionsdaten aus Zelllinien unterschiedlicher Entitäten. Dieses Panel steht in der GEO Database von NCBI frei zur Verfügung (Abbildung 21). Diese NCI-60 Expressionsdaten wurden, wie unsere Proben, mit der gleichen Plattform erstellt und ausgewertet. Die Expressionsdaten wurden auch dazu verwendet, eine

3. Ergebnisse

unüberwachte Clusteranalyse mit dem NCI-60 Panel durchzuführen. Die Bedingungen für die Analyse waren hierarchisch (nicht-gemittelt), euklidische Konditionen mit zentraler Verbindungsregel. Die Chordom-Zelllinien stellten sich gemeinsam aufgrund der höheren Ähnlichkeit der Daten, als ein Block vor dem Hintergrund der anderen Zelllinien dar (Abbildung 22). Die Daten der mRNA-Analyse sind frei verfügbar unter der GEO-Accession-Nummer GSE68497.

Zusätzlich wurden eigene Expressionsdaten einer Knorpel-Zelllinie aus einer Bandscheibe mit in den Vergleich eingeschlossen. Diese Knorpel-Zelllinie wurde dazu zusammen mit unseren Chordom mRNA-Datensatz analysiert. Außerdem wurden Daten von Chondrozyten, Liposarkomen und pleomorphen Sarkomen in die Analyse integriert. Diese Linien stammen einerseits aus dem Labor der Pathologie Ulm (Knorpel-Zelllinie) und aus weiteren verschiedenen Laboren, wobei diese Daten ebenfalls frei verfügbar sind (Accession-Nummern: GSM737457, GSM737456, GSM363625, GSM1210480, GSM1210481, GSM1210482). Durch diese zusätzliche Clusteranalyse zeigte sich, dass die Herkunft der mRNA-Daten der Linien keinen Einfluss auf die erste Clusteranalyse hatte. In dieser Analyse bildeten die Chordom-Zelllinien erneut eine gemeinsame Gruppe. Im Gegensatz dazu bildet die Chondrozyten-Zelllinie zusammen mit den mRNA-Daten der Chondrozyten sowie den Sarkom-Zelllinien eine eigene Gruppe. Diese Ergebnisse belegen die hohe Ähnlichkeit der Chordom-Zelllinien auf mRNA-Expressionsebene und bestätigen damit direkt die Clusteranalyse mit dem NCI-60 Panel (Abbildung 22).



Abbildung 21:

mRNA-Expressionsdaten der Chordom-Zelllinien dargestellt in Box Plots für Brachyury, Kollagen 2A1 und CD24.

Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

3. Ergebnisse



Abbildung 22:

A: Unüberwachte Clusteranalyse der mRNA-Expressionsdaten der 8 Chordom-Zelllinien. Das T-Gene (codiert für Brachyury) ist überexprimiert (rot).

B: Clusteranalyse von Chordom-Zelllinien, Chondrozyten-, Liposarkom- und Sarkomdaten aus der GEO-Datenbank und mit eigenen Daten einer Knorpel-Zelllinie (etabliert aus einer Bandscheibe).

Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]
3. Ergebnisse

3.2.2 Analyse des CDK4/CDK6 Signalwegs in den Chordom-Zelllinien

Wie oben bereits beschrieben zeigen die Zelllinien eine häufige Deletion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9, einschließlich der Region 9p21.3. Diese Region enthält unter anderem das Gen *CDKN2A*, welches für das p16-Protein codiert. p16 ist ein natürlicher Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen.

Die Ergebnisse der CGH-Analyse stimmen mit den publizierten CGH-Daten überein, da diese Deletion für die meisten Chordome auch *in situ* beschrieben wird (Tabelle 5). Die Daten zeigen in 75% der Fälle Zugewinne von chromosomalem Material in der Region 7q21.2, welche das CDK6 Gen beinhaltet. Aufgrund dieser genetischen Daten und aberranter Muster wurden die weiteren Untersuchungen auf die Moleküle des CDK4/CDK6 Signalwegs fokussiert. In der mRNA-Expressions-Analyse zeigte sich eine Expression der Zellzyklus Moleküle CDK4, CDK6 und Rb, wobei auf mRNA-Ebene CDK6 höher als CDK4 exprimiert ist. Die mRNA-Expression von p16 ist dagegen niedrig. Anschließend wurden diese Moleküle mittels Western Blot auf Proteinebene analysiert. Während alle Zelllinien eine positive Bande für CDK4 und eine stark positive Bande für CDK6, konnte das Protein p16 bei keiner Zelllinie nachgewiesen werden. Für diese Untersuchungen wurde die HeLa-Zelllinie als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 23A).

3. Ergebnisse

Tabelle 5:

Ergebnisse der FISH-Analyse des CDKN2A Status der 8 Chordom-Zelllinien und deren Parentaltumoren (nach dem International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)). Prozentangaben sind als Signalverhältnisse zwischen der CDKN2A Region und dem Zentromer 9 angegeben.

<u>Abkürzungen</u>: Nuc ish = nuclear in situ hybridization; NA= Nicht analysiert; kursiv =disomer Status; hervorgehoben =Verlust von CDKN2A im Vergleich zu Zentromer 9; standard = Zugewinne von CDKN2A im Vergleich zu Zentromer 9. Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

	Chordom-Zelllinie	Parentaltumor
U-CH1	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=14%	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=8% nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=54% nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=34%
	nuc ish(CDKN2AX1;CEN9X3)=26%	nuc ish(CDKN2Ax2;CEN9X1)=4%
U-CH2	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=22%	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=48%
	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=60%	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=34%
	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=18%	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=16%
		nuc ish(CDKN2Ax2;CEN9x3)=2%
U-CH3	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=14%	NA
	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=56%	
	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=30%	
U-CH6	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=44%	ΝΑ
	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=22%	
	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=16%	
	nuc ish(CDKN2Ax4;CEN9x2)=8%	
	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x3=6%	
	nuc Ish(CDKN2AX2;CEN9X4)=4%	
U-CH7	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=40%	NA
	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=40%	
	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=20%	
U-CH10	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=0%	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=2%
	nuc ish(CDKN2Ax0;CEN9)x1=36%	nuc ish(CDKN2Ax0;CEN9x1)=24%
	nuc ish(CDKN2Ax0;CEN9)x2=46%	nuc ish(CDKN2Ax0;CEN9x2)=54%
	nuc ish(CDKN2Ax0;CEN9)x3=19	nuc ish(CDKN2Ax0;CEN9x3)=12%
		nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=6%
U-CH11	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=38%	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=30%
	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=46%	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=24%
	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=4%	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=10%
	nuc ish(CDKN2Ax2;CEN9x1)=12%	nuc ish(CDKN2Ax2;CEN9x1)=32%
		nuc ish(CDKN2Ax3;CEN9x2)=4%
U-CH12	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=12%	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x2=38%
	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=64%	nuc ish(CDKN2A;CEN9)x1=38%
	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=22%	nuc ish(CDKN2Ax1;CEN9x2)=2%
	nuc ish(CDKN2Ax2;CEN9x1)=2%	nuc ish(CDKN2Ax2;CEN9x1)=8%
		nuc ish(CDKN2A;CEN9)x4=8%
		nuc ish(CDKN2Ax2;CEN9x3)=4%
		HUCISH(CDNNZAXS,CENSXZ)-Z%







Abbildung 23:

A: Ergebnis der Western Blot Analyse von 8 Chordom-Zelllinien für p16, CDK4 und CDK6, verglichen mit der Zelllinie HeLa.

B: Schema des defizitären CDK4/CDK6 Signalwegs mit der Darstellung der fehlenden p16 Expression und der verstärkten Expression von CDK4/CDK6, Rb und pRb (schwarze Pfeile). Angriffspunkt des von Pfizer entwickelten Palbociclib sind die cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6. Nach Inhibition nimmt die pRb-Expression ab (roter Pfeil). **C**: Inhibitions-Assay von 8 Chordom-Zelllinien für 3 Tage mit 100 nM und 1'000 nM Palbociclib.

Die erste Reihe zeigt den konzentrationsabhängigen Abfall der pRb-Expression, die zweite Reihe zeigt die gleichbleibende Rb-Expression. β -Actin wurde als Lade-Kontrolle verwendet.

Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

3.2.3 Inhibition der Chordom-Zelllinien mit Palbociclib

Diese molekularen Daten zeigten, dass der CDK4/CDK6 Signalweg aufgrund des generell nachweisbaren Verlustes von p16 in den Zelllinien aktiv ist. Der CDK4/CDK6-abhängige und durch p16 freigeschaltete Signalweg kann durch den CDK4/CDK6 Inhibitor Palbociclib gehemmt werden (Abbildung 23B). Die Cyclinabhängigen Kinasen 4 und 6 phosphorylieren das Retinoblastom-Protein (Rb) vor allem an Serin 780. Daher wurde pRb(S780) im Western Blot als Kontroll-Molekül für die Inhibitionsversuche verwendet. Nach der Inhibition aller Zelllinien mit 100 nM und 1'000 nM Palbociclib für 3 Tage zeigte der Western Blot eine entsprechende Abnahme der Expression von pRb(S780) in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration. U-CH1, U-CH2, U-CH6, U-CH7, U-CH10 und U-CH11 sind in den höchsten Palbociclib-Konzentrationen komplett negativ für pRb(S780). Rb zeigt dagegen auch in den höchsten Palbociclib-Konzentrationen eine erhaltene Proteinexpression (Abbildung 23C). Diese Daten wurden für U-CH1 immunzytologisch an Paraffinschnitten bestätigt. Dafür wurden Paraffinblöcke aus der originalen U-CH1 und der 3 Tage mit 1'000 nM Palbociclib inhibierten U-CH1 hergestellt. Die Immunhistochemie zeigte eine deutliche Reduktion des Ki-67 Index von 20% auf unter 1%; dazu passend zeigte die Proteinexpression von pRb(S780) nach der Inhibition eine schwächere Färbung (Abbildung 24).



Palbociclib für 3 Tage. Der Ki-67 Index fällt von 20% auf unter 1%. Die Expression von pRb fällt durch Reduktion der Anzahl an positiven Zellkernen und durch Verminderung der Färbeintensität. Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

3. Ergebnisse

Die Inhibition wurde hinsichtlich der IC50-Werte genauer quantifiziert. Diese Quantifizierung wurde mit einem MTS-Assay an lebenden Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden für 3 Tage mit aufsteigenden Konzentrationen von Palbociclib (0, 3, 6, 10, 30, 60, 100, 300, 600, 1'000 nmol/L) inkubiert, und anschließend wurde die Anzahl lebensfähiger Zellen gemessen. Für die Zelllinien U-CH2, U-CH3, U-CH6 und U-CH7 lag der IC50-Wert für Palbociclib zwischen 50 und 100 nmol/L. U-CH11 sprach erst bei höheren Konzentrationen an, die IC50-Werte lagen dabei zwischen 300 und 400 nmol/L.

Die Zelllinien MCF7 und CAL51 wurden, wie publiziert, als Positiv- bzw. Negativkontrollen verwendet (Abbildung 25). Der Inhibitionseffekt wurde durch alternative Methoden zusätzlich bestätigt. Das Wachstum der Zelllinien U-CH1, U-CH7, U-CH10, U-CH11 wurde für 6 Tage mit drei unterschiedlichen Konzentrationen (10, 100, 1'000 nM) von Palbociclib gehemmt, was durch eine Zellzählung bestätigt werden konnte. Die Zelllinien sprachen mit einer Abnahme des Wachstums zwischen 1,9% und 18,5% an. U-CH1 zeigte die deutlichsten Inhibitionseffekte (Abbildung 26A). Die Zelllinien U-CH2, U-CH3, U-CH6 und U-CH10 wurden mit dem AlamarBlue-Assay auf das Wachstum unter Inhibition analysiert. Diese Zelllinien zeigten ebenfalls eine deutliche Zunahme der Wachstumshemmung mit Anstieg der Palbociclib-Konzentration (Abbildung 26B).



Abbildung 25:

Inhibitionseffekt von Palbociclib auf das Wachstum der Chordom-Zelllinien U-CH2, U-CH3, U-CH6, U-CH7, und U-CH11 sowie der Kontroll-Zelllinie CAL51. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten ausgesäht und wurden für 3 Tage bei 37 °C mit ansteigenden Palbociclib-Konzentrationen (3, 6, 10, 30, 60, 100, 300, 600, 1'000 nM) inkubiert. Die Anzahl der vitalen Zellen wurde mit dem MTS-Zell-Viabilitäts-Test bestimmt. IC50=mittlere inhibitorische Konzentration.

(GraphPad Prism, Version 6). Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]



Abbildung 26:

A: Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung von U-CH1 nach Palbociclib-Inhibition für 6 Tage mit 10 nM, 100 nM und 1'000 nM. Die grüne Linie zeigt die Kontroll-Zellen. Die anderen Farben beschreiben die unterschiedlichen Konzentrationen von Palbociclib.

B: Proliferations-Assay mit AlamarBlue für die Linien U-CH2, U-CH3, U-CH6 and U-CH10. Steigende Konzentrationen von Palbociclib führen zu einer stärkeren Inhibition des Wachstums der Chordom-Zelllinien. (C=Kontrolle bei 0%) Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

3. Ergebnisse

Um zu prüfen, ob der Inhibitionseffekt auf eine Wachstumshemmung oder eine Zunahme der apoptotischen Zellen zurückzuführen ist, wurde eine Untersuchung mit Propidiumiodid in einer FACS-Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Dafür wurden die Zelllinien U-CH1 und U-CH2 repräsentativ verwendet. Es wurden jeweils 3 Ansätze pro Zelllinie mit 1'000 nM Palbociclib für 3 Tage inkubiert und anschließend zusammen mit der Kontrolle analysiert.

Die Abbildung 27 zeigt die Zunahme des Anteils der Zellen in der G₁-Phase und belegt die Abnahme der Zellen in der S- und G₂-Phase. Diese Veränderungen sind statistisch signifikant für U-CH1 in der S-Phase und für U-CH2 in der G₁-, S- und G₂-Phase. Betrachtet man den subG₁-Anteil, sieht man lediglich einen geringen Anstieg von möglichen apoptotischen Zellen.

Um eine definitive Aussage über die Apoptose machen zu können, wurde abschließend eine Western Blot Analyse mit Cleaved Caspase 3 und Cleaved PARP durchgeführt. Als Kontrollen dienten eine unbehandelte HEK-293-Zelllinie und eine HEK-293-Zelllinie, die zuvor mit TNFα und Bortezomib für 18 h stimuliert wurde. Bei keiner der Chordom-Zelllinien konnten Banden für Cleaved Caspase 3 und Cleaved PARP nach 3 Tagen 1'000 nM Palbociclib-Inhibition detektiert werden (Abbildung 28).



Abbildung 27:

FACS-Zellzyklus-Analyse für U-CH1 und U-CH2 nach 3 Tagen Inhibition mit 1'000 nM Palbociclib. Es zeigt sich ein Anstieg der Zellzahl in der G_1 -Phase und ein Abfall der Zellzahl in der S-Phase und G_2 -Phase. Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]



Abbildung 28:

Ergebnisse der Western Blot Analyse für Cleaved PARP und Cleaved Caspase 3 der 8 Chordom-Zelllinien im Vergleich mit den HEK-293 Zellen (-/+ Stimulation mit TNFα und Bortezomib für 18 h; – =Negativkontrolle, + =Positivkontrolle). Nach der Inhibition mit 1'000 nM Palbociclib für 3 Tage zeigen sich keine positive Banden bei allen Chordom-Zelllinien. Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

3. Ergebnisse

Zusätzlich zur Palbociclib-Inhibition wurde ein alternativer Inhibitor von CDK4/CDK6 getestet. Dazu wurden die Linien U-CH1 and U-CH6 mit LY2835219 (Abemaciclib) inkubiert. Die Ergebnisse zeigten ebenso eine reduzierte Zell-Viabilität (Abbildung 29).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwei unterschiedliche Inhibitoren, die an CDK4/CDK6 angreifen, zu einer Inhibition des Wachstums durch eine Blockierung des CDK4/CDK6 Signalwegs von Chordomzellen führen.



Abbildung 29:

Wachstumskinetik der Chordom-Zelllinien U-CH1 und U-CH6.

CAL51 wurde als Negativkontrolle und MCF7 als Positivkontrolle verwendet. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten 3 Tage lang mit ansteigenden Konzentrationen von Abemaciclib (LY2835219) bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl der vitalen Zellen wurde mit dem MTS-Zell-Viabilitäts-Test bestimmt. IC50=mittlere inhibitorische Konzentration.

(GraphPad Prism, Version 6). Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

3.2.4 Definition eines potentiellen Responder-Phänotyps für die Palbociclib-Inhibition

Die erhobenen immun-(cyto-)histochemischen Profile der Chordom-Zelllinien und Proben des Kollektivs wurden bezüglich der Expression von CDK4, CDK6, p16, Rb, pRb und Cyclin D1 sortiert, um einen potentiellen Responder-Phänotypen zu definieren. Basis für diese Sortierung waren die immunzytologischen Daten und die Western Blot Daten dieser Moleküle in den Zelllinien und die Ansprechraten der Zelllinien auf die Inhibition.

Zum Beispiel zeigten U-CH3, U-CH6, und U-CH12 ein gutes Ansprechen, während U-CH7 und U-CH11 schlecht ansprachen (Abbildung 30). Dieses Ansprechen auf Palbociclib zeigte einen Zusammenhang zu der quantitativen Auswertung der Western Blot Ergebnisse von pRb im Verhältnis zu β-Actin.

Jede Probe des Ulmer Kollektivs wurde mit den oben genannten Antikörpern gegen p16, CDK4, CDK6, Rb, pRb und Cyclin D1 immunhistochemisch analysiert. 66% der Chordome *in situ* sind negativ für p16, 70% sind positiv für CDK4, 85% sind positiv für CDK6 und über 90% sind positiv für Rb und pRb(S780) (Abbildung 30B). Eine Probe ist stark positiv für p16, vereinzelt sind CDK4, CDK6 und Rb/pRb negativ (nur Rb oder pRb negativ: n=2, alle 4 Moleküle negativ: n=2); zudem sind die CDK4 und/oder CDK6 Expressionslevel quantitativ unterschiedlich. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden 4 Gruppen von Chordomen 0, 1, 2 und 3 definiert.

Die Rationale für diese Unterteilung in einen potentiellen Responder und Non-Responder-Phänotyp ist wie folgt:

Das p16 Molekül hemmt den CDK4/CDK6 Signalweg, daher wurden Proben mit p16 über 10% in die Non-Responder Kategorie eingestuft. Rb sowie pRb(S780) sind essentiell für den Signalweg; falls diese Moleküle fehlen, wurden diese Proben ebenso der Non-Responder Kategorie 0 zugeordnet. Weiterhin ist ein Fehlen von CDK4 und CDK6 nicht mit der Funktionalität des Signalwegs vereinbar. Daher wurden Proben ohne nachgewiesenem CDK4- und CDK6-Protein auch unter die Kategorie 0 eingeordnet.

3. Ergebnisse

Der Responder-Phänotyp wurde in verschiedene Kategorien eingeteilt (1-3). Diese beinhalten Proben von Patienten, für die ein potentielles Ansprechen auf eine Inhibition mit Palbociclib angenommen wurde. Basis hierfür war das entsprechende Expressionsprofil von pRb, verglichen mit dem Expressionsprofil der ansprechenden Zelllinien und deren Ansprechen auf die Inhibition (Abbildung 30; die Proben mussten dafür neu sortiert werden, daher entsprechen die Probennummern in dieser Tabelle nicht der bisher verwendeten ID).

Der beste angenommene Responder-Phänotyp ist definiert mit >70% immunhistologisch nachgewiesenem pRb (+++). Die anderen Kategorien beschreiben den Anstieg der pRb-Immunreaktivität in den Chordomproben:

Potentieller Non-Responder-Phänotyp:

0 = p16 >10% positiv; Rb oder pRb negativ; CDK4 und CDK6 negativ

Potentieller Responder-Phänotyp:

- 1 = pRb ist +
- 1 = pRb ist ++
- 3 = pRb ist +++

Nach der Prüfung der Kohorte bezüglich der oben genannten Kategorien, wurden 5 der 42 Chordome dem potentiellen Non-Responder-Phänotyp zugeordnet (Phänotyp 0). Die potentiellen Responder Profile der verbleibenden 37 Proben waren wie folgt verteilt: 10 (Phänotyp 1), 13 (Phänotyp 2), 14 (Phänotyp 3). Eine Probe musste aufgrund einer wiederholt nicht nachweisbaren Reaktivität der verwendeten 4 Antikörper ausgeschlossen werden.

Die statistische Auswertung des Responder-Phänotyps in einer Korrelation bezüglich der Expression von pRb mit dem Ki-67 Index, zeigten eine statistisch signifikante positive Korrelation (p=0,0216). Das bedeutet stärker proliferierende Chordome zeigen eine vermehrte pRb-Expression. Diese Beobachtung zeigt sich auch in den Zelllinien: eine vermehrte pRb-Expression korrelierte mit einem höheren Ki-67 Index in den Chordom-Zelllinien.

Chordom p16 Ki-67 Cyclin CDK4 CDK6 Bb pBb/(5780) Palbociclib	JE CONTRACTOR
Zelllinien index D1 Contraction (β-Actin C50 [nM]	
U-CH10 0% 8% +++ ++ ++ 0,29 no IC50 🔺	00 09 20 000
U-CH11 0% 10% ++ + + + 0,42 340	a company to the state
U-CH7 0% 5% + + + ++ 0,63 98	N. C. C. Pop. C.
U-CH1 0% 15% ++ + + +++ 0,76 NA INNIDITION	
U-CH12 0% 5% ++ ++ +++ 0,84 NA des Zell-	1
0-CH6 0% 5% ++ ++ +++ 0,92 90 Wachstums	
	A Charles and
Chordom- proben Nr. p16 Ki-67 Cyclin CDK4 CDK6 Rb pRb Responder Phänotyp	
1 0% 1% +++ 0	
2 0% 1% ++ 0	
3 0% 5% + - + ++ - 0 Non-Responder	a sub- to the same
4 8% 2% + - + - ++ 0	
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	A State A State A
$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	
8 0% 2% + - + + 1	10
9 5% 5% + + - ++ + 1	010
10 0% 5% ++ + + 1	in the state of the states
	a all the property
15 0% 1% + + NA + + 1	
16 0% 1% + - + + ++ 2	CDR 4
17 0% 1% + + + ++ 2	
18 5% 5% + - ++ + ++ 2	
19 0% 5% + + + + + + 2 Zundnine	
20 $1%$ $1%$ t	
22 0% 1% ++ + ++ ++ 2 potentiellen	CDV C
23 1% 1% ++ ++ ++ +++ +++ 2 Ansprechens	UK O
24 0% 5% ++ ++ ++ ++ ++ 2 Ansprechens	
25 0% 8% + + ++++ + ++ 2 aut eine	
26 0% 13% ++ ++ ++ ++ 2 Palbociclib	
28* 0% 5% +++ +++ +++ +++ 2 Therapie	and a second of the
29 0% 15% + +++ +++ 3	Pb/(5780)
30 8% 1% + + ++ ++ 3	JND(3780)
31 0% 1% + + ++ ++ 3	and the state of t
32 5% 5% ++ ++ + +++ 3	
33 1% 2% 1+ ++ ++ ++ ++ 3	and the second sec
35 5% 50% + ++ ++ +++ 3	
36 5% 5% + + +++ + +++ 3	
37 0% 5% ++ + +++ + +++ 3	and the second and
38 0% 10% + ++ +++ + +++ 3	KD
39 8% 5% ++ ++ +++ +++ 3	
42 0% 10% + +++ +++ +++ 3	
43 NA 1% NA NA NA NA NA	

Abbildung 30:

Beschreibung potentieller Responder- und Non-Responder-Phänotypen bei einer Behandlung mit Palbociclib. **A**: Oben: Protein Expressionsdaten der Chordom-Zelllinien mit Zunahme der Wachstumsinhibition von oben nach unten. Entsprechend dazu die Expression der Proteine des CDK4/CDK6 Signalwegs. WB(=Western Blot)-Daten von pRb vor der Inhibition. Unten: Expression der verschiedenen Proteine des CDK4/CDK6 Signalwegs in den Chordomproben und die angenommene Zunahme des potentiellen Ansprechens auf eine Palbociclib Therapie. Oben (rot): Potentielle Non-Responder; Unten (grün): Potentielle Responder **B**: H.E.-Färbung von Probe Nummer 28 (*), Immunhistochemie: p16 ist negativ, CDK6, CDK4, pRb und Rb sind stark positiv (von oben nach unten); Größenstandard: 100µm.

Reprinted by permission from the American Association for Cancer Research. [79]

4 Diskussion

4.1 Chordom-Kollektiv

Der erste praktische Teil der Doktorarbeit war die Zusammenstellung des Chordom-Kollektivs aus den Archiven des Instituts für Pathologie der Universität Ulm und dessen detaillierter immun- und histologischer Analyse. Weitere erhobene Parameter wurden dann mit den verfügbaren Überlebensdaten der Chordompatienten korreliert, um Gesamtüberlebens-Analysen durchzuführen.

In dem Ulmer Kollektiv zeigte sich folgende Alters- und Geschlechtsverteilung: (Median: 67 Jahre; 17 - 84 Jahre; 26 männlich, 17 weiblich) mit einem Gesamtüberleben im Median von 8,25 Jahren, was publizierten Daten zu Chordomen entspricht [48]. Die Analysen bestätigten die besondere Biologie der Chordome, die generell als langsam proliferierende Neoplasien gelten und im Vergleich zu anderen Gewebsneubildungen ein vergleichsweise langes Gesamtüberleben zeigen. In unserer Chordom-Kohorte war das Sakrum am häufigsten befallen. Die Größe der Chordome korrelierte mit der Lokalisation: kleinere Chordome waren im Clivus, größere Chordome im Sakrum lokalisiert. Diese Daten reflektieren die veröffentlichten Daten der WHO [26].

Initial wurde die Histologie aller Chordome des Kollektivs analysiert. Dabei zeigte sich ein breites Spektrum an histomorphologischen Varianten der Chordome untereinander, sowie eine intratumorale Heterogenität. Die Chordome des Ulmer Kollektivs wurden in Nierenzellkarzinom-ähnliche Chordome, Chordome mit chondroider oder hepatoider Differenzierung sowie auch in Chordome mit anaplastischer Morphologie unterteilt. Da sich dieses Spektrum abschnittsweise sehr weit von der ursprünglichen Morphologie eines klassischen Chordoms (NOS) entfernt, kann es folglich als Metastase, beispielsweise eines Nierenzellkarzinoms, fehlinterpretiert werden. Somit ist die Brachyury-Färbung ein obligatorischer Schritt in der histologischen Diagnosestellung eines Chordoms.

Bei zwei Chordom Fällen zeigten sich im Tumor morphologisch auffällige Bereiche, die eine Lipom-ähnliche Histologie aufwiesen und als benigner notochordaler Tumor bezeichnet werden. Diese Läsion wird als Vorläuferläsion von manifesten Chordomen diskutiert [63]. Da sie im Ulmer Kollektiv immer im Kontext eines Chordoms gefunden wurde, bestätigen diese Ergebnisse eine mögliche schrittweise Entstehung von Chordomen.

Für die auf histologischen Parametern basierende Risikostratifizierung von Chordompatienten wurden verschiedene histologische Parameter analysiert. In Bezug auf den intratumoralen Matrixgehalt konnte gezeigt werden, dass ein matrixarmer Typ eines Chordoms einen statistisch signifikant negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben hat. Naka et al. haben als Erste auf eine negative Korrelation zwischen intraläsionalen fibrösen Septen in Chordomen und dem Gesamtüberleben hingewiesen [51]. Nach Analyse des Ulmer Kollektivs, wurde dieses Konzept des Einflusses der Matrix auf das Gesamtüberleben durch die Abschätzung des extrazellulären Matrixinhalts in größer oder kleiner 50% vereinfacht. Der niedrige Matrixgehalt spielt auch bei Neuroblastomen eine Rolle und verdeutlicht den Einfluss der Matrix auf die Zellbiologie von Neoplasien [3,42,64].

Diese Besonderheit wurde für Chordome bisher noch nicht publiziert. Der niedrige Matrixgehalt stellt damit einen neuen Risikofaktor für Chordompatienten dar. Er ist ein histologisch einfach abschätzbarer prognostischer Parameter in der histochemischen Analyse der Gewebeproben.

Die Bestimmung des Ki-67 Index ist ein bekannter Parameter für die Risikobeurteilung von Chordomen [6,39,51,59,60,82]. Diese Aussage konnte bestätigt werden. Zudem zeigte sich in dem etablierten Kollektiv, dass ein hoher Ki-67 Index auch mit einer höheren Metastasierungsrate einhergeht (statistisch signifikant, p<0,0001). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Ki-67 Index in matrixarmen Chordomen statistisch signifikant höher war als in matrixreichen Chordomen. Dies stützt und bestätigt indirekt die Annahme, dass ein niedriger Matrixgehalt einen prognostisch ungünstigen Parameter darstellt.

Aufgrund dieser Daten kann man ableiten, dass bei der histo-pathologischen Aufarbeitung eines Chordoms nicht nur die histologischen Subtypen, sondern auch der extrazelluläre Matrixgehalt zusammen mit dem Ki-67 Index im abschließenden pathologischen Bericht aufgeführt werden sollten.

Diese histologische Bestimmung des Matrixgehaltes definiert einen matrixarmen Phänotyp eines Chordoms als eine aggressivere Variante eines Chordoms mit höherem Ki-67 Index und kürzerem Gesamtüberleben.

78

4. Diskussion

Solche histologischen Befunde werden durch einfache reproduzierbare Routine-Färbungen erhoben. Sie können dazu beitragen, durch Gewebeproben solche Patientengruppen zu definieren, die dieser aggressiveren Variante eines Chordoms mit schlechterer Prognose zuzuordnen sind.

Der matrixarme Phänotyp kann als zusätzlicher Risikofaktor eines Chordoms verwendet werden, um möglicherweise Argumente für eine klinische Entscheidungsfindung hinsichtlich einer (neo-)adjuvanten Chemo- oder Radiotherapie zu liefern.

Diese zusätzlichen Parameter im Hinblick auf eine mögliche aggressivere Variante eines Chordoms, verankert im pathologischen Bericht, können neben den klinischen Parametern hilfreich sein, die Prognose eines Patienten nach Chordomresektion genauer abzuschätzen.

Die Daten bieten Anlass für weitere Studien, um diese Parameter in zusätzlichen unabhängigen Chordom-Kollektiven mit größeren Fallzahlen zu re-evaluieren und auf diese Weise die Aussagekraft zu überprüfen.

4.2 Chordom-Zelllinien, Wachstumsinhibition und Definition von potentiellen Responder-Phänotypen

Im zweiten praktischen Teil der Doktorarbeit wurden 6 neu etablierte Chordom-Zelllinien zytologisch und molekularbiologisch charakterisiert und direkt mit zwei schon beschriebenen und publizierten Chordom-Zelllinien verglichen. Ziel war es, mögliche neue Strukturen für eine potentielle Therapie zu finden.

Chordome werden bislang aufgrund der geringen Fallzahlen medikamentös nicht einheitlich behandelt, da eine spezifische Zielstruktur, wie etwa in der chronischen myeloischen Leukämie aufgrund der vorhandenen Translokation t(9;22) und einer daraus resultierenden erfolgreichen Therapie mit einem Proteinkinaseinhibitor (Imatinib), nicht bekannt ist. In ersten molekularen Screeningverfahren, durchgeführt von Xia et al. [81], konnte gezeigt werden, dass es erste Hinweise für Ansatzpunkte einer zielgerichteten Therapie gibt, wie beispielsweise eine Inhibition von Tyrosinkinasen (EGFR) [17,65,68]. Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurden erste Xenograft Modelle mit der Ulmer Chordom-Zelllinie U-CH1 entwickelt. Dieses Modell könnte zukünftig eine wichtige Rolle spielen, um weitere Inhibitions- sowie Behandlungsexperimente zu überprüfen. Es belegt hiermit die Bedeutung von Zelllinien-Systemen [55].

Die eingesetzten molekularbiologischen Untersuchungen zeigten auf mRNA-Expressionsebene der 8 Ulmer Chordom-Zelllinien hohe Werte von typischen Chordom Markern, wie Brachyury, Collagen 2A1 und CD24 [9]. Wenn man diese Daten mit anderen Expressionsdaten weiterer Zelllinien, wie dem NCI-60 Panel oder anderen mRNA-Daten vergleicht, zeigt sich, dass die Chordom-Zelllinien in der unüberwachten Analyse eine Gruppe bilden und somit ein hoch charakteristisches Expressionsprofil dieser Tumorentität wiederspiegeln. Der Verlust den Gens *CDKN2A* auf den telomernahen Abschnitten des kurzen Arms des Chromosoms 9 ist eine rekurrente genomische Aberration in Chordomen [13,34,46]. Es konnte einen rekurrenten Verlust von *CDKN2A* in allen acht Zelllinien in einem hohen Anteil der Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis tritt nicht sekundär durch einen *in vitro* Effekt auf, sondern besteht bereits in den Parentaltumoren der verschiedenen Linien. Dieser Verlust des Gens zeigte sich auch auf der Proteinebene, da das p16-Protein in keiner der 8 untersuchten Chordom-Zelllinien nachzuweisen war. Der Tumorsupressor p16 (*CDKN2A*) hemmt die Aktivität von CDK4/CDK6 und ist daher wichtig für die Regulation

80

des Zellzyklus in dem Übergang der G₁- zu der S-Phase [34]. Aus einem Verlust von p16 resultiert folglich eine dauerhafte Aktivierung von CDK4, CDK6 und der nachgeschalteten Moleküle des Signalweges. Dazu passend konnte beispielsweise in Melanomen gezeigt werden, dass der Verlust des p16-Proteins negativ mit der Prognose korreliert [56,69].

Passend zu dem p16-Verlust, zeigten sich in der Analyse der mRNA-Expressionsdaten niedrige *CDKN2A* Werte und vergleichsweise hohe Expressionswerte für CDK4 und CDK6 Transkripte. Auf Proteinebene konnten in dem Western Blot entsprechend, und zwar für alle Zelllinien, kräftige Banden für CDK4 und CDK6 nachgewiesen werden. Ein weiteres abhängiges Protein in dem CDK4/CDK6 Signalweg ist das Rb-Protein, welches von den Cyclin-abhängigen Kinasen phosphoryliert wird. Das Rb-Protein wurde im Western Blot von allen 8 Chordom-Zelllinien exprimiert. Die exakte Stelle der Phosphorylierung des Rb-Proteins ist das Serin780 [22]. Das phosphorylierte Rb wurde ebenfalls im Western Blot in allen Chordom-Zelllinien nachgewiesen.

Zusammenfassend ist aufgrund dieser Ergebnisse davon auszugehen, dass der CDK4/CDK6 Signalweg durch den Verlust von p16 in den untersuchten Chordom-Zelllinien aktiviert ist (Abbildung 23B).

Ein spezifischer Inhibitor des CDK4/CDK6 Signalweges ist Palbociclib, der von der Firma Pfizer vertrieben wird [18]. Dieses Medikament zur Proliferations- und Wachstumsreduktion von Neoplasien wird bereits für die Therapie von Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen und Liposarkomen eingesetzt [19,23,44]. In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Palbociclib bei Bronchialkarzinomen mit p16-Verlust ein deutlicher inhibitorischer Effekt auf das Wachstum besteht. Im Gegensatz dazu konnte bei Patienten mit Bronchialkarzinomen und nachgewiesener Expression von p16 und einem Verlust von Rb-Protein nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Palbociclib nicht mit einem Ansprechen auf das Wachstum der Bronchialkarzinome korreliert [30,52].

Aufgrund des nachgewiesenen defizitären Signalweges in Chordomen und in Analogie zu den Befunden in Bronchialkarzinomen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Inhibition von CDK4/CDK6 mit Palbociclib zu einer Verminderung des pRb-Proteins in den Chordom-Zelllinien führen sollte. Tatsächlich zeigte sich in den Experimenten, dass pRb nach der Inhibition mit Palbociclib konzentrationsabhängig jeweils geringer exprimiert wurde. In diesen Inhibitionsexperimenten wurde auch deutlich, dass die

81

Expression von pRb direkt mit der Zellproliferation korrelierte, was die aufgestellte Hypothese bestätigte.

Die IC50-Werte für die gezeigten Chordom-Zelllinien wurden bestimmt und lagen unter 100 nM für Palbociclib und entsprachen damit den schon publizierten IC50-Werten von Palbociclib wie z.B. dem IC50-Wert für Mammakarzinom-Zelllinien. Aufgrund dieser Zellliniendaten von Mammakarzinomen werden Patienten mit Mammakarzinomen aktuell bereits effektiv mit Palbociclib in der Klinik behandelt [22]. Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurde für die analysierten Chordom-Zelllinien der alternative CDK4/CDK6 Inhibitor - Abemaciclib (Ly2835219) - eingesetzt [31]. Dabei konnte ein ähnlicher inhibitorischer Effekt erzielt werden.

Der Einsatz dieses alternativen Inhibitors belegt, dass durch zwei biochemisch unterschiedliche Inhibitoren des CDK4/CDK6 Komplexes das Wachstum der Chordom-Zelllinien gehemmt werden konnte und dass diese Inhibition tatsächlich auf einer Blockade des CDK4/CDK6 Signalwegs zurückzuführen war [18]. Dieser Effekt entfaltet seine Wirkung an dem Übergang zwischen der G₁- und S-Phase. Biochemisch gesehen also dort, wo die Cyclin-abhängigen Kinasen die Phosphorylierung von Rb katalysieren. Die Hemmung der Kinasen führte zu einem Block der G₁-Phase, der mit Hilfe einer FACS-Analyse gezeigt werden konnte. Die G₁-Phase nahm unter der Inhibition an Zellen zu, während die S- und die G₂-Phase an Zellen vermindert waren. Die subG₁-Phase war nach der Inhibition mit Palbociclib nur minimal erhöht. Diese Hemmung des Wachstums der Chordomzellen war folglich nicht auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen, da im Western Blot in keiner Zelllinie die

Apoptosemarker Cleaved Caspase 3 oder Cleaved PARP detektiert werden konnten.

Daraus kann zusammenfassend gefolgert werden, dass die Inhibition mit Palbociclib vorwiegend über eine Wachstumshemmung und nicht durch Induktion der Apoptose erfolgte.

4. Diskussion

Um potentielle Responder-Phänotypen im Ulmer Chordom-Kollektiv zu definieren, wurden alle 43 Chordomgewebeproben auf die Expression von p16, CDK4, CDK6, Rb, pRb und Cyclin D1 im Vergleich zu den Zelllinien analysiert. Durch eine immunhistologische Typisierung der Chordomproben konnten die Proben in verschiedene Gruppen aufgeteilt werden. Dabei wurden zunächst ein Non-Responder-Phänotyp und ein potentieller Responder-Phänotyp definiert, der möglicherweise auf eine Behandlung mit Palbociclib ansprechen könnte. Diesen Gruppen wurden die erhobenen immunhistologischen Daten zugeteilt.

Der potentielle Non-Responder-Phänotyp wurde definiert als: p16 positiv oder über die fehlende Expression von CDK4 oder CDK6 oder Rb/pRb. *Vice versa* wurde der potentielle Responder-Phänotyp definiert als Verlust von p16 und Expression von CDK4/CDK6 und Rb/pRb [11,30,74].

In der Analyse waren über 75 % der Chordomgewebeproben komplett p16-Protein negativ, was auf einen defizitären CDK4/CDK6 Signalweg in mehr als 2/3 der Chordome hindeutet. Die immunhistologischen Analysen von CDK4 und CDK6 im Kollektiv erwiesen sich als dazu passend. 56 % der Chordome wiesen eine Koexpression von CDK4 und CDK6 auf, 35 % exprimierten entweder CDK4 oder CDK6 und nur 5 % der Chordomproben waren immunhistologisch komplett negativ für diese Marker. Wiederum dazu passend und in Analogie zu den Zellliniendaten zeigte sich, dass mehr als 90 % der Gewebeproben immunhistologisch Rb und pRb positiv waren.

Zusammenfassend zeigte sich durch die immunhistologische Analyse von mehr als 40 Chordomgewebeproben, dass ein potentieller Responder-Phänotyp in 85% der untersuchten Proben definiert werden konnte. Ein Patient mit diesem Phänotyp könnte durch eine Behandlung mit Palbociclib profitieren.

In den *in situ* Analysen konnte zusätzlich und komplementär zu den *in vitro* Daten gezeigt werden, dass ein hoher Ki-67 Index mit einer statistisch verstärkten pRb-Expression einhergeht. Dieser Zusammenhang untermauert zusätzlich, dass die Analyse der Moleküle des CDK4/CDK6 Signalwegs Biomarker für Chordome darstellen, um einen potentiellen Responder- *vs*. Non-Responder-Status bezüglich einer möglichen Therapie mit Palbociclib zu erheben.

Aus der Literatur sind einige klinische Studien bekannt, in denen Palbociclib zur Behandlung von verschiedenen Tumoren erfolgreich eingesetzt wurde; Beispiele dafür sind das Plattenepithelkarzinom des Kopfes und Halses (SCCHN), das Leber-, Ovarial-,

83

4. Diskussion

Prostata- und Mammakarzinom mit bereits aufgelegten Phase-II/III-Studien, das Melanom in Phase-I/II-Studien, der gastrointestinale Stromatumor (GIST), das Mantelzell- Lymphom und eine Phase-II-Studie für dedifferenzierte Liposarkome. Alle diese Studien zeigten einen positiven Einfluss auf das progressionsfreie Überleben bei insgesamt nur moderaten Nebenwirkungen [23,19,74,25,24].

Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen, gestützt durch die Daten aus der Literatur, weisen darauf hin, dass eine Palbociclib-Therapie künftig auch für Chordompatienten ähnlich erfolgsversprechend sein kann.

Daher sollten auf der Basis dieser Ergebnisse künftig prospektive Studien geplant und durchgeführt werden, in die Chordompatienten eingeschlossen werden, welche die Biomarker des CDK4/CDK6 Signalwegs exprimieren und einen simultanen Verlust von p16-Protein aufweisen.

Die Etablierung eines immunhistologischen Profils bezüglich eines potentiellen Responder-Phänotyps, aufbauend auf dem defizitären CDK4/CDK6 Signalwegs, kann folglich auch an repräsentativem Gewebe von Chordomen angewendet werden. Falls die vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse entsprechend positiv bezüglich der Inhibition des Chordomwachstums *in situ* sind, könnte in Zukunft die Profilbestimmung im Hinblick auf einen potentiellen Responder-Phänotypen ein wichtiger obligater Pfeiler für die Chordomtherapie sein.

5 Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurde ein repräsentatives Chordom-Kollektiv aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Ulm erhoben und zunächst anhand von verschiedenen Parametern analysiert. Diese wurden anschließend mit dem Gesamtüberleben korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass ein positiver Resektions-Status, ein niedriger Gehalt von extrazellulärer Matrix und ein erhöhter Ki-67 Index eine statistisch relevante Risikozunahme der Metastasierung sowie einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben von Chordompatienten zur Folge haben. In vitro gelang es acht neue Chordom-Zelllinien zu etablieren und einen rekurrenten molekularbiologischen Defekt in dem CDK4/CDK6 (cyclin-dependent kinase) Signalweg nachzuweisen. Alle acht Chordom-Zelllinien sind p16 negativ. Dies ist am ehesten im Zusammenhang mit einem nachgewiesenen Verlust von CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A) auf genomischer Ebene in einem großen Anteil von Chordomzellen zu sehen. Resultierend aus diesem Verlust, wurde eine starke Proteinexpression der abhängigen Moleküle CDK4, CDK6, Rb (Retinoblastom-Protein) und pRb (phosphoryliertes Rb) in den Zelllinien nachgewiesen. Der CDK4/CDK6 Signalweg ist folglich in allen acht Chordom-Zelllinien aktiviert und kann durch den p16-Verlust ungebremst das Molekül Rb zu dem aktiven pRb phosphorylieren. Daraus folgt eine Aktivierung des Zellzyklus und damit Zellwachstum.

Die Inhibition des Signalwegs mit spezifischen CDK4/CDK6 Inhibitoren wie Palbociclib oder Abemaciclib führte zu einer konsistenten Reduktion des Wachstums in allen überprüften Chordom-Zelllinien.

Das Patientenkollektiv wurde hinsichtlich der Stärke der pRb(S780)-Proteinexpression sortiert. Dabei zeigte sich, dass über 80% der Patienten einen potentiellen Responder-Phänotyp aufwiesen.

In der Zusammenschau betrachtet, weisen die Daten daraufhin, dass Palbociclib einen vielversprechenden, möglichen neuen therapeutischen Ansatz für die onkologische Therapie von Chordomen darstellt.

6 Literaturverzeichnis

- Adenis A, Ray-Coquard I, Italiano A, Chauzit E, Bui-Nguyen B, Blay J-Y, Tresch-Bruneel E, Fournier C, Clisant S, Amela EY, Cassier PA, Molimard M, Penel N: A dose-escalating phase I of imatinib mesylate with fixed dose of metronomic cyclophosphamide in targeted solid tumours. *Br. J. Cancer* 109: 2574–2578 (2013)
- 2. Akhavan-Sigari R, Gaab MR, Rohde V, Abili M, Ostertag H: Prognostic significance of immunohistochemical expression of VEGFR2 and iNOS in spinal chordoma. Eur. Spine J. 23: 2416–2422 (2014)
- 3. Ambros IM, Zellner A, Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, Gadner H, Ambros PF: Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 334: 1505–1511 (1996)
- Ares C, Hug EB, Lomax AJ, Bolsi A, Timmermann B, Rutz HP, Schuller JC, Pedroni E, Goitein G: Effectiveness and safety of spot scanning proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base: first long-term report. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75: 1111–1118 (2009)
- Barth TFE, Martin-Subero JI, Joos S, Menz CK, Hasel C, Mechtersheimer G, Parwaresch RM, Lichter P, Siebert R, Möoller P: Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101: 3681–3686 (2003)
- Bergh P, Kindblom LG, Gunterberg B, Remotti F, Ryd W, Meis-Kindblom JM: Prognostic factors in chordoma of the sacrum and mobile spine: a study of 39 patients. *Cancer* 88: 2122–2134 (2000)
- Bompas E, Le Cesne A, Tresch-Bruneel E, Lebellec L, Laurence V, Collard O, Saada-Bouzid E, Isambert N, Blay JY, Amela EY, Salas S, Chevreau C, Bertucci F, Italiano A, Clisant S, Penel N: Sorafenib in patients with locally advanced and metastatic chordomas: a phase II trial of the French Sarcoma Group (GSF/GETO)⁺.Ann. Oncol. (2015) doi:10.1093/annonc/mdv300
- 8. Boriani S, Bandiera S, Biagini R, Bacchini P, Boriani L, Cappuccio M, Chevalley F, Gasbarrini A, Picci P, Weinstein JN: Chordoma of the mobile spine: fifty years of experience. *Spine* 31: 493–503 (2006)
- Brüderlein S, Sommer JB, Meltzer PS, Li S, Osada T, Ng D, Möller P, Alcorta DA, Kelley MJ: Molecular Characterization of Putative Chordoma Cell Lines. *Sarcoma* 2010: 1–14 (2010)
- Burger A, Vasilyev A, Tomar R, Selig MK, Nielsen GP, Peterson RT, Drummond IA, Haber DA: A zebrafish model of chordoma initiated by notochord-driven expression of HRASV12. *Dis. Model. Mech.* 7: 907–913 (2014)
- Cadoo KA, Gucalp A, Traina TA: Palbociclib: an evidence-based review of its potential in the treatment of breast cancer. Breast Cancer (Dove Med. Press) 6: 123–133 (2014)
- Casali PG, Messina A, Stacchiotti S, Tamborini E, Crippa F, Gronchi A, Orlandi R, Ripamonti C, Spreafico C, Bertieri R, Bertulli R, Colecchia M, Fumagalli E, Greco A, Grosso F, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S: Imatinib mesylate in chordoma. *Cancer*

101: 2086–2097 (2004)

- Choy E, MacConaill LE, Cote GM, Le LP, Shen JK, Nielsen GP, Iafrate AJ, Garraway LA, Hornicek FJ, Duan Z: Genotyping cancer-associated genes in chordoma identifies mutations in oncogenes and areas of chromosomal loss involving CDKN2A, PTEN, and SMARCB1. *PloS One* 9: e101283 (2014)
- Chugh R, Dunn R, Zalupski MM, Biermann JS, Sondak VK, Mace JR, Leu KM, Chandler WF, Baker LH: Phase II study of 9-nitro-camptothecin in patients with advanced chordoma or soft tissue sarcoma. J. Clin. Oncol. 23: 3597–3604 (2005)
- Crockard HA, Steel T, Plowman N, Singh A, Crossman J, Revesz T, Holton JL, Cheeseman A: A multidisciplinary team approach to skull base chordomas. J. Neurosurg. 95: 175–183 (2001)
- Demetri GD, Elias AD: Results of single-agent and combination chemotherapy for advanced soft tissue sarcomas. Implications for decision making in the clinic. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9: 765–785 (1995)
- 17. Dewaele B, Maggiani F, Floris G, Ampe M, Vanspauwen V, Wozniak A, Debiec-Rychter M, Sciot R: Frequent activation of EGFR in advanced chordomas. *Clin. Sarcoma Res.* 1: 4 (2011)
- Dickson MA: Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy. Clin. Cancer Res. 20: 3379–3383 (2014)
- Dickson MA, Tap WD, Keohan ML, D'Angelo SP, Gounder MM, Antonescu CR, Landa J, Qin L-X, Rathbone DD, Condy MM, Ustoyev Y, Crago AM, Singer S, Schwartz GK: Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma. J. Clin. Oncol. 31: 2024–2028 (2013)
- Edwards YH, Putt W, Lekoape KM, Stott D, Fox M, Hopkinson DA, Sowden J: The human homolog T of the mouse T(Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Res.* 6: 226–233 (1996)
- 21. Feng Y, Zhang Q, Wang Z, Yan B, Wei W, Li P: Overexpression of the BMP4/SMAD signaling pathway in skull base chordomas is associated with poor prognosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8: 8268–8275 (2015)
- 22. Finn RS, a Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, Ginther C, Atefi M, Chen I, Fowst C, Los G, Slamon DJ: PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res. BCR* 11: R77 (2009)
- Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Ro J, Huang X, Kim ST, Randolph S, Slamon DJ: Phase II Study of Palbociclib (PD-0332991) + Letrozole vs Letrozole alone in First-Line Er+/Her2- advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* 24: ix32–ix33 (2013)
- 24. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, Ettl J, Patel R, Pinter T, Schmidt M, Shparyk Y, Thummala AR, Voytko NL, Fowst C, Huang X, Kim ST, Randolph S, Slamon DJ: The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-

1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol.* 16: 25–35 (2015)

- Flaherty KT, Lorusso PM, Demichele A, Abramson VG, Courtney R, Randolph SS, Shaik MN, Wilner KD, O'Dwyer PJ, Schwartz GK: Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered using a 21-day schedule in patients with advanced cancer. Clin. Cancer Res. 18: 568–576 (2012)
- Flanagan AM YT: Chordoma: In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, editors. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press; p 328–329. (2013)
- Fleming GF, Heimann PS, Stephens JK, Simon MA, Ferguson MK, Benjamin RS, Samuels BL: Dedifferentiated chordoma. Response to aggressive chemotherapy in two cases. *Cancer* 72: 714–718 (1993)
- Förstner P, Bayer F, Kalu N, Felsen S, Förtsch C, Aloufi A, Ng DYW, Weil T, Nestorovich EM, Barth H: Cationic PAMAM dendrimers as pore-blocking binary toxin inhibitors. *Biomacromolecules* 15: 2461–2474 (2014)
- Foweraker KL, Burton KE, Maynard SE, Jena R, Jefferies SJ, Laing RJC, Burnet NG: High-dose radiotherapy in the management of chordoma and chondrosarcoma of the skull base and cervical spine: Part 1--Clinical outcomes. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol. G. B.* 19: 509–516 (2007)
- Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, Albassam M, Zheng X, Leopold WR, Pryer NK, Toogood PL: Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* 3: 1427–1438 (2004)
- 31. Gelbert LM, Cai S, Lin X, Sanchez-Martinez C, del Prado M, Lallena MJ, Torres R, Ajamie RT, Wishart GN, Flack RS, Neubauer BL, Young J, Chan EM, Iversen P, Cronier D, Kreklau E, de Dios A: Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest. New Drugs* 32: 825–837 (2014)
- George S, Merriam P, Maki RG, Van den Abbeele AD, Yap JT, Akhurst T, Harmon DC, Bhuchar G, O'Mara MM, D'Adamo DR, Morgan J, Schwartz GK, Wagner AJ, Butrynski JE, Demetri GD, Keohan ML: Multicenter phase II trial of sunitinib in the treatment of nongastrointestinal stromal tumor sarcomas. J. Clin. Oncol. 27: 3154–3160 (2009)
- Le Gouar M, Guillou A, Vervoort M: Expression of a SoxB and a Wnt2/13 gene during the development of the mollusc Patella vulgata. *Dev. Genes Evol.* 214: 250– 256 (2004)
- 34. Hallor KH, Staaf J, Jonsson G, Heidenblad M, Vult von Steyern F, Bauer HCF, Ijszenga M, Hogendoorn PCW, Mandahl N, Szuhai K, Mertens F: Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation. *Br. J. Cancer* 98: 434–442 (2008)
- 35. Heery CR, Singh BH, Rauckhorst M, Marté JL, Donahue RN, Grenga I, Rodell TC, Dahut W, Arlen PM, Madan RA, Schlom J, Gulley JL: Phase I Trial of a Yeast-Based

Therapeutic Cancer Vaccine (GI-6301) Targeting the Transcription Factor Brachyury. *Cancer Immunol. Res.* (2015) doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0119

- 36. Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H: Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343: 617–622 (1990)
- 37. Higinbotham NL, Phillips RF, Farr HW, Hustu HO: Chordoma. Thirty-five-year study at Memorial Hospital. *Cancer* 20: 1841–1850 (1967)
- 38. Hof H, Welzel T, Debus J: Effectiveness of cetuximab/gefitinib in the therapy of a sacral chordoma. *Onkologie* 29: 572–574 (2006)
- Horbinski C, Oakley GJ, Cieply K, Mantha GS, Nikiforova MN, Dacic S, Seethala RR: The prognostic value of Ki-67, p53, epidermal growth factor receptor, 1p36, 9p21, 10q23, and 17p13 in skull base chordomas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 134: 1170– 1176 (2010)
- Hsu W, Mohyeldin A, Shah SR, ap Rhys CM, Johnson LF, Sedora-Roman NI, Kosztowski TA, Awad OA, McCarthy EF, Loeb DM, Wolinsky J-P, Gokaslan ZL, Quinones-Hinojosa A: Generation of chordoma cell line JHC7 and the identification of Brachyury as a novel molecular target. *J. Neurosurg.* 115: 760–769 (2011)
- Hug EB, Loredo LN, Slater JD, DeVries A, Grove RI, Schaefer RA, Rosenberg AE, Slater JM: Proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base. J. Neurosurg. 91: 432–439 (1999)
- Joshi VV: Peripheral neuroblastic tumors: pathologic classification based on recommendations of international neuroblastoma pathology committee (Modification of shimada classification). Pediatr. Dev. Pathol. 3: 184–199 (2000)
- Kayani B, Sewell MD, Tan K-A, Hanna SA, Williams R, Pollock R, Skinner J, Briggs TWR: Prognostic Factors in the Operative Management of Sacral Chordomas. *World Neurosurg.* (2015) doi:10.1016/j.wneu.2015.06.030
- Konecny GE, Winterhoff B, Kolarova T, Qi J, Manivong K, Dering J, Yang G, Chalukya M, Wang H-J, Anderson L, Kalli KR, Finn RS, Ginther C, Jones S, Velculescu VE, Riehle D, Cliby WA, Randolph S, Koehler M, Hartmann LC, Slamon DJ: Expression of p16 and retinoblastoma determines response to CDK4/6 inhibition in ovarian cancer. Clin. Cancer Res. 17: 1591–1602 (2011)
- 45. Lartillot N, Lespinet O, Vervoort M, Adoutte A: Expression pattern of Brachyury in the mollusc Patella vulgata suggests a conserved role in the establishment of the AP axis in Bilateria. *Dev. Camb. Engl.* 129: 1411–1421 (2002)
- 46. Le LP, Nielsen GP, Rosenberg AE, Thomas D, Batten JM, Deshpande V, Schwab J, Duan Z, Xavier RJ, Hornicek FJ, lafrate AJ: Recurrent chromosomal copy number alterations in sporadic chordomas. *PloS One* 6: e18846 (2011)
- Linden O, Stenberg L, Kjellen E: Regression of cervical spinal cord compression in a patient with chordoma following treatment with cetuximab and gefitinib. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 48: 158–159 (2009)
- McMaster ML, Goldstein AM, Bromley CM, Ishibe N, Parry DM: Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995. *Cancer Causes Control CCC* 12: 1–11 (2001)
- 49. Miettinen M, Wang Z, Lasota J, Heery C, Schlom J, Palena C: Nuclear Brachyury

Expression Is Consistent in Chordoma, Common in Germ Cell Tumors and Small Cell Carcinomas, and Rare in Other Carcinomas and Sarcomas: An Immunohistochemical Study of 5229 Cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 39: 1305–1312 (2015)

- Mukherjee D, Chaichana KL, Parker SL, Gokaslan ZL, McGirt MJ: Association of surgical resection and survival in patients with malignant primary osseous spinal neoplasms from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database. Eur. Spine J. 22: 1375–1382 (2013)
- Naka T, Boltze C, Kuester D, Samii A, Herold C, Ostertag H, Iwamoto Y, Oda Y, Tsuneyoshi M, Roessner A: Intralesional fibrous septum in chordoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 122 lesions. *Am. J. Clin. Pathol.* 124: 288–294 (2005)
- 52. Neil Johnson GIS: Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibition in cancer therapy. *Cell Cycle Georget. Tex* 11: (2012)
- 53. Noel G, Habrand JL, Mammar H, Pontvert D, Haie-Meder C, Hasboun D, Moisson P, Ferrand R, Beaudre A, Boisserie G, Gaboriaud G, Mazal A, Kerody K, Schlienger M, Mazeron JJ: Combination of photon and proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base: the Centre de Protontherapie D'Orsay experience. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 51: 392–398 (2001)
- Owen JHJ, Wang AC, Abuzeid, WM, Keep RF, Fan X, McKean EL, Sullivan SE, Prince ME: Establishment and characterization of two novel human chordoma cell lines. *Poster P0721 JAMA Otolarygology - Head Neck Surg. Congr.* (2014)
- 55. Presneau N, Shalaby A, Ye H, Pillay N, Halai D, Idowu B, Tirabosco R, Whitwell D, Jacques TS, Kindblom L-G, Brüderlein S, Möller P, Leithner A, Liegl B, Amary FM, Athanasou NN, Hogendoorn PC, Mertens F, Szuhai K, Flanagan AM: Role of the transcription factor T (brachyury) in the pathogenesis of sporadic chordoma: a genetic and functional-based study. *J. Pathol.* 223: 327–335 (2011)
- 56. Reed JA, Loganzo F [JR, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW: Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res.* 55: 2713–2718 (1995)
- 57. Rinner B, Froehlich EV, Buerger K, Knausz H, Lohberger B, Scheipl S, Fischer C, Leithner A, Guelly C, Trajanoski S, Szuhai K, Liegl B: Establishment and detailed functional and molecular genetic characterisation of a novel sacral chordoma cell line, MUG-Chor1. *Int. J. Oncol.* 40: 443–451 (2012)
- Rocca A, Farolfi A, Bravaccini S, Schirone A, Amadori D: Palbociclib (PD 0332991): Targeting the cell cycle machinery in breast cancer. *Expert Opin. Pharmacother*. 15: 407–420 (2014)
- 59. Saad AG, Collins MH: Prognostic value of MIB-1, E-cadherin, and CD44 in pediatric chordomas. Pediatr. Dev. Pathol. 8: 362–368 (2005)
- 60. Sakai K, Hongo K, Tanaka Y, Nakayama J: Analysis of immunohistochemical expression of p53 and the proliferation marker Ki-67 antigen in skull base chordomas: relationships between their expression and prognosis. *Brain Tumor*

Pathol. 24: 57-62 (2007)

- 61. Scheil S, Brüderlein S, Liehr T, Starke H, Herms J, Schulte M, Moller P: Genomewide analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1. *Genes. Chromosomes Cancer* 32: 203–211 (2001)
- Scimeca PG, James-Herry AG, Black KS, Kahn E, Weinblatt ME: Chemotherapeutic treatment of malignant chordoma in children. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 18: 237– 240 (1996)
- Shen J, Li C-D, Yang H-L, Lu J, Zou T-M, Wang D-L, Deng M: Classic chordoma coexisting with benign notochordal cell rest demonstrating different immunohistological expression patterns of brachyury and galectin-3. J. Clin. Neurosci. 18: 96–99 (2011)
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86: 364–372 (1999)
- 65. Singhal N, Kotasek D, Parnis FX: Response to erlotinib in a patient with treatment refractory chordoma. *Anticancer. Drugs* 20: 953–955 (2009)
- 66. Stacchiotti S, Casali PG, Vullo S Lo, Mariani L, Palassini E, Mercuri M, Alberghini M, Pilotti S, Zanella L, Gronchi A, Picci P: Chordoma of the mobile spine and sacrum: a retrospective analysis of a series of patients surgically treated at two referral centers. *Ann. Surg. Oncol.* 17: 211–219 (2010)
- Stacchiotti S, Longhi A, Ferraresi V, Grignani G, Comandone A, Stupp R, Bertuzzi A, Tamborini E, Pilotti S, Messina A, Spreafico C, Gronchi A, Amore P, Vinaccia V, Casali PG: Phase II study of imatinib in advanced chordoma. J. Clin. Oncol. 30: 914– 920 (2012)
- Stacchiotti S, Tamborini E, Vullo S Lo, Bozzi F, Messina A, Morosi C, Casale A, Crippa F, Conca E, Negri T, Palassini E, Marrari A, Palmerini E, Mariani L, Gronchi A, Pilotti S, Casali PG: Phase II study on lapatinib in advanced EGFR-positive chordoma. *Ann. Oncol.* 24: 1931–1936 (2013)
- 69. Straume O, Sviland L, Akslen LA: Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. Clin. Cancer Res. 6: 1845–1853 (2000)
- Tamborini E, Miselli F, Negri T, Lagonigro MS, Staurengo S, Dagrada GP, Stacchiotti S, Pastore E, Gronchi A, Perrone F, Carbone A, Pierotti MA, Casali PG, Pilotti S: Molecular and biochemical analyses of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) B, PDGFRA, and KIT receptors in chordomas. Clin. Cancer Res. 12: 6920– 6928 (2006)
- Thilmann C, Schulz-Ertner D, Zabel A, Herfarth KK, Wannenmacher M, Debus J: Intensity-modulated radiotherapy of sacral chordoma--a case report and a comparison with stereotactic conformal radiotherapy. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 41: 395–399 (2002)
- 72. Tirabosco R, Mangham DC, Rosenberg AE, Vujovic S, Bousdras K, Pizzolitto S, De Maglio G, Bakker MA den, Di Francesco L, Kalil RK, Athanasou NA, O'Donnell P,

McCarthy EF, Flanagan AM: Brachyury expression in extra-axial skeletal and soft tissue chordomas: a marker that distinguishes chordoma from mixed tumor/myoepithelioma/parachordoma in soft tissue. *Am. J. Surg. Pathol.* 32: 572–580 (2008)

- 73. Trucco MM, Awad O, Wilky BA, Goldstein SD, Huang R, Walker RL, Shah P, Katuri V, Gul N, Zhu YJ, McCarthy EF, Paz-Priel I, Meltzer PS, Austin CP, Xia M, Loeb DM: A novel chordoma xenograft allows in vivo drug testing and reveals the importance of NF-κB signaling in chordoma biology. *PloS One* 8: e79950 (2013)
- 74. Vaughn DJ, Hwang W-T, Lal P, Rosen MA, Gallagher M, O'Dwyer PJ: Phase 2 trial of the cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in patients with retinoblastoma protein-expressing germ cell tumors. *Cancer* (2014) doi:10.1002/cncr.29213
- Vujovic S, Henderson S, Presneau N, Odell E, Jacques TS, Tirabosco R, Boshoff C, Flanagan AM: Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. *J. Pathol.* 209: 157–165 (2006)
- 76. Walcott BP, Nahed BV, Mohyeldin A, Coumans J-V, Kahle KT, Ferreira MJ: Chordoma: current concepts, management, and future directions. *Lancet Oncol.* 13: e69–76 (2012)
- 77. Wang K, Tian K, Wang L, Wu Z, Ren C, Hao S, Feng J, Li J, Wan H, Jia G, Zhang L, Zhang J: Brachyury: A sensitive marker, but not a prognostic factor, for skull base chordomas. *Mol. Med. Rep.* 12: 4298–4304 (2015)
- Weniger MA, Pulford K, Gesk S, Ehrlich S, Banham AH, Lyne L, Martin-Subero JI, Siebert R, Dyer MJS, Möller P, Barth TFE: Gains of the proto-oncogene BCL11A and nuclear accumulation of BCL11A(XL) protein are frequent in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 20: 1880–1882 (2006)
- 79. von Witzleben A, Goerttler LT, Marienfeld R, Barth H, Lechel A, Mellert K, Böhm M, Kornmann M, Mayer-Steinacker R, von Baer A, Schultheiss M, Flanagan AM, Möller P, Brüderlein S, Barth TFE: Preclinical characterization of novel chordoma cell systems and their targeting by pharmocological inhibitors of the CDK4/6 cell cycle pathway. *Cancer Res.* (2015) doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3270
- 80. von Witzleben A, Goerttler LT, Lennerz J, Weissinger S, Kornmann M, Mayer-Steinacker R, von Baer A, Schultheiss M, Möller P, Barth TFE: In chordoma, metastasis, recurrences, Ki-67 index, and a matrix-poor phenotype are associated with patients' shorter overall survival. Eur. Spine J. (2015) doi:10.1007/s00586-015-4242-1
- Xia M, Huang R, Sakamuru S, Alcorta D, Cho M-H, Lee D-H, Park DM, Kelley MJ, Sommer J, Austin CP: Identification of repurposed small molecule drugs for chordoma therapy. *Cancer Biol. Ther.* 14: 638–647 (2013)
- Yakkioui Y, Temel Y, Creytens D, Jahanshahi A, Fleischeuer R, Santegoeds RGC, Van Overbeeke JJ: A comparison of cell-cycle markers in skull base and sacral chordomas. *World Neurosurg.* 82: e311–8 (2014)
- 83. Yamaguchi T, Suzuki S, Ishiiwa H, Ueda Y: Intraosseous benign notochordal cell tumours: overlooked precursors of classic chordomas? *Histopathology* 44: 597–

602 (2004)

Danksagung

Aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Eigene Vorträge und Publikationen

Gehaltene Vorträge

Sarkomkonferenz, Berlin März 2014:

"Presentation of 10 chordoma cell lines – the Ulm experience"

98. Jahrestagung der DGP, Berlin Juni 2014:

"Chordomas along the spine vary in morphology independent from localization"

Second Chordoma Conference in Europe, Frankfurt Juni 2014:

"Chordomas and chordoma cell lines – the Ulm experience"

99. Jahrestagung der DGP, Frankfurt 2015:

"Chordom-Zelllinien sprechen auf die pharmakologische Inhibition des CDK4/CDK6 Signalweges an. Präsentation von 6 neuen Chordom-Zelllinien und die Definition eines potentiellen Responder Profils"

Veröffentlichte Arbeiten und urheberrechtliche Genehmigungen

Cancer Research, 2015:

"Preclinical characterization of novel chordoma cell systems and their targeting by pharmocological inhibitors of the CDK4/6 cell cycle pathway."

Adrian <u>von Witzleben</u>, Lukas T. Goerttler, Ralf Marienfeld, Holger Barth, André Lechel, Kevin Mellert, Michael Böhm, Marko Kornmann, Regine Mayer-Steinacker, Alexandra von Baer, Markus Schultheiss, Adrienne M. Flanagan, Peter Möller, Silke Brüderlein, Thomas F.E. Barth, 75(18); 3823–31, Published Online: July 16, 2015, DOI: 10.1158/0008-5472, CAN-14-3270:

Figures 1-4, Supplementary Figures 1-9, Table 1, Supplementary Table 1 and 2. Die Abbildungen 17, 18, 20 – 30 und Tabellen 3 – 5 wurden in Cancer Research publiziert und können in dieser Doktorarbeit mit freundlicher Genehmigung von AACR verwendet werden.

Translations of any AACR materials into languages other than English are intended solely as a convenience to the non-English-reading public. Translation accuracy is neither guaranteed nor implied. If any questions arise related to the accuracy of the information contained in the translation, please refer to the English version of the AACR journal that is the Version of Record (VoR).

Springer and the European Spine Journal, 2015:

"In chordoma, metastasis, recurrences, Ki-67 index, and a matrix-poor phenotype are associated with patients' shorter overall survival."

Adrian <u>von Witzleben</u>, Lukas T. Goerttler, Jochen Lennerz, Stephanie Weissinger, Marko Kornmann, Regine Mayer-Steinacker, Alexandra von Baer, Markus Schultheiss, Peter Möller, Thomas F.E. Barth, Published Online: September 23, 2015, DOI: 10.1007/s00586-015-4242-1:

Figures 1-8, Supplementary Figures 1-6, Table 1.

Die Abbildungen 2, 7, 8 – 16 und Tabelle 2 wurden im European Spine Journal publiziert und können in dieser Doktorarbeit mit freundlicher Genehmigung von Springer Science and Business Media verwendet werden.