Institut für Pathologie Ulm, Prof. Dr. med. Dr. nat. med. Nadine Gaisa

Einfluss der *HOXB7*-Expression auf den MAPK-Signalweg und die *TBXT*-Expression in Chordomzellen sowie Etablierung der Linien U-CH22 und U-CH24 Q3

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm
Luisa Haase
geboren in Stuttgart
2023

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Barth
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schultheiß
Tag der Promotion: 06.12.2024

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis V
1 Einleitung 1
1.1 Chordome 1
1.1.1 Epidemiologie 1
1.1.2 Therapie 2
1.1.3 Ursprung 3
1.1.4 Signalwege in Chordomen 4
1.1.5 Etablierung neuer Zelllinien 9
2 Material und Methoden 11
2.1 Materialliste 11
2.2 Methoden 20
2.2.1 Zellkultur 20
2.2.2 Immunzytochemie 23
2.2.3 DNA-Isolation 24
2.2.4 RNA-Isolation 25
2.2.5 Umschreibung RNA in cDNA 25
2.2.6 PCR und Gelelektrophorese 26
2.2.7 Quantitative PCR (qPCR) 27
2.2.8 Western Blot und SDS-Page 27
2.2.9 STR-Analyse 28
2.2.10 Antikörpertest 29
2.2.11 *GFP*-Vektor-Transfektion 29
2.2.12 Endo-Porter und PCI (Photochemical internalisation) 30
2.2.13 Toxizität 31
2.2.14 *HOXB7*-Transfektionen 32
2.2.15 *HOXB7*-siRNA-Interferenz 32
2.2.16 Analyse von HOXA7 in Chordomzellinien 33
2.2.17 Etablierung der Linien U-CH22 und U-CH24 Q3 33
2.2.18 Ethikvotum 34
3 Ergebnisse 35
3.1 Expressionsmodulation von *HOXA7* und *HOXB7* 35
3.1.1 Antikörpertest 35
3.1.2 *GFP*-Plasmid-Transfektionen 35

3.1.3 Erhöhung der Transfektionseffizienz durch Transfer endosomal aufgenommener Vektoren in Zytosol durch Endo Porter und PCI 37
3.1.4 Toxizität 41
3.1.5 *HOXB7*-Plasmid Transfektion 41
3.1.6 *HOXB7*-siRNA-Transfektion 47
3.1.7 Messung der Viabilität der Chordomzellen nach Überexpression bzw. Reduktion der HOXB7-Mengen mittels MTS-Assay 52
3.1.8 *HOXA7*-Transfektionen 54
3.2 Etablierung Zelllinien 55
3.2.1 U-CH22 55
3.2.2 U-CH24 Q3 61
4 Diskussion 65
4.1 HOXB7-Versuche 65
4.1.1 *GFP*-Plasmid-Transfektionen und Transfektionseffizienz 65
4.1.2 *HOXB7*-Plasmid Transfektion 66
4.1.3 *HOXB7*-siRNA-Transfektion 69
4.1.4 *HOXA7*-Knockdown Versuche 69
4.1.5 HOXB7 Autoregulation 70
4.1.6 Weitere Optionen zur Analyse des HOXB7 Signalwegs 71
4.2 Etablierung von Zelllinien 71
4.2.1 U-CH22 72
4.2.2 U-CH24 Q3 73
5 Zusammenfassung 74
6 Literaturverzeichnis 75
7 Danksagung 83
8 Lebenslauf 84

I.Abkürzungsverzeichnis

AK: Antikörper

AKT: Gene der Proteinkinasen B (PKBα/β/γ)

BNCT: benign notochordal tumours

BSA: bovine serum albumine

cDNA: complementary Desoxyribonukleinsäure

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonukleinacid

dNTP: desoxyDinukleotidtriphosphat

Dt.: Deutsch

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

EMT: epitheliale mesenchymale Transition

FCS: fetal calf serum auch

FBS: fetal bovine serum

GFP: green fluoreszent protein

H.E.: Hämatoxylin/Eosin

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium

kDa: Kilodalton

mAK: monoklonaler Antikörper

MDCK: Madin-Darby canine kidney

MTS: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)

MW: Mikrowelle

NOS: not other specified

ORF: open reading frame

PBS: Phosphate buffered saline

PCI: Photochemical interalisation

PCR: poly chain reaction

RNA: Ribonukleinacid

Rpm: Rounds per minute

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

sgRNA: single-guide

shRNA: small hairpin

siRNA: small interfering RNA

SKT: Schnellkochtopf

SNP: Single nucleotid polymorphism

STR: short tandem repat

Taq: Thermus aquaticus

TBS: TRIS-buffered saline

TBS-T: Tris buffered saline-Tween

WHO: World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Chordome

Chordome sind langsam wachsende, lokal aggressive Tumoren vorwiegend des Achsenskelettes, deren Ursprung vermutlich auf Überbleibseln der Chorda dorsalis beruht [51, 54].

1.1.1 Epidemiologie

Chordome gehören mit einer Inzidenz von 0,08 pro 100 000 Einwohnern pro Jahr [47] und einem Anteil von 8,4% Prozent der primären Sarkome des Knochens [19] zu den sogenannten „orphan diseases“. Das Verhältnis von Männern zu Frauen liegt laut Literatur bei 62,5 zu 37,5% [47] bei sakralen Tumoren und bei 55,7% zu 44,3% bei clivalen Tumoren [11]. Die Verteilung liegt im Axialskelett bei ca. 32% kranial, 32,8% spinal, und 29,2% sacral [47]. Allerdings gibt es Quellen, die die kranialen Anteile mit 42% höher schätzen [11], ebenso wie Quellen, die den sakralen Anteil auf 78% legen [67]. Die clivalen Tumoren sind im Vergleich zu sakralen deutlich kleiner und häufiger bei jüngeren Patienten vorzufinden [34]. Auch weisen sie eine geringere Ki-67-Rate, die mit einer erhöhten Proliferation assoziiert ist, sowie eine geringere Tendenz zum Metastasieren auf [34]. Extraaxiale Chordome sind mit einem Anteil von 6% selten, jedoch beschrieben [47, 72], so findet sich zum Beispiel im Ulmer Kollektiv ein Chordom des anterioren Nasenseptums [28].

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Chordomen liegt laut Literatur bei 67,6% [47], die Zehn- Jahres-Überlebensrate bei 39,9% [47]. Nach Therapie kommen Rezidive häufig mit bis zu 59% der Fälle vor [67]. Metastasen finden sich in bis zu 22% [67]. Diese treten vor allem in der Lunge (69%), im Knochen (16%) und im Weichgewebe (13%) auf [67].

Die meisten Chordome treten spontan auf, jedoch sind familiäre Häufungen mit bis zu acht betroffenen Verwandten beschrieben [75], die mit einer Gen-Duplikation von *TBXT*, lokalisiert auf 6q27, einhergehen [79]. Chordome treten mit einer Prävalenz von 0,02/100000 Einwohnern [47] eher selten in einem Alter unter 40 Jahren auf. Das mittlere Alter liegt dabei bei 58,5 Jahren und ist mit einem allgemeinen Anstieg der Inzidenz mit zunehmendem Alter [47] verbunden. Allerdings wurden Fälle von pädiatrischen Chordomen beschrieben, diese finden sich vor allem bei clivalen Chordomen [15, 47]. Zudem sind Unterschiede in der ethnischen Prävalenz

beschrieben. So treten Chordome in der afroamerikanischen Bevölkerung seltener auf als in der eurasischen [47].

1.1.2 Therapie

Die Goldstandard der Therapie von Chordomen ist die en-bloc-Resektion, da diese im Vergleich zur reinen Radiotherapie, der Teilresektion oder deren Kombination, eine deutlich geringere Rezidivrate und ein längeres krankheitsfreies Intervall aufweist und die einzige Therapie mit einem rezidivfreien Überleben von mehr als 5 Jahren ist [7, 80]. Allerdings muss die Operation in oft komplizierten und schwer zugänglichen Regionen durchgeführt werden. Das führt in bis zu 10% der Fälle zu operationsbedingten Todesfällen [7, 67]. Zudem können weitere Komplikationen wie Nervenschädigungen, die u.a. zu Inkontinenz führen können, auftreten [38]. Für eine Steigerung der allgemeinen Überlebenszeit und des lokalen und distalem (metastasiertem) rezidivfreien Überlebens ist vor allem die Tumorgröße zu Beginn der Therapie ausschlaggebend. Eine weite Resektion im Rahmen der en bloc Resektion scheint tendenziell im Vergleich zu einer marginalen oder intraläsionalen Resektion eine Steigerung des allgemeinen Überlebens zu bewirken, ebenso ein signifikant längeres lokal rezidivfreies Überleben, sowie ein allgemein rezidivfreies Überleben [67]. Der Erfolg einer en bloc Resektion sinkt bei Operationen an einem rekurrentem oder bereits behandeltem Tumor, bei nicht mehr intakten Tumoren oder bei intraläsionalen Grenzen [7].

Eine adjuvante Radiotherapie kann sinnvoll sein [80]. Allerdings beeinflusst eine Radiotherapie unter 60Gy weder das allgemeine Überleben noch das lokale rezidivfreie Überleben [67]. Patienten, die ausschließlich mit Radiotherapie behandelt wurden, oder eine intraläsionale Resektion hatten beziehungsweise eine Kombination hieraus, hatten laut einer 50 Jahre andauernden teils retrospektiven und teils prospektiven Studie ein kürzeres krankheitsfreies Intervall und wiesen ein Rezidiv nach spätestens 2 Jahren auf [7]. Jedoch zeigen Studien, dass sowohl eine Carbon Ion Radiotherapie als auch eine Hochdosis Helium Ionen Therapie bei sakralen Tumoren eine Kontrolle der Tumorgröße bewirken kann [33, 62]. Das Gleiche gilt für eine Hochdosis Protonentherapie [52].

Die Chemotherapie hat eine geringere Bedeutung in der Behandlung von Chordomen, da es sich um langsam wachsende Tumoren handelt und Chemotherapie vorwiegend auf stark proliferierende Zellen wirkt. Jedoch gibt es Hinweise, dass sie

unteranderem bei dedifferenzierten Tumoren sinnvoll eingesetzt werden könnte [22]. So wirken manche Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Yondelis, Zalapsis und Cisplatin, nicht jedoch Paclitaxel und Methotrexat, negativ auf die Viabilität von Chordomzellen in Zellkultur [78].

Aufgrund bisheriger noch nicht ausreichend effektiver Therapien werden neue Therapiemethoden herangezogen. Da PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor A), PDGFRB und KIT in Chordomen exprimiert werden [71], kann Imatinib bei inoperablen Patienten einen Tumorarrest bewirken [26]. Bei Imatinib-Resistenz gibt es in kleineren Studien Hinweise, dass eine Kombination von Imatinib mit Sirolimus eine Tumorantwort auslöst [68]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Chordome zumeist positiv für p-AKT (92%), p-TSC2 (96%), teils für p-mTOR (27%), sämtliches mTOR (75%), p-p70S6K (62%) p-4E-BP1 (96%) und eIF-4E (98%) sind. Daher ist denkbar, dass Chordome sensibel auf mTOR-Inhibitoren reagieren. Das Gleiche gilt für die Inhibition des AKT-Signalweges [58]. In Einzelstudien wurde bei Expression des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor) eine Tumorrückbildung unter Cetuximab/Gefitinib beobachtet [27]. Auch Erlotinib, ein EGFR-Rezeptor-Inhibitor, konnte in Einzelfällen eine Tumorregression bewirken [29].

1.1.3 Ursprung

Chordome haben ein typisch vakuolenhaltiges Plasma, das erstmals von Rudolf Virchow 1857 aufgrund des schaumigen Plasmas als physaliphor (aus dem Griechischen: „Blasen tragend“) und charakteristisch für diesen Tumor beschrieben wurde [73]. 1858 wurde erstmals die Vermutung publiziert, dass Chordome vom Notochord abstammen [51, 54].

Der Begriff „eccohordosis physaliphora“ wurde 1894 zuerst als Beschreibung für Chordome verwendet [60], heute wird damit ein Hamartom mit notochordalem Ursprung, auch BNCT (benign notochordal cell tumor; „gutartiger notochordaler Zelltumor“) genannt, bezeichnet. Bei einer BNCT handelt es sich um eine entlang des Achsenskeletts lokalisierte, primäre intraossäre Läsion, die als Zufallsbefund in Autopsien gefunden werden kann [2, 48]. In einer Post-Mortem-Studie konnten BNCT in 11,5% der untersuchten Fälle im Clivus, in 5% in der zervikalen Wirbelsäule, in 2% in der lumbalen Wirbelsäule und in 12% im Sakrum nachgewiesen werden, womit sie die topographische Verteilung der Chordome reflektieren [2].

Die Chorda dorsalis, auch Notochord genannt, ist eine embryonale Struktur, die sich ebenfalls durch ein vakuolenhaltiges Plasma auszeichnet. Sie ist essenziell für die Bildung des Neuralrohres und die Formierung der anterior-posterior-Achse. Charakteristisch ist eine starke Zytokeratinexpression und eine schwache Expression von Vimentin [1], die mit der Separation des Notochordes vom epithelialen Gewebe im Verlauf der Embryogenese zunimmt, während die Zytokeratinexpression abnimmt. Da gezeigt werden konnte, dass sowohl das rostrale als auch das kaudale Ende des Notochords komplexe Strukturen mit Gabelungen und Abspaltungen darstellen [61], ist erklärbar, warum die meisten Chordome an beiden Enden des Notochords auftauchen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zellen des Notochords im Laufe der Embryogenese sowohl im Nucleus pulposus persistieren können, oder in selteneren Fällen im Annulus fibrosus [16].

Bis vor kurzem wurden Chordome in folgende Typen unterteilt: klassisch (66,7%), mit chondroiden Anteilen (25,5%), chondroid (3,9%) und dedifferenziert (3,92%) [36]. Die aktuelle Ausgabe der WHO-Klassifikation „Weichgewebs und Knochentumore“ (5. Edition von April 2021) unterteilt Chordome jedoch in das konventionelle Chordom, als die häufigste Variante mit klassisch blasigen Anteilen, in das aggressivere dedifferenzierte Chordom, das nur 5% aller Chordome ausmacht und nur zum Teil Brachyury exprimiert und in das gering differenzierte Chordom, das durch den Verlust von *SMARCB1* klassifiziert ist und vermehrt bei jüngeren Patienten vorkommt. Das chondroid differenzierte Chordom wird von der aktuellen WHO-Klassifikation als konventionelles Chordom aufgefasst [83]. Immunzytochemische Marker sind Zytokeratin (100%), EMA (100%), S100 (85,7%), und Vimentin (100%) [36]. Die Ki-67-Rate liegt zwischen 1-50%, im Mittel jedoch bei 5% , was das Chordom als insgesamt langsam wachsenden Tumor auszeichnet [76].

1.1.4 Signalwege in Chordomen

1.1.4.1 Brachyury

Eine Besonderheit bei Chordomen ist die starke Expression des *TBXT*-Gens, das für den Transkriptionsfaktor Brachyury codiert. Da sowohl Chordome als auch das Notochord *TBXT* exprimieren, gibt die Transkription einen direkten Hinweis auf den Ursprung der Chordome [74]. Das Vorhandensein von Brachyury in über 90% [36] aller Chordome ist ein sensitiver Marker für ein Chordom. Die Spezifität ist ebenso hoch, da das Protein in einer großen Variabilität an Tumoren nicht detektierbar ist,

inklusive den sonst häufig schwer zu differenzierenden Chondrosarkomen oder nicht chordomatösen Tumoren mit chondroider oder myxoider Matrix [36, 74]. Jedoch findet sich eine Brachyuryexpression auch häufig in Seminomen und Hämangioblastomen und teilweise in Lungenkarzinomen [21, 49, 55]. Die Expression von *TBXT* findet sich in allen Unterformen von Chordomen, sowie deren Metastasen [74]. In spontan auftretenden Chordomen sind eine erhöhte Anzahl an Kopien von *TBXT* durch unter anderem Amplifikationen des Genes oder Polysomie des Chromosomes 6 häufig anzutreffen [59].

Brachyury (lit.: „kurzer Schwanz“) wurde zum ersten Mal 1927 als semi-dominante Mutation in Form einer phänotypischen Analyse bei einer spontan auftretenden Mausmutante beschrieben [14, 56, 82]. Bei homozygoten Mäusen, welche als Embryos nach 10,75 Tagen sterben, fehlen das Notochord und die posterioren Bereiche, inklusive deren Glieder. Das Neuralrohr ist irregulär, ebenso die Somiten [14]. Ein *in vivo* knockdown (dt.: Herunterregulierung) von Brachyury mit miRNA an Mäusen führte zu Defekten und mangelnder Differenzierung des Notochords, welches ein eher neuralrohrähnliches Aussehen annahm. Ebenso kam es zu einer fehlenden Differenzierung des paraaxialen Mesenchyms, was bedeutet, dass es zu einem Verlust an Mesoderm kam [56]. Zudem hatten die Embryos Defekte des Axialskelettes, konsistent mit den Neuralrohrdefekten und schwere kaudale Defekte [56]. In Versuchen an *Xenopus sp.* konnte gezeigt werden, dass eine Injektion des in *Xenopus sp.* korrespondierenden Gens zu *TBXT*, *Xbra*, in frühen Stadien zur Ausbildung von Mesoderm sowie zur Aktivierung von Genen für die Formierung des posterioren Mesoderms führt [17], was insgesamt die Vermutung aufkommen ließ, Brachyury sei für die Formierung des posterioren Mesoderms verantwortlich. In Tumorzellen kann eine Überexpression von Brachyury eine epitheliale-mesodermale-Transition auslösen, während eine Inhibition von Brachyury einen Verlust von mesenchymalen Markern und eine reduzierte Migration von Zellen, sowie eine verminderte Tumorinvasivität auslöst [21].

Brachyury bindet mit seiner N-terminalen Domäne sehr spezifisch an eine 24bp-große, palindrome DNA-Sequenz [41] und dient hierbei als Transkriptionsfaktor. Dies konnte anderem in einer kombinierten Vektor-Transfektion in HeLa Zellen mit einem *TBXT*-Vektor und einem Vektor mit der T-Binde-Sequenz und einem Reportergen gezeigt werden [42]. Jedoch kann Brachyury in *Xenopus Xbra* auch als

Monomer an eine nicht palindrome Sequenz in der upstream Regulationsregion binden [10]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Hälfte von Brachyury in der Maus zwei Transaktivierungsdomänen und zwei Repressionsdomänen hat [42]. Im Verlauf wurden weitere Gene beschrieben, die eine *TBXT*-homologe Domäne aufweisen, und die zur sogenannten T-Box-Familie zusammengefasst wurden [6].

Brachyury spielt eine zentrale Rolle als Transkriptionsfaktor in der Embryogenese und ebenso bei Chordomen in der Tumorgenese. In der Linie U-CH1, konnten 257 Gene identifiziert werden, die direkt von Brachyury reguliert werden und weitere 366, welche indirekt reguliert werden [53]. Dabei scheint Brachyury die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie CTGF, PTN, TGFA, EGF, FGF1, und BMP6 zu regulieren. Ein knockdown von Brachyury mit einer shRNA in der Linie U-CH1 führte zu einer Veränderung der Morphologie im Sinne eines eines differenzierteren Stadiums und einem Wachstumsstopp [30, 59] . Ein CRISPR-Cas9-Versuch an den Linien UM-Chor1 und MUG-Chor1 führte zum Absterben der Tumorzellen, nicht so jedoch bei Zelllinien anderer Tumoren [66].

Das Auftreten von Chordomen ist stark assoziiert mit dem Vorkommen eines Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl.: single nucleotid polymorphism) in Exon 4 des *TBXT*-Gens, rs2305089, resultierend in pGly177Asp. Dieser SNP kommt in 86% aller europäischer Individuen vor, die an Chordomen erkrankt sind im Vergleich zu 53% in der Kontrollgruppe [57]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die *TBXT*-Expression in homozygoten Genträgern höher war als in heterozygoten Trägern [57].

Da Brachyury ein Schlüsselprotein in der Tumorgenese von Chordomen ist, gibt es Bestrebungen, es als Zielstruktur für eine mögliche Therapie zu nutzen. Hierfür gibt es verschiedene Ansätze. Für weitere mögliche Therapieansätze bei Chordomen sind so zum Beispiel auch die upstream-Regulatoren (dt.: etwa „vorgeschaltet“) von Brachyury von Bedeutung. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass 94% der Chordome mindestens einen von vier FGF-Rezeptoren (Fibroblast-growth-factor, dt.: Fibroblasten-Wachstumsfaktor“) exprimieren. Zudem besteht eine direkte Verbindung von dessen Substrat, FRS2α, mit dem RAS-RAF-MEK-ERK-Weg, auch MAP-Kinase-Weg (Mitogen-activated-protein) [65]. In Lungenkarzinomzelllinien konnte die Inhibition von FGFR1 eine Suppression von Brachyury auslösen [31], in

Chordomen löste die Inhibition von FGFR eine verminderte Phosphorylierung von MEK und ERK, sowie eine Suppression von Brachyury aus und wurde als essenziell beschrieben [32]. Eine Inhibition von MEK/ERK führte zu einer Suppression von Brachyury [32]. Beides führte in den verwendeten Zelllinien zur Apoptose und reduziertem Zellwachstum [32]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Brachyury die FGF-getriggerte EMT (epitheliale mesenchymale Transition) ebenfalls positiv reguliert [32].

1.1.4.2 *HOX*-Gene

HOX-Gene sind eine Familie von regulatorischen Genen, die entlang der anterior-posterior-Achse im zentralen Nervensystem sowie dem paraaxialen Mesoderm von Vertebraten-Embryos exprimiert werden [8]. Dabei zeigt die Expressionsreihenfolge entlang der anterior-posterior-Achse eine Kolinearität mit der Reihenfolge auf dem jeweiligen Chromosom [20, 24]. Eine verringerte Expression und Inaktivierung von *HOX*-Genen in Mäusen und Drosophila-Fliegen zeigen, dass *HOX*-Gene verantwortlich für spezifisch regionale Identität entlang der anterior-posterioren-Achse sind [8, 40]. In Vertebraten sind 39 *HOX*-Gene bekannt, die in vier verschiedenen, auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierten, Clustern (A-D) unterteilt werden. Die Gene werden entlang ihrer Reihenfolge vom 3‘-Ende zum 5‘-Ende in die Paraloggruppen 1-13 untergliedert [43]. HOX-Proteine wie HOXA7, HOXB7 und HOXA5 können durch Phorbol-Ester getriggerte Aktivierung der PKC vermittelten Differenzierung inhibiert werden [44]. Auch konnte umgekehrt gezeigt werden, dass HOXA7 in der upstream-Region von Transglutaminase, einem Quervernetzungs- und differenzierungsverbundenem Protein, reprimierend bindet [44].

HOX-Proteine gehen eine dimere Bindung mit PBX ein [12, 50]. Diese Interaktion kann mit einem, den HOX-Proteinen der paralogen Gruppe 1-9 strukturell ähnelndem Peptid, HXR9 inhibiert werden [50]. In Chordomen führt die Behandlung mit HXR9 zur Apoptose der Zellen [64].

Sakrale Chordome haben im Vergleich zu clivalen Tumoren eine verstärkte Expression von *HOXA7, HOXA9* und *HOXA10* [34]. Während die bereits beschriebene größere Masse von sakralen im Vergleich zu clivalen Tumoren mit der anatomischen Begrenzung von clivalen Tumoren im Schädel erklärbar wäre, ist weiterhin unklar, ob die höheren Ki-67-Raten und höheren Metastasierungs-Tendenzen mit der *HOX*-Expression zusammenhängen. Für die Bedeutung der *HOX*-Gene in

Chordomen ist weiterhin zu erwähnen, dass sich eine gesteigert exprimierte *HOXA-AS3*-, *HOXB7*- und *HOXB13*-Rate bei rekurrenten Chordomen findet [64].

An der Regulation von *HOX*-Genen sind auch miRNAs beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass ein knockdown der miRNA-196 zu einer Ausdifferenzierung des letzten zervikalen Wirbels hin zu einem thorakalen führen kann, bedingt durch eine Steigerung der HOXB8-Mengen [46]. Auch konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmuster von miRNA10a und miRNA196a in Korrelation mit dem von HOX-Proteinen ist [45].

Da unter Anderem mi-RNA-196a-5p-Raten in rekurrenten Chordomen signifikant niedriger als in primären Chordomen sind, sowie negativ mit den HOX-Mengen korrelieren, kann davon ausgegangen werden, dass diese ein Regulator von verschiedenen HOX-Genen unter Anderem in Chordomen ist [64]. Die weitere Erforschung der Rolle der HOX-Proteine in Chordomen erscheint somit essenziell, da sie für die Tumorgenese und Proliferation ein entscheidender Faktor sein könnten.

HOXB7 scheint eine besondere Rolle zuzukommen, da Antisense-HOXB7-, nicht jedoch HOXB2- und HOXB4-Oligomere in Melanomzellen zur Inhibition der Proliferation führen [9].

1.1.4.3 Hypothetischer Signalweg und Fragestellung

Für die Behandlung von Chordomen und das Verständnis der Tumorgenese ist die Regulierung von Brachyury zentral. Wie bereits beschrieben, konnte in Chordomen der FGFR/MAP-Kinase/Brachyury-Weg gezeigt werden [32, 65]. Ebenso konnte die Bedeutung von HOX-Proteinen in Chordomen und deren Regulierung durch miRNA-196a-5p nachgewiesen werden [34, 64]

Eine Verbindung von HOX-Proteinen mit dem MAPK-Weg und Brachyury konnte in Chordomen noch nicht nachgewiesen werden, allerdings geben Versuche bei anderen Tumoren Hinweise darauf, dass es auch bei Chordomen eine Verbindung geben könnte. In MDCK-Zellen (Madin-Darby-Hunde-Nierenzellen) konnte so z.B. nachgewiesen werden, dass *HOXB7*-transfizierte Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle höhere aktive Raten von RhoA und Ras aufwiesen, sowie eine höhere Aktivität des MAPK-Weges [77]. Eine Inhibition des MAPK-Weges konnte in MDA-MB-435 (Melanom) Zellen mittels si-RNA-Suppression erreicht werden [77]. Ein knockdown von *HOXB7* mittels shRNA in Brustkrebs-Zellen löste eine verminderte

Phosphorylierung von ERK und eine Herunterregulierung des AKT und MAPK-Signalweges aus [25]. *HOXB7*-antisense Oligomere konnten eine Herunterregulierung von *bFGF*-mRNA verursachen, zudem konnte gezeigt werden, dass *HOXB7*-DNA im Bereich vor der bFGF-Promotorregion bindet [9]. In der Mammakarzinomlinie MCF-7 konnte mittels *HOXB7*-Vektor-Überexpression ein Anstieg der *EGFR*-Expression verzeichnet werden, während ein siRNA vermittelter knockdown zu einer verminderten *EGFR*-Expression, sowie einer verminderten Phosphorylierung im MAPK-Weg führte [37]. ChIP-qPCR bestätigte die Bindung von HOXB7 an proximalen *bFGF*- und *EGFR*-Promotorregionen [25].

Aus den oben aufgeführten Studien ergibt sich ein hypothetischer Signalweg in Chordomen, der die mi-RNA-196a-5p über HOXB7 und den MAPK-Weg direkt in Verbindung mit Brachyury stellt (Abb. 1).



Abbildung 1: Hypothetischer Signalweg:
Dargestellt ist der hypothetische Signalweg, der miRNA 196a über HOXB7 und den MAPK-Weg mit Brachyury verbindet. Die Hypothese basiert auf Daten vorausgegangener Studien.

Dieser Signalweg konnte bis jetzt noch nicht in Chordomen dargestellt werden, jedoch geben Versuche in anderen Tumoren (s.o.) den Hinweis, dass HOXB7 über den MAPK-Weg Brachyury auch in Chordomen reguliert.

1.1.5 Etablierung neuer Zelllinien

Aufgrund der geringen Inzidenz von Chordomen sind klinische Studien mit hohen Fallzahlen schwierig durchzuführen. Für die Optimierung der Therapie und Testung neuer Behandlungsansätze spielen deshalb Zelllinien eine besondere Rolle. Die erste validierte Chordomzelllinie, U-CH1, wurde 2001 in Ulm etabliert und stammte von einem Rezidiv eines sacrococcygealen Chordoms [63]. Sie zeigt für Chordome typische physaliphore Zellen mit zytoplasmatischen Vakuolen, runden Zellkernen und immunzytochemisch betrachtet zeigte sich eine Expression von S100, Vimentin, EMA und Zytokeratin [63]. Seither wurde die Linie U-CH1 für verschiedene Studien verwendet [39, 78]. Die Etablierung der Linie U-CH11 aus einem Primarius und aus dessen Rezidiv, U-CH11R, ergaben ein intrapersonelles Model einer Tumorprogression eines Chordomes [64]. Die Zelllinien U-CH17P, U-CH17M und U-

CH17S wurden aus einem primären sakralen Chordom, seiner Weichgewebs- und seiner Hautmetastase etabliert [35]. Hierbei konnte mit einem Vergleich der genomischen Aberrationen gezeigt werden, dass im Primarius bereits Vorläuferzellen von U-CH17P, U-Ch17M und U-CH17S im Primärtumor vorhanden waren, was zeigte, dass klonale Diversität bereits in dem Primärtumor existierte, und somit nicht alle Subklone zur Metastasierung neigen [35]. Zudem wurde eine Zelllinie aus einem extra-axialen Chordom der Scapula etabliert. Die Linie EACH-1 zeigte interessanterweise nach 30 Passagen einen Einbruch und eine Abnahme an Brachyury, was mit einer fortschreitenden Dedifferenzierung *in vitro* erklärt wurde [18].

Zielsetzung:

1. Analysiert werden soll, ob eine erhöhte, beziehungsweise erniedrigte Menge an HOXB7 eine Hoch- beziehungsweise eine Herunterregulierung des MAPK-Weges und infolgedessen auch von Brachyury verursachen kann.

2. In der Arbeit sollen zusätzlich neue Chordomzelllinien etabliert werden. Dazu wurde einerseits eine Linie aus einer Metastase aus Tumorzellen eines Pleuraerguss bei bekanntem mehrfach metastasiertem, sakralem Chordom etabliert. Zudem wurde versucht, aus einem sakralen Chordom aus 4 Quadranten je eine Linie zu etablieren, die als weiteres Modell für Tumorheterogenität im Primärtumor dienen kann, wovon die Etablierung des Quadranten 3 in dieser Arbeit behandelt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Dargestellt sind jeweils der Name der Zelllinie, deren Herkunft und das Alter des Patienten bei Gewebsentnahme. Unter „Herkunft“ ist der Ort der Etablierung angegeben. Die Linie HEK293T ist kommerziell erhältlich, alle anderen Linien, außer den in dieser Arbeit etablierten Linien U-CH22 und U-CH24 Q3 sind zu diesem Zeitpunkt bei der Chordoma Foundation erhältlich.

Zelllinie	**Ursprung,**	**Alter**	**Herkunft**
HEK293T	Embryonale Nierenzellen	-	Universität Stanford
Mug-Chor1	Sakrales Chordom, Rezidiv	57	Universität Graz
U-CH1	Sakrales Chordom, Rezidiv	56	Universität Ulm
U-CH2	Sakrales Chordom, Rezidiv	72	Universität Ulm
U-CH7	Sakrales Chordom, Primarius	67	Universität Ulm
U-CH11	Sakrales Chordom, Primarius	71	Universität Ulm
U-CH11R	Sakrales Chordom, Rezidiv	75	Universität Ulm
U-CH19	Sakrales Chordom Primarius	77	Universität Ulm
U-CH22	Pleuraerguss bei sakralem Chordom	78	Universität Ulm
U-CH24 Q 3	Sakrales Chordom, Rezidiv	47	Universität Ulm
U-CH24 Q 4	Sakrales Chordom, Rezidiv	47	Universität Ulm
UM-Chor1	Clivales Chordom, Primarius	66	Universität Michigan

2.1.2 Antikörper Western Blot

Tabelle 2: Verwendete Antikörper im Immunoblot:

Dargestellt sind die Antikörper, die für die SDS-Page und Immunoblotversuche verwendet wurden. Aufgeführt sind das Antigen, die Herkunft, die Verdünnung des Primärantikörpers, die Verdünnung des Sekundärantikörpers und der Hersteller.

Antigen	**Herkunft**	**Verdünnung**	**Verdünnung Sek.-AK**	**Hersteller**
Brachyury	Kaninchen	1: 2000	1:10 000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)
ERK	Kaninchen	1: 1000	1:2000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)
FGFR2	Kaninchen	1: 1000	1:2000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)

GAPDH	Kaninchen	1: 2000	1: 10 000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)
HistonH3	Kaninchen	1: 2000	1: 10 000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)
HOXA7	Maus	1: 1000	1:2000	Proteintech; (Rosemont, USA)
HOXB7	Kaninchen	1: 1000	1:2000	Proteintech; (Rosemont, USA)
MEK	Kaninchen	1: 1000	1:2000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)
Mouse (Sekundärantikörper)	Goat (H+L)	Siehe „Verdünnung Sek.-AK“ des jeweiligen Primär-AK	-	Invitrogen/ Thermo Fisher scientific
pERK	Kaninchen	1: 1000	1:2000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)
pMEK	Kaninchen	1: 1000	1:2000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)
Rabbit (Sekundärantikörper)	Ziege -IgG	Siehe „Verdünnung Sekundärantikörper“	-	Sigma life Science, Sigma-Aldrich; (St. Louis, USA)
ß-Aktin	Maus, mAb	1: 2000	1:50 000	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
ß-Catenin	Kaninchen	1: 1000	1:2000	Cell signaling technology; (Danvers, USA)

2.1.3 Antikörper Immunzytochemie

Tabelle 3: Antikörper Immunzytochemie

Dargestellt ist das Antigen des Antikörpers, die Verdünnung, die Vorbehandlung, der Hersteller und der Klonname des Antikörpers

Antigen	**Klonname**	**Verdünnung**	**Vorbehandlung**	**Hersteller**
Brachyury	EPR18113	1:4000	Dampfgarer, pH 8	Abcam; (Camebridge, Großbritannien)
CDK4	QDCS-31.2	1:50	Dampfgarer, pH 6,1	Zytomed; (Bargteheide, Deutschland)
CDK6	8H4	1:100	SKT	LSBio

CK (Breit-band)	CK AE1+3	1:100	Pronase	Dako, (Glostrup, Dänemark)
EMA	E29	1:500	Pronase	Dako, (Glostrup, Dänemark)
Ki-67	BAF47	1:50	SKT	BD
p16 (*CDKN2A*)	1D7D2	1:200	MW	Abcam; (Camebridge, Großbritannien)
p53	DO-7	1:400	MW	Dako, (Glostrup, Dänemark)
S100	polyklonal	1:1000	Pronase	Dako, (Glostrup, Dänemark)
Vimentin	Vim3B4	1:300	MW	Dako, (Glostrup, Dänemark)

2.1.4 siRNA und Vektoren

Tabelle 4: siRNA und Vektoren

Dargestellt sind die aufgelisteten Vektoren und siRNAs und die Namen der Hersteller

Name des Vektors/ der siRNA	**Hersteller**
GFP-Vektor	Pmax, Lonza (Basel, Schweiz)
HOXA7-siRNA	Santa Cruz, (Dallas, USA)
HOXB7-siRNA	Santa Cruz (Dallas, USA)
HOXB7-Vektor	Addgene (Watertown, Massachusetts, USA)
Kontroll-siRNA	Santa Cruz (Dallas, USA)
Kontroll-Vektor	Addgene (Watertown, Massachusetts, USA)

2.1.5 Primer

Tabelle 5: Primer

Dargestellt sind die jeweiligen Primer mit der durch die PCR nachgewiesene DANN, die Primeranlagerungstemperatur, die Primersequenz und der Hersteller.

Nachgewiesene(s) Gen/ DNA	**Primeranlage-temperatur**	**Primersequenz**	**Hersteller**
GAPDH	54°C	FW: 5‘ CCT GCA CCA CCA ACT GCT TA 3‘ RV: 5‘TGG CAT GGA CTG TGG TGA TG3‘	Biomers; (Ulm, Deutschland)
Mycoplasmen	50°C	FW: 5‘ CRC CTG RGT AGT AHR HWC AG 3‘ RV: 5’GCG GTG TGT ACA ARM CCC GA 3‘	Biomers; (Ulm, Deutschland)
ß-Aktin	52°C	FW: 5‘ CCA CCA TGT ACC CTG GCA TT 3‘ RV: 5‘ TCA GGA GGA GCA ATG ATC TTG A 3‘	Biomers; (Ulm, Deutschland)
TBXT	52°C	FW: 5‘ GTG ACC AAG AAC GGC GGC AGG AG 3‘	Biomers; (Ulm, Deutschland)

		RV: 5‘ TAC TTC CAG CGG TGG TTG TC 3‘	
TBXT (SNP)	55°C	FW: 5‘ ATA GTG AGA GTT GGG GAT CCA CAG CGC ATG ATC 3‘ RV: 5‘GAT CAT GCG CTG TGG ATC CCC AAC TCT CAC TAT 3‘	Biomers; (Ulm, Deutschland)

2.1.6 Kits

Tabelle 6: Kits

Dargestellt sind in der linken Spalte die Namen der verwendeten Kits und rechts die Hersteller.

Name des Kits	**Hersteller**
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse	Dako, (Glostrup, Dänemark)
GenomeLab Human STR-Primer Set	Sciex Beckman Coulter; (Framingam, USA)
Maxi Prep (10x)	Qiagen; (Hilden, Deutschland)
MTS Assay Kit (cell proliferation)	Abcam; (Camebridge, Großbritannien)
QIAmp DNA Kit	Quiagen; (Hilden, Deutschland)
RNase free DNase Set	Qiagen; (Hilden, Deutschland)
RNeasy Kit	Quiagen; (Hilden, Deutschland)
SuperScript IV Reverse Transkriptase Invitrogen und First Strand synthesis system	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
Sybr Green PCR Kit	Qiagen; (Hilden, Deutschland)
WesternSure Premium Chemiluminescent Substrate	LI-COR, (Lincoln, USA)
Zymo Research DNA Clean and Concentrator-25	Zymo-Research; (Irvine, USA)

2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 7: Chemikalien und Reagenzien

Dargestellt sind in der linken Spalte die jeweiligen Namen der verwendeten Reagenzien und in der rechten Spalte der Hersteller, oder die Zubereitung bei Eigenherstellung.

Name der Chemikalie/ des Reagenz	**Hersteller/ Zubereitung**
2-Mercaptoethanol	AppliChem; (Darmstadt, Deutschland)
Agarose High Resolution	Roth; (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin Fraktion V NZ-origin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Merck; (Darmstadt, Deutschland)

Ampli Taq Gold, 250 Units, 5U/µl	Applied biosystems, life technologies, ThermoFisher Scientific, (Waltham, Massachusetts, USA)
Ampuwa	Fresenius; (Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)
Antibody diluent	Zytomed Systems GmbH; (Berlin, Deutschland)
Aquatex® Deckgläschenkleber	Merck; (Darmstadt, Deutschland)
Citratpuffer	pH 6,0 aus Citronensäure 9,6g/5l und Natriumhydroxid Plättchen
Citronensäure	Roth; (Karlsruhe Deutschland)
DNA Ladder, 100bp	NEB New England BioLabs; (Ipswich, USA)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
Ethanol absolut	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
Ethidiumbromid	Merck; (Darmstadt, Deutschland)
Gel loading purple (6x)	New England BioLabs; (Ipswich, USA)
GenomeLab Human STR-Primer Set	Sciex Beckman Coulter (Framinham USA)
Glycin	Sigma-Aldrich; (St. Louis, USA)
Halt™ Protease und Phosphatase Inhibitor single use cocktail	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
Hämatoxilin	Dako, (Glostrup, Dänemark)
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
Methanol	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck; (Darmstadt, Deutschland)
Novex® NuPage Running Buffer	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
Onetaq Quick load 2x Mastermix Buffer	New England BioLabs; (Ipswich, USA)
PBS 20x pH 7,6	0,4M Tris 1,8M NaCl HCl (pH titriert)
Pronase Reagent	Electron microscopy sciences; (Hatfield, Pennsylvania)
RIPA Buffer	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
SDS 20% (angesetzt aus Pellets)	Roth; (Karlsruhe, Deutschland)
TAE-Puffer 10x pH 8,0	Tris 48,5g Essigsäure 11,4g EDTA 3,7g
Transferpuffer 10x	58g Tris 29g Glycin 18,5 ml 20%SDS
Transferpuffer 1x	100ml Transferpuffer 100ml Methanol Ad 10000ml H2O

Salzsäure 32%	Roth; (Karlsruhe, Deutschland)
SDS (Sodium dodecyl Sulfat)	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
Skim milk powder for blotting	SERVA; (Heidelberg, Deutschland)
TEMED	Roth; (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS-hydrochlorid	Roth; (Karlsruhe Deutschland)
Trizma base	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
WesternSure Pre-stained chemiluminescent Protein-ladder	LI-COR; (Lincoln, USA)
Xylol	Apotheke der Universität Ulm; (Ulm, Deutschland)

2.1.8 Zellkulturmaterial

Tabelle 8: Zellkulturmaterial

Dargestellt sind in der linken Spalte die Materialien, die explizit für die Zellkultur benötigt wurden und in der rechten Spalte die jeweiligen Hersteller.

Name des Materials	**Hersteller**
6- und 24-Näpfchen-Platte, TC	Sarstedt AG&co.KG; (Nürmbrecht, Deutschland)
96-Näpfchen-Platte, Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
BD 10ml Syringe Luer-Lok™ Tip Spritzen für Sterilfiltration	Becton, Dickinson and Company; (Franklin Lakes, USA)
Bio Whittaker PBS	Gibco™, Thermo Fisher Scientific; (Rosaklide, Dänemark)
BioWhittaker IMDM	Lonza; (Basel, Schweiz)
BioWhittaker RPMI	Gibco™, Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
BSA Atto 448	Atto-Tec GmbH; (Siegen, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth; (Karlsruhe Deutschland)
Dry Hot Indicator Tape	3M Deutschland GmbH; (Neuss, Deutschland)
Einfrierröhrchen Cryotubes 1,8ml	Nunc A/S, Apogent; (Waltham, Massachusetts, USA)
Endo-Porter	Gene Tools; (Philomath, USA)
FCS (Fetal calf serum)	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
L-Glutamin	Lonza; (Basel, Schweiz)
Minisart ®, Filter für Sterilfiltratation	Sartorius Stedim Biotech GmbH; (Göttingen, Deutschland)
OptiMEM Serumreduziertes Medium	Gibco™, Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
Parafilm Laboratory Film	Merck; (Darmstadt, Deutschland)

Pasteurpipetten aus Glas mit/ohne Wattestop-fen	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH& Co KG; (Sondheim, Deutschland)
Penicillin und Streptomycin	Lonza; (Basel, Schweiz)
Serologische Pipette (1ml,5ml,10ml,25ml,50ml)	Sarstedt AG& Co. KG (Nürmbrecht, Deutschland)
$TPPS_4$	TriPorTech GmbH, (Lübeck, Deutschland)
Trypsin EDTA	Lonza; (Basel, Schweiz)
Tryptanblau	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
Zählkammern	Neubauern improved, Roth; (Karlsruhe, Deutschland)
Zellblockkasetten	Avantor; (Radnor, Pennsylvania, USA)
Zellkulturflaschen Nunc™EasyFlask™ 25, 75, 175 cm^2, Nunclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
Zellschaber 25cm multiposition-blade	VWR, Avantor; (Radnor, USA)

2.1.9 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Dargestellt ist jeweils der Name des Gerätes und der Hersteller.

Name des Gerätes	**Hersteller**
AlphaImager EP für Gelelektrophoresende-tektion	Alpha innotech Biozym scientific GmbH; (Oldendorf, Deutschland)
Dampfgarer Vitacuisine	Tefal; (Rumilly, Frankreich)
DiGit Blot Scanner	LI-COR (Lincoln, USA)
Epoch Scanner	BioTek instruments; (Winooski, USA)
Gelelektrophoresekammern	Easy Cast Electrophoresis system
Heizplatte	IKA Labortechnik; (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Intelligenter Cell imager Paula	Leica microsystems; (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop	Zeiss; (Oberkochen, Deutschland)
Mikrowelle	Samsung; (Suwon, Südkorea)
PCR-Maschine Labcycler	SensoQuest; (Göttingen, Deutschland)
Pharmacis Gene power supply GPS 200/400, Voltmeter	Akribis Scientific limited; (Cheshire, Großbritannien)
qPCR Maschiene, Rotor-Gene Q	Qiagen; (Hilden, Deutschland)
Schnellkochtopf	Silit-Werke GmbH & Co. KG; (Riedlingen an der Donau, Deutschland)
Schüttler	Phoenix instruments GmbH; (Garbsen, Deutschland)
Tischzentrifuge Galaxy MiniStar	VWR, Avantor; (Radnor, USA)
TS100 Reagenzgefäßerhitzer	Biosan; (Riga, Lettland)
Vortexmaschiene Analog vortex Mixer	VWR, Avantor; (Radnor, USA)

Waage	Sartorius Stedim Biotech GmbH; (Göttingen, Deutschland)
Western Blot Kammer Mini blot Module	Invitrogen by Thermo Fisher (Kiryal Shmona, Israel)
Zentrifuge für Reagenzgefäße	Eppendorf Zentrifugen GmbH; (Leipzig, Deutschland)

2.1.10 Weitere Materialien

Tabelle 10: Weitere Materialien

Dargestellt sind weitere verwendete Materialien, die nicht näher klassifiziert wurden. In der linken Spalte sind die Namen der Materialien dargestellt, in der rechten Spalte die jeweiligen Hersteller.

Name des Materials	**Hersteller**
Amersham Protran 0,2µm NC Nitrocellulose Blotting membrane	Cytiva (Marlborough, Massachusetts, USA)
Deckgläser Cover glasses	VWR, Avantor; (Radnor, USA)
Eppendorf® Reagenzgefäße 5ml	Eppendorf AG; (Hamburg, Deutschland)
Handschuhe Semper-Care Powder-free	Sempermed; (Clearwater, USA)
Mr Frosty Nalgene^{TM}Cryo1°freezing Container	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
Novex ® NuPage 4-12% BisTris Gele (10, 12 und 15 well)	Thermo Fisher Scientific; (Waltham, Massachusetts, USA)
Objektträger Cover glass	VWR, Avantor; (Radnor, USA)
Pap Pen	Science Services GmbH; (München, Deutschland)
PCR-Reagenzgefäße, Multiply µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt AG&Co KG, (Nürmbrecht, Deutschland)
Pipetten BRAND® accu-jet® pro pipette controller	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
Pipetten-Set Discovery comfort	Corning HTL SA; (Warschau, Polen)
Pipettenspitzen (10µl, 100µl,200µl 1000µl)	z.B. SurPhob Biozym; Sarstedt AG&Co.KG (Nürmbrecht, Deutschland)
Reagiergefäße 2,0ml SafeSeal	Sarstedt AG&Co KG, (Nürmbrecht, Deutschland)

2.1.11 Auswertungsprogramme

Tabelle 11: Auswertungsprogramme:

Dargestellt sind in der linken Spalte die verwendeten Auswertungsprogramme und in der rechten Spalte der jeweilige Hersteller.

Name des Auswertungsprogrammes	**Hersteller**
BioTek Gene5	BioTek (Winooski, USA)
Alpha Imager	Alpha innotech Biozym scientific GmbH; (Oldendorf, Deutschland)
Microsoft Exel, Powerpoint und Word	Microsoft; (Redmont, USA)

PAULA imaging and analysis software	Leica microsystems; (Wetzlar, Deutschland)
DC-Pathos	DC-Systeme Informatik GmbH (Heiligenhaus, Deutschland)
Rotor Gene Q Series Software	Sigma Aldrich; (St. Louis, USA)
Image Studio Digits Ver 5.2	LI-COR (Lincoln, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Experimente wurden mit Zelllinien der Ulmer Zelllinienbank durchgeführt. Einzelne Einfrierröhrchen wurden in N_2-Stickstofftanks aufbewahrt und bei Bedarf (s.u.) aufgetaut. Die benötigte Zellkultur wurde zur Kultivierung in 25cm² Brutflaschen ausgesät, jeweils mit 5ml Kulturmedium. Das Nährmedium bestand aus einer 4:1 Mischung IMDM/RPMI-Medium, angereichert mit 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS (Fetal bovine serum, dt.: fetales Rinder Serum) und 2mM L-Glutamin. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2. Die Zellen wurden in der Regel ein Mal pro Woche, spätestens jedoch bei Umschlag des Mediums in einen sauren oder alkalischen pH, mit frischem Medium versorgt. Bei einer Konfluenz von spätestens 90% wurden die Zellen gesplittet.

2.2.1.1 Propagation der Zellen

Die Zellkultur wurde bei voller Kulturflasche nach Absaugen des Mediums mit 2-3ml PBS (Phosphat buffered saline, dt.: Phosphat gepufferte Salzlösung) gespült und anschließend mit 2ml Trypsin/EDTA für 2min bei 37°C inkubiert. Sobald die adhärenten Zellen gelöst waren, gegebenenfalls durch Klopfen der Zellkulturflasche gegen eine harte Oberfläche, wurde der Vorgang mit der 2,5fachen Menge an Nährmedium gestoppt und die Zellsuspension bei 1000rpm für 5min in einem Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet erneut in 5ml Medium gelöst und auf zwei Brutflaschen mit je 2,5ml vorgelegtem Kulturmedium verteilt.

2.2.1.2 Zellen auftauen

Um eine Zellkultur aus der Zellbank in Kultur zu nehmen, wurde die gewünschte, sich in einem Einfrierröhrchen befindende Zelllinie aus einem Stickstofftank geholt und auf Eis transportiert. Nach Auftauen in einem 37°C-Wasserbad wurden der Suspension über 10min insgesamt 9ml Medium verteilt hinzugegeben. Dabei wurden definierte, zunächst geringe Mengen Kulturmedium pro Minute zugegeben, um einen osmotischen Schock der Zellen zu verhindern. Die entstandene Suspension wurde abzentrifugiert und das Pellet in 5ml Kulturmedium gelöst und in einer Brutflasche inkubiert. Um das restliche, für die Zellen toxische, DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen wurde in der Regel am folgenden Tag erneut das Medium gewechselt.

2.2.1.3 Zellen einfrieren

Um Zellen erneut in der Zellbank einzufrieren, wurden die sich in der Brutflasche befindenden Zellen wie bereits beschrieben abtrypsiniert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml Einfriermedium gelöst und in ein Einfrierröhrchen gegeben, welches in einer Einfrierbox, gefüllt mit Isopropanol, gelagert wurde. Um das Einfriermedium anzusetzen, wurden zunächst Nährmedium, FCS und DMSO im Verhältnis 2:2:1 gemischt, steril filtriert und anschließend 1:1 mit Nährmedium gemischt. Die einzufrierenden Zellen wurden zunächst in -80°C für 24h gelagert. Danach wurden die Zellen einem Stickstofftank der Zellbank hinzugefügt.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Um eine bestimmte Anzahl an Zellen in einer Lösung zu bestimmen, wurden sie wie bereits beschrieben abtrypsiniert, zentrifugiert und das Pellet und in einer gewünschten Menge Medium gelöst. Davon wurde eine kleine Menge 1:1 mit Trypanblau gemischt. Auf eine Zählkammer wurde ein angefeuchtetes Eindeckgläschen gegeben, sodass es adhärent war. Zwischen die Zählkammer und das Eindeckgläschen wurde nun die Zellsuspension-Trypanblau-Mischung pipettiert. Bei den verwendeten Zählkammern handelte es sich um doppelt angelegte Zellkammern Neubauern improved. Abgestorbene Zellen wurden durch eine gestörte Membranbarriere von Trypanblau angefärbt und konnten somit unterschieden werden. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter in der ursprünglichen Lösung konnte in der folgenden Formel berechnet werden. X ist hierbei die insgesamt in allen 8 Quadraten gezählte Anzahl.

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{x}}{8} \times 2 \times 10000$$

2.2.1.5 Proteinisolation

Zur Isolation von Proteinen wurden die sich in Kultur befindenden Flaschen zweimal in kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde auf die Zellen ca. 75µl Ripa-Lysis Buffer/ Phosphataseprotease-Inhibitor in einem 100:1 Verhältnis gegeben und diese für 10min auf Eis inkubiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und die entstandene Suspension wurde in einem Reagenzgefäß für 1min in flüssigen Stickstoff gegeben. Nach Auftauen der Suspension wurde diese gevortext und der Vorgang wiederholt. Die Proben wurden für 10min bei 4°C bei 14 000 rpm zentrifugiert und der entstandene proteinhaltige Überstand wurde bei -20°C

eingefroren. Für die Quantifikation der isolierten Proteine wurde das Pierce BCA Assay Kit von Thermo Fisher verwendet.

2.2.1.6 Zellblockanfertigung

Zur Herstellung eines Zellblocks wurden die Zellen, wie oben beschrieben, abtrypsiniert und zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in einem Milliliter des Überstandes gelöst. Dazu wurden 6-8ml vergälltes, reines Ethanol hinzugegeben und die Suspension wurde erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 1ml des entstandenen Überstandes gelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurde ein Tropfen Hämalaun hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde auf einen Filter und mehrere Lagen Zellstoff gestürzt. So wurde das Ethanol durch den Filter im Zellstoff gesammelt, sodass ein erweitertes Zellpellet gebildet wurde. Dieses wurde mitsamt dem gefalteten Filter in eine Einbettungskassette für mind. 2h in Formalin gegeben. Anschließend wurde das Pellet in Paraffin zu einem Block eingegossen.

2.2.1.7 MTS-Assay

Ein MTS Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) wird verwendet, um die Zellviabilität einer Zellpopulation zu bestimmen. Das hinzugegebene MTS wird von den Zellen verstoffwechselt. Das Endprodukt kann dabei photochemisch detektiert werden. Für einen MTS-Assay wurden die zu messenden Zellen in einer 96-well (dt.: 96 Näpfchen) Platte ausgesät. In der Regel nach 24h oder aber zum in einem vorigen Versuch bestimmten idealen Zeitpunkt nach Transfektion (Kapitel 2.2.14) wurde das Medium gewechselt und durch 10% MTS-Reagenz ersetzt. Dafür wurde das MTS Assay Kit von Abcam (Camebridge, Großbritannien) verwendet. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1-4 h wurde die Absorption mit einem Spektralphotometer (Epoch Scanner, BioTek, Winooski, USA) und dem dazugehörigen Auswertungsprogramm Gene5 gemessen. Dabei wurde sowohl die Wellenlänge von 490nm als auch von 650nm verwendet. Die Differenz der beiden Werte ergab den gesuchten Absorptionswert.

2.2.1.8 Bestimmung der Wachstumskurve

Um die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellpopulation zu bestimmen, wurde eine Wachstumskurve angefertigt. Dafür wurden Zellen in einer 96-well Platte in einer zuvor bestimmten Anzahl ausgesät. In einem zuvor gesetzten zeitlichen Abstand, in der Regel alle 24h, wurde bei jeweils derselben Anzahl an wells ein MTS-Assay

durchgeführt. Die Mittelwerte der einzelnen Tage ergaben dabei eine Kurve, an welcher die Wachstumsgeschwindigkeit abgelesen werden konnte.

2.2.2 Immunzytochemie

Für eine immunzytochemische Färbung wurde der nach dem bereits beschriebenen Verfahren hergestellte Block mit einem Mikrotom geschnitten. Danach wurden die entstandenen Schnitte auf einen Objektträger gebracht. Die Trocknung erfolgte bei 56°C über Nacht.

Für die Entparaffinierung wurden die Schnitte einmal kurz und dann weitere 3 Male für 5min in Xylol gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Schnitte zuerst in 100% Ethanol getaucht, dann für 5 min zuerst in 100%, dann 90% und schließlich 70% Ethanol gewaschen. Im Folgenden wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült.

Vorbehandlungen: Zur weiteren Präparation wurde je nach Primärantikörper ein unterschiedliches Verfahren angewendet.

Dampfdruckgarer: Abhängig vom Primärantikörper wurden die Schnitte in 1:10 verdünnten Pufferlösungen EDTA (pH 9,0 oder 6,1) oder TRS (pH 6,1) in den vorgeheizten Dampfdruckgarer für 25min gegeben. Anschließend wurden sie für 10min in Eiswasser gekühlt und in destilliertem Wasser gespült.

Mikrowelle: Die Schnitte wurden in vorher erwärmten Citratpuffer (10mM, pH 6,0) für 25min bei 800 Watt erwärmt. Bis Minute 16 wurde dabei das verdampfende Wasser mit Citratpuffer aufgefüllt, im Folgenden mit destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden unter fließendem Wasser abgekühlt.

Schnellkochtopf: Die Schnitte wurden in bereits kochenden Citratpuffer (10mM, pH 6,0) gegeben und im Schnellkochtopf bis zur zweiten Druckstufe erhitzt. Im Anschluss wurden die Schnitte im Schnellkochtopf für 20min auf 150°C erhitzt. Danach wurde der Druck abgelassen und die Schnitte wurden bei geöffnetem Deckel für 20min abgekühlt. Im Anschluss wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült.

Pronase: Zuerst wurden die Gewebe auf den Objektträgern mit einem hydrophoben Marker (PAP-Pen) umrandet und anschließend mit Pronase für 5min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gespült.

Färbung: Zunächst wurden alle Schnitte, welche nicht bereits mit einem hydrophoben Marker markiert worden waren, mit einem PAP-Pen umrandet. Danach wurden alle Schnitte in 1x PBS gespült. Die Schnitte wurden in feuchten Kammern für 30min mit dem zuvor angesetzten Primärantikörper benetzt. Dieser war zuvor in einem spezifischen Verhältnis mit dem Diluent vermischt worden. Danach wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen. Im Folgenden wurde die Färbung nach der sogenannten ABC-Methode durchgeführt. Dafür wurde der biotinylierte Sekundärantikörper für 30min auf den Schnitten inkubiert, nach einem weiteren Waschvorgang in PBS wurde mit Streptavidin für 30min ebenfalls inkubiert und die Schnitte erneut in PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte mit der vorher angesetzten RED-Lösung für exakt 16min inkubiert. Dafür wurde zuvor in einem vom Hersteller angegebenen Verhältnis RED I, II, III mit AP-Buffer gemischt. Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 5min mit Hämalaun gegengefärbt und anschließend für 5min unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Schnitte wurden mit aquatex eingedeckt.

2.2.3 DNA-Isolation

Für die Isolation von DNA wurde das QIAmp DNA Kit von Qiagen verwendet. Dafür wurden die gewünschten Zellen wie oben beschrieben abtrypsiniert und abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nach Protokoll (siehe unten) von Qiagen behandelt und die DNA isoliert.

Hierfür wurde die stets auf Eis gehaltene Probe in 200µl PBS resuspendiert und 20µl Proteinase K hinzugefügt. Diesem Gemisch wurden noch 200µl Buffer AL hinzugegeben. Nach einem 15-sekündigem Vortexen wurde der Ansatz bei 70°C für 10min inkubiert. Danach wurden 200µl absolutes Ethanol hinzugefügt und die Probe erneut für 15sec gevortext. Der Ansatz wurde auf eine DNeasy- Säule gegeben und bei 10 000rpm bei 4°C für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss und das Sammelgefäß wurden verworfen, die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß gegeben. Es wurden 500µl AW1 Buffer hinzugegeben und die Säule erneut bei 10 000rpm eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500µl Buffer AW2 auf die Säule gegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß gegeben und der Ansatz wurde bei 14 000rpm für 4min zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Der Durchfluss, sowie das Sammelgefäß wurden erneut verworfen und die Säule wurde in ein neues 1,5ml Reagenzgefäß

gegeben. Auf die Säule wurden 100µl AE Buffer gegeben, der Ansatz wurde 1min inkubiert, und schließlich 1min bei 8000rpm zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde mit dem Epoch Scanner (BioTek, Winooski, USA) und dem dazugehörigen Auswertungsprogramm Gene5 vermessen. Die isolierte DNA wurde bei 4°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

2.2.4 RNA-Isolation

Für eine RNA-Isolation wurde das RNeasy Kit von Qiagen verwendet. Die gewünschten Zellen wurden abtrypsiniert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde auf Eis gestellt und die RNA entsprechend dem Protokoll (siehe unten) isoliert.

Dafür wurden die Zellen unter einem Abzug mit 700µl RLT-Puffer mit 1%igem Mercaptoethanol resuspendiert. Dieser Ansatz wurde in eine Schreddersäule gegeben, die die Zellen weiter mechanisch aufschießt. Der Ansatz wurde für zwei Minuten bei 14 000rpm auf 4°C zentrifugiert. Während der Schredder verworfen wurde, wurde der Durchfluss 1:1 mit 70%igem Ethanol verdünnt. Der Ansatz wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 1min bei 10 000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, auf die Säule wurden 350µl RW1-Puffer gegeben. Nach erneuter Zentrifugation bei 10000rpm wurde 10µl DNase, angesetzt mit 70µl RDD-Buffer auf die Säule gegeben und der Ansatz wurde für 15-30min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden erneut 350µl RW1 Buffer hinzugegeben und eine erneute Zentrifugation bei 10 000rpm wurde durchgeführt. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden zwei Waschschritte mit 500µl RPE-Buffer durchgeführt, der Durchfluss wurde hierbei jeweils erneut verworfen. Die Säule wurde in ein neues 2ml Sammelgefäß gegeben und bei 10 000rpm 1min trocken zentrifugiert. Nun wurde die Säule in ein 1,5µl Reagenzgefäß gegeben. Zum Lösen der RNA aus der Säule wurden auf diese 30-50µl RNase freies Wasser pipettiert. Nach einer Inkubation von 1-2min wurde der Ansatz bei 10 000rpm zentrifugiert und die isolierte RNA somit aus der Säule gelöst. Für die Detektion wurde ebenso der Epoch Scanner (BioTek, Winooski, USA) und das dazugehörige Auswertungsprogramm Gene5 verwendet. Die isolierte RNA wurde bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

2.2.5 Umschreibung RNA in cDNA

Für das Umschreiben von RNA in die stabilere cDNA (complementary DNA, dt.: komplementäre DNA) wurde das SuperScript IV Reverse Transkriptase und First Strand Synthesis System von Thermo Fisher verwendet. Zu Beginn wurde der bei -

20°C gekühlte 5x SSIV-Puffer auf Raumtemperatur aufgewärmt, während die restlichen Reagenzien auf Eis gelagert wurden. Zuerst wurden die Primer zur Probe hinzugegeben. Hierfür wurde ein Ansatz hergestellt aus 1µl 50ng/µl random hexamers, 1µl 10mM dNTPmix und 1µg RNA. Der Ansatz wurde mit DEPC behandeltem Wasser auf 13µl aufgefüllt, gemixt und anschließend mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Zum Anlagern der Primer wurde der Ansatz für fünf Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend für eine Minute auf Eis gestellt.

Anschließend wurde der Reverse Transkriptase Mix hergestellt. Dafür wurde der 5x SSIV-Puffer gevortext und zentrifugiert und folgender Ansatz pipettiert: 5µl des 5x SSIV-Puffers, 1µl 100nM DTT, 1µl Ribonukleaseinhibitor und 1µl Superskript-Reverse-Transkriptase (200 U/µl) Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurde der Ansatz zu den zuvor auf Eis gestellten RNA-Proben und dem Primer Mix gegeben. Anschließend wurde für 10min zuerst bei Raumtemperatur und weitere 10min bei 55°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 80°C inaktiviert. Um die noch vorhandene RNA abzubauen, wurde nun für 20min bei 37°C 1µl E. coli RNase II hinzugegeben. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.6 PCR und Gelelektrophorese

Für eine PCR wurde ein Ansatz hergestellt, der zu 50% aus Onetaq Quick load 2x Mastermix Buffer von New England BioLabs; (Ipswich, USA) bestand. Der restliche Ansatz bestand zumeist aus 1µl Template-DNA, jedoch konnte dies variieren, jeweils 1µl Reverse und 1µl Forward Primer (working solution (Arbeitskonzentration 5pmol/µl), 5% der stock solution (Vorratskonzentration (100pmol/µl))). Der Rest wurde mit Aqua dest. aufgefüllt. Für die PCR wurde die PCR-Maschine Labcycler von SensoQuest von verwendet. Je nach Primer wurden unterschiedliche Temperaturen und Zeiten verwendet.

Für eine Mykoplasmen PCR wurde beispielgebend folgendes Protokoll verwendet:

95°C 10min
95°C 30sec ┐
50°C 30sec ├ 50x
68°C 30sec ┘
72°C 10min
12°C ∞

2.2.7 Quantitative PCR (qPCR)

Eine qPCR kann verwendet werden, um relativ- quantitativ mRNA (messenger RNA, dt.: Boten RNA) in einer Probe zu bestimmen. Dafür wurde zuerst mRNA aus den zu untersuchenden Linien isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Primer wurden vorab 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt (5µl Primer Stock solution + 95µl H_2O). Die jeweiligen Primeranlagerungstemperaturen können aus der Materialliste entnommen werden. Für jede Probe wurde folgender Ansatz hergestellt:

SybrGrenn Mastermix:	5µl	(oder 50% des kompletten Ansatzes)
Vorwärts-gerichteter Primer:	1µl	
Rückwärts-gerichteter Primer:	1µl	
destilliertes Wasser:	2µl	(oder auf 100% des Ansatzes aufgerundet)
Probe:	1µl	(oder mehr, gegebenenfalls verdünnt)

Für die PCR wurde die Rotor Gene Software von Qiagen verwendet. Dabei wurden die Proben zuerst 15min auf 95°C erhitzt, um die Polymerase zu aktivieren. Anschließend wurden folgende Sequenz für mindestens 40 Runden wiederholt:

Denaturierugstemperatur (95°C)	30sec
Primeranlagerungstemperatur	30sec
Polymerisierungstemperatur (72°C)	30sec

Im Folgenden wurde die relative Menge an gebildeter cDNA gemessen. Dafür wurden zur Kalibrierung jeweils 2 Housekeeper-Gene (dt.: „Haushalter“, bezeichnet Gene, die in verschiedenen Zellentypen zu gleichem Maße exprimiert werden sollten) bestimmt.

2.2.8 Western Blot und SDS-Page

Für Western Blot Analysen wurden Novex ® NuPage 4-12% BisTris Gele von Thermo Fisher verwendet. Das fertige Gel wurde in einen SDS-Laufpuffer (Sodium dodecyl sulfat, dt.: Natrimdodecylsulfat) gegeben und die Proben wurden in die dafür vorgesehenen Sammeltaschen pipettiert. Die Proben bestanden aus einer variablen Menge Proteinisolat, zu einem Viertel aus 4xSDS-Loading-Buffer, der Rest wurde mit RIPA-Lysis-Buffer aufgefüllt. Dieser Ansatz war für 5min auf 95°C erhitzt worden. Als Größenstandard wurde die Chemiluminescent Protein Ladder von LI-COR verwendet.

Die SDS-Page (polyacrylamid gelelectrophoresis, dt.: Polyarylamidgelelectrophorese) wurde in den Western Blot Kammern Mini blot Module von Invitrogen zunächst bei 130V und 160mA für 60min durchgeführt, bis die Banden des Größenstandards deutlich getrennt sichtbar waren.

Für den Western Blot (Transfer der Proteine auf eine Membran) wurden pro Gel je zwei Filterpapiere, zwei Schwämme und eine Nitrocellulosemembran in Transferpuffer getränkt. Das Gel und die Membran wurden zunächst zwischen zwei Filterpapiere gebettet und diese wurden wiederum zwischen beide Schwämme und schlussendlich in die Blot Tanks gegeben. Der Western Blot wurde bei 20V, 160mA für 70min durchgeführt.

Sobald die Proteine auf die Membran transferiert wurden, wurde diese in TBS (Tris buffered Saline, dt.: Tris gepufferte Kochsalzlösung) gelegt und zweimal in TBS für 10min (RT) gewaschen. Anschließend wurde sie in 3%igem BSA (bovine serum albumine, dt.: Rinderserum Albumin), gelöst in TBS, für eine Stunde geblockt. Die Membran wurde im Folgenden zweimal in TBS-T (TBS mit Tween20) und ein weiteres Mal in TBS für je 10min (RT) gewaschen und bei 4°C über Nacht mit dem gewünschten Primärantikörper, gelöst in 3%igem BSA, inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran erneut zweimal in TBS-T, einmal in TBS, gewaschen und anschließend für eine halbe Stunde in 10%igem Milchpulver, gelöst in TBS, geblockt. Nach einem Zwischenwaschschritt in TBS wurde die Membran für 60min in einem Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet war, inkubiert. Der Sekundärantikörper war hierbei verdünnt in 10%igem Milchpulver. Die Membran wurde viermal in TBS-T gewaschen. Für die Detektion wurde das WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate von LI-COR verwendet. Dieses wurde nach Protokoll vorbereitet und dann für fünf Minuten in einer dunklen Kammer auf der Membran inkubiert. Nach der Detektion wurden die Schritte ab dem ersten Waschschritt wiederholt und ebenso mit der Detektion des Housekeeper-Proteins verfahren. Hierfür wurde in der Regel Anti-GAPDH oder Anti-ß-Aktin verwendet.

2.2.9 STR-Analyse

Für eine STR-Analyse (engl. short tandem repeat, etwa „kurze sich wiederholende Sequenzen“) werden sämtliche zuvor isolierte DNA-Proben auf 10ng/µl mit destilliertem Wasser verdünnt. DNA, die zuvor in Paraffin eingebettet war, wurde

zunächst mit dem DNA Clean and Concentrator-25-Kit von Zymo Research isoliert. Im Folgenden wurde der PCR-Ansatz hergestellt.

Primermix:	5,0µl
AmpliTaq Gold:	0,3µl
destilliertes Wasser:	3,7µl
DNA (10ng/µl):	1,0µl

Danach wurde eine PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

95°C	11min	
96°C	2min	
94°C	1min	27x
60°C	1min	
70°C	1min	
60°C	30min	
10°C	∞	

Diese entstandenen Amplifikate konnten dann über eine Kapillar-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

2.2.10 Antikörpertest

Sämtliche Antikörper für den Western Blot wurden vor Verwendung in Versuchen einmal an zuvor isolierten Proteinen der kultivierten Linie U-CH11 bzw. U-CH11R getestet. Dabei wurde ein Western Blot mit SDS-Page mit Proteinmengen von 10, 20, 30 und 40µg durchgeführt.

2.2.11 *GFP*-Vektor-Transfektion

Zur Testung der Transfektionseffizienz der verschiedenen Zelllinien wurden primär Transfektionen mit einem GFP-DNA-Vektor (green fluoreszent protein, dt.: grün fluoreszierendes Protein) durchgeführt. Für eine Transfektion wurde die Zellen wie bereits beschrieben abzentrifugiert und in antibiotikafreiem Medium (IMDM+10% FCS) gelöst. Nach Aussaat von 500µl (2ml) der Suspension in eine 24-well- (6-well-) Platte wurde der Transfektionsansatz hinzugegeben. Dieser wurde zuvor wie folgt angesetzt.

In Ansatz A wurden 50µl (250µl) OptiMem reduced serum medium mit maximal 1µg Vektor und in Ansatz B 50µl (250µl) OptiMem reduced serum medium mit 2µl (7µl)

Lipofektamin gegeben. Beide Ansätze wurden nach 5min Inkubation zusammengeführt und für weitere 20min inkubiert.

Nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz nach 24h Inkubation im Brutschrank mittels Fluoreszenzmikroskopie ermittelt.

Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurden verschiedene Transfektionszeitpunkte, Zellkonfluenzen und Lipofektamin/RNA Verhältnisse bzw. Mengen getestet. Auch wurde eine Transfektion in reinem OptiMem und ein Hungerversuch gestartet, wobei die Zellen vorab in FCS freies Medium gegeben wurden. 10% FCS wurde dabei erst bei Transfektion hinzugegeben.

Es wurden die Zelllinien U-CH1, U-CH2, U-CH7, U-CH11, U-CH11R, U-CH19, U-CH22, UM-Chor1 und MUG-Chor1 untersucht. Als Referenz wurde die Linie HEK293T (human, embryonale Nierenzellen) verwendet.

2.2.12 Endo-Porter und PCI (Photochemical internalisation)

Zur weiteren Transfektionsoptimierung für schwer zu transfizierende Zelllinien wurde sowohl eine PCI als auch Endo-Porter verwendet. Beide Methoden zielen darauf ab, endolysosomal aufgenommene Stoffe in das Zytoplama der Zellen zu transferieren. Hierzu werden die Reagenzien $TPPS_4$ (TriPorTech GmbH, Lübeck; für PCI) bzw. Endo-Porter (Gene Tools; Philomath, USA) in endo-lysosomale Vesikelmembranen integriert. Induziert durch Licht spezifischer Wellenlängen (PCI) oder pH-Absenkung (Endo-Porter) werden diese Vesikel porös und geben ihren Inhalt ins Zytosol frei.

Für die Versuche mit Endo-Porter wurden 6µl Endo-Porter auf 1000µl Ansatz gegeben, entsprechend einer Endkonzentration von 6µm. Für den ersten Versuch wurde Endo-Porter kombiniert mit 1µg/µl Atto448-markiertes BSA. Dazu wurde die Zelllinie U-CH2 in 1000µl antibiotikafreiem Medium mit 6µl Endo-Porter ausgesät und mit 0,5µl Atto448-BSA von ATTO-TEC GmbH inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ausschließlich Atto448-BSA verwendet.

Als weiterer Versuch wurde die Zelllinie U-CH2 nach oben genanntem Protokoll transfiziert, allerdings wurden die Zellen zeitgleich mit einem Transfektionsansatz (Kap. 2.2.11) mit 6µM Endo-Porter inkubiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Transfektionseffizienz stellt die PCI dar (Photochemical internalisation, engl. für Photochemische Internalisierung). Die Technologie beruht auf der Vermutung, dass endozytierte Makromoleküle wie Plasmide in Vesikeln verbleiben, anstatt freigesetzt zu werden. Verwendet werden dabei Photosensitizer wie $TPPS_4$ oder $AlPcS_{2a}$. Diese bewirken bei Lichteinwirkung über Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen ein Freisetzen von Makromolekülen in Vesikeln [4, 5].

Für die PCI wurde $TPPS_4$ verwendet. Das Protokoll wurde an das Protokoll von Berg et al. [4,5] angelegt. Dafür wurden, abweichend von Berg et al 2mg $TPPS_4$ in 1ml PBS gelöst und steril filtriert. Dieser Vorratsansatz wurde bei -20°C eingefroren. Die Zellen der Linie U-CH2 wurden in eine 24-well Platte ausgesät und nach 2h Adhäsionszeit mit unterschiedlichen Konzentrationen (s.u.) von $TPPS_4$ versehen. Nach 18-24h wurde der Ansatz dreimal mit Medium gewaschen, um die Zellmembran von $TPPS_4$ zu reinigen, sodass möglichst nur noch Endosomen $TPPS_4$ enthalten. Danach wurde eine Transfektion wie oben beschrieben gestartet mit einem GFP-Vektor (0,75µg DNA) und 2µl Lipofektamin auf insgesamt 500µl Medium. Bei einigen Ansätzen wurden hierbei erneut $TPPS_4$ hinzugegeben. Der Ansatz wurde erneut 18-24h inkubiert und nach einem weiteren Waschvorgang blauem Licht ausgesetzt. Die Detektion erfolgte hierbei 24h und 72h nach der Lichtinkubation.

Ansatz A) 0,2µg/ml $TPPS_4$
Ansatz B) 0,2µg/ml $TPPS_4$ und 0,2µg/ml $TPPS_4$ während Transfektion
Ansatz C) 2µg/ml $TPPS_4$
Ansatz D) 2µg/ml $TPPS_4$ und 2µg/ml $TPPS_4$ während Transfektion
Ansatz E) 20µg/ml $TPPS_4$
Ansatz F) 20µg/ml $TPPS_4$ und 20µg/ml $TPPS_4$ während Transfektion
Ansatz G) 2µg/ml $TPPS_4$ während Transfektion

2.2.13 Toxizität

Da ein erhöhtes Absterben der Zellen bei Transfektion beobachtet wurde, wurde zudem untersucht, wie sich das Absterben der Zellen bei unterschiedlichen Plasmid-Konzentrationen oder bei alleiniger Lipofektaminbehandlung verhält. Als Vergleich wurden die Zellen ohne Behandlung ausgesät.

Ansatz A:100ng *GFP*-Plasmid + 2µl Lipofektamin
Ansatz B:50ng *GFP*-Plasmid +2µl Lipofektamin
Ansatz C:100ng *GFP*-Plasmid +1µl Lipofektamin
Ansatz D: 1µl Lipofektamin
Ansatz E: Negativkontrolle

2.2.14 *HOXB7*-Transfektionen

Für die Transfektion eines *HOXB7*-Plasmids wurde parallel als Negativkontrolle stets eine Transfektion mit einem *Kontroll*-Vektor gestartet. Für eine Transfektion wurde eine volle 25cm² Kulturflasche einer zuvor kultivierten Linie abtrypsiniert und in 6ml Transfektionsmedium gelöst. Jeweils 1ml wurde in ein Näpfchen einer 6-Näpfchen Platte gegeben und auf 2ml aufgefüllt. Das Transfektionsprotokoll entsprach dem bereits beschriebenen. Der optimale Transfektionszeitpunkt wurde zuvor als zeitgleich mit der Aussaat bestimmt. Es wurde 1µg des *HOXB7*-Vektors verwendet.

Zur Testung des optimalen Isolationszeitpunktes wurde eine Transfektion mit *HOXB7*-Vektor in der Linie U-CH1 nach Protokoll gestartet und die Isolation der Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten (7h,16h, 20h, 23h, 30h, 42h) durchgeführt. Die isolierten Proteine wurden in einem Western Blot detektiert. Hierbei wurde die höchste Menge an HOXB7 im Vergleich zur parallelen Transfektion mit einem *Kontroll*-Vektor als Maß für den optimalen Transfektionszeitpunkt gewählt. Um die Auswirkungen von HOXB7 auf den MAPK-Weg und Brachyury zu untersuchen, wurde die Proteinmenge von EGFR, ERK, pERK, MEK, pMEK und Brachyury mittels Western Blot bestimmt. Pro Zelllinie wurden Triplikate angefertigt. Es wurden die Linien U-CH1, U-CH7, U-CH19, MUG-Chor1 und UM-Chor1 verwendet.

2.2.15 *HOXB7*-siRNA-Interferenz

Der Effekt von HOXB7 wurde ebenso mittels knockdown (dt.: „Herunterregulieren“) durch *HOXB7*-siRNA-Interferenz untersucht. Als Kontrolle wurde eine *Kontroll*-siRNA verwendet. Hierbei wurde zu Teilen das bereits beschriebene Transfektionsprotokoll verwendet. Allerdings wurde für eine RNA-Transfektion eine geringere Lipofektaminmenge verwendet, d.h. 5µl für eine 6-well-Platte. Es wurden pro Ansatz 80pmol siRNA verwendet. Dieser Versuch wurde als Triplikat bei der Linie U-CH1 durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurden *HOXB7*-Plasmid und *HOXB7*-siRNA in einer Transfektion kombiniert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit ausschließlicher *HOXB7*-Plasmid-Transfektion verwendet. Hierbei wurden 7µl Lipfectamin, 1µg DNA und 80pmol siRNA verwendet. Die optimale Isolationszeitpunkt wurde erneut bestimmt, indem zuvor eine Transfektion nach 24h und 48h durchgeführt wurde und mittels Western Blot die höchste knockdown-Rate von HOXB7 bestimmt wurde. Hier wurden ebenfalls die Linien U-CH1, U-CH7, U-CH19, MUG-Chor1 und UM-Chor1 verwendet.

2.2.16 Analyse von HOXA7 in Chordomzellinien

Zuletzt wurde der Effekt von HOXA7 auf Chordomzellen getestet. Hierbei wurde, wie oben beschrieben, sowohl ein alleiniger knockdown mittels *HOXA7*-siRNA als auch die Kombination von *HOXA7*- mit *HOXB7*-siRNA gegen die Negativkontrolle mit *Kontroll*-siRNA durchgeführt. Für den ersten Versuch wurde die Linie U-CH1 verwendet, für den zweiten die Linien UM-Chor1 und MUG-Chor1.

2.2.17 Etablierung der Linien U-CH22 und U-CH24 Q3

Hier sind die spezifischen Methoden aufgeführt, die für die Etablierung der Linien U-CH22 und U-CH24 Q3 verwendet wurden.

2.2.17.1 U-CH22

Erhalten wurde ca. 1l Flüssigkeit eines Pleurapunktates. Davon wurden 800ml, unterteilt in 50ml Falkons, verwendet. Die Inhalte der Falkons wurden wie oben beschrieben abzentrifugiert und die entstandenen Pellets wurde in 5ml Medium gelöst. Die erhaltenen Zellen aus 4 dieser Falkons wurden in zwei 75cm² gegeben, je zwei ohne Behandlung in Suspension und zwei mit Behandlung mit einem Erythrozytenlysepuffer. Am ersten Tag nach der Inkubation wurden 10 Einfrierröhrchen der ersten Passage eingefroren, und RNA, DNA und Proteine isoliert. Die DNA wurde mittels PCR und Gelelektrophorese wie oben beschrieben auf den SNP im Gen *TBXT* untersucht. Im Verlauf wurden regelmäßig Zellblöcke hergestellt, um die Zellen auf Positivität für Brachyury zu untersuchen.

2.2.17.2 Subklonierung der Zellen

Zudem wurden, da es sich um sehr schnell proliferierende Zellen handelte, in eine 96-well Platte rechnerisch je 1 Zelle/well ausgesät mit dem Ziel, Zellklone zu erhalten. Das Medium wurde hierbei zuerst alle 2 Wochen gewechselt. Sobald sich ein

größerer Zellhaufen gebildet hatte, wurde der Klon abtrypsiniert und in das nächstgrößere well gegeben.

2.2.17.3 Bestätigung der Immortaliät der Zelllinie und Validierung

Nach Erreichen der Passage 58, wurden mehrere Einfrierröhrchen wie oben beschrieben eingefroren. Eine immunzytochemische Färbung auf Brachyury und weitere chordomspezifische Proteine wurde durchgeführt. Zudem wurde ein Western Blot durchgeführt, um die Zunahme an Brachyury im Verlauf zu bestimmen. Eine Mycplasmen-PCR wurde durchgeführt. Um die Wachstumsgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde eine Wachstumskurve über sieben Tage angelegt. Dafür wurden an Tag -1 zwei 96-well-Platten mit je einmal 1000 Zellen und einmal 2000 Zellen ausgesät. Pro Tag wurden 6 Näpfchen gemessen. Für die Messung der Expression von *TBXT* wurde eine qPCR durchgeführt. Als Referenzzelllinien wurden hierbei U-CH1 und U-CH2 verwendet. Zuletzt wurde eine STR-Analyse durchgeführt. Als Referenz wurde die unmittelbar nach Erhalt des Pleuraergusses isolierte DNA verwendet.

2.2.17.4 U-CH24 Quadrant 3

Erhalten wurde eine Gewebsprobe eines sakralen Chordomes, ca. 1x1x1cm. Diese wurde unmittelbar in Antibiotika-haltiges Kulturmedium gegeben, um Bakterienwachstum am Präparat zu stoppen. Zur Aufbereitung wurde die Probe mit Medium in eine Petrischale gegeben und mit Skalpellen zerkleinert, um die Tumorzellen zu mobilisieren. Dann wurde die Suspension gevortext und die Flüssigkeit abpipettiert. Diese wurde zentrifugiert und das entstandene Pellet in einer Zellkulturflasche kultiviert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, sodass sich insgesamt 3 Flaschen ergaben (erster, zweiter und dritter Schnitt) Die Flaschen wurden, wie auch die Passagen der Linie U-CH22, behandelt. Nach Passage 51 wurden ebenso eine Mycoplasmen-PCR, eine STR-Analyse, eine Wachstumskurve, eine qPCR auf *TBXT* durchgeführt und mehrere Einfrierröhrchen eingefroren.

2.2.18 Ethikvotum

Sämtliche Experimente wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Der experimentelle Einsatz von Zellkulturen und Patientenmaterial wurde zuvor durch das Ethikkomitee der Universität Ulm genehmigt. Hierbei wurden die Ethikvoten 369/17 und 373/17 mit dem Zusatz 03/18 abgedeckt.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsmodulation von *HOXA7* und *HOXB7*

Hier werden die Ergebnisse der Transfektionen mit *HOXB7* und *HOXA7* und deren Einfluss auf Proteine des MAPK-Weges und Brachyury aufgeführt.

3.1.1 Antikörpertest

Die in den Versuchen verwendeten Antikörper für die Proteindetektion im Western Blot zeigten sich alle als funktional und detektierten das jeweilige Protein auf der richtigen, dem Molekulargewicht des Proteins entsprechenden, Höhe (Abb. 2).

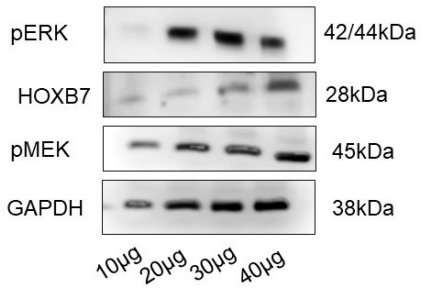


Abbildung 2: Antikörpertest

Dargestellt sind beispielhaft einige Antikörpertests von pERK, HOXB7, pMEK und GAPDH, die durchgeführt wurden, bevor die eigentlichen Versuche durchgeführt wurden.

3.1.2 *GFP*-Plasmid-Transfektionen

Die Transfektion mit einem GFP-Plasmid diente dazu, die Transfektionseffizienz in einzelnen Zelllinien zu bestimmen (Abb. 3). Allgemein konnte bei den verwendeten Chordomzelllinien im Vergleich zu HEK293T eine schlechtere Transfektionseffizienz erreicht werden. Während die Linien U-CH1, U-CH7, U-CH19, UM-Chor1, U-CH11, und U-CH22 eine für weitere Versuche ausreichende Transfektionseffizienz und geringe Toxizität durch Fremd-DNA aufwiesen, konnten U-CH2, U-CH11R aufgrund einer geringeren Transfektionseffizienz nicht für weitere Versuche verwendet werden.

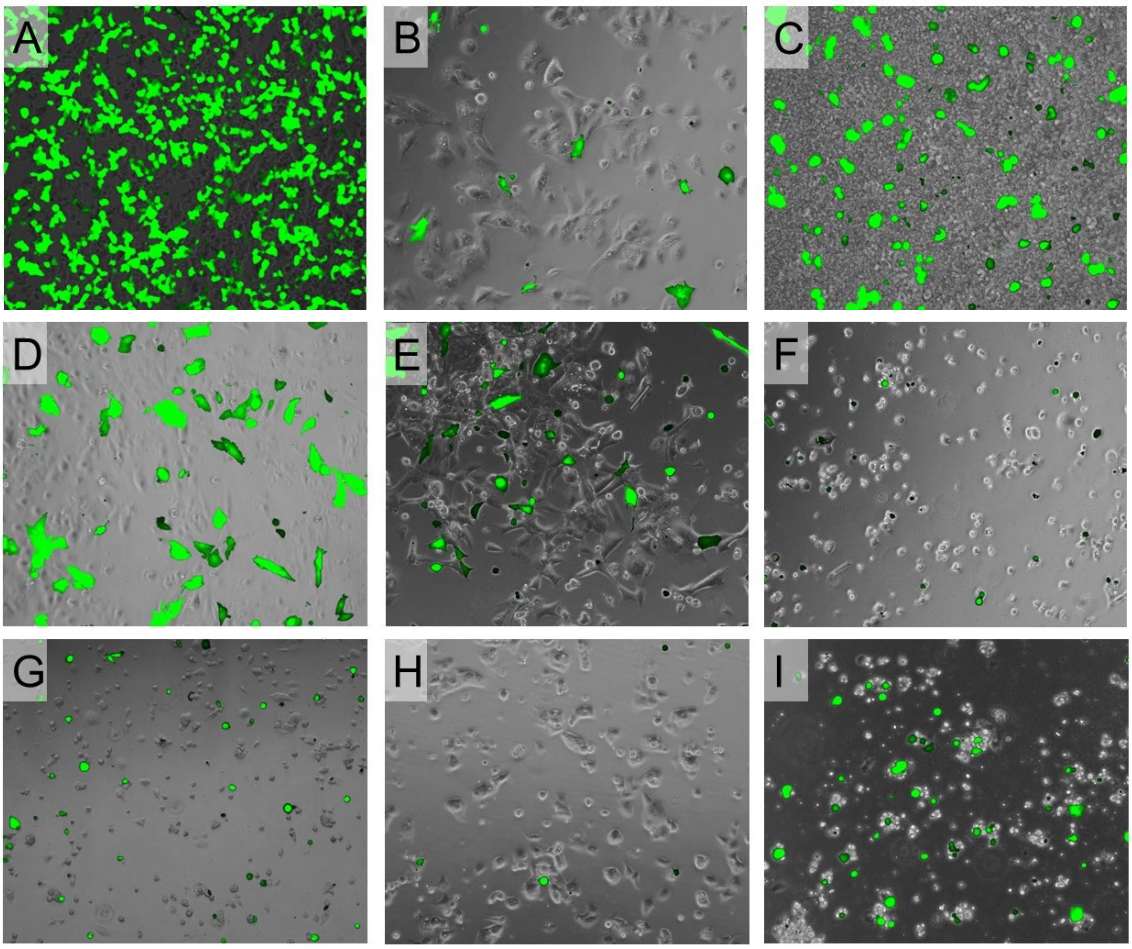


Abbildung 3. *GFP*-Transfektionen an verschiedenen Zelllinien

Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen als Überlagerung mit den zugehörigen Phasenkontrastbildern verschiedener Zelllinien nach Transfektion mit einem Green-fluorencent protein-exprimierenden Vektor. A: HEK293T, B: U-CH7, C: U-CH1, D: UM-Chor1, E: U-CH19, F: U-CH2, G: MUG-Chor1, H: U-CH11R, I: U-CH22. Während die Linien HEK293T und UM-Chor1 eine hohe bis sehr hohe Transfektionseffizienz aufwiesen, wiesen die Linien U-CH1, U-CH7, U-CH19, MUG-Chor1 und U-CH22 eine mäßige Transfektionseffizienz auf. Die Linien U-CH2 und U-CH11R wiesen eine geringe Transfektionseffizienz auf. Zudem zeigte sich ein verstärktes Absterben der Zellen unter Transfektion, was sich unter anderem durch abgestorbene Zellbestandteile im Medium zeigte (siehe z.B. Linie U-CH2).

Es wurden verschiedene Varianten des Transfektionsprotokolls durchgeführt, um die Transfektionseffizienz in schlecht transfizierbaren Zelllinien wie der Linie U-CH11R, zu erhöhen. Bei der Linie U-CH11R brachte jedoch weder die Transfektion in reinem OptiMem, IMDM ohne FCS oder einem 3:1 Verhältnis von DNA zu Lipofectamin eine Steigerung der Effizienz (Abb. 4). Auch brachten verschiedene Transfektionszeitpunkte nach Aussaat keine Verbesserung der Transfektionseffizienz. Im Folgenden wurde deshalb die Transfektion zeitgleich mit der Aussaat durchgeführt.

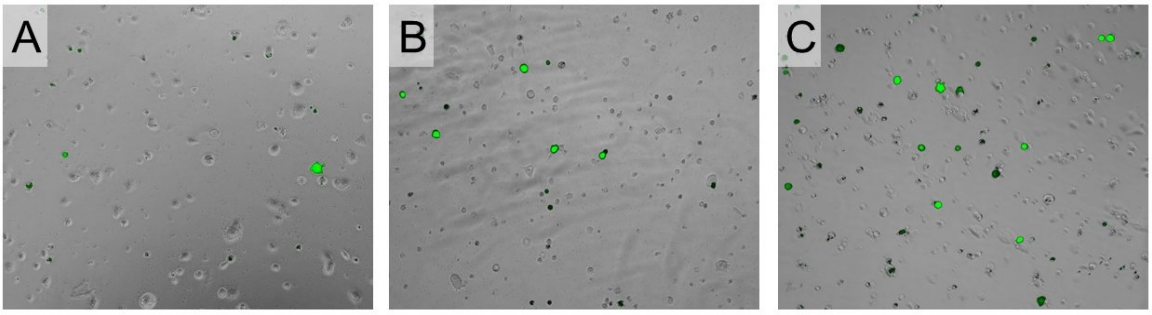


Abbildung 4: Versuche zur Steigerung der Transfektionseffizienz

Dargestellt sind Fluoreszenzaufnahmen der Zelllinie U-CH11R als Überlagerung mit den zugehörigen Phasenkontrastbildern verschiedener Zelllinien nach Versuchen zur Optimierung der Transfektion mit einem Green fluorencent protein- exprimierenden Vektor. Jedoch zeigten weder ein Hungerversuch (A), eine Kultivierung in reinem OptiMem (B) oder eine 3-fache Menge an Vektor-DNA (C) zu einer ausreichenden Verbesserung der Transfektionseffizienz. Zudem führte eine zu hohe Menge an Vektor-DNA zu einem verstärkten Absterben der Zellen

3.1.3 Erhöhung der Transfektionseffizienz durch Transfer endosomal aufgenommener Vektoren in Zytosol durch Endo Porter und PCI

Die Transfektionseffizienz stellte sich bei einigen Chordomzelllinien als gering heraus. Zabner et al. (1995) beschrieben, dass neben Proteinen auch Expressionsvektoren *in vitro* durch Zellen endosomal aufgenommen und lysosomal abgebaut werden [81]. Berg et al. (1999) und Summerton (2005) konnten zeigen, dass eine Perforation von Endosomenmembranen mittels Endo-Porter (pH-abhängig) bzw. $TPPS_4$ (Licht-induziert, photochemische Internalisierung (PCI)) daher Transfektionseffizienzen *in vitro* erhöhen können [4, 69].

Bei den Versuchen mit Endo-Porter diente Atto488-markiertes BSA als endosomal aufgenommenes Kontrollmakromolekül. Bei den Ansätzen mit Atto448-BSA zeigte sich am nächsten Tag eine leichte Fluoreszenz, jedoch keine Verbesserung im Vergleich zur Negativkontrolle mit reiner Behandlung mit Atto448-BSA (Abb. 5, A-D). Die durchgeführte Transfektion bei gleichzeitigem Hinzufügen von Endo-Porter führte zu einer Transfektionseffizienz von ca. 2%, was der Transfektionseffizienz ohne Endo- Porter entspricht (Abb. 5, E+F).

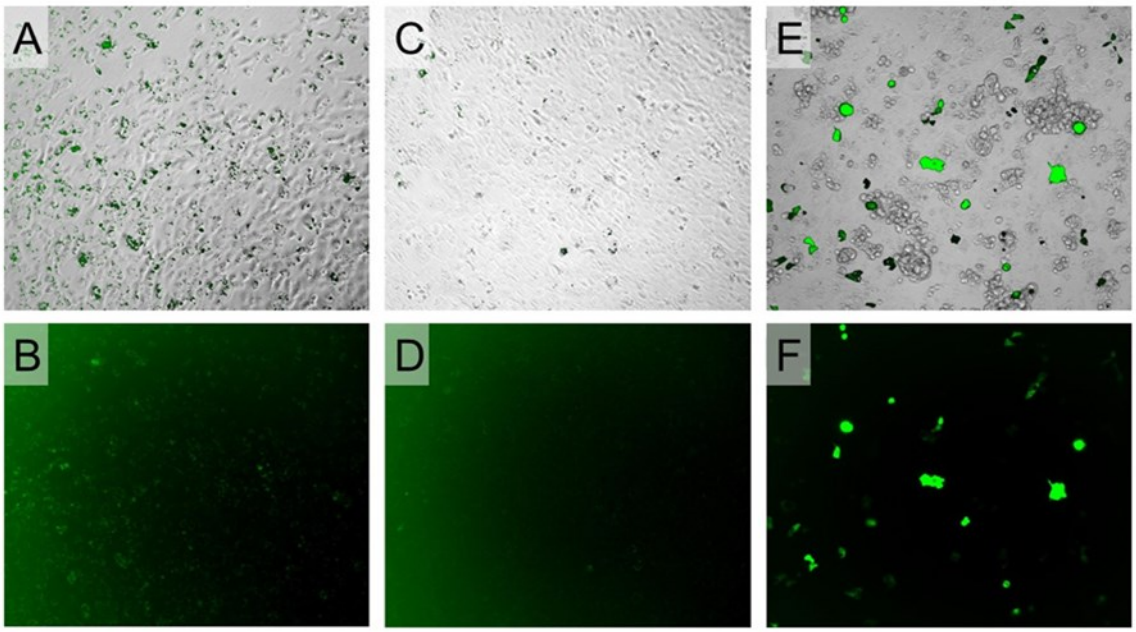
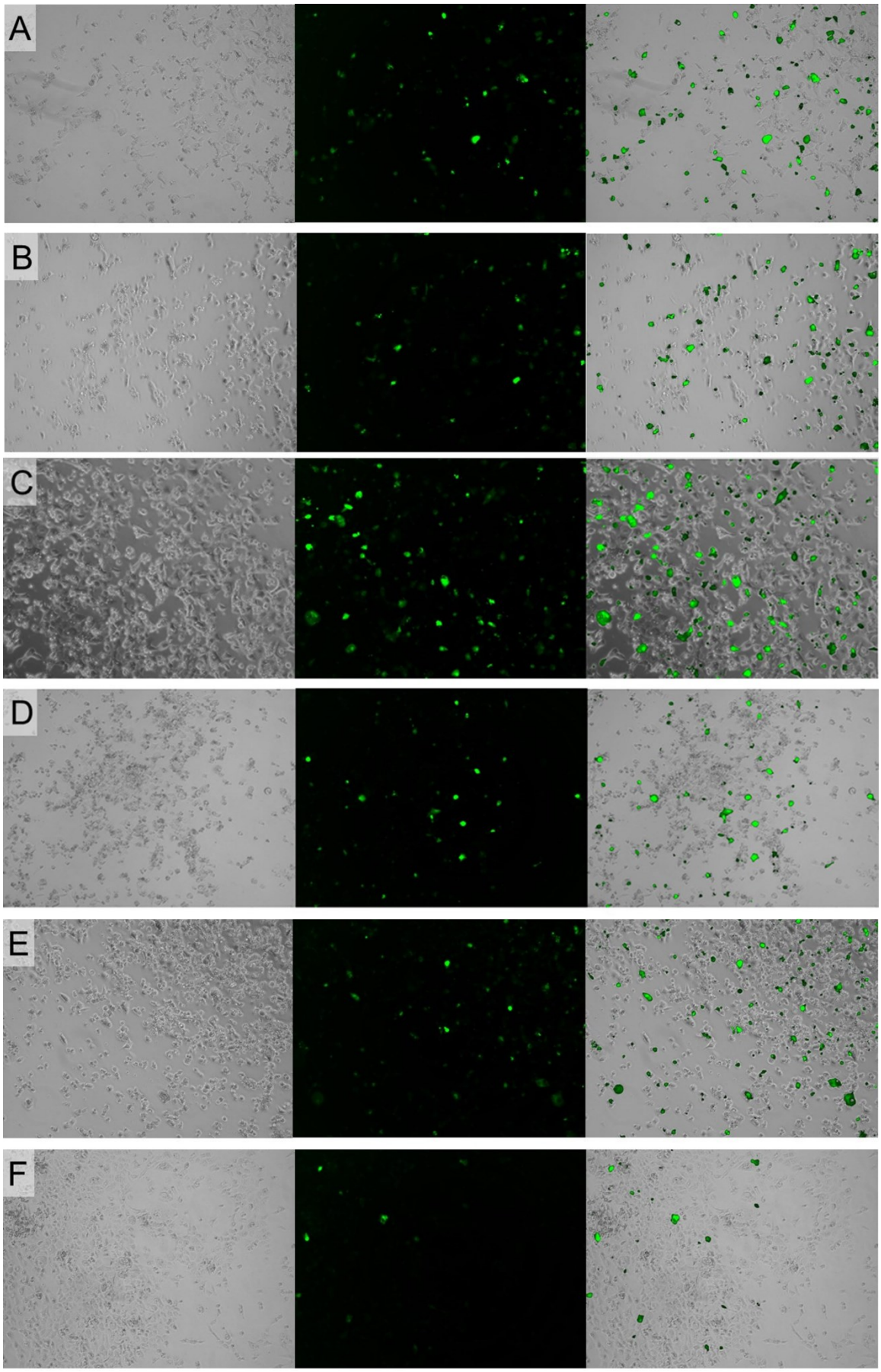


Abbildung 5: Endo-Porter und Atto448-BSA

In Abbildung (A) und (B) sind die fluoreszierenden Mengen an Atto448 BSA ohne gleichzeitige Behandlung mit Endo-Porter dargestellt, in Abbildung (C) und (D) die Mengen an Atto448 BSA mit gleichzeitiger Behandlung von Endo-Porter. In (E) und (F) sind die Transfektionen mit GFP-Plasmid bei gleichzeitiger Behandlung mit EndoPorter dargestellt.

Für die PCI wurden bei der Linie U-CH2 verschiedene Konzentrationen von $TPPS_4$ und Zeitpunkte verwendet. Hierbei zeigte sich im ersten Versuch eine gesteigerte Transfektionseffizienz bei 2µg/ml auf ca. 8%, allerdings konnte dies bei anderen Zelllinien nicht reproduziert werden (Abb. 6).


A
B
C
D
E
F

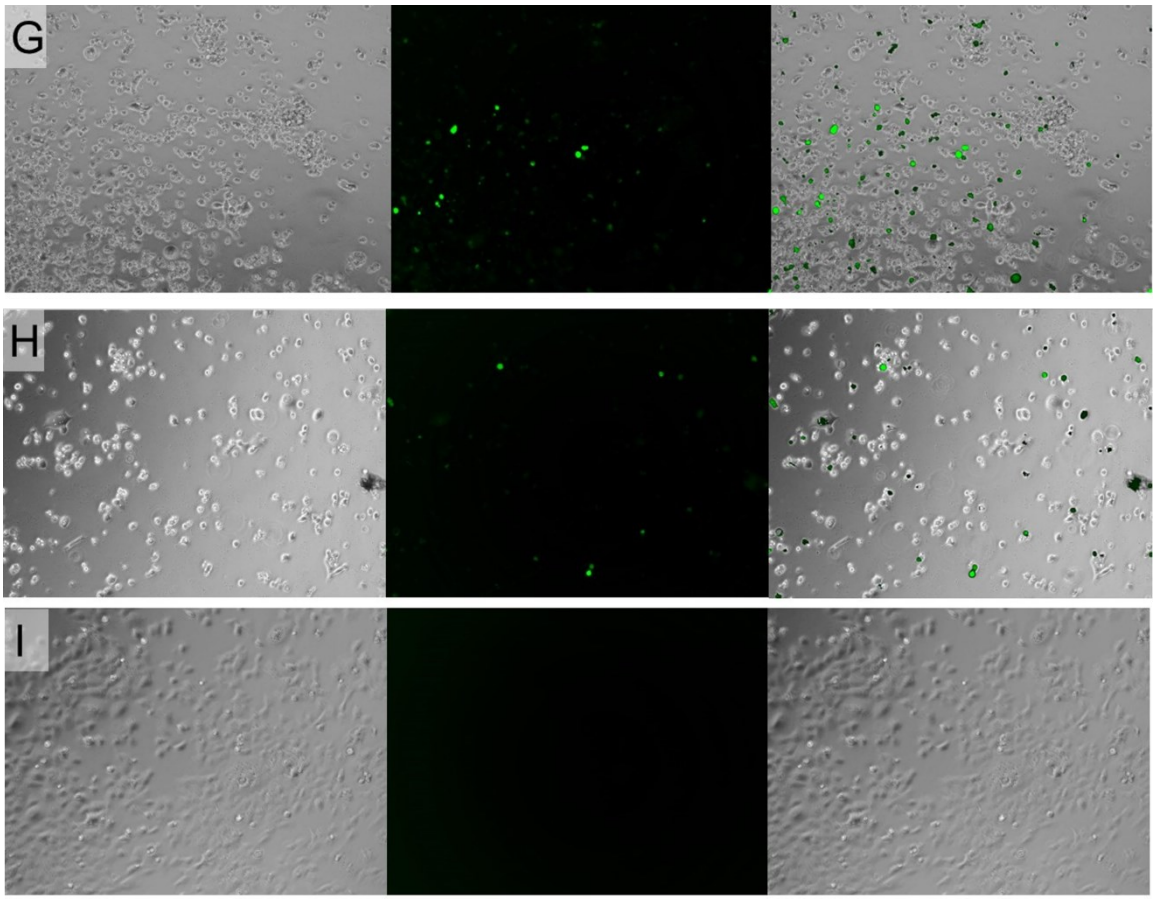


Abbildung 6: Transfektion eines GFP-Plasmides in der Linie U-CH2 bei PCI:

Dargestellt sind, jeweils gemessen 24h nach Lichtexposition, die Transfektionseffizienz bei: in (A): 0,2µg/ml TPPS4, (B): 0,2µg/ml und 0,2µg/ml während Transfektion, (C): 2µg/ml , (D): 2µg/ml und 2µg/ml während Transfektion, (E): 20µg/ml, (F): 20µg/ml und 20µg/ml während Transfektion, (G): 2µg/ml während Transfektion, (H): reine Transfektion ohne PCI; (I): keine Behandlung.

3.1.4 Toxizität

Während der Transfektion wurde ein erhöhtes Absterben der Zellen beobachtet, im Vergleich zur Aussaat ohne Behandlung (Abb.7).

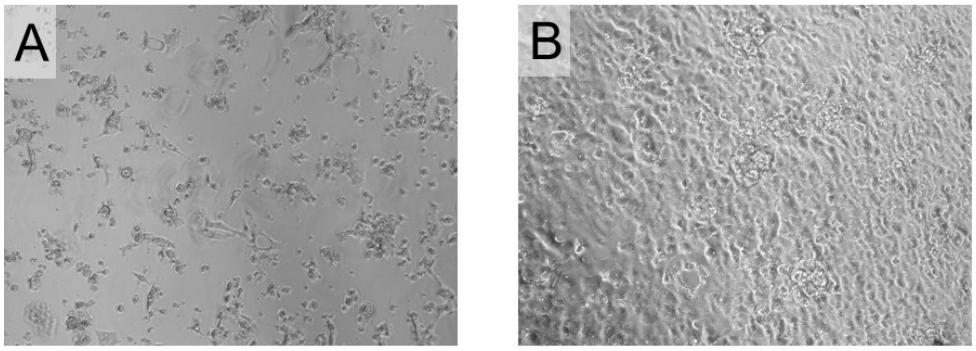


Abbildung 7: Absterben der Zellen bei Transfektion:
Bei Transfektion ergab sich eine stark erhöhte Toxizität mit Absterben der Zellen im Vergleich zur Kontrolle ((A): U-CH2 Zellen nach Transfektion, (B): U-CH2 Zellen ohne Behandlung).

Dabei zeigte sich eine hohe, konzentrationsabhängige Toxizität bei Vektor-DNA-Transfektion, eine leichte Toxizität bei reiner Lipofektaminbehandlung. Zudem wurde eine zelllinienabhängige Toxizität beobachtet. Auch bei den Versuchen mit einer PCI konnte eine vermehrte Toxizität beobachtet werden.

3.1.5 *HOXB7*-Plasmid Transfektion

Als erstes wurde bei der Zelllinie U-CH1 der optimale Isolationszeitpunkt für Proteine nach der Transfektion bestimmt. Hierzu wurde Protein 7, 16, 20, 23 und 30 Stunden nach Transfektion mit einem *HOXB7*-Expressionsvektor isoliert und die Mengen an HOXB7-Protein per Western Blot geprüft. Als optimale Inkubationszeit nach Transfektion wurden 20h bestimmt (Abb. 8).

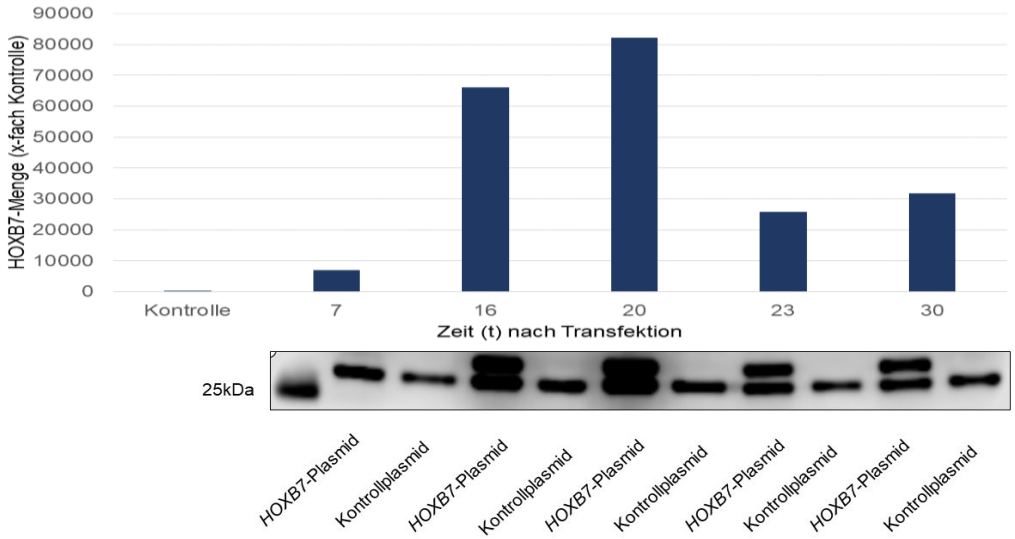


Abbildung 8: Ermittlung der optimalen Proteinisolationszeit nach Transfektion

Dargestellt sind die Mengen an HOXB7, zu verschiedenen Isolationszeitpunkten nach Transfektion der Linie U-CH1 in Stunden. Im oberen Diagramm wurde dabei die Menge bei *HOXB7*-Vektor-Transfektion (dunkelblau) normiert auf die Kontrollgruppe. Es zeigt sich ein optimaler Isolationszeitpunkt von 20h. Darunter ist die Detektion des Immunoblots abgebildet. Dabei wurde pro Zeitpunkt (h) immer zuerst die *HOXB7*-Transfektion, folgend die Kontrollgruppe abgebildet.

Deshalb wurde im Folgenden bei der Linie U-CH1 ein Isolationspunkt für 20h festgelegt. Bei den weiteren Zelllinien wurde ebenso ein optimaler Isolationszeitpunkt bestimmt. So konnte in allen verwendeten Zelllinien eine vielfache Menge an HOXB7 im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 9). Bei Überexpression stellt sich HOXB7 aufgrund des schwereren getaggten Vektorproteins und des leichteren endogenen Proteins im Immunoblot als Doppelbande dar. Hierbei zeigten sich sowohl für die getaggte als auch für die endogene HOXB7-Menge eine Überexpression im Vergleich zur Negativkontrolle.

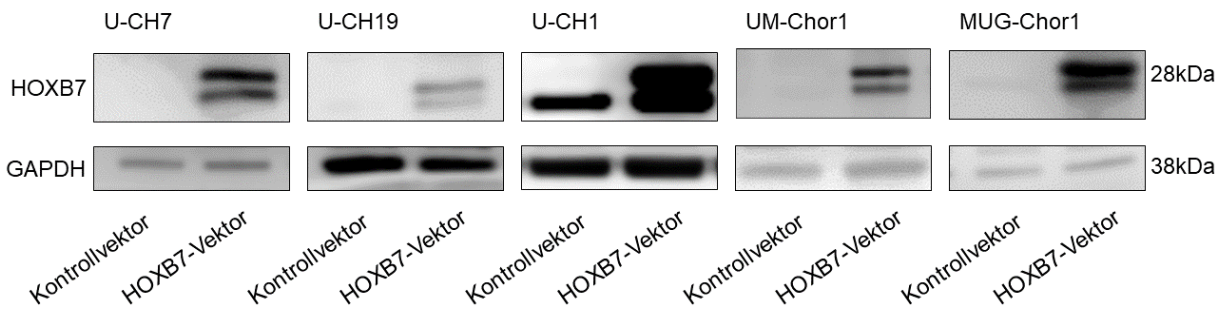


Abbildung 9: *HOXB7*-Überexpression nach Transfektion, Western blot

Im Western Blot wurde die Überexpression von *HOXB7* bei Transfektion im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen fünf verwendeten Zelllinien nachgewiesen. Als interne Ladekontrolle wurde jeweils zusätzlich die Menge an GAPDH bestimmt.

Allerdings konnten sowohl innerhalb eines Triplikates als auch zwischen den Zelllinien große Unterschiede bezüglich der gesteigerten HOXB7-Menge detektiert werden. So kam es nur in der Linie UM-Chor1 und MUG-Chor1 zu einer signifikanten Erhöhung der HOXB7 Mengen ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10).

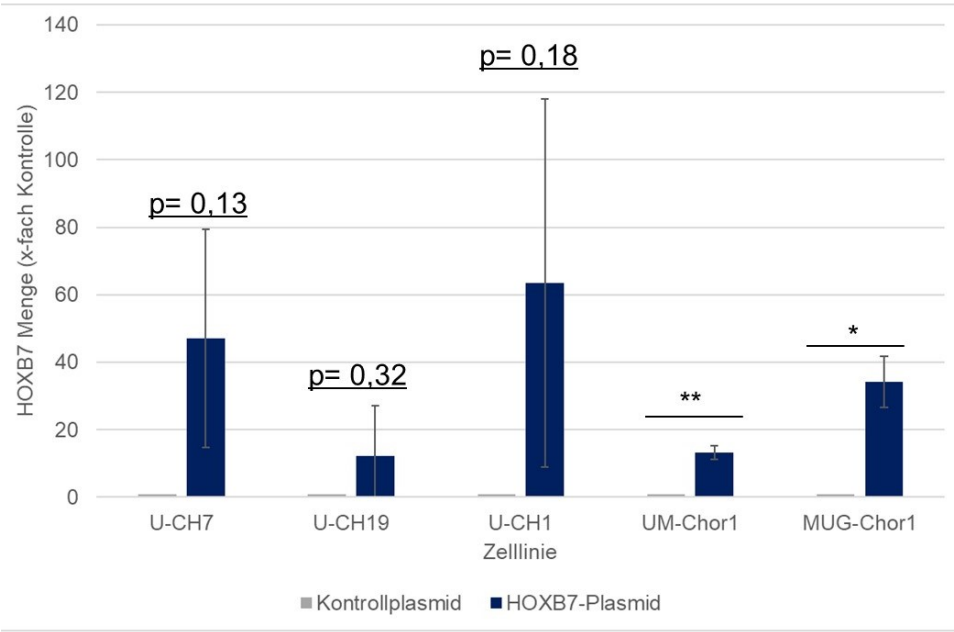


Abbildung 10: *HOXB7*-Überexpression nach Transfektion:

Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der densiometrischen Auswertung von im Western Blot detektierten Mengen von HOXB7 nach Transfektion mit einem Kontrollvektor (grau) und einem *HOXB7*-Expressionsvektor (dunkelblau), normiert auf die Kontrollwerte (grau). Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) wieder. P-Werte spiegeln die Ergebnisse von T-Tests zwischen *HOXB7*-Plasmid-Transfektion und Kontrollplasmid-Transfektion wider. Signifikante/ sehr signifikante Ergebnisse wurden mit */** gekennzeichnet, p-Werte > 0,05 mit der berechneten Irrtumswahrscheinlichkeit.

Für pERK, als Glied des MAPK-Weges und Brachyury, als potentiell letztes Glied des hypothetisches Signalweges wurden von allen fünf Zelllinien Triplikate angefertigt (Abb. 11).

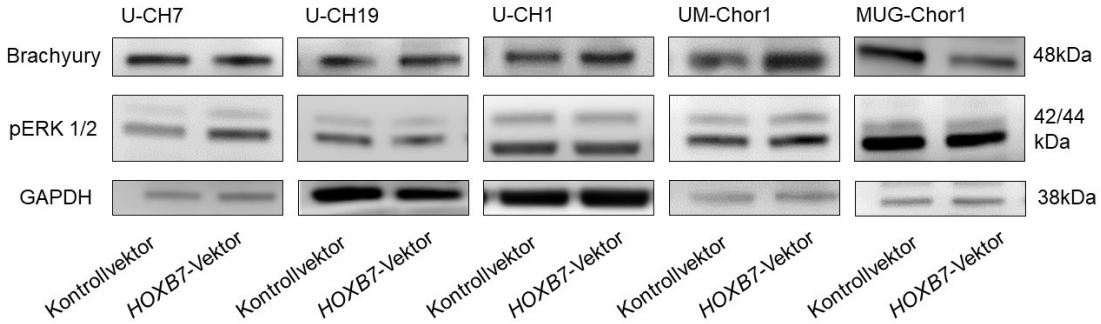


Abbildung 11: Einfluss der *HOXB7*-Überexpression auf pERK und Brachyury, Western Blot

Im Western Blot wurde Mengen von pERK 1 und 2, sowie von Brachyury bei beiden Vergleichsgruppen dargestellt. Als interne Ladekontrolle wurde jeweils zusätzlich die Menge an GAPDH bestimmt.

Hierbei wurde bei pERK für alle Zelllinien eine leichte Steigerung der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen. Allerdings war Steigerung der pERK Mengen ausschließlich bei der Linie U-CH19 signifikant. Auch war die Steigerung in allen Zelllinien sehr variabel. Während die Steigerung der MUG-Chor1im Mittelwert um das 1,7-fache war, war sie bei der UM-Chor1 um das 1,1-fache erhöht (Abb. 12).

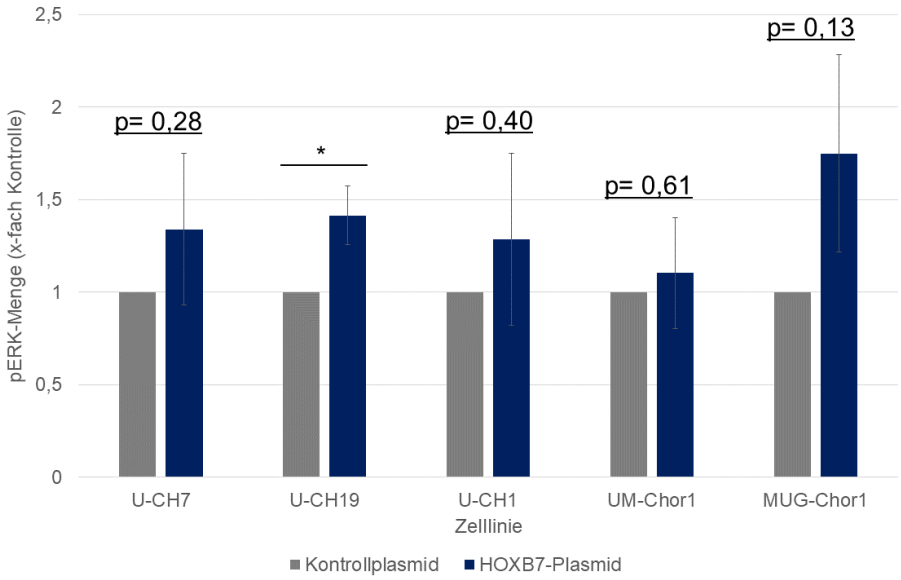


Abbildung 12: Einfluss der *HOXB7*-Überexpression auf pERK:

Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der densiometrischen Auswertung von im Westernblot detektierten Mengen von pERK nach Transfektion mit einem Kontrollvektor (grau) und einem *HOXB7*-Expressionsvektor (dunkelblau), normiert auf die Kontrollwerte (grau). Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) wieder. P-Werte spiegeln die Ergebnisse von T-Tests zwischen *HOXB7*-Plasmid-Transfektion und Kontrollplasmid-Transfektion wider. Signifikante Ergebnisse wurden mit * gekennzeichnet, p-Werte > 0,05 mit der berechneten Irrtumswahrscheinlichkeit.

Bei Brachyury ergab sich keine einheitliche Tendenz. Während es bei U-CH19, UM-Chor1 und MUG-Chor1 zu einer verstärkten Expression im Vergleich zur Negativkontrolle kam, kam es bei den Linien U-CH7 und U-CH1 zu einer Senkung. Bei keiner Linie waren die Änderungen der gemessenen Brachyury-Mengen nach *HOXB7*-Transfektion signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen (Abb. 13).

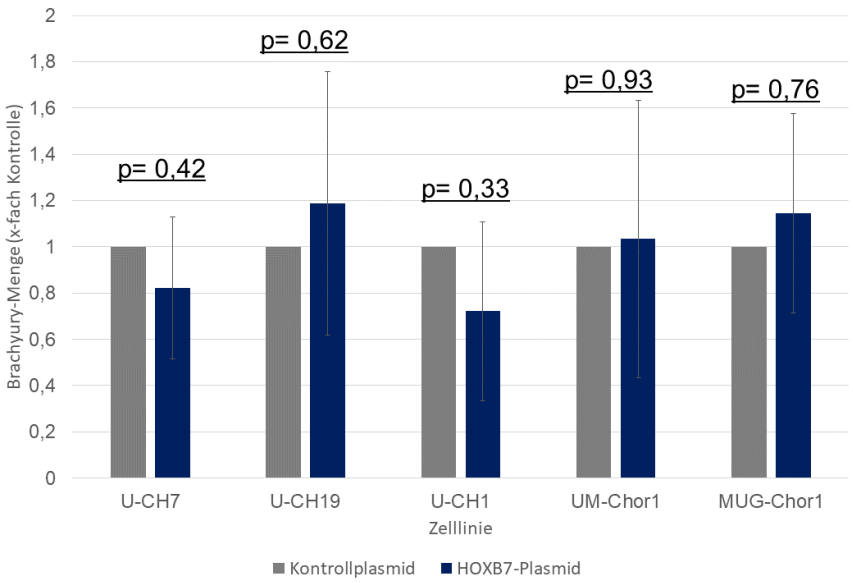


Abbildung 13 Einfluss der HOXB7-Überexpression auf Brachyury:

Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der densiometrischen Auswertung von im Westernblot detektierten Mengen von Brachyury nach Transfektion mit einem Kontrollvektor (grau) und einem *HOXB7*-Expressionsvektor (dunkelblau), normiert auf die Kontrollwerte (grau). Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) wieder. P-Werte spiegeln die Ergebnisse von T-Tests zwischen *HOXB7*-Plasmid-Transfektion und Kontrollplasmid-Transfektion wider. Signifikante Ergebnisse wurden mit * gekennzeichnet, p-Werte > 0,05 mit der berechneten Irrtumswahrscheinlichkeit.

Bei der Zelllinie U-CH1 wurde im Folgenden untersucht, ob upstream von ERK1/2 im hypothetischen Signalweges Unterschiede in den Proteinmengen oder deren Phosphorylierungen durch gesteigerte HOXB7-Mengen erreicht werden konnten. Weder für EGFR noch für MEK konnte dies gezeigt werden (Abb. 14).

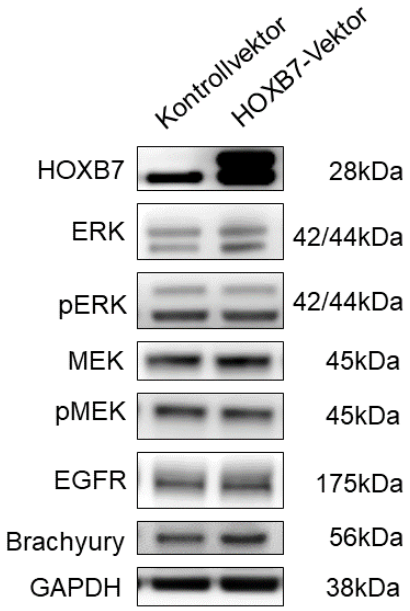


Abbildung 14: Einfluss der gesteigerten HOXB7-Expression auf andere Proteine des MAPK-Weges

Dargestellt sind im Immunoblot nachgewiesenen Proteine des MAPK- Weges und des hypothetischen Signalweges. Als interne Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

3.1.6 *HOXB7*-siRNA-Transfektion

Versuche zur siRNA-vermittelten Herabregulation der *HOXB7* Expression erbrachten bei der Linie U-CH1auf Proteinebene im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer *Kontroll*-siRNA keinen signifikanten Unterschied (Abb. 15).

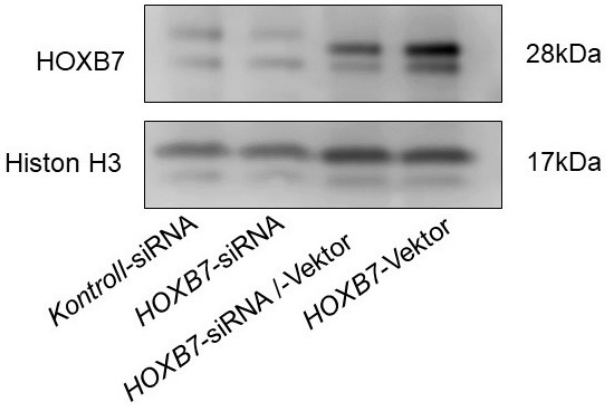


Abbildung 15: Transfektion von *HOXB7*-siRNA in der Linie U-CH1, Western Blot

Dargestellt ist der Immunoblot, der Linie U-CH1 mit Transfektion von *Kontroll*-siRNA, *HOXB7*-siRNA, *HOXB7*-siRNA / -Vektor und alleinigem *HOXB7*-Vektor. Als interne Ladekontrolle wurde Histon H3 verwendet.

Dafür zeigte eine Transfektion mit *HOXB7*-siRNA bei gleichzeitiger Transfektion mit einem *HOXB7*-Vektor im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer ausschließlichen *HOXB7*-Vektor-Transfektion, eine deutliche Reduktion sowohl der endogenen als auch der transfizierten, schwereren *HOXB7*-Bande (Abb. 15).

Diese Reduktion konnte im Folgenden bei allen fünf Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 16). Die Unterschiede in den gemessenen Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle waren außer bei der Linie U-CH7 bei allen Linien signifikant bis höchst signifikant (Abb. 17).

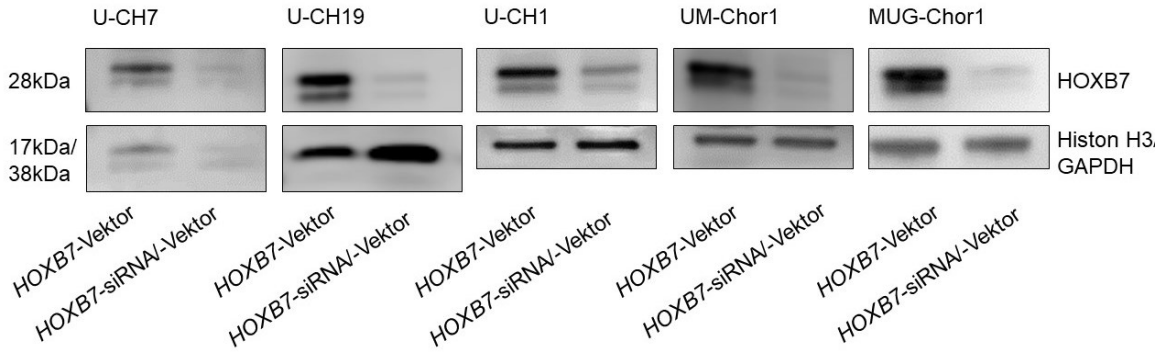


Abbildung 16: Transfektion von *HOXB7*-siRNA und *HOXB7*-siRNA/-Vektor, Western Blot: Dargestellt sind die Immunoblots der fünf Chordomzelllinien U-CH7, U-CH19, U-CH1, UM-Chor1 und MUG-Chor1. Die gleichzeitige Interferenz mit siRNA unter Vektortransfektion führt zu einer HOXB7-Reduktion im Vergleich zur Kontrolle. Als Ladekontrolle wurde für die Linien U-CH7 und U-CH19 Histon H3 verwendet, für U-CH1, UM-Chor1 und MUG-Chor1 GAPDH.

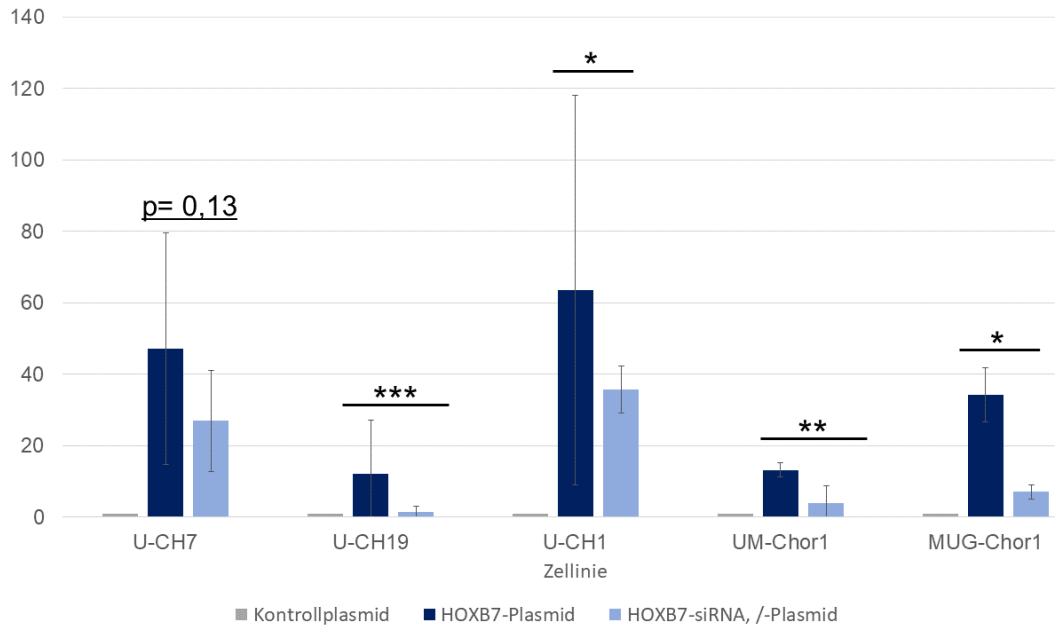


Abbildung 17: Transfektion von HOXB7-siRNA und HOXB7-siRNA/-Vektor

Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der densiometrischen Auswertung von im Westernblot detektierten Mengen von HOXB7 nach Transfektion mit einem Kontrollvektor (grau) aus Kap. 3.1.5, einem *HOXB7*-Expressionsvektor (dunkelblau) und einer Kombination aus HOXB7-Expressionsvektor und *HOXB7* siRNA (hellblau). Alle Messwerte wurde auf die Kontrollwerte (grau) normiert. Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) wieder. P-Werte spiegeln die Ergebnisse von T-Tests zwischen *HOXB7*-Plasmid-Transfektion und *HOXB7*-siRNA/-plasmid-Transfektion wider. Signifikante Unterschiede wurden dabei mit * gekennzeichnet, sehr signifikante Ergebnisse mit ** und höchst signifikante Ergebnisse mit ***. P-Werte > 0,05 wurden mit der berechneten Irrtumswahrscheinlichkeit dargestellt.

Es zeigte sich auch hier eine große intra- und intertriplikatere Varianz. Das Niveau der Kontrollvektortransfektion aus Kapitel, entsprechend der endgogenen HOXB7-Menge konnte bei keiner Zelllinie wieder erreicht werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine kombinierte Transfektion von *HOXB7*-siRNA und -Plasmid im Vergleich zu einer reinen Plasmid-Transfektion zu einer deutlichen Veränderung in der HOXB7 Menge führt, wurde auch in diesem Versuchsansatz die Veränderung von pERK- und Brachyury im Western Blot bestimmt (Abb. 18). Dabei wurden die Mengen an pERK bzw. Brachyury bei *HOXB7*/-siRNA/-Plasmid-Transfektion mit den Mengen bei reiner *HOXB7*-Transfektion verglichen. Dies wurde bei allen fünf verwendeten Ziellinien in Triplikaten durchgeführt.

Für pERK ergab sich keine eindeutige Tendenz (Abb. 19). Während es bei den Linien U-CH7 und U-CH1 zu einer Steigerung der pERK-Menge bei *HOXB7*-siRNA/-Plasmid -Transfektion im Vergleich zur reinen *HOXB7*-Plasmid-Transfektion kam, kam es bei den Linien UM-Chor1 und MUG-Chor1 zu einer Senkung im Vergleich zur *HOXB7*-Transfektion. Bei der Linie U-CH19 kam es zudem zu einer Senkung unter das Nullniveau, der Transfektion mit Kontrollvektor.

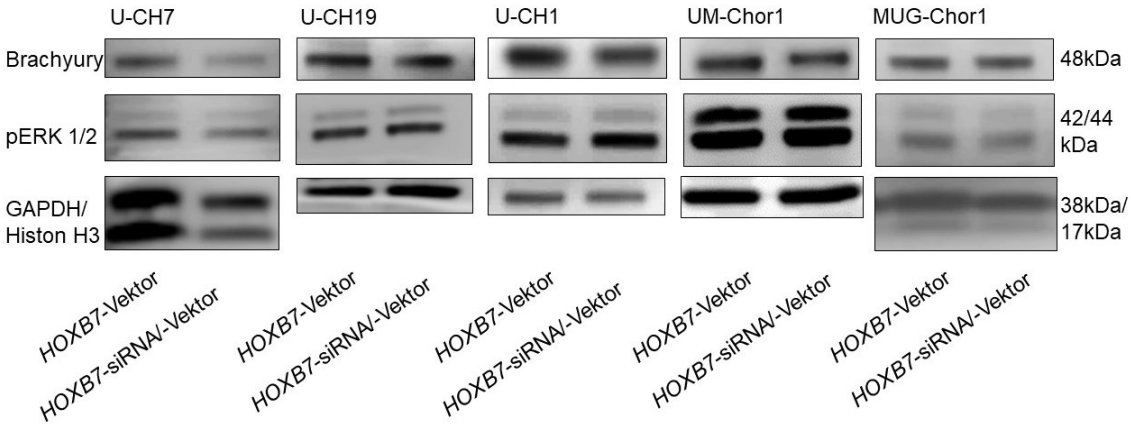


Abbildung 18 Einfluss von *HOXB7*-siRNA/Vektor auf pERK und Brachyury, Western Blot:
Im Western Blot wurde die Mengen von pERK 1 und 2, sowie von Brachyury bei beiden Vergleichsgruppen dargestellt. Als interne Ladekontrolle wurde jeweils zusätzlich die Menge an GAPDH oder Histon H3 bestimmt.

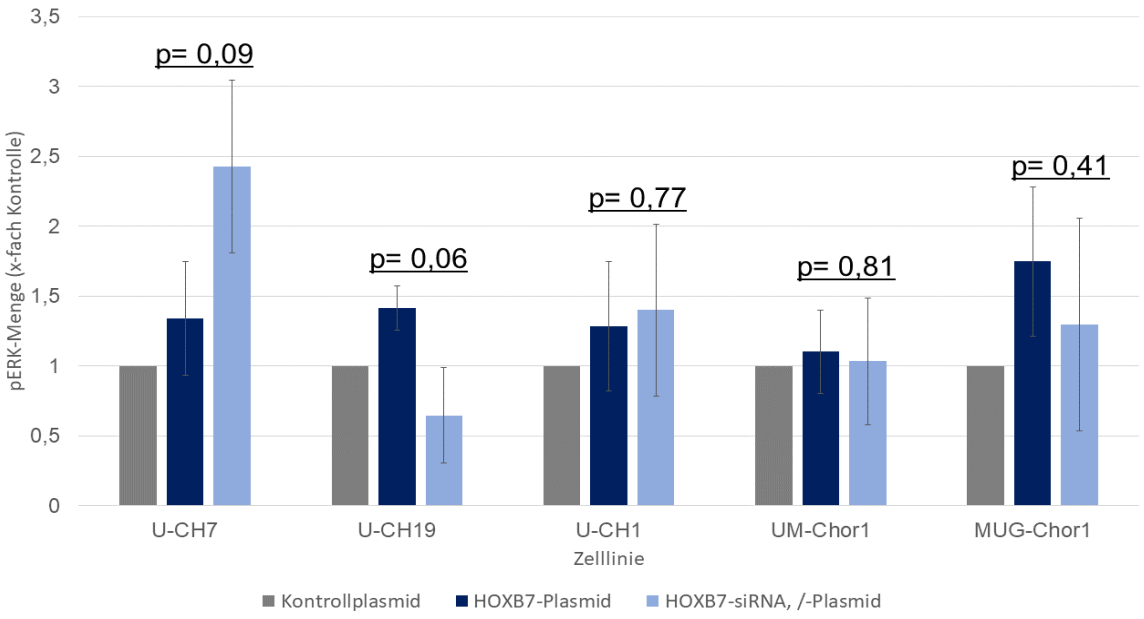


Abbildung 19: Einfluss von HOXB7-siRNA/Vektor auf pERK

Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der densiometrischen Auswertung von im Westernblot detektierten Mengen von pERK nach Transfektion mit einem Kontrollvektor (grau) aus Kap. 3.1.5, einem *HOXB7*-Expressionsvektor (dunkelblau) und einer Kombination aus *HOXB7*-Expressionsvektor und *HOXB7* siRNA (hellblau). Alle Messwerte wurde auf die Kontrollwerte (grau) normiert. Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) wieder. P-Werte spiegeln die Ergebnisse von T-Tests zwischen *HOXB7*-plasmid-Transfektion und *HOXB7*-siRNA/-plasmid-Transfektion wider. Signifikante Ergebnisse wurden dabei mit * gekennzeichnet. P-Werte > 0,05 wurden mit der berechneten Irrtumswahrscheinlichkeit dargestellt.

Bei Brachyury (Abb. 20) ergab sich ebenfalls keine einheitliche Tendenz. Während es bei U-CH7, U-CH1 und UM-Chor1 zu einer Steigerung der Brachyury-Menge bei HOXB7-siRNA/-Plasmid-Transfektion im Vergleich zur reinen *HOXB7*-Transfektion kam, kam es bei den Linien U-CH19 und MUG-Chor1 zu einer Senkung im Vergleich zur *HOXB7*-Transfektion und zudem unter das Nullniveau. Bei der Linie U-CH1 kam es trotz Steigerung zu einer relativen Senkung im Vergleich zum Nullniveau. Eine Signifikanz der Änderungen konnte bei keiner der Zelllinien gefunden werden.

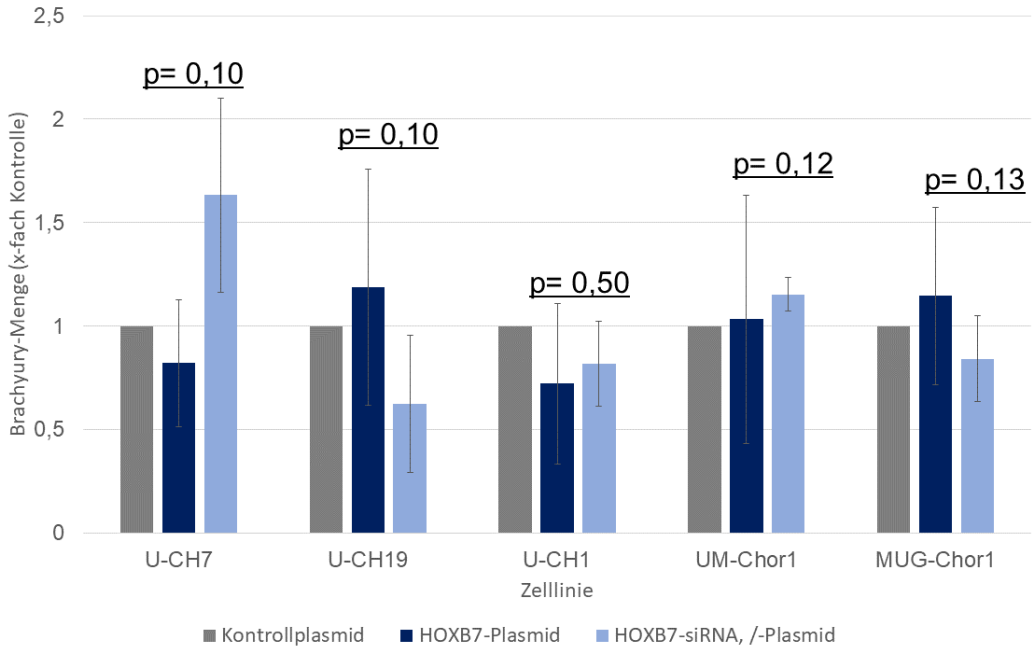


Abbildung 20: Einfluss von *HOXB7*-siRNA/Vektor auf Brachyury:

Dargestellt sind Mittelwerte (n=3) der densiometrischen Auswertung von im Westernblot detektierten Mengen von Brachyury nach Transfektion mit einem Kontrollvektor (grau) aus Kap. 3.1.5, einem *HOXB7*-Expressionsvektor (dunkelblau) und einer Kombination aus *HOXB7*-Expressionsvektor und *HOXB7* siRNA (hellblau). Alle Messwerte wurde auf die Kontrollwerte (grau) normiert. Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) wieder. P-Werte spiegeln die Ergebnisse von T-Tests zwischen *HOXB7*-Plasmid-Transfektion und *HOXB7*-siRNA/-plasmid-Transfektion wider. Signifikante Ergebnisse wurden dabei mit * gekennzeichnet. P-Werte > 0,05 wurden mit der berechneten Irrtumswahrscheinlichkeit dargestellt.

3.1.7 Messung der Viabilität der Chordomzellen nach Überexpression bzw. Reduktion der HOXB7-Mengen mittels MTS-Assay

Zur Testung der Viabilität der Zelllinien nach *HOXB7*-Vektor-Transfektion bei gleichzeitiger siRNA-Interferenz wurden MTS-Assays durchgeführt. Sämtliche Ansätze, in denen die Viabilität bei *HOXB7*-Transfektion durch ein MTS-Assay getestet wurde, wurden zuvor auf die erfolgreiche Transfektion mittels Western Blot getestet. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt (Abb. 21).

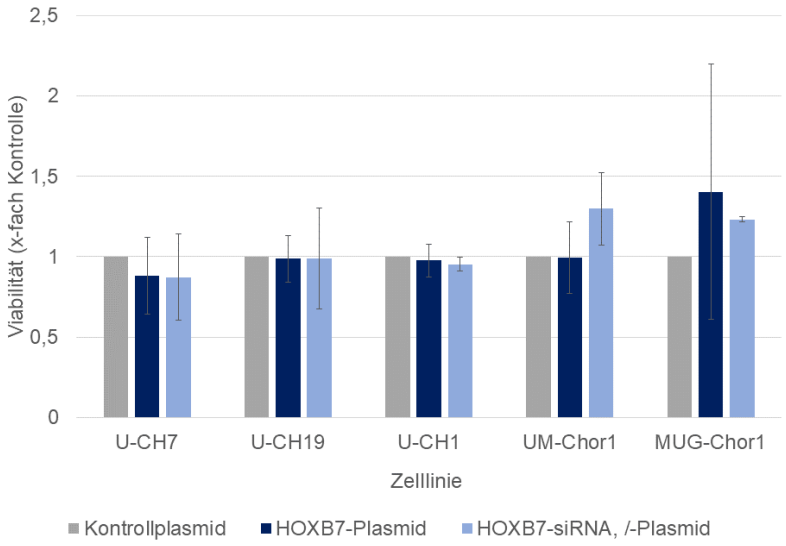


Abbildung 21: Viabilitäten der Versuchsreihen bei verschiedenen HOXB7-Mengen

Dargestellt sind die Viabilität der Zelllinien mit Kontrollvektor (grau), die Viabilität der Zelllinien, die den *HOXB7*-Vektor exprimieren (dunkelblau), normiert auf die Viabilitäten der Zelllinien mit Kontrollvektor und die Viabilität der Zelllinien, die sowohl den *HOXB7*-Vektor exprimieren als auch mit *HOXB7*-siRNA behandelt wurden (hellblau), normiert auf deren Kontrollgruppe. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) an.

Bei den Linien U-CH7, U-CH19, U-CH1 ergab sich sowohl in der Gruppe mit *HOXB7*-Transfektion als auch in der Gruppe mit *HOXB7*-siRNA/Vektor-Transfektion kein Einfluss auf die Viabilität. Bei den Linien UM-Chor1 und MUG-Chor1 zeigte sich in der Gruppe mit der *HOXB7*-Transfektion ebenso kein signifikanter Einfluss auf die Viabilität, jedoch jeweils eine Tendenz zur Steigerung der Viabilität bei siRNA/Vektor-Transfektion.

3.1.8 *HOXA7*-Transfektionen

Bei reiner siRNA-Interferenz mit *HOXA7*-siRNA im Vergleich zu *Kontroll*-siRNA-konnte für die Mengen an HOXA7 kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle im Immunoblot detektiert werden (Abb. 22). Dementsprechend zeigten sich auch keine Veränderungen der pERK- und Brachyury-Mengen als downstream Regulatoren. Der Versuch wurde aufgrund der fehlenden Reduktion der HOXA7 Mengen nicht an weiteren Zelllinien durchgeführt.

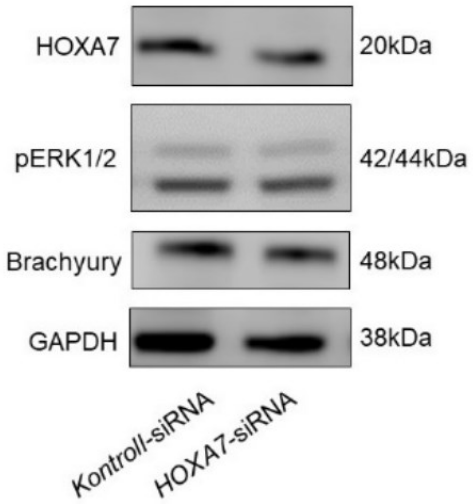


Abbildung 22: Transfektion mit *HOXA7*-siRNA, Western Blot

Dargestellt sind die im Immunoblot nachgewiesenen Proteine bei *HOXA7*-siRNA-Transfektion im Vergleich zu einer *Kontroll*-siRNA dargestellt. Verwendet wurde die Linie U-CH1. Zudem wurden pERK und Brachyury als Bestandteile des hypothetischen Signalweges bestimmt. Als interne Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

Bei der Kombination aus *HOXA7*- und *HOXB7*-siRNA konnte bei der Linie MUG-Chor1, nicht jedoch bei der Linie UM-Chor1 für HOXB7 eine leichte Reduktion der Menge festgestellt werden. Jedoch konnte keine Reduktion der HOXA7-Menge detektiert werden (Abb. 23). Bei beiden Zelllinien konnte dementsprechend kein signifikanter Unterschied bezüglich pERK und Brachyury festgestellt werden. Da auch diese Kombination zu keiner ausreichenden Reduktion der HOXB7/A7-Mengen führte, und demnach keine Aussagen über downstream Regulatoren getroffen werden konnten, wurden diese Versuche nicht bei allen fünf Zelllinien als Triplikate angefertigt.

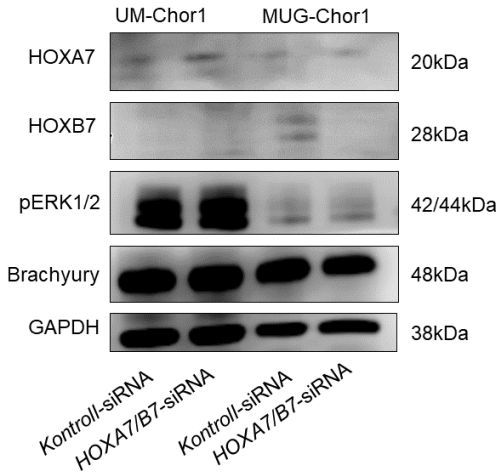


Abbildung 23: Kombinierte Transfektion mit *HOXB7*- und *A7*-siRNA:
Dargestellt sind die Immunoblots der Linien UM-Chor1 und MUG-Chor1 nach kombinierter *HOXA7/B7*-siRNA Transfektion im Vergleich zu einer *Kontroll*-siRNA dargestellt. Als interne Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet.

3.2 Etablierung Zelllinien

In dieser Arbeit konnten zwei Chordomzelllinien etabliert werden, U-CH22 und U-CH24 Q3.

3.2.1 U-CH22

Die Zelllinie U-CH22 wurde aus einem Pleurapunktat einer 78-Jährigen, weiblichen Patientin bei bekanntem, bereits mehrfach metastasiertem, sakralem Chordom mit teils chondroider Differenzierung ohne Hinweis Dedifferenzierung etabliert.

Erhalten wurde hierbei ein Liter einer gelblichen, leicht trüben, mäßig zelldichten Flüssigkeit. Das primäre Punktat enthielt hierbei multiple Zellen mit verschobener Kern-Plasma-Relation. Dabei ergab sich eine Positivität der Tumorzellen für CK-AE1/3-, Vimentin- und Brachyury-Färbungen. Die Tumorzellen zeigten sich primär negativ für S100, p53- und EP-4-Färbungen. Die Ki-67-Rate lag bei 40%.

Das erhaltene Material konnte in Zellkulturflaschen kultiviert werden (Abb. 24 A). Die Zellen zeigten zu Beginn einen hohen Metabolismus, sodass ein Mediumwechsel und eine Verringerung der Zelldichte bereits nach zwei Stunden erfolgen mussten. Im Verlauf adhärierte ein Großteil der Zellen, sodass die Vermutung, es könne sich um ausschließlich in Suspension wachsende Zellen handeln, verworfen wurde. Die Zellen wiesen weiterhin eine hohe Proliferationsrate auf, sodass ein Splitting

der Zellen zweimal die Woche erforderlich war. Eine PCR ergab eine Positivität für den SNP in Exon 5 des *TBXT*-Gens (Abb. 24 B). Im Verlauf wurde regelmäßig auf die Brachyury-Positivität getestet, die mit höheren Passagen zunahm (Abb. 24 C).

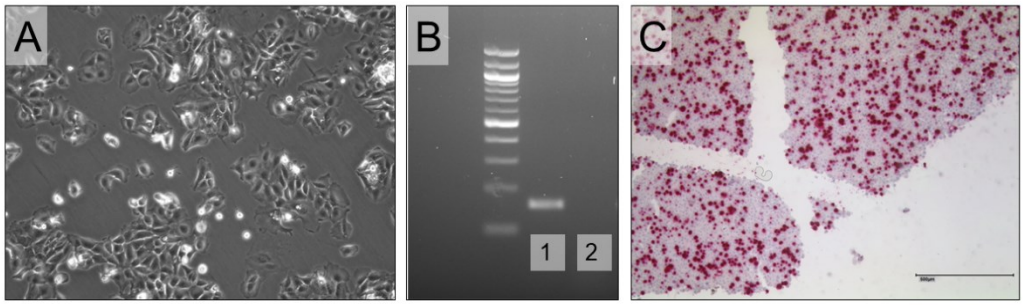


Abbildung 24: Linie U-CH22, frühe Passagen:
Zu sehen sind Zellen in Kultur der Passage 5 (A), die mutationsspezifische PCR für den SNP mit Gelelektrophorese (B) ergab eine deutliche Positivität für die Linie U-CH22 (1) im Vergleich zur Negativkontrolle (2) für den SNP in Exon 5 des *TBXT*-Gens. Eine immunzytochemische Färbung auf Brachyury in Passage 5 (C) ergab eine ca. 32%ige Positivität für Brachyury.

3.2.1.1 Subklonierung der U-CH22 Zellen

Aus den mehreren, in den 96-Näpfchen-Platten entstandenen Klonen konnten drei Klone etabliert werden, Klon B, Klon 1 und Klon 6 (Abb. 25). Während Klon 1 und 6 vorwiegend ein adhärentes Wachstum aufwiesen, wies Klon B teilweise ein Wachstum in Suspension auf. Deshalb wurde anstelle des sonst verwendeten Splittens zunächst der Überstand der Flasche in eine neue Flasche transferiert. Dabei adhärierte jeweils ein Teil der Zellen in Suspension erneut. Ebenso ging ein Teil der adhärenten Zellen in der ursprünglichen Flasche in Suspension. Ein Lebend-tot-Test mittels Trypanblau bestätigte, dass die Zellen, die in Suspension vorlagen, weiterhin vital waren. Bei Transfer der Suspensionzellen in eine neue Flasche adhärierte erneut ein Teil. Der Versuch, Klon B in FCS-freiem Medium (IMDM, RPMI 4:1, Glutamin und Penicillin/Streptomycin) zu kultivieren, führte nach 96 Stunden zu einem traubenförmigen, jedoch adhärenten Wachsmuster.

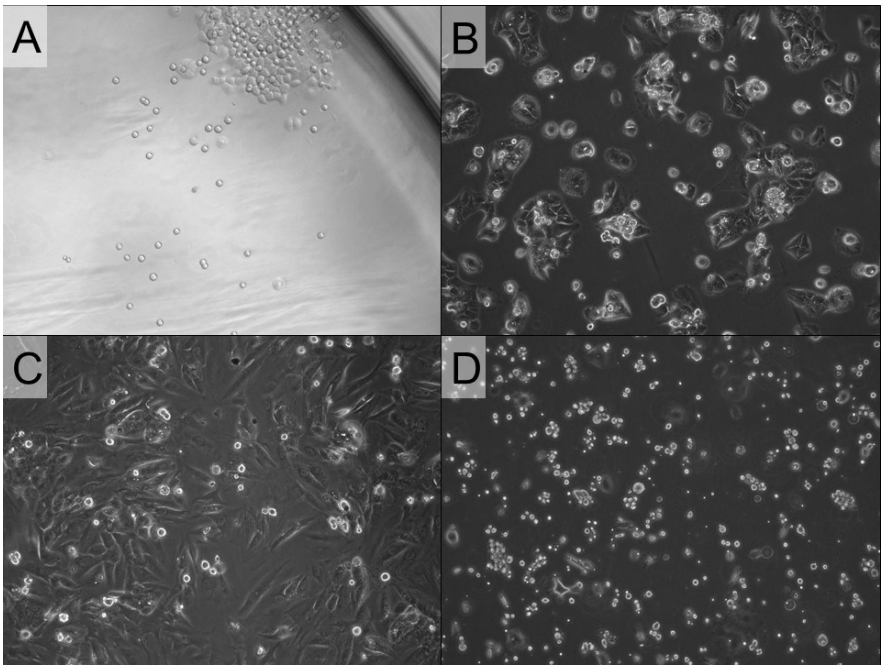


Abbildung 25, Klone:

Bei Aussaat von rechnerisch 1 Zelle/100µl konnten in einem 96-Näpfchenplatten-Näpfchen Klone gezüchtet werden (A). Im Verlauf ergaben sich Klon 1 (B), Klon 6 (C) und Klon B (D).

Alle Klone wurden mittels STR-Analyse dem ursprünglichen Tumormaterial aus Passage 1 (Tab. 12, Kap. 3.2.1.2) zugeordnet und konnten negativ auf Mykoplasmen getestet werden. Eine Immunzytochemie ergab eine Positivität für Brachyury (Klon B 42%, Klon1 95%, Klon 6 50%) (Abb. 26), eine schwache Positivität für S100, eine Positivität für EMA und Vimentin.

Da Klon B teilweise in Suspension wuchs, wurde ein Versuch gestartet, ihn in FCS-freiem Medium (IMDM, RPMI 4:1, Glutamin und Penicillin/Streptomycin) zu kultivieren, da dies in einer bislang nicht publizierten Zelllinie eines Fremdinstituts zu einem ausschließlichen Wachstum in Suspension geführt hat. Nach 96 Stunden wiesen die Zellen ein adhärentes, jedoch traubenförmiges Wachsmuster auf. Der Versuch wurde aufgrund nicht weiterführender Ergebnisse abgebrochen.

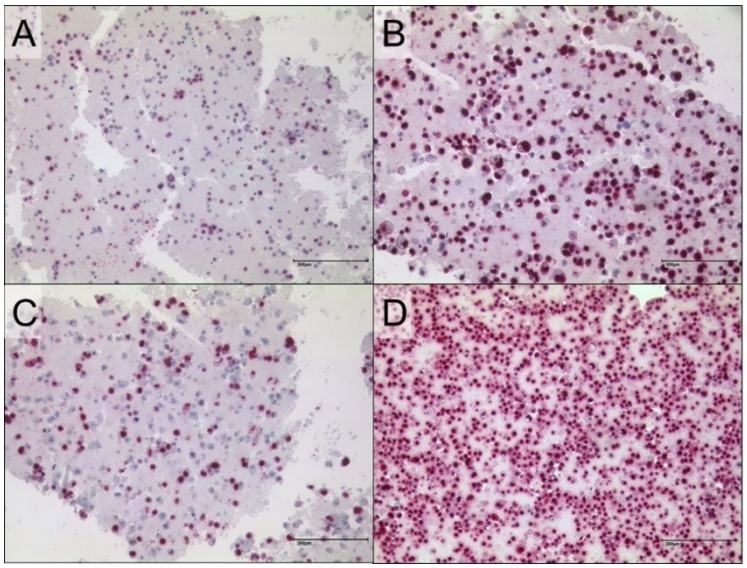


Abbildung 26: Klone Immunzytochemische Färbung Brachyury:

Die Färbung für Klon B (A), 1 (B), und 6 (C) ergaben im Vergleich zu den Linie U-CH2 (D) nur eine partielle Positivität auf Brachyury

3.2.1.2 Finale Etablierung und Validierung der Zelllinie U-CH22

Eine zu etablierende Zelllinie gilt als stabil, sobald sie mindestens 50 Populationsverdopplungen ohne Anzeichen von Seneszenz erreicht hat. Bei Passage 58 konnten 36 Stocks eingefroren werden. Die Linie U-CH22 zeigt ein stabiles adhärentes Wachstum in Kultur bei kaum physaliphorer Morphologie (Abb. 27).

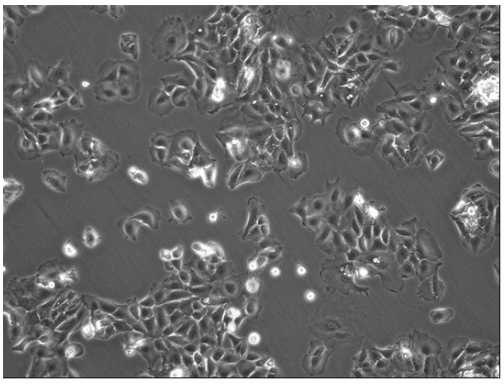


Abbildung 27: U-CH22 in Kultur

Dargestellt ist die Linie U-CH22 in Kultur. Sie weist, untypisch für Chordome, kein stark vakuolenhaltiges Plasma auf.

Die immunzytochemische Färbung ergab eine 100%ige Positivität für Brachyury, eine ca. 50%ige Positivität für EMA, eine 100%ige Positivität für Vimentin, eine schwache Positivität für S100, und eine 100% Positivität für CD24, CK AE 1+3 und CK 8/18. Die Ki-67-Rate lag bei über. 90% (Abb. 28).

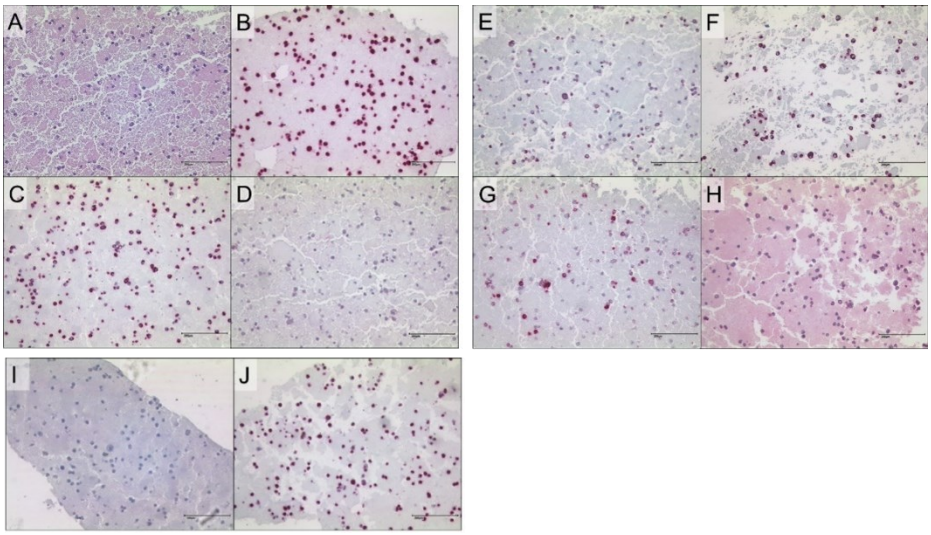


Abbildung 28: Immunzytochemische Färbungen, Passage 58:

Dargestellt sind die immunzytochemischen Färbungen auf chordomspezifische Marker und Ki-67. HE (A), Brachyury (B), Vimentin (C), S100 (D), CK AE 1+3 (E), CK 8/18 (F), EMA (G), CD24 (H), p53 (I) und Ki-67 (J).

Die durchgeführte STR-Analyse ergab eine Übereinstimmung mit den Klonen und dem Ursprungsmaterial (Tab. 12). Die Wachstumskurve ergab eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 1,76 Tagen (Abb. 29 A). Der durchgeführte Western Blot zeigte in Übereinstimmung mit den regelmäßig durchgeführten immunzytohemischen Färbungen eine deutliche Zunahme von Brachyury im Verlauf (Abb. 29 B). In der qPCR konnte eine 4,3-fache Menge an Brachyury im Vergleich zur Linie U-CH1 und eine 1,1-fache Menge an Brachyury im Vergleich zur Linie U-CH17M festgestellt werden (Abb. 29 C). Eine Mykoplasmen-PCR ergab keinen Nachweis von Mykoplasmen-DNA in der Zelllinie (Abb. 29 D).

Tabelle 12: STR-Analyse Linie U-CH22

Dargestellt sind die verschiedenen Marker der STR-Analyse. Die Marker der Linie U-CH22 sind identisch mit denen der Klone mit Ausnahme Marker D3S1358 und D8S1179. Die Linie U-CH22 und Klone konnten über die STR- Analyse dem Primärmaterial zugeordnet werden.

Marker	U-CH22	Klon 1	Klon 6	Klon B
AMEL	X	X	X	X
D13S317	8; 10	8; 10	8; 10	8; 10
D7S820	8	8	8	8
D16S539	9; 12	9; 12	9; 12	9; 12
Penta E	10; 20	10; 20	10; 20	10; 20
TH01	9; 9,3	9; 9,3	9; 9,3	9; 9,3
D18S51	15; 16	15; 16	15; 16	15; 16
D3S1358	(15); 16	16	16	15; 16
D8S1179	9; 13	9; 13	9	9; 13
TPOX	9; 11	9; 11	9; 11	9; 11
CSF1PO	11; 12	11; 12	11; 12	11; 12
Penta D	9	9	9	9

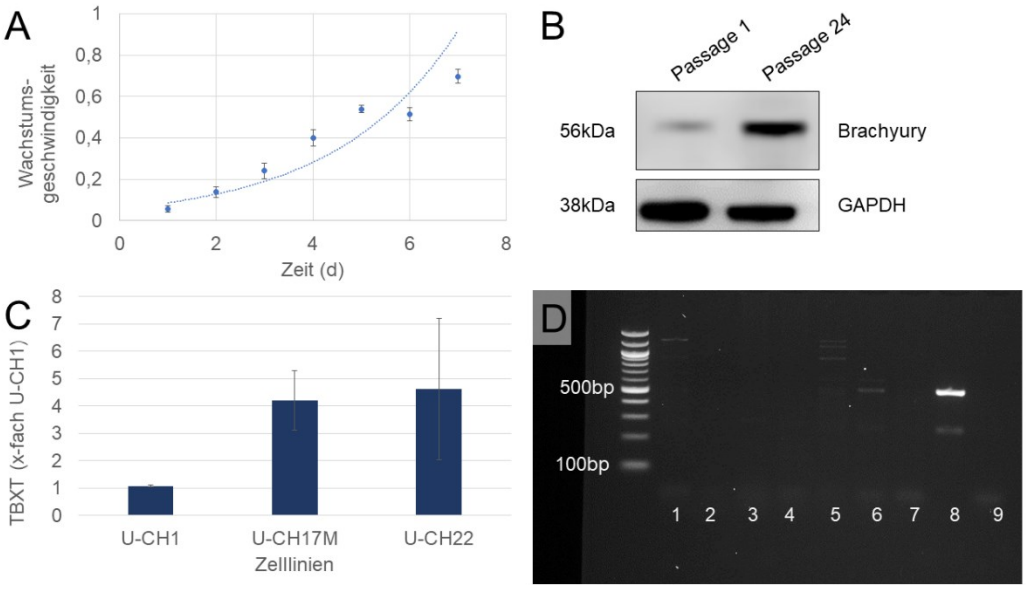


Abbildung 29: Wachstumskurve, Immunoblot, qPCR und Mykoplasmen-PCR der Linie U-CH22:

Dargestellt ist die Wachstumskurve der Linie U-CH22 (A). Die x-Achse gibt die Zeit (d) an, die y-Achse die, beim MTS-Assay gemessene Absorption, die mit der Zellzahl korreliert. Der Immunoblot (B) zeigt die Zunahme der Brachyury-Menge von Passage 1 zu Passage 24. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. In (C) wurde die qPCR auf TBXT mRNA durchgeführt. Als Referenz wurden ß-Aktin und GAPDH bestimmt, als Referenz wurden die Linien U-CH1 und U-CH17M mitgetestet. Angegeben ist die x-fache Expression verglichen zur Kontrolle (U-CH1; ΔΔCT-Methode). Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) an. In (D) ist die Mykoplasmen-PCR dargestellt, 1-3 stellen als Vergleichsprobe die Linie U-CH24 dar, in (4) ist die Linie U-CH22 gestellt, in (5) Klon1, (6) Klon6, (7) KlonB, (8) die Positivkontrolle und (9) die Negativkontrolle.

3.2.2 U-CH24 Q3

Die Zelllinie U-CH24 Q3 wurde aus einem sakralen Chordom eines 47-jährigen Mannes etabliert. Von der Pathologie der Universität Ulm wurde die Diagnose eines klassischen Chordoms (NOS) gestellt. Der Tumor und das Steißbein wurden per en-bloc Resektion entfernt (Abb. 30 A-C). Aufgrund der Größe wurde der Tumor in vier Quadranten unterteilt, und aus jedem Quadranten wurde Material zur Aufarbeitung entnommen (Abb. 30 D). Hierbei wurden in dieser Arbeit Quadrant drei und vier bearbeitet.

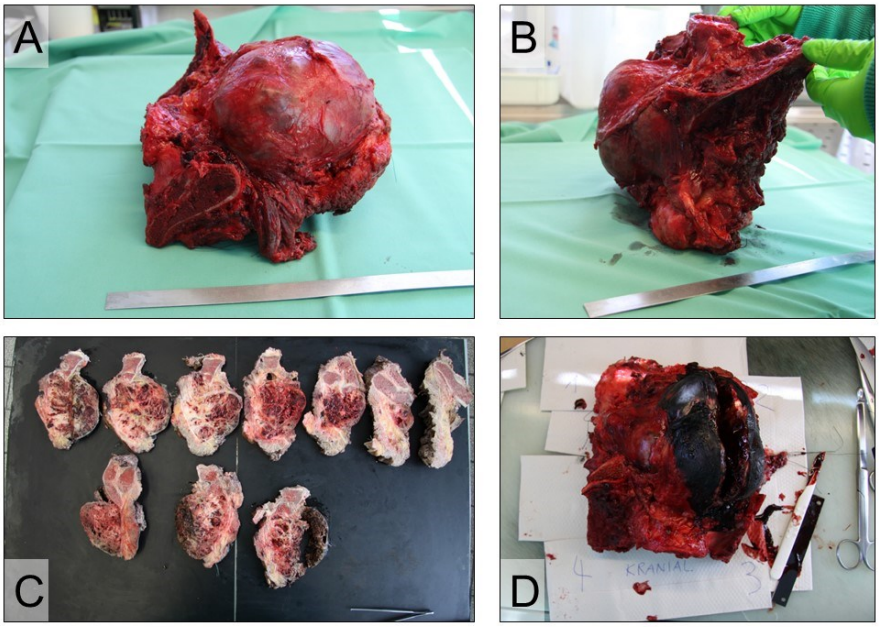


Abbildung 30: Makroskopisches Resektat des Primärtumors:
Dargestellt ist der Primärtumor (A, B), dessen makroskopische Aufarbeitung (C) und die Unterteilung in vier Quadranten (D).

Durch die Aufarbeitung der Gewebeproben konnte in beiden Ansätzen vitale Zellen gewonnen werden, die In Zellkulturflaschen kultivier und propagiert werden konnten. Nach Passage fünf wurden immunzytochemische Schnitte angefertigt, um die Zellen auf Brachyury als Marker für Anteil an Tumorzellen zu testen (Abb. 31). In niedrigen Passagen zeigte sich eine geringe Positivität, mit zunehmenden Passagen konnte eine 100%ige Positivität für Brachyury erreicht werden.

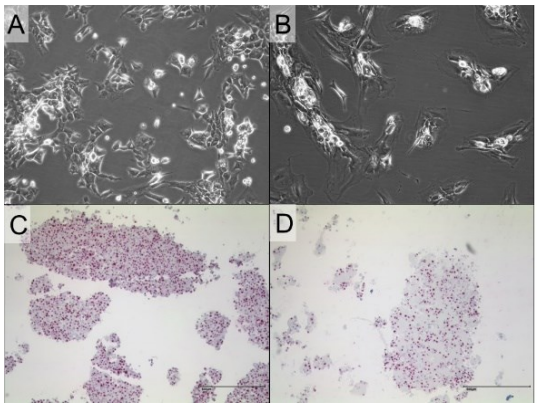


Abbildung 31: U-CH24 Q 3,4 Passage 5

Zu sehen sind in Zellkultur der Quadrant 3 (A) und 4 (B) und die jeweilige Immunzytochemie auf Brachyury (C und D)

Eine STR-Analyse des Quadranten 4 ergab in Passage 40 eine fehlende Übereinstimmung mit dem Patienten, sodass diese Kultur verworfen werden musste, da dies auf eine Kreuzkontamination mit einer anderen Zelllinie hinwies. Die Linie U-CH24 Q3 zeigte eine Übereinstimmung mit dem STR-Profil des Patienten, was die Herkunft der Zelllinie bestätigte (Tab. 13, Kap.3.2.2.1).

3.2.2.1 Finale Etablierung und Validierung der Zelllinie U-CH24 Q3

Mit Passage 51 wurde die Etablierung der Linie U-CH24 Q3 abgeschlossen. Die Linie U-CH24 zeigt ein stabiles Wachstum in Kultur mit einem typischen physaliphoren Wachstum (Abb. 32)

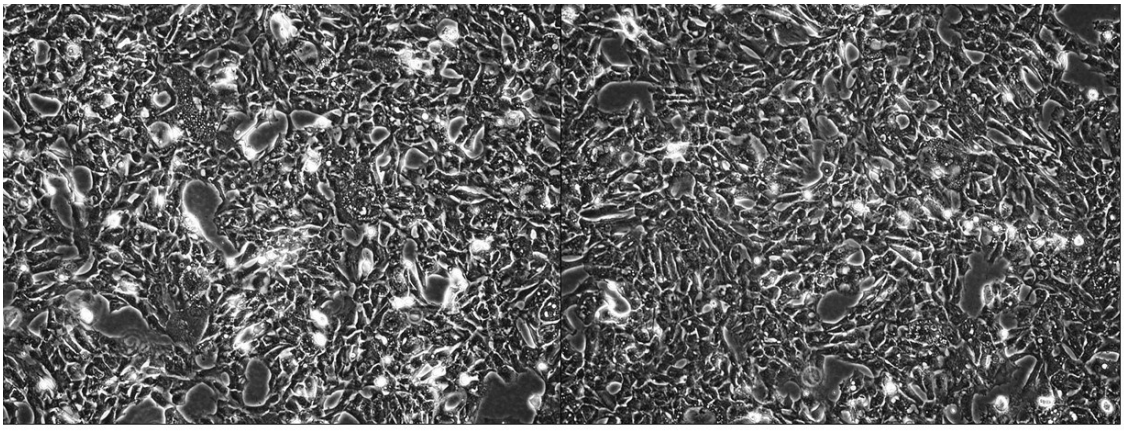


Abbildung 32: U-CH24 in Kultur:

Dargestellt ist die Linie U-CH24 in Kultur bei ca. 95% Konfluenz. Das vakuolenhaltige, “physaliphore” Zytoplasma ist charakteristisch für Chordome.

Die immunzytochemische Färbung ergab eine 100%ige Positivität für Brachyury, eine starke 100%ige Positivität für Vimentin und EMA, eine starke Positivität für

S100, und CK AE 1+3 und eine fehlende Positivität für p53. Die Ki-67-Rate lag unter 5% (Abb. 33)

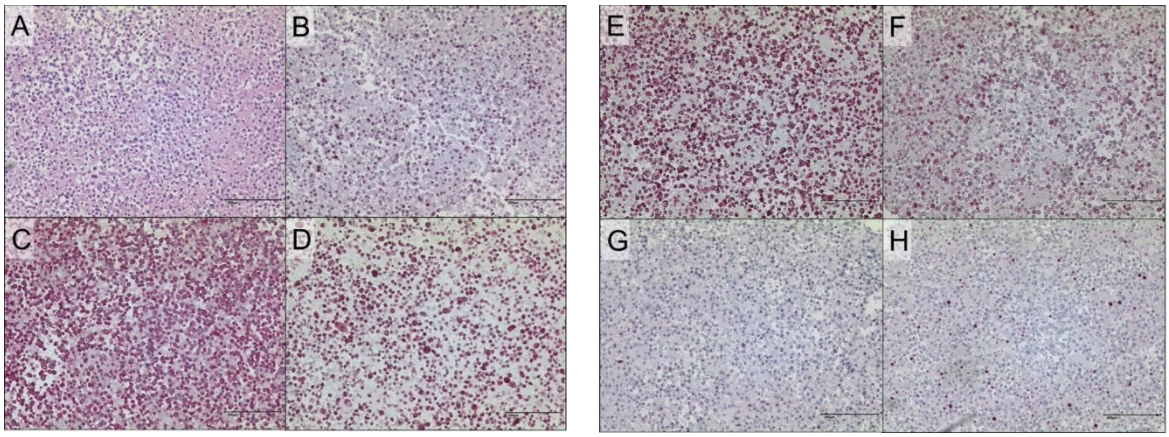


Abbildung 33: Immunzytochemie U-CH24

Dargestellt sind die immunzytochemischen Färbungen auf chordomspezifische Marker und Ki-67. HE (A), Brachyury (B), Vimentin (C), S100 (D), CK AE 1+3 (E), EMA (F), p53 (G), Ki-67 (H).

Die Wachstumskurve ergab eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 15,07 Tagen (Abb. 34 A). In qPCR-Analysen konnte eine im Vergleich zur Zelllinie U-CH1 geringere Expression von *TBXT* nachgewiesen werden. Die Expression entspricht somit ungefähr der Expression der Zelllinie U-CH2 (Abb. 34 B). Eine Mykoplasmen-DNA-PCR ergab keinen Nachweis einer Kontamination mit Mykoplasmen (Abb. 34 C).

Die durchgeführte STR-Analyse ergab eine Übereinstimmung mit dem STR-Profil des Patienten (Tab. 13).

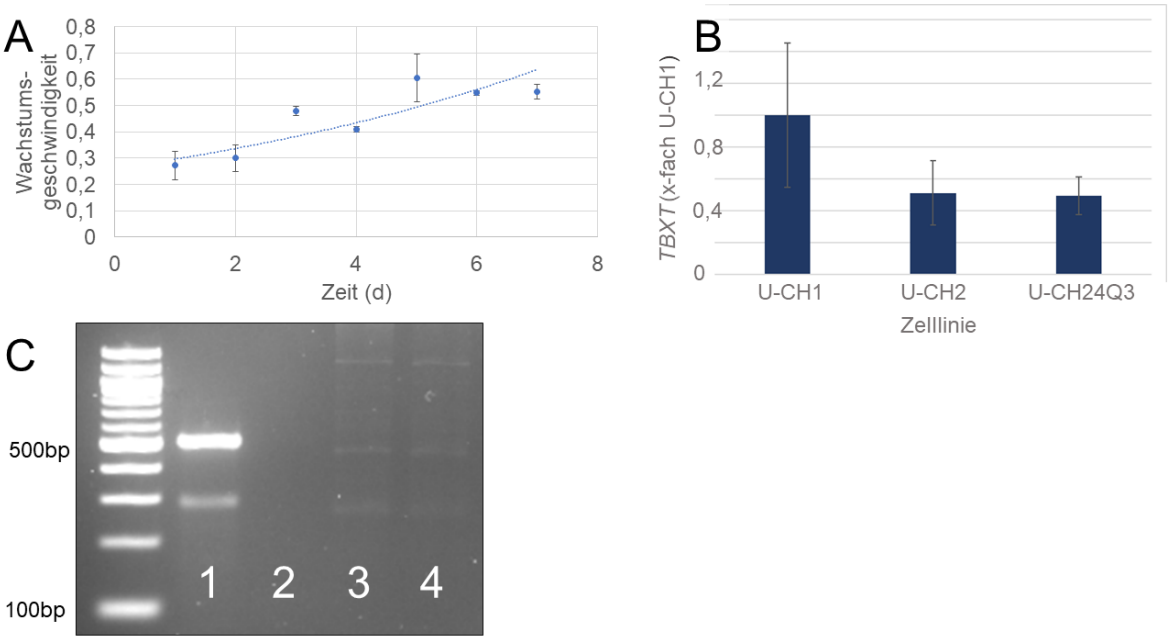


Abbildung 34: Wachstumskurve und TBXT-qPCR der Linie U-CH24

Dargestellt ist die Wachstumskurve der Linie U-CH24 (A). Die x-Achse gibt die Zeit (d) an, die y-Achse die beim MTS-Assay gemessene Absorption. In (B) wurde die qPCR auf Brachyury durchgeführt. Als Referenz wurden die Linien U-CH1 und U-CH2 verwendet. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung (n=3) an. In (C) ist die Gelelektrophorese nach PCR auf Mykoplasmen-DNA dargestellt; dabei ist in (1) die Positivkontrolle, in (2) die Negativkontrolle in (3) U-CH24 und in (4) U-CH7 als Referenz dargestellt.

Tabelle 13: STR-Analyse Linie U-CH24

Dargestellt sind die verschiedenen Marker der STR-Analyse. Die Marker der Linie U-CH24 sind identisch mit dem Referenzmaterial. Hierfür wurde DNA aus einer älteren Gewebsprobe des Patienten gewonnen und für den Herkunftsnachweis verwendet.

Marker	U-CH24	Vergleichsprobe
AMEL	X; Y	X; Y
D13S317	8	8
D7S820	8; 10	8; 10
D16S539	9; 13	13
Penta E	7; 14	7; 14
TH01	7; 9,3	7; 9,3
D18S51	309; 19	19
D3S1358	15; 17	15; 17
D8S1179	13; 14	13; 14
TPOX	11	11
CSF1PO	10; 13	10; 13
Penta D	10; 13	10;13

4 Diskussion

4.1 HOXB7-Versuche

HOX-Gene scheinen in Chordomen eine besondere Rolle einzunehmen. Zum einen sind sie ein wichtiger Bestandteil der Embryogenese und somit eng mit der Entwicklung der Chorda dorsalis verbunden, von deren Überbleibseln Chordome höchstwahrscheinlich abstammen [8, 54]. Zudem findet sich ebenso eine vermehrte *HOX*-Expression in den größeren, eine höhere Ki-67-Rate aufweisenden sakralen Chordomen, wie auch in rekurrenten Chordomen [35, 64]. Eine Inhibition der PBX/HOX Dimerisierung führt in Chordomzelllinien zur Apoptose. Deswegen ist deren Einordnung in die Signalwege und Regelkreise von Chordomen für das Verstehen der Pathomechanismen und für das Finden möglicher Therapieansätze von zentraler Bedeutung. Der hypothetische Signalweg HOXB7-MAPK-Brachyury wurde hierbei in dieser Arbeit untersucht, angelehnt an Ergebnisse aus Studien mit anderen Tumorentitäten und Zelllinien [9, 25, 37, 77].

4.1.1 *GFP*-Plasmid-Transfektionen und Transfektionseffizienz

Die Transfektion mit einem *GFP*-Plasmid dient als gute Möglichkeit, die Transfektionseffizienz einer Zelllinie zu bestimmen. Auch in diesen Versuchen konnte eine vorherige Transfektion mit einem *GFP*-Plasmid verwendet werden, um vor Transfektion anderer Expressionsvektoren die Transfektionseffizienz der Zelllinie grob abzuschätzen.

Es zeigte sich, dass Chordomzellen im Vergleich zu anderen oft genutzten Tumorzelllinien wie HEK293T schwer transfizierbar sind. Der Ausschluss von Zelllinien von weiteren Versuchen bei zu schlechter Effizienz, wie den Zelllinien U-CH2 und U-CH11R, schränkte die Auswahl der verwendeten Zelllinien und somit die Diversität der verschiedenen Zelllinien ein. Jedoch ist es gelungen, sowohl sakrale als auch clivale Chordome, Primarii als auch Rezidive zu verwenden, sodass von einer angemessenen Vielfalt an Chordomzelllinien gesprochen werden kann.

Eine zu geringe Transfektionseffizienz bei Versuchen limitierte jedoch auch die Aussagekraft nachfolgender Versuche, wie der *HOXB7*-Transfektion, da bei Proteinisolation und Immunoblot alle Zellen eines Versuchs betrachtet wurden, und nicht nur die erfolgreich transfizierten. Hier wäre eventuell eine Selektion der transfizierten Zellen zur alleinigen Betrachtung notwendig gewesen. Dies hätte sich allerdings

ebenfalls als komplex dargestellt, da Chordome als langsam wachsende Zellen stark auf Zell-Zell-Kontakte angewiesen sind. Somit würden stark selektierte Chordomzelllinien schlecht bis überhaupt nicht proliferieren.

Die zytotoxische Wirkung sowohl von transfizierter Fremd-DNA (in Form von Expressionsvektoren) und als auch durch das Transfektionsreagenz Lipofektamin verminderte nicht nur die Zahl der für weitere Versuche verwendeten Zellen, sondern waren zudem ein weiterer Faktor, der die Zellen beeinflusste. Um diesen Einfluss gering zu halten, wurde in folgenden Versuchen, wie der *HOXB7*-Transfektion, stets eine Transfektion mit einem Kontroll-Vektor oder -siRNA durchgeführt. Eine Variierung der Lipofektaminmenge und DNA-Menge brachte keine Veränderung für die Transfektionseffizienz. Für eine Steigerung der Transfektionseffizienz hätten auch andere Methoden verwendet werden können, wie Elektroporation oder anstatt einer Transfektion eventuell ein Crispr-Cas9-Versuch, was bei Chordomzelllinien bereits erfolgreich zur Anwendung kam [66]. Dies ist allerdings nur bei einzelnen Chordomzelllinien möglich, da hierfür eine Subklonierung nötig ist, die bei vielen Zelllinien nicht möglich ist.

Die Methode der PCI zur Steigerung der Transfektionseffizienz konnte ebenfalls nicht mehrfach eine Steigerung der Transfektionseffizienz erzeugen, obwohl sie bei mehreren, schwer zu transfizierenden Zellen eine Verbesserung beschrieben wurde. Gründe dafür könnten sein, dass Chordome sehr große Vakuolen besitzen und hierfür noch mehr Photosensitizer nötig gewesen wäre, was jedoch durch die toxische Wirkung eingeschränkt war. Zudem hätten weitere Photosensitizer ausgetestet werden können wie 3-THPP, ZnPc, oder AlPcS2a [4].

4.1.2 *HOXB7*-Plasmid Transfektion

Da die Transfektionseffizienz bei Transfektion eines *HOXB7*-Plasmides nur indirekt über Proteinisolation und Immunoblot getestet werden konnte, wurde vorab eine Transfektion mit *HOXB7*-Plasmiden zu verschieden Zeitpunkten durchgeführt. Anhand der gemessenen HOXB7-Menge konnte gezeigt werden, dass es zuerst zu einer Steigerung der HOXB7-Menge bis 20h nach Transfektion kam, und danach zu einer erneuten Reduktion. Deshalb konnte die optimale Zeit zur Bestimmung der Auswirkung von HOXB7 auf den MAPK-Weg ermittelt werden.

Zudem konnte per Immunoblot nur nachgewiesen werden, dass bei Transfektion ein Protein gebildet wurde, das von der Größe passend zu HOXB7 ist. Nicht nachgewiesen wurde jedoch, ob dieses Protein funktional war, beispielsweise eine Verbindung mit PBX eingehen konnte oder als Transkriptionsfaktor aktiv war.

Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass bei Transfektion eines markierten *HOXB7*-Plasmides sowohl die schwerere, markierte HOXB7-Bande im Immunoblot erscheint, als auch die leichtere, endogene HOXB7-Bande kräftiger war als in der Negativkontrolle. Hierauf wird in Kap. 4.1.5 genauer eingegangen.

Bei der Transfektion des *HOXB7*-Plasmides konnten bezüglich der HOXB7-Menge gegenüber der Negativkontrolle nicht in allen fünf Zelllinien signifikante Unterschiede erreicht werden, was dort die Aussagekraft den folgenden Untersuchungen einschränkte. Allerdings lag dies hauptsächlich an einer großen intrareplikateren Differenz der HOXB7-Mengen, da in jedem einzelnen Replikat eine deutliche Steigerung der HOXB7 Menge im Vergleich zur Negativkontrolle erreicht werden konnte, weshalb sämtliche Versuche dennoch als aussagekräftig bewertet wurden. Zudem zeigte sich eine starke Differenz der HOXB7-Menge zwischen den Zelllinien, weswegen die Ergebnisse auch unterschiedlich und für jede Zelllinie einzeln betrachtet wurden. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die verschiedenen Zelllinien eine unterschiedliche Transfektionsrate beziehungsweise Metabolismusrate aufweisen, oder in unterschiedlichem Maße endozytieren. Interessanterweise zeigt sich jedoch zwischen der transfizierten HOXB7 Menge und der scheinbaren Transfektionseffizienz bei *GFP*-Transfektion kein klarer Zusammenhang. Dies könnte möglicherweise auf zelluläre Autoregulation hinweisen, sodass *HOXB7* in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich verstärkt exprimiert wird.

Die gesteigerte Menge an HOXB7 führte bei allen Linien zu einer schwachen, jedoch meist nicht signifikanten Steigerung an pERK. Dies könnte einerseits bedeuten, dass HOXB7 in Chordomen nicht den MAPK-Weg reguliert, andererseits deuten vorherige Studien stark daraufhin, dass es diesen dennoch Zusammenhang geben könnte. Hierfür wäre möglicherweise eine höhere Anzahl an Versuchen von Nöten gewesen, um die bereits detektierte Tendenz zu bestätigen.

Mögliche weitere Limitationen dieser Versuchsreihe waren neben der geringen Transfektionseffizienz der Zelllinien auch die Überlegung, dass bereits eine geringe

Menge an HOXB7 zur maximalen Aktivierung des HOXB7-Weges führen könnte, weshalb sämtliche Mengen über diesem Level zu keiner stärkeren Aktivierung des MAPK-Weges mehr fähig waren. Dies würde bedeuten, dass bereits die endogene HOXB7-Menge ausreicht, die maximale Antwort auszulösen und eine Steigerung im Rahmen einer Transfektion keinen Unterschied machen würde. Um hierzu treffendere Aussagen tätigen zu können, wäre deshalb ein knockdown von *HOXB7* nötig gewesen, da hier die endogene Menge verringert werden würde. Erwartungsgemäß müsste hierbei eine Herunterregulierung des MAPK-Weges zu sehen sein.

Die fehlende Tendenz bei Brachyury könnte einerseits bedeuten, dass HOXB7 in Chordomen Brachyury nicht reguliert. Jedoch muss bedacht werden, dass Brachyury nicht ausschließlich von HOXB7, sondern von mehreren Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Zudem ist beschrieben, dass *TBXT* in Chordomen Super-Enhancer-assoziiert ist und Brachyury in Form von Autoregulation an die eigene Promotorregion binden kann [66]. Des Weiteren konnte bereits in Mausembryonen gezeigt werden, dass Brachyury über Interaktion mit p300 die H3K27-Acetylierung reguliert, eine Mutation in Brachyury zu einer verminderten Acetylierung unter anderem im T-Locus führt [3]. Dies könnte wiederum bedeuten, dass die mögliche Steigerung durch HOXB7 durch andere herunterregulierte Signalwege, wie der Brachyury Autoregulation, kompensiert wird. Ein isolierter Blick auf den Signalweg HOXB7-Brachyury wäre somit mit diesem Versuchsansatz nicht möglich gewesen.

Eine gesteigerte Viabilität bei HOXB7-Überexpression konnte nicht gezeigt werden, obwohl im Gegenzug bereits gezeigt werden konnte, dass die Inhibition des PBX/HOX-Dimers durch HXR9 eine Apoptose in Chordomzellen auslöst [64]. Dies könnte jedoch wieder die Hypothese stützen, dass die endogene HOXB7-Menge bereits ausreichend ist, die maximale Antwort auszulösen. Allerdings ergab sich aufgrund der Toxizität der Transfektion eine vermutlich allgemein verminderte Viabilität, weshalb die Aussagekraft dieses Versuches vermindert sein kann.

Somit kann gesagt werden, dass es noch weiterer Versuche bedarf, um eine fehlende Regulierung von Brachyury durch HOXB7 über den MAPK-Weg und eine fehlende Steigerung der Viabilität von Chordomzelllinien durch HOXB7 anzunehmen. Auch könnten weitere Versuche mit HOXB7 unternommen werden, da unter anderem in Plattenepithelkarzinomen ein knockdown von HOXB7 zu einer Induktion der Apoptose durch Inhibition des ß-Catenin/Wnt-Weges geführt hat [23]. Da es

Vermutungen gibt, dass dieser auch in Chordomen u.a. Brachyury reguliert, wäre dies ein weiterer Ansatz, die Regulierung von HOXB7 über einen Signalweg zu Brachyury zu untersuchen.

4.1.3 *HOXB7*-siRNA-Transfektion

Bei Interferenz mit *HOXB7*-siRNA im Vergleich zu einer Kontroll-siRNA konnte keine Reduktion der HOXB7-Menge in Chordomzelllinien erreicht werden, obwohl dies zum Beispiel bei Plattenepithelkarzinomzellen bereits gezeigt werden konnte [23]. Eine mögliche Ursache könnte die schlechte Transfektionseffizienz in Chordomzellen sein, die es unmöglich macht, im Immunoblot bei bereits geringen endogenen Mengen von HOXB7 eine Reduktion zu detektieren. Ein Grund hierfür wäre, dass bei Proteinisolation wie bereits beschrieben, sämtliche Zellen betrachtet werden, und nicht nur diese, in denen die siRNA-Interferenz geglückt ist. Zudem ergibt sich die Hypothese einer HOXB7-Autoregulation in Chordomen, die im Folgenden noch genauer beschrieben werden soll.

Die Reduktion der HOXB7-Menge bei gleichzeitiger Plasmidtransfektion zeigte bei allen Linien, mit Ausnahme der Linie U-CH7, eine Signifikanz im Vergleich zur reinen Plasmidtransfektion. Dass es hingegen keine Tendenz in der Veränderung der ERK-Phosphorylierung gab, lässt sich entweder damit erklären, dass HOXB7 die Phosphorylierung von ERK und somit des MAPK-Weges in Chordomzelllinien nicht kontrolliert oder dass HOXB7 den MAPK-Weg in verschiedenen Zelllinien bzw. Chordomen unterschiedlich reguliert. Eine weitere Ursache könnte gewesen sein, da auch bei keinem Versuch das endogene Ausgangsniveau von HOXB7 erreicht wurde, dass bereits geringe Mengen an HOXB7 ausreichen, die maximale Antwort des MAPK-Weges auszulösen. Auch hier wären suffizientere Methoden zur Herunterregulierung von HOXB7 nötig.

4.1.4 *HOXA7*-Knockdown Versuche

Da nicht nur *HOXB7* sondern auch andere *HOX*-Gene in Chordomen exprimiert werden und einige auch in sakralen Chordomen im Vergleich zu clivalen eine Hochregulierung aufweisen [34], kann von einer besonderen Rolle der HOX-Gene in der Pathogenese der Chordome ausgegangen werden. Auch ihre Bedeutung in der Embryogenese und der vermutlich notochordale Ursprung der Chordome weisen auf eine mögliche Verbindung hin. Deswegen sollten auch andere HOX-Proteine auf ihre Regulationsmechanismen in Chordomen untersucht werden. Aufgrund der

paralogen *HOX*-Cluster und der Strukturähnlichkeit ist bei Untersuchung der Funktion von *HOXB7* auch *HOXA7* relevant, da *HOXA7* und *HOXB7* aufgrund sich ähnelnder Struktur überlappende Funktionen aufweisen [13].

In dieser Arbeit wurde ein Versuch gestartet, HOXA7 und HOXB7 gleichzeitig mittels siRNA-Interferenz herunterzuregulieren. Allerdings konnte auch hier kein Erfolg im Sinne einer Herunterregulierung im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden, weswegen die Verwendung eines HOXA7-Plasmides für Überexpressionsversuche, gleichsam der oben aufgeführten HOXB7-Plamsid-Versuchsreihe ein nächster Schritt sein könnte. Diese erbrachten die höchste Differenz der HOXB7-Menge zwischen Versuch und Kontrolle und könnten somit auch bei der Untersuchung von HOXA7 mehr Aussagekraft liefern. Auch hier könnten, bei Verdacht einer Autoregulierung von HOXA7 Methoden wie CRISPR-Cas9 angewendet werden, wie bereits mit Brachyury durchgeführt [66]. In Keratinozyten konnte mit Phorbolester eine Abnahme von HOXA7, sowie auch HOXB7 und HOXB4 erzielt werden [44].

4.1.5 HOXB7 Autoregulation

Wie bereits zuvor aufgeführt, zeigten sich zwei Besonderheiten bei Transfektion, die die Regulation der Expression von *HOXB7*-zum Ziel hatten. Einerseits führte eine Transfektion eines HOXB7-Expressionsvektors nicht nur zu einer Translation eines getaggten und somit schwereren HOXB7-Proteins, sondern auch zur Erhöhung der endogenen HOXB7-Menge. Anderseits konnte eine Reduktion von der endogenen HOXB7-Menge mittels siRNA nicht erreicht werden, außer es fand eine gleichzeitige Transfektion mit einem *HOXB7*-Plasmid statt. Bei letzterem konnte gezeigt werden, dass bei Interferenz mit *HOXB7*-siRNA sowohl die endogene als auch die getaggte, transfizierte HOXB7-Menge reduziert wird. Somit war die siRNA auch für endogene HOXB7-Transkripte suffizient, aber nicht über das Ausgangsniveau heraus. Eine siRNA-vermittelte Reduktion bei gleichzeitiger Überexpression durch einen HOXB7-Expressionsvektor erreichte zudem nie das Ausgangsniveau ohne Transfektion.

Diese Beobachtungen ergaben die Vermutung, dass es eine Autoregulation von *HOXB7* in Chordomen geben könnte, die einerseits bei Überexpression von exogenem *HOXB7* auch zu einer Steigerung der endogenen *HOXB7*-Expression führt, jedoch anderseits verhindert, dass eine gewisse Baseline-expression an *HOXB7* nicht unterschritten wird. Hierfür könnten weitere Versuche durchgeführt werden,

wie die Untersuchung der Promotorregion von *HOXB7* auf mögliche HOXB7-Bindungstellen, beispielsweise in Form eines Mobility shift binding assays, wie es für HOXB7 schon in Melanomen gemacht wurde [9]. Auch könnte mittels qPCR-Analysen die mRNA-Mengen der endogenen *HOXB7* Trankskripte nach Plasmidtransfektion im Vergleich zur Negativkontrolle durchgeführt wird.

4.1.6 Weitere Optionen zur Analyse des HOXB7 Signalwegs

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass HOXB7 in Chordomen den MAPK-Signalweg und Brachyury nicht reguliert. Dennoch müssen diese Ergebnisse weiter validiert werden, um die Möglichkeit der HOXB7-vermittelten Regulation von Brachyury definitiv auszuschließen.

Mit einem Crispr-Cas9-Versuchsansatz wäre es zum Beispiel möglich, die Expression des *HOXB7*-Gens komplett auszuschalten, allerdings ist die Selektion von den meisten Chordomlinien erschwert, da diese oft langsam wachsen und auf Zell-Zell-Kontakte angewiesen sind. In den Zelllinien UM-Chor1 und MUG-Chor1 konnte die Technik für *TBXT*-sgRNA erfolgreich angewendet werden, was die Vermutung nahelegt, dass es zumindest in diesen Ziellinien auch möglich wäre, die Expression von HOXB7 via Crispr-Cas9 vollständig zu stoppen [66]. Auch könnte man schneller proliferierende Zelllinien, wie die Linie U-CH22, bei der eine Klon Selektion bereits möglich war, für diese Methode verwenden. Bei einem solchen kompletten knockdown wäre auch eine Autoregulation als mögliches Bias ausgeschlossen.

Auch wäre das Verwenden von shRNA oder anderen Interferenzen denkbar. Zudem könnte auch in Chordomen mithilfe eines Mobility shift Assays untersucht werden, bei welchen Genen HOXB7 als Transkriptionspartner agiert, wie dies unter anderem in Melanomen erfolgreich durchgeführt wurde [9].

4.2 Etablierung von Zelllinien

Die Analyse von Zelllinien stellt eine bedeutsame Methode zur Erschließung neuer Therapiemöglichkeiten und zur Erweiterung des Verstehens von Regulationsmechanismen dar. Vor allem bei Chordomen, als sehr seltene Tumoren sind klinische Studien oft erschwert, oder mit geringen Fallzahlen belegt. Die Linie U-CH1, als erste etablierte Chordomlinie wurde bereits in vielen Studien als Modell verwendet [39, 78]. Bei Chordomen gibt es viele verschiedene Entitäten, beispielsweise bezüglich der Lokalisation, wie sakral, clival oder extraaxial, oder bezüglich der

histologischen Klassifikation, wie NOS, schwach differenziert, dedifferenziert. Ebenso unterschieden sich einzelne Chordome diesen Untergruppierungen voneinander in Morphologie, Wachstumsverhalten und Expressionsmuster. Daher ist es sinnvoll, eine große Bandbreite an Chordomzelllinien verschiedener Entitäten für Forschungszwecke zur Verfügung zu haben.

4.2.1 U-CH22

Die Linie U-CH22 erfüllt alle Kriterien zur Etablierung einer neuen Zelllinie. Sie zeigt in der immunzytochemischen Färbung die typischen Marker eines Chordoms und bietet darüber hinaus bei Ursprung aus einem zellreichen Pleuraerguss bei bereits mehrfach metastasiertem, sakralem Chordom ein interessantes Modell mit besonderer Herkunft. Pleuraergüsse sind bei Metastasierung in Chordomen sehr selten, stehen aber in Zusammenhang mit einer großen Mortalität. Erst 2021 wurde der erste Fallbericht eines Pleuraergusses bei metastasiertem Chordom publiziert [70]. Für das Verständnis des Metastasierungsvorganges bei Chordomen, vor allem hinsichtlich pleuraler Metastasierung und Verlust der Adhäsion, wie z.B. bei Klon B dargestellt, könnte sie als Modell dienen.

Bei Beginn der Kultivierung wurde vermutet, dass es sich bei der Linie U-CH22 um eine Linie mit nur partieller Brachyurypositivität handeln könne. Dies hat sich im Verlauf nicht bestätigt. Tatsächlich weist sie im Vergleich zur Linie U-CH1 eine höhere Expression von *TBXT* auf. Da sie jedoch ähnlich der Expression einer weiteren Metastase, U-CH17M, ist, wäre es interessant zu untersuchen, ob dies bei Metastasen im Vergleich zu Rezidiven, wie der Linie U-CH1 oder Primarii, wie der Linie U-CH7, eine grundsätzliche Tendenz ist und woran dies liegen könnte.

Mit einer Ki-67 Rate von 90% liegt sie weit über dem Median von Chordomen bei 5% [76] und stellt auch in dieser Hinsicht eine Rarität dar. Die Klone geben den Hinweis, dass sich, wie auch in der Linie U-CH17P, innerhalb des Pleuraergusses Subklone gebildet haben, die in diesem Fall eine unterschiedliche Morphologie aufweisen [35].

Für die Forschung bietet die Linie zudem den Vorteil einer schnellen Proliferation mit der Verdopplungszeit von 1,76 Tagen und einer hohen Robustheit in Kultur. Da bei GFP-Transfektion die Linie U-CH22 eine für Chordomzelllinien gute

Transfektionseffizienz aufweist, könnte sie auch für Transfektionsversuche verwendet werden.

4.2.2 U-CH24 Q3

Die Linie U-CH24 Q3 erfüllt alle notwendigen Kriterien einer neuen Zelllinie. Sakrale Chordome bilden eine große Gruppe der Chordome ab [47]. Die Zelllinie U-CH24 Q3 stellt somit ein Modell eines klassischen Chordoms (NOS) mit vergleichsweise großer Häufigkeit dar. Die immunzytochemischen Marker entsprechen denen eines Chordoms.

Da sie alle Kriterien zur Etablierung einer neuen Zelllinie erfüllt, kann sie in Zukunft für die Forschung, wie der Grundlagenforschung von Regulationsmechanismen in Chordomen, oder für Therapiemöglichkeiten verwendet werden. Zudem bietet jede etablierte Linie für den Patienten, von dem sie stammt, die Chance, bei Rezidiv als *in vitro* Modell für Therapiemöglichkeiten zu dienen.

Da noch Proben aus weiteren Quadranten des Tumors und im Verlauf eine Probe aus einer Biopsie bei neu entwickelten Lebermetastasen kultiviert wurden, kann bei Etablierung von Ziellinien aus diesen Proben einerseits ein Vergleich der verschiedenen Zelllinien aus demselben Patienten erfolgen, wie es bei der Linie U-CH17P erfolgt ist [35].

5 Zusammenfassung

Chordome sind Tumoren, die wahrscheinlich aus Überbleibseln der Chorda dorsalis entstehen und mit einer Inzidenz von 0,08/100 000 Einwohnern zu den sogenannten „Orphan diseases“ zählen.

Da der momentane Goldstandard der Therapie, die en bloc-Resektion, mit einer hohen Komplikationsrate und häufigen Rezidiven vergesellschaftet ist, stellt die weitere Erschließung neuer Therapieansätze ein wichtiges Ziel dar, um Patienten mit Chordomen in Zukunft suffizienter behandeln zu können. Dafür hat nicht zuletzt das Verstehen von Regulationsmechanismen in diesen Tumoren höchste Priorität, da Regulatoren wie Transkriptionsfaktoren, Translationsregulatoren oder Signalwege Angriffspunkte in der Therapie darstellen können.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob HOXB7 als Transkriptionsfaktor den MAPK-Signalweg und in der Folge die *TBXT*-Expression reguliert, wie es bei anderen Tumoren bereits gezeigt wurde. Erste Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit konnten eine solche Hypothese jedoch nicht stützen. Allerdings ist es denkbar, dass weitere, komplexere Versuche nötig sind, die Regulierung von Brachyury über den MAPK-Signalweg durch HOXB7 final nachzuweisen. Da es bei *HOXB7*-Transfektionsversuchen zudem Hinweise gab, dass sich HOXB7 in Chordomen möglicherweise selbst regulieren könnte, konnte für das Fehlen des zu erwartenden Ergebnisses nicht nur eine Erklärung, sondern gleichauf eine Basis für neue Forschungsansätze geschaffen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Etablierung zweier sich voneinander stark unterscheidenden Zelllinien beschrieben. Aufgrund der Seltenheit von Chordomen, wie auch ihres langsamen Wachstums ist die Arbeit mit Zelllinien in der Chordomforschung eine unverzichtbare Methode. Die Zelllinie U-CH24 Q3 mit Ursprung eines sakralen Chordomes stellt ein Modell eines klassischen, häufig vorkommenden Chordomes dar. Die Linie U-CH22 hingegen stellt aufgrund ihres Ursprungs aus einem Pleuraerguss eine Rarität dar. Der Vergleich bereits dieser beiden Linien zeigt die große Diversität unter Chordomen und rechtfertigt das Etablieren neuer Zelllinien, um bei Versuchen aus einem großen Spektrum wählen zu können.

6 Literaturverzeichnis

1. Babic MS (2002) Development of the notochord in normal and malformed human embryos and fetuses. Int J Dev Biol 35:345–352. doi: 10.1387/ijdb.1726049

2. Barth TFE, von Witzleben A, Möller P, Scheil-Bertram S (2018) Notochordale Tumoren. Pathologe 39:117–124. doi: 10.1007/s00292-017-0399-1

3. Beisaw A, Tsaytler P, Koch F, Schmitz SU, Melissari M, Senft AD, Wittler L, Pennimpede T, Macura K, Herrmann BG, Grote P (2018) BRACHYURY directs histone acetylation to target loci during mesoderm development. EMBO Reports 19:118–134. doi: 10.15252/embr.201744201

4. Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Tjelle TE, Sandvig K, Moan J, Gaudernack G, Fodstad Ø, Kjølsrud S, Anholt H, Rodal GH, Rodal SK, Høgset A Photochemical Internalization: A Novel Technology for Delivery of Macromolecules into Cytosol. 5

5. Berg K, Weyergang A, Prasmickaite L, Bonsted A, Høgset A, Strand M-TR, Wagner E, Selbo PK (2010) Photochemical Internalization (PCI): A Technology for Drug Delivery. In: Gomer CJ (ed) Photodynamic Therapy: Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp 133–145

6. Bollag RJ, Siegfried Z, Cebra-Thomas JA, Garvey N, Davison EM, Silver LM (1994) An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus. Nat Genet 7:383–389. doi: 10.1038/ng0794-383

7. Boriani S, Bandiera S, Biagini R, Bacchini P, Boriani L, Cappuccio M, Chevalley F, Gasbarrini A, Picci P, Weinstein JN (2006) Chordoma of the Mobile Spine: Fifty Years of Experience. Spine 31:493–503. doi: 10.1097/01.brs.0000200038.30869.27

8. Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C (1995) Hox genes and the evolution of vertebrate axial morphology. Development 121:333–346. doi: 10.1242/dev.121.2.333

9. Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP (1996) HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. Mol Cell Biol 16:4842–4851. doi: 10.1128/MCB.16.9.4842

10. Casey ES, O'Reilly MA, Conlon FL, Smith JC (1998) The T-box transcription factor Brachyury regulates expression of eFGF through binding to a non-palindromic response element. Development 125:3887–3894. doi: 10.1242/dev.125.19.3887

11. Chambers KJ, Lin DT, Meier J, Remenschneider A, Herr M, Gray ST (2014) Incidence and survival patterns of cranial chordoma in the United States: Survival Outcomes Cranial Chordoma. The Laryngoscope 124:1097–1102. doi: 10.1002/lary.24420

12. Chang CP, Shen WF, Rozenfeld S, Lawrence HJ, Largman C, Cleary ML (1995) Pbx proteins display hexapeptide-dependent cooperative DNA binding with a subset of Hox proteins. Genes Dev 9:663–674. doi: 10.1101/gad.9.6.663

13. Chen F, Greer J, Capecchi MR (1998) Analysis of Hoxa7/Hoxb7 mutants suggests periodicity in the generation of the different sets of vertebrae. Mech Dev 77:49–57. doi: 10.1016/s0925-4773(98)00126-9

14. Chesley P (1935) Development of the short-tailed mutant in the house mouse. Journal of Experimental Zoology 70:429–459. doi: 10.1002/jez.1400700306

15. Choi GH, Yang M-S, Yoon DH, Shin HC, Kim KN, Yi S, Lee DY, Ahn PG, Ha Y (2010) Pediatric cervical chordoma: report of two cases and a review of the current literature. Childs Nerv Syst 26:835–840. doi: 10.1007/s00381-009-1076-3

16. Choi K-S, Cohn MJ, Harfe BD (2008) Identification of nucleus pulposus precursor cells and notochordal remnants in the mouse: Implications for disk degeneration and chordoma formation. Dev Dyn 237:3953–3958. doi: 10.1002/dvdy.21805

17. Cunliffe V, Smith JC (1992) Ectopic mesoderm formation in Xenopus embryos caused by widespread expression of a Brachyury homologue. Nature 358:427–430. doi: 10.1038/358427a0

18. DeComas AM, Penfornis P, Harris MR, Meyer MS, Pochampally RR (2010) Derivation and Characterization of an Extra-Axial Chordoma Cell Line (EACH-1) from a Scapular Tumor. J Bone Joint Surg Am 92:1231–1240. doi: 10.2106/JBJS.I.00594

19. Dorfman HD, Czerniak B (1995) Bone cancers. Cancer 75:203–210. doi: 10.1002/1097-0142(19950101)75:1+<203::aid-cncr2820751308>3.0.co;2-v

20. Duboule D, Dollé P (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of Drosophila homeotic genes. The EMBO Journal 8:1497–1505. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb03534.x

21. Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C (2010) The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. J Clin Invest 120:533–544. doi: 10.1172/JCI38379

22. Fleming GF, Heimann PS, Stephens JK, Simon MA, Ferguson MK, Benjamin RS, Samuels BL (1993) Dedifferentiated chordoma. Response to aggressive chemotherapy in two cases. Cancer 72:714–718. doi: 10.1002/1097-0142(19930801)72:3<714::aid-cncr2820720314>3.0.co;2-1

23. Gao D, Chen H-Q (2018) Specific knockdown of *HOXB7* inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell migration and invasion while inducing apoptosis via the Wnt/β-catenin signaling pathway. American Journal of Physiology-Cell Physiology 315:C675–C686. doi: 10.1152/ajpcell.00291.2017

24. Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R (1989) The murine and Drosophila homeobox gene complexes have common features of organization and expression. Cell 57:367–378. doi: 10.1016/0092-8674(89)90912-4

25. Heinonen H, Lepikhova T, Sahu B, Pehkonen H, Wei G-H, Hautaniemi S, Ja OA (2015) Identification of several potential chromatin binding sites of HOXB7 and its downstream target genes in breast cancer. Cancer Genetics 10

26. Hindi N, Casali PG, Morosi C, Messina A, Palassini E, Pilotti S, Tamborini E, Radaelli S, Gronchi A, Stacchiotti S (2015) Imatinib in advanced chordoma: A retrospective case series analysis. European Journal of Cancer 51:2609–2614. doi: 10.1016/j.ejca.2015.07.038

27. Hof H, Welzel T, Debus J (2006) Effectiveness of Cetuximab/Gefitinib in the Therapy of a Sacral Chordoma. ORT 29:572–574. doi: 10.1159/000096283

28. Holley C, Breining T, Scheithauer M, Möller P, Barth TFE (2021) Primäres extraaxiales chondroides Chordom des anterioren Nasenseptums: Fallbericht eines seltenen Chordoms mit Literaturübersicht. HNO 69:221–228. doi: 10.1007/s00106-020-00957-3

29. Houessinon A, Boone M, Constans J-M, Toussaint P, Chauffert B (2015) Sustained Response of a Clivus Chordoma to Erlotinib after Imatinib Failure. CRO 8:25–29. doi: 10.1159/000371843

30. 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, Quiñones-Hinojosa A (2011) Generation of chordoma cell line JHC7 and the identification of Brachyury as a novel molecular target. J Neurosurg 115:760–769. doi: 10.3171/2011.5.JNS11185

31. Hu Y, Feng X, Mintz A, Petty WJ, Hsu W (2016) Regulation of brachyury by fibroblast growth factor receptor 1 in lung cancer. Oncotarget 7:87124–87135. doi: 10.18632/oncotarget.13547

32. Hu Y, Mintz A, Shah SR, Quinones-Hinojosa A, Hsu W (2014) The FGFR/MEK/ERK/brachyury pathway is critical for chordoma cell growth and survival. Carcinogenesis 35:1491–1499. doi: 10.1093/carcin/bgu014

33. Imai R, Kamada T, Sugahara S, Tsuji H, Tsujii H (2011) Carbon ion radiotherapy for sacral chordoma. Br J Radiol 84:S048–S054. doi: 10.1259/bjr/13783281

34. Jäger D, Barth TFE, Brüderlein S, Scheuerle A, Rinner B, von Witzleben A, Lechel A, Meyer P, Mayer-Steinacker R, Baer A von, Schultheiss M, Wirtz CR, Möller P, Mellert K (2017) HOXA7, HOXA9, and HOXA10 are differentially expressed in clival and sacral chordomas. Sci Rep 7:2032. doi: 10.1038/s41598-017-02174-5

35. Jäger D, Lechel A, Tharehalli U, Seeling C, Möller P, Barth TFE, Mellert K (2018) U-CH17P, -M and -S, a new cell culture system for tumor diversity and

progression in chordoma. International Journal of Cancer 142:1369–1378. doi: https://doi.org/10.1002/ijc.31161

36. Jambhekar NA, Rekhi B, Thorat K, Dikshit R, Agrawal M, Puri A (2010) Revisiting Chordoma With Brachyury, a '"New Age"' Marker. Arch Pathol Lab Med 134:7

37. Jin K, Kong X, Shah T, Penet M-F, Wildes F, Sgroi DC, Ma X-J, Huang Y, Kallioniemi A, Landberg G, Bieche I, Wu X, Lobie PE, Davidson NE, Bhujwalla ZM, Zhu T, Sukumar S (2012) The HOXB7 protein renders breast cancer cells resistant to tamoxifen through activation of the EGFR pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 109:2736–2741. doi: 10.1073/pnas.1018859108

38. Kaiser TE, Pritchard DJ, Unni KK (1984) Clinicopathologic study of sacrococcygeal chordoma. Cancer 53:2574–2578. doi: 10.1002/1097-0142(19840601)53:11<2574::AID-CNCR2820531136>3.0.CO;2-5

39. Kato TA, Tsuda A, Uesaka M, Fujimori A, Kamada T, Tsujii H, Okayasu R (2011) In vitro characterization of cells derived from chordoma cell line U-CH1 following treatment with X-rays, heavy ions and chemotherapeutic drugs. Radiat Oncol 6:116. doi: 10.1186/1748-717X-6-116

40. Kessel M, Gruss P (1991) Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of Hox codes induced by retinoic acid. Cell 67:89–104. doi: 10.1016/0092-8674(91)90574-I

41. Kispert A, Herrmann BG The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. 10

42. Kispert A, Koschorz B, Herrmann BG (1995) The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. The EMBO Journal 14:4763–4772. doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00158.x

43. Krumlauf R (1994) Hox genes in vertebrate development. Cell 78:191–201. doi: 10.1016/0092-8674(94)90290-9

44. La Celle PT, Polakowska RR (2001) Human homeobox HOXA7 regulates keratinocyte transglutaminase type 1 and inhibits differentiation. J Biol Chem 276:32844–32853. doi: 10.1074/jbc.m104598200

45. Mansfield JH, Harfe BD, Nissen R, Obenauer J, Srineel J, Chaudhuri A, Farzan-Kashani R, Zuker M, Pasquinelli AE, Ruvkun G, Sharp PA, Tabin CJ, McManus MT (2004) MicroRNA-responsive "sensor" transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. Nat Genet 36:1079–1083. doi: 10.1038/ng1421

46. McGlinn E, Yekta S, Mansfield JH, Soutschek J, Bartel DP, Tabin CJ (2009) In ovo application of antagomiRs indicates a role for miR-196 in patterning the chick axial skeleton through Hox gene regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences 106:18610–18615. doi: 10.1073/pnas.0910374106

47. McMaster ML, Goldstein AM, Bromley CM, Ishibe N, Parry DM (2001) Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995. Cancer Causes Control 12:1–11. doi: 10.1023/a:1008947301735

48. Mehnert F, Beschorner R, Kuker W, Hahn U, Nagele T (2004) Retroclival Ecchordosis Physaliphora: MR Imaging and Review of the Literature

49. Miettinen M, Wang Z, Lasota J, Heery C, Schlom J, Palena C (2015) 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. doi: 10.1097/PAS.0000000000000462

50. Morgan R, Pirard PM, Shears L, Sohal J, Pettengell R, Pandha HS (2007) Antagonism of HOX/PBX Dimer Formation Blocks the *In vivo* Proliferation of Melanoma. Cancer Res 67:5806–5813. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4231

51. Müller H (1858) Über das Vorkommen von Resten der Chorda dorsalis bei Menschen nach der Geburt und über ihr Verh ältniss zu den Gallertgeschwülsten am Clivus. Zeitung Für Rationelle Medizin, vol.2.p202

52. Munzenrider JE, Liebsch NJ (1999) Proton therapy for tumors of the skull base. Strahlenther Onkol 175:57–63. doi: 10.1007/BF03038890

53. Nelson AC, Pillay N, Henderson S, Presneau N, Tirabosco R, Halai D, Berisha F, Flicek P, Stemple DL, Stern CD, Wardle FC, Flanagan AM (2012) An integrated functional genomics approach identifies the regulatory network directed by brachyury (*T*) in chordoma: Gene targets of brachyury (*T*) in chordoma. J Pathol 228:274–285. doi: 10.1002/path.4082

54. Nibu Y, José-Edwards DS, Di Gregorio A (2013) From Notochord Formation to Hereditary Chordoma: The Many Roles of Brachyury. BioMed Research International 2013:e826435. doi: 10.1155/2013/826435

55. Park DM, Zhuang Z, Chen L, Szerlip N, Maric I, Li J, Sohn T, Kim SH, Lubensky IA, Vortmeyer AO, Rodgers GP, Oldfield EH, Lonser RR (2007) von Hippel-Lindau Disease-Associated Hemangioblastomas Are Derived from Embryologic Multipotent Cells. PLoS Med 4:e60. doi: 10.1371/journal.pmed.0040060

56. Pennimpede T, Proske J, König A, Vidigal JA, Morkel M, Bramsen JB, Herrmann BG, Wittler L (2012) In vivo knockdown of Brachyury results in skeletal defects and urorectal malformations resembling caudal regression syndrome. Developmental Biology 372:55–67. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.09.003

57. Pillay N, Plagnol V, Tarpey PS, Lobo SB, Presneau N, Szuhai K, Halai D, Berisha F, Cannon SR, Mead S, Kasperaviciute D, Palmen J, Talmud PJ, Kindblom L-G, Amary MF, Tirabosco R, Flanagan AM (2012) A common single-nucleotide variant in T is strongly associated with chordoma. Nature Genetics 44:1185–1187. doi: 10.1038/ng.2419

58. Presneau N, Shalaby A, Idowu B, Gikas P, Cannon SR, Gout I, Diss T, Tirabosco R, Flanagan AM (2009) Potential therapeutic targets for chordoma:

PI3K/AKT/TSC1/TSC2/mTOR pathway. Br J Cancer 100:1406–1414. doi: 10.1038/sj.bjc.6605019

59. 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 (2011) Role of the transcription factor T (brachyury) in the pathogenesis of sporadic chordoma: a genetic and functional-based study. The Journal of Pathology 223:327–335. doi: https://doi.org/10.1002/path.2816

60. Ribbert H (1894) Über die Ecchondrosis Physalifora Sphenooccipitalis. Zentralblatt Fur Allgemeine Pathologie und Pathologische ¨ Anatomie, vol. 5, pp. 457–461

61. Salisbury JR, Deverell MH, Cookson MJ, Whimster WF (1993) Three-dimensional reconstruction of human embryonic notochords: Clue to the pathogenesis of chordoma. The Journal of Pathology 171:59–62. doi: 10.1002/path.1711710112

62. Saunders WM, Chen GT, Austin-Seymour M, Castro JR, Collier JM, Gauger G, Gutin P, Phillips TL, Pitluck S, Walton RE (1985) Precision, high dose radiotherapy. II. Helium ion treatment of tumors adjacent to critical central nervous system structures. Int J Radiat Oncol Biol Phys 11:1339–1347. doi: 10.1016/0360-3016(85)90250-0

63. Scheil S, Brüderlein S, Liehr T, Starke H, Herms J, Schulte M, Möller P (2001) Genome-wide analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1. Genes, Chromosomes and Cancer 32:203–211. doi: https://doi.org/10.1002/gcc.1184

64. Seeling C, Lechel A, Svinarenko M, Möller P, Barth TFE, Mellert K (2021) Molecular features and vulnerabilities of recurrent chordomas. J Exp Clin Cancer Res 40:244. doi: 10.1186/s13046-021-02037-y

65. Shalaby AA, Presneau N, Idowu BD, Thompson L, Briggs TR, Tirabosco R, Diss TC, Flanagan AM (2009) Analysis of the fibroblastic growth factor receptor-RAS/RAF/MEK/ERK-ETS2/brachyury signalling pathway in chordomas. Mod Pathol 22:996–1005. doi: 10.1038/modpathol.2009.63

66. Sharifnia T, Wawer MJ, Chen T, Huang Q-Y, Weir BA, Sizemore A, Lawlor MA, Goodale A, Cowley GS, Vazquez F, Ott CJ, Francis JM, Sassi S, Cogswell P, Sheppard HE, Zhang T, Gray NS, Clarke PA, Blagg J, Workman P, Sommer J, Hornicek F, Root DE, Hahn WC, Bradner JE, Wong KK, Clemons PA, Lin CY, Kotz JD, Schreiber SL (2019) Small-molecule targeting of brachyury transcription factor addiction in chordoma. Nat Med 25:292–300. doi: 10.1038/s41591-018-0312-3

67. Stacchiotti S, Casali PG, Lo Vullo S, Mariani L, Palassini E, Mercuri M, Alberghini M, Pilotti S, Zanella L, Gronchi A, Picci P (2010) 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. doi: 10.1245/s10434-009-0740-x

68. Stacchiotti S, Marrari A, Tamborini E, Palassini E, Virdis E, Messina A, Crippa F, Morosi C, Gronchi A, Pilotti S, Casali PG (2009) Response to imatinib plus sirolimus in advanced chordoma. Annals of Oncology 20:1886–1894. doi: 10.1093/annonc/mdp210

69. Summerton JE (2005) Endo-Porter: A Novel Reagent for Safe, Effective Delivery of Substances into Cells. Annals of the New York Academy of Sciences 1058:62–75. doi: 10.1196/annals.1359.012

70. Tamba-Sakaguchi M, Oshiro H, Mato N, Kikkawa I, Endo T, Yanagita M, Suzuki T, Akimoto M, Okabe N, Hiruta M, Ikeda E, Fukushima N Cytological detection of metastatic chordoma cells in pleural effusions: A case report. Diagnostic Cytopathology n/a. doi: 10.1002/dc.24832

71. 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 (2006) Molecular and Biochemical Analyses of Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) B, PDGFRA, and KIT Receptors in Chordomas. Clinical Cancer Research 12:6920–6928. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1584

72. Tirabosco R, Mangham DC, Rosenberg AE, Vujovic S, Bousdras K, Pizzolitto S, Maglio GD, Bakker MAD, Francesco LD, Kalil RK, Athanasou NA, O'Donnell P, McCarthy EF, Flanagan AM (2008) Brachyury expression in extra-axial skeletal and soft tissue chordomas: A marker that distinguishes chordoma from mixed tumor/myoepithelioma/parachordoma in soft tissue. The American journal of surgical pathology 32:572–580. doi: 10.1097/PAS.0b013e31815b693a

73. Virchow RLK (1857) Untersuchungen über die Entwickelung des Schädelgrundes im gesunden und krankhaften Zustand und über den Einfluss derselben auf Schädelform,Gesichtsbildung und Gehirnbau. Berlin, Deutschland

74. Vujovic S, Henderson S, Presneau N, Odell E, Jacques T, Tirabosco R, Boshoff C, Flanagan A (2006) Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. The Journal of Pathology 209:157–165. doi: 10.1002/path.1969

75. Wang K, Wu Z, Tian K, Wang L, Hao S, Zhang L, Zhang J (2015) Familial chordoma: A case report and review of the literature. Oncology Letters 10:2937–2940. doi: 10.3892/ol.2015.3687

76. von Witzleben A, Goerttler LT, Lennerz J, Weissinger S, Kornmann M, Mayer-Steinacker R, von Baer A, Schultheiss M, Möller P, Barth TFE (2016) In chordoma, metastasis, recurrences, Ki-67 index, and a matrix-poor phenotype are associated with patients' shorter overall survival. Eur Spine J 25:4016–4024. doi: 10.1007/s00586-015-4242-1

77. Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, Argani P, Sukumar S (2006) HOXB7, a Homeodomain Protein, Is Overexpressed in Breast Cancer and Confers Epithelial-Mesenchymal Transition. Cancer Res 66:9527–9534. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4470

78. Yang C, Hornicek FJ, Wood KB, Schwab JH, Choy E, Iafrate J, Rosenberg A, Nielsen GP, Xavier RJ, Mankin H, Duan Z (2010) Characterization and Analysis of Human Chordoma Cell Lines. Spine (Phila Pa 1976) 35:1257–1264. doi: 10.1097/BRS.0b013e3181c2a8b0

79. Yang XR, Ng D, Alcorta DA, Liebsch NJ, Sheridan E, Li S, Goldstein AM, Parry DM, Kelley MJ (2009) T (Brachyury) gene duplication confers major susceptibility to familial chordoma. Nat Genet 41:1176–1178. doi: 10.1038/ng.454

80. York JE, Kaczaraj A, Abi-Said D, Fuller GN, Skibber JM, Janjan NA, Gokaslan ZL (1999) Sacral Chordoma: 40-Year Experience at a Major Cancer Center. Neurosurgery 44:74

81. Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ (1995) Cellular and Molecular Barriers to Gene Transfer by a Cationic Lipid. Journal of Biological Chemistry 270:18997–19007. doi: 10.1074/jbc.270.32.18997

82. Zavadskaia N (1927) Sur la mortification spontanèe de la que chez la souris nouveau-nèe et sur l'existence d'un caractère (facteur) hèrèditaire, non viable. CRSoc de Biol C.R.Soc de Biol.:114–119

83. Chordoma Foundation. https://www.chordomafoundation.org/. Accessed 9 Jul 2023

7 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

8 Lebenslauf

Name: Luisa Haase

Geb. 1997, Stuttgart

Ausbildung:

Medizinstudium:

2017-2024: Studium der Humanmedizin

2024: 3. Staatsexamen (Note 1,0)

2023: 2. Staatsexamen (Note 2,0)

2019: 1. Staatsexamen (Note 2,0)

Praktisches Jahr:

3. Tertial: Chirurgie Augsburg Uniklinik

2. Tertial: Pädiatrie, OSK Ravensburg

1. Tertial: Innere Medizin, Augsburg Uniklinik

Doktorarbeit:

2021-2024: Institut für Pathologie, Universität Ulm
„Einfluss der HOXB7-Expression auf den MAPK-Signalweg und die TBXT-Expression in Chordomzellen sowie Etablierung der Linien U-CH22 und U-CH24 Q3“

2022: Vortrag auf der DGP

2021: Promotionsfreisemester,
Forschungstrack Experimentelle Medizin

Famulaturen:

2022: Notaufnahme, Uniklinik Ulm

2020: Gynäkologie, KH Böblingen

2020: Unfallchirurgie, Uniklinik Ulm

2020: Kinderarztpraxis, Praxis Baumann, Öhringen

Studium:

2016-2017: Grundkurs FKN Nürtingen

Schule:

2008-2016: Abitur, Gymnasium Rutesheim (Note 1,0)

Beruflicher Werdegang:

2024: Assistenzärztin im Uniklinikum Augsburg (3. Med.)

12.12.2024; Luisa Haase