

Analyse der Aktivierung des Hedgehog-Signalweges in kindlichen Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Lange, Veit Lukas Karl

- 2017 -

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. M. Ebinger

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Schluesener

**für
meine Frau Anne**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	11
1.1 Malignome bei Kindern	11
1.1.1 Definition	11
1.1.2 Epidemiologie der Malignomerkrankungen im Kindesalter	11
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese von Malignomerkrankungen	12
1.2 Der Hedgehog-Signalweg	13
1.2.1 Entdeckung des Hedgehog-Signalweges	13
1.2.2 Funktionsweise des Hedgehog-Signalweges	14
1.2.3 Die physiologische Rolle des Hedgehog-Signalweges	15
1.2.4 Die pathophysiologische Rolle des Hedgehog-Signalweges	16
1.2.4.1 Der Hedgehog-Signalweg und intrauterine Fehlbildungen	16
1.2.4.2 Der Hedgehog-Signalweg und Malignomerkrankungen	16
1.3 Nachweis des Hedgehog-Signalweges in Geweben	18
1.3.1 Immunhistochemischer Nachweis	18
1.3.2 Nachweis durch RT-qPCR	18
1.4 Hemmung des Hedgehog-Signalweges	19
1.4.1 Cyclopamin und seine Derivate	19
1.4.2 Itraconazol	19
1.4.3 Arsen	20
1.4.4 Hedgehog-Antikörper	20
1.4.5 Weitere Hh-Inhibitoren	21

1.5	Studienziele	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Herkunft der Gewebeproben und Einschlusskriterien	23
2.2	Geräte	24
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.4	Chemikalien	25
2.5	Antikörper	25
2.6	Ventana-Reagenzien	26
2.7	Reagenzien reverser Transkription und RT-qPCR.....	26
2.8	Mikroskopische und histologische Beurteilung	28
2.9	Herstellung der histologischen Präparate	28
2.10	Tissue Micro Array	28
2.11	Immunhistochemie.....	29
2.11.1	Auswahl der Antikörper.....	29
2.11.1.1	Ki-67.....	30
2.11.1.2	CD56	30
2.11.2	Lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben.....	30
2.12	RT-qPCR.....	32
2.12.1	RNA-Isolation aus Paraffinmaterial.....	32
2.12.2	cDNA-Synthese	32
2.12.3	Relative mRNA-Quantifizierung.....	32
2.13	Statistische Auswertung der Daten.....	34
2.13.1	Rangkorrelationskoeffizient Spearmans Rho	34
2.13.1.1	Signifikanzbestimmung	34

2.13.2	Boxplot.....	34
2.13.2.1	Signifikanzbestimmung.....	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Ergebnisse der histologischen Auswertung	36
3.2	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen.....	38
3.2.1	Neuroblastome	39
3.2.1.1	Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung	39
3.2.1.2	Korrelation der Ergebnisse der einzelnen Antikörperfärbungen (NB).....	46
3.2.1.3	Korrelation der IHC-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf (NB).....	47
3.2.2	Rhabdomyosarkome.....	49
3.2.2.1	Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung	49
3.2.2.2	Korrelation der Ergebnisse der einzelnen Antikörperfärbungen (RMS).....	56
3.2.2.3	Korrelation der IHC-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf (RMS).....	57
3.2.3	Grafische Gesamtdarstellung der IHC-Ergebnisse.....	59
3.3	Ergebnisse der RT-qPCR-Analyse.....	60
3.3.1	Neuroblastome	61
3.3.1.1	SHH (NB)	61
3.3.1.2	DHH (NB).....	61
3.3.1.3	IHH (NB).....	62
3.3.1.4	PTCH1 (NB).....	62
3.3.1.5	SMO (NB).....	63
3.3.1.6	SUFU (NB).....	63
3.3.1.7	GLI1 (NB).....	64
3.3.1.8	GLI2 (NB).....	64

3.3.1.9	Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse (NB)	65
3.3.1.10	Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf (NB)	66
3.3.2	Rhabdomyosarkome	67
3.3.2.1	SHH (RMS)	67
3.3.2.2	DHH (RMS)	67
3.3.2.3	IHH (RMS)	68
3.3.2.4	PTCH1 (RMS)	68
3.3.2.5	SMO (RMS)	69
3.3.2.6	SUFU (RMS)	69
3.3.2.7	GLI1 (RMS)	70
3.3.2.8	GLI2 (RMS)	70
3.3.2.9	Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse (RMS)	71
3.3.2.10	Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf (RMS)	72
3.3.3	Grafische Gesamtübersicht der RT-qPCR-Ergebnisse	73
3.3.4	Gruppierung der Fälle nach RT-qPCR-Ergebnissen in Bezug auf den Signalweg	75
3.3.4.1	Neuroblastome	75
3.3.4.2	Rhabdomyosarkome	76
3.4	Korrelation von IHC- und RT-qPCR-Ergebnissen	77
3.4.1	Neuroblastome	77
3.4.2	Rhabdomyosarkome	77
3.5	Bildung von Fallgruppen auf Grundlage der IHC- und PCR-Ergebnisse	78
3.5.1	Neuroblastome	79
3.5.1.1	Gruppe 1 (NB)	79
3.5.1.2	Gruppe 2 (NB)	80
3.5.1.3	Gruppe 3 (NB)	81

3.5.2	Rhabdomyosarkome.....	82
3.5.2.1	Gruppe 1 (RMS).....	82
3.5.2.2	Gruppe 2 (RMS).....	83
3.5.2.3	Gruppe 3 (RMS).....	84
4	Diskussion	85
4.1.1	Neuroblastome und Hedgehog.....	85
4.1.2	Rhabdomyosarkome und Hedgehog	86
4.2	Untersuchungsmethoden.....	87
4.2.1	Probleme mit FFPE-Material	87
4.2.2	Vor- und Nachteile der TMA-Methode	87
4.3	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen.....	89
4.3.1	CD56.....	89
4.3.2	Ki-67	89
4.3.3	Hedgehog-Proteine.....	90
4.3.3.1	SHH.....	90
4.3.3.2	DHH	91
4.3.3.3	IHH	91
4.3.3.4	SMO	92
4.3.3.5	SUFU	92
4.3.4	Korrelation der einzelnen IHC-Ergebnisse und Zusammenhänge mit dem klinischen Verlauf	93
4.4	Ergebnisse der RT-qPCR-Analyse.....	94
4.4.1	Neuroblastome	94
4.4.2	Rhabdomyosarkome.....	95
4.4.3	Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse	96
4.5	Korrelation der IHC- mit den RT-qPCR-Ergebnissen.....	96

4.6	Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf.....	97
4.7	Analyse der Fallgruppen	98
4.7.1	Neuroblastome	99
4.7.2	Rhabdomyosarkome.....	100
4.8	Schlussfolgerungen und Ausblick	101
5	Zusammenfassung.....	102
6	Literaturverzeichnis	103
7	Erklärung zum Eigenanteil	111
8	Anhang	112
8.1	Gesamtübersicht der Ergebnisse	112
8.1.1	Übersichtstabelle mit klinischen Verlaufsdaten, IHC- und PCR- Ergebnissen	112
8.1.2	IHC-Ergebnisse	115
8.2	Abbildungsverzeichnis	119
8.3	Tabellenverzeichnis	125
9	Danksagung.....	129
10	Lebenslauf.....	130

Abkürzungsverzeichnis

DHH	Desert Hedgehog
FFPE	Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded
FU	Fused
GLI ^A	GLI-Aktivatorform
GLI ^R	GLI-Repressorform
Hh	Hedgehog
HRPO	Horseradish Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IHH	Indian Hedgehog
INPC	International Neuroblastoma Pathology Committee
IRS	Immunoreactivity Score
NB	Neuroblastom
NBCCS	Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome
PTCH	Patched
PTCH1	Patched 1
PTCH2	Patched 2
RMS	Rhabdomyosarkom
RT-qPCR	Real-Time quantitative PCR
SHH	Sonic Hedgehog
SMO	Smoothened
SUFU	Suppressor of Fused
TMA	Tissue Micro Array

1 Einleitung

1.1 Malignome bei Kindern

1.1.1 Definition

Ein Malignom ist eine Masse von körpereigenen, abnorm transformierten Zellen mit Störungen der Wachstumskontrolle, der Differenzierung und der Apoptose durch Veränderung des Erbgutes der betroffenen Zellen. Bei der Entstehung eines Malignoms kommt es zur autonomen, ungehemmten Proliferation von Körperzellen mit Infiltration angrenzender Gewebe und Metastasierung in andere Körperregionen. Haben abnorm transformierte, überschießend wachsende Zellen ihren Ursprung im blutbildenden System, spricht man von einer Hämoblastose, z.B. einer Leukämie (Böcker et al. 2004).

1.1.2 Epidemiologie der Malignomerkrankungen im Kindesalter

Zur epidemiologischen Erfassung pädiatrischer Krebserkrankungen wurde im Jahr 1980 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz das deutsche Kinderkrebsregister gegründet. Dort werden mit einem Vollzähligkeitsgrad von etwa 95 Prozent Malignomfälle bei Kindern unter 15 Jahren deutschlandweit erfasst und epidemiologisch ausgewertet (Kinderkrebsregister 2009). Nach den im deutschen Kinderkrebsregister gesammelten Daten wird in Deutschland jedes Jahr bei etwa 1800 Kindern unter 15 Jahren eine Krebserkrankung diagnostiziert. Das entspricht, bei etwa elf Millionen Kindern in dieser Altersgruppe in Deutschland, einer Inzidenzrate von 16,4 pro 100 000. Was die altersmäßige Verteilung der neudiagnostizierten Fälle betrifft, so ist die Gruppe der unter Fünfjährigen etwa doppelt so häufig betroffen wie die Gruppe der 5- bis 14-Jährigen. Der Altersmedian bei Diagnosestellung liegt bei fünf Jahren und elf Monaten (Kaatsch et al. 2012). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei malignen Erkrankungen im Kindesalter liegt bei 83 Prozent. Wiederum 81 Prozent der Patienten überleben mindestens zehn Jahre, 80 Prozent überleben 15 Jahre und länger (Kaatsch und Spix 2012). In der pädiatrischen Onkologie spielen Karzinome, anders als bei Erwachsenen, eine untergeordnete Rolle (ca. zwei

Prozent der Malignome bei Kindern), vorherrschend sind embryonale Tumoren wie Neuroblastome, Retinoblastome, Nephroblastome, Medulloblastome, embryonale Rhabdomyosarkome, Keimzelltumoren (siehe Abbildung 1). Die Gruppe der am häufigsten bei Kindern diagnostizierten malignen Erkrankungen sind Leukämien (34,1%), ZNS-Tumoren (23,2%) und Lymphome (11,4%) (Kaatsch et al. 2012).

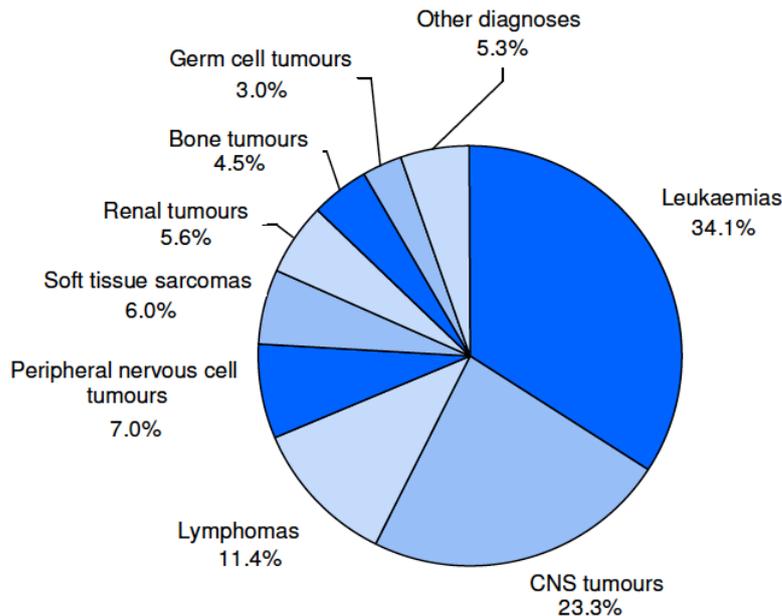


Abbildung 1: Relative Häufigkeit der gemeldeten Patienten unter 15 Jahren aus der deutschen Wohnbevölkerung nach den häufigsten ICC-3 Diagnose-Hauptgruppen; 2001-2010; n = 17876 (Kaatsch und Spix 2012)

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese von Malignomerkrankungen

Autonom und überschießend wachsende Zellen im menschlichen Körper sind, unabhängig von der exakten Bezeichnung der Krebserkrankung, dadurch charakterisiert, dass zelleigene Abläufe wie Zellzyklusregulation, Zellproliferation und programmierter Zelltod, aber auch gewebetypische Eigenschaften wie Angiogenese und Invasion, nicht mehr in normaler Weise funktionieren. Es gibt Signalwege von denen bekannt ist, dass sie Zellzyklus, Apoptose und Proliferation regulieren. Diese Signalwege, zu denen auch der Hedgehog-Pathway gehört, sind seit einigen Jahren Gegenstand klinisch-onkologischer Forschung zur Verbesserung von Diagnostik, Therapie und Prognose (Kaatsch et al. 2006).

1.2 Der Hedgehog-Signalweg

Während der Embryogenese komplex organisierter Vertebraten und Evertebraten ist eine Vielzahl interzellulärer Signalwege hochreguliert. Ein während der Entwicklungsgeschichte der Lebewesen weitgehend konservierter Signalweg ist der Hedgehog-Signalweg (Hh-Signalweg). Dessen Signalmoleküle spielen in der Embryonalentwicklung der bilateralsymmetrisch aufgebauten Tiere und des Menschen eine zentrale Rolle als lokale Mediatoren. Über eine Reihe molekularbiologischer Vorgänge, die im Folgenden beschrieben werden, aktivieren sie die Transkription der Hedgehog-Zielgene im Zellkern (Alberts 2011). Nach der Embryogenese wird der Hedgehog-Signalweg in den meisten Gewebetypen stillgelegt, kann jedoch nach Gewebeschäden reaktiviert werden, um eine adäquate Regeneration zu gewährleisten. Neben der physiologischen Reaktivierung nach Gewebetraumata wird eine pathologische Reaktivierung des Signalweges in vielen verschiedenen humanen Malignomtypen beobachtet, was eine wichtige Rolle des Hedgehog-Pathways in der Karzinogenese nahelegt (McMillan und Matsui 2012).

1.2.1 Entdeckung des Hedgehog-Signalweges

Der Hh-Signalweg wurde ursprünglich in seiner Schlüsselrolle bei der Entwicklung von *Drosophila*-Larven beschrieben. Erst später wurde er als wichtiger Regulationsmechanismus in der Embryonalentwicklung vieler weiterer Spezies, inklusive des Menschen, erkannt. In ihrer Veröffentlichung mit dem Titel „Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*“ (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980) beschreiben Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus Mutationsmuster in Larven von *Drosophila melanogaster*. Sie erwähnen dabei erstmals ein Gen namens Hedgehog und weisen nach, dass Mutationen in diesem Gen bei *Drosophila*-Larven grundlegende Auswirkungen auf deren Morphologie haben. Im Jahr 1995 wurden Nüsslein-Volhard und Wieschaus „für ihre grundlegenden Erkenntnisse über die genetische Kontrolle der frühen Embryoentwicklung“ mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet (Nobelprize.org 1995, Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980, Franco und Yao 2012).

1.2.2 Funktionsweise des Hedgehog-Signalweges

Der Hedgehog-Signalweg beruht auf dem Prinzip der Proteolyse. Zur Signaltransduktion nach Ligandenbindung ist eine enzymatische Spaltung von Signalwegspoteinen nötig. Die Liganden des Hh-Signalweges sind Polypeptide, die von der Zelle sezerniert und durch kovalent gebundene Lipide modifiziert werden (Ingham et al. 2011). Die drei homologen Liganden Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog und Indian Hedgehog wirken autokrin oder parakrin auf die sezernierende oder auf benachbarte Zellen (Alberts 2011). Bei fehlender Präsenz eines Liganden wirkt das intramembranös lokalisierte Rezeptorprotein Patched (PTCH) inhibierend auf das Protein Smoothened (SMO). Der genaue Mechanismus dieser Inhibition ist bisher nicht bekannt. In Säugetieren und im Menschen existieren zwei Formen des Hedgehog-Rezeptors Patched, PTCH1 und PTCH2. Sie binden die drei Ligandehomologe mit gleicher Affinität und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Expressionsmuster; PTCH2 wird vermehrt im Hoden-Gewebe exprimiert (Carpenter et al. 1998). Bei Bindung eines Liganden an PTCH wird die Hemmung von SMO aufgehoben. Das freigeordnete Messenger-Protein SMO aktiviert daraufhin die Effektoren des Signalweges, die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren der GLI-Familie (Glioma associated oncogene homolog; Unterformen GLI1, GLI2 und GLI3). GLI-Moleküle werden während der Absenz von Hedgehog-Liganden in einem Proteinkomplex bestehend aus dem Protein Costal, der Serin-Threonin-Kinase Fused (FU) und dem Fused hemmenden Suppressor of Fused (SUFU), proteolytisch gespalten und dadurch in eine Transkriptions-Repressor-Form (GLI^R) umgewandelt. Nach Desinhibition von SMO durch Ligandenbindung an PTCH wird GLI in seiner transkriptionsaktivierenden Form (GLI^A) bereitgestellt. GLI^R leiten sich überwiegend aus der GLI-Unterform GLI3 ab, während zur Aktivität von GLI^A vor allem GLI2 beiträgt. GLI1 stellt eines der Transkriptionsziele des Hedgehog-Signalweges dar und wirkt wiederum als Transkriptionsaktivator, der die Funktion von GLI^A verstärkt. Die aktivierten GLI-Effektoren GLI^R und GLI^A kontrollieren die Transkription einer Reihe von Target-Genen im Zellkern, darunter *PTCH1*, *GLI1* und *GLI3* (Jiang und Hui 2008, Ingham und McMahon 2001, Alberts 2011). Die zu den einzelnen Proteinen gehörigen Gene werden

üblicherweise in kursiven Großbuchstaben geschrieben, so auch in dieser Arbeit: *SHH*, *DHH*, *IHH*, *SMO*, *PTCH1*, *SUFU*, *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*.

1.2.3 Die physiologische Rolle des Hedgehog-Signalweges

In der Embryonalentwicklung von Vertebraten finden sich zahlreiche Belege für eine zentrale Funktion des Hh-Signalweges. So wurden jeweils einer oder mehrere der homologen Hedgehog-Liganden als mitogen wirkende, die Zellproliferation anregende Faktoren bei der Angiogenese, der Hämatopoese, der Osteogenese, der Entwicklung des Gastrointestinaltraktes, der Extremitäten, der Gonaden, des Herzens, der Lunge sowie von Nerven- und Muskelgewebe beschrieben (Ingham und McMahon 2001, Franco und Yao 2012). Die Idee eines chemischen Mechanismus, der der Differenzierung von embryonalem Gewebe zugrunde liegt, wurde bereits im Jahre 1953 von Alan Turing, einem britischen Naturwissenschaftler, formuliert (Turing 1953). Der Begriff des Morphogens, einer Turings Idee entsprechenden Substanz, kam erstmals durch die Veröffentlichungen des US-amerikanischen Genetikers Thomas Hunt Morgan ins Spiel. Morgan gilt als Pionier der Forschung an Genmutationen in *Drosophila*. Er wies nach, dass in *Drosophila* die Chromosomen Träger von Faktoren sind, die zur Ausbildung spezifischer Körpermerkmale wie der Augenfarbe führen (Morgan 1911a, Morgan 1910, Morgan 1911b). Das Konzept des Morphogens wurde 1968 von Lewis Wolpert weiter verfeinert: Er beschreibt die Auswirkungen eines Morphogens auf die Zelldifferenzierung, indem er das so genannte French Flag Model einführt. Nach diesem Modell hängt die Genaktivierung in den durch das Morphogen erreichten Zellen direkt von dessen lokaler Konzentration ab. So entstehen in der Frühphase der Entwicklung um die morphogensezernierende Zone herum räumlich gestaffelt verschiedene Zelltypen (Wolpert und Gingell 1968). SHH-Signalaktivität mit Inhibition von GLI^R wurde beispielsweise als ausschlaggebender Faktor in der Steuerung der Anordnung und des Überlebens von neuronalen Progenitorzellen im ventralen Rückenmark von Mäusen nachgewiesen (Litingtung und Chiang 2000). In ähnlicher Weise ist der Hh-Signalweg beteiligt an der Aufrechterhaltung von Stamm- oder Progenitorzellen verschiedener Gewebe im adulten Organismus, inklusive der Epithelien vieler innerer Organe (Beachy et al. 2004). Erwartungsgemäß erwies sich der Signal-

weg auch für die Geweberegeneration etwa des Lungenepithels (Watkins et al. 2003), des Prostataepithels (Karhadkar et al. 2004) und des exokrinen Pankreasepithels (Fendrich et al. 2008) als kritisch. Weiterhin ist der Hh-Signalweg involviert in die Aktivierung von T-Zellen (Outram et al. 2000), die Hämatopoese (Bhardwaj et al. 2001) und die Entwicklung der Haut (Athar et al. 2006). Hh-Liganden können vielfältige Funktionen annehmen. Sie fungieren als Morphogen, als Mitogen, als Faktor für das Überleben von Zellen oder als chemotaktischer Lockstoff (King et al. 2008).

1.2.4 Die pathophysiologische Rolle des Hedgehog-Signalweges

Fehlerhafte Hh-Signalaktivität kann durch deaktivierende Mutationen in *PTCH*, *SMO* oder *GLI1*, durch aktivierende Mutationen in *SUFU* sowie durch ligandenabhängige Aktivierung des Signalweges entstehen. Die pathologische Aktivierung des Hh-Signalweges ist nicht nur in die Genese von Malignomen involviert, sie kann auch intrauterinen Fehlbildungen zu Grunde liegen.

1.2.4.1 Der Hedgehog-Signalweg und intrauterine Fehlbildungen

Durch genetische Analyse wurden kausale Zusammenhänge zwischen Extremitätenanomalien und pathogenetischen Mutationen im Hh-Signalweg beim Menschen aufgedeckt. Am häufigsten wurden kongenitale präaxiale (daumenseitige) und postaxiale (fingerseitige) Polydaktylien der Hände beschrieben, die durch ektope Expression von SHH während der Embryonalentwicklung zu erklären sind (Anderson et al. 2012). Auch hereditäre Brachydaktylien und die hereditäre akrokapitofemorale Dysplasie sind durch Hh-Mutationen zu erklären (Nieuwenhuis und Hui 2005).

1.2.4.2 Der Hedgehog-Signalweg und Malignomerkrankungen

Erste Hinweise auf eine Verbindung zwischen erhöhter Hh-Signalaktivität und der Entstehung von Malignomen lieferte der Nachweis eines auffällig hochregulierten *GLI*-Gens in humanen Gliomen durch Kinzler et al. im Jahr 1987 (Kinzler et al. 1987). Später wurden Mutationen in den Genen von *PTCH* und *SMO* in Basalzellkarzinomen (Gailani und Bale 1997, Xie et al. 1998), Medulloblastomen (Zurawel et al. 2000) und Rhabdomyosarkomen (Tostar et al. 2006) gefunden (Onishi und Katano 2011). In Studien über das Gorlin-Syndrom

(NBCCS; Nevoid basal cell carcinoma syndrome) wurde in den 1990er-Jahren erstmals eine ursächliche Rolle des Hh-Signalweges bei der Entstehung von Neoplasien nachgewiesen. Ursache für das Gorlin-Syndrom ist nach Hahn et al. eine Mutation in *PTCH1* mit dysregulierter Aktivität des Signalweges (Hahn et al. 1996, McMillan und Matsui 2012, Johnson et al. 1996). Auch in spontan aufgetretenen Basalzellkarzinomen und Medulloblastomen wurden signifikant häufig *PTCH1*-, *SMO*- und *SUFU*-Mutationen nachgewiesen (Epstein 2008, Kool et al. 2008). Neben Mutationen als Ursache hochregulierter Hh-Aktivität wurde auch die Aktivierung des Signalweges durch vermehrt gebildete Liganden beobachtet. Diese können dabei autokrin und parakrin wirken. Eine autokrine Sekretion von Liganden, also die Aktivierung des intrazellulären Hh-Signalweges durch die Zelle selbst, wurde in zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen, beispielsweise in Glioblastomen (Bar et al. 2007), Melanomen (Stecca et al. 2007), metastasierten Prostatakarzinomen (Karhadkar et al. 2004), kolorektalen Karzinomen (Varnat et al. 2009), Pankreaskarzinomen (Berman et al. 2003, Thayer et al. 2003) und kleinzelligen Bronchiolalkarzinomen (Watkins et al. 2003). Auch parakrine Signalaktivität von Hh-Liganden, also die Stimulation benachbarter Zellen, wurde beschrieben, und zwar in B-Zell-Lymphomen und Multiplen Myelomen, wo von Stromazellen sezernierte Hh-Liganden als wichtiger Faktor für das Überleben der malignen Zellen nachgewiesen wurden (Dierks et al. 2007). Yauch et al. beschreiben für alle Hh exprimierenden Malignome eine direkte Abhängigkeit des Tumorwachstums von parakriner Hh-Signalaktivität in den Dimensionen Proliferationsaktivität, Invasivität und Zellüberleben. Bei medikamentöser Blockade des Signalweges wurde eine Wachstumshemmung der Tumore im Mausmodell beobachtet (Yauch et al. 2008). Die Rolle des Hh-Signalweges in der Malignomentstehung kann also bislang am ehesten durch Beobachtung der Auswirkungen seiner Hemmung auf das Tumorwachstum nachvollzogen werden.

1.3 Nachweis des Hedgehog-Signalweges in Geweben

Zur Analyse der Expression von Bestandteilen des Hedgehog-Signalweges in Geweben stehen mehrere verschiedene Methoden zur Verfügung, darunter der Proteinnachweis mittels Immunhistochemie, Western-Blot oder Immunfluoreszenz-Methode. Auf RNA-Ebene gelingt der Nachweis durch RT-qPCR. Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden für die vorliegende Arbeit verwendet.

1.3.1 Immunhistochemischer Nachweis

Die immunhistochemische Untersuchung von Gewebeproben auf bestimmte Proteine basiert auf einer Antigen-Antikörper-Bindung zwischen dem nachzuweisenden Antigen und speziell zu diesem Zweck aufgebrauchten monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern. Die an das Antigen gebundenen Antikörper werden durch Markierung mit Farbstoffen sichtbar gemacht. Die Auswertung geschieht mikroskopisch beziehungsweise fluoreszenzmikroskopisch. Es existieren Antikörper zur immunhistochemischen Färbung von SHH, IHH, SHH, PTCH, SMO, SUFU, FU, GLI1, GLI2 und GLI3 von verschiedenen Herstellern.

1.3.2 Nachweis durch RT-qPCR

Die quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ist eine Methode, mittels derer Nukleinsäuren in Gewebeproben vervielfältigt und nachgewiesen werden können. Durch den Einsatz der Reversen Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, wird die aus der Probe extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der cDNA wird durch Fluoreszenz-Emission einer Sonde detektiert. Die mRNA-Menge der Probe kann dann relativ quantifiziert werden.

1.4 Hemmung des Hedgehog-Signalweges

Die eingehende Untersuchung durch eine größere Zahl an Forschungsgruppen in den letzten Jahren hat den Hh-Signalweg zu einem vielversprechenden therapeutischen Ziel in der Onkologie gemacht. Einige Medikamente, die den Hh-Signalweg an unterschiedlichen Stellen beeinflussen, werden derzeit auf den Weg zur klinischen Einsatzfähigkeit gebracht (Atwood et al. 2012, Kim et al. 2013, Wickström et al. 2013).

1.4.1 Cyclopamin und seine Derivate

Als erster Inhibitor des Hh-Signalweges wurde Cyclopamin identifiziert. Nachdem auf einer Farm in Idaho, USA, in den 1950er-Jahren mehrere einäugige Lämmer geboren worden waren, deren Muttertiere eine Pflanze namens *Veratrum californicum* gefressen hatten, wurde Cyclopamin, ein nach der Zyklopie der betroffenen Lämmer benanntes Pflanzenalkaloid der Jerveratrum-Gruppe, als verursachendes Teratogen ausgemacht (Herper 2005). Cyclopamin wirkt durch direkte Interaktion mit SMO supprimierend auf den Hh-Signalweg (Incardona et al. 1998). Obwohl Cyclopamin in vitro und in vivo tumorwachstumshemmende Wirkung zeigte, machten seine geringe Affinität zu SMO, seine eingeschränkte orale Bioverfügbarkeit und seine nachteiligen pharmakokinetischen Eigenschaften die Entwicklung potenterer synthetischer Derivate erforderlich. Eine Reihe synthetischer Cyclopamin-Derivate befindet sich mittlerweile in der klinischen Erprobung, beispielsweise IPI-926 (Saridegib; Cyclopamin mit verbesserten Lösungseigenschaften), SANT 1-4 (Hemmer der Aktivierung von SMO), GDC-0449 (Vismodegib), und BMS-833923 (Low und de Sauvage 2010, Gupta et al. 2010, Onishi und Katano 2011, Lin und Matsui 2012).

1.4.2 Itraconazol

Das Antimykotikum Itraconazol besitzt, wie Kim et al. zeigen konnten, ebenfalls Hedgehog-inhibierende Eigenschaften. In üblicher Dosierung wurde eine wachstumshemmende Wirkung auf Medulloblastome in vivo nachgewiesen. Ähnlich Cyclopamin greift Itraconazol auf der Ebene von SMO an und wirkt der ziliären Akkumulation von SMO entgegen (Kim et al. 2010b). Itraconazol befindet sich in der klinischen Erprobung bei Patienten mit Basalzellkarzinom, meta-

stasiertem Prostatakarzinom und nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom (Lin und Matsui 2012).

1.4.3 Arsen

Ein gravierender Nachteil der oben genannten SMO-Inhibitoren ist der spontane Wirkungsverlust, der bei Mutationen in *SMO* unter Therapie eintreten kann. Mutationen können einerseits durch dauerhafte Aktivierung von *SMO* (Xie et al. 1998), andererseits durch Verlust der Bindungsfähigkeit von *SMO* an Cyclopamin und dessen Derivate zur Resistenzentwicklung führen (Yauch et al. 2009). Weiterhin ist eine Malignom-assoziierte Hh-Aktivierung oftmals durch Veränderungen im intrazellulären Signalweg verursacht, beispielsweise durch loss-of-function-Mutationen im Regulatorprotein SUFU (Tostar et al. 2006) oder durch Hh-unabhängige GLI1-Aktivierung (Beauchamp et al. 2009). Um diese mögliche Einschränkung von SMO-Inhibitoren zu umgehen, bedarf es Hh-Antagonisten, die den intrazellulären Signalweg jenseits von *SMO* angreifen. Kim et al. berichten, dass verschiedene Arsenverbindungen (Natriumarsenit, Arsen trioxid und Phenylarsinoxid) als potente Inhibitoren der Signalübertragung durch SHH fungieren. Außerdem unterdrückt Arsen die SHH-induzierte Akkumulation von GLI2 im primären Cilium und reduziert langfristig die Aktivität von GLI2 (Kim et al. 2010a). Beauchamp et al. berichten, dass auch die Aktivität von GLI1 und die Expression von GLI-Zielgenen durch Bindung von Arsen trioxid an GLI1 unterdrückt wird (Beauchamp et al. 2011).

1.4.4 Hedgehog-Antikörper

Der Hh-Signalweg kann durch mono- oder polyklonale Antikörper direkt an seinem Anfangspunkt blockiert werden, beispielsweise durch den Hh-Antikörper 5E1, der die Bindung von Hh-Liganden an PTCH verhindert und in präklinischen Studien erfolgreich getestet wurde (Scales und de Sauvage 2009).

1.4.5 Weitere Hh-Inhibitoren

Durch die Blockade der GLI-medierte Transkription wirken die niedermolekularen Hh-Antagonisten GANT 58 und GANT 61 selektiv inhibitorisch auf die Expression der Hh-Zielgene im letzten Schritt des Signalweges (Lauth et al. 2007). Auch ein monoklonaler Antikörper gegen PTCH1 befindet sich derzeit in Entwicklung (Nakamura et al. 2007). Erst vor kurzer Zeit wurde außerdem eine niedermolekulare Verbindung namens Robotnikinin beschrieben, die extrazelluläres SHH bindet und damit die Induktion des Signalweges durch an PTCH bindendes SHH unterdrückt (Stanton et al. 2009, Gupta et al. 2010).

1.5 Studienziele

Gesamtziel dieser Arbeit war eine retrospektive, pseudonymisierte Analyse des Hedgehog-Pathways in pädiatrischen Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen anhand des Nachweises seiner Aktivierung mittels Analyse durch Immunhistochemie und RT-qPCR.

Das erste Teilziel dieser Arbeit war die Etablierung einer immunhistochemischen Färbung für SHH, DHH, IHH, SMO, PTCH, SUFU, GLI1, GLI2 und GLI3.

Das zweite Teilziel dieser Arbeit war die immunhistochemische Färbung von Gewebeproben aus Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen zur qualitativen und quantitativen Analyse der Expression von Proteinen des Hedgehog-Signalweges.

Das dritte Teilziel dieser Arbeit war die Quantifizierung der in den Gewebeproben vorhandenen mRNA für die Gene *SHH*, *DHH*, *IHH*, *SMO*, *PTCH1*, *SUFU*, *GLI1* und *GLI2* mittels RT-qPCR.

Das vierte Teilziel dieser Arbeit war der Vergleich der mRNA-Expression und der Proteinexpression der verschiedenen Komponenten des Hh-Signalweges innerhalb der einzelnen Fälle und in der Gesamtkohorte.

Das fünfte Teilziel dieser Arbeit war schließlich eine Einschätzung der Eignung insbesondere immunhistochemischer Untersuchungsmethoden für den klinischen Einsatz bei der Therapieplanung in der pädiatrischen Onkologie.

2 Material und Methoden

2.1 Herkunft der Gewebeproben und Einschlusskriterien

Bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten Proben handelt es sich um Gewebe aus Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen, das entnommen, formalinfixiert in Paraffin eingebettet (FFPE-Material; formalin-fixed paraffin-embedded) und im Archiv des Instituts für Pathologie und Neuropathologie des Universitätsklinikums Tübingen eingelagert wurde. Die Proben stammen von 20 Neuroblastom- und 19 Rhabdomyosarkompatienten. Die Auswahl der Patienten, die für die Studie berücksichtigt wurden, erfolgte nach histopathologischer Diagnose sowie Verfügbarkeit konservierter Proben. Es wurden Patienten ermittelt, deren Erstdiagnose eines Neuroblastoms oder Rhabdomyosarkoms im Kindesalter in den Jahren 1993 bis 2011 am Universitätsklinikum Tübingen zweifelsfrei gestellt wurde. Zur Erhöhung der Fallzahl wurden in die Gruppe der Rhabdomyosarkomfälle neun Patienten aufgenommen, die zum Diagnosezeitpunkt das Erwachsenenalter bereits erreicht hatten. In Tabelle 1 werden die Patientencharakteristika aufgelistet. Zur Etablierung der Immunfärbungen wurden Vergleichsproben von humanem Herz-, Darm-, Nieren-, Hirn- und Plazentagewebe, von fetalem Leber-, Nieren- und Darmgewebe und aus hepatozellulären Karzinomen sowie Lungenkarzinomen verwendet. Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen hat der Verwendung der Paraffingewebeblöcke für diese Arbeit zugestimmt (Ethikvotum Nummer 27/2008B01). In Tabelle 5 (Kapitel 3.1) werden alle in diese Studie eingeschlossenen Fälle mit genauer histopathologischer Diagnose aufgeführt. Bezüglich der Gruppe der Neuroblastome werden parallel zwei wichtige Klassifikationen berücksichtigt: Die Diagnose nach INPC (Shimada et al. 1999) und die Klassifikation nach Hughes (Hughes et al. 1974).

2.2 Geräte

In Tabelle 1 werden die im Labor für diese Studie verwendeten Geräte und Materialien aufgeführt.

Tabelle 1: Geräte

Materialbezeichnung	Hersteller
Sterile Werkbank Hera Safe	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Beheizbares Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge Biofuge	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Thermo-Inkubationsmischer Thriller	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Thermal Cycler GeneTouch	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Light Cycler 480 Real-Time PCR	Roche (Basel, Schweiz)
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Gefrierschrank (-25°C)	Bosch (Gerlingen, Deutschland)
Gefrierschrank (-80°C) -86° Freezer	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Vortexer Reox Top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Schüttler MTS 2	IKA (Staufen, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Waage 500 g	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Pipettiergerät Pipetboy Plus	Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland)
Verstellbare Pipetten Pipetman	Gilson (Middleton, WI, USA)
TMA-Maschine	(Beecher, Sun Prairie, WI, USA)
Mikroskop Axiostar plus	Zeiss (Jena, Deutschland)
Digitalkamera Olympus E20p	Olympus (Tokio, Japan)
IHC-Vollautomat BenchMark XT	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)

2.3 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 findet sich eine Auflistung der für diese Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Hersteller
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen Safeseal-Tips	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Objektträger Super Frost Plus	Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)

2.4 Chemikalien

Tabelle 3 zeigt die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien.

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Xylol	VWR Prolabo (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Roti-Aqua-Phenol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti-Chloroform	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Appllichem (Darmstadt, Deutschland)
UltraPure DNase/Rnase-Free Distilled Water	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
DTT Dithiothreitol (0,1 M)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Natriumacetat-Pufferlösung (3 M, pH 5,2)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium Chloride 1 M – Tris pH 8,0	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EDTA 500 mM	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium dodecyl sulfate solution (SDS) 20%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

2.5 Antikörper

Tabelle 4 zeigt eine Auflistung der verwendeten Antikörper mit Details zu Verdünnung, Vorbehandlung der Gewebe, Inkubation und verwendetem Nachweissystem.

Tabelle 4: Antikörper
(CC1= Cell Conditioner 1; TRIS/Borat/EDTA-Puffer, pH 8,4)

Anti-körper	Hersteller und Bestellnummer	Verdünnung	Vorbehandlung	Nachweissystem	Inkubationszeit / -temperatur 1. Antikörper
SHH	Acris / 15785PU-N	1/100	CC1 (90 min)	Ultra view DAB (Roche)	32min / 37°C
DHH	Abcam / 97287	1/150	CC1 (60 min)	Ultra view DAB (Roche)	32min / 37°C
IHH	Abcam / 39634	1/100	CC1 (60 min)	Ultra view DAB (Roche)	32min / 37°C
SMO	Abcam / 72130	1/200	CC1 (60 min)	Ultra view DAB (Roche)	32min / 37°C
SUFU	Abcam / 52913	1/50	CC1 (60 min)	Opti view DAB (Roche)	32min / 37°C
CD56	Menarini / 44512	1/100	CC1 (60 min)	iView DAB (Roche)	32min / 37°C
Mib1	DAKO / M7240	1/200	CC1 (60 min)	iView DAB (Roche)	32min / 37°C

2.6 Ventana-Reagenzien

In Tabelle 5 werden die für diese Studie verwendeten Ventana-Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 5: Ventana-Reagenzien

Materialbezeichnung	Hersteller
Ultra LCS – Liquid Coverslip	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
SSC – Sodium Salt Citrate	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
Reaction Buffer	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
Ultra Cell Conditioner 1	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
EZ Prep	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
Glykogen	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
UltraView Universal DAB Detection Kit	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)

2.7 Reagenzien reverser Transkription und RT-qPCR

In Tabelle 6 werden die für die reverse Transkription, in Tabelle 7 die für die RT-qPCR verwendeten Reagenzien aufgeführt. Tabelle 8 zeigt die mittels UPL-Assay Design Center entwickelten UPL-Assays sowie die dazugehörigen Primer und Sonden.

Tabelle 6: Reagenzien reverser Transkription

Materialbezeichnung	Hersteller
Primer Random	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
dNTP-Mix 10 mM	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
UPL Human TBP Gene Assay Primer Mix	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)

Tabelle 7: Reagenzien RT-qPCR

Materialbezeichnung	Hersteller
Rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor RNase Out	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Proteinase K (25 mg/ml)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SuperScript II Reverse Transcriptase	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
5X First Strand Buffer	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
LightCycler Uracil-DNA Glykosylase	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
UPL Human TBP Gene Assay	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
LightCycler 480 Probes Master	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)

Tabelle 8: Mittels Universal Probe Library (UPL) Assay Design Center designte UPL-Assays mit entsprechenden Primern und Sonden

Primer	Primersequenz 5'-3'	UPL-Probe
SHH_F	gcttcgactgggtgtactacg	86
SHH_R	gccaccgagttctctgct	
DHH_F	gcaacaagtatgggttgctg	86
DHH_R	cggaccgccagtgagtta	
IHH_F	tgattgctccgcaagtc	38
IHH_R	ccactctccaggcgtacct	
SUFU_F	gagtcggagccctcatt	13
SUFU_R	tgtaaagtgccgtccatgc	
SMO_F	gcacactgtgtcccacga	13
SMO_R	ctccgagccaccatcttg	
GLI1_F	caggaggaaagcagactga	76
GL1_R	actgctgcaggatgactgg	
GLI2_F	actccacacacgcggaac	16
GLI2_R	ccactgaagtttccaggatg	
PTCH1_F	ctgccctctccgatcac	5
PTCH1_R	tttgaatgtaacaaccagtttaata	

2.8 Mikroskopische und histologische Beurteilung

Alle ausgewählten Tumore wurden erneut mikroskopisch evaluiert und von zwei erfahrenen Pathologen diagnostiziert. Es wurden nur solche Tumore in die Studie eingeschlossen, die eindeutig histopathologisch klassifiziert werden konnten.

2.9 Herstellung der histologischen Präparate

Das Tumorgewebe wurde nach der operativen Entnahme sofort mit vierprozentigem Formalin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung fixiert. Die entnommenen Proben wurden nach der Fixierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 70%, 80%, 96%) zweimal in einem Gemisch aus 96-prozentigem Alkohol und Xylol sowie zweimal in unverdünntem Xylol entwässert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden von den Paraffinblöcken an einem Mikrotom ca. 3 µm dicke Schnitte gefertigt, die zur histologischen Beurteilung auf Objektträger aufgezogen und mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung behandelt wurden.

2.10 Tissue Micro Array

Die Methode der Gewebeaufarbeitung mittels Tissue Micro Array stellt im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungsansätze eine Möglichkeit zu einem, im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie, deutlich schnelleren und somit effizienteren Screeningverfahren dar. Mit diesem System, das erstmals im Jahr 1998 beschrieben wurde (Kononen et al. 1998), können je nach Gewebebeschaffenheit und je nach Größe des Paraffinblocks bis zu 1000 Gewebeproben in einen einzigen Paraffinblock eingebracht und weiter verarbeitet werden. Auf den in dieser Arbeit verwendeten TMA-Paraffinblöcken befanden sich bis zu 42 Gewebezylinder. Um die TMA-Paraffinblöcke herzustellen, wurden zuerst auf HE-gefärbten, konventionellen Gewebeschnitten der Donor-Paraffinblöcke repräsentative Tumoreale lichtmikroskopisch untersucht und farblich gekennzeichnet. Danach wurden die markierten Areale von den HE-gefärbten Schnitten auf die zugehörigen Blöcke übertragen. Dieses Verfahren war unerlässlich, um unerwünschte Gewebazonen wie beispielsweise Einblutungen und großflächige Nekroseareale auszuschließen. Im Übrigen wurde das ausgesuchte Ge-

webe nicht weiter selektioniert. Die Tissue Micro Arrays wurden nach der von Kononen beschriebenen Methode hergestellt. Mittels einer TMA-Maschine wurden in Abständen von ca. 1,5 mm Löcher in einen frischen Paraffinblock (Akzeptor-Block) gestanzt und sofort danach mit Gewebezylindern aus dem Donor-Block gefüllt. Der frische Paraffinblock wurde durch Festschrauben an der Plattform der TMA-Maschine befestigt, um eine exakte Positionierung zu gewährleisten. Hierfür lassen sich die Nadeln an feinen Schrauben nachjustieren. Mit einer dünnen Stanze von 1 mm Durchmesser wurden Gewebezylinder aus dem Donor-Block herausgestanzt, die dann mithilfe von Justierungsschrauben am frischen Paraffinblock in die gewünschte Position gebracht wurden. Versiegelt wurden die fertigen TMA-Paraffinblöcke mit einem auf 42°C vorgeheizten Objektträger, um ein eventuelles Herausgleiten der Gewebezylinder beim Schneidvorgang zu verhindern. Für die vorliegende Studie konnten nicht alle Fälle mit der TMA-Methode aufgearbeitet werden. In einzelnen Fällen wurden Einzelschnitte angefertigt und gefärbt, weil das vorhandene Probenmaterial von der Dicke her nicht ausreichend für eine Verarbeitung als TMA war (Goepfert 2006).

2.11 Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie (IHC) dient der Sichtbarmachung von Proteinen und anderen Strukturen mithilfe von Antikörpern, die an einen Farbstoff gekoppelt sind.

2.11.1 Auswahl der Antikörper

Die fünf in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind jeweils gegen ein Protein aus dem Hh-Signalweg gerichtet. Es handelt sich um die Proteine SHH, DHH, IHH, SMO und SUFU. Die immunhistochemischen Färbungen mit diesen Antikörpern wurden an Tumorgewebeproben aus allen in Tabelle 1 aufgeführten Fällen durchgeführt. Bei den ausgewählten Zielmolekülen handelt es sich um SHH, DHH, IHH, SMO und SUFU. Für einige weitere Proteine der Signalkette (PTCH, GLI1, GLI2, GLI3) gelang es auch nach mehreren Anläufen nicht, eine ausreichend spezifische Antikörperfärbung zu etablieren. Die verwendeten Hh-

Antikörper sind in Tabelle 4 unter 2.5 aufgelistet. Die Färbungen wurden nach den jeweiligen Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.11.1.1 Ki-67

Zusätzlich zu den Hh-Proteinen wurde Ki-67, ein nukleäres Protein mit Assoziation zur Zellproliferation, immunhistochemisch gefärbt. Der Nachweis von Ki-67 wird als eindeutiger Beweis für Proliferationsaktivität gesehen (Scholzen und Gerdes 2000). Zum Einsatz kam der monoklonale Antikörper MIB-1 (siehe Tabelle 4 unter 2.5) in einer Verdünnung von 1:200.

2.11.1.2 CD56

Als Positivkontrolle der immunhistochemischen Methode in Kombination mit dem zur Verfügung stehenden FFPE-Probenmaterial wurde ein monoklonaler Antikörper gegen CD56 (siehe Tabelle 4 unter 2.5) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. CD56 (Synonym: NCAM; Neural cell adhesion molecule) ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Neuronen, Gliazellen, Skelettmuskelzellen und NK-Zellen exprimiert wird und sowohl in Neuroblastomen als auch in Rhabdomyosarkomen zuverlässig zu finden ist (Jensen und Berthold 2007, Figarella-Branger et al. 1990, Lipinski et al. 1987, Phimister et al. 1991, Winter et al. 2008).

2.11.2 Lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben

Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop. Bei 200-facher Vergrößerung wurde ein repräsentatives Tumoreal aus der jeweiligen TMA-Stanze beziehungsweise dem vorliegenden Einzelschnitt anhand folgender Kriterien ausgewählt: Das Gewebe im Gesichtsfeld sollte vom Primäraspekt her eindeutig Tumorgewebe entsprechen, es sollten keine Nekrosen und Artefakte sichtbar sein und das Tumorgewebe sollte das gesamte Gesichtsfeld ausfüllen. Die Qualität der immunhistochemischen Färbung des jeweiligen Probengewebes mit jedem der eingesetzten Antikörper wurde mikroskopisch zunächst hinsichtlich der Art der Anfärbung beurteilt. Unterschieden wurde hierbei zwischen membranöser, zytoplasmatischer und nukleärer Anfärbung sowie der besonders für SHH charakteristischen Anfärbung der zytoplasmatisch gelegenen

Golgi-Apparate. Für jede dieser verschiedenen Anfärbungsarten wurde jeweils ein Wert für die durchschnittliche Färbeintensität in der vorliegenden Probe sowie ein Wert für den geschätzten Anteil der angefärbten Zellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen pro TMA-Stanze beziehungsweise pro Schnitt festgelegt. Bei der Beurteilung der Färbeintensität wurden die Zahlenwerte 0 (keine Anfärbung sichtbar), 1 (leichte Anfärbung), 2 (mittlere Färbungsintensität) und 3 (starke Anfärbung) vergeben. Der Anteil der angefärbten Zellen wurde mit den Werten 0 (<5%), 1 (5-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) und 4 (>75%) angegeben. Die jeweiligen Werte für Färbungsintensität und Anteil wurden dann miteinander multipliziert, um den Immunoreactivity Score (IRS) nach Vorbild von Sinicrope et al. zu generieren (Sinicrope et al. 1995). Dementsprechend beinhaltet die Skala des IRS Werte von 0 bis 12. In den Ergebnistabellen ab Seite 41 wurden die Abstufungen der IRS-Werte mit einem Farbcode visualisiert. Zusätzlich zu den Tabellen werden auch Abbildungen von lichtmikroskopischen Darstellungen gezeigt. Diese wurden mit einer digitalen Spiegelreflexkamera aufgenommen.

2.12 RT-qPCR

Die RT-qPCR-Analysen erfolgten in Kooperation durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Fend (Institut für Pathologie und Neuropathologie, Uniklinikum Tübingen).

2.12.1 RNA-Isolation aus Paraffinmaterial

Zur Isolation von RNA aus den FFPE-Tumorproben wurden zunächst eine Entparaffinierung des Materials in Xylol und eine Rehydratation mittels Zentrifugation in einer absteigenden Alkoholreihe (98%, 90%, 70%, 50%) vorgenommen. Daraufhin wurde das Zellmaterial über Nacht mittels Proteinase bei 60°C verdaut. Am nächsten Tag erfolgte die RNA-Extraktion in Phenol und Chloroform unter pH-Pufferung mit Natriumacetat. Als Carrier zur Unterstützung der mRNA-Präzipitation wurde Glykogen zugegeben. Die nach Fällung zentrifugierten und luftgetrockneten Pellets wurden zur Analyse in DNase/RNase-freiem Wasser gelöst. Die Prozedur erfolgte durch die AG Fend (Koch et al. 2006).

2.12.2 cDNA-Synthese

Zur reversen Transkription der mRNA in cDNA wurde reverse Transkriptase eingesetzt. Zu 5 µl der gelösten mRNA (100 ng/µl) wurden 1 µl Random-Primer gegeben. Es folgte eine Inkubation von 2 min bei 70°C und 10 min bei 25°C. Anschließend wurden 5 µl demineralisiertes Wasser, 4 µl 5x First Strand Buffer, 4 µl Dichlordiphenyltrichlorethan, 1 µl Nukleotid-Lösung, 1 µl rekombinanter Ribonuklease-Inhibitor und 1 µl reverse Transkriptase zugegeben und für 1 h bei 42°C, dann für 5 min bei 95°C inkubiert. Die so synthetisierten cDNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit RNase/DNase-freiem Wasser verdünnt.

2.12.3 Relative mRNA-Quantifizierung

Die relative mRNA-Expression verschiedener Hh-Signalwegsgene (*SHH*, *DHH*, *IHH*, *PTCH1*, *SMO*, *SUFU*, *GLI1*, *GLI2*) in den ausgewählten Gewebeproben wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR (RT-qPCR) mit dem Universal Probe Library-System von Roche analysiert. Basierend auf 90 kurzen Hydrolyse-Sonden, die mit LNAs (Locked Nucleic Acids) versehen wurden, ist es mit UPL möglich, 98% der 37.000 humanen Gentranskripte zu analysieren, die in der

NCBI-Referenzsequenz-Datenbank beschrieben sind. Mit der ProbeFinder Assay Design Software (Roche) können spezifische Primersequenzen sowie in Kombination zu verwendende UPL-Sonden für die jeweiligen Zielsequenzen ermittelt werden. Es wurden Multiplex-PCRs zur simultanen Analyse des zu untersuchenden Gens und des Referenzgens designt. Die mRNA-Expression der verschiedenen Gene wurde in 20 Neuroblastom- und in 19 Rhabdomyosarkomfällen relativ zu 3 Proben aus normalem Gehirn- bzw. 3 Proben aus normalem Muskelgewebe quantifiziert. Die RT-qPCR erfolgte mit mittels Universal Probe Library Assay Design Center designten Primern und Sonden nach den Angaben von Roche mit LightCycler 480 Probes Master (Roche), siehe Tabelle 6 unter 2.7. Als Referenzgen diente das Housekeeping-Gen TBP. Die Amplifikation der Proben sowie der Negativkontrollen (ddH₂O statt cDNA) wurde in Duplikaten im LightCycler 480 (Roche) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Tabelle 9 zeigt Detailangaben zur Durchführung der RT-qPCR.

Tabelle 9: RT-qPCR mit UPL-Assays

Reagenzien	Volumen [μ l]	Hersteller
Uracil-DNA Glycosylase	0,2	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
UPL-Sonde (10 μ M)	0,2	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
Primer F (20 μ M)	0,2	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Primer R (20 μ M)	0,2	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
TBP-Sonde	0,2	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
TBP-Primer-Mix	0,2	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
LightCycler 480 Probes Master	10	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
ddH ₂ O	4,8	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
Template-cDNA (2,5 ng/ μ l)	4	Roche/Ventana (Basel, Schweiz)
<u>PCR-Programm:</u>		
	40°C	10 min
	95°C	10 min
	95°C	10 s
	60°C	30 s
	72°C	60 s
	} 55 Zyklen	

2.13 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Auswertung der in dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Statistikprogrammes SAS JMP 11 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

2.13.1 Rangkorrelationskoeffizient Spearmans Rho

Um eine potenzielle Korrelation der immunhistochemisch untersuchten Proteinexpression zu berechnen, wurde Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans ρ) verwendet. Dieser gibt an, ob ein monotoner Zusammenhang zwischen zwei Reihen von Werten besteht, und zwar parameterfrei, das heißt, ohne eine bestimmte Art der Wahrscheinlichkeitsverteilung der untersuchten Werte vorauszusetzen. Um Spearmans ρ für zwei zu vergleichende Datenreihen zu berechnen, werden die Werte jeder Reihe zunächst nach Rang geordnet. Die Rangkorrelation beschreibt, wie stark die Rangzahlen der ursprünglich zusammengehörigen Wertepaare einander ähneln. Eine starke Rangkorrelation bedeutet einen starken gleichsinnigen oder gegensinnigen monotonen Zusammenhang zwischen den beiden Rangordnungen (Fahrmeir 2004).

2.13.1.1 Signifikanzbestimmung

Um die Signifikanz einzelner Werte von Spearmans ρ zu berechnen, wird ein Permutationstest durchgeführt. Dessen Ergebnis p ist ein Wert für die Wahrscheinlichkeit, dass Spearmans ρ für die Nullhypothese größer als das beobachtete Spearman- ρ ist. Ein p -Wert kleiner 0,05 entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5 % und gilt als signifikant. Ist der p -Wert unter 0,01, spricht dies für ein hochsignifikantes Ergebnis, welches dementsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 1 % unterliegt (Hörrmann 2012, Fahrmeir 2004).

2.13.2 Boxplot

Um die RT-qPCR-Ergebnisse unter 3.3 zu visualisieren, wurden vertikale Boxplot-Diagramme verwendet. Diese dienen im Allgemeinen zur grafischen Darstellung der Verteilung von kardinalskalierten Daten. Die Box umschließt dabei den mittleren Bereich der Daten vom unteren bis zum oberen Quartil. Der Median der Verteilung ist innerhalb der Box mit einer Linie markiert. Einzelne

Ausreißer werden durch die so genannten Antennen markiert. Diese haben eine maximale Länge von 1,5 Interquartilsabständen und enden beim letzten Wert, der noch innerhalb dieses Abstandes liegt. Extreme Ausreißer werden von den Antennen nicht erfasst (Falk et al. 2002).

2.13.2.1 Signifikanzbestimmung

Die Boxplot-Diagramme unter 3.3 stellen jeweils zwei Verteilungen dar, die der Werte aus dem Normalgewebe und die derer aus dem Probengewebe. Um die Signifikanz der Übereinstimmung dieser beider Verteilungen zu analysieren, wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet. Dieser nichtparametrische statistische Test ist dazu geeignet zu überprüfen, inwieweit bei zwei Verteilungen eine dazu tendiert höhere Werte zu zeigen als die andere oder ob beide Verteilungen zum selben Kollektiv gehören (Siegel 1985).

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse aus der mittels Immunhistochemie und RT-qPCR durchgeführten Analyse der in Tabelle 5 aufgeführten Patientenproben präsentiert. Ergänzend werden die Ergebnisse der zugehörigen Korrelationsberechnungen aufgeführt und Gruppeneinteilungen vorgenommen.

3.1 Ergebnisse der histologischen Auswertung

Tabelle 10 zeigt eine Auflistung der in die vorliegende Studie eingeschlossenen Fälle mit den Ergebnissen der histologischen Klassifizierung, die im Rahmen dieser Arbeit erfolgt ist.

Tabelle 10: In die Studie eingeschlossene Fälle

Fall- nummer	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Neuroblastome
	1=männlich	in Jahren	Diagnose nach INPC
	2=weiblich		
1	2	8	Stromareiches Ganglioneuroblastom, Typ intermixed
2	1	5	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
3	1	1	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
4	1	3	Atypisches noduläres Ganglioneuroblastom
5	2	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
6	2	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
7	2	9	Reifendes Ganglioneurom
8	2	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
9	1	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
10	2	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
11	1	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
12	1	3	Stromaarmes Neuroblastom, undifferenziert
13	1	1	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
14	1	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
15	2	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
16	2	1	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
17	1	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
18	1	0	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
19	1	4	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
20	2	1	Stromaarmes Neuroblastom, gering differenziert
			Rhabdomyosarkome (RMS)
			Histopathologische Diagnose
21	2	7	RMS, embryonaler Subtyp
22	2	14	RMS, embryonaler Subtyp
23	2	6	RMS, embryonaler Subtyp
24	2	4	RMS, embryonaler Subtyp
25	1	60	RMS, embryonaler Subtyp
26	2	87	RMS, embryonaler Subtyp
27	2	75	RMS, embryonaler Subtyp
28	1	49	RMS, embryonaler Subtyp
29	2	39	RMS, alveolärer Subtyp
30	1	2	RMS, embryonaler Subtyp
31	1	6	RMS, embryonaler Subtyp
32	2	5	RMS, alveolärer Subtyp
33	1	49	RMS, embryonaler Subtyp
34	1	67	RMS, embryonaler Subtyp
35	2	7	RMS, alveolärer Subtyp
36	1	16	RMS, alveolärer Subtyp
37	1	6	RMS, alveolärer Subtyp
38	1	82	RMS, alveolärer Subtyp
39	2	24	RMS, alveolärer Subtyp

3.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Wie unter 2.11.2 beschrieben, wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte mikroskopisch beurteilt und nach verschiedenen Arten der Anfärbung (membranös, zytoplasmatisch, nukleär, Anfärbung der Golgi-Apparate) untersucht. Abbildung 2 zeigt Beispiele für die verschiedenen Anfärbungsarten.

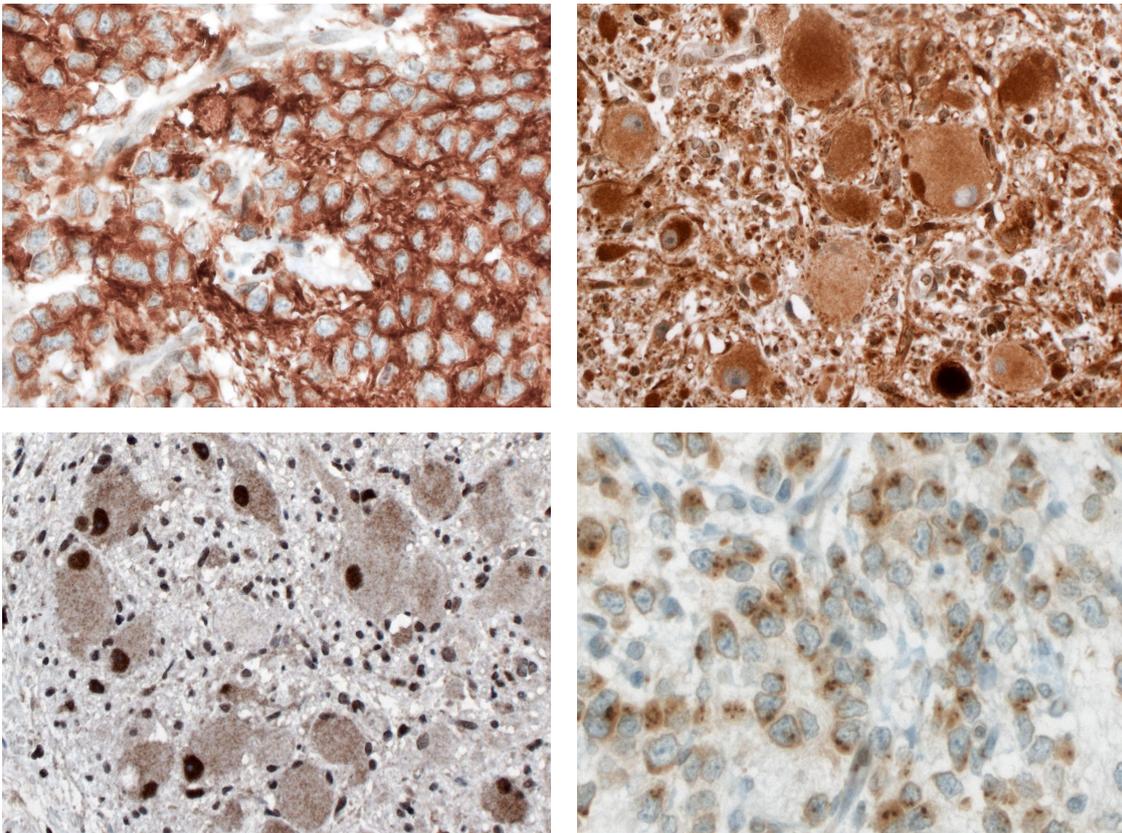


Abbildung 2:
Exemplarische Darstellung der verschiedenen Anfärbungsarten in vier Fällen
Links oben: Membranöse Anfärbung (IHH), Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x
Rechts oben: Zytoplasmatische Anfärbung (IHH), Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 200x
Links unten: Nukleäre Anfärbung (SUFU), Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 200x
Rechts unten: Anfärbung der Golgi-Apparate (SHH), Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

Am Ende der Evaluation von Färbeintensität und –anteil steht der Immunoreactivity Score (IRS), dessen Wert 0, 1, 3, 4, 6, 8, 9 und 12 sein kann. In den Ergebnistabellen weiter unten wurden die Abstufungen der IRS-Werte mit einem Farbcode visualisiert (12=dunkelbraun, 8/9=braun, 4/6=hellbraun, 1/3=beige). Im Folgenden werden exemplarisch für jede Antikörper-Färbung drei ausgewählte Fälle in 400-facher Vergrößerung gezeigt.

3.2.1 Neuroblastome

3.2.1.1 Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung

3.2.1.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (NB)

Die drei ausgewählten Neuroblastomfälle (Fallnummer 1, 2 und 10) werden zum Vergleich zunächst in HE-Färbung gezeigt (Abbildung 3). Bei Fallnummer 1 handelt es sich um ein Ganglioneuroblastom, dessen große Ganglienzellen gut für die Beobachtung zytoplasmatischer Anfärbung geeignet sind. Die Fälle Nr. 2 und 10 sind stromaarme, gering differenzierte Neuroblastome.

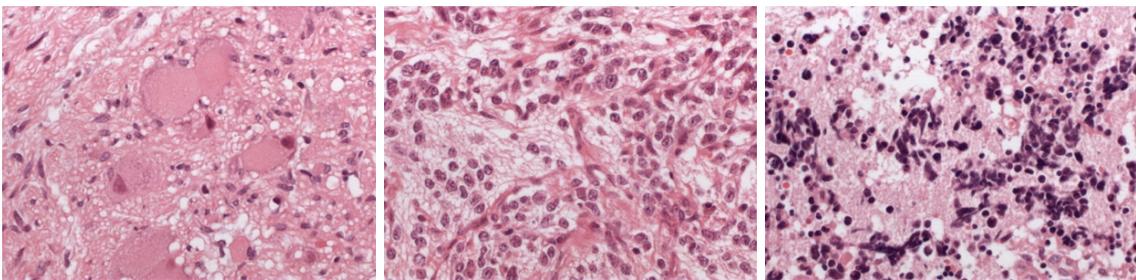


Abbildung 3:
Exemplarische Darstellung der HE-Färbung in drei Fällen
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

3.2.1.1.2 CD56 (NB)

Alle der untersuchten Neuroblastomfälle waren in der Antikörperfärbung positiv für das Oberflächenantigen CD56, einige zeigten eine besonders starke Anfärbung (Abbildung 4).

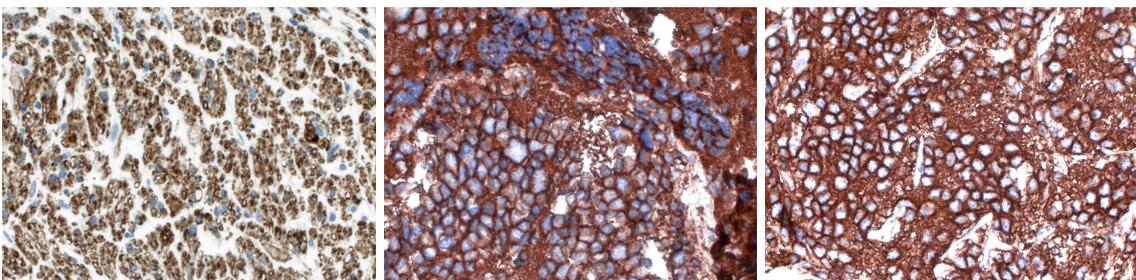


Abbildung 4:
Exemplarische Darstellung der Immunhistochemischen Färbung von CD56 in drei Fällen
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

3.2.1.1.3 Ki-67 (NB)

Auch in der Färbung des Proteins Ki-67 (Abbildung 5), das als Proliferationsmarker eingesetzt wird, waren alle Neuroblastom-Gewebeproben positiv. Es wurde der bei 200-facher Vergrößerung geschätzte Anteil der gefärbten Tumorzellkerne an der Gesamtheit der Tumorzellkerne im Gesichtsfeld, ausgedrückt in Prozent, festgehalten (Tabelle 11).

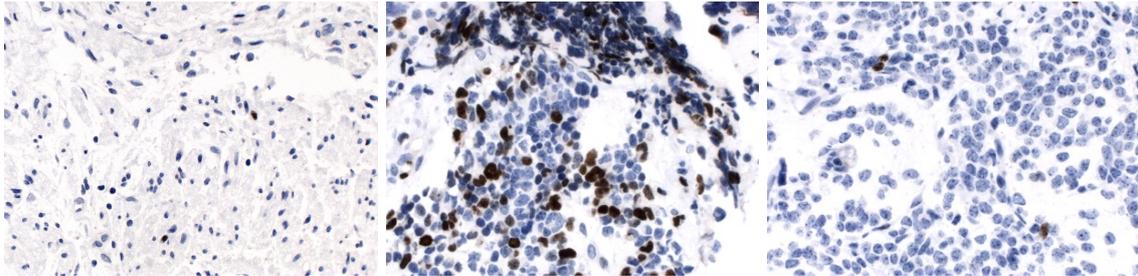


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der IHC-Färbung von Ki-67 in drei Fällen
 Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 200x
 Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x
 Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 11: Werte für die immunhistochemische Färbung von Ki-67 (NB)

Fallnummer	Ki-67
	Anteil gefärbter Tumorzellen in %
	(5er-Schritte)
1	10
2	15
3	35
4	5
5	5
6	20
7	80
8	15
9	50
10	5
11	20
12	15
13	10
14	5
15	5
16	5
17	40
18	10
19	10
20	10

3.2.1.1.4 SHH (NB)

Die Antikörperfärbung von SHH (Abbildung 6) zeigte bei den Neuroblastomfällen eine ausschließlich auf Zytoplasma und Golgi-Apparate beschränkte Positivität für SHH. Auffällig war die relativ starke Anfärbung insbesondere der Golgi-Apparate in der Mehrzahl der Fälle. Eine nukleäre oder membranöse Anfärbung von SHH konnte nicht beobachtet werden, wie Tabelle 12 veranschaulicht.

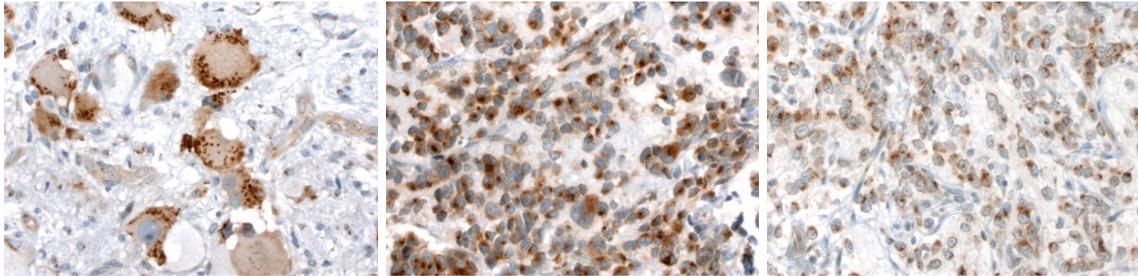


Abbildung 6:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SHH in drei Fällen
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 12: Werte für die immunhistochemische Färbung von SHH (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	SHH											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
1	0	0	0	2	4	8	0	0	0	3	4	12
2	0	0	0	2	4	8	0	0	0	2	4	8
3	0	0	0	1	4	4	0	0	0	2	4	8
4	0	0	0	1	2	2	0	0	0	2	3	6
5	0	0	0	2	4	8	0	0	0	3	4	12
6	0	0	0	1	4	4	0	0	0	2	4	8
7	0	0	0	3	4	12	0	0	0	3	4	12
8	0	0	0	1	4	4	0	0	0	3	4	12
9	0	0	0	1	4	4	0	0	0	2	4	8
10	0	0	0	1	4	4	0	0	0	2	4	8
11	0	0	0	1	4	4	0	0	0	2	4	8
12	0	0	0	1	4	4	0	0	0	1	2	2
13	0	0	0	2	4	8	0	0	0	2	4	8
14	0	0	0	1	4	4	0	0	0	2	4	8
15	0	0	0	2	4	8	0	0	0	3	4	12
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	9
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	6
18	0	0	0	1	2	2	0	0	0	2	3	6
19	0	0	0	1	3	3	0	0	0	3	4	12
20	0	0	0	1	4	4	0	0	0	1	1	1

3.2.1.1.5 DHH (NB)

Die DHH-Färbung (Abbildung 7) zeigte sich bei den Neuroblastomen vor allem zytoplasmatisch und nukleär, wobei die zytoplasmatische Anfärbung die nukleäre in Intensität und Anteil deutlich überwog (Tabelle 13).

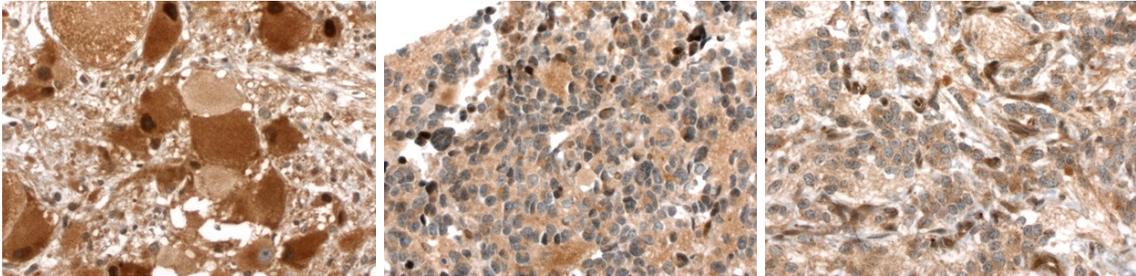


Abbildung 7:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von DHH in drei Fällen
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 13: Werte für die immunhistochemische Färbung von DHH (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	DHH											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
1	0	0	0	3	4	12	2	3	6	0	0	0
2	0	0	0	2	4	8	2	3	6	0	0	0
3	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
4	0	0	0	2	3	6	2	4	8	0	0	0
5	0	0	0	2	4	8	2	2	4	0	0	0
6	0	0	0	2	4	8	1	1	1	0	0	0
7	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
8	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
9	0	0	0	2	4	8	2	4	8	2	3	6
10	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
11	0	0	0	2	4	8	1	1	1	0	0	0
12	0	0	0	1	3	3	2	3	6	0	0	0
13	0	0	0	3	4	12	1	1	1	0	0	0
14	0	0	0	2	4	8	1	1	1	0	0	0
15	0	0	0	2	4	8	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	2	4	8	3	3	9	0	0	0
17	0	0	0	3	3	9	2	4	8	0	0	0
18	0	0	0	2	4	8	2	4	8	0	0	0
19	0	0	0	2	4	8	1	3	3	0	0	0
20	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0

3.2.1.1.6 IHH (NB)

In der IHH-Färbung (Abbildung 8) fiel eine membranöse Komponente in elf von 20 Neuroblastomfällen auf. Die zytoplasmatische Anfärbung überwog auch hier wieder deutlich die nukleäre. Eine Anfärbung der Golgi-Apparate war nicht zu beobachten (Tabelle 14).

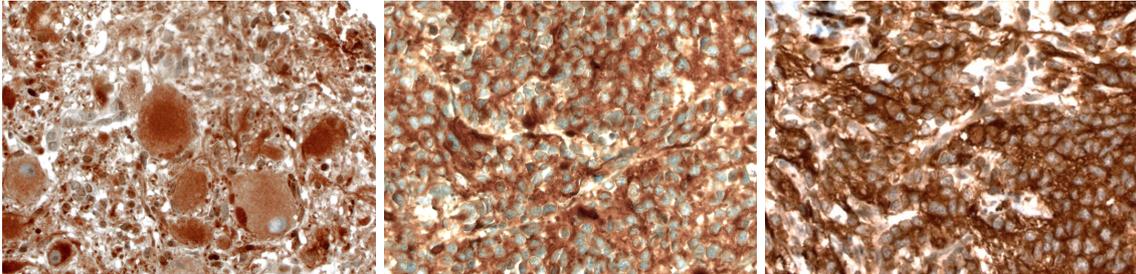


Abbildung 8:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von IHH in drei Fällen
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 14: Werte für die immunhistochemische Färbung von IHH (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	IHH											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
1	0	0	0	3	4	12	1	2	2	0	0	0
2	0	0	0	3	4	12	2	3	6	0	0	0
3	2	4	8	2	4	8	1	4	4	0	0	0
4	2	2	4	2	4	8	1	3	3	0	0	0
5	1	4	4	3	4	12	1	4	4	0	0	0
6	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
7	0	0	0	3	4	12	0	0	0	0	0	0
8	1	2	2	3	4	12	2	4	8	0	0	0
9	1	2	2	2	4	8	2	4	8	0	0	0
10	2	4	8	3	4	12	0	0	0	0	0	0
11	1	4	4	3	4	12	1	4	4	0	0	0
12	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
13	0	0	0	2	4	8	1	1	1	0	0	0
14	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
15	0	0	0	2	4	8	0	0	0	0	0	0
16	2	3	6	3	4	12	0	0	0	0	0	0
17	2	2	4	2	3	6	2	4	8	0	0	0
18	0	0	0	3	4	12	1	2	2	0	0	0
19	2	2	4	2	4	8	1	3	3	0	0	0
20	3	2	6	2	4	8	2	2	4	0	0	0

3.2.1.1.7 SMO (NB)

Eine relativ gleichmäßige, durchgängige Anfärbbarkeit zeigte SMO (Abbildung 9) zytoplasmatisch bei den Neuroblastomen. Die nukleäre Anfärbung fiel schwach, teilweise negativ aus (Tabelle 15).

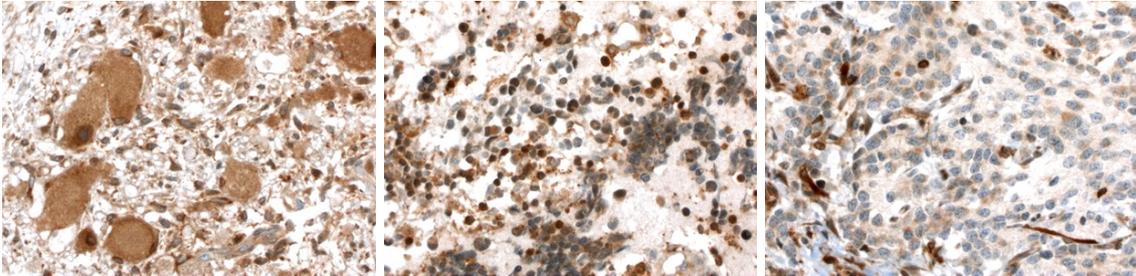


Abbildung 9:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SMO in drei Fällen
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 15: Werte für die immunhistochemische Färbung von SMO (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	SMO											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
1	0	0	0	2	4	8	1	3	3	0	0	0
2	0	0	0	2	4	8	1	4	4	0	0	0
3	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
4	0	0	0	1	3	3	1	1	1	0	0	0
5	0	0	0	1	4	4	2	2	4	0	0	0
6	0	0	0	1	4	4	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	2	4	8	1	1	1	0	0	0
8	0	0	0	2	4	8	1	3	3	0	0	0
9	0	0	0	2	3	6	2	3	6	0	0	0
10	0	0	0	1	3	3	1	4	4	0	0	0
11	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
12	0	0	0	1	3	3	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	2	4	8	1	1	1	0	0	0
14	0	0	0	1	4	4	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	2	4	8	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	1	3	3	2	3	6	0	0	0
17	0	0	0	1	3	3	1	3	3	0	0	0
18	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	2	4	8	1	3	3	0	0	0
20	0	0	0	3	4	12	1	2	2	0	0	0

3.2.1.1.8 SUFU (NB)

Die Färbung von SUFU (Abbildung 10) zeigte sich durchgängig nukleär und zytoplasmatisch (Tabelle 16).

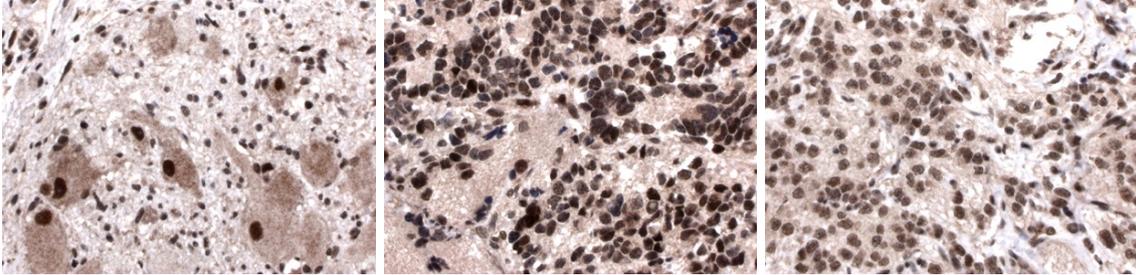


Abbildung 10:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SUFU in drei Fällen
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 16: Werte für die immunhistochemische Färbung von SUFU (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	SUFU											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
1	0	0	0	1	4	4	3	3	9	0	0	0
2	0	0	0	1	4	4	3	4	12	0	0	0
3	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
4	0	0	0	1	2	2	2	4	8	0	0	0
5	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
6	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
7	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
8	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
9	0	0	0	1	4	4	1	3	3	0	0	0
10	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
11	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
12	0	0	0	1	2	2	1	1	1	0	0	0
13	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
14	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
15	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
16	0	0	0	2	4	8	3	4	12	0	0	0
17	0	0	0	1	3	3	3	4	12	0	0	0
18	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
19	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
20	0	0	0	1	4	4	3	3	9	0	0	0

3.2.1.2 Korrelation der Ergebnisse der einzelnen Antikörperfärbungen (NB)

Zur Korrelationsberechnung mit IRS-Werten wurde ausschließlich die zytoplasmatische Färbintensität der jeweiligen Antikörperfärbung berücksichtigt. Wie aus Tabelle 17 ersichtlich, bestehen statistisch signifikante positive Korrelationen zwischen den immunhistochemisch erhobenen Werten für SMO und SHH ($p=0,0071$) sowie für SUFU und IHH ($p=0,028$). Die restlichen Werte zeigen ebenfalls durchweg positive, jedoch nicht signifikante Korrelationen.

Tabelle 17: Spearmans ρ für die interne Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse (NB; * = $p<0,05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Genexpression Proteinebene	Genexpression Proteinebene	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit $> \rho $
DHH	SHH	0,2179	0,3561
IHH	SHH	0,2344	0,3198
IHH	DHH	0,1975	0,4039
SMO	SHH	0,5821	0,0071*
SMO	DHH	0,1218	0,6090
SMO	IHH	0,1284	0,5894
SUFU	SHH	0,1708	0,4715
SUFU	DHH	0,2822	0,2281
SUFU	IHH	0,4908	0,0280*
SUFU	SMO	0,2964	0,2045

3.2.1.3 Korrelation der IHC-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf (NB)

Tabelle 18 gibt zunächst die klinischen Verlaufsdaten für jeden Neuroblastomfall wieder und ordnet ihnen die jeweiligen IHC-Ergebnisse zu.

Tabelle 19 zeigt, dass signifikante Korrelationen zwischen klinischen Verlaufsdaten und IHC-Ergebnissen bei den Neuroblastomfällen nicht beobachtet werden konnten. Es fällt jedoch auf, dass der Gegenregulator SUFU deutlich negativ mit den Verlaufsfaktoren Rezidiv und Tod korreliert. Dies kann ein Hinweis auf eine tumorwachstumssupprimierende Funktion von SUFU sein.

Tabelle 18: Klinische Verlaufsdaten und IHC-Ergebnisse (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Rezidiv	Tod	SHH	DHH	IHH	SMO	SUFU
	1=männlich 2=weiblich	in Jahren	0=nein 1=ja	0=nein 1=ja	Zyto- plas- matisch IRS	Zyto- plas- matisch IRS	Zyto- plas- matisch IRS	Zyto- plas- matisch IRS	Zyto- plas- matisch IRS
1	2	8	0	0	8	12	12	8	4
2	1	5	1	1	8	8	12	8	4
3	1	1	0	0	4	8	8	8	4
4	1	3	1	1	2	6	8	3	2
5	2	0	0	0	8	8	12	4	4
6	2	0	0	0	4	8	4	4	4
7	2	9	0	0	12	8	12	8	4
8	2	0	0	0	4	8	12	8	4
9	1	0	0	0	4	8	8	6	4
10	2	0	0	0	4	8	12	3	4
11	1	0	0	0	4	8	12	8	4
12	1	3	0	0	4	3	4	3	2
13	1	1	0	0	8	12	8	8	4
14	1	0	0	0	4	8	4	4	4
15	2	0	0	0	8	8	8	8	4
16	2	1	0	0	0	8	12	3	8
17	1	0	0	0	0	9	6	3	3
18	1	0	0	0	2	8	12	1	4
19	1	4	0	0	3	8	8	8	4
20	2	1	0	0	4	4	8	12	4

Tabelle 19: Spearmans ρ für die Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse (nur zytoplasmatische Anfärbung) mit klinischen Verlaufsdaten (NB)

Genexpression Proteinebene	Klinischer Verlaufparameter	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit > ρ
SHH	Geschlecht	0,3320	0,1528
SHH	Alter bei Diagnose	0,2460	0,2959
SHH	Rezidiv	-0,0153	0,9490
SHH	Tod	-0,0153	0,9490
DHH	Geschlecht	0,0108	0,9641
DHH	Alter bei Diagnose	-0,0896	0,7071
DHH	Rezidiv	-0,2674	0,2544
DHH	Tod	-0,2674	0,2544
IHH	Geschlecht	0,3655	0,1130
IHH	Alter bei Diagnose	0,1215	0,6098
IHH	Rezidiv	0,0933	0,6958
IHH	Tod	0,0933	0,6958
SMO	Geschlecht	0,1753	0,4596
SMO	Alter bei Diagnose	0,3214	0,1670
SMO	Rezidiv	-0,0612	0,7977
SMO	Tod	-0,0612	0,7977
SUFU	Geschlecht	0,4366	0,0542
SUFU	Alter bei Diagnose	-0,0936	0,6947
SUFU	Rezidiv	-0,3310	0,1540
SUFU	Tod	-0,3310	0,1540

3.2.2 Rhabdomyosarkome

3.2.2.1 Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung

3.2.2.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (RMS)

Zum Vergleich werden die drei ausgewählten Rhabdomyosarkomfälle (Fallnummern 23, 28 und 29) zu Beginn in HE-Färbung gezeigt (Abbildung 11). Bei allen drei Fällen handelt es sich um embryonale Rhabdomyosarkome.

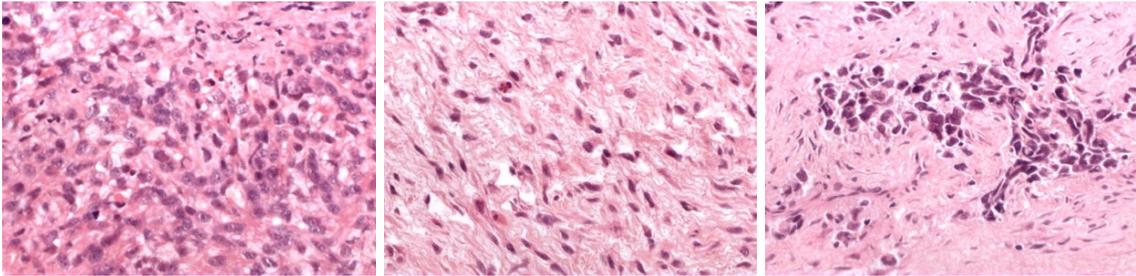


Abbildung 11:
Exemplarische Darstellung der HE-Färbung in drei Fällen
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x

3.2.2.1.2 CD56 (RMS)

Die immunhistochemisch untersuchten Rhabdomyosarkomfälle (Fallnummern 21 bis 39) waren bis auf die Fälle 25, 26 und 27 positiv für CD56 (Abbildung 12).

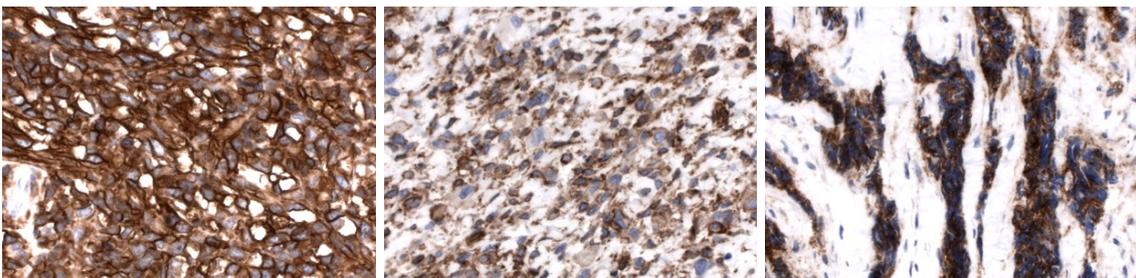


Abbildung 12:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von CD56 in drei Fällen
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x

3.2.2.1.3 Ki-67 (RMS)

In der Immunfärbung des Proliferationsmarkers Ki-67 mit dem Antikörper MIB-1 (Abbildung 13) war der größte Teil der Rhabdomyosarkom-Proben positiv. Es wurde der Anteil der gefärbten Tumorzellkerne an der Gesamtheit der Tumorzellkerne im Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung in Prozent festgehalten (Tabelle 20).

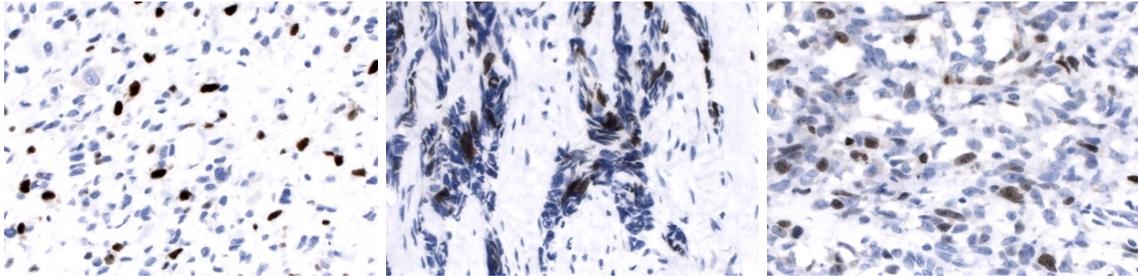


Abbildung 13:
 Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von Ki-67 in drei Fällen
 Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x
 Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x
 Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 20: Prozentuale Anfärbung von Ki-67 in Tumorgewebe (RMS)

Fallnummer	Ki-67
	Anteil gefärbter Tumorzellen in %
	(5er-Schritte)
21	0
22	70
23	35
24	35
25	30
26	20
27	5
28	30
29	25
30	0
31	10
32	20
33	25
34	40
35	0
36	20
37	80
38	30
39	30

3.2.2.1.4 SHH (RMS)

Auch bei den Rhabdomyosarkomen zeigte sich eine Anfärbarkeit von SHH zytoplasmatisch und an den Golgi-Apparaten (Abbildung 14). In Intensität und Anteil überwiegt die Anfärbung der Golgi-Apparate, wie aus Tabelle 21 ersichtlich ist.

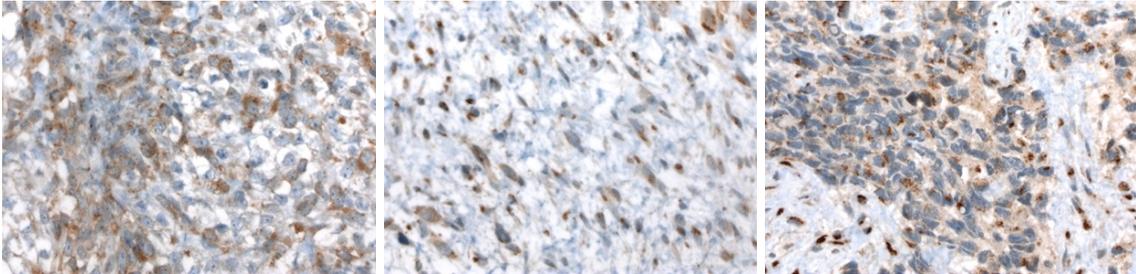


Abbildung 14:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SHH in drei Fällen
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 21: Werte für die immunhistochemische Färbung von SHH (RMS; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	SHH											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
21	0	0	0	1	3	3	0	0	0	1	3	3
22	0	0	0	2	3	6	0	0	0	2	4	8
23	0	0	0	2	3	6	0	0	0	1	2	2
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4
25	0	0	0	1	4	4	0	0	0	3	3	9
26	0	0	0	1	2	2	0	0	0	2	4	8
27	0	0	0	2	4	8	0	0	0	3	4	12
28	0	0	0	2	2	4	0	0	0	2	3	6
29	0	0	0	1	4	4	0	0	0	3	4	12
30	0	0	0	1	2	2	0	0	0	1	3	3
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
32	0	0	0	1	3	3	0	0	0	1	4	4
33	0	0	0	1	4	4	0	0	0	1	4	4
34	0	0	0	1	3	3	0	0	0	1	3	3
35	0	0	0	2	4	8	0	0	0	2	4	8
36	0	0	0	3	4	12	0	0	0	2	4	8
37	0	0	0	2	4	8	0	0	0	2	4	8
38	0	0	0	2	3	6	0	0	0	2	3	6
39	0	0	0	1	3	3	0	0	0	1	3	3

3.2.2.1.5 DHH (RMS)

Vereinzelt zeigte sich in der DHH-Färbung (Abbildung 15) bei den Rhabdomyosarkomfällen eine Positivität der Golgi-Apparate. Die zytoplasmatische Anfärbbarkeit war durchgängig zu beobachten, die nukleäre nicht ganz durchgängig und insgesamt etwas schwächer (Tabelle 22).

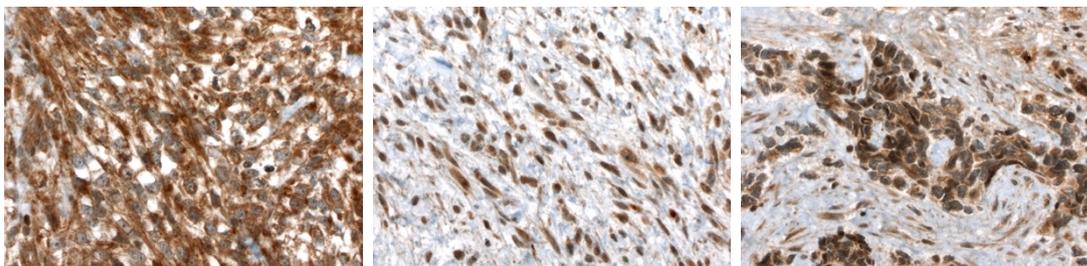


Abbildung 15:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von DHH in drei Fällen
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 22: Werte für die immunhistochemische Färbung von DHH (RMS; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	DHH											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
21	0	0	0	2	4	8	0	0	0	1	2	2
22	0	0	0	2	3	6	1	4	4	1	2	2
23	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
24	0	0	0	1	4	4	1	3	3	0	0	0
25	0	0	0	2	4	8	1	4	4	1	2	2
26	0	0	0	2	4	8	1	4	4	0	0	0
27	0	0	0	2	4	8	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	2	4	8	1	3	3	0	0	0
29	0	0	0	3	4	12	3	4	12	0	0	0
30	0	0	0	1	3	3	1	4	4	0	0	0
31	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
32	0	0	0	2	3	6	2	4	8	0	0	0
33	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
34	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
35	0	0	0	1	4	4	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	2	4	8	1	3	3	0	0	0
37	0	0	0	3	4	12	2	3	6	0	0	0
38	0	0	0	2	4	8	2	4	8	0	0	0
39	0	0	0	1	4	4	1	4	4	1	2	2

3.2.2.1.6 IHH (RMS)

Auch bei den Rhabdomyosarkomen fiel die IHH-Färbung kräftig aus (Abbildung 16). In vereinzelten Fällen zeigte sich eine membranöse Anfärbung. Anders als bei den Neuroblastomen überwog die nukleäre Färbung die zytoplasmatische, eine Anfärbung der Golgi-Apparate war nicht zu beobachten (Tabelle 23).

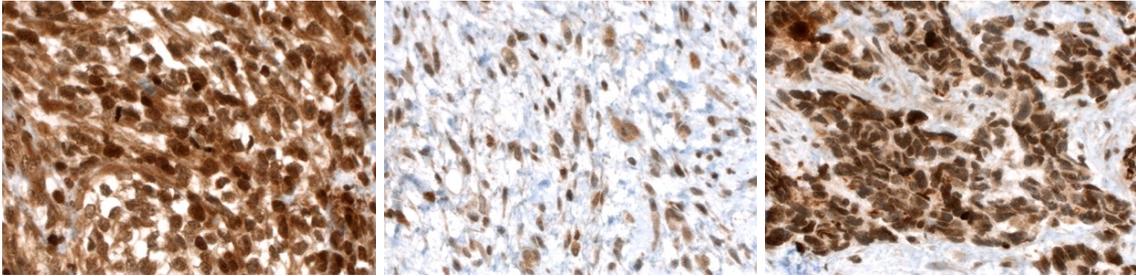


Abbildung 16:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von IHH in drei Fällen
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 23: Werte für die immunhistochemische Färbung von IHH
(RMS; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	IHH											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
21	1	3	3	1	4	4	3	4	12	0	0	0
22	0	0	0	1	3	3	3	4	12	0	0	0
23	0	0	0	2	4	8	3	4	12	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	2	4	8	0	0	0
25	2	2	4	1	4	4	1	2	2	0	0	0
26	0	0	0	1	4	4	3	3	9	0	0	0
27	1	3	3	1	4	4	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	2	3	6	2	4	8	0	0	0
29	0	0	0	2	4	8	2	4	8	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	1	4	4	0	0	0
31	0	0	0	1	3	3	2	4	8	0	0	0
32	0	0	0	2	4	8	3	4	12	0	0	0
33	2	3	0	3	2	6	1	3	3	0	0	0
34	0	0	0	2	2	4	2	2	4	0	0	0
35	0	0	0	1	4	4	2	3	6	0	0	0
36	0	0	0	1	4	4	3	4	12	0	0	0
37	0	0	0	2	3	6	1	2	2	0	0	0
38	0	0	0	1	4	4	1	3	3	0	0	0
39	2	2	4	1	4	4	1	4	4	0	0	0

3.2.2.1.7 SMO (RMS)

Die Immunfärbung von SMO in den Rhabdomyosarkom-Proben (Abbildung 17) zeigte eine durchgängige zytoplasmatische und eine schwächere nukleäre Anfärbbarkeit in 12 von 19 Fällen (Tabelle 24).

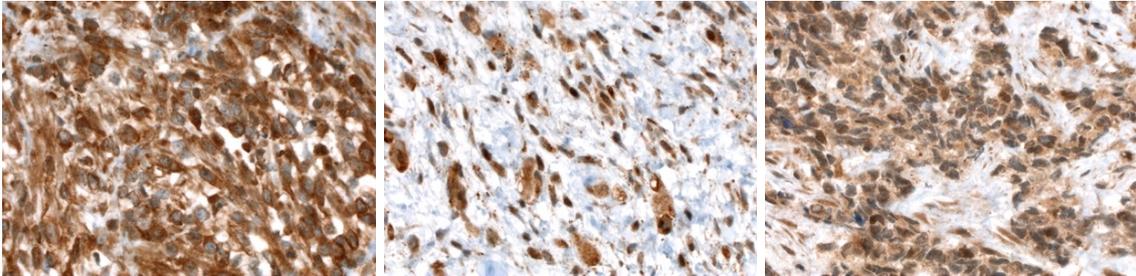


Abbildung 17:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SMO in drei Fällen
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 24: Werte für die immunhistochemische Färbung von SMO (RMS; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	SMO											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
21	0	0	0	2	3	6	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	2	4	8	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	2	4	8	1	3	3	0	0	0
24	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
25	0	0	0	1	4	4	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	3	2	6	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	3	4	12	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	2	3	6	1	4	4	0	0	0
29	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
30	0	0	0	1	3	3	1	2	2	0	0	0
31	0	0	0	1	3	3	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	1	3	3	1	3	3	0	0	0
33	0	0	0	1	3	3	1	3	3	0	0	0
34	0	0	0	2	3	6	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	2	4	8	1	2	2	0	0	0
36	0	0	0	2	3	6	1	1	1	0	0	0
37	0	0	0	2	4	8	2	3	6	0	0	0
38	0	0	0	1	4	4	1	3	3	0	0	0
39	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0

3.2.2.1.8 SUFU (RMS)

Bei der Antikörperfärbung von SUFU (Abbildung 18) fielen teils kräftige zytoplasmatische wie nukleäre Anfärbungen in allen Rhabdomyosarkom-Proben auf, wie Tabelle 25 zeigt.

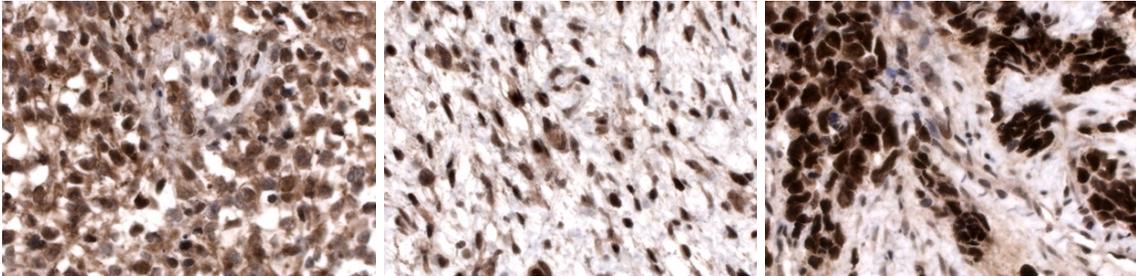


Abbildung 18:
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SUFU in drei Fällen
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x

Tabelle 25: Werte für die immunhistochemische Färbung von SUFU (RMS; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	SUFU											
	Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi		
	Inten- sität	Anteil	IRS									
21	0	0	0	1	4	4	3	4	12	0	0	0
22	0	0	0	1	3	3	3	4	12	0	0	0
23	0	0	0	3	4	12	2	4	8	0	0	0
24	0	0	0	1	4	4	3	4	12	0	0	0
25	0	0	0	2	4	8	1	4	4	0	0	0
26	0	0	0	1	4	4	1	4	4	0	0	0
27	0	0	0	2	4	8	1	4	4	0	0	0
28	0	0	0	2	4	8	2	4	8	0	0	0
29	0	0	0	1	3	3	3	4	12	0	0	0
30	0	0	0	2	2	4	1	3	3	0	0	0
31	0	0	0	1	4	4	2	3	6	0	0	0
32	0	0	0	2	3	6	3	4	12	0	0	0
33	0	0	0	1	3	3	3	3	9	0	0	0
34	0	0	0	1	3	3	1	2	2	0	0	0
35	0	0	0	1	4	4	2	4	8	0	0	0
36	0	0	0	3	4	12	2	4	8	0	0	0
37	0	0	0	3	4	12	3	4	12	0	0	0
38	0	0	0	2	3	6	1	3	3	0	0	0
39	0	0	0	2	4	8	3	4	12	0	0	0

3.2.2.2 Korrelation der Ergebnisse der einzelnen Antikörperfärbungen (RMS)

Bei den Rhabdomyosarkomen ergeben sich statistisch signifikante positive Korrelationen zwischen den immunhistochemisch ermittelten Werten für IHH und DHH ($p=0,0160$), für SMO und SHH ($p=0,0028$) und für SMO und DHH ($p=0,0411$), siehe Tabelle 26. Auch hier wurden zur Korrelationsberechnung nur die zytoplasmatischen Werte der jeweiligen Antikörperfärbung berücksichtigt (siehe 3.2.1.2).

Tabelle 26: Spearmans ρ für die interne Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse (RMS; * = $p < 0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Genexpression Proteinebene	Genexpression Proteinebene	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit $> \rho $
DHH	SHH	0,4437	0,0571
IHH	SHH	0,3669	0,1223
IHH	DHH	0,5443	0,0160*
SMO	SHH	0,6466	0,0028*
SMO	DHH	0,4725	0,0411*
SMO	IHH	0,1039	0,6721
SUFU	SHH	0,4311	0,0654
SUFU	DHH	0,3087	0,1985
SUFU	IHH	0,2691	0,2653
SUFU	SMO	0,2972	0,2165

3.2.2.3 Korrelation der IHC-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf (RMS)

Die klinischen Verlaufsdaten bezüglich der Rhabdomyosarkomfälle konnten auf Grund fehlender Informationen leider nicht vollständig zusammengestellt werden. Tabelle 27 zeigt alle verfügbaren klinischen Verlaufsdaten und die zugehörigen IHC-Ergebnisse. Es ergeben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen klinischen Verlaufsdaten und IHC-Ergebnissen, wie Tabelle 28 zeigt. Analog zu 3.2.1.3 zeigt sich auch bei den Rhabdomyosarkomen eine deutliche negative Korrelation des Inhibitors SUFU mit den Verlaufsparemtern Rezidiv und Tod.

Tabelle 27: Klinische Verlaufsdaten und Immunhistochemie-Ergebnisse (RMS; IRS = Immunoreactivity Score; k. A. = keine Angabe)

Fallnummer	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Rezidiv	Tod	SHH	DHH	IHH	SMO	SUFU
	1=männlich 2=weiblich	in Jahren	0=nein 1=ja	0=nein 1=ja	Zytoplas-matisch	Zytoplas-matisch	Zytoplas-matisch	Zytoplas-matisch	Zytoplas-matisch
					IRS	IRS	IRS	IRS	IRS
21	2	7	0	0	3	8	4	6	4
22	2	14	1	1	6	6	3	8	3
23	2	6	0	0	6	8	8	8	12
24	2	4	k. A.	k. A.	0	4	0	4	4
25	1	60	k. A.	k. A.	4	8	4	4	8
26	2	87	k. A.	k. A.	2	8	4	6	4
27	2	75	k. A.	k. A.	8	8	4	12	8
28	1	49	k. A.	k. A.	4	8	6	6	8
29	2	39	k. A.	k. A.	4	12	8	4	3
30	1	2	0	0	2	3	0	3	4
31	1	6	1	0	0	4	3	3	4
32	2	5	k. A.	k. A.	3	6	8	3	6
33	1	49	k. A.	k. A.	4	4	6	3	3
34	1	67	k. A.	k. A.	3	8	4	6	3
35	2	7	0	1	8	4	4	8	4
36	1	16	1	1	12	8	4	6	12
37	1	6	0	0	8	12	6	8	12
38	1	82	k. A.	k. A.	6	8	4	4	6
39	2	24	k. A.	k. A.	3	4	4	4	8

Tabelle 28: Spearmans ρ für die Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse mit klinischen Verlaufsdaten (RMS)

Genexpression Proteinebene	Klinischer Verlaufparameter	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit $> \rho $
SHH	Alter bei Diagnose	0,2331	0,3369
SHH	Tod	0,6273	0,0959
DHH	Alter bei Diagnose	0,4409	0,0589
DHH	Rezidiv	0,1162	0,7841
DHH	Tod	-0,1162	0,7841
IHH	Alter bei Diagnose	0,1542	0,5286
IHH	Rezidiv	-0,4067	0,3174
IHH	Tod	-0,1162	0,7841
SMO	Alter bei Diagnose	0,2069	0,3953
SMO	Rezidiv	-0,2434	0,5613
SMO	Tod	0,3651	0,3738
SUFU	Alter bei Diagnose	-0,0687	0,7800
SUFU	Rezidiv	-0,2469	0,5556
SUFU	Tod	-0,2469	0,5556

3.2.3 Grafische Gesamtdarstellung der IHC-Ergebnisse

In Tabelle 29 werden die Ergebnisse aus der Immunfärbung der zum Hedgehog-Signalweg gehörigen Proteine zur Übersicht grafisch mittels des in dieser Arbeit für die Visualisierung von IHC-Ergebnissen verwendeten Farbcodes dargestellt.

Tabelle 29: Grafische Gesamtdarstellung der Immunhistochemie-Ergebnisse (IRS = Immunoreactivity Score)

Legende		IRS-Wert 12				IRS-Wert 8-9				IRS-Wert 4-6				IRS-Wert 1-3							
Neuroblastome																					
Fallnummer		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
SHH	Zytoplasmatisch	12	12	8-9	8-9	8-9	8-9	12	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SHH	Golgi	12	12	8-9	8-9	12	8-9	12	12	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	12	8-9	8-9	8-9	8-9
DHH	Zytoplasmatisch	12	12	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
DHH	Nukleär	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
IHH	Zytoplasmatisch	12	12	8-9	8-9	8-9	8-9	12	12	8-9	8-9	12	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
IHH	Nukleär	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
IHH	Membranös	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SMO	Zytoplasmatisch	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SMO	Nukleär	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SUFU	Zytoplasmatisch	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SUFU	Nukleär	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	12	8-9	8-9	8-9	8-9
Rhabdomyosarkome																					
Fallnummer		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
SHH	Zytoplasmatisch	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	12	8-9	8-9	8-9	8-9
SHH	Golgi	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
DHH	Zytoplasmatisch	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
DHH	Nukleär	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
IHH	Zytoplasmatisch	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
IHH	Nukleär	12	12	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
IHH	Membranös	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SMO	Zytoplasmatisch	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SMO	Nukleär	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SUFU	Zytoplasmatisch	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9
SUFU	Nukleär	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	8-9	12	8-9	8-9	8-9	8-9

3.3 Ergebnisse der RT-qPCR-Analyse

Zusätzlich zur Proteinexpression sollten die mRNA-Level der HH-Moleküle untersucht werden. Die zur Auswertung benutzte $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode dient der relativen Quantifizierung der mittels RT-qPCR generierten PCR-Produkte. Als Referenzgen diente das Housekeeping-Gen TBP. Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode liefert als Ergebnis für jede getestete Probe einen Faktor (den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert), der die x-fache mRNA-Menge im Vergleich zum Kalibrator (hier Normalgewebe) angibt. Zur Normalisierung der Werte aus den Tumorzellen in Bezug auf Normalgewebe wurden für die Neuroblastomfälle drei Referenzproben von humanem Hirngewebe benutzt, für die Rhabdomyosarkomfälle drei Proben aus humanem Skelettmuskelgewebe. Für jede der beiden Gruppen wurde der Mittelwert aus den $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten der drei Referenzproben als Kalibrator verwendet. Ergebnisse mit Ct-Werten in der RT-qPCR der TBP-Amplifikation von über 35 Zyklen wurden nicht verwendet, da dies auf eine schlechte Amplifizierbarkeit der RNA hindeutet und keine zuverlässige Aussage erlaubt. Leerstellen innerhalb der Diagramme sind auf die Entfernung nicht verwertbarer Messergebnisse zurückzuführen, während $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von 0 einen nicht gelungenen Nachweis von mRNA in der jeweiligen Gewebeprobe bezeichnen. Die Abbildungen 19 bis 34 zeigen die Ergebnisse der RT-qPCR-Analyse.

3.3.1 Neuroblastome

3.3.1.1 SHH (NB)

Abbildung 19 zeigt die RT-qPCR-Ergebnisse für SHH bei den Neuroblastomen. Die Mehrheit der Fälle war negativ für SHH-mRNA. Die wenigen positiven Fälle zeigen im Vergleich der Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

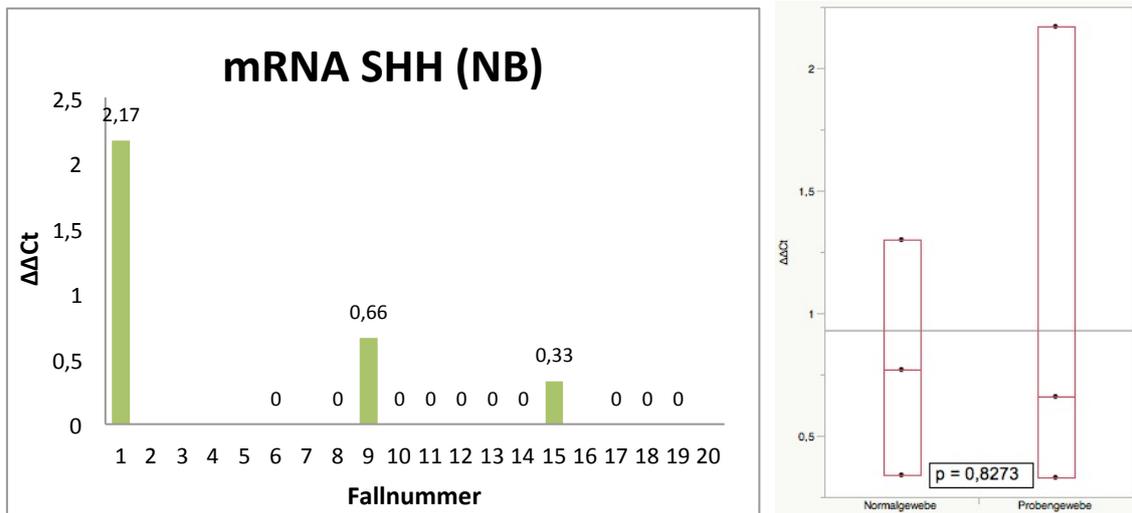


Abbildung 19: RT-qPCR-Ergebnisse für SHH (NB)
 Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt
 Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.1.2 DHH (NB)

In Abbildung 20 werden die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte für DHH-mRNA in den Neuroblastomfällen dargestellt. Bei meist negativen bis schwach positiven Ergebnissen stehen die Fälle 1 und 13 mit stark erhöhten Werten hervor.

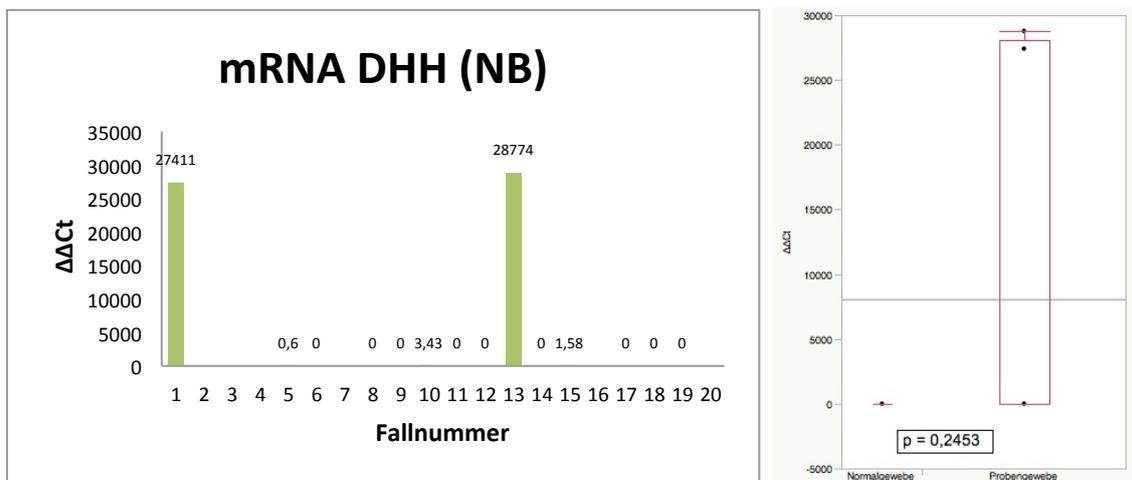


Abbildung 20: RT-qPCR-Ergebnisse für DHH (NB)
 Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt
 Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.1.3 IHH (NB)

Bei der RT-qPCR-Analyse der Neuroblastomfälle auf IHH-mRNA fallen bei weitgehend negativen Ergebnissen drei Fälle mit leicht positiven $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten auf, die im Vergleich der Gruppen keinen signifikanten Unterschied zeigen (siehe Abbildung 21).

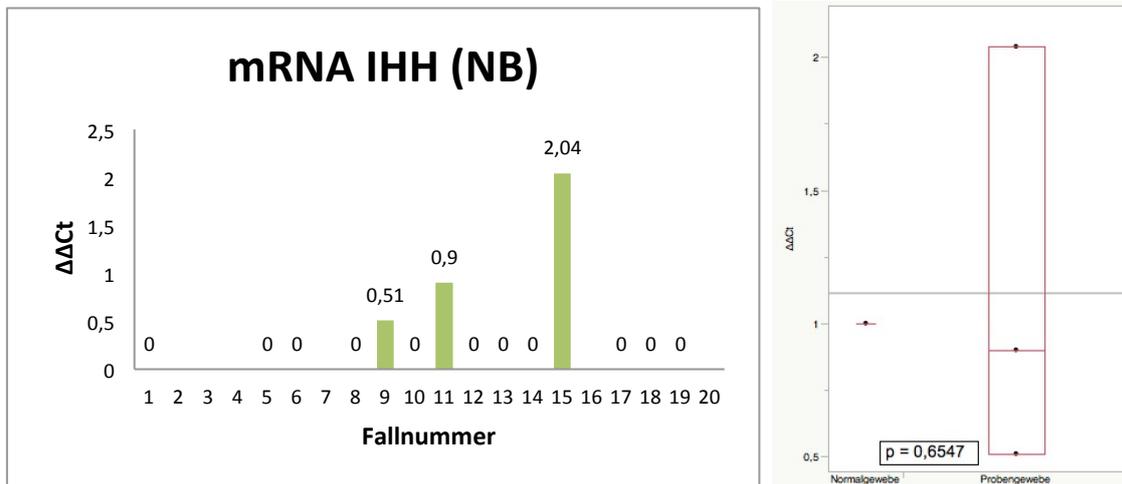


Abbildung 21: RT-qPCR-Ergebnisse für IHH (NB)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.1.4 PTCH1 (NB)

Wie Abbildung 22 zeigt, ergaben sich für PTCH1-mRNA fast durchgehend positive $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte, die Verteilung innerhalb der Vergleichsgruppen weist keine signifikanten Unterschiede auf.

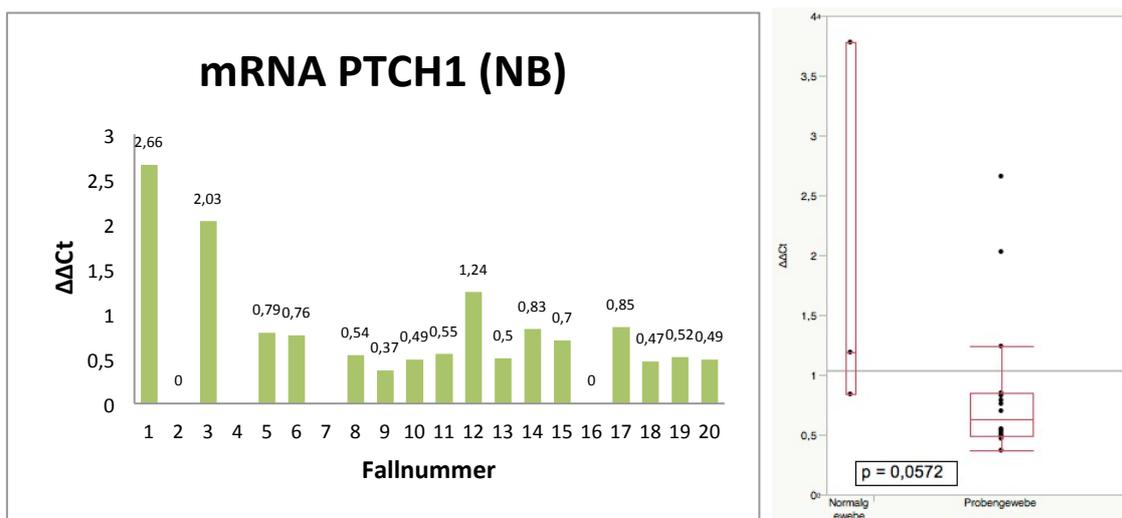


Abbildung 22: RT-qPCR-Ergebnisse für PTCH1 (NB)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.1.5 SMO (NB)

Unter den $\Delta\Delta Ct$ -Werten für SMO-mRNA (Neuroblastome) befinden sich überwiegend leicht positive Ergebnisse, in der Verteilung der Werte innerhalb der beiden Vergleichsgruppen besteht kein signifikanter Unterschied, siehe Abbildung 23.

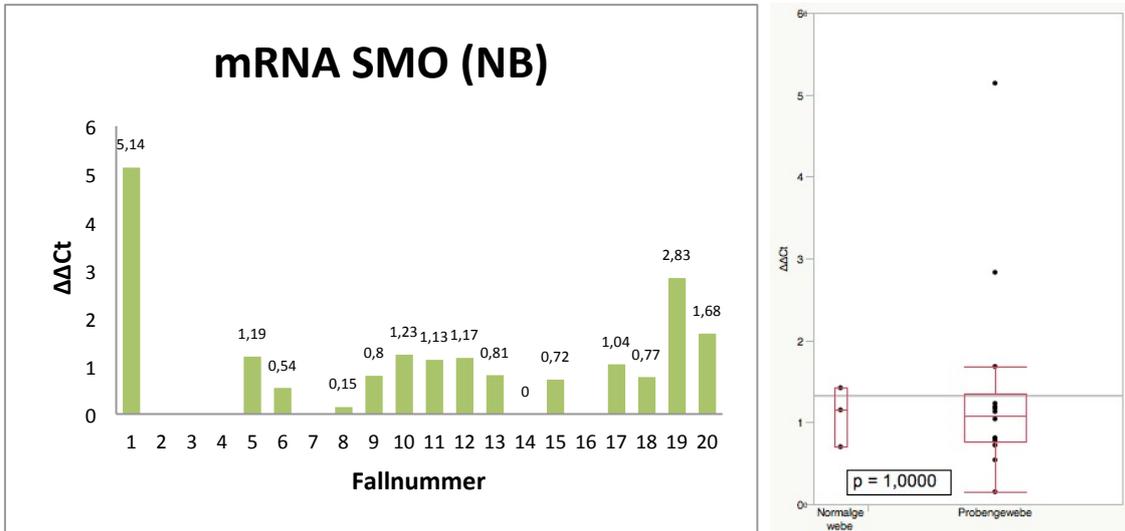


Abbildung 23: RT-qPCR-Ergebnisse für SMO (NB)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.1.6 SUFU (NB)

Abbildung 24 zeigt, dass die Mehrheit der Neuroblastomfälle schwach positive $\Delta\Delta Ct$ -Werte aufweist und kein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Gruppen besteht.

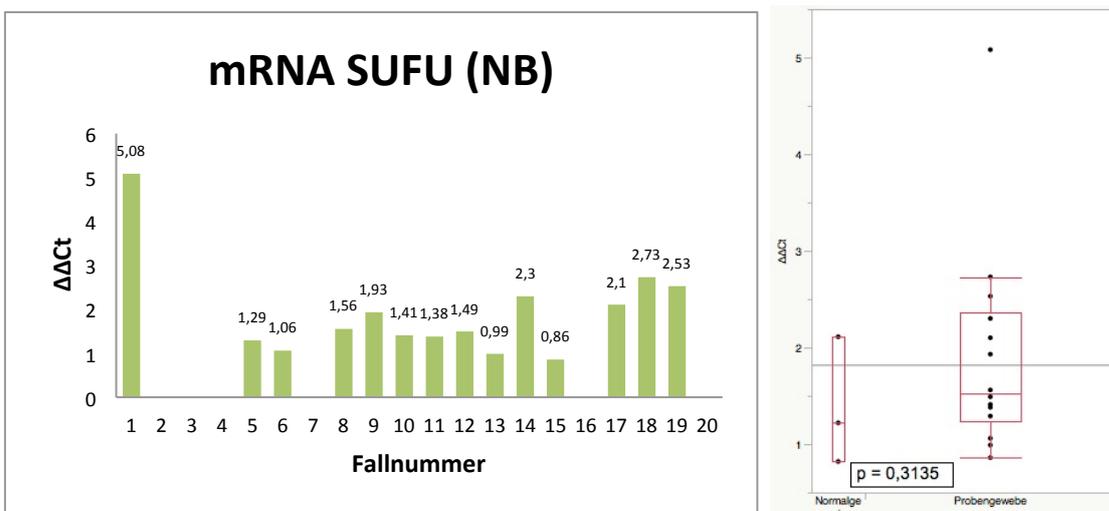


Abbildung 24: RT-qPCR-Ergebnisse für SUFU (NB)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.1.7 GLI1 (NB)

Aus Abbildung 25 ist ersichtlich, dass bei überwiegend negativen bis schwach positiven $\Delta\Delta Ct$ -Werten für GLI1-mRNA in den Neuroblastomfällen drei bis vier Fälle deutlich erhöhte $\Delta\Delta Ct$ -Werte zeigen. In der Verteilung der Werte gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Proben Gruppen.

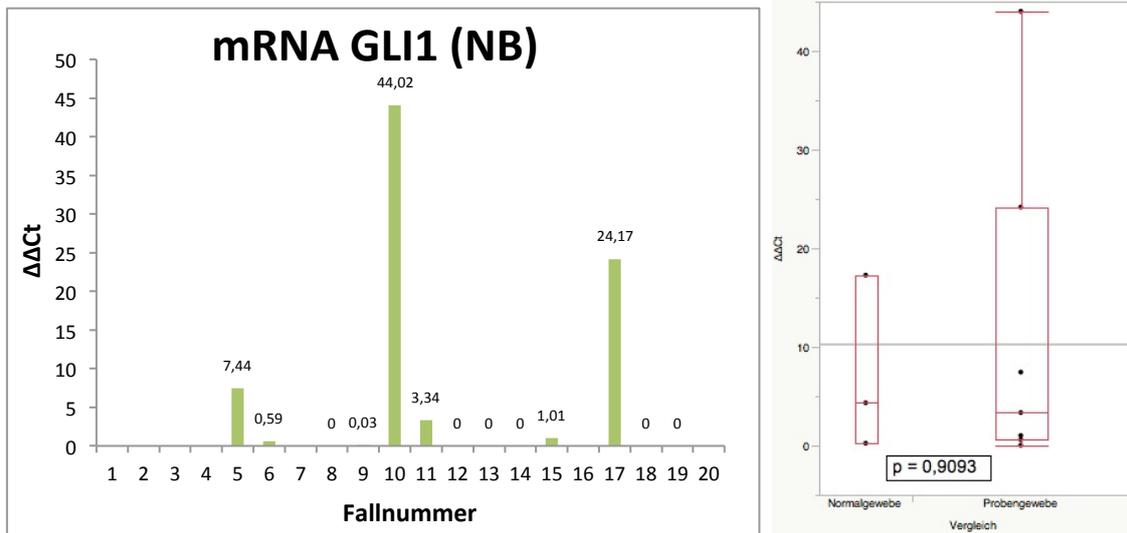


Abbildung 25: RT-qPCR-Ergebnisse für GLI1 (NB)
 Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt
 Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.1.8 GLI2 (NB)

Die $\Delta\Delta Ct$ -Werte für GLI2-mRNA sind in Abbildung 26 dargestellt. Es zeigen sich durchgängig positive bis stark positive Werte, im Vergleich der Probengruppen ist kein signifikanter Unterschied der Werteverteilung nachweisbar.

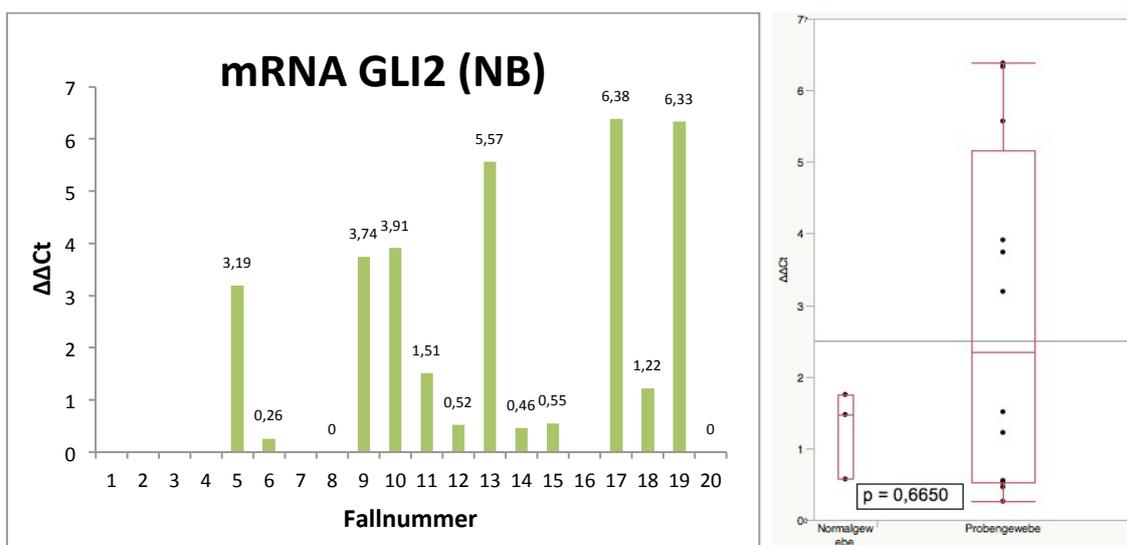


Abbildung 26: RT-qPCR-Ergebnisse für GLI2 (NB)
 Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt
 Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.1.9 Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse (NB)

Mithilfe der unter 2.13 beschriebenen Methoden wurde nach statistisch signifikanten Zusammenhängen unter den RT-qPCR-Ergebnissen gesucht. Die Korrelationsanalyse (Tabelle 30) zeigt keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den einzelnen RT-qPCR-Ergebnissen in der Gruppe der Neuroblastome.

Tabelle 30: Spearmans ρ für die interne Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse (NB)

Genexpression RNA-Ebene	Genexpression RNA-Ebene	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit > $ \rho $
DHH	SHH	0,3721	0,2105
IHH	SHH	0,4799	0,0970
IHH	DHH	-0,0321	0,9133
SMO	SHH	0,1635	0,5936
SMO	DHH	0,3868	0,1719
SMO	IHH	-0,1621	0,5799
SUFU	SHH	0,1375	0,6542
SUFU	DHH	-0,3304	0,2486
SUFU	IHH	-0,3700	0,1928
SUFU	SMO	0,2132	0,4643
PTCH1	SHH	0,0855	0,7813
PTCH1	DHH	0,0231	0,9377
PTCH1	IHH	-0,2355	0,4177
PTCH1	SMO	0,0590	0,8346
PTCH1	SUFU	0,0857	0,7708
GLI1	SHH	0,1951	0,5434
GLI1	DHH	0,3247	0,2790
GLI1	IHH	0,2697	0,3729
GLI1	SMO	0,3525	0,2374
GLI1	SUFU	-0,3670	0,2174
GLI1	PTCH1	0,1185	0,6999
GLI2	SHH	0,0161	0,9603
GLI2	DHH	0,3087	0,3048
GLI2	IHH	-0,0297	0,9232
GLI2	SMO	0,4312	0,1237
GLI2	SUFU	0,1374	0,6545
GLI2	PTCH1	-0,1068	0,7162
GLI2	GLI1	0,3497	0,2416

3.3.1.10 Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf (NB)

Tabelle 31 zeigt Korrelationen zwischen RT-qPCR-Ergebnissen und klinischen Verlaufsdaten, die auf Basis der vorliegenden Daten errechnet wurden. Das Fehlen einzelner Korrelationsdaten zwischen einzelnen Faktoren ist durch eine zu niedrige Anzahl der betreffenden Einzeldaten begründet. Es besteht bei den Neuroblastomfällen eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen den gemessenen Werten von SMO und dem Alter bei Diagnose ($p=0,0067$).

Tabelle 31: Spearmans ρ für die Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse mit den klinischen Verlaufsdaten (NB; * = $p<0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Genexpression RNA-Ebene	Klinischer Verlaufparameter	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit > $ \rho $
SHH	Alter bei Diagnose	0,1906	0,5328
DHH	Alter bei Diagnose	0,3048	0,2893
IHH	Alter bei Diagnose	-0,3218	0,2619
SMO	Alter bei Diagnose	0,6663	0,0067*
SUFU	Alter bei Diagnose	0,3056	0,2880
PTCH1	Alter bei Diagnose	0,0257	0,9194
GLI1	Alter bei Diagnose	-0,5335	0,0604
GLI2	Alter bei Diagnose	0,1049	0,7212

3.3.2 Rhabdomyosarkome

3.3.2.1 SHH (RMS)

Die Mehrheit der Rhabdomyosarkomfälle war in der RT-qPCR negativ für SHH-mRNA, siehe Abbildung 27. Die wenigen schwach positiven Fälle zeigen im Vergleich der Probengruppen keinen signifikanten Unterschied.

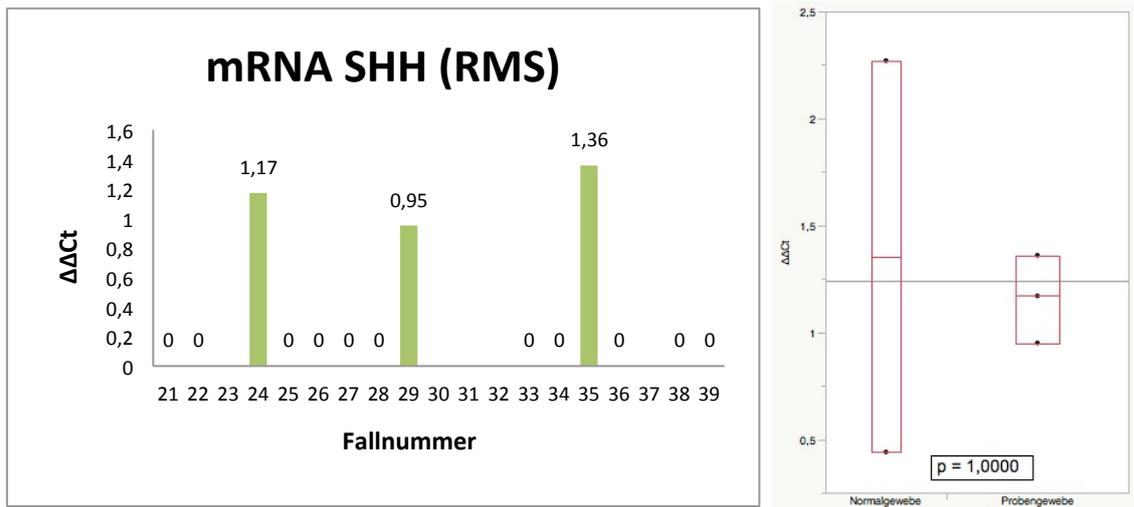


Abbildung 27: RT-qPCR-Ergebnisse für SHH (RMS)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.2.2 DHH (RMS)

Fall 26 sticht mit mehrtausendfacher Erhöhung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wertes für DHH-mRNA (RMS) heraus bei mehrheitlich negativen Ergebnissen (Abbildung 28). Dieser Fall ergibt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Probengruppen.

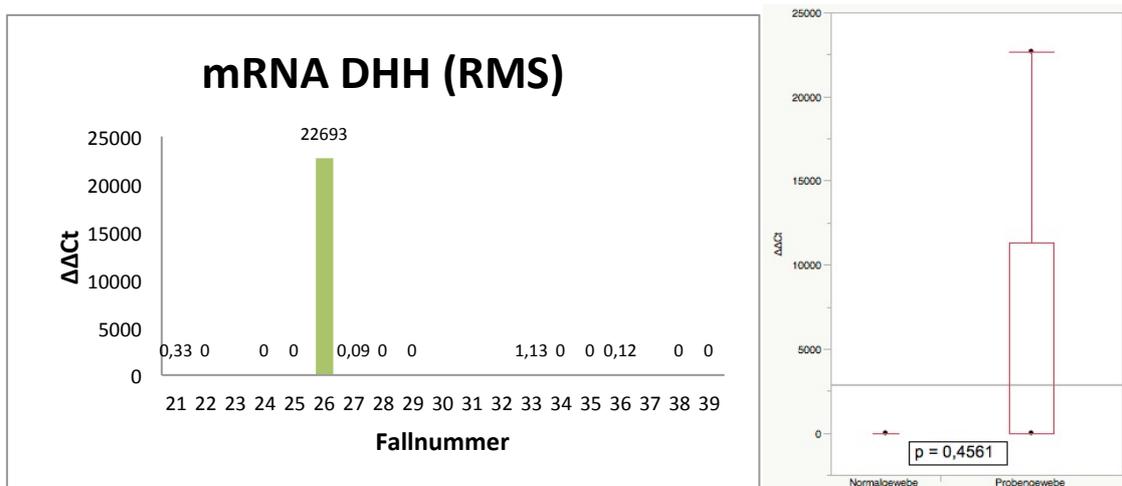


Abbildung 28: RT-qPCR-Ergebnisse für DHH (RMS)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.2.3 IHH (RMS)

Abbildung 29 zeigt Rhabdomyosarkomfälle mit negativen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten, dazwischen einige Fälle mit mehrfach erhöhten $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten. Im Vergleich der Probengruppen zeigt sich nur knapp kein signifikanter Verteilungsunterschied.

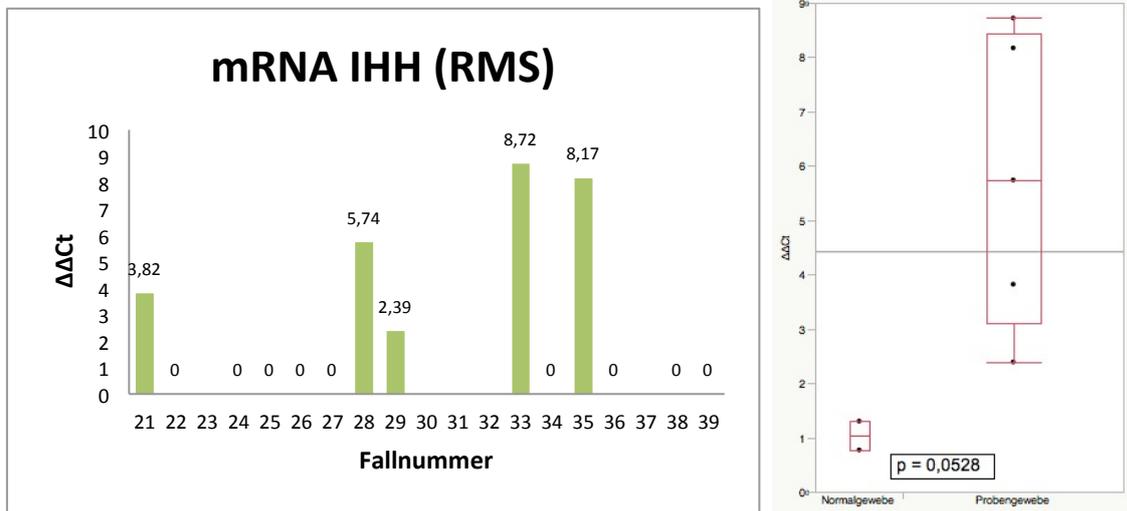


Abbildung 29: RT-qPCR-Ergebnisse für IHH (RMS)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.2.4 PTCH1 (RMS)

In Abbildung 30 sieht man mehrheitlich positive $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte für PTCH1-mRNA in den Rhabdomyosarkomfällen. Die Verteilung der Werte innerhalb der beiden Probengruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied.

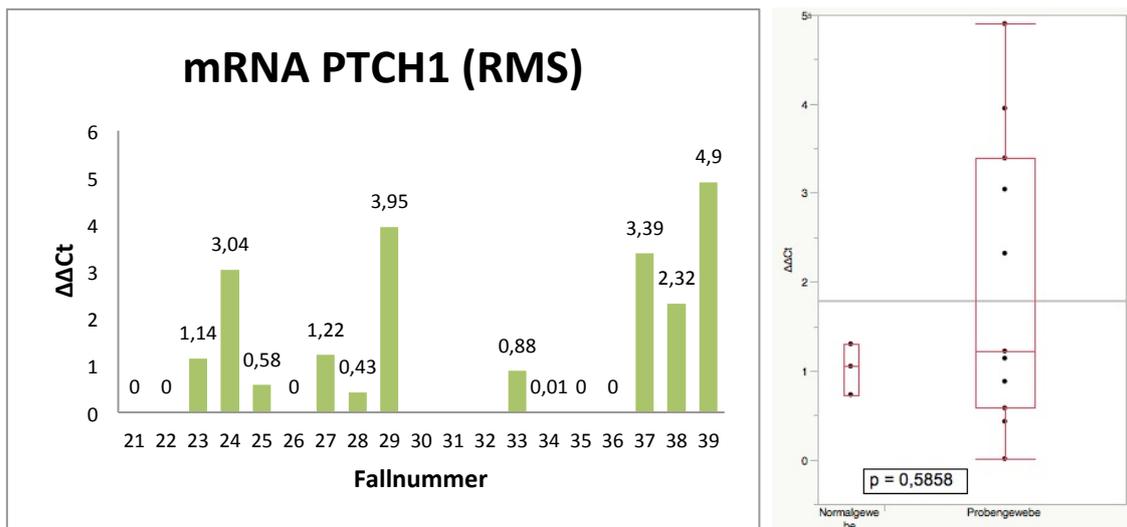


Abbildung 30: RT-qPCR-Ergebnisse für PTCH1 (RMS)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.2.5 SMO (RMS)

Die $\Delta\Delta Ct$ -Werte für SMO-mRNA (Rhabdomyosarkomfälle) sind durchgehend positiv ohne Ausreißer. In der Verteilung gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen, siehe Abbildung 31.

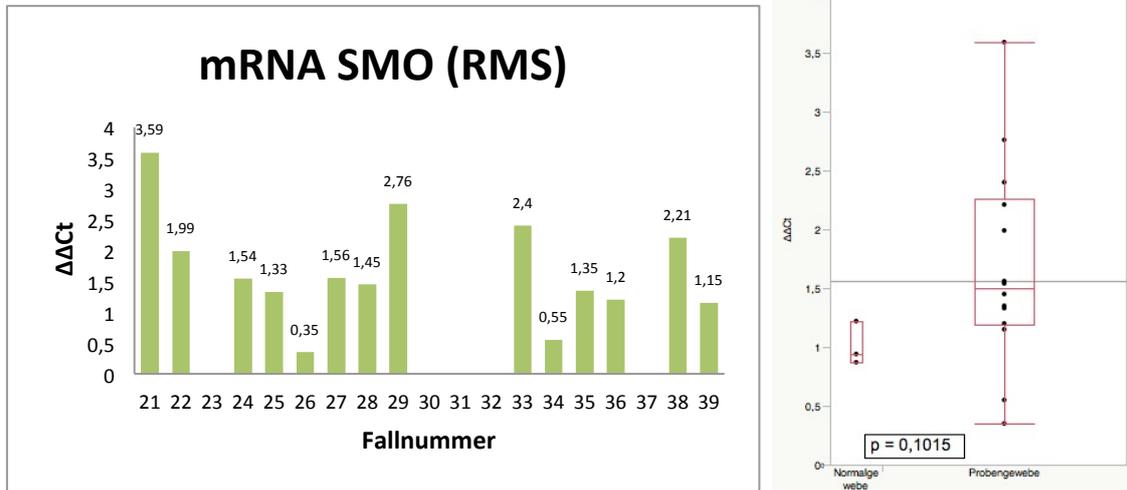


Abbildung 31: RT-qPCR-Ergebnisse für SMO (RMS)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.2.6 SUFU (RMS)

Abbildung 32 zeigt positive $\Delta\Delta Ct$ -Werte für SUFU-mRNA bei den Rhabdomyosarkomen. Hier besteht ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte zwischen der Normalgewebe-Gruppe und der Probengewebe-Gruppe mit $p = 0,0117$.

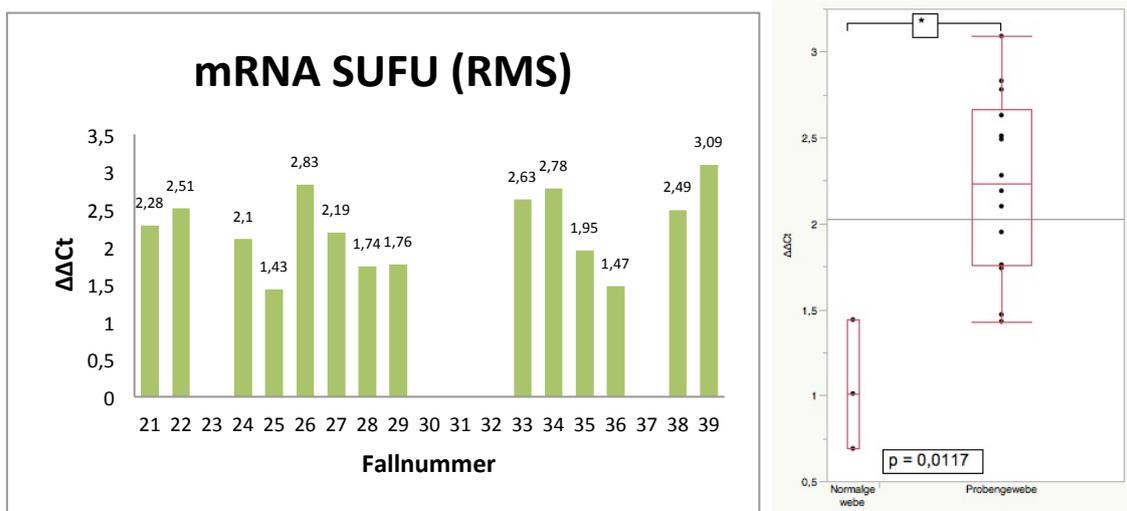


Abbildung 32: RT-qPCR-Ergebnisse für SUFU (RMS)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.2.7 GLI1 (RMS)

Abbildung 33 zeigt mehrheitlich schwach positive $\Delta\Delta Ct$ -Werte für GLI1-mRNA in den Rhabdomyosarkomfällen. Die wenigen mehrfach erhöhten $\Delta\Delta Ct$ -Werte zeigen im Vergleich der Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

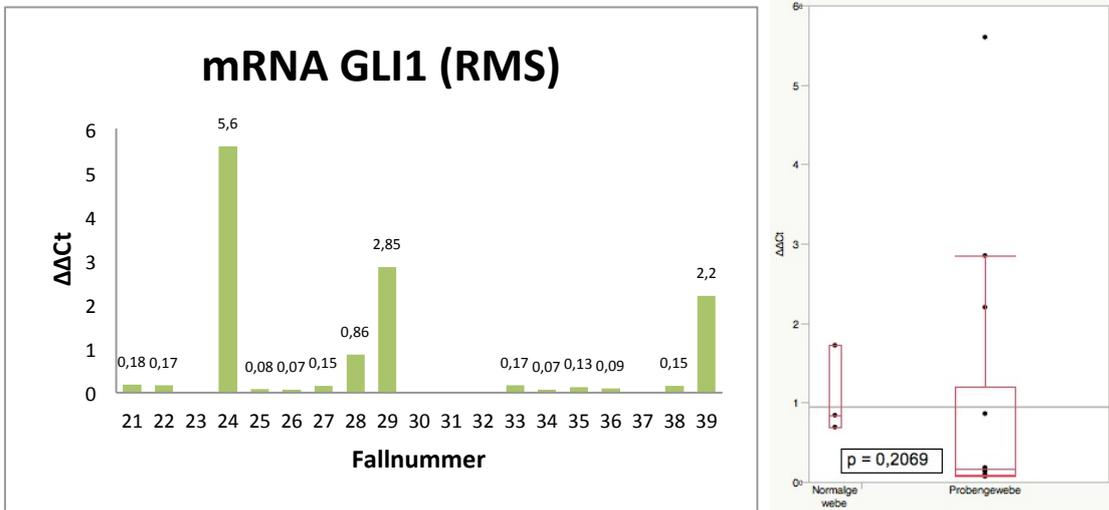


Abbildung 33: RT-qPCR-Ergebnisse für GLI1 (RMS)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.2.8 GLI2 (RMS)

Unter den GLI2-mRNA- $\Delta\Delta Ct$ -Werten (Abbildung 34) befinden sich teils schwach bis mehrfach erhöhte Werte sowie ein Ausreißer (Fall 29, $\Delta\Delta Ct$ 14,3). Der Vergleich der Verteilungen innerhalb beider Probengruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied.

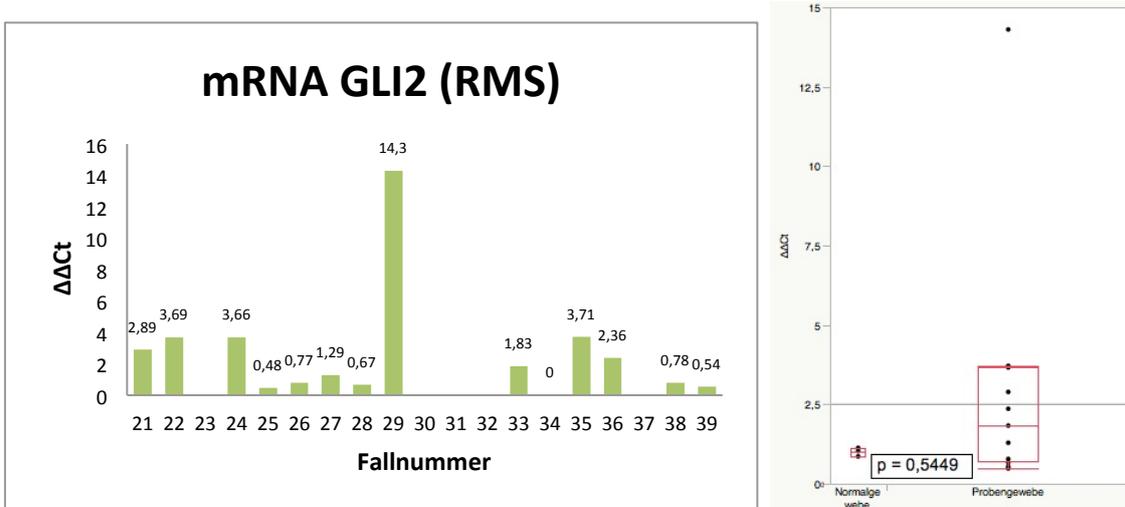


Abbildung 34: RT-qPCR-Ergebnisse für GLI2 (RMS)

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt

Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe

3.3.2.9 Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse (RMS)

Bei den Rhabdomyosarkomfällen bestehen statistisch signifikante positive Korrelationen zwischen den RT-qPCR-Ergebnissen von SHH und GLI2 ($p=0,0106$), PTCH 1 und GLI1 ($p=0,0314$), SMO und GLI1 ($p=0,0337$) sowie SMO und GLI2 ($p=0,0246$), siehe Tabelle 32.

Tabelle 32: Spearmans ρ für die interne Korrelation RT-qPCR-Ergebnisse (RMS; * = $p<0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Genexpression RNA-Ebene	Genexpression RNA-Ebene	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit > $ \rho $
DHH	SHH	-0,3742	0,1874
IHH	SHH	0,2958	0,3045
IHH	DHH	0,1582	0,5891
SMO	SHH	0,1498	0,6091
SMO	DHH	0,0487	0,8688
SMO	IHH	0,4687	0,0909
SUFU	SHH	-0,3150	0,2727
SUFU	DHH	0,2331	0,4226
SUFU	IHH	-0,1767	0,5456
SUFU	SMO	-0,1692	0,5630
PTCH1	SHH	0,1783	0,5420
PTCH1	DHH	-0,3903	0,1677
PTCH1	IHH	-0,1336	0,6489
PTCH1	SMO	0,2001	0,4929
PTCH1	SUFU	0,0697	0,8129
GLI1	SHH	0,3590	0,2075
GLI1	DHH	-0,2801	0,3321
GLI1	IHH	0,2878	0,3183
GLI1	SMO	0,5689	0,0337*
GLI1	SUFU	-0,0639	0,8281
GLI1	PTCH1	0,5751	0,0314*
GLI2	SHH	0,6575	0,0106*
GLI2	DHH	0,0282	0,9238
GLI2	IHH	0,3663	0,1977
GLI2	SMO	0,5956	0,0246*
GLI2	SUFU	-0,2571	0,3748
GLI2	PTCH1	-0,1191	0,6850
GLI2	GLI1	0,4366	0,1186

3.3.2.10 Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf (RMS)

Tabelle 33 zeigt Korrelationen zwischen RT-qPCR-Ergebnissen und klinischen Verlaufsdaten. Das Fehlen einzelner Korrelationsdaten zwischen einzelnen Faktoren ist durch eine zu niedrige Anzahl der betreffenden Einzeldaten begründet. Bei den Rhabdomyosarkomfällen zeigen sich statistisch signifikante negative Zusammenhänge zwischen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten und klinischem Verlauf bei SHH und Alter bei Diagnose ($p=0,045$), GLI1 und Alter bei Diagnose ($p=0,044$) sowie GLI2 und Alter bei Diagnose ($p=0,0139$).

Tabelle 33: Spearmans ρ für die Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse mit den klinischen Verlaufsdaten (RMS; * = $p<0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Genexpression RNA-Ebene	Klinischer Verlaufparameter	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit > $ \rho $
SHH	Alter bei Diagnose	-0,5425	0,0450*
SHH	Rezidiv	-0,5774	0,4226
SHH	Tod	0,3333	0,6667
DHH	Alter bei Diagnose	0,2002	0,4925
DHH	Rezidiv	-0,2357	0,7643
DHH	Tod	-0,8165	0,1835
IHH	Alter bei Diagnose	-0,2901	0,3144
IHH	Rezidiv	-0,9428	0,0572
IHH	Tod	-0,2722	0,7278
SMO	Alter bei Diagnose	-0,2731	0,3448
SMO	Rezidiv	-0,4472	0,5528
SMO	Tod	-0,7746	0,2254
SUFU	Alter bei Diagnose	0,2511	0,3865
SUFU	Rezidiv	0,0000	1,0000
SUFU	Tod	-0,2582	0,7418
PTCH1	Alter bei Diagnose	-0,0898	0,7410
PTCH1	Rezidiv	-0,4899	0,3239
PTCH1	Tod	-0,6928	0,1270
GLI1	Alter bei Diagnose	-0,5448	0,0440*
GLI1	Rezidiv	-0,4472	0,5528
GLI1	Tod	-0,7746	0,2254
GLI2	Alter bei Diagnose	-0,6388	0,0139*
GLI2	Rezidiv	-0,4472	0,5528
GLI2	Tod	0,2582	0,7418

3.3.3 Grafische Gesamtübersicht der RT-qPCR-Ergebnisse

Tabelle 34 stellt eine grafische Gesamtübersicht über die RT-qPCR-Ergebnisse dar. Wie in Kapitel 3.2 erklärt, wurden einzelne $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte als nicht verwertbar ausgeschlossen und nicht aufgeführt. Das betroffene Probenmaterial stellte sich als für die RT-qPCR-Analyse ungeeignet dar, wenn TBP deutlich schlechter amplifizierbar war. Nach Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe wurde die Toleranzgrenze zwischen 35 und 36 RT-qPCR-Zyklen gesetzt. Details zu einzelnen RT-qPCR-Ergebnissen sind im Anhang unter 8.1.1 nachzulesen. Es zeigt sich in der grafischen Gesamtübersichtstabelle eine nach unten hin dichter werdende Verteilung positiver Messergebnisse. Das heißt, für die intrazellulär gelegenen Komponenten des Signalwegs PTCH1, SMO, SUFU, GLI1 und GLI2 wurden durchschnittlich höhere $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte gemessen als für die Liganden SHH, DHH und IHH. Außerdem fällt auf, dass für einige Fälle nur der intrazelluläre Teil des Signalweges nachgewiesen wurde, für andere Fälle beide Teile des Signalweges. Eine Einordnung der Fälle in Gruppen nach Expressionsmustern erscheint daher sinnvoll.

Tabelle 34: Grafische Gesamtübersicht der RT-qPCR-Ergebnisse

Legende		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert über 4
		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert 1 bis 4
		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert > 0 bis 1
		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert = 0
		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert nicht verwendbar

Neuroblastome																				
Fallnummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
SHH																				
DHH																				
IHH																				
PTCH1																				
SMO																				
SUFU																				
GLI1																				
GLI2																				

Rhabdomyosarkome																			
Fallnummer	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
SHH																			
DHH																			
IHH																			
PTCH1																			
SMO																			
SUFU																			
GLI1																			
GLI2																			

3.3.4 Gruppierung der Fälle nach RT-qPCR-Ergebnissen in Bezug auf den Signalweg

In den nachfolgenden Tabellen 35 und 36 sollen die einzelnen Fälle anhand des mRNA-Expressionsmusters angeordnet werden, um potenzielle Subgruppen zu identifizieren. Fälle, die in Tabelle 29 überwiegend grau oder weiß markiert sind, wurden für die folgende Darstellung ausgeblendet. Betroffen sind hiervon die Fälle 2, 3, 4, 7, 16, 20, 23, 30, 31, 32 und 37.

3.3.4.1 Neuroblastome

Tabelle 35 zeigt, dass für die Fälle 1, 15, 9, 10, 13, 5 und 11 die Expression von mRNA mindestens eines Liganden nachgewiesen wurde. Im Probengewebe der Fälle 17, 12, 19, 18, 14 und 6 waren die Liganden auf mRNA-Ebene nicht nachweisbar, aber, im Gegensatz zu Fall 8, mindestens einer der GLI-Effektoren GLI1 und GLI2.

Tabelle 35: Signalwegbezogene Gruppierung der RT-qPCR-Ergebnisse (NB)

Fallnummer	1	15	9	10	13	5	11	17	12	19	18	14	6	8
SHH	Dark Green	Light Green	Light Green	White	White	Light Green	White							
DHH	Dark Green	Dark Green	White	Light Green	Dark Green	Light Green	White							
IHH	White	Light Green	Light Green	White	White	White	Light Green	White						
PTCH1	Dark Green	Light Green	Dark Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green						
SMO	Dark Green	Light Green	Light Green	Light Green	Light Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Light Green	White	Light Green	Light Green
SUFU	Dark Green	Light Green	Dark Green	Dark Green	Light Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green
GLI1	White	Light Green	Light Green	Dark Green	White	Dark Green	Dark Green	Dark Green	White	White	White	White	Light Green	White
GLI2	White	Light Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Dark Green	Light Green	Dark Green	Dark Green	Light Green	Light Green	White

3.3.4.2 Rhabdomyosarkome

Auch bei den Rhabdomyosarkomen (Tabelle 36) lässt sich anhand der mRNA-Expression eine Einteilung in Gruppen vornehmen. Eine Ausprägung des Signalweges von den Liganden bis zu den Effektoren zeigen hier die Fälle 29, 35, 33, 24, 36, 26, 21, 28 und 27. Bei den Fällen 39, 38, 22, 25 und 34 fehlt die Expression von Liganden-mRNA.

Tabelle 36: Signalwegbezogene Gruppierung der RT-qPCR-Ergebnisse (RMS)

Legende		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert über 4
		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert 1 bis 4
		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert > 0 bis 1
		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert = 0
		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert nicht verwendbar

Fallnummer	29	35	33	24	36	26	21	28	27	39	38	22	25	34
SHH														
DHH														
IHH														
PTCH1														
SMO														
SUFU														
GLI1														
GLI2														

3.4 Korrelation von IHC- und RT-qPCR-Ergebnissen

Um statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen aus Immunhistochemie und PCR aufzudecken, wurden die betreffenden Genexpressionswerte auf beiden Ebenen, nach Tumorentität getrennt, miteinander verglichen.

3.4.1 Neuroblastome

Eine signifikante Korrelation zwischen IHC- und RT-qPCR-Ergebnissen bei den Neuroblastomfällen zeigt sich zwischen DHH und DHH ($p=0,0463$), siehe Tabelle 37.

Tabelle 37: Spearmans ρ für die Korrelation der IHC-Ergebnisse mit den RT-qPCR-Ergebnissen (NB; * = $p<0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Genexpression RNA-Ebene	Genexpression Proteinebene	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit > $ \rho $
SHH	SHH	0,5285	0,0633
DHH	DHH	0,5399	0,0463*
IHH	IHH	0,0906	0,7579
SMO	SMO	0,2026	0,4690
SUFU	SUFU	-0,0902	0,7592

3.4.2 Rhabdomyosarkome

Innerhalb der Rhabdomyosarkomfälle besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen IHH (RNA-Ebene) und IHH (Proteinebene) mit $p=0,0156$, siehe Tabelle 38.

Tabelle 38: Spearmans ρ für die Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse mit den RT-qPCR-Ergebnissen (RMS; * = $p<0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.

Genexpression RNA-Ebene	Genexpression Proteinebene	Spearmans ρ	Wahrscheinlichkeit > $ \rho $
SHH	SHH	-0,0342	0,9075
DHH	DHH	0,0805	0,7844
IHH	IHH	0,6308	0,0156*
SMO	SMO	-0,1728	0,5547
SUFU	SUFU	-0,4116	0,1437

3.5 Bildung von Fallgruppen auf Grundlage der IHC- und PCR-Ergebnisse

Analog zu der unter 3.3.4 gezeigten Gruppierung der Fälle nach PCR-Ergebnissen wurden anhand der Gesamtergebnisse Fallgruppen gebildet, um einen Interpretationsansatz zu schaffen. Die auf den Signalweg bezogenen Ergebnisse aus beiden verwendeten Untersuchungsmethoden (IHC und PCR) werden im Folgenden in grafischer Darstellung unter Verwendung des bereits eingeführten Farbcodes präsentiert.

3.5.1 Neuroblastome

3.5.1.1 Gruppe 1 (NB)

Die in Gruppe 1 zusammengefassten Fälle 15, 9, 10, 5, 13, 11 und 1 zeigen eine Hochregulation der Hedgehog-Signalwegsgene von den Liganden bis hin zu den Effektormolekülen (Tabelle 39). In fünf von sieben Fällen wurde als Ligand DHH (mRNA) nachgewiesen, in jeweils drei Fällen SHH und IHH. Die intrazellulären Signalwegskomponenten PTCH1, SMO und SUFU waren, zumindest auf mRNA-Ebene, allesamt nachweisbar. Die Effektoren GLI1 und GLI2 konnten in fünf Fällen zusammen detektiert werden, in Fall 13 wurde nur GLI2 nachgewiesen und für Fall 1 fehlt ein Nachweis der Effektoren aufgrund nicht verwertbarer $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte.

Tabelle 39: Gruppe 1 (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	15	9	10	5	13	11	1
SHH							
DHH							
IHH							
PTCH1							
SMO							
SUFU							
GLI1							
GLI2							

Legende	Linke Säule (IHC)		IRS-Wert 12
			IRS-Wert 8 bis 9
			IRS-Wert 4 bis 6
			IRS-Wert 1 bis 3
			IRS-Wert 0
	Rechte Säule (PCR)		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert über 4
			$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert 1 bis 4
			$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert > 0 bis 1
			$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert 0
			$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert nicht verwendbar

3.5.1.2 Gruppe 2 (NB)

Zu Gruppe 2 gehören die Neuroblastomfälle, bei denen keine Expression von Liganden-mRNA nachgewiesen wurde (Fallnummern 19, 18, 14, 17, 6 und 12). Die Ligandenproteine waren zwar mehr oder weniger stark immunhistochemisch anfärbbar, eine Transkription ihrer Gene scheint aber zuletzt nicht in ausgeprägtem Maße stattgefunden zu haben (Tabelle 40). Die intrazellulären Signalwegsbestandteile waren, bis auf Fall 14, auf mRNA-Ebene durchgehend nachweisbar. Auch von den Effektoren GLI1 und GLI2 wurde jeweils mindestens einer detektiert.

Tabelle 40: Gruppe 2 (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	19	18	14	17	6	12
SHH	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
DHH	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
IHH	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
PTCH1	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
SMO	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
SUFU	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
GLI1	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün
GLI2	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün	Grün

Legende	Linke Säule (IHC)	Dark Orange	IRS-Wert 12
		Orange	IRS-Wert 8 bis 9
		Light Orange	IRS-Wert 4 bis 6
		Very Light Orange	IRS-Wert 1 bis 3
		White	IRS-Wert 0
	Rechte Säule (PCR)	Dark Green	$\Delta\Delta Ct$ -Wert über 4
		Medium Green	$\Delta\Delta Ct$ -Wert 1 bis 4
		Light Green	$\Delta\Delta Ct$ -Wert > 0 bis 1
		White	$\Delta\Delta Ct$ -Wert 0
		Grey	$\Delta\Delta Ct$ -Wert nicht verwendbar

3.5.1.3 Gruppe 3 (NB)

Zuletzt werden diejenigen Fälle unter den Neuroblastomen aufgeführt, deren Analyse kein vollständiges Gesamtbild des Signalweges lieferte (Fallnummern 8, 20, 3, 7, 16, 2 und 4). Dies ist einerseits auf die fehlenden Immunfärbungen für PTCH1, GLI1 und GLI2 zurückzuführen, andererseits auf die eingeschränkte Tauglichkeit der Gewebeproben für die RT-qPCR-Methode (Tabelle 41).

Tabelle 41: Gruppe 3 (NB; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	8	20	3	7	16	2	4
SHH	Orange	Orange	Orange	Braun	Orange	Orange	Orange
DHH	Braun	Orange	Orange	Braun	Braun	Braun	Orange
IHH	Braun	Orange	Orange	Braun	Braun	Braun	Orange
PTCH1	Grün	Grün	Grün	Grün	Braun	Braun	Orange
SMO	Orange	Braun	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
SUFU	Orange						
GLI1	Grün						
GLI2	Grün						

Legende	Linke Säule (IHC)	Braun	IRS-Wert 12
		Orange	IRS-Wert 8 bis 9
		Orange	IRS-Wert 4 bis 6
		Orange	IRS-Wert 1 bis 3
		Weiß	IRS-Wert 0
	Rechte Säule (PCR)	Braun	$\Delta\Delta Ct$ -Wert über 4
		Grün	$\Delta\Delta Ct$ -Wert 1 bis 4
		Grün	$\Delta\Delta Ct$ -Wert > 0 bis 1
		Weiß	$\Delta\Delta Ct$ -Wert 0
		Grün	$\Delta\Delta Ct$ -Wert nicht verwendbar

3.5.2 Rhabdomyosarkome

3.5.2.1 Gruppe 1 (RMS)

Die Gruppe 1 der Rhabdomyosarkome zeigt analog zur Einteilung der Neuroblastome die Fälle, für die eine durchgehende Aktivierung des Signalweges auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde: Fallnummern 29, 33, 35, 24, 21, 28, 27, 36 und 26 (Tabelle 42). Bei teils fehlendem Nachweis einzelner Liganden ergibt sich intrazellulär ab der Ebene von SMO ein auffällig lückenloser mRNA-Nachweis der Signalwegskomponenten einschließlich SUFU und beider Effektoren GLI1 und GLI2.

Tabelle 42: Gruppe 1 (RMS; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	29	33	35	24	21	28	27	36	26
Subtyp	alveolär	embryonal	alveolär	embryonal	embryonal	embryonal	embryonal	alveolär	embryonal
SHH									
DHH									
IHH									
PTCH1									
SMO									
SUFU									
GLI1									
GLI2									

Legende	Linke Säule (IHC)		IRS-Wert 12
			IRS-Wert 8 bis 9
			IRS-Wert 4 bis 6
			IRS-Wert 1 bis 3
			IRS-Wert 0
	Rechte Säule (PCR)		$\Delta\Delta Ct$ -Wert über 4
			$\Delta\Delta Ct$ -Wert 1 bis 4
			$\Delta\Delta Ct$ -Wert > 0 bis 1
			$\Delta\Delta Ct$ -Wert 0
			$\Delta\Delta Ct$ -Wert nicht verwendbar

3.5.2.2 Gruppe 2 (RMS)

In Gruppe 2 befinden sich diejenigen Rhabdomyosarkomfälle, bei denen die Signalwegs-mRNA erst ab der Ebene von PTCH1 und weiter stromabwärts nachweisbar war. Dies betrifft die Fallnummern 39, 38, 22, 25 und 34 (Tabelle 43). Wie schon in Gruppe 1 zeigt sich ein fast durchgängiger Nachweis der Signalwegs-mRNA ab SMO über SUFU und die Effektoren GLI1 und GLI2.

Tabelle 43: Gruppe 2 (RMS; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	39	38	22	25	34
Subtyp	alveolär	alveolär	embryonal	embryonal	embryonal
SHH					
DHH					
IHH					
PTCH1					
SMO					
SUFU					
GLI1					
GLI2					

Legende	Linke Säule (IHC)		IRS-Wert 12
			IRS-Wert 8 bis 9
			IRS-Wert 4 bis 6
			IRS-Wert 1 bis 3
			IRS-Wert 0
	Rechte Säule (PCR)		$\Delta\Delta Ct$ -Wert über 4
			$\Delta\Delta Ct$ -Wert 1 bis 4
			$\Delta\Delta Ct$ -Wert > 0 bis 1
			$\Delta\Delta Ct$ -Wert 0
			$\Delta\Delta Ct$ -Wert nicht verwendbar

3.5.2.3 Gruppe 3 (RMS)

Zur dritten Gruppe unter den Rhabdomyosarkomen gehören die Fälle mit den Nummern 37, 23, 32, 30 und 31, die aufgrund von Analyselücken nicht in die beiden vorangegangenen Gruppen eingeordnet werden können (Tabelle 44).

Tabelle 44: Gruppe 3 (RMS; IRS = Immunoreactivity Score)

Fallnummer	37	23	32	30	31
Subtyp	alveolär	embryonal	alveolär	embryonal	embryonal
SHH	 	 	 	 	 
DHH	 	 	 	 	 
IHH	 	 	 	 	 
PTCH1	 	 	 	 	 
SMO	 	 	 	 	 
SUFU	 	 	 	 	 
GLI1	 	 	 	 	 
GLI2	 	 	 	 	 

Legende	Linke Säule (IHC)		IRS-Wert 12
			IRS-Wert 8 bis 9
			IRS-Wert 4 bis 6
			IRS-Wert 1 bis 3
			IRS-Wert 0
	Rechte Säule (PCR)		$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert über 4
			$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert 1 bis 4
			$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert > 0 bis 1
			$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert 0
			$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert nicht verwendbar

4 Diskussion

Der Hedgehog-Signalweg wurde in den zurückliegenden Jahrzehnten intensiv untersucht. Er wird heute in seiner Rolle bei der Entstehung von Malignomen besser verstanden, viele Funktionsdetails der Signalweiterleitung konnten aber noch nicht geklärt werden (Ingham et al. 2011). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Hh-Signalweg in seiner Ausprägung in pädiatrischen Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen auf RNA- und Proteinebene zu analysieren, um Hinweise auf bessere Therapiemöglichkeiten zu bekommen.

4.1.1 Neuroblastome und Hedgehog

Das Neuroblastom ist das häufigste solide Malignom bei Kindern. Es hat seinen Ursprung in Zellen der Neuralleiste und tritt üblicherweise innerhalb des Nebennierenmarks auf (Souzaki et al. 2010). Die Deregulation des Hh-Signalweges ist schon seit Jahrzehnten als ein mit der Entstehung vieler verschiedener humaner Malignome assoziierter Faktor bekannt. Neuroblastome wurden dieser Liste erst vor wenigen Jahren hinzugefügt. Es gibt eine Reihe von Studienergebnissen, die eine zentrale Rolle des Hh-Signalweges in der Entwicklung von Neuralleisten-Stammzellen und des sympathischen Nervensystems nahelegen (Ahlgren und Bronner-Fraser 1999, Fu et al. 2004, Jeong et al. 2004). Aktuelle Studien belegen, dass primäre Neuroblastome und Neuroblastom-Zelllinien hohe Expressionsraten der Hh-Proteine aufweisen (Schiapparelli et al. 2011, Mao et al. 2009c, Wickström et al. 2013). Wickström et al. beschreiben weiterhin eine Wachstumsinhibition von Neuroblastomzellen *in vitro* und *in vivo* durch Ausschaltung von GLI1 und GLI2 mit Hilfe des GLI-Inhibitors GANT61 (Wickström et al. 2013). Dies ist ein Beleg für die Rolle des Hh-Signalweges in der Proliferation von Neuroblastomgewebe und ergänzt frühere Berichte, nach denen die Inhibition des Signalweges durch Cyclopamin Apoptose, Proliferationsstopp und Aufhebung der Tumorigenität von Neuroblastomzellen bewirkt (Mao et al. 2009c). Mao et al. beschreiben in einem weiteren Bericht den immunhistochemischen Nachweis von PTCH1, GLI1 und

GLI2 in 20 humanen Olfactorius-Neuroblastomen. Die Proteine waren in 70% (PTCH1), 70% (GLI1) und 65% (GLI2) der untersuchten Tumore nachweisbar, woraus Mao et al. eine führende Rolle des Hh-Signalweges in der Regulation der Progression von Olfactorius-Neuroblastomen herleiten (Mao et al. 2009b).

4.1.2 Rhabdomyosarkome und Hedgehog

Der Hh-Signalweg wurde, zusammen mit dem Notch- und dem Wnt-Signalweg, zwei auch auf Proteolyse basierenden entwicklungsgeschichtlich stark konservierten zellulären Signalwegen, als zentraler Regulator der Myogenese von Vertebraten beschrieben (Gustafsson et al. 2002). Während der embryonalen und fetalen Myogenese wird der Hh-Signalweg für das Überleben, die Proliferation und die Regulation von Myoblasten und Myotuben benötigt (Krüger et al. 2001). Nach der Geburt gilt der Hh-Signalweg im Skelettmuskelgewebe als silent. Straface et al. berichten jedoch von einer erneuten Expression von SHH nach Verletzung von adultem Muskelgewebe und zeigen, dass der Signalweg auch im Erwachsenenalter im Muskelgewebe präsent und aktivierbar ist. Die als Satellitenzellen bezeichneten, für die Muskelgewebereparatur essenziellen Myoblasten besitzen eine hohe Regenerationskapazität mit Einbeziehung des Hh-Signalweges (Straface et al. 2009). Lag anfangs der Fokus von Studien zur Untersuchung der Tumorgenese von Rhabdomyosarkomen auf dysregulierten Genen und Proteinen, so wird die Rolle zellulärer Signalwege in diesem Zusammenhang heute stärker wahrgenommen und untersucht. Klinisch ist eine unterstützende Funktion des Hh-Signalweges in der Ätiologie von Rhabdomyosarkomen anhand des Gorlin-Syndroms gut belegt (Gorlin 1999, Belyea et al. 2012).

4.2 Untersuchungsmethoden

4.2.1 Probleme mit FFPE-Material

Bei FFPE-Probenmaterial gestaltet sich die RNA-Quantifizierung schwierig, weil die RNA aufgrund von stattgehabten Degradierungsvorgängen im Rahmen der Formaldehydbehandlung in vergleichsweise minderer Qualität vorliegt. Koch et al. vergleichen in ihrer Studie RT-qPCR-Analysen aus Frischmaterial direkt mit solchen aus FFPE-Material. Die benötigten Ct-Werte zur Analyse von FFPE-Material lagen bei ihnen durchschnittlich um 3,2 höher. Unter den einzelnen FFPE-Proben schwankten die Ct-Differenzbeträge zum jeweiligen Frischmaterial zwischen 1,8 und 5,1 (Koch et al. 2006). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Sensitivität der RT-qPCR aus FFPE-Material stark abhängig ist von der Qualität der einzelnen Gewebeproben. Aus diesem Grund wurden elf Fälle ausgeschlossen, weil die RNA-Qualität für eine Verwendung der erzielten Ergebnisse nicht ausreichend war.

4.2.2 Vor- und Nachteile der TMA-Methode

Die Methode, mittels Tissue Micro Array eine Vielzahl an einzelnen Gewebeschnitten auf einem Objektträger zu vereinen, zu behandeln und auszuwerten, hat Vor- und Nachteile. Dadurch, dass im Optimalfall alle Proben in einem einzigen TMA angeordnet sind, können Antikörperfärbungen schneller, effizienter und vor allem auf eine statistisch validere Art durchgeführt werden. Alle Gewebeproben werden während der einzelnen Schritte einer Immunfärbung exakt gleich behandelt. Die daraus resultierende standardisierte Färbequalität garantiert eine direkte Vergleichbarkeit der Expressionsraten des angefärbten Biomarkers in allen Proben. Ein weiterer Vorteil der TMA-Methode ist, dass zur Untersuchung von Koexpressionen einzelner Proteine nahezu identische Gewebeareale immunhistopathologisch verarbeitet werden können. Durch Anfertigung serieller TMA-Schnitte werden jeweils eng benachbarte Gewebeareale auf verschiedene Objektträger aufgezogen, die dann separat weiterverarbeitet werden können. Für die vorliegende Arbeit wurden jeweils zwei Stenzen pro Fall für jede Antikörperfärbung nebeneinander platziert. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde dadurch erleichtert. Fehlerhafte Stan-

zen mit Rissen oder Materialaussparungen konnten durch intakte Zweitstanzen ergänzt werden. Bei zu nahe am Rand des Objektträgers liegenden Stanzen ist allerdings die konstante Färbung gefährdet, da während der einzelnen Färbeschritte eine ständige Benetzung des Probengewebes mit den Reagenzien nicht immer gewährleistet ist. Ein weiterer Nachteil der TMA-Methode besteht in der Größe des pro Fall untersuchten Gewebeausschnittes. Der Durchmesser einer Stanze beträgt etwa 1 mm, daher eignen sich TMAs nur sehr eingeschränkt zur morphologisch-histologischen Beurteilung von Geweben. Der zur Herstellung eines TMA erforderliche organisatorische und technische Aufwand stellt eine weitere Einschränkung dar (Goepfert 2006).

4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Die unter 3.2 aufgeführten Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse von Neuroblastom- und Rhabdomyosarkomproben werden im Folgenden verglichen und in Bezug zum Hedgehog-Signalweg diskutiert.

4.3.1 CD56

Es kann davon ausgegangen werden, dass Neuroblastom- und Rhabdomyosarkomgewebe grundsätzlich das CD56-Oberflächenantigen exprimieren (Jensen und Berthold 2007, Figarella-Branger et al. 1990, Lipinski et al. 1987, Phimister et al. 1991, Winter et al. 2008). Fast alle Fälle mit Ausnahme der Fallnummern 25 bis 27 sind positiv in der Anti-CD56-Immunfärbung. Das Ergebnis der CD56-Färbung bestätigt die Tauglichkeit des in dieser Arbeit getesteten FFPE-Probenmaterials mit Ausnahme der Fälle 25 bis 27 für immunhistochemische Färbungen. Diese drei Fälle färben allerdings positiv für Ki-67, darum wird davon ausgegangen, dass sie dennoch immunhistochemietauglich sind.

4.3.2 Ki-67

Für die vorliegende Studie wird angenommen, dass der Anteil der in der Anti-Ki-67-Färbung angefärbten Tumorzellkerne an der Gesamtheit der Tumorzellkerne im Gesichtsfeld dem Anteil der proliferativ aktiven Zellen an der Gesamtheit der Zellen der vorliegenden Tumorseite entspricht (Scholzen und Gerdes 2000). Der Nachweis des nukleären Proteins Ki-67 in den Fällen 1 bis 20 spricht für eine durchgängig vorhandene Zellteilungsaktivität im Probengewebe zum Zeitpunkt seiner Entnahme und Fixierung. In einigen Fällen (Fallnummern 4, 5, 10, 14, 15 und 16) ist die Proliferationsaktivität mit Anfärbung von 5% der Zellen nur basal, in anderen hoch zwischen 50 und 100% (Fallnummern 1, 7 und 9). Ein Zusammenhang mit der histologischen Klassifikation der jeweiligen Neuroblastome ist nicht augenfällig. Anders als bei den Neuroblastomen konnte Ki-67 nicht in allen Rhabdomyosarkomfällen nachgewiesen werden. Im Gewebe der Fälle 21, 30 und 35 scheint eine Proliferationsaktivität zu fehlen, die übrigen Fälle zeigen unterschiedliche Werte für die Anfärbbarkeit von Ki-67. Auch

hier ist kein Zusammenhang mit der histologischen Einordnung in embryonale und alveoläre Rhabdomyosarkome feststellbar.

4.3.3 Hedgehog-Proteine

Die grafische Gesamtdarstellung der IHC-Ergebnisse (Tabelle 29) verdeutlicht, dass die Expression der Hh-Proteine bei den Neuroblastomen insgesamt deutlich stärker nachweisbar war als bei den Rhabdomyosarkomen. Aktuelle Studien berichten von ähnlich hohen Expressionsraten der Hh-Proteine in Neuroblastomen (Schiapparelli et al. 2011, Mao et al. 2009c, Wickström et al. 2013). Mao et al. beschreiben allerdings ein anderes zelluläres Verteilungsmuster der von ihnen gefärbten Hh-Moleküle SHH und SMO als es die für diese Arbeit gesammelten Ergebnisse tun. Während SHH und SMO von Mao et al. als membranständig nachgewiesen wurden, konnte in den für diese Arbeit angefertigten SHH-Immunfärbungen keine Anfärbung der Membran festgestellt werden, ebenso wenig in den SMO-Färbungen. SHH und SMO wurden hauptsächlich im Zytoplasma bzw. am Golgi-Apparat nachgewiesen. Aus Tabelle 29 geht hervor, dass in allen 39 Fällen mehr als ein Ligand auf Proteinebene nachweisbar war. Die drei Ligandenhomologe sind in den untersuchten Geweben meist parallel exprimiert, und zwar sowohl im Zytoplasma als auch nukleär, teilweise membranös und am Golgi-Apparat. Weiterhin fällt auf, dass in Fällen mit deutlicher Expression der intrazellulären Hedgehog-Proteine SMO und SUFU (zum Beispiel Fälle 15, 19, 27) eine ebenfalls deutliche Expression der Liganden vorliegt.

4.3.3.1 SHH

Der immunhistochemische Nachweis des Liganden Sonic Hedgehog in allen 39 Fällen zeugt von einer Aktivierung der SHH-Proteinsynthese in den vorliegenden Geweben. Die zytoplasmatische Anfärbung von SHH in 35 von 39 Fällen ist durch die Synthese dieses Proteins an zytoplasmatischen Ribosomen erklärbar. Mao et al. beschreiben, dass SHH in der Zelle nach seiner Synthese im Golgi-Apparat modifiziert und mit Caveolin-1, einem mit Membrantransport und Signaltransduktion in Verbindung gebrachten Membranprotein, gekoppelt wird (Mao et al. 2009a). Diese Assoziation von SHH und Golgi-Apparat stellt eine

mögliche Erklärung der fast durchgängig relativ starken Anfärbung der Golgi-Apparate in der Anti-SHH-Färbung dar. Insgesamt zeigt sich innerhalb der Neuroblastomfälle eine etwas kräftigere SHH-Anfärbung, was für eine gegenüber den Rhabdomyosarkomfällen stärkere SHH-Synthese im Probenmaterial spricht. Eine nukleäre Anfärbung von SHH wurde nicht beobachtet.

4.3.3.2 DHH

In allen untersuchten Proben wurde der Ligand Desert Hedgehog immunhistochemisch nachgewiesen, was den Verdacht einer Aktivität des Signalweges auf der Ebene der Liganden in den vorliegenden Probengeweben weiter verstärkt. Die durchschnittlich stärkste Anfärbung zeigte sich zytoplasmatisch. In 35 der 39 Fälle fiel auch eine nukleäre Komponente auf, in fünf Fällen eine leichte Anfärbung der Golgi-Apparate. Eine deutliche Assoziation zum Golgi-Apparat fehlt hier, für eine solche Verbindung ist auch in der aktuellen Fachliteratur kein Hinweis zu finden. Die DHH-Färbung fällt bei den Neuroblastomfällen etwas stärker aus als bei den Rhabdomyosarkomfällen.

4.3.3.3 IHH

Die Immunfärbung von Indian Hedgehog fiel bei den Neuroblastomen auffallend stark aus. Die zytoplasmatische Anfärbung erreicht hier in neun von 20 Fällen den maximalen IRS-Wert von 12. Auch bei den Rhabdomyosarkomen ergeben sich in fünf von 19 Fällen IRS-Werte von 12, allerdings für den Bereich der Zellkerne. Eine erhöhte nukleäre Aktivität des Liganden IHH in Rhabdomyosarkomen und anderen Malignomen ist in der Literatur bislang nicht beschrieben worden. Ein weiteres auffälliges Merkmal der IHH-Färbung ist ihre membranöse Komponente, die in der Färbung von SHH und DHH nicht auftrat. Diese wurde in elf von 20 Neuroblastomfällen und in vier von 19 Rhabdomyosarkomfällen jeweils in eher schwacher Ausprägung gesehen. Eine membranöse Anfärbung von IHH kann wohl darauf zurückgeführt werden, dass die IHH-Färbung insgesamt kräftig ausfiel. Das Verhältnis zwischen zytoplasmatischer und membranöser Anfärbung ist bei beiden Tumorentitäten ähnlich. Denkbar ist eine membranöse Färbung von IHH auch im Zusammenhang mit einer transmembr-

ranösen Sekretion, der allerdings alle drei Hedgehog-Ligandenhomologe unterliegen (Alberts 2011).

4.3.3.4 SMO

Die immunhistochemische Färbung von Smoothened zeigt sich bei beiden Gruppen, Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen, wieder deutlich gleichmäßiger. Es besteht eine mäßige bis mittelkräftige zytoplasmatische Anfärbung in allen 39 Fällen und eine schwache Anfärbung in 15 von 20 Neuroblastom- und zwölf von 19 Rhabdomyosarkomfällen. Eine membranöse Komponente konnte nicht beobachtet werden.

4.3.3.5 SUFU

Das fünfte untersuchte Hh-Protein ist das die Serin-Threonin-Kinase Fused hemmende Suppressor of Fused. Es interagiert mit GLI-Molekülen und funktioniert als negativer Regulator der Hh-Signalaktivität. Außerdem wird SUFU eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben. Barnfield et al. beschreiben beispielsweise, dass SUFU die nukleäre Akkumulation von GLI1 und GLI2 über mehrere Mechanismen verhindert (Barnfield et al. 2005). SUFU-Mutationen wurden in Medulloblastomen und Prostatamalignomen gefunden (Taylor et al. 2002, Pastorino et al. 2009). Die Ergebnisse der SUFU-Immunfärbung zeigen zytoplasmatisch und vor allem nukleär sowohl im Neuroblastom- als auch im Rhabdomyosarkomgewebe eine mittlere (zytoplasmatisch) bis starke (nukleär) Proteinexpression. Dies entspricht weitgehend der Erwartung an ein hauptsächlich nukleär agierendes Protein. In der SUFU-Färbung fällt gegenüber den vier vorausgegangenen Färbungen erstmals ein leichtes Überwiegen von Intensität und Anteil der Färbung bei den Rhabdomyosarkomen (IRS 6,11 zytoplasmatisch / 7,95 nukleär) gegenüber den Neuroblastomen (IRS 3,95 zytoplasmatisch / 7,3 nukleär) auf. Tostar et al. beschreiben eine positive Immunfärbung von SUFU in 29 von 46 untersuchten Rhabdomyomen und Rhabdomyosarkomen sowie eine im Vergleich zu normalem Muskelgewebe eher niedrige Immunreaktivität von SUFU. Für die vorliegende Arbeit wurden keine vergleichbaren Färbungen von Normalgewebe erstellt, deshalb kann ein analoger Vergleich nicht angestellt werden (Tostar et al. 2006).

4.3.4 Korrelation der einzelnen IHC-Ergebnisse und Zusammenhänge mit dem klinischen Verlauf

Im Vergleich der Ergebnisse aus der Immunhistochemie untereinander fällt zunächst auf, dass alle IHC-Werte positiv miteinander korrelieren (siehe Tabellen 17 und 26). Es ließe sich hier ein gleichsinniger Zusammenhang der Expression aller Hh-Proteine postulieren. Dass die IHC-Werte des inhibitorischen Proteins SUFU positiv mit denen der anderen Proteine korrelieren, könnte auf eine möglicherweise physiologische, eventuell frustrane Gegenreaktion des Organismus hinweisen, auf einen Versuch der Inhibition des Hh-Signalweges durch Hochregulierung suppressiver Faktoren. Eine immunhistochemische Färbung von PTCH1 und der GLI-Effektormoleküle wäre an dieser Stelle interessant, konnte wie bereits beschrieben aber leider nicht verwirklicht werden (siehe 2.11.1). Ho et al. beschreiben hierzu, dass die Reduktion der Aktivität von SUFU durch Hh-induzierte Phosphorylierung von SUFU bewirkt wird, eine Abnahme der SUFU-Konzentration im Gewebe bei Hh-Aktivität also nicht unbedingt erfolgen muss (Ho et al. 2005).

Wie unter 3.2.1.3 und 3.2.2.3 bereits angemerkt, besteht bei den Neuroblastomen und Rhabdomyosarkomen jeweils eine negative Korrelation zwischen der Expression des inhibitorisch wirkenden Proteins SUFU und den Verlaufskriterien Rezidiv und Tod. Dies passt zu Ergebnissen aus Arbeiten, die SUFU eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor zuschreiben, und spricht für eine Verbesserung der Prognose bei Patienten mit Hochregulation von SUFU (Lee et al. 2007, Svard et al. 2006).

Darüber hinaus fallen im Vergleich der IHC-Ergebnisse miteinander statistisch hochsignifikante positive Korrelationen zwischen den Wertereihen für SHH und SMO auf. Das lässt vermuten, dass im Probengewebe durch gesteigerte Expression von SHH das nachgeschaltete SMO hochreguliert wurde. Eine weitere signifikante positive Korrelation ergibt sich bei den Rhabdomyosarkomen für den Grad der Ausbildung von DHH und SMO, der Kausalzusammenhang scheint hier der gleiche zu sein.

4.4 Ergebnisse der RT-qPCR-Analyse

Unter 3.3 wurden die RT-qPCR-Messergebnisse und die Ergebnisse aus der statistischen Analyse präsentiert. Im folgenden Abschnitt sollen diese unabhängig von den IHC-Ergebnissen diskutiert, verglichen und in Bezug zum Hh-Signalweg eingeordnet werden. In einigen Fällen wurden nur sehr hohe CT-Werte bzw. Nullwerte gemessen, die Expression der Signalwegsfaktoren für diese Fälle ist auf mRNA-Ebene also nicht beurteilbar beziehungsweise negativ. Daneben gibt es Fälle, die fast durchgehend hohe $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte zeigen. Hier scheint der Signalweg auf mRNA-Ebene durchgehend aktiviert zu sein. In anderen Fällen ist Hedgehog-mRNA erst ab einer bestimmten Stelle des Signalwegs (meist ab PTCH1) nachweisbar, sodass hier von einer Expression des Hh-Signalweges an dieser Stelle ausgegangen werden kann, die sich in Richtung der nachgeschalteten Proteine fortsetzt. Unterschiede im mRNA-Expressionsmuster der Neuroblastom- und Rhabdomyosarkomproben werden im Folgenden angesprochen.

4.4.1 Neuroblastome

Der bei den Neuroblastomen in der RT-qPCR am gleichmäßigsten nachgewiesene Faktor ist die PTCH1-mRNA. In 16 von 20 Neuroblastomfällen konnte PTCH1 detektiert werden, und zwar in jeweils ähnlicher Menge ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte meist zwischen 0 und 1). Diese Ergebnisse passen zu dem, was Shahi et al. in der RT-qPCR-Untersuchung von elf Neuroblastom-Zelllinien fanden. Sie beschreiben eine im Vergleich mit normalem adultem Hirngewebe durchgehend niedrignormale bis erniedrigte PTCH1-Expression in Neuroblastomzellen (Shahi et al. 2008). Weiterhin zeigt die Übersicht in Tabelle 25 bei den Neuroblastomen eine im Vergleich zu GLI1 tendenziell stärkere Expression von GLI2. Mao et al. beschreiben vergleichbare Ergebnisse aus zwölf Neuroblastomzelllinien und 40 humanen Neuroblastomen. GLI2 wird von ihnen als essenziell für das Tumorwachstum von humanen Neuroblastomen angeführt. Mithilfe von in Neuroblastomzellen eingeschleusten modifizierten Retroviren generierten Mao et al. zwei Zelllinien mit deutlich reduzierter GLI2-Expression. Diese Zellen bildeten deutlich kleinere und weniger Kolonien als die Kontrollzellen (Mao et al. 2009c).

Zur Rolle von GLI1 in Neuroblastomen berichten Paul et al. von einer positiven Korrelation der GLI1-Expression mit der Prognose bei Neuroblastom-Patienten. Je stärker die GLI1-Expression, desto niedriger sei die Mitoserate und desto stärker die Expression von Genen, die zur Differenzierung der Neuroblastomzellen beitragen. Als für die Regulierung der GLI1-Transkriptionsaktivität ausschlaggebend wird der PI3K-Signalweg beschrieben (Paul et al. 2013). Dazu passen auch die Ergebnisse von Souzaki et al., die in 82 Neuroblastomen und 10 Ganglioneuroblastomen die Proteinexpression von SHH, GLI1 und PTCH1 analysiert haben und von einer hohen GLI1-Expressionsrate speziell in Neuroblastomen, die für das prognostisch ungünstige Onkogen N-Myc negativ sind, berichten. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei GLI1-positiven, N-Myc-negativen Fällen ist deutlich höher (Souzaki et al. 2010).

4.4.2 Rhabdomyosarkome

Bei den Rhabdomyosarkomen ist die Expression von GLI1 und GLI2 etwa gleich stark. Insbesondere die mRNA-Expression von GLI1 in Geweben wird in der Literatur als ein Parameter für die Aktivierung des Hh-Signalweges gesehen. Wie Diao et al. schreiben, sind GLI1-Expressionsraten ein guter Marker für die Signalwegsaktivität, weil GLI1 nicht nur Effektor, sondern auch Zielgen des Signalweges ist, welches das Hh-Signal verstärkt (Diao et al. 2014). Tostar et al. orientieren sich zur Beurteilung der Hh-Signalwegsaktivität an den Expressionsraten von PTCH1 und GLI1. Diese beiden werden als Antwort auf Hh-Signalübertragung transkriptionell aktiviert. Daher kann eine PTCH1/GLI1-Überexpression als Nachweis bestehender Hh-Signalaktivität gewertet werden (Tostar et al. 2006). Von einer mRNA-Überexpression wird in dieser Arbeit bei $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werten ausgegangen, die über 1 liegen. Diese drücken eine mRNA-Expressionsrate aus, die x-fach höher ist als der Mittelwert aus den jeweiligen Vergleichsgewebeproben. Die stärkste GLI1-Expression liegt bei Fall 24, einem Rhabdomyosarkom vom embryonalen Typ, vor. Danach folgen die Fälle 29 und 39, beides Rhabdomyosarkome vom alveolären Typ. Paulson et al. beschreiben eine GLI1-Amplifikation in Rhabdomyosarkomen. Sie untersuchten 26 embryonale Rhabdomyosarkome und fanden in über 50% der Fälle eine leichte

Expressionssteigerung von GLI1, die mit einer Amplifikation weiterer Hh-Zielgene einherging (Paulson et al. 2011).

4.4.3 Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse

Wenn auch unter den Ergebnissen der RT-qPCR aus dem Neuroblastom-Probenmaterial keine statistisch signifikante Korrelation besteht, so fallen bei den Rhabdomyosarkomfällen die folgenden vier Zusammenhänge auf: Zwischen den Expressionsraten von SHH und GLI2 besteht eine signifikante positive Korrelation, ebenso zwischen denen von SMO und GLI2, von PTCH1 und GLI1 sowie von SMO und GLI1. Geht man davon aus, dass eine signifikante Korrelation zwischen den mRNA-Expressionsraten zweier Signalwegskomponenten einen zugrundeliegenden Kausalzusammenhang beschreibt, so ergibt sich durch Kombination der einzelnen Korrelationen eine Kette, die den Signalweg angefangen bei SHH über PTCH1 und SMO bis zu den Effektoren GLI1 und GLI2 auf mRNA-Ebene wiedergibt. Dies entspricht der grundsätzlichen Annahme, dass in einer zellulären Signalkaskade hochregulierte Komponenten die Expression der nachgeschalteten Komponenten stimulieren.

4.5 Korrelation der IHC- mit den RT-qPCR-Ergebnissen

Im Vergleich der Werte aus IHC und PCR zeigen sich zwischen den jeweiligen Äquivalenten auf mRNA- und auf Proteinebene erstaunlich wenige signifikante Korrelationen. Lediglich für die Expressionsdaten von DHH (RNA-Ebene, NB) und DHH (Proteinebene, NB) sowie die von IHH (RNA-Ebene, RMS) und IHH (Proteinebene, RMS) ist ein statistischer Zusammenhang nachweisbar. Die bereits unter 4.5 genannten Arbeiten berichten passend hierzu von generell auffällig schwachen Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinexpressionsraten. Fehlende Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinwerten in den für diese Arbeit erhobenen Daten unterstreichen die These, dass posttranskriptionale Prozesse zur Stärke der Proteinexpression einen ähnlich großen Teil beitragen wie die Transkription selbst (de Sousa Abreu et al. 2009, Ghazalpour et al. 2011, Vogel und Marcotte 2012).

4.6 Korrelation der Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf

Die Protein-Expressionsraten zeigen in keinem der untersuchten NB- und RMS-Fälle eine signifikante Korrelation mit den zur Verfügung stehenden klinischen Verlaufsdaten. Anders die mRNA-Expressionsraten, hier ergeben sich einige scheinbare Zusammenhänge, die jedoch auf Grundlage einer geringen Fallzahl zustande gekommen sind. Saze et al. berichten von ihrer Analyse des Hh-Signalweges in 41 Magenkarzinomen, dass die Hh-Proteinexpressionswerte nicht mit klinischen Faktoren korrelierten, wohl aber die mRNA-Werte von SHH und PTCH1. Hohe Werte waren mit einer schlechten Prognose assoziiert (Saze et al. 2012). In den für die vorliegende Arbeit untersuchten Fällen ist nur bei Fall Nummer 35 ein erhöhter SHH-Wert gemessen worden, SHH und PTCH1 sind bei allen anderen Fällen mit dokumentierten Rezidiven bzw. Tod (Fallnummern 2, 4, 22, 31 und 36) niedrig bis nicht nachweisbar. Die Neuroblastom-Fälle mit günstigen Verlaufsdaten zeigen allerdings auch durchgehend niedrige Werte für PTCH1, was die Ergebnisse aus der Untersuchung von Magenkarzinomen von Saze et al. (siehe oben) untermauert. Eine im Vergleich zu mRNA-Expressionswerten schwächere Korrelation von Proteinexpressionsraten mit klinischen Verlaufsdaten wird übrigens für eine Vielzahl untersuchter Proteine und Transkripte berichtet (Ghazalpour et al. 2011).

4.7 Analyse der Fallgruppen

Die unter 3.5 gezeigte Gruppierung der Fälle nach Expressionsmuster wird im Folgenden erklärt und als Interpretationshilfe genutzt. Nachdem die Ergebnisse aus Immunhistochemie und RT-qPCR einzeln diskutiert wurden, soll nun versucht werden, aus dem Gesamtbild Schlüsse für das Verständnis des Hh-Signalweges in Neuroblastom- und Rhabdomyosarkomgewebe zu ziehen. Aufgrund nicht gelungener Etablierung einer entsprechenden Immunfärbung konnte die Expression von PTCH1, GLI1 und GLI2 nur auf mRNA-Ebene analysiert werden. Es fehlen also Vergleichswerte für diese wichtigen Signalwegskomponenten auf Proteinebene (siehe 2.11.1). Für die Interpretation der Ergebnisse aus beiden Ebenen ist es interessant, wie stark der Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von mRNA und der tatsächlichen Expression eines Proteins in einem Organismus ist. Aktuelle Studien zeigen erstaunlich geringe Korrelationen von mRNA- und Protein-Expressionsraten in allen untersuchten Organismen von der Hefezelle bis zum Menschen. Es wird davon ausgegangen, dass 30 bis 85% der Expressionsunterschiede auf Proteinebene durch die Variation der mRNA-Ausprägung verursacht werden. Die restlichen 15 bis 70% werden durch posttranskriptionale, posttranslationale und proteolytische Regulation und durch Messungenauigkeiten erklärt. Es hat sich gezeigt, dass diese Prozesse zur Regulation der Proteinexpression mindestens so viel beitragen wie die Transkription selbst (de Sousa Abreu et al. 2009, Vogel und Marcotte 2012, Ghazalpour et al. 2011). Liu et al. bezeichnen den Proteinnachweis mittels Immunhistochemie zur Analyse der Aktivierung des Hh-Signalweges folgerichtig als unzuverlässig (Liu et al. 2011). Beim Vergleich der Gruppenzugehörigkeit mit dem klinischen Outcome fällt auf, dass von den Fällen, für die ein Rezidiv bzw. Tod dokumentiert wurde (Fallnummern 2, 4, 22, 31, 35 und 36), für fünf Fälle (Fallnummern 2, 4, 22, 31 und 36) kein Nachweis der Signalwegsaktivierung gelang. So konnten in den Fällen 2, 4 und 31 die RT-qPCR-Werte nicht verwendet werden. In den Fällen 22, 35 und 36 war kein Nachweis von PTCH1 möglich, was eher gegen eine Aktivierung des Signalweges spricht (siehe 4.4.2). Diese Beobachtungen könnten die These einer prognosebegüns-

tigenden Aktivierung des Hh-Signalweges in Tumoren stärken, siehe dazu 4.4.1 (Paul et al. 2013).

4.7.1 Neuroblastome

Die Neuroblastomfälle (Fallnummern 1 bis 20) lassen sich anhand des Expressionsmusters der Hh-mRNA und -Proteine in drei Gruppen einteilen, die unterschiedliche Aktivierungsmuster des Signalweges widerspiegeln. In den Fällen aus Gruppe 1 konnten Liganden, intrazelluläre Signalwegsanteile sowie die Effektoren nachgewiesen werden. Dies spricht für eine durchgehende Aktivierung des Signalweges in den untersuchten Tumorgeweben. Man kann hier von einer ligandenabhängigen Aktivierung des Signalweges mit physiologischer Signalübertragung von den Liganden über PTCH1 und SMO bis zu den Effektoren ausgehen. In den in Gruppe 2 zusammengefassten Fällen konnte keine Liganden-mRNA nachgewiesen werden. Ein immunhistochemischer Nachweis von Liganden-Protein gelang zwar, dieser wird aber, wie unter 4.7 erklärt, gegenüber dem RT-qPCR-Ergebnis vernachlässigt. Als Erklärung für das vollständige Fehlen von Liganden-mRNA in allen sechs Fällen der Gruppe 2 wird hier, analog zu 4.7.2, die ligandenunabhängige Aktivierung des Signalweges durch Mutationen in PTCH1 vorgeschlagen. In der Literatur finden sich bisher keine Arbeiten zur ligandenunabhängigen Aktivierung des Hh-Signalweges in Neuroblastomen. Als Hinweis auf ein gehäuftes Auftreten ligandenunabhängiger Aktivierung durch PTCH1-Aktivierung in Neuroblastomen kann der unter 4.4.1 beschriebene fast durchgängig mögliche, aber schwache Nachweis von PTCH1-mRNA im untersuchten Neuroblastomgewebe in Verbindung mit der Studie von Shahi et al., die ähnliche Ergebnisse in Bezug auf PTCH1-Expression in Neuroblastomzellen beschreibt, gewertet werden (Shahi et al. 2008).

4.7.2 Rhabdomyosarkome

Auch bei den Rhabdomyosarkomfällen wurden in Gruppe 1 die Fälle mit einer durchgängig nachgewiesenen Aktivierung des Hh-Signalweges zusammengefasst. Hier kann von einer ligandenabhängigen Aktivierung des Signalweges ausgegangen werden. Gruppe 2 beinhaltet analog zu den Neuroblastomen die Fälle, für die eine Aktivierung des Hh-Signalweges erst ab *PTCH1* und stromabwärts nachgewiesen werden konnte. Eine ligandenunabhängige Aktivierung des Hh-Signalweges könnte durch eine irreguläre Aktivierung von *PTCH1* verursacht sein. Patienten mit Keimbahnmutationen im *PTCH1*-Gen (Gorlin-Syndrom) wurden als anfällig für eine Vielzahl von Malignomen beschrieben, darunter Basalzellkarzinome, Medulloblastome und Rhabdomyosarkome (Johnson et al. 1996, Gorlin 1999, Gorlin 2004). Auch *SUFU*-Mutationen wurden im Zusammenhang mit dem Gorlin-Syndrom beschrieben (Pastorino et al. 2009, Taylor et al. 2002). Die Rolle von *PTCH1*-Mutationen in sporadischen Rhabdomyosarkomen ist weniger klar. Aktuelle Studien, in denen nach *PTCH1*- und *SMO*-Mutationen in Rhabdomyosarkomen gesucht wurde, brachten unterschiedliche Ergebnisse hervor: Calzada-Wack et al. fanden in nur einer von 14 Rhabdomyosarkom-Proben einen Verlust der Heterozygotie für *PTCH1*. Punktmutationen oder Deletionen von *PTCH1* konnten in den Probengeweben nicht gefunden werden (Calzada-Wack et al. 2002). Bridge et al. berichten von einem Verlust von 9q22 inklusive *PTCH1* bei vier von 12 Rhabdomyosarkomen und legen eine wichtige Rolle von *PTCH1* in sporadischen Rhabdomyosarkomen nahe (Bridge et al. 2000). Tostar et al. schreiben von einem Verlust der Heterozygotie für *PTCH1* in fünf von neun untersuchten Rhabdomyosarkomen (Tostar et al. 2006, Belyea et al. 2012). Auch für *SMO* sind Mutationen bekannt, die eine Hedgehog-Zielgen-Amplifikation nach sich ziehen. Xie et al. beschreiben die Identifikation einer aktivierenden somatischen Missense-Mutation in *SMO* in drei Fällen sporadischer Basalzellkarzinome (Xie et al. 1998), Reifenberger et al. fanden in zwei Basalzellkarzinomen Mutationen in *PTCH* und *SMO* (Reifenberger et al. 1998).

4.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Hinweise auf frühe molekularbiologische Prognosemarker bei der Therapieplanung in der pädiatrischen Onkologie zu finden. Beispielsweise könnte ein klinischer Einsatz von relativ einfach zu etablierenden immunhistochemischen Assays eine individualisierte Indikationsstellung für die Therapie mit Hedgehog-Inhibitoren wie Itraconazol, Cyclopamin-Derivaten, Arsentrioxid, Hedgehog-Antikörpern und anderen Hedgehog-Antagonisten ermöglichen. Voraussetzung dafür ist, dass für die betreffende Tumorart eine klare Korrelation der biologischen Marker mit der Aktivierung des Signalwegs nachgewiesen werden konnte. Dies ist den Ergebnissen aus dieser Arbeit zufolge auf immunhistochemischer Ebene nicht der Fall. Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Hh-Signalwegspoteinen und der auf mRNA-Ebene abgebildeten Expression des Hh-Signalweges bewiesen werden. Dieses Fazit deckt sich mit dem Tenor der aktuellen Fachliteratur. Der Einsatz der Immunhistochemie zur einfachen Bestimmung klinischer Ziele in Form von Hh-Signalwegsbestandteilen scheint für die individualisierte onkologische Therapieplanung in der Pädiatrie nicht geeignet zu sein. Alternativ könnte die PCR-Analyse von Probenmaterial aus pädiatrischen Tumoren zur gezielten therapeutischen Inhibition des Hh-Signalweges bei entsprechend Hh-positiven Tumoren dienen. In der Universitäts-Kinderklinik Tübingen ist bisher kein entsprechender Assay etabliert. Bei einer Fallzahl von nur etwa zehn soliden pädiatrischen Neoplasien pro Jahr in der Universitäts-Kinderklinik Tübingen könnte die PCR-Analyse der Gewebeproben durch das Institut für allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen durchgeführt werden. Nach den Ergebnissen dieser Studie zu urteilen, ist eine PCR-basierte individuelle Therapieplanung für die Behandlung pädiatrischer Neuroblastome und Rhabdomyosarkome erfolgsversprechend.

5 Zusammenfassung

Die Analyse der Aktivität des Hedgehog-Signalweges in 20 pädiatrischen Neuroblastomen sowie neun pädiatrischen und zehn nicht-pädiatrischen Rhabdomyosarkomen war das dieser Arbeit zugrunde liegende Ziel. Mit den Methoden der immunhistochemischen Färbung und der RT-qPCR-Analyse wurde eine Quantifizierung der in den Gewebeproben enthaltenen Signalwegsbestandteile auf RNA- und auf Proteinebene vorgenommen. Auf beiden Ebenen konnte der Hedgehog-Signalweg in unterschiedlicher Ausprägung nachgewiesen werden. Die 20 Neuroblastom- und 19 Rhabdomyosarkomfälle konnten in jeweils drei Gruppen mit unterschiedlichen Expressionsmustern eingeteilt werden. Es gab Fälle, die sich durch eine Expression des gesamten Signalweges auf Protein- beziehungsweise mRNA-Ebene auszeichneten und Fälle mit unvollständigen Expressionsmustern. Die statistische Auswertung der Ergebnisse zeigte einen relativ schwachen Zusammenhang zwischen nachgewiesener Protein- und mRNA-Expression. Für das klinische Ziel der Therapieplanung in der pädiatrischen Onkologie erscheint die Immunhistochemie deshalb als ungeeignete Methode. Die auf der PCR-Analyse basierende Therapieplanung mit nachfolgender Hedgehog-Inhibitionstherapie von Hedgehog-aktivierten pädiatrischen Tumoren rückt weiter in den Vordergrund.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlgren SC, Bronner-Fraser M (1999) Inhibition of sonic hedgehog signaling in vivo results in craniofacial neural crest cell death. *Curr Biol*, 9 (22):1304-1314.
- Alberts B (2011) *Molekularbiologie der Zelle*. Seiten 1068-1089. Schäfer U (Hrsg). 5. Aufl. Wiley-VCH, Weinheim.
- Anderson E, Peluso S, Lettice LA, Hill RE (2012) Human limb abnormalities caused by disruption of hedgehog signaling. *Trends Genet*, 28 (8):364-373.
- Athar M, Tang X, Lee JL, Kopelovich L, Kim AL (2006) Hedgehog signalling in skin development and cancer. *Exp Dermatol*, 15 (9):667-677.
- Atwood SX, Chang AL, Oro AE (2012) Hedgehog pathway inhibition and the race against tumor evolution. *J Cell Biol*, 199 (2):193-197.
- Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, Piccirillo S, Vescovi AL, DiMeco F, Olivi A, Eberhart CG (2007) Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells*, 25 (10):2524-2533.
- Barnfield PC, Zhang X, Thanabalasingham V, Yoshida M, Hui CC (2005) Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms. *Differentiation*, 73 (8):397-405.
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM (2004) Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 432 (7015):324-331.
- Beauchamp E, Bulut G, Abaan O, Chen K, Merchant A, Matsui W, Endo Y, Rubin JS, Toretsky J, Uren A (2009) GLI1 is a direct transcriptional target of EWS-FLI1 oncoprotein. *J Biol Chem*, 284 (14):9074-9082.
- Beauchamp EM, Ringer L, Bulut G, Sajwan KP, Hall MD, Lee YC, Peaceman D, Ozdemirli M, Rodriguez O, Macdonald TJ, Albanese C, Toretsky JA, Uren A (2011) Arsenic trioxide inhibits human cancer cell growth and tumor development in mice by blocking Hedgehog/GLI pathway. *J Clin Invest*, 121 (1):148-160.
- Belyea B, Kephart JG, Blum J, Kirsch DG, Linardic CM (2012) Embryonic signaling pathways and rhabdomyosarcoma: contributions to cancer development and opportunities for therapeutic targeting. *Sarcoma*, 2012:406239.
- Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA (2003) Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 425 (6960):846-851.
- Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol*, 2 (2):172-180.
- Böcker W, Kleihues P, Höfler HK, Lax S, Poremba C, Moll R (2004) *Allgemeine Tumorpathologie*. Seiten 169-173. Böcker W, Denk H, Heitz P (Hrsg). Pathologie. Urban & Fischer, München.

- Bridge JA, Liu J, Weibolt V, Baker KS, Perry D, Kruger R, Qualman S, Barr F, Sorensen P, Triche T, Suijkerbuijk R (2000) Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study. *Genes Chromosomes Cancer*, 27 (4):337-344.
- Calzada-Wack J, Schnitzbauer U, Walch A, Wurster KH, Kappler R, Nathrath M, Hahn H (2002) Analysis of the PTCH coding region in human rhabdomyosarcoma. *Hum Mutat*, 20 (3):233-234.
- Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, de Sauvage FJ (1998) Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (23):13630-13634.
- de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009) Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst*, 5 (12):1512-1526.
- Diao Y, Rahman MF, Villegas VE, Wickstrom M, Johnsen JI, Zaphiropoulos PG (2014) The impact of S6K1 kinase on neuroblastoma cell proliferation is independent of GLI1 signaling. *BMC Cancer*, 14:600.
- Dierks C, Grbic J, Zirlik K, Beigi R, Englund NP, Guo GR, Veelken H, Engelhardt M, Mertelsmann R, Kelleher JF, Schultz P, Warmuth M (2007) Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med*, 13 (8):944-951.
- Epstein EH (2008) Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*, 8 (10):743-754.
- Fahrmeir Lea (2004) Statistik Der Weg zur Datenanalyse. Fünfte, verbesserte Auflage Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Falk M, Marohn F, Tewes B (2002) Foundations of statistical analyses and applications with SAS. Basel u.a.: Birkhäuser.
- Fendrich V, Esni F, Garay MV, Feldmann G, Habbe N, Jensen JN, Dor Y, Stoffers D, Jensen J, Leach SD, Maitra A (2008) Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas. *Gastroenterology*, 135 (2):621-631.
- Figarella-Branger D, Nedelec J, Pellissier JF, Boucraut J, Bianco N, Rougon G (1990) Expression of various isoforms of neural cell adhesive molecules and their highly polysialylated counterparts in diseased human muscles. *J Neurol Sci*, 98 (1):21-36.
- Franco HL, Yao HH (2012) Sex and hedgehog: roles of genes in the hedgehog signaling pathway in mammalian sexual differentiation. *Chromosome Res*, 20 (1):247-258.
- Fu M, Lui VC, Sham MH, Pachnis V, Tam PK (2004) Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J Cell Biol*, 166 (5):673-684.
- Gailani MR, Bale AE (1997) Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. *J Natl Cancer Inst*, 89 (15):1103-1109.
- Ghazalpour A, Bennett B, Petyuk VA, Orozco L, Hagopian R, Mungrue IN, Farber CR, Sinsheimer J, Kang HM, Furlotte N, Park CC, Wen PZ,

- Brewer H, Weitz K, Camp DG, 2nd, Pan C, Yordanova R, Neuhaus I, Tilford C, Siemers N, Gargalovic P, Eskin E, Kirchgessner T, Smith DJ, Smith RD, Lusic AJ (2011) Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet*, 7 (6):e1001393.
- Goeppert FB (2006) Immunreaktivität von VEGF und Gravin in humanen Astrozytomen unterschiedlichen WHO-Grads. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen
- Gorlin RJ (1999) Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome: unanswered issues. *J Lab Clin Med*, 134 (6):551-552.
- Gorlin RJ (2004) Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome. *Genet Med*, 6 (6):530-539.
- Gupta S, Takebe N, Lorusso P (2010) Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 2 (4):237-250.
- Gustafsson MK, Pan H, Pinney DF, Liu Y, Lewandowski A, Epstein DJ, Emerson CP, Jr. (2002) Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes Dev*, 16 (1):114-126.
- Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Uden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgard R, Chenevix-Trench G, Wainwright B, Bale AE (1996) Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85 (6):841-851.
- Herper M (2005) The curious case of the one-eyed sheep. *Forbes*, 176 (11):69-71.
- Ho KS, Suyama K, Fish M, Scott MP (2005) Differential regulation of Hedgehog target gene transcription by *Costal2* and *Suppressor of Fused*. *Development*, 132 (6):1401-1412.
- Hörmann RA (2012) Charakterisierung leukämischer Progenitorzellen im NOD/SCID-Mausmodell mittels Hoechst 33342.
- Hughes M, Marsden HB, Palmer MK (1974) Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer*, 34 (5):1706-1711.
- Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H (1998) The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development*, 125 (18):3553-3562.
- Ingham PW, McMahon AP (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, 15 (23):3059-3087.
- Ingham PW, Nakano Y, Seger C (2011) Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet*, 12 (6):393-406.
- Jensen M, Berthold F (2007) Targeting the neural cell adhesion molecule in cancer. *Cancer Lett*, 258 (1):9-21.
- Jeong J, Mao J, Tenzen T, Kottmann AH, McMahon AP (2004) Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev*, 18 (8):937-951.
- Jiang J, Hui CC (2008) Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*, 15 (6):801-812.

- Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH, Jr., Scott MP (1996) Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*, 272 (5268):1668-1671.
- Kaatsch P, Spix J (2012) German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2011 (1980-2010). . Mainz.
- Kaatsch P, Spix C, Schüz J (2006) *Epidemiologie, Ätiologie, Prävention*. Seiten 421-435. Gadner H, Gaedicke G, Niemeier C, Ritter J (Hrsg). Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer, Hamburg.
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S 2012 Krebs in Deutschland 2007/2008 Robert Koch-Institut.
- Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA (2004) Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, 431 (7009):707-712.
- Kim J, Lee JJ, Kim J, Gardner D, Beachy PA (2010a) Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (30):13432-13437.
- Kim J, Aftab BT, Tang JY, Kim D, Lee AH, Rezaee M, Kim J, Chen B, King EM, Borodovsky A, Riggins GJ, Epstein EH, Jr., Beachy PA, Rudin CM (2013) Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothed antagonists. *Cancer Cell*, 23 (1):23-34.
- Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, Chong CR, Chang KS, Fereshteh M, Gardner D, Reya T, Liu JO, Epstein EH, Stevens DA, Beachy PA (2010b) Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell*, 17 (4):388-399.
- [Http://www.kinderkrebsregister.de](http://www.kinderkrebsregister.de) [Zugriff 12. Apr 2013]
- King PJ, Guasti L, Laufer E (2008) Hedgehog signalling in endocrine development and disease. *J Endocrinol*, 198 (3):439-450.
- Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B (1987) Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*, 236 (4797):70-73.
- Koch I, Slotta-Huspenina J, Hollweck R, Anastasov N, Hofler H, Quintanilla-Martinez L, Fend F (2006) Real-time quantitative RT-PCR shows variable, assay-dependent sensitivity to formalin fixation: implications for direct comparison of transcript levels in paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol*, 15 (3):149-156.
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4 (7):844-847.
- Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrcic A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R (2008) Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with

- distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*, 3 (8):e3088.
- Krüger M, Mennerich D, Fees S, Schafer R, Mundlos S, Braun T (2001) Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. *Development*, 128 (5):743-752.
- Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R (2007) Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (20):8455-8460.
- Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, Li Y, Russell HR, Curran T, McKinnon PJ (2007) Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis. *Oncogene*, 26 (44):6442-6447.
- Lin TL, Matsui W (2012) Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development. *Onco Targets Ther*, 5:47-58.
- Lipinski M, Hirsch MR, Deagostini-Bazin H, Yamada O, Tursz T, Goridis C (1987) Characterization of neural cell adhesion molecules (NCAM) expressed by Ewing and neuroblastoma cell lines. *Int J Cancer*, 40 (1):81-86.
- Litingtung Y, Chiang C (2000) Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between Shh and Gli3. *Nat Neurosci*, 3 (10):979-985.
- Liu H, Gu D, Xie J (2011) Clinical implications of hedgehog signaling pathway inhibitors. *Chin J Cancer*, 30 (1):13-26.
- Low JA, de Sauvage FJ (2010) Clinical experience with Hedgehog pathway inhibitors. *J Clin Oncol*, 28 (36):5321-5326.
- Mao H, Diehl AM, Li YX (2009a) Sonic hedgehog ligand partners with caveolin-1 for intracellular transport. *Lab Invest*, 89 (3):290-300.
- Mao L, Xia YP, Zhou YN, Dai RL, Yang X, Wang YJ, Duan SJ, Qiao X, Mei YW, Hu B (2009b) Activation of sonic hedgehog signaling pathway in olfactory neuroblastoma. *Oncology*, 77 (3-4):231-243.
- Mao L, Xia YP, Zhou YN, Dai RL, Yang X, Duan SJ, Qiao X, Mei YW, Hu B, Cui H (2009c) A critical role of Sonic Hedgehog signaling in maintaining the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Cancer Sci*, 100 (10):1848-1855.
- McMillan R, Matsui W (2012) Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 18 (18):4883-4888.
- Morgan TH (1910) Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*, 32 (812):120-122.
- Morgan TH (1911a) The Origin of Five Mutations in Eye Color in *Drosophila* and Their Modes of Inheritance. *Science*, 33 (849):534-537.
- Morgan TH (1911b) The Origin of Nine Wing Mutations in *Drosophila*. *Science*, 33 (848):496-499.
- Nakamura M, Kubo M, Yanai K, Mikami Y, Ikebe M, Nagai S, Yamaguchi K, Tanaka M, Katano M (2007) Anti-patched-1 antibodies suppress hedgehog signaling pathway and pancreatic cancer proliferation. *Anticancer Res*, 27 (6A):3743-3747.
- Nieuwenhuis E, Hui CC (2005) Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin Genet*, 67 (3):193-208.
- [Http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1995/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1995/press.html)
[Zugriff 16. Apr 2013]

- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287 (5785):795-801.
- Onishi H, Katano M (2011) Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in various types of cancer. *Cancer Sci*, 102 (10):1756-1760.
- Outram SV, Varas A, Pepicelli CV, Crompton T (2000) Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Immunity*, 13 (2):187-197.
- Pastorino L, Ghiorzo P, Nasti S, Battistuzzi L, Cusano R, Marzocchi C, Garre ML, Clementi M, Scarra GB (2009) Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *Am J Med Genet A*, 149A (7):1539-1543.
- Paul P, Volny N, Lee S, Qiao J, Chung DH (2013) Gli1 transcriptional activity is negatively regulated by AKT2 in neuroblastoma. *Oncotarget*, 4 (8):1149-1157.
- Paulson V, Chandler G, Rakheja D, Galindo RL, Wilson K, Amatruda JF, Cameron S (2011) High-resolution array CGH identifies common mechanisms that drive embryonal rhabdomyosarcoma pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 50 (6):397-408.
- Phimister E, Kiely F, Kemshead JT, Patel K (1991) Expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in neuroblastoma. *J Clin Pathol*, 44 (7):580-585.
- Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, Reifenberger G (1998) Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*, 58 (9):1798-1803.
- Saze Z, Terashima M, Kogure M, Ohsuka F, Suzuki H, Gotoh M (2012) Activation of the sonic hedgehog pathway and its prognostic impact in patients with gastric cancer. *Dig Surg*, 29 (2):115-123.
- Scales SJ, de Sauvage FJ (2009) Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 30 (6):303-312.
- Schiapparelli P, Shahi MH, Enguita-German M, Johnsen JI, Kogner P, Lazcoz P, Castresana JS (2011) Inhibition of the sonic hedgehog pathway by cyclopamine reduces the CD133+/CD15+ cell compartment and the in vitro tumorigenic capability of neuroblastoma cells. *Cancer Lett*, 310 (2):222-231.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182 (3):311-322.
- Shahi MH, Lorente A, Castresana JS (2008) Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma. *Oncol Rep*, 19 (3):681-688.
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999) Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*, 86 (2):349-363.
- Siegel S (1985) Nichtparametrische statistische Methoden. 2. Aufl. Aufl. Eschborn bei Frankfurt am Main: Fachbuchh. f. Psychologie.

- Sinicrope FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B (1995) bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, 55 (2):237-241.
- Souzaki R, Tajiri T, Souzaki M, Kinoshita Y, Tanaka S, Kohashi K, Oda Y, Katano M, Taguchi T (2010) Hedgehog signaling pathway in neuroblastoma differentiation. *J Pediatr Surg*, 45 (12):2299-2304.
- Stanton BZ, Peng LF, Maloof N, Nakai K, Wang X, Duffner JL, Taveras KM, Hyman JM, Lee SW, Koehler AN, Chen JK, Fox JL, Mandinova A, Schreiber SL (2009) A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol*, 5 (3):154-156.
- Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz IAA (2007) Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (14):5895-5900.
- Straface G, Aprahamian T, Flex A, Gaetani E, Biscetti F, Smith RC, Pecorini G, Pola E, Angelini F, Stigliano E, Castellot JJ, Jr., Losordo DW, Pola R (2009) Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration. *J Cell Mol Med*, 13 (8B):2424-2435.
- Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergstrom A, Ericson J, Toftgard R, Teglund S (2006) Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell*, 10 (2):187-197.
- Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D (2002) Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*, 31 (3):306-310.
- Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, 425 (6960):851-856.
- Tostar U, Malm CJ, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Toftgard R, Unden AB (2006) Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development. *J Pathol*, 208 (1):17-25.
- Turing AM (1953) The chemical basis of morphogenesis. 1953. *Bull Math Biol*, 52 (1-2):153-197; discussion 119-152.
- Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, Ruiz i Altaba A (2009) Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med*, 1 (6-7):338-351.
- Vogel C, Marcotte EM (2012) Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet*, 13 (4):227-232.
- Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB (2003) Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*, 422 (6929):313-317.

- Wickström M, Dyberg C, Shimokawa T, Milosevic J, Baryawno N, Fuskevag OM, Larsson R, Kogner P, Zaphiropoulos PG, Johnsen JI (2013) Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, 132 (7):1516-1524.
- Winter C, Pawel B, Seiser E, Zhao H, Raabe E, Wang Q, Judkins AR, Attiyeh E, Maris JM (2008) Neural cell adhesion molecule (NCAM) isoform expression is associated with neuroblastoma differentiation status. *Pediatr Blood Cancer*, 51 (1):10-16.
- Wolpert L, Gingell D (1968) Cell surface membrane and amoeboid movement. *Symp Soc Exp Biol*, 22:169-198.
- Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH, Jr., de Sauvage FJ (1998) Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*, 391 (6662):90-92.
- Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D, Nannini-Pepe M, Kotkow K, Marsters JC, Rubin LL, de Sauvage FJ (2008) A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature*, 455 (7211):406-410.
- Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Aliche B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, Pujara K, Stinson J, Callahan CA, Tang T, Bazan JF, Kan Z, Seshagiri S, Hann CL, Gould SE, Low JA, Rudin CM, de Sauvage FJ (2009) Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science*, 326 (5952):572-574.
- Zurawel RH, Allen C, Chiappa S, Cato W, Biegel J, Cogen P, de Sauvage F, Raffel C (2000) Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 27 (1):44-51.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption der in dieser Arbeit beschriebenen Studie erfolgte durch PD Dr. Ebinger (Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Kinderheilkunde I) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Fend (Ärztlicher Direktor des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen). Die Patientendaten wurden von PD Dr. Ebinger und Prof. Fend zur Verfügung gestellt. Die Datenrecherche erfolgte durch PD Dr. Ebinger und mich, Veit Lange. Die für diese Studie verwendeten Gewebeproben wurden von Prof. Fend zur Verfügung gestellt und von Dr. Nann und Dr. Zeid Bittar (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen) histopathologisch überprüft. Die Etablierung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch das Immunlabor-Team des Instituts für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Universität Tübingen (C. Hermann, N. Rieger, J. Baturin, D. Thiele) unter Betreuung durch Dr. Nann (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen). Die immunhistochemischen Färbungen der Gewebeproben wurden durch die Mitarbeiter im Immunlabor des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte durch Dr. Nann, Dr. Zeid Bittar und mich. Die RT-qPCR-Analysen wurden von Dr. Bonzheim und ihren Mitarbeitern (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen) vorgenommen. Die Auswertung der Daten aus diesen Analysen geschah ebenfalls durch Dr. Bonzheim. Die statistische Auswertung aller erhobenen Daten erfolgte durch mich. Betreuer dieser Arbeit waren Dr. Nann und PD Dr. Ebinger.

Tübingen, 23.02.2017

Veit Lange

8 Anhang

8.1 Gesamtübersicht der Ergebnisse

8.1.1 Übersichtstabelle mit klinischen Verlaufsdaten, IHC- und PCR-Ergebnissen

Tabelle 41: Gesamtergebnistabelle

	Fallnummer	Surgical-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Rezidiv	Tod	CD56	Mib1	SHH	SHH	DHH	DHH
			1=männlich	in Jahren	0=nein	0=nein	0=negativ	in %	Zytoplasmatisch	mRNA	Zytoplasmatisch	mRNA
			2=weiblich		1=ja	1=ja	1=positiv	(5er-Schritte)	IRS	x = nicht verwertbar	IRS	x = nicht verwertbar
Neuroblastome	1	K 4193/03	2	8	0	0	1	10	8	2,17	12	27411
	2	K 13436/03	1	5	1	1	1	15	8	x	8	x
	3	K 15142/03	1	1	0	0	1	35	4	x	8	x
	4	K 4767/04	1	3	1	1	1	5	2	x	6	x
	5	K 8594/04	2	0	0	0	1	5	8	x	8	0,6
	6	K 19175/04	2	0	0	0	1	20	4	0	8	0
	7	K 21276/04	2	9	0	0	1	80	12	x	8	x
	8	K 12914/05	2	0	0	0	1	15	4	0	8	0
	9	K 2991/06	1	0	0	0	1	50	4	0,66	8	0
	10	K 17327/06	2	0	0	0	1	5	4	0	8	3,43
	11	K 16536/07	1	0	0	0	1	20	4	0	8	0
	12	K 8222/08	1	3	0	0	1	15	4	0	3	0
	13	K 11996/09	1	1	0	0	1	10	8	0	12	28774
	14	K 5918/10	1	0	0	0	1	5	4	0	8	0
	15	K 22937/10	2	0	0	0	1	5	8	0,33	8	1,58
	16	K 26/07	2	1	0	0	1	5	0	x	8	x
	17	K 3476/08	1	0	0	0	1	40	0	0	9	0
	18	K 21106/08	1	0	0	0	1	10	2	0	8	0
	19	K 25425/08	1	4	0	0	1	10	3	0	8	0
	20	K 4745/09	2	1	0	0	1	10	4	x	4	x
Rhabdomyosarkome	21	K 5826/93	2	7	0	0	1	0	3	0	8	0,33
	22	K 8309/93	2	14	1	1	1	70	6	0	6	0
	23	K 20300/05	2	6	0	0	1	35	6	x	8	x
	24	K 18625/09	2	4			1	35	0	1,17	4	0
	25	K 19925/09	1	60			0	30	4	0	8	0
	26	K 4028/09	2	87			0	20	2	0	8	22693
	27	K 24184/11	2	75			0	5	8	0	8	0,09
	28	K 1031/11	1	49			1	30	4	0	8	0
	29	K 8890/06	2	39			1	25	4	0,95	3	0
	30	K 214/05	1	2	0	0	1	0	2	x	3	x
	31	K 11906/05	1	6	1	0	1	10	0	x	4	x
	32	K 4183/10	2	5			1	20	3	x	6	x
	33	K 15357/10	1	49			1	25	4	0	4	1,13
	34	K16761/11	1	67			1	40	3	0	8	0
	35	K 121/07	2	7	0	1	1	0	8	1,36	4	0
	36	K 25667/08	1	16	1	1	1	20	12	0	8	0,12
	37	K 3882/07	1	6	0	0	1	80	8	x	12	x
	38	K 15012/08	1	82			1	30	6	0	8	0
	39	K 16024/08	2	24			1	30	3	0	4	0

	Fallnummer	Surgical-Nr.	IHH	IHH	SMO	SMO	SUFU	SUFU	PTCH1	GLI1	GLI2	
			Zytoplasmatisch	mRNA	Zytoplasmatisch	mRNA	Zytoplasmatisch	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA	mRNA
			IRS	x = nicht verwertbar	IRS	x = nicht verwertbar	IRS	x = nicht verwertbar				
Neuroblastome	1	K 4193/03	12	0	8	5,14	4	5,08	2,66	x	x	
	2	K 13436/03	12	x	8	x	4	x	0	x	x	
	3	K 15142/03	8	x	8	x	4	x	2,03	x	x	
	4	K 4767/04	8	x	3	x	2	x	x	x	x	
	5	K 8594/04	12	0	4	1,19	4	1,29	0,79	7,44	3,19	
	6	K 19175/04	4	0	4	0,54	4	1,06	0,76	0,59	0,26	
	7	K 21276/04	12	x	8	x	4	x	x	x	x	
	8	K 12914/05	12	0	8	0,15	4	1,56	0,54	0	0	
	9	K 2991/06	8	0,51	6	0,8	4	1,93	0,37	0,03	3,74	
	10	K 17327/06	12	0	3	1,23	4	1,41	0,49	44,02	3,91	
	11	K 16536/07	12	0,9	8	1,13	4	1,38	0,55	3,34	1,51	
	12	K 8222/08	4	0	3	1,17	2	1,49	1,24	0	0,52	
	13	K 11996/09	8	0	8	0,81	4	0,99	0,5	0	5,57	
	14	K 5918/10	4	0	4	0	4	2,3	0,83	0	0,46	
	15	K 22937/10	8	2,04	8	0,72	4	0,86	0,7	1,01	0,55	
	16	K 26/07	12	x	3	x	8	x	0	x	x	
	17	K 3476/08	6	0	3	1,04	3	2,1	0,85	24,17	6,38	
	18	K 21106/08	12	0	1	0,77	4	2,73	0,47	0	1,22	
	19	K 25425/08	8	0	8	2,83	4	2,53	0,52	0	6,33	
	20	K 4745/09	8	x	12	1,68	4	x	0,49	x	0	
Rhabdomyosarkome	21	K 5826/93	4	3,82	6	3,59	4	2,28	0	0,18	2,89	
	22	K 8309/93	3	0	8	1,99	3	2,51	0	0,17	3,69	
	23	K 20300/05	8	x	8	x	12	x	1,14	x	x	
	24	K 18625/09	0	0	4	1,54	4	2,1	3,04	5,6	3,66	
	25	K 19925/09	4	0	4	1,33	8	1,43	0,58	0,08	0,48	
	26	K 4028/09	4	0	6	0,35	4	2,83	0	0,07	0,77	
	27	K 24184/11	4	0	12	1,56	8	2,19	1,22	0,15	1,29	
	28	K 1031/11	6	5,74	6	1,45	8	1,74	0,43	0,86	0,67	
	29	K 8890/06	8	2,39	4	2,76	3	1,76	3,95	2,85	14,3	
	30	K 214/05	0	x	3	x	4	x	x	x	x	
	31	K 11906/05	3	x	3	x	4	x	x	x	x	
	32	K 4183/10	8	x	3	x	6	x	x	x	x	
	33	K 15357/10	6	8,72	3	2,4	3	2,63	0,88	0,17	1,83	
	34	K16761/11	4	0	6	0,55	3	2,78	0,01	0,07	0	
	35	K 121/07	4	8,17	8	1,35	4	1,95	0	0,13	3,71	
	36	K 25667/08	4	0	6	1,2	12	1,47	0	0,09	2,36	
	37	K 3882/07	6	x	8	x	12	x	3,39	x	x	
	38	K 15012/08	4	0	4	2,21	6	2,49	2,32	0,15	0,78	
	39	K 16024/08	4	0	4	1,15	8	3,09	4,9	2,2	0,54	

8.1.2 IHC-Ergebnisse

Tabelle 42: IHC-Ergebnisübersicht

Fallnummer	Tumorentitäten	TMA oder Einzelschnitt	Surgical-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose in Jahren	Rezidiv	Tod	CD56	Mib1	SHH (1:100)										
										1=männlich 2=weiblich	0=nein 1=ja	0=nein 1=ja	0=negativ 1=positiv	in % (5er-Schritte)	Zytoplasmatisch			Golgi		
															Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS
1	Neuroblastome	TMA Nr. 40	K 4193/03	2	8	0	0	1	10	2	4	8	3	4	12					
2		TMA Nr. 40	K 13436/03	1	5	1	1	1	15	2	4	8	2	4	8					
3		TMA Nr. 40	K 15142/03	1	1	0	0	1	35	1	4	4	2	4	8					
4		TMA Nr. 40	K 4767/04	1	3	1	1	1	5	1	2	2	2	3	6					
5		TMA Nr. 40	K 8594/04	2	0	0	0	1	5	2	4	8	3	4	12					
6		TMA Nr. 40	K 19175/04	2	0	0	0	1	20	1	4	4	2	4	8					
7		TMA Nr. 40	K 21276/04	2	9	0	0	1	80	3	4	12	3	4	12					
8		TMA Nr. 40	K 12914/05	2	0	0	0	1	15	1	4	4	3	4	12					
9		TMA Nr. 40	K 2991/06	1	0	0	0	1	50	1	4	4	2	4	8					
10		TMA Nr. 40	K 17327/06	2	0	0	0	1	5	1	4	4	2	4	8					
11		TMA Nr. 40	K 16536/07	1	0	0	0	1	20	1	4	4	2	4	8					
12		TMA Nr. 40	K 8222/08	1	3	0	0	1	15	1	4	4	1	2	2					
13		TMA Nr. 40	K 11996/09	1	1	0	0	1	10	2	4	8	2	4	8					
14		TMA Nr. 40	K 5918/10	1	0	0	0	1	5	1	4	4	2	4	8					
15		TMA Nr. 40	K 22937/10	2	0	0	0	1	5	2	4	8	3	4	12					
16		Einzelschnitt	K 26/07	2	1	0	0	1	5	0	0	0	3	3	9					
17		Einzelschnitt	K 3476/08	1	0	0	0	1	40	0	0	0	2	3	6					
18		Einzelschnitt	K 21106/08	1	0	0	0	1	10	1	2	2	2	3	6					
19		Einzelschnitt	K 25425/08	1	4	0	0	1	10	1	3	3	3	4	12					
20		Einzelschnitt	K 4745/09	2	1	0	0	1	10	1	4	4	1	1	1					
Mittelwert											4,75			8,3						
21	Rhabdomyosarkome	TMA Nr. 41	K 5826/93	2	7	0	0	1	0	1	3	3	1	3	3					
22		TMA Nr. 41	K 8309/93	2	14	1	1	1	70	2	3	6	2	4	8					
23		TMA Nr. 41	K 20300/05	2	6	0	0	1	5	2	3	6	1	2	2					
24		TMA Nr. 41	K 18625/09	2	4			1	35	0	0	0	2	2	4					
25		TMA Nr. 41	K 19925/09	1	60			0	30	1	4	4	3	3	9					
26		TMA Nr. 41	K 4028/09	2	87			0	20	1	2	2	2	4	8					
27		TMA Nr. 41	K 24184/11	2	75			0	5	2	4	8	3	4	12					
28		TMA Nr. 41	K 1031/11	1	49			1	30	2	2	4	2	3	6					
29		TMA Nr. 41	K 8890/06	2	39			1	25	1	4	4	3	4	12					
30		Einzelschnitt	K 214/05	1	2	0	0	1	0	1	2	2	1	3	3					
31		Einzelschnitt	K 11906/05	1	6	1	0	1	10	0	0	0	1	2	2					
32		Einzelschnitt	K 4183/10	2	5			1	20	1	3	3	1	4	4					
33		Einzelschnitt	K 15357/10	1	49			1	25	1	4	4	1	4	4					
34		Einzelschnitt	K16761/11	1	67			1	40	1	3	3	1	3	3					
35		TMA Nr. 41	K 121/07	2	7	0	1	1	0	2	4	8	2	4	8					
36		TMA Nr. 41	K 25667/08	1	16	1	1	1	20	3	4	12	2	4	8					
37		Einzelschnitt	K 3882/07	1	6	0	0	1	80	2	4	8	2	4	8					
38		Einzelschnitt	K 15012/08	1	82			1	30	2	3	6	2	3	6					
39		Einzelschnitt	K 16024/08	2	24			1	30	1	3	3	1	3	3					
Mittelwert											4,53			5,95						

Fallnummer	Dhh (1:150)									Ihh (1:100)								
	Zytoplasmatisch			Nukleär			Golgi			Membranös			Zytoplasmatisch			Nukleär		
	Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS
1	3	4	12	2	3	6	0	0	0	0	0	0	3	4	12	1	2	2
2	2	4	8	2	3	6	0	0	0	0	0	0	3	4	12	2	3	6
3	2	4	8	1	2	2	0	0	0	2	4	8	2	4	8	1	4	4
4	2	3	6	2	4	8	0	0	0	2	2	4	2	4	8	1	3	3
5	2	4	8	2	2	4	0	0	0	1	4	4	3	4	12	1	4	4
6	2	4	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	4	4	1	4	4
7	2	4	8	1	2	2	0	0	0	0	0	0	3	4	12	0	0	0
8	2	4	8	1	2	2	0	0	0	1	2	2	3	4	12	2	4	8
9	2	4	8	2	4	8	2	3	6	1	2	2	2	4	8	2	4	8
10	2	4	8	1	2	2	0	0	0	2	4	8	3	4	12	0	0	0
11	2	4	8	1	1	1	0	0	0	1	4	4	3	4	12	1	4	4
12	1	3	3	2	3	6	0	0	0	0	0	0	1	4	4	2	4	8
13	3	4	12	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2	4	8	1	1	1
14	2	4	8	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	4	4	1	4	4
15	2	4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	8	0	0	0
16	2	4	8	3	3	9	0	0	0	2	3	6	3	4	12	0	0	0
17	3	3	9	2	4	8	0	0	0	2	2	4	2	3	6	2	4	8
18	2	4	8	2	4	8	0	0	0	0	0	0	3	4	12	1	2	2
19	2	4	8	1	3	3	0	0	0	2	2	4	2	4	8	1	3	3
20	1	4	4	1	4	4	0	0	0	3	2	6	2	4	8	2	2	4
Mittelwert			7,9			4,1			0,3			2,6			9,1			3,65
21	2	4	8	0	0	0	1	2	2	1	3	3	1	4	4	3	4	12
22	2	3	6	1	4	4	1	2	2	0	0	0	1	3	3	3	4	12
23	2	4	8	1	2	2	0	0	0	0	0	0	2	4	8	3	4	12
24	1	4	4	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	8
25	2	4	8	1	4	4	1	2	2	2	2	4	1	4	4	1	2	2
26	2	4	8	1	4	4	0	0	0	0	0	0	1	4	4	3	3	9
27	2	4	8	0	0	0	0	0	0	1	3	3	1	4	4	0	0	0
28	2	4	8	1	3	3	0	0	0	0	0	0	2	3	6	2	4	8
29	1	3	3	1	4	4	0	0	0	0	0	0	2	4	8	2	4	8
30	1	3	3	1	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	4
31	1	4	4	2	4	8	0	0	0	0	0	0	1	3	3	2	4	8
32	2	3	6	2	4	8	0	0	0	0	0	0	2	4	8	3	4	12
33	1	4	4	1	4	4	0	0	0	2	3	0	3	2	6	1	3	3
34	2	4	8	1	2	2	0	0	0	0	0	0	2	2	4	2	2	4
35	1	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	4	2	3	6
36	2	4	8	1	3	3	0	0	0	0	0	0	1	4	4	3	4	12
37	3	4	12	2	3	6	0	0	0	0	0	0	2	3	6	1	2	2
38	2	4	8	2	4	8	0	0	0	0	0	0	1	4	4	1	3	3
39	1	4	4	1	4	4	1	2	2	2	2	4	1	4	4	1	4	4
Mittelwert			6,42			3,74			0,42			0,74			4,42			6,79

Fallnummer	Smo (1:200)						SuFu (1:50)					
	Zytoplasmatisch			Nukleär			Zytoplasmatisch			Nukleär		
	Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS	Intensität	Anteil	IRS
1	2	4	8	1	3	3	1	4	4	3	3	9
2	2	4	8	1	4	4	1	4	4	3	4	12
3	2	4	8	1	2	2	1	4	4	2	4	8
4	1	3	3	1	1	1	1	2	2	2	4	8
5	1	4	4	2	2	4	1	4	4	2	4	8
6	1	4	4	0	0	0	1	4	4	1	4	4
7	2	4	8	1	1	1	1	4	4	2	4	8
8	2	4	8	1	3	3	1	4	4	2	4	8
9	2	3	6	2	3	6	1	4	4	1	3	3
10	1	3	3	1	4	4	1	4	4	2	4	8
11	2	4	8	1	2	2	1	4	4	2	4	8
12	1	3	3	0	0	0	1	2	2	1	1	1
13	2	4	8	1	1	1	1	4	4	2	4	8
14	1	4	4	0	0	0	1	4	4	1	4	4
15	2	4	8	0	0	0	1	4	4	2	4	8
16	1	3	3	2	3	6	2	4	8	3	4	12
17	1	3	3	1	3	3	1	3	3	3	4	12
18	1	1	1	0	0	0	1	4	4	1	4	4
19	2	4	8	1	3	3	1	4	4	1	4	4
20	3	4	12	1	2	2	1	4	4	3	3	9
Mittelwert			5,9			2,25			3,95			7,3
21	2	3	6	0	0	0	1	4	4	3	4	12
22	2	4	8	0	0	0	1	3	3	3	4	12
23	2	4	8	1	3	3	3	4	12	2	4	8
24	1	4	4	1	4	4	1	4	4	3	4	12
25	1	4	4	0	0	0	2	4	8	1	4	4
26	3	2	6	0	0	0	1	4	4	1	4	4
27	3	4	12	0	0	0	2	4	8	1	4	4
28	2	3	6	1	4	4	2	4	8	2	4	8
29	1	4	4	1	4	4	1	3	3	3	4	12
30	1	3	3	1	2	2	2	2	4	1	3	3
31	1	3	3	0	0	0	1	4	4	2	3	6
32	1	3	3	1	3	3	2	3	6	3	4	12
33	1	3	3	1	3	3	1	3	3	3	3	9
34	2	3	6	0	0	0	1	3	3	1	2	2
35	2	4	8	1	2	2	1	4	4	2	4	8
36	2	3	6	1	1	1	3	4	12	2	4	8
37	2	4	8	2	3	6	3	4	12	3	4	12
38	1	4	4	1	3	3	2	3	6	1	3	3
39	1	4	4	1	4	4	2	4	8	3	4	12
Mittelwert			5,58			2,05			6,11			7,95

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Relative Häufigkeit der gemeldeten Patienten unter 15 Jahren aus der deutschen Wohnbevölkerung nach den häufigsten ICC-3 Diagnose-Hauptgruppen; 2001-2010; n = 17876 (Kaatsch und Spix 2012).....	12
Abbildung 2:.....	38
Exemplarische Darstellung der verschiedenen Anfärbungsarten in vier Fällen	38
Links oben: Membranöse Anfärbung (IHH), Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x	38
Rechts oben: Zytoplasmatische Anfärbung (IHH), Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 200x	38
Links unten: Nukleäre Anfärbung (SUFU), Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 200x.....	38
Rechts unten: Anfärbung der Golgi-Apparate (SHH), Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x	38
Abbildung 3:	39
Exemplarische Darstellung der HE-Färbung in drei Fällen	39
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x.....	39
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x	39
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x.....	39
Abbildung 4:.....	39
Exemplarische Darstellung der Immunhistochemischen Färbung von CD56 in drei Fällen.....	39
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x.....	39
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x	39
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x.....	39

Abbildung 5: Exemplarische Darstellung der IHC-Färbung von Ki-67 in drei Fällen.....	40
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 200x.....	40
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x	40
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x.....	40
Abbildung 6:.....	41
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SHH in drei Fällen.....	41
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x.....	41
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x	41
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x.....	41
Abbildung 7:.....	42
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von DHH in drei Fällen.....	42
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x.....	42
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x	42
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x.....	42
Abbildung 8:.....	43
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von IHH in drei Fällen.....	43
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x.....	43
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x	43
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x.....	43
Abbildung 9:.....	44
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SMO in drei Fällen.....	44

Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x.....	44
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x	44
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x.....	44
Abbildung 10:.....	45
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SUFU in drei Fällen.....	45
Links: Fallnummer 1, Original-Vergrößerung 400x.....	45
Mitte: Fallnummer 2, Original-Vergrößerung 400x	45
Rechts: Fallnummer 10, Original-Vergrößerung 400x.....	45
Abbildung 11:.....	49
Exemplarische Darstellung der HE-Färbung in drei Fällen	49
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x.....	49
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x	49
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x.....	49
Abbildung 12:.....	49
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von CD56 in drei Fällen.....	49
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x.....	49
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x	49
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x.....	49
Abbildung 13:.....	50
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von Ki-67 in drei Fällen.....	50
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x.....	50
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x	50
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x.....	50

Abbildung 14:.....	51
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SHH in drei Fällen.....	51
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x.....	51
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x	51
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x.....	51
Abbildung 15:.....	52
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von DHH in drei Fällen.....	52
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x.....	52
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x	52
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x.....	52
Abbildung 16:.....	53
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von IHH in drei Fällen.....	53
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x.....	53
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x	53
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x.....	53
Abbildung 17:.....	54
Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SMO in drei Fällen.....	54
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x.....	54
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x	54
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x.....	54
Abbildung 18:.....	55

Exemplarische Darstellung der immunhistochemischen Färbung von SUFU in drei Fällen.....	55
Links: Fallnummer 23, Original-Vergrößerung 400x.....	55
Mitte: Fallnummer 28, Original-Vergrößerung 400x	55
Rechts: Fallnummer 29, Original-Vergrößerung 400x.....	55
Abbildung 19: RT-qPCR-Ergebnisse für SHH (NB).....	61
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	61
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	61
Abbildung 20: RT-qPCR-Ergebnisse für DHH (NB)	61
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	61
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	61
Abbildung 21: RT-qPCR-Ergebnisse für IHH (NB)	62
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	62
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	62
Abbildung 22: RT-qPCR-Ergebnisse für PTCH1 (NB)	62
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	62
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	62
Abbildung 23: RT-qPCR-Ergebnisse für SMO (NB)	63
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta Ct$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	63
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta Ct$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	63
Abbildung 24: RT-qPCR-Ergebnisse für SUFU (NB)	63

Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	63
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	63
Abbildung 25: RT-qPCR-Ergebnisse für GLI1 (NB)	64
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	64
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	64
Abbildung 26: RT-qPCR-Ergebnisse für GLI2 (NB)	64
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	64
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	64
Abbildung 27: RT-qPCR-Ergebnisse für SHH (RMS).....	67
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	67
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	67
Abbildung 28: RT-qPCR-Ergebnisse für DHH (RMS)	67
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	67
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	67
Abbildung 29: RT-qPCR-Ergebnisse für IHH (RMS)	68
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	68
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	68
Abbildung 30: RT-qPCR-Ergebnisse für PTCH1 (RMS)	68
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	68
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	68

Abbildung 31: RT-qPCR-Ergebnisse für SMO (RMS)	69
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta C_t$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	69
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta C_t$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	69
Abbildung 32: RT-qPCR-Ergebnisse für SUFU (RMS)	69
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta C_t$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	69
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta C_t$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	69
Abbildung 33: RT-qPCR-Ergebnisse für GLI1 (RMS)	70
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta C_t$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	70
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta C_t$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	70
Abbildung 34: RT-qPCR-Ergebnisse für GLI2 (RMS)	70
Links: Säulendiagramm, das die $\Delta\Delta C_t$ -Werte der einzelnen Proben zeigt	70
Rechts: Statistischer Vergleich der $\Delta\Delta C_t$ -Werte aus Normal- und Tumorgewebe	70

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	24
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 3: Chemikalien	25
Tabelle 4: Antikörper	25
(CC1= Cell Conditioner 1; TRIS/Borat/EDTA-Puffer, pH 8,4).....	25
Tabelle 8: Ventana-Reagenzien	26
Tabelle 5: Reagenzien reverser Transkription.....	26
Tabelle 6: Reagenzien RT-qPCR	26

Tabelle 7: Mittels Universal Probe Library (UPL) Assay Design Center designte UPL-Assays mit entsprechenden Primern und Sonden	27
Tabelle 9: RT-qPCR mit UPL-Assays.....	33
Tabelle 10: In die Studie eingeschlossene Fälle	37
Tabelle 11: Werte für die immunhistochemische Färbung von Ki-67 (NB).....	40
Tabelle 12: Werte für die immunhistochemische Färbung von SHH.....	41
(NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	41
Tabelle 13: Werte für die immunhistochemische Färbung von DHH.....	42
(NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	42
Tabelle 14: Werte für die immunhistochemische Färbung von IHH	43
(NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	43
Tabelle 15: Werte für die immunhistochemische Färbung von SMO	44
(NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	44
Tabelle 16: Werte für die immunhistochemische Färbung von SUFU.....	45
(NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	45
Tabelle 17: Spearmans ρ für die interne Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse	46
(NB; * = $p < 0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.	46
Tabelle 18: Klinische Verlaufsdaten und IHC-Ergebnisse	47
(NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	47
Tabelle 19: Spearmans ρ für die Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse	48
(nur zytoplasmatische Anfärbung) mit klinischen Verlaufsdaten (NB).....	48
Tabelle 20: Prozentuale Anfärbung von Ki-67 in Tumorgewebe (RMS).....	50
Tabelle 21: Werte für die immunhistochemische Färbung von SHH.....	51
(RMS; IRS = Immunoreactivity Score).....	51

Tabelle 22: Werte für die immunhistochemische Färbung von DHH.....	52
(RMS; IRS = Immunoreactivity Score).....	52
Tabelle 23: Werte für die immunhistochemische Färbung von IHH	53
(RMS; IRS = Immunoreactivity Score).....	53
Tabelle 24: Werte für die immunhistochemische Färbung von SMO	54
(RMS; IRS = Immunoreactivity Score).....	54
Tabelle 25: Werte für die immunhistochemische Färbung von SUFU.....	55
(RMS; IRS = Immunoreactivity Score).....	55
Tabelle 26: Spearmans ρ für die interne Korrelation der Immunhistochemie- Ergebnisse	56
(RMS; * = $p < 0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.	56
Tabelle 27: Klinische Verlaufsdaten und Immunhistochemie-Ergebnisse.....	57
(RMS; IRS = Immunoreactivity Score; k. A. = keine Angabe)	57
Tabelle 28: Spearmans ρ für die Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse mit klinischen Verlaufsdaten (RMS)	58
Tabelle 29: Grafische Gesamtdarstellung der Immunhistochemie-Ergebnisse.	59
(IRS = Immunoreactivity Score).....	59
Tabelle 30: Spearmans ρ für die interne Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse (NB)	65
Tabelle 31: Spearmans ρ für die Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse mit den klinischen Verlaufsdaten (NB; * = $p < 0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.	66
Tabelle 32: Spearmans ρ für die interne Korrelation RT-qPCR-Ergebnisse	71
(RMS; * = $p < 0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.	71
Tabelle 33: Spearmans ρ für die Korrelation der RT-qPCR-Ergebnisse mit den klinischen Verlaufsdaten (RMS; * = $p < 0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.	72

Tabelle 34: Grafische Gesamtübersicht der RT-qPCR-Ergebnisse	74
Tabelle 35: Signalwegbezogene Gruppierung der RT-qPCR-Ergebnisse (NB)	75
Tabelle 36: Signalwegbezogene Gruppierung der RT-qPCR-Ergebnisse (RMS)	76
Tabelle 37: Spearmans ρ für die Korrelation der IHC-Ergebnisse mit den RT-qPCR-Ergebnissen (NB; * = $p < 0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.....	77
Tabelle 38: Spearmans ρ für die Korrelation der Immunhistochemie-Ergebnisse mit den RT-qPCR-Ergebnissen (RMS; * = $p < 0.05$). Signifikante Ergebnisse sind grau hinterlegt.....	77
Tabelle 39: Gruppe 1 (NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	79
Tabelle 40: Gruppe 2 (NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	80
Tabelle 41: Gruppe 3 (NB; IRS = Immunoreactivity Score).....	81
Tabelle 42: Gruppe 1 (RMS; IRS = Immunoreactivity Score).....	82
Tabelle 43: Gruppe 2 (RMS; IRS = Immunoreactivity Score).....	83
Tabelle 44: Gruppe 3 (RMS; IRS = Immunoreactivity Score).....	84
Tabelle 41: Gesamtergebnistabelle	113
Tabelle 42: IHC-Ergebnisübersicht.....	116

9 Danksagung

Zuerst gilt mein Dank meinem Betreuer vonseiten des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen, Dr. Dominik Nann. Danke für Deine verlässliche Begleitung und für Deine Geduld bei unserem gemeinsamen Projekt.

Auch Dr. Irina Bonzheim vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen habe ich viel zu verdanken an Hilfestellung und Korrekturarbeit. Danke für Deine freundschaftliche Unterstützung meiner Arbeit!

Herzlicher Dank geht an Prof. F. Fend für die Kooperation, Planung der Studie, Korrekturarbeit und Bereitstellung der Ressourcen seines Instituts. Auch beim Team des Immunlabors des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Universität Tübingen bedanke ich mich für die Hilfe bei der Anfertigung der Immunfärbungen.

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Martin Ebinger für die Bereitstellung des Themas und der Patientendaten und die Annahme als Doktoranden. Ich habe im Studium, während des Praktischen Jahres und als Doktorand vieles von Dir gelernt.

Bei Herrn Prof. R. Handgretinger bedanke ich mich für die Aufnahme in sein Institut. Die Universitäts-Kinderklinik Tübingen wird mir in sehr guter Erinnerung bleiben.

Meiner Frau Anne danke ich dafür, dass sie mich durch Studium und Doktorarbeit begleitet hat und mir Motivation und Freude ist. Danke, dass Du mit mir auf dem gleichen Weg gehst.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium der Medizin ermöglicht haben. Ihr habt es mir zugetraut und deshalb habe ich es gemacht. Danke, dass Ihr Vorbilder für mich seid.

Mein größter Dank gilt Gott, dem Freund des Lebens, der Alles ins Dasein gerufen hat und jeden Tag erhält.

10 Lebenslauf

Persönliches

Name: Veit Lange
 Geburtsdatum: 26.10.1984
 Geburtsort: Bayreuth

Ärztliche Weiterbildung

01/2015 – 11/2016: Assistenzarzt für Anästhesie am Universitäts-
 klinikum Tübingen
 12/2016 – heute Assistenzarzt für Pädiatrie am Universitätskli-
 nikum Tübingen

Hochschulbildung

04/2008 - 05/2014 : Studium der Humanmedizin an der Eberhard-
 Karls-Universität Tübingen
 24.03.2010: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 13.05.2014: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Schulbildung

06/2004 Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium
 Christian-Ernestinum, Bayreuth

Tübingen, 23.02.2017

Veit Lange