

Aus dem Bereich Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Expressions- und Mutationsanalyse des $\beta$ -Catenin-Signalweges im juvenilen Angiofibrom**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: Stefanie Beck, geb. Weber

geboren am: 23.06.1986 in Karlsruhe

*für meine Familie*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2. Abstract .....	3
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
2.1. Das juvenile Angiofibrom .....	5
2.1.1. Epidemiologie und Klinik .....	5
2.1.2. Diagnostik .....	6
2.1.3. Therapie .....	8
2.1.4. Histologie .....	9
2.1.5. Ätiologie.....	11
2.2. Der WNT-Signalweg.....	15
2.2.1. WNT-off Status.....	16
2.2.2. WNT-on Status.....	18
2.2.3. Der WNT-Signalweg in der Tumorentstehung .....	20
2.3. Zielsetzung der Arbeit .....	22
<b>3. MATERIAL.....</b>	<b>23</b>
3.1. Bezugsquellen der Materialien .....	23
3.2. Antikörper .....	24
3.3. Lösungen und Puffer .....	24
3.3.1. Nährmedien.....	25
3.3.1.1. Bakterienkultur .....	25
3.3.1.2. Zellkultur .....	25
3.4. Geräte .....	26
3.5. Oligonukleotide.....	27
3.6. Molekulargewichtsmarker .....	29
3.7. Kits .....	29
3.8. Vektoren .....	29
3.9. Untersuchungsmaterial .....	29
3.9.1. Tumor- und Referenzgewebe .....	29
3.9.2. Zelllinien .....	31

---

<b>4.   METHODEN.....</b>	<b>32</b>
4.1. Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion .....	32
4.1.1. RNA-Extraktion aus Gewebe .....	32
4.1.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	33
4.1.3. Agarosegelelektrophorese .....	33
4.1.4. DNase-Verdau .....	34
4.1.5. Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion .....	35
4.1.6. Polymerase-Kettenreaktion.....	36
4.2. Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	38
4.2.1. Aufreinigung der PCR-Produkte .....	38
4.2.2. Sequenzierung .....	38
4.3. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	39
4.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	40
4.4. Quantitative Real-Time-PCR.....	41
4.5. Zellkultur-Techniken.....	42
4.5.1. Kultivierung von Zelllinien .....	42
4.5.2. Auftauen von Zellen .....	43
4.5.3. Einfrieren von Zellen .....	43
4.6. Immunfärbungen .....	43
4.6.1. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen.....	43
4.6.2. Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten .....	45
4.6.2.1. Paraffineinbettung.....	45
4.6.2.2. DAB-Färbung von Gewebeschnitten .....	46
4.6.2.3. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten .....	48
<b>5.   ERGEBNISSE.....</b>	<b>49</b>
5.1. Mutationsanalyse .....	49
5.1.1. Sequenzierungen des $\beta$ -Catenin-Gen (CTNNB1-Gen) .....	49
5.1.1.1. Mutationen .....	51
5.1.2. Sequenzierungen des Axin2-Gen .....	54
5.1.2.1. Punktmutationen.....	54
5.1.2.2. Spleißvariante.....	57
5.2. Expressionsanalyse .....	61
5.2.1. quantitative Realtime-PCR.....	61
5.2.2. Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen.....	65
5.2.2.1. $\beta$ -Catenin – Proteinexpression .....	66
5.2.2.2. Axin2 – Proteinexpression .....	67
5.2.2.3. GSK3 $\beta$ – Proteinexpression .....	68
5.2.2.4. APC – Proteinexpression.....	69
5.2.2.5. Axin1 – Proteinexpression .....	70



---

5.2.3. Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen.....	72
5.2.3.1.     β-Catenin-Expression in Gewebeschnitten .....	72
5.2.3.2.     β-Catenin-Expression in Zellkulturen .....	73
<b>6.     DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
6.1. Veränderungen des WNT-Signalwegs auf DNA-Ebene .....	77
6.2. Veränderungen des WNT-Signalwegs auf RNA-Ebene .....	79
6.3. Veränderungen des WNT-Signalwegs auf Proteinebene .....	81
6.4. Ausblick .....	83
<b>7.     LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>85</b>
<b>8.     DANKSAGUNG .....</b>	<b>96</b>
<b>9.     PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>97</b>
9.1. Publikation.....	97
9.2. Tagungsbeitrag .....	97

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
A	Alter des Patienten
Abb.	Abbildung
AB-Komplex	Avidin-Biotin-HRP-Komplex
AF	juveniles Angiofibrom
AK	Antikörper
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
Asp	Asparaginsäure
AURKA	Aurorakinase A
BMI-1	<i>B-cell specific Moloney murine leukemia virus integration site 1</i>
BORIS	<i>brother of the regulator of imprinted sites</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	komplementäre DNA
CGH	vergleichende genomische Hybridisierung
CK1	Casein Kinase 1
cm	Zentimeter
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
Cys	Cystein
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4, 6-diamidino-2-phenylindole
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dvl	<i>dishevelled</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alteri</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis coli
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

FKS	fetales Kälberserum
FZ	<i>frizzled</i>
Gly	Glycin
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase Kinase 3 $\beta$
h	Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i>
IGF-II	<i>Insulin-like growth factor II</i>
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LRP5/6	<i>LDL-receptor related protein 5/6</i>
min	Minute
ml	Milliliter
nb	nicht bekannt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NM	Nasenmuschel
NP40	Nonidet P40
nt	Nukleotid
P	Phosphat
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PP1	Protein Phosphatase 1
PP2a	Protein Phosphatase 2a
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
Re	Rezidiv
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion
s	Sekunde
S	Svedberg-Units
Sequ.	Sequenzierung
Ser	Serin

---

β-Cat	β-Catenin
TAE-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TAK1	<i>TGFβ-activated-Kinase-1</i>
TCF / LEF	<i>T-cell factor / Lymphoid enhancer factor</i>
TE-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ethylendiamintetraacetat-Puffer
TGFβ1	<i>transforming growth factor β1</i>
TIEG-Gen	<i>TGF-β-inducible-early-growth-response-Gen</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin-Isothiocyanat
TSHZ1	<i>teashirt zinc finger homeobox 1</i>
U	Ubiquitin
Ub-Ligase	Ubiquitin-Ligase
UV	ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1. Zusammenfassung

### Zielsetzung

Das juvenile Angiofibrom ist ein gutartiger, fibrovaskulärer Tumor mit einem meist aggressiven Wachstum, der nahezu ausschließlich bei männlichen Jugendlichen auftritt. Über die Ätiologie dieser seltenen, gefäßreichen Neoplasie ist bislang wenig bekannt. Der WNT-Signalweg und das zugehörige Protein  $\beta$ -Catenin scheinen eine wichtige Rolle in der Tumorphathogenese des juvenilen Angiofibroms zu spielen. Neben der Beobachtung, dass in 75 % der untersuchten Angiofibrome  $\beta$ -Catenin-Mutationen im Bereich der Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ -Bindungsstelle vorliegen, wurden erhöhte  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel nachgewiesen (Zhang et al., 2003, Abraham et al., 2001). Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  ist ein Regulator, der  $\beta$ -Catenin mittels Phosphorylierung zum Abbau markiert, was die Vermutung nahe legt, dass der erhöhte  $\beta$ -Catenin-Proteinspiegel durch eine verlängerte Halbwertszeit der Proteine hervorgerufen wird. In dieser Arbeit sollten zum einen die bereits bekannten Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen überprüft, und zum anderen nach weiteren Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen und im Axin2-Gen gesucht werden, da Axin eine wichtige Funktion als Brückenprotein im WNT-Signalweg inne hat. Ein weiteres Ziel war die erste quantitative Bestimmung der  $\beta$ -Catenin Transkripte, sowie der Transkripte, der an der Regulation von  $\beta$ -Catenin beteiligten Faktoren Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , *Adenomatous polyposis coli*, Axin1 und Axin2. Abschließend sollte die Expression der genannten WNT-Signalweg-Proteine in Tumorgewebe und in Zellkulturen geprüft werden.

### Methoden

Von fünf Tumorgeweben und zwei gesunden Referenzgeweben wurde Ribonukleinsäure isoliert, in komplementäre Desoxyribonukleinsäure umgeschrieben und mittels direkter Sequenzierung auf Mutationen in den Genen  $\beta$ -Catenin und Axin2 untersucht. Um eine hierbei aufgefallene Deletion im Axin2-Gen genauer zu charakterisieren, wurde das entsprechende Polymerasekettenreaktion-Produkt kloniert und sequenziert. Ferner wurde eine quantitative *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion für die Gene  $\beta$ -Catenin, Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , *Adenomatous polyposis coli*, Axin1 und Axin2 durchgeführt. Zur Expressionsanalyse der entsprechenden Proteine wurden immunhistochemische Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid an zuvor in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten von acht Angiofibromen und zwei Normalgeweben angefertigt. Des Weiteren wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem  $\beta$ -Catenin-Antikörper an Zellkulturreihen von drei Angiofibrom- und drei gesunden Hautfibroblasten-Zellreihen durchgeführt.

## Ergebnisse

In vier von fünf Tumoren wurden sowohl bereits bekannte, als auch nach unserem Wissen für juvenile Angiofibrome nicht vorbeschriebene  $\beta$ -Catenin Punktmutationen nachgewiesen, die zu einem Austausch eines von Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  phosphorylierten Serinrestes oder einer Aminosäure in dessen unmittelbarer Nähe führen. Im Axin2-Gen konnte eine bislang nicht bekannte Spleißvariante (Nukleotid 342 bis 457) detektiert werden, weitere Mutationen konnten im untersuchten Bereich nicht gezeigt werden. Zugleich wurden deutliche Unterschiede im Expressionsmuster der betrachteten Gene beobachtet. Vier von fünf Tumoren zeigten teils deutlich erhöhte Transkriptmengen an  $\beta$ -Catenin, Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , *Adenomatous polyposis coli* und Axin2 im Vergleich zum Normalgewebe. Des Weiteren konnten mittels immunhistochemischen Färbungen mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid verstärkte Proteinexpressionen von  $\beta$ -Catenin und Axin2 im juvenilen Angiofibrom nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenz-Färbungen der Zellkulturreihen mit einem  $\beta$ -Catenin-Antikörper zeigten keine Unterschiede zwischen Angiofibrom- und Normalgewebe-Zellreihen, bei beiden waren die Zellmembranen und teils auch das Cytoplasma stark angefärbt.

## Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass verschiedene Mechanismen zu erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinleveln im juvenilen Angiofibrom führen, was für eine hohe Relevanz des WNT-Signalwegs in der Tumorphagenese spricht. Neben dem Nachweis bekannter, sowie im juvenilen Angiofibrom neu aufgezeigter  $\beta$ -Catenin-Mutationen, konnte eine neue Spleißvariante im Axin2-Gen identifiziert werden, welche ebenfalls zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führen könnte. Erhöhte Transkriptlevel der WNT-Weg-Gene  $\beta$ -Catenin, Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , *Adenomatous polyposis coli* und Axin2 verdeutlichen die Bedeutung des WNT-Signalwegs beim juvenilen Angiofibrom.

## 1.2. Abstract

### Objective

Juvenile angiofibromas is a benign fibro-vascular, mostly aggressive growing tumor occurring almost exclusively in adolescent males. Little is known about the pathogenesis of this rare tumor. The WNT-pathway and its associated protein  $\beta$ -catenin seem to play a pivotal role in tumor biology. In addition to the frequent finding of  $\beta$ -catenin mutations at the glycogen synthase kinase 3 $\beta$  phosphorylation site in 75 % of analyzed juvenile angiofibromas, high levels of  $\beta$ -catenin protein were scientifically proven (Zhang et al., 2003, Abraham et al., 2001). Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is a regulator, marking  $\beta$ -catenin for its degradation through phosphorylation. The loss of  $\beta$ -catenin phosphorylation due to the detected mutations is the suggested reason for the increased  $\beta$ -catenin protein levels. The aim of this study was to examine already known mutations of  $\beta$ -catenin as well as to search for further  $\beta$ -catenin and Axin mutations. Axin is known as an important scaffolding protein within the WNT-pathway. Furthermore, we aimed to determine the first quantitative analysis of  $\beta$ -catenin transcripts and the WNT-pathway members glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , adenomatous polyposis coli, Axin1 and Axin2. Lastly, the expression of WNT-pathway proteins in tumor tissues and cell-cultures were analyzed.

### Methods

Ribonucleic acid was isolated from five tumors and two normal control tissues, transcribed into complementary deoxyribonucleic acid, and subsequently analyzed by direct sequencing to determine whether mutations for the genes  $\beta$ -catenin and Axin2 exist. Once a deletion in Axin2 was found, the corresponding polymerase chain reaction product was cloned and sequenced for its characterisation. Expression of the WNT-pathway genes  $\beta$ -catenin, glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , adenomatous polyposis coli, Axin1 and Axin2 was further measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. Additionally, paraffin embedded tissue of eight juvenile angiofibromas and two normal control tissues was analyzed immunohistochemically using 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride to examine the expression of the corresponding proteins. Furthermore, immunofluorescence staining using  $\beta$ -catenin antibodies was performed on three cultured tumor and three normal dermal fibroblast lines.

## Results

The mutation analysis detected already known  $\beta$ -catenin point mutations as well as mutations not yet described, to the best of our knowledge, in juvenile angiofibromas in four out of five tumors. These mutations lead to an exchange of the serine residues phosphorylated by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  or an amino acid in its close proximity. In addition, a so far unknown transcribed Axin2 splice variant (nucleotide 342 to 457) was identified, but no further Axin2 mutations. Furthermore, clear differences between the patterns of expression of the examined transcripts were observed.

Four out of five tumors showed in part a substantial increase in transcripts of  $\beta$ -catenin, glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , adenomatous polyposis coli and Axin2 in comparison to normal tissue. Using 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride for immunohistochemical staining in juvenile angiofibromas showed an increased expression of  $\beta$ -catenin and Axin2 proteins. The location and intensity of immunofluorescence staining using  $\beta$ -catenin antibodies in cultured tumor and normal tissue cell lines were identical, both showed strong staining of cell membranes and cytoplasm.

## Conclusion

This study supports the importance of aberrant WNT-signaling as a common event in the pathogenesis of juvenile angiofibromas. Various mechanisms seem to be responsible for the increased levels of  $\beta$ -catenin protein in the expression of this tumor. In addition to the frequent  $\beta$ -catenin mutations, a so far unknown Axin2 splice variant was found, which could result in a further stabilization of the  $\beta$ -catenin protein. Besides the loss of phosphorylation, the finding of increased transcript levels of the WNT-pathway members  $\beta$ -catenin, glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , adenomatous polyposis coli and Axin2 suggests additional factors being responsible for the increased levels of  $\beta$ -catenin protein in juvenile angiofibromas.



## 2. EINLEITUNG

### 2.1. Das juvenile Angiofibrom

#### 2.1.1. Epidemiologie und Klinik

Das juvenile Angiofibrom (AF) ist ein seltener, gutartiger Tumor, der nahezu ausschließlich bei männlichen Jugendlichen zwischen dem 9. und dem 19. Lebensjahr, meist zu Beginn der Pubertät, auftritt (Nicolai et al., 2012). In sehr wenigen Fällen wurde das Angiofibrom auch bei älteren Frauen in der Menopause diagnostiziert (Patrocinio et al., 2005, Ewing und Shively, 1981, Osborn et al., 1965). Es wird über eine Inzidenz, zum Beispiel in Dänemark, von 0,4 Fällen pro eine Million Einwohner pro Jahr berichtet (Glad et al., 2007). Obwohl es sich histologisch um einen benignen Tumor handelt, zeigt das juvenile Angiofibrom ein lokal aggressives Verhalten, indem es sich in angrenzende Gewebe ausbreiten und zur Destruktion von Knochen führen kann (Tewfik et al., 1999, Jafek et al., 1979). Der Tumor nimmt seinen Ursprung im hinteren Abschnitt der Nasenhaupthöhle in Beziehung zum Foramen sphenopalatinum und kann sich in die Fossa pterygopalatina, die Nasennebenhöhlen und die Fossa infratemporalis ausbreiten (Sennes et al., 2003, Schick und Kahle, 2000). Über die Fissura orbitalis inferior kann sich das Angiofibrom in die Orbita und über eine Erosion der Schädelbasis nach intrakraniell ausdehnen. Trotz des relativ häufigen intrakraniellen Wachstums wird nur selten eine intradurale Ausbreitung des Tumors beobachtet, meistens bei Rezidivtumoren (Ramos et al., 2011, Jafek et al., 1979). Bei extensivem intrakraniell Tumorwachstum können die Arteria carotis interna und der Sinus cavernosus befallen werden (Schick und Kahle, 2000, Lyons und Donald, 1992).

Klinisch manifestiert sich das juvenile Angiofibrom am häufigsten durch eine unilateral behinderte Nasenatmung und rezidivierendes Nasenbluten (Zito et al., 2001). Ein Tumoreinbruch in die Orbita kann zum Exophthalmus sowie zur Schädigung des Nervus opticus führen. Außerdem kann durch eine laterale Ausbreitung eine Gesichtsschwellung auftreten (Schick und Kahle, 2000). Weitere Symptome können Kopfschmerzen, chronische Rhinosinusitis und eine Hörminderung durch Beteiligung der Tuba Eustachii sein.

### 2.1.2. Diagnostik

Im Anschluss an eine nasale Endoskopie werden zur Diagnosesicherung bildgebende Verfahren eingesetzt. Zur präzisen Darstellung der Tumorlokalisation, -ausdehnung und der Beziehung zu den Nachbarorganen werden eine Computertomographie (siehe Abb. 1) und eine Magnetresonanztomographie durchgeführt. Durch zusätzliche Kontrastmittelgabe kann die Vaskularisierung des Tumors aufgezeigt werden.

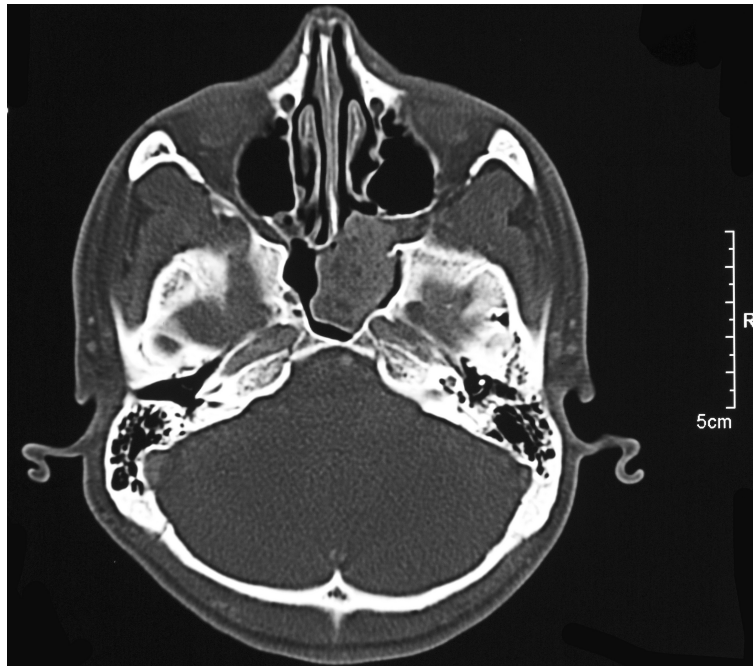


Abb. 1: Computertomographische Aufnahme eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten (Quelle: Klinik für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie, Universitätsklinikum des Saarlandes)

Zur exakten Bestimmung der Gefäßversorgung ist die Durchführung einer bilateralen Angiographie der Arteria carotis interna und externa notwendig (Giavroglou et al., 2007). Die homolaterale Blutversorgung stammt im Wesentlichen aus den Arterien maxillaris und pharyngea ascendens (siehe Abb. 2). Durch weiteres Tumorwachstum nehmen auch andere Gefäße aus den Stromgebieten der Arteria carotis externa und interna, sowohl von ipsilateral als auch von kontralateral, an der Gefäßversorgung teil (Wu et al., 2011). Anhand dieser Informationen aus der Angiografie kann präoperativ gegebenenfalls eine Tumorembolisation geplant und durchgeführt werden (siehe Kap. 2.1.3.). Eine Probebiopsie des Tumors ist in den meisten Fällen nicht nötig und sollte aufgrund des stark erhöhten Blutungsrisikos vermieden werden.

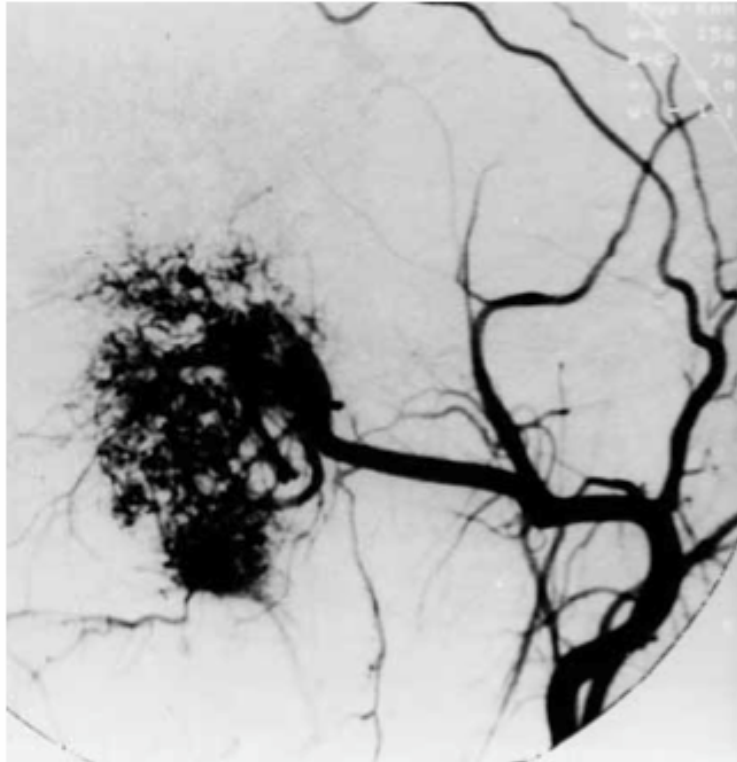


Abb. 2: Unilaterale Angiographie bei einem juvenilen Angiofibrom mit abgebildeter Blutversorgung durch die Arteria maxillaris (Quelle: Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Klinikum Fulda).

Zur Stadieneinteilung des Tumors existieren verschiedene Klassifikationssysteme, die geläufigste und meistverwendete ist die Klassifikation nach Andrews (Andrews et al., 1989). Diese Unterteilung erfolgt in vier Stadien, welche im Folgenden näher beschrieben sind.

#### Stadium I:

Der Tumor ist begrenzt auf den Nasopharynx und die Nasenhaupthöhle, die Knochendestruktion ist gering oder auf das Foramen sphenopalatinum beschränkt.

#### Stadium II:

Der Tumor dringt bis in die Fossa pterygopalatina oder in die Nasennebenhöhlen ein mit Destruktion der Knochen.

#### Stadium IIIa:

Der Tumor dehnt sich bis in die Fossa infratemporalis oder die Orbitaregion aus, ohne intrakranielles Wachstum.

#### Stadium IIIb:

Der Tumor dehnt sich bis in die Fossa infratemporalis oder die Orbitaregion aus, mit intrakraniell, extraduralem Wachstum.

#### Stadium IVa:

Der Tumor wächst intrakraniell und intradural, ohne den Sinus cavernosus, die Hypophysenregion oder das Chiasma opticum zu infiltrieren.

#### Stadium IVb:

Der Tumor wächst intrakraniell und intradural und infiltriert den Sinus cavernosus, die Hypophysenregion oder das Chiasma opticum.

### 2.1.3. Therapie

Die Therapie der Wahl ist die chirurgische Tumoresektion. Das juvenile Angiofibrom kann in den meisten Fällen endoskopisch entfernt werden. Im Vergleich zu anderen Zugangsformen können hierdurch die Morbidität, der Blutverlust während der Operation und die Krankenhausaufenthaltsdauer deutlich reduziert werden (Wang et al., 2011, Carrau et al., 2001, Kamel, 1996). Selbst bei großen Tumoren erzielt die endonasale Resektion gleich gute oder bessere Ergebnisse, insofern kritische Strukturen wie die Arteria carotis interna oder der Sinus cavernosus nicht beteiligt sind (Bosraty et al., 2011, Nicolai et al., 2010).

Von den meisten Autoren wird präoperativ eine Embolisation des juvenilen Angiofibroms empfohlen, um den intraoperativen Blutverlust des stark vaskularisierten Tumors und somit die Gabe von Bluttransfusionen zu verringern (Midilli et al., 2009, Giavrogrou et al., 2007, Glad et al., 2007). Die Tumorembolisation wird 24 – 48 h vor der operativen Entfernung durchgeführt, um das Risiko der Revaskularisierung zu vermeiden. Vor der Durchführung sollten Nutzen und potenzielle Risiken gut abgewägt werden, da vor allem in kleineren Tumorstadien die präoperative Embolisation nicht unmittelbar notwendig sein muss (Schick, 2007). Einige wenige Autoren berichten von einer erhöhten Rezidivrate bei Anwendung einer präoperativen Embolisation (Lloyd et al., 1999).

Bei nicht-resezierbaren oder intrakraniell wachsenden Tumoren wird eine Strahlentherapie empfohlen (Lee et al., 2002, Reddy et al., 2001). Hierbei werden Tumorkontrollraten von durchschnittlich 85 % angegeben bei jedoch nicht unbedeutenden Komplikationen wie Wachstumsverzögerung, Katarakt und Induktion eines Basalzell- oder Plattenepithelkarzinoms (Mallick et al., 2015, Schick, 2007, Reddy et al., 2001). Über die Behandlung des juvenilen Angiofibroms mittels Chemotherapie wird nur vereinzelt, jedoch mit erfolgreichen Resultaten berichtet (Schick et al., 1996, Goepfert et al., 1985). Eine weitere mögliche Therapieoption ist die *Gamma-Knife*-Bestrahlung, bei welcher der Krankheitsherd laut dem *Gamma Knife* Zentrum Bielefeld zielgenau bestrahlt werden kann und das umliegende Gewebe nur minimal beeinträchtigt wird. Hierzu liegen jedoch bislang nur wenige Erfahrungsberichte vor (Park et al., 2006, Dare et al., 2003).

Die Feststellung, dass fast ausschließlich männliche Jugendliche ein juveniles Angiofibrom entwickeln, hat schon früh zu der Vermutung geführt, dass der Tumor von Hormonen abhängig entsteht. Es wurden unterschiedliche Therapieversuche mit Hormonen und Hormonantagonisten durchgeführt, welche teilweise sehr widersprüchliche Ergebnisse lieferten (siehe Kap. 2.1.5.).

Es wird aktuell von Rezidivraten zwischen 8,6 % und 23 % berichtet (Nicolai et al., 2010, Glad et al., 2007). Signifikante Risikofaktoren für ein Rezidiv sind ein Patientenalter bei Diagnosestellung von unter 18 Jahren, eine Tumorgöße über 4 cm und das Tumorstadium (Sun et al., 2010). Außerdem spielen die Tumorausdehnung, der Einsatz der präoperativen Embolisation und die Operationstechnik eine entscheidende Rolle (Giavroglou et al., 2007, Herman et al., 1999). In wenigen Fällen wurde auch eine spontane Remission des juvenilen Angiofibroms beobachtet (Spielmann et al., 2008, Dohar und Duvall, 1992).

#### 2.1.4. Histologie

Histologisch zeigt sich, dass der Tumor von einer gefäßarmen Pseudokapsel und bedeckendem Oberflächenepithel umgeben ist (Schick, 2007). Charakteristisch für das juvenile Angiofibrom ist eine Vielzahl von überwiegend irregulär geformten und nicht vollständig ausgebildeten Gefäßen, eingebettet in fibröses Bindegewebsstroma (siehe Abb. 3) (Beham et al., 1993). Das Tumorstroma besteht aus einer variierenden Anzahl von Kollagenfasern, Fibroblasten und wenigen Myofibroblasten (Beham et al., 1997). Die Mehrzahl der Stromazellen sind jedoch undifferenziert, ohne immunhistochemische Hinweise auf spezifische epitheliale, endotheliale, myoidale oder andere Differenzierungen (Pauli et al., 2008). Lediglich die Mehrzahl der Zellen des mikrovaskulären Anteils des Tumors, welcher meistens der Hauptwachstumszone entspricht, scheinen sich in glatte Muskelzellen und Endothelzellen differenzieren zu können (Pauli et al., 2008). Wendler und Mitarbeiter konnten 30 % der Zellen im juvenilen Angiofibrom als Mastzellen und T-Lymphozyten identifizieren und somit eine hohe Rate an inflammatorischen Zellen nachweisen (Wendler et al., 2007).

Die Hypervaskularisierung durch viele Tumorgefäße, welchen aufgrund eines unvollständigen Gefäßwandaufbaus die Fähigkeit zur Kontraktion fehlt, erklärt die starke Blutungsneigung des Angiofibroms (Nicolai et al., 2012). Die Gefäße können nicht ausreichend kontrahieren, da die glatten Muskelzellen irregulär angeordnet sind und die Gefäßwände einen variablen Gehalt an Muskelzellen haben (Beham et al., 1993). Außerdem fehlen elastische Membranen und Fasern und eine effiziente sympathische Innervation der Gefäße (Wang et al., 1994, Beham et al., 1993).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Basallaminae der Gefäße nicht kontinuierlich verlaufen und manchen Gefäßen die Perizyten zur Kontraktion fehlen (Beham et al., 2000). Das Verhältnis von Gefäßen und Bindegewebe ist sehr variabel, es sind sowohl Bereiche mit einem überwiegenden Anteil von Gefäßstrukturen als auch Abschnitte mit dominierendem Bindegewebsstroma zu beobachten (Schick, 2007).

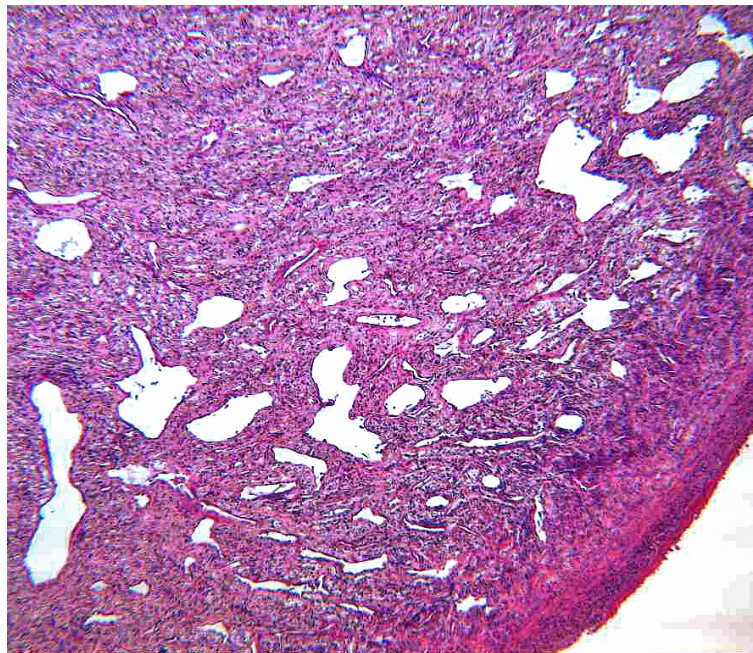


Abb. 3: Histologischer Schnitt eines juvenilen Angiofibroms.  
HE-Färbung, 10fache Vergrößerung

### 2.1.5. Ätiologie

Die Ätiologie des juvenilen Angiofibroms ist bis heute nicht abschließend geklärt. Seit Mitte des 19. Jahrhunderts wurde über eine Vielzahl von Theorien über den Ursprung des Tumors diskutiert. Unter anderem gab es Vermutungen, dass der Tumor aus Periost bzw. embryonalem Knorpelgewebe entsteht, dass es sich um ein vaskuläres Hamartom durch fehlplaziertes Schwellkörpergewebe oder um ein Teratom handelt (Farag et al., 1987, Maurice und Milad, 1981, Tillaux, 1878). Aufgrund der Beschreibung von endothelial ausgekleideten Gefäßspalten wurde 1942 erstmals von einer vaskulären Komponente des Tumors berichtet (Brunner, 1942). Sternberg und Mitarbeiter sowie Hubbard und Mitarbeiter postulierten das juvenile Angiofibrom als spezielle Form eines Hämangioms umgeben von Bindegewebe, während Schiff die Theorie vertrat, dass es sich um ektopes Gefäßgewebe verbunden mit einer Hypophysendysfunktion handelt (Schiff, 1959, Hubbard, 1958, Sternberg et al., 1954).

Beham und Mitarbeiter betrachteten die Tumoren aufgrund immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen ihrer irregulären Gefäßstrukturen als vaskuläre Malformation (Beham et al., 2000). Dies hat Schick und Mitarbeiter dazu bewogen, die embryologischen Aspekte der Gefäßentwicklung genauer zu beleuchten (Schick et al., 2002). Sie erklären die vaskuläre Fehlbildung durch die unvollständige Rückbildung der ersten Pharyngealbogenarterie im Sinne eines Atavismus, welcher dann durch einen Wachstumsreiz in der Adoleszenz zur Ausbildung eines Angiofibroms führen kann (Schick et al., 2002). Diese Theorie konnte durch den Nachweis der Expression von Laminin alpha2 in Gefäßen des juvenilen Angiofibroms gefestigt werden (Starlinger et al., 2007). Es wird vermutet, dass Laminin alpha2 das Vorhandensein von Gefäßen aus der frühen embryonalen Angiogenese markiert.

Da das juvenile Angiofibrom als kollagenreicher Tumor beschrieben wird, untersuchten Duerr und Mitarbeiter die Aktivität von Metalloproteinasen, welche in physiologischen und pathologischen Vorgängen wie der Angiogenese und im Tumorwachstum extrazelluläre Matrix spalten (Duerr et al., 2008). Die Autoren zeigten eine signifikant höhere Expression der Metalloproteinasen im juvenilen Angiofibrom im Vergleich zu gesundem Nasenmuschelgewebe und vermuteten demnach eine Beteiligung an der Tumorentstehung. Des Weiteren wurde die Expression der Kollagen Typen I, II, III und VI untersucht, wobei die Kollagen-Typen I und III als Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix in Angiofibromen bestätigt werden konnten (Gramann et al., 2009a). Eine starke Expression zeigte auch das Kollagen Typ VI, was mit einem aggressiven Tumorwachstum in Verbindung gebracht wird (Gramann et al., 2009b). Das Kollagen Typ II konnte wiederum so gut wie nicht nachgewiesen werden, weshalb die Autoren einen Tumorursprung im Knorpelgewebe für unwahrscheinlich halten (Gramann et al., 2009a).

Aufgrund der Beobachtung, dass nur männliche Jugendliche am juvenilen Angiofibrom erkranken, wurde 1948 erstmals die Bedeutung hormoneller Einflüsse diskutiert (Martin et al., 1948). Martin und Mitarbeiter vermuteten, dass eine verminderte Androgenwirkung oder eine überhöhte Östrogenproduktion für das Tumorwachstum verantwortlich sein könnten. Dane und Mitarbeiter sahen die Ursache in einem Androgenüberschuss (Dane et al., 1954). Beides wurde 1987 durch die Messung altersentsprechend normaler Serumspiegel von Testosteron, Dihydrotestosteron und Östradiol bei Patienten mit juvenilem Angiofibrom widerlegt (Farag et al., 1987). In einem Fallbericht beobachteten Johnsen und Mitarbeiter, dass der Tumor unter Androgentherapie deutlich an Größe zunahm, wohingegen er sich unter einer Therapie mit Östrogenen rapide verkleinerte (Johnsen et al., 1966). Auch das seltene Vorkommen juveniler Angiofibrome bei älteren Frauen kann durch den abfallenden Östrogenspiegel in der Menopause erklärt werden (Patrocinio et al., 2005).

Das widerspricht der späteren Feststellung von Montag und Mitarbeiter, dass im Tumorgewebe vermehrt Östrogenrezeptoren des Typs  $\beta$  exprimiert werden und demnach über eine antiöstrogene Therapie nachgedacht werden sollte (Montag et al., 2006). Komponenten von spezifischen Bindungsstellen für Testosteron und Dihydrotestosteron konnten im juvenilen Angiofibrom erstmals 1980 nachgewiesen werden (Lee et al., 1980). Der erste direkte Nachweis von Androgenrezeptoren erfolgte durch Hwang und Mitarbeiter mithilfe immunzytochemischer Techniken (Hwang et al., 1998). Schick und Mitarbeiter wiesen signifikante Verluste des Y-Chromosoms beim juvenilen Angiofibrom nach, außerdem wurden in mehreren Tumoren zusätzliche X-Chromosomen gefunden (Schick et al., 2003, Brunner et al., 2003). Da die Androgenrezeptoren auf dem X-Chromosom in der Region Xq11-12 lokalisiert sind, spricht dies für die Androgen-Abhängigkeit des Tumors (Brown et al., 1989). Es wurden bereits verschiedene Studien mit dem Androgenrezeptor-Blocker Flutamide durchgeführt (Schick et al., 2014, Thakar et al., 2011, Gates et al., 1992). In einer Studie mit 5 an einem juvenilen Angiofibrom erkrankten Patienten zeigten 4 der 5 Patienten einen Rückgang des Tumors um 44 % bei präoperativer Gabe von Flutamide (Gates et al., 1992). Die Autoren Thakar und Mitarbeiter berichten über eine unterschiedliche Reaktion auf das Medikament von präpubertären und postpubertären Patienten (Thakar et al., 2011). Hiernach führte die präoperative Einnahme von Flutamide bei postpubertären Patienten zur partiellen Tumorregression (Thakar et al., 2011). Bei kultivierten Mesenchymzellen des juvenilen Angiofibroms führte Flutamide ebenfalls zur Hemmung des Zellwachstums (Schick et al., 2014).



Des Weiteren wurden in 10 von 12 untersuchten Angiofibromen Glukokortikoid-Rezeptoren detektiert, sodass antiproliferative Effekte von Glukokortikoiden auf Fibroblasten des Tumors *in vitro* untersucht und nachgewiesen wurden (Wendler et al., 2012, Brentani et al., 1989).

Genetische Untersuchungen konnten neben den zusätzlichen X-Chromosomen zahlreiche weitere chromosomale Veränderungen im Angiofibrom nachweisen. Von mehreren Autoren wurden mittels vergleichender genomischer Hybridisierung (CGH) sowohl Gewinne als auch Verluste auf verschiedenen Chromosomen aufgezeigt (Heinrich et al., 2007, Schick et al., 2007, Brunner et al., 2003). Die Autoren beobachteten häufiger chromosomale Gewinne als Verluste, was sie zu der Annahme führte, dass die Überexpression von Onkogenen eine größere Rolle bei der Pathogenese spielt, als der Verlust von Tumorsuppressorgenen (Heinrich et al., 2007). Eine Untersuchung der Expression verschiedener Onkogene zeigte, dass das Protoonkogen C-MYC und das Onkogen BMI-1 (*B-cell specific Moloney murine leukemia virus integration site 1*) verstärkt in Bindegewebszellen des juvenilen Angiofibroms zu finden sind (Renkonen et al., 2011).

Der Wachstumsfaktor-Rezeptor C-KIT wurde verstärkt in Bindegewebe und Endothel exprimiert, was zu der Schlussfolgerung führte, dass sowohl das Bindegewebe als auch das Endothel in die Tumorpathogenese involviert sind (Renkonen et al., 2011).

Außerdem wurde nach Mutationen der Onkogene Ki-ras und Ha-ras gesucht, welche jedoch in keinem Tumor nachgewiesen wurden (Coutinho et al., 1999). Durch Deletionen auf Chromosom 17 kommt es vermutlich zum Genverlust des Wachstumsfaktor-Rezeptors Her-2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) und dem Tumorsuppressorgen p53 (Schick et al., 2005). Des Weiteren konnten Schick und Mitarbeiter eine signifikante Hochregulierung der Transkripte von BORIS (*brother of the regulator of imprinted sites*) und TSHZ1 (*teashirt zinc finger homeobox 1*) feststellen (Schick et al., 2011). Das *Cancer/Testis-Antigen* BORIS wird ausschließlich in Keimzellen und in Tumorzellen exprimiert, sodass es als potentieller Angriffspunkt für eine Immuntherapie diskutiert wird (de Necochea Campion et al., 2011). Das Protein TSHZ1 ist in die Regulation von Entwicklungsprozessen involviert, unter anderem bei der Entstehung der ersten Pharyngealbogenarterie (Core et al., 2007). Der Nachweis von TSHZ1-Amplifikationen wird im Hinblick auf die Hypothese, dass es sich beim Angiofibrom um eine Malformation der ersten Pharyngealbogenarterie handeln könnte, diskutiert (Schick et al., 2011).

Als Ursache für die chromosomalen Veränderungen spielt eventuell das Gen AURKA (*Aurorakinase A*) eine Rolle. Die Amplifikation des Gens, welches für eine Serin-Threoninkinase kodiert, wurde mittels Microarray im juvenilen Angiofibrom nachgewiesen und wird in verschiedenen Tumoren für deren chromosomale und genetische Instabilität verantwortlich gemacht (Schick et al., 2007, Jeng et al., 2004, Klein et al., 2004).

Ein weiterer Faktor, der in der Pathogenese des juvenilen Angiofibroms diskutiert wird, ist der *Transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF $\beta$ 1). TGF $\beta$ 1 aktiviert die Proliferation von Fibroblasten und induziert die Angiogenese und konnte von Dillard und Mitarbeitern sowohl in Fibroblasten als auch in Endothelzellen des Tumors nachgewiesen werden (Dillard et al., 2000). Brunner und Mitarbeiter zeigten den Zugewinn zweier Genregionen im juvenilen Angiofibrom, auf denen zum einen das *TGF- $\beta$ -inducible-early-growth-response-Gen* (TIEG-Gen) und zum anderen die *TGF $\beta$ -activated-Kinase-1* (TAK1) liegen, welche TGF $\beta$ 1 aktivieren (Brunner et al., 2003).

Aufgrund der Beobachtung, dass Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis coli (FAP) etwa 25-mal häufiger an einem juvenilen Angiofibrom leiden, wurde ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Erkrankungen vermutet (Ferouz et al., 1995, Giardiello et al., 1993). Die FAP ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, welche sich durch eine Vielzahl von Polypen im Dickdarm äußert und eine obligate Präkanzerose darstellt.

Für die Entstehung einer FAP sind Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen *Adenomatous polyposis coli* (APC) verantwortlich (Kinzler et al., 1991, Nishisho et al., 1991). Das APC-Protein reguliert das Protein  $\beta$ -Catenin, welches zum einen eine Komponente in Zell-Zell-Verbindungen darstellt und zum anderen im WNT-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt (Fodde, 2003). Im juvenilen Angiofibrom konnten keine Mutationen im APC-Gen nachgewiesen werden (Abraham et al., 2001, Guertl et al., 2000, Ferouz et al., 1995). Es zeigten sich jedoch deutlich erhöhte  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel und  $\beta$ -Catenin-Mutationen in 75 % der untersuchten Angiofibrome, sodass davon ausgegangen wird, dass das Protein  $\beta$ -Catenin und der WNT-Signalweg einen hohen Stellenwert in der Ätiologie dieses Tumors einnehmen (Rippel et al., 2003, Zhang et al., 2003, Abraham et al., 2001). Des Weiteren wird hier ein Zusammenhang mit der Androgenabhängigkeit des juvenilen Angiofibroms gesehen, da  $\beta$ -Catenin als Coaktivator von Androgenrezeptoren wirksam ist. Untersuchungen von Pawlowski und Mitarbeiter zeigen, dass liganden-gebundene Androgenrezeptoren  $\beta$ -Catenin in den Zellkern transportieren und dort die Interaktion zwischen den Androgenrezeptoren und  $\beta$ -Catenin für eine Steigerung der transkriptionellen Aktivität sorgt (Koh et al., 2002, Pawlowski et al., 2002, Truica et al., 2000). Beispielsweise konnten in Tumorzellen des Prostatakarzinoms eine deutliche Zunahme des  $\beta$ -Catenin-Proteins und der Androgenrezeptoren nach Stimulation durch Androgene beobachtet werden, sodass  $\beta$ -Catenin-Mutationen auch beim Prostatakarzinom eine wichtige Rolle zugeschrieben werden (Truica et al., 2000).

## 2.2. Der WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg ist ein elementarer Mechanismus zur Kontrolle der fetalen Entwicklung und zur Erhaltung der Gewebs-Homöostase bei Erwachsenen (Logan und Nusse, 2004). Mutationen in dieser Signalkaskade werden für Fehlbildungen bei Neugeborenen, für Krebserkrankungen und andere Krankheiten verantwortlich gemacht (Clevers, 2006). Der Haupteffektor des WNT-Signalwegs ist das Protein  $\beta$ -Catenin, welches die WNT-Zielgene im Zellkern und somit unter anderem den Zellzyklus aktiviert. Es sind eine Vielfalt an WNT-Zielgenen bekannt, darunter beispielsweise die Zellzyklusaktivatoren der

*T-cell factor/Lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF) - Transkriptionsfaktorfamilie (siehe Kap. 2.2.2). Als weiteres Zielgen, welches vor allem in der Tumor-Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, wurde der *Vaskular endothelial growth factor* (VEGF) identifiziert (Zhang et al., 2001). Die Aktivierung des WNT-Signalwegs führt außerdem zur erhöhten Expression der Transkriptionsfaktoren Nanog und Oct4, welche die Produktion von embryonalen Stammzellen anregen, die refraktär gegenüber weiteren Differenzierungen sind (Cole et al., 2008). Auch Axin2, welches als Protein im WNT-Weg eine wichtige Rolle im Abbau von  $\beta$ -Catenin spielt, wird als direktes Zielgen durch WNT aktiviert (Jho et al., 2002, Lustig et al., 2002).

Beim WNT-Weg kann man vereinfacht von zwei Zuständen ausgehen, die miteinander interagieren, dem inaktivierten WNT-off Status und dem aktivierten WNT-on Status.

### 2.2.1. WNT-off Status

Die WNT-Signalkaskade wird durch die Bindung spezifischer WNT-Moleküle an Transmembran-Rezeptoren ausgelöst (Mao et al., 2001). Solange kein WNT-Signal vorhanden ist, wird das freie  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma von einem Multiproteinkomplex bestehend aus den Tumorsuppressoren APC, Axin1 und Axin2, der Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) und Casein Kinase 1 (CK1) gebunden und mittels Phosphorylierung zum Abbau markiert (Behrens et al., 1998, Itoh et al., 1998). Hierbei fungiert Axin als Stützprotein, da es separate Bindungsdomänen zu APC, GSK3 $\beta$ , CK1 und  $\beta$ -Catenin besitzt und somit alle beteiligten Proteine in räumliche Nähe zueinander bringt (Dajani et al., 2003, Amit et al., 2002, Spink et al., 2000). Axin ermöglicht hier die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch CK1 und GSK3 $\beta$  (Liu et al., 2002, Ikeda et al., 1998). Dazu werden am amino-terminalen Ende von  $\beta$ -Catenin Serin- und Threoninreste phosphoryliert (Peifer et al., 1994, Yost et al., 1996).

Die Phosphorylierung durch CK1 erfolgt zuerst und ist Voraussetzung für die nachfolgende Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$ , außerdem verstärkt CK1 die Verbindung zwischen Axin und GSK3 $\beta$  (Lui et al., 2002, Luo et al., 2007). Durch die Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  wird eine Bindungsstelle für eine Ubiquitin-Ligase geschaffen, sodass  $\beta$ -Catenin anschließend durch Ubiquitin zum Abbau markiert und durch ein Proteasom degradiert werden kann (Aberle et al., 1997).

Zusätzlich zu  $\beta$ -Catenin werden auch Axin und APC durch CK1 und GSK3 $\beta$  phosphoryliert, was zu einer verstärkten Bindung zwischen Axin und APC mit  $\beta$ -Catenin und somit zur gesteigerten Degradierung von  $\beta$ -Catenin führt (Huang und He, 2008, Ha et al., 2004).

Vom Stützprotein Axin sind zwei Axin-Gene bekannt, die als negative Regulatoren des WNT-Wegs agieren und in vivo funktionell gleich sind (Chia und Costantini, 2005, Jho et al., 2002, Lustig et al., 2002). Axin1 ist konstitutiv aktiv, wohingegen Axin2, welches auch als Conductin bezeichnet wird, erst durch das WNT-Signal aktiviert wird und somit vermutlich als negatives Feedback wirkt (Leung et al., 2002, Jho et al., 2002, Behrens et al., 1998).

Auch die Rolle des Tumorsuppressorproteins APC im WNT-Signalweg ist noch nicht vollständig verstanden. APC bindet direkt an  $\beta$ -Catenin und Axin (Mao et al., 2001). Su und Mitarbeiter zeigten, dass APC den Abbau von  $\beta$ -Catenin unterstützt, indem es  $\beta$ -Catenin vor der Dephosphorylierung durch die Protein Phosphatase 2a (PP2a) schützt (Su et al., 2008). Dem entgegengesetzt ist die Beobachtung, dass die APC-Proteinlevel bei angeschaltetem WNT-Signal ansteigen und APC die Degradation von Axin verstärkt (Takacs et al., 2008, Choi et al., 2004, Lee et al., 2003). Ein Anstieg des APC-Proteinlevels resultiert demnach in einem verminderten Axin-Proteinlevel, was nach Ansicht von Lee und Mitarbeitern eine starke  $\beta$ -Catenin-Fluktuation verhindern kann.

Umgekehrt kann bei einer Überexpression von APC auch Axin den Abbau von APC initiieren, was auf einen komplexen Kreislauf in der APC-Axin-Regulierung schließen lässt (Choi et al., 2004).

Positive Regulatoren des WNT-Signalwegs sind die zwei Phosphatasen Protein Phosphatase 1 (PP1) und PP2a. Während CK1 nicht nur für die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin sondern auch für die Phosphorylierung von Axin und somit für eine verstärkte Bindung zwischen Axin und GSK3 $\beta$  zuständig ist, kann PP1 Axin wieder dephosphorylieren und damit GSK3 $\beta$  vom Multiproteinkomplex ablösen (Luo et al., 2007). Es ist unklar, ob PP1 konstitutiv arbeitet oder ob die Phosphatase durch WNT reguliert wird (MacDonald et al., 2009). PP2a bindet sowohl an Axin als auch an APC, wobei die genaue Rolle von PP2a noch immer unklar ist (Kimelman und Xu, 2006, Hsu et al., 1999, Seeling et al., 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass PP2a  $\beta$ -Catenin dephosphoryliert, was ebenso zu einem verminderten  $\beta$ -Cateninabbau führt (Zhang et al., 2009, Su et al., 2008). Ein weiterer positiver Regulator stellt die Proteinkinase CK2 dar. Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an der Aminosäure Threonin 393 durch CK2 führt zu einer gesteigerten Resistenz gegen die Proteasomen und somit zu einem Anstieg von  $\beta$ -Catenin (Song et al., 2003, Wu et al., 2009). Der WNT-off Status ist schematisch in der Abb. 4 A dargestellt.

### 2.2.2. WNT-on Status

Nachdem sich spezifische WNT-Moleküle an die Transmembran-Rezeptoren *Frizzled* und *LDL-receptor related protein 5/6* (LRP5/6) gebunden haben wird eine Signalkaskade initiiert, die in der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des LRP5/6 resultiert (Tamai et al., 2004, Mao et al., 2001). Hierbei aktiviert der *Frizzled*-Rezeptor das im Zytoplasma vorliegende Protein *Dishevelled*, welches daraufhin an Axin und den Multiproteinkomplex binden kann (Zeng et al., 2008). Nun wird der LRP5/6-Rezeptor durch CK1 und GSK3 $\beta$  phosphoryliert, wodurch weitere Bindungsstellen für Axin und den Multiproteinkomplex am LRP5/6-Rezeptor erzeugt werden (Zeng et al., 2005, Tamai et al., 2004, Mao et al., 2001). Hierdurch kommt es zur Unterbrechung der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch GSK3 $\beta$  und somit zum reduzierten Abbau von  $\beta$ -Catenin. Es gibt verschiedene Theorien wie es zu dieser verminderten Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin kommen könnte, der genaue Mechanismus ist jedoch bis heute nicht geklärt (Luo et al., 2007, Liu et al., 2005, Lee et al., 2003, Li et al., 1999, Yost et al., 1998).

Durch den verminderten Abbau kommt es zu einem erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinspiegel im Zytoplasma und anschließend zur Translokation von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern. Dort aktiviert  $\beta$ -Catenin die Transkription von Zielgenen der TCF/LEF-Transkriptionsfaktorfamilie (van de Wetering et al., 1997, Behrens et al., 1996). Ohne die Bindung von  $\beta$ -Catenin agieren TCF/LEFs zusammen mit dem Co-Repressorprotein Groucho/TLE als Repressoren und verhindern somit die Transkription (Bienz, 1998, Riese et al., 1997). Die Bindung von  $\beta$ -Catenin an TCF/LEFs führt zur Ablösung von Groucho/TLE und ermöglicht die Bildung eines Komplexes mit weiteren Co-Aktivatoren, welcher schlussendlich die Transkription der Zielgene aktiviert (Daniels und Weis, 2005, Stadel und Basler, 2005).

In Abbildung 4 A und 4 B wird der WNT-Signalweg schematisch im On- und im Off-Status gezeigt.

Die Beobachtung, dass der Multiproteinkomplex sowohl beim angeschalteten WNT-Signalweg via LRP5/6-Phosphorylierung als auch beim inaktivierten Weg via  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung involviert ist, führt zur dringenden Vermutung, dass der WNT-Signalweg mehr ein dynamischer Prozess ist, anstatt im einfachen On-/Off-Status zu arbeiten (Zeng et al., 2008, Zeng et al., 2005).

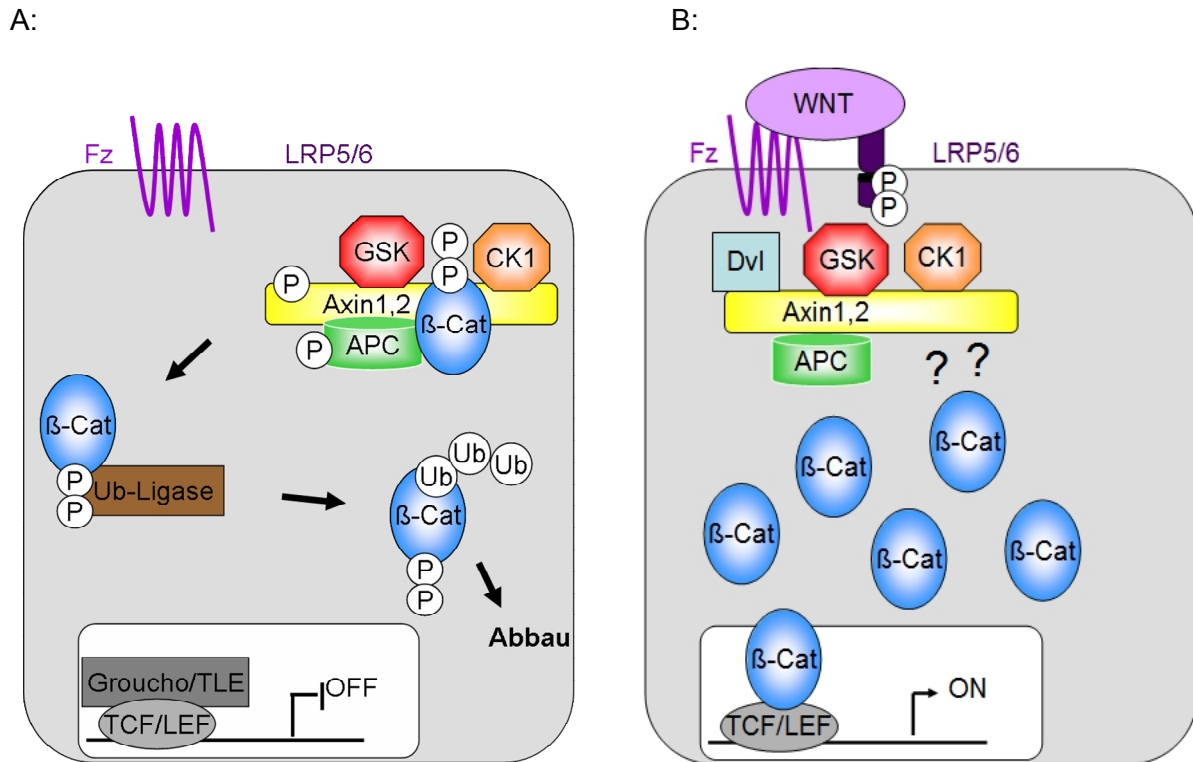


Abb. 4 A und B: Schematische Darstellung des WNT-Signalwegs in einer Zelle.

A: Der WNT-off Status: Die Rezeptoren *Frizzled* (FZ) und *LDL-receptor related protein* (LRP5/6) bleiben inaktiv, da kein WNT-Molekül zur Bindung vorliegt.  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat) wird durch den Multiproteinkomplex phosphoryliert (P = Phosphat), daraufhin durch eine Ubiquitin-Ligase (Ub-Ligase) ubiquiniert (U = Ubiquitin) und abschließend durch ein Proteasom abgebaut. Die WNT-Zielgene im Zellkern bleiben abgeschaltet. Die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF agieren mit dem Co-Repressorprotein Groucho/TLE als Repressoren und verhindern die Transkription.

B: Der WNT-on Status: WNT-Moleküle binden an die Rezeptoren FZ und LRP5/6, dadurch kommt es zur Aktivierung von *Dishevelled* (Dvl). Dvl bindet den Multiproteinkomplex bestehend aus Axin1, Axin2, GSK3 $\beta$ , APC und CK1, es kommt zur Phosphorylierung von LRP5/6, dadurch werden weitere Bindungsstellen für den Multiproteinkomplex erzeugt. Die Phosphorylierung von  $\beta$ -Cat wird unterbrochen,  $\beta$ -Cat reichert sich zuerst im Zytoplasma und anschließend im Zellkern an. Die Transkription der TCF/LEF-Zielgene im Zellkern wird aktiviert.

### 2.2.3. Der WNT-Signalweg in der Tumorentstehung

Veränderungen in der WNT-Signalkaskade sind häufig mit Erbkrankheiten, Krebserkrankungen und anderen Krankheiten assoziiert. Mutationen im  $\beta$ -Catenin- oder APC-Gen, welche die  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung oder Degradierung, wie in Abb. 5 schematisch dargestellt, verhindern, führen letztendlich zur Entstehung von Krebserkrankungen (Morin et al., 1997, Korinek et al., 1997). So sind Keimzellmutationen im APC-Gen die Verursacher der Familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP), welche eine obligate Präkanzerose für Dickdarmtumore darstellt (Kinzler et al., 1991, Nishisho et al., 1991). In selteneren Fällen von kolorektalen Karzinomen, bei denen weder APC- noch  $\beta$ -Catenin-Mutationen nachgewiesen werden konnten, sind Mutationen im Axin2-Gen für die Tumorentstehung verantwortlich (Lammi et al., 2004). In hepatozellulären Karzinomen konnten Satoh und Mitarbeiter außerdem Axin1-Mutationen aufzeigen (Satoh et al., 2000).  $\beta$ -Catenin-Mutationen wurden nicht nur in kolorektalen und hepatozellulären Karzinomen, sondern auch bei Tumoren von Prostata, Haut, Endometrium und weiteren Organen gefunden (Chan et al., 1999, Fukuchi et al., 1998, Miyochi et al., 1998, Voeller et al., 1998, Rubinfeld et al., 1997). Auch im juvenilen Angiofibrom wurden durch Abraham und Mitarbeiter Mutationen im Exon 3 des  $\beta$ -Catenin-Gens nachgewiesen, welche größtenteils zum Verlust der Serin- / Threonin-Bindungsstelle für GSK3 $\beta$  führen (Abraham et al., 2001). Dies resultiert in einer verminderten Phosphorylierung und führt somit zu einer Anhäufung von  $\beta$ -Catenin in der Zelle und im Zellkern. Erhöhte  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel in Bindegewebs- und Endothelzellen konnten dementsprechend bereits gezeigt werden (Rippel et al., 2003, Zhang et al., 2003, Abraham et al., 2001). Neben Mutationen sind andere Mechanismen bekannt, die zu den erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinleveln führen können. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass der *Insulin-like growth factor II* (IGF-II) signifikant verstärkt im juvenilen Angiofibrom exprimiert wird, dessen fetale Form, der *Insulin-like growth factor I* (IGF-I) als Inhibitor von GSK3 $\beta$  stabilisierend auf  $\beta$ -Catenin wirkt (Playford et al., 2000, Nagai et al., 1996). Außerdem konnte eine verminderte Expression der mikro Ribonukleinsäure (RNA) 218 im juvenilen Angiofibrom nachgewiesen werden, was ebenfalls in der Stabilisierung und Akkumulation von  $\beta$ -Catenin resultiert (Lerner et al., 2014, Alqurashi et al., 2013, Uesugi et al., 2011, Katoh et al., 2006).

APC-Mutationen wurden bislang in keinem der untersuchten Tumoren gefunden (Abraham et al., 2001, Guertl et al., 2000). Des Weiteren ist bis dato nicht bekannt, ob weitere Mutationen in den WNT-Weg-Genen  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , Axin1 und Axin2 im juvenilen Angiofibrom vorliegen. Bezüglich der Proteinexpression im juvenilen Angiofibrom wurde nur das Protein  $\beta$ -Catenin untersucht, die anderen am WNT-Signalweg beteiligten Proteine wurden bislang weder auf RNA- noch auf Proteinebene analysiert.



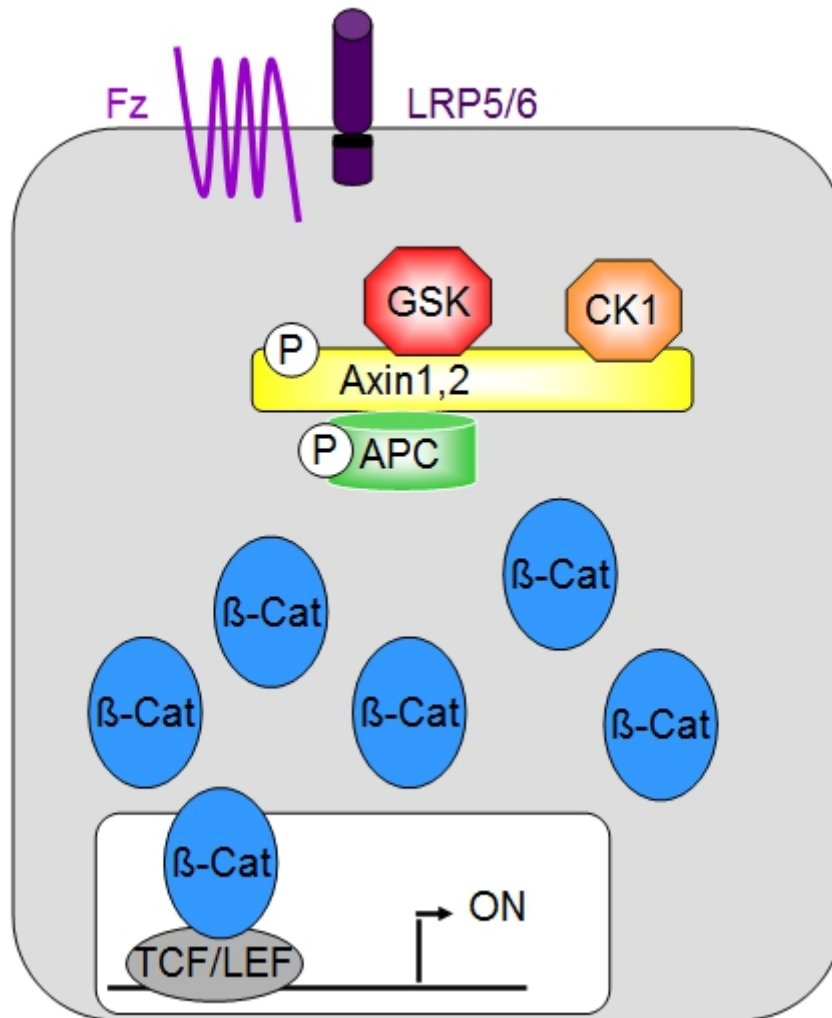


Abb. 5: Schematische Darstellung des WNT-Signalwegs bei  $\beta$ -Catenin-Mutationen. Trotz fehlendem WNT-Signal kommt es zur Anhäufung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und im Zellkern, da  $\beta$ -Catenin nicht mehr phosphoryliert und abgebaut werden kann. Dadurch sind die WNT-TCF/LEF-Zielgene angeschaltet.

### 2.3. Zielsetzung der Arbeit

Das Protein  $\beta$ -Catenin und der WNT-Signalweg scheinen nach bisherigen Kenntnissen einen hohen Stellenwert in der Entstehung des juvenilen Angiofibroms einzunehmen. Abraham und Mitarbeiter konnten in 75 % der von ihnen untersuchten Tumoren  $\beta$ -Catenin-Mutationen im Bereich der GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle nachweisen (Abraham et al., 2001). Dies legt die Vermutung nahe, dass  $\beta$ -Catenin durch die fehlende Phosphorylierung durch GSK3 $\beta$  nicht zum Abbau markiert werden kann und hieraus die mehrfach gezeigten erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel resultieren (Rippel et al., 2003, Zhang et al., 2003, Abraham et al., 2001).

In den bislang publizierten Arbeiten wurde das  $\beta$ -Catenin-Gen im Bereich der GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle und von den weiteren WNT-Signalweg-Genen nur APC auf Mutationen untersucht (Abraham et al., 2001, Guertl et al., 2000, Ferouz et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit sollten zum einen die bereits bekannten Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen bestätigt werden, und zum anderen nach weiteren Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen im Bereich der Bindungsstellen von Axin2 und APC gesucht werden. Da Axin im Rahmen des WNT-Signalwegs eine wichtige Funktion als Brückenprotein innehat, wurde auch hier der Bereich der Bindungsstellen von  $\beta$ -Catenin und GSK3 $\beta$  auf Mutationen überprüft.

Ausgehend von der Überlegung, dass neben den Veränderungen auf DNA-Ebene noch weitere Mechanismen für die erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel verantwortlich sein können, wurde nachfolgend die Expression der WNT-Weg-Gene  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , APC und Axin2 auf RNA-Ebene mittels quantitativer Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) untersucht.

Abschließend sollte die Expression der entsprechenden WNT-Signalweg-Proteine im Tumorgewebe anhand von immunhistochemischen Untersuchungen und in Zellkulturen geprüft werden, um neben den Proteinleveln von  $\beta$ -Catenin auch Aussagen über die Expression der Proteine GSK3 $\beta$ , APC, Axin1 und Axin2 machen zu können.

## 3. MATERIAL

### 3.1. Bezugsquellen der Materialien

Wenn nicht anders angegeben wurden die verwendeten Materialien von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen.

10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Agarose	Lonza Group, Basel, Schweiz
Amphotericin B	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Antibody diluent S3022	Dako, Hamburg, Deutschland
Antifade, Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, Californien
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Chloroform	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole)	Vector Laboratories, Burlingame, Californien
DEPC	Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dnase I	Promega, Fitchburg, USA
EDTA	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Glykogen	Roche, Basel, Schweiz
Hot-Start Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
IPTG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Hedinger., Stuttgart, Deutschland
Natriumacetat	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nystatin Suspension	Dermapharm, Wien, Österreich
Paraffin	Engelbrecht Medizin
PBS steril / unsteril	PAA-Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Tris/HCL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland

### 3.2. Antikörper

Tab. 1: Verwendete Primärantikörper, alle Antikörper sind vom Isotyp IgG

Antigen	Klon	Bildungsorgan	Verdünnung IHC	Verdünnung IF	Hersteller
APC	Monoklonal (Klon CC-1)	Maus	1:20		Abcam, Cambridge, UK
Axin1	Monoklonal (Klon C76H11)	Kaninchen	1:20		Cell Signaling Technology Cambridge, UK
Axin2	Polyklonal	Kaninchen	1:20		Abcam, Cambridge, UK
β-Cat	Monoklonal (Klon CAT- 5H10)	Maus	1:100	1:200	Zymed Laboratories, San Francisco, USA
GSK3β	Polyklonal	Kaninchen	1:50		Abcam, Cambridge, UK

β-Cat: β-Catenin, IHC: Immunhistochemie, IF: Immunfluoreszenz

Als Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde ein Tetramethyl Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC) -gekoppelter Antikörper der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis, USA mit einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

### 3.3. Lösungen und Puffer

TE-Puffer                    10 mM Tris/HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0

TAE-Puffer (50x)        2 M Tris/HCl, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8.3

Citratpuffer                2 mM Citronensäure, 9 mM Na-Citrat

DNase Puffer              400 mM Tris/HCl, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0

DEPC-Wasser              0,1 % DEPC in H<sub>2</sub>O, über Nacht gerührt, anschließend autoklaviert

STET-Puffer: 43 mM Tris-HCl, pH 8 (1 M, 5 ml), 43 mM EDTA, pH 8 (0,2 M, 25 ml), 5 ml Triton X 100, 8 g Sucrose, 80 ml H<sub>2</sub>O  
Das Lysozym wurde in einer Endkonzentration von 500 µg/ml (50 µl Lysozym pro 5 ml STET) zugegeben.

DAB-Lösung: Sigmafast DAB tablet set (Sigma Aldrich)  
1 Tablette 3,3'-Diaminobenzidine  
1 Tablette Urea Hydrogen Peroxide  
5 ml destilliertes Wasser (H<sub>2</sub>O dest.)  
5 µl Nickelchlorid (13 mg/ml)

### 3.3.1. Nährmedien

#### 3.3.1.1. Bakterienkultur

LB-Medium, Gibco

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

#### 3.3.1.2. Zellkultur

Alle Nährmedien und die aufgeführten Zusätze wurden von der Firma PAA-Laboratories, Pasching, Österreich bezogen.

Tab. 2: Für die Zellkultur verwendete Nährmedien und Zusätze

Unkonditioniertes Medium	<i>DMEM / HAM's F12 with L-Glutamine</i>
Konditioniertes Medium	<i>DMEM / HAM's F12 with L-Glutamine</i> inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) Penicillin/Streptomycin L-Glutamin Na-Pyruvat

Zur Inaktivierung des im FKS enthaltenen Komplementsystems wurde das Serum zuvor für 30 min auf 56 °C erhitzt, bevor es aliquotiert eingefroren bzw. dem Medium zugesetzt wurde.

---

Einfriermedium I	0,3 ml unkonditioniertes Medium 0,2 ml FKS
Einfriermedium II	0,4 ml unkonditioniertes Medium 0,1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (steril)

### 3.4. Geräte

#### Zentrifugen:

Jouan MR23i 5804R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Eppendorf, Hamburg, Deutschland
----------------------	---

#### Mikrozentrifuge:

Biofuge Pico, Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
-----------------------	--

#### Thermocycler:

Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
-----------------------	---------------------------------

#### Fluoreszenzmikroskop:

Olympus BX61	Olympus, Tokio, Japan
--------------	-----------------------

#### Mikrotom:

Leica SM2000 R	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
----------------	---

#### Paraffineinbettung:

Shandon Histocentre 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shandon Hypercenter XP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

#### Dokumentation Gelelektrophorese:

Compact Imaging System	Imago, Kaiserslautern, Deutschland
------------------------	------------------------------------

#### Dokumentation Immunfluoreszenz:

ISIS	Soft Imagine System, Münster, Deutschland
------	---

#### Dokumentation Immunhistochemie:

analySIS	Soft Imagine System, Münster, Deutschland
----------	---

### 3.5. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland bezogen.

Axin2 221for	5'- CCACGCCGATTGCTGAGAGG -3'
Axin2 257for (RT)	5'- TTCCCAGACTCAGTGGGAAGAG -3'
Axin2 439for	5'- AAGGGCCAGGTCACCAAAC -3'
Axin2 577rev	5'- TCGGAACAGGTAAGCACCGTCT -3'
Axin2 1025for	5'- ACCGTGGTTGGCTTGTCCAG -3'
Axin2 1217for	5'- GATATCCAGTGATGCGCTG -3'
Axin2 1303rev	5'- TTA CTGCCACACGATAAG -3'
Axin2 1458rev	5'- CTGTGGCGGCTCTCCA ACTC -3'
Axin2 1824rev	5'- TTCGTCGTCTGCTTGGTCAC -3'
Axin2 Mut1for	5'- AGCAGCAGCTTCCGCGG -3'
Axin2 Mut2for	5'- AGCAGCAGCTTCCACGG -3'
Axin2 Mutfor (RT)	5'- AGCAGCAGCTTCCGCGGAACG -3'
Axin2 Mutrev (RT)	5'- ATCTTCGTTCCGCGGAAGCTGC -3'
Axin2 wtfor	5'- AGCAGCAGCTTCCGTGA -3'
Axin2 wtfor (RT)	5'- AGCAGCAGCTTCCGTGAGGGATG -3'
Axin2 wtrev (RT)	5'- ATCTTCGTTCCGCCTGGTGTTG -3'
β-Cat 269for	5'- ATGGCTACTCAAGCTGATTTG -3'
β-Cat 308for	5'- ATGGAACCAGACAGAAAAGC -3'
β-Cat 611for (RT)	5'- GATGCTGCTCATCCCACTAATG -3'
β-Cat 839for	5'- TCTCCTCAGATGGTGTCTGC -3'
β-Cat 942rev	5'- CGATGATGGGAAAGGTTATG -3'
β-Cat 1079for	5'- ATGGCAGTGCGTTTAGCTG -3'
β-Cat 1079for (RT)	5'- ATGGCAGTGCGTTTAGC -3'
β-Cat 1209for	5'- TCATACTGGCTAGTGGTGG -3'
β-Cat 1228rev	5'- TCCACCACTAGCCAGTATG -3'
β-Cat 1470rev	5'- AGACCTTCCATCCCTTCCTG -3'
β-Cat 1550rev	5'- TGAGGTTAGAAAGAATTCCAGC -3'
β-Cat 1820rev	5'- GGACAAAGGGCAAGATTTTCG -3'
β-Cat 2341for (RT)	5'- TGAGACTGCTGATCTTGGACTTG -3'
β-Cat 2523rev (RT)	5'- CCATCAACTGGATAGTCAGCACC -3'

---

GAPDHfor	5'- AGTCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC -3'
GAPDHrev	5'- TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC -3'
G6PDH 833for	5'- ATCGACCACTACCTGGGCAA -3'
G6PDH 1023rev	5'- TTCTGCATCACGTCCCGGA -3'
RPII 4301for	5'- GCACCACGTCCAATGACAT -3'
RPII 4567rev	5'- GTGCGGCTGCTTCCATAA -3'

RT: Primer, die ausschließlich für die quantitative Real-Time-PCR verwendet wurden





Aufgrund der Gewebemengen konnten die immunhistochemischen Methoden nicht an denselben Tumorgewebe wie die vorangegangenen Untersuchungen durchgeführt werden. Als Referenzgewebe wurden die gesunden Nasenmuschelgewebe (NM) NM 1765, NM 1914, NM 2268 und NM 2284, sowie gesundes Zahnfleischgewebe verwendet, welche dankenswerterweise aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und der Klinik für Urologie der Universitätskliniken des Saarlandes (Prof. Dr. Unteregger) zur Verfügung gestellt wurden.

Tab. 3: Zusammenstellung der verfügbaren Daten der in dieser Arbeit verwendeten Gewebe

Gewebe	A	Grad nach Andrews	Bezugsquelle	Untersuchung
AF 3076	9	II	Erlangen	PCR, qRT-PCR, Sequ.
AF 3493	10	Re (3076)	Erlangen	PCR, qRT-PCR, Sequ.
AF 3428	19	III	Erlangen	PCR, qRT-PCR, Sequ.
AF 356	13	IV	Homburg	PCR, qRT-PCR, Sequ.
AF 357	18	II	Homburg	PCR, qRT-PCR, Sequ.
AF 17438	nb	nb	nb	IHC
AF 3428	19	III	Erlangen	IHC
AF 3076	9	II	Erlangen	IHC
AF 2970	nb	nb	Lübeck	IHC
AF 2336	nb	nb	Erlangen	IHC
AF 119	nb	IIIa	Homburg	IHC
AF 074	46	IIIb Re	Frankfurt	IHC
AF 046	nb	IIIa	Aachen	IHC

A: Patienten-Alter bei Operation, Re: Rezidiv, Sequ.: Sequenzierung, nb: nicht bekannt, PCR: Polymerasekettenreaktion, qRT-PCR: *quantitative real-time PCR*, IHC: Immunhistochemie

### 3.9.2. Zelllinien

Tab 4: Zusammenstellung der verfügbaren Daten der für die Immunfluoreszenz verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Bezugsquelle
DFF3	Hautfibroblasten	nb
H3337	Hautfibroblasten	nb
H3332I	Hautfibroblasten	nb
AF 3109	Humane juveniles Angiofibrom	Erlangen
AF 3076	Humane juveniles Angiofibrom	Erlangen
AF 3428	Humane juveniles Angiofibrom	Erlangen

nb: nicht bekannt

## 4. METHODEN

### 4.1. Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Die Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dient dazu, aus Gewebe extrahierte RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umzuschreiben und anschließend zu amplifizieren. In dieser Arbeit wurde RNA aus 2 gesunden Nasenmuschelgeweben und 5 Angiofibromgeweben extrahiert und nach der anschließenden Amplifikation mittels PCR zur Bestimmung der Basenabfolge sequenziert.

#### 4.1.1. RNA-Extraktion aus Gewebe

Um Gesamt-RNA aus Gewebe zu extrahieren, wurde das Gewebe unter flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerkleinert und anschließend mit 1 ml TRIzol in ein 15 ml Röhrchen überführt und homogenisiert. Hierzu wurde der Ansatz bis zum vollständigen Auflösen des Gewebes gevortext. Um eine Zerstörung der RNA zu vermeiden wurden die nachfolgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Nun wurden die Extraktionsansätze mit jeweils 0,2 ml Chloroform versetzt, 40 s gevortext um eine Phasendurchmischung zu erhalten und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation (14000 rpm, 4 °C) entstand eine Phasentrennung in 3 Phasen, wobei sich in der oberen, wässrigen Phase die RNA, und in der Interphase und der unteren organischen Phase die DNA und Proteine befanden. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA durch Zugabe des gleichen Volumens an absolutem Isopropanol und 2,5 µl Glykogen über Nacht bei -20 °C gefällt. Das durch erneutes Zentrifugieren (20 min, 14000 rpm, 4 °C) gewonnene RNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert (10000 rpm, 4 °C). Daraufhin konnte das RNA-Pellet für eine zweite Fällung in 0,1 ml sterilem 1x Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ethylendiamintetraacetat-Puffer (TE-Puffer) für 5 min bei 70 °C gelöst werden. Anschließend musste das Eppendorfgefäß sofort auf Eis gelagert werden und es wurden 35 µl 3-molares Natriumacetat, 1,5 µl Glykogen und 0,25 ml Ethanol absolut zugegeben und gemischt. Die RNA wurde für 60 min bei -20 °C gefällt und durch 20-minütiges Zentrifugieren (14000 rpm, 4 °C) pelletiert. Nachdem die RNA-Pellets getrocknet waren, wurden sie abschließend in 30 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gelöst.

#### 4.1.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit der Nukleinsäuren wurden mithilfe einer fotometrischen Messung bestimmt. Die zu bestimmende Substanz wird hierzu mit Licht einer konstanten Wellenlänge durchstrahlt, um die Lichtabsorption der Substanz messen zu können. Diese Extinktion kann nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz in die Konzentration der Substanz umgerechnet werden. DNA und RNA besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine haben ein Maximum bei 280 nm. Um zusätzlich zur Konzentration noch die Reinheit der Nukleinsäuren zu bestimmen, wird der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 nm und der optischen Dichte bei 280 nm berechnet, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination, beispielsweise mit Proteinen, hin.

Die Qualität der extrahierten RNA wurde in einem 1,5 %igen Gel nach den im folgenden beschriebenen Prinzipien der Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Bei intakter RNA sollten eine 28Svedberg-Units (S) und eine 18S Bande der ribosomalen RNA (rRNA) sichtbar sein. Die 28S rRNA Bande ist bei nicht degradiertem rRNA ausgeprägter als die untere Bande.

#### 4.1.3. Agarosegelelektrophorese

Um die Qualität der extrahierten RNA oder DNA zu überprüfen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Hierbei werden Nukleinsäurefragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt und die Größe durch einen parallel mitgeführten DNA-Molekulargewichtsmarker bestimmt. Die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle wandern im elektrischen Feld durch die Gel-Matrix zur Anode. Die kleineren Moleküle können sich schneller durch das Gel bewegen als Fragmente mit höherem Molekulargewicht. Neben der angelegten Spannung hängen Auftrennungsgeschwindigkeit und -qualität von der Agarosekonzentration ab. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren, die sich in dem Gel befinden.

In dieser Arbeit wurden 1,5 %ige Agarosegele zum Nachweis von Nukleinsäurefragmenten bis 5 kb und 3 %ige Gele für den Bereich von 0,1 – 2 kb verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Agarosemenge mit 150 ml 1 x Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)-Acetat-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Puffer (TAE-Puffer) in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf 50 – 60 °C wurden 15 µl des interkalierenden DNA-Farbstoffes Ethidiumbromid (10 g/ml) zugegeben, um die RNA oder DNA anschließend unter ultraviolettem (UV) Licht sichtbar machen zu können.

Das Agarosegel wurde luftblasenfrei in einen vorbereiteten horizontalen Gelträger gegossen und ein Kamm auf einer Seite des Gels ca. 2 mm über dem Boden befestigt.

Der Kamm wurde nach der Polymerisation des Gels entfernt, wodurch sich Taschen gebildet hatten, in welche Nukleinsäure-Lösung einpipettiert werden konnte. Das fertige Agarosegel wurde nun in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Von den Nukleinsäure-Ansätzen wurden je 5 µl mit 20 % Blaumarker (50 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 50 mM EDTA) versetzt. Das darin enthaltene Glycerin führt dazu, dass die Nukleinsäure-Lösung in den Geltaschen absinkt, der Farbstoff Bromphenolblau dient zur optischen Markierung der Lauffront. EDTA fängt freie Mg<sup>2+</sup>-Ionen, welche von Desoxyribonukleasen (DNasen) zum Spalten benötigt werden, ab und schützt somit die DNA oder RNA-Fragmente vor Degradation. Die Lösungen wurden einpipettiert und parallel dazu 5 µl eines DNA-Molekulargewichtsmarker aufgetragen, um später die Größe der Nukleinsäure-Fragmente bestimmen zu können. Die Nukleinsäure wurde bei 110 V über 45 min aufgetrennt. Abschließend konnten die Gele unter kurzweiligem UV-Licht (302 nm) dokumentiert und ausgewertet werden.

#### 4.1.4. DNase-Verdau

Um DNA-Verunreinigungen auszuschliessen wurde die isolierte RNA vor Durchführung der RT-PCR einem DNase-Verdau unterzogen. Dies soll sicherstellen, dass in der PCR ausschließlich die extrahierte RNA, nicht aber genomische DNA amplifiziert wird. Für einen 20 µl-Ansatz wurden 8 µg isolierte RNA auf 10 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und mit 2 µl 10fach DNase Puffer und 8 µl RNase-freier DNase I versetzt. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Dnase I mittels 1 µl Stopp-Lösung inaktiviert, um einen Verdau der cDNA bei der anschließenden RT-PCR zu verhindern. Abschließend wurde die vollständige Eliminierung der genomischen DNA anhand einer PCR überprüft (siehe Kap. 4.1.6.). Ist die RNA kontaminationsfrei, darf hier kein PCR-Produkt entstehen.

#### 4.1.5. Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Die RT-PCR umfasst zwei Schritte. Im ersten Schritt wird die RNA mithilfe der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, da die in der PCR (siehe Kap. 4.1.6.) verwendeten DNA-Polymerasen nicht in der Lage sind RNA zu amplifizieren. Im darauf folgenden Schritt schließt sich eine PCR an, in der die im ersten Schritt erzeugte cDNA als Matrize verwendet wird, um so die RNA-Expression spezifischer Fragmente nachzuweisen. Vor der Transkription wurde eine RNA-Aufreinigung nach dem *RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup* von Qiagen durchgeführt.

Die anschließende Reverse Transkription erfolgte mit dem *Omniscript Reverse Transcriptase Kit* von Qiagen entsprechend den Herstellerangaben mit dem folgenden Ansatz, der mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt wurde:

Tab. 5: Ansatz RT-PCR nach dem Protokoll des *Omniscript Reverse Transcriptase Kit* von Qiagen

PCR-Komponenten	Eingesetzte Volumina	Konzentrationen der Ausgangslösungen
RT-Puffer	2 µl	10x
dNTP-Mix	2 µl	5 mM/dNTP
Random Primer (Invitrogen)	2 µl	3 µg/µl
RNAse Inhibitor	1 µl	10 Units/µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl	4 Units/µl
Template-RNA	3-12 µl	1,4 µg/Ansatz

Die Ansätze wurden für 60 min bei 37 °C inkubiert und danach für 15 min bei 70 °C inaktiviert. Die anschließende PCR wurde nach den unter Kap. 4.1.6. genannten Bedingungen durchgeführt und die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese (siehe Kap. 4.1.3.) dokumentiert. Zum Nachweis von DNA-Kontaminationen aufgrund eines nicht vollständigen DNase-Verdau (siehe Kap. 4.1.4.) wurde parallel zu jedem Ansatz mit reverser Transkriptase auch ein Ansatz ohne Enzym als Negativkontrolle mitgeführt, der in der nachfolgenden PCR keine Amplifikate zeigen durfte.

#### 4.1.6. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist ein Verfahren zur gezielten *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis et al., 1986). Durch die exponentielle Vervielfältigung können bis zu  $10^{12}$  identische Abschnitte aus wenigen Ausgangssequenzen erzeugt werden. Die eingesetzte doppelsträngige DNA wird im ersten Schritt kurzzeitig auf über 90 °C erhitzt und dadurch in ihre Einzelstränge denaturiert. Nun können sich in einem Hybridisierungs-Schritt spezifische Oligonukleotide (Primer) an ihre komplementären Sequenzen der DNA-Matrize (Template) anlagern (Annealing). Hierzu muss der Reaktionsansatz auf eine vom Primer und der zu amplifizierenden DNA-Sequenz abhängigen Temperatur, die meist zwischen 52 °C und 60 °C liegt, abgekühlt werden.

Es wird jeweils der zwischen zwei spezifischen Primern befindliche DNA-Abschnitt amplifiziert, beide Primer müssen also zu je einem der Matrizenstränge komplementär sein. In der anschließenden Elongation synthetisiert die DNA-Polymerase, beginnend an den freien 3'-OH-Enden, analog zu den Matrizen neue, komplementäre DNA-Fragmente. Hierfür werden Polymerasen aus thermophilen Organismen verwendet, die bei einem Temperaturoptimum zwischen 68 °C und 73 °C arbeiten und auch bei 95 °C noch eine gute Temperaturstabilität besitzen. Danach beginnt dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation von neuem.

Die in dieser Arbeit angefertigten PCR's wurden mit den folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

10 min	95 °C	Denaturierung	} x 39 - 42 Zyklen
30 s	94 °C	Denaturierung	
30 s	56 – 58 °C	Annealing	
1:45 min	72 °C	Elongation	
10 min	72 °C	Elongation	

Für einen 20 µl Ansatz wurde das folgende Pipettierschema in die PCR eingesetzt und alle Ansätze mit sterilem H<sub>2</sub>O dest. auf 20 µl Endvolumen aufgefüllt.



Tab. 6: Ansatz PCR

PCR-Komponenten	Eingesetzte Volumina	Konzentrationen der Ausgangslösungen
Primer 1	0,3 µl	25 µM
Primer 2	0,3 µl	25 µM
dNTP-Mix	0,3 µl	10 mM/dNTP
PCR-Puffer	2 µl	10 x
HotStar Taq DNA-Polymerase	0,1 µl	5 Units/µl
Template-DNA	1-2 µl	variabel

Die nachfolgende DNA-Agarosegelelektrophorese wurde wie in Kap. 4.1.3. beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

## 4.2. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

### 4.2.1. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mithilfe des *NucleoSpin® Extract II Kits* von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers (*PCR clean-up Protokoll*) aufgereinigt. Hierdurch werden die während der PCR benötigten Zusätze entfernt, da diese die Sequenzierungsreaktion beeinflussen können. Die Ansätze wurden hierzu mit 100 µl Puffer NT vermischt, auf eine Säule aufpipettiert und danach zentrifugiert (1 min, 11000 rpm), um die DNA zu filtern. Diese wurde anschließend mit 700 µl Puffer NT3 gewaschen (1 min, 11000 rpm) und durch wiederholtes Zentrifugieren (2 min, 11000 rpm) getrocknet. Abschließend wurde die DNA mit 20 µl Puffer NE für 1 min inkubiert und durch 1-minütiges Zentrifugieren (1 min, 11000 rpm) eluiert.

### 4.2.2. Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidabfolge eines DNA-Abschnitts um Mutationen und Genvarianten zu detektieren.

Die Sequenzierungen der aufgereinigten PCR-Produkte wurden bei der Firma GATC Biotech, Konstanz in Auftrag gegeben und mit dem Sequenzierer Sanger ABI 3730xl nach der Didesoxymethode nach Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977).

Ausgehend von den in Abschnitt 4.1.6. genannten Komponenten einer PCR müssen für eine Sequenzierung dem Ansatz zusätzlich Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugegeben werden. Diese ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe, welche für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids notwendig ist. Somit ist eine Verlängerung der DNA durch die DNA-Polymerase nicht mehr möglich, sobald die ddNTPs in den neu synthetisierten Strang eingebaut wurden. Die ddNTPs werden willkürlich anstatt eines Desoxynukleosidtriphosphats (dNTP) in die DNA-Fragmente eingebaut, was in der Folge nach unterschiedlich langen Fragmenten zum Kettenabbruch führt. Da die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, zeigen die DNA-Fragmente, nachdem sie mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mithilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt wurden, unterschiedliche Farben, welche von einem Detektor erkannt werden können.

### 4.3. Klonierung von DNA-Fragmenten

Mittels Klonierung von PCR-Produkten erhält man eine große Menge an stabilen und exakt identischen DNA-Fragmenten, mit denen im Anschluss eine Vielzahl weiterer Untersuchungen durchgeführt werden können. In dieser Arbeit diente sie zur Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Bande, um eine bislang nicht bekannte Deletion im Axin2-Gen genauer zu charakterisieren.

Hierfür wurde die mit den Primern Axin2 221for und 577rev amplifizierte DNA des Tumors AF 3076 in einem 1,5 %igen Agarosegel (siehe Kap. 4.1.3.) aufgetrennt. Dabei entstanden zwei Banden, wovon die kleinere Bande mit einer Größe von ca. 240 bp im Anschluss aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mithilfe des *NucleoSpin Extract II Kits* von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers (Protokoll für *DNA extraction from agarose gels*) aufgereinigt wurde. Die sich daran anschließende Ligation beinhaltet eine enzymkatalysierte Verknüpfung von zwei DNA-Segmenten an ihren Enden. Mit Hilfe des Enzyms Ligase wird hierbei das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäuresegmente verbunden. Die Verknüpfung entsteht dabei ATP-abhängig durch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung. In dieser Arbeit wurde mit dieser Technik ein DNA-Fragment mit dem linearisierten Vektor pGEM-T verbunden, um das rekombinante Plasmid anschließend in Bakterien einzuschleußen und dort zu vermehren.

Die folgenden 10 µl-Ansätze wurden unter Anwendung des *pGEM-T Vector System I Protokoll* (Promega) über Nacht bei 4°C inkubiert:

Tab. 7: Ansatz für die Klonierung von PCR-Produkten nach dem *Protokoll pGEM-T Vector System I* (Promega)

Komponenten	Eingesetzte Volumina	Konzentration der Ausgangslösungen
Ligase-Puffer	5 µl	2x
pGEM-T Vektor	1 µl	50 ng
PCR-Produkt	3 µl	variabel
T4 DNA Ligase	1 µl	3 Weiss Units/µl

Für die anschließende Transformation wurden je 2 µl der Ligationsansätze in 1,5 ml Gefäße pipettiert und diese mit 50 µl *E. coli* pMOSBlue Bakterien versetzt. Durch eine 20-minütige Inkubation auf Eis lagert sich das Plasmid spontan an die Bakterienwände an. Die Zellmembran der Bakterien wird anschließend durch einen Hitzeschock von 90 s bei 42 °C permeabel gemacht, sodass die Plasmid-DNA in die Bakterien gelangen kann. Zur Vorkultur wurden die Ansätze mit 200 µl LB-Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Ansätze mithilfe eines Drigalskispatels auf LB-Agarplatten, die zuvor mit Ampicillin (100 µg/ml), Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (0,5 mM) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) (80 µg/ml) versetzt worden waren, ausplattiert und bei 37 °C selektioniert.

Da der pGEM-T Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, können auf dem mit Ampicillin versetzten LB-Medium nur diejenigen Bakterien wachsen, die das Plasmid ins Zellinnere aufgenommen haben. Des Weiteren dient IPTG zur künstlichen Induktion des Lactose-Operons, indem es an den am pGEM-T Vektor integrierten Lactose-Repressor bindet. Hierdurch bleibt das Plasmid inaktiviert und wird erst durch Zugabe von IPTG kontrolliert angeschaltet. Um die mit DNA ligierten Vektoren von leeren Vektoren differenzieren zu können, wurde den Agarplatten X-Gal zugegeben. X-Gal wird durch das Enzym β-Galactosidase zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol hydrolysiert, welches durch Sauerstoff zum blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert. Im pGEM-T Vektor liegt die Sequenz, in welche die zu klonierenden DNA-Fragmente eingebracht werden, in der codierenden Sequenz der β-Galactosidase, wodurch die Gensequenz unterbrochen und das Enzym nicht mehr exprimiert wird. Demnach kann X-Gal nur noch in den leeren Vektoren gespalten werden, wodurch der blaue Farbstoff entsteht. Am nächsten Tag wurden somit nur die weißen Kolonien gepickt, in je 1,5 ml LB A-Medium überführt und erneut bei 37 °C über Nacht kultiviert.

#### 4.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Bakterien wurden für 10 min zentrifugiert (12000 rpm) und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in je 180 µl STET-Puffer resuspendiert und im Wasserbad 1 min bei 100 °C aufgeköcht. Nach 15-minütigem Zentrifugieren (4 °C, 12000 rpm) wurden die Zellreste und denaturierten Eiweiße mithilfe eines sterilen Zahnstochers als gallertartige Masse entfernt. Durch Zugabe von je 200 µl Isopropanol und erneutem Zentrifugieren (20 min, 4 °C, 12000 rpm) wurden die verbliebenen Nukleinsäuren gefällt. Danach wurde der Überstand dekantiert, das Pellet getrocknet und anschließend in 30 µl TE-Puffer zuzüglich RNase A (100 µg/ml) resuspendiert. Abschließend wurde die isolierte DNA durch eine PCR wie in Kap. 4.1.6 beschrieben überprüft.

#### 4.4. Quantitative Real-Time-PCR

Die *quantitative Real-Time-PCR* (qRT-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die ergänzend zur herkömmlichen PCR die Quantifizierung der gewonnenen Produkte ermöglicht. Hierdurch kann anschließend die Ausgangsmenge der amplifizierten Nukleinsäure bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde hiermit die Menge der cDNA und somit die RNA-Expressionsraten der WNT-Weg-Gene  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , APC, Axin1 und Axin2 von juvenilen Angiofibromen und Normalgewebe miteinander verglichen.

Die Quantifizierung der Nukleinsäuren wird mithilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Produktbildung wird hierbei in Echtzeit während der PCR erfasst, wodurch sich die qRT-PCR von anderen quantitativen PCR-Methoden unterscheidet, bei denen erst nach Ablauf der PCR die absolute Produktmenge bestimmt wird. Dafür wird dem PCR-Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff beigemischt, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Zunahme der DNA von Zyklus zu Zyklus korreliert folglich mit der Fluoreszenzintensität. In dieser Arbeit wurde der DNA-Farbstoff *SYBR Green I* verwendet. Durch die Bindung an die doppelsträngige DNA steigt die Fluoreszenz des Cyanin-Farbstoffs bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches an. *SYBR Green I* bindet auch an einzelsträngige DNA sowie an RNA, jedoch mit einem deutlich geringeren Fluoreszenzsignal. Da der Farbstoff jedoch sequenzunspezifisch bindet wurden die Produkte anschließend mittels Gelelektrophorese überprüft, um zu zeigen, dass nur ein DNA-Produkt vervielfältigt wurde.

Im Anschluss an die qRT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität des PCR-Produkts zu bestimmen. Um eine Schmelzkurve zu erstellen wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur im PCR-Gefäß kontinuierlich erhöht wird. Der DNA-Doppelstrang wird bei einer für das spezifische Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur in zwei Einzelstränge denaturiert. Hierbei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, was in einer Abnahme der Fluoreszenz resultiert. Spezifische PCR-Produkte mit doppelsträngiger DNA benötigen eine höhere Schmelztemperatur als unspezifische Amplifikate oder Primer-Dimere. Somit kann mithilfe der Schmelzkurvenanalyse die Spezifität der Amplifikate bestimmt werden.

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte mittels relativer Quantifizierung. Anstatt nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen die DNA-Menge zu bestimmen, wird gemessen wie viele Zyklen benötigt werden bis das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert übersteigt. Denn während der PCR findet man eine exponentielle Phase mit einem quantifizierbaren Anstieg des Produkts und eine stationäre Phase. Zu Beginn der PCR ist die Menge der DNA-Matrizen begrenzt und gegen Ende die Nukleotide verbraucht, sodass in diesen Phasen nur langsam amplifiziert wird.

Der Schwellenwert *Cycle Threshold* (Ct) beschreibt die Anzahl der Zyklen, nach denen das erzeugte Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Der Ct-Wert steht somit am Anfang der exponentiellen Amplifikationsphase. Befindet sich in einer Probe nur wenig Ausgangs-DNA wird der Schwellenwert erst nach einer größeren Anzahl von Zyklen erreicht als beim Vorliegen von reichlich Ausgangsmaterial, was mit einem höheren Ct-Wert korreliert. Die Ct-Werte werden anschließend gegen Haushaltsgene normiert und können dann miteinander verglichen werden.

Die qRT-PCR wurde mit 50 ng cDNA pro Ansatz durchgeführt, es wurde das Kit iQ SYBR Green Supermix von Biorad nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle Proben wurden gegen die Gene G6PDH, GAPDH und RPII normalisiert und mit dem CFX96 Real-Time PCR Detection System der Firma BioRad durchgeführt und ausgewertet. Um die daraus gewonnenen Daten zu verifizieren wurden im Anschluss qRT-PCRs an einer größeren Anzahl an Geweben durch unsere Kooperationspartner der Universitätsklinik Erlangen (Dr. rer. nat. Wendler) mit dem Gerät Step-one plus der Firma ABI angefertigt und mit dem Programm GNorm ausgewertet.

## 4.5. Zellkultur-Techniken

### 4.5.1. Kultivierung von Zelllinien

Die Angiofibrom- und Hautfibroblasten-Zelllinien (siehe Kap. 3.9.2.) wurden mit konditioniertem *DMEM/HAM's F12*-Medium als Monolayerkultur bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Hierfür wurden dem unkonditionierten Medium *DMEM/HAM's F12 with L-Glutamine* 10 % inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS), 2 % Penicillin/Streptomycin, 2 % L-Glutamin und 1 % Na-Pyruvat zugesetzt.

Die Zellen wurden entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und Zelldichte bei etwa 90 %iger Konfluenz nach 7 bis 14 Tagen passagiert und 3-mal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Zur Passagierung wurden die adhärennten Zellen zum Auswaschen des fetalen Kälberserum (FKS) mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült und vorsichtig wieder abgesaugt. Anschließend wurde Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin in PBS mit 0,02 % EDTA) auf die Zellen gegeben und wiederum abgesaugt. Nach 5-10minütiger Inkubation im Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) lösten sich die Zellen vom Boden der Petrischale. Abschließend wurden die gelösten Zellen in frisches Kulturmedium aufgenommen und je nach Zelldichte auf 2 bis 3 neue Petrischalen überführt.

#### 4.5.2. Auftauen von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden aus tiefgefrorenen Zellkulturen kultiviert. Dabei wurden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Kryoröhrchen zuerst im 37 °C warmen Wasserbad 1 min lang angetaut. Anschließend wurden die Zellen mit angewärmtem Medium versehen und die Zellsuspension in ein mit Kulturmedium (37 °C) gefülltes Spitzröhrchen überführt. Nach 3-minütiger Zentrifugation (1200 rpm) wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in neuem Kulturmedium resuspendiert und in einer Zellkulturschale bei den in Kap. 4.5.1. genannten Bedingungen kultiviert.

#### 4.5.3. Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren einer Zelllinie wurden die Zellen durch Trypsinieren vom Boden der Petrischale gelöst und in konditioniertem Zellkulturmedium aufgenommen. Nach 3-minütiger Zentrifugation (1200 rpm) wurde das Zellpellet in 0,5 ml Einfriermedium I (siehe Kap. 3.3.1.2.) aufgenommen und danach in 0,5 ml Einfriermedium II in ein Kryoröhrchen überführt und resuspendiert. Das Kryoröhrchen wurde 1 h bei -20 °C eingefroren, dann bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

### 4.6. Immunfärbungen

#### 4.6.1. Indirekte Immunfluoreszenzfärbungen

Mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz können endogene Proteine innerhalb einer Zelle sichtbar gemacht werden. Hierzu wird im ersten Schritt ein für das Protein spezifischer Primärantikörper auf das zu untersuchende Gewebe aufgetragen. In einem zweiten Schritt wird ein Sekundärantikörper zugegeben, der an den ersten Antikörper bindet und mit einem Fluorochrom wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün) oder Tetramethyl Rhodamin-Isothiocyanat (TRITC, rot) gekoppelt ist. Durch die Bindung mit FITC, der Primärantikörper aus dem Kaninchen detektiert, entsteht ein Konjugat, welches unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anregung mit blauem Licht bei einem Absorptionsmaximum einer Wellenlänge von 492 nm als grünes Licht mit einem Emissionsmaximum von 520 nm sichtbar gemacht werden kann. Der Sekundärantikörper TRITC, der zur Detektion der Primärantikörper aus der Maus verwendet wurde, sendet bei einem Absorptionsmaximum von 550 nm ein rotes Licht bei einer Wellenlänge von 570 nm aus.

Vorbereitend mussten die adhärennten Zellen der Angiofibrom- und Hautfibroblasten-Zelllinien am Vortag auf sterile Deckgläschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert werden. Nun wurden die Zellen zweimal kurz mit PBS gespült, mit eiskaltem Methanol für eine halbe Stunde fixiert und nochmals mit PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die Zellen mit BSA (5 % in PBS plus 0,3 % NP40) auf dem Schüttler für 30 min inkubiert. Das ebenfalls zugesetzte nichtionische Detergenz NonidetP40 (NP40) diente hierbei zur Porenbildung in der Zellmembran, um den Antikörpern den Zugang zu intrazellulären Proteinen zu ermöglichen. Der Primärantikörper Anti-β-Catenin (siehe Kap. 3.2.) wurde in einer Verdünnung von 1:200 (in 1 % BSA in PBS plus 0,3 % NP40) aufgetragen.

Als Negativkontrolle wurde PBS ohne Zugabe des Primärantikörpers verwendet. Die Bindung des Primärantikörpers an die nachzuweisenden Proteine erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37 °C für 45 min. Anschließend wurden die nicht gebundenen Primärantikörper durch zweimaliges Waschen mit PBS mit 0,3 % NP40 und einmaliges Spülen mit BSA (1 % in PBS plus 0,3 % NP40) entfernt. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde nachfolgend in einer Verdünnung von 1:1000 (in PBS plus 0,3 % NP40) auf die Zellen gegeben und wiederum in einer feuchten Kammer dunkel bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift, wurden die Zellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI-Reagenz) gefärbt. Da sich der blau fluoreszierende Farbstoff nur mit doppelsträngiger DNA verbindet, werden durch diese Färbung spezifisch die Zellkerne angefärbt. Hierfür wurden die Präparate kurz mit Methanol gespült, 5 – 10 min lang in DAPI-Lösung (1 µg/ml DAPI Gebrauchslösung in Methanol) inkubiert und nochmals mit Methanol gewaschen.

Abschließend konnten die Deckgläschen kopfüber auf einem Objektträger in Elvanol eingebettet werden. Die Ergebnisse wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und mittels des Programms ISIS (siehe Kap. 3.4.) dokumentiert. Um einen Farbverlust zu verhindern wurden die Präparate im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.



## 4.6.2. Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten

### 4.6.2.1. Paraffineinbettung

Für die immunhistologischen Färbungen wurden die zu untersuchenden Gewebeproben entsprechend nachfolgendem Protokoll in Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Mikrotoms wurden 5 µm dünne Schnitte hergestellt, welche abschließend auf silanisierte Objektträger aufgebracht wurden.

Tab. 8: Paraffineinbettung der Gewebeproben

Lösung	Temperatur	Dauer
4 % Formalin	37 °C	1 h
70 % Ethanol	37 °C	1 h
70 % Ethanol	37 °C	2 h
70 % Ethanol	37 °C	3 h
100 % Ethanol	37 °C	1 h
100 % Ethanol	37 °C	2 h
100 % Ethanol	37 °C	3 h
Xylol	37 °C	1 h
Xylol	37 °C	2 h
Xylol	37 °C	3 h
Paraffin	60 °C	2 h
Paraffin	60 °C	1 h

Durch die Silanisierung liegt eine permanente positive Ladung auf den Objektträgern vor, sodass die Schnitte besser auf dem Glas haften. Hierfür wurden die Objektträger für 10 min in 10 % Tri-ethoxy-silyl-propylamin inkubiert und anschließend zuerst in 100 % Aceton und danach in Aqua dest. gespült und bei 50 °C über Nacht getrocknet.

#### 4.6.2.2. DAB-Färbung von Gewebeschnitten

Das Prinzip dieser Färbung beruht auf der Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Das zuvor fast farblose Chromogen wird, durch die an den Antikörperkomplex gebundene Peroxydase (horseradish peroxidase (HRP)), unter Bildung von Wasser zu seinem braunen Endprodukt oxidiert.

Vorbereitend wurden die Paraffinschnitte im Wärmeschrank bei 55 °C über Nacht gelagert, damit sich ein Teil des Paraffins vorab schon lösen konnte. Die vollständige Entparaffinierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema:

Xylol	15 min
Xylol	10-mal spülen
Xylol	10-mal spülen
Ethanol 100 %	10-mal spülen
Ethanol 100 %	10-mal spülen
Ethanol 100 %	10-mal spülen
Ethanol 70 %	10-mal spülen
Ethanol 70 %	10-mal spülen
Ethanol 70 %	10-mal spülen
H <sub>2</sub> O dest.	10-mal spülen
H <sub>2</sub> O dest.	10-mal spülen

Zur Demaskierung der Antigene müssen die Präparate mit Citratpuffer vorbehandelt werden. Die Objektträger wurden in der Citratpufferlösung in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, was dazu führt, dass maskierte, also durch die Fixierung in ihrer räumlichen Struktur veränderte Proteine, wieder in ihren ursprünglichen Zustand gebracht werden. Nach 30-minütigem Sieden wurden die Präparate langsam auf Eis abgekühlt und mit H<sub>2</sub>O dest. gespült.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, erfolgte eine Blockade mit BSA (5 % in PBS plus 0,3 % NP40) für 30 min. Die Primärantikörper APC (Verdünnung 1:20), Axin1 (Verdünnung 1:20), Axin2 (Verdünnung 1:20),  $\beta$ -Catenin (Verdünnung 1:100) und GSK3 $\beta$  (Verdünnung 1:50) wurden in den genannten Verdünnungen (in Antikörper(AK)-Verdünnungsmedium DAKO) auf die Objektträger aufgetragen und in einer feuchten Kammer bei 3 °C inkubiert. Parallel dazu wurde für jeden Gewebeschnitt eine Negativkontrolle mit dem AK-Verdünnungsmedium ohne Primärantikörper mitgeführt. Nach einer Stunde erfolgten zwei 20-minütige Waschungen in PBS plus 0,3 % NP40 und eine 20-minütige Waschung in BSA (1 % in PBS plus 0,3 % NP40), um die nichtgebundenen Primärantikörper zu entfernen.

Als Sekundärantikörper wurde ein gebrauchsfertiger polyvalenter, biotinylierter Antikörper (Immunotech) auf die Gewebeschnitte pipettiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Es folgte anschließend noch mal ein Waschschrift, bei dem die Präparate dreimal für jeweils 5 min mit PBS plus 0,3 % NP40 und einmalig mit BSA (1 % in PBS plus 0,3 % NP40) gespült wurden. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung wurden die Schnitte für 20 min mit einem Avidin-Biotin-HRP-Komplex (AB-Komplex) inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Hierbei bindet Avidin an den biotinkonjugierten Zweitantikörper und an die Peroxidase. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität und somit zur Visualisierung der Komplexe wurde nachfolgend die DAB-Lösung auf die Objektträger aufgetragen und nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion mit Wasser abgestoppt.

Um die Zellkerne sichtbar zu machen wurden die Gewebeschnitte mit Hämalaun nach Mayer eingefärbt und nach wenigen Sekunden erneut mit Wasser abgespült. Die Färbelösung Hämalaun enthält Komplexe aus Hämatein und Allaunen. Hämatein ist wiederum das Oxidationsprodukt des Naturfarbstoffs Hämatoxylin, welcher nur in oxidierter Form wirksam werden kann. In der Färbelösung ist der basische Farbstoff in einem sauren Milieu bei einem pH-Wert von 3-4 enthalten. Beim Auftragen der Lösung bindet der Farbstoff durch Chelatbildung mit anionischen Strukturen, wie zum Beispiel die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren im Zellkern. Aufgrund des niedrigen pH-Werts der Färbelösung erscheinen die Zellkerne zunächst rot-braun, erst durch die Spülung mit Wasser, welches einen höheren pH-Wert besitzt, entsteht die blauviolette Färbung. Abschließend wurden die Schnitte mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (3 x 70 % Ethanol, 3 x 100 % Ethanol, 3 x Xylol) dehydriert und in Entellan eingedeckt. Da es durch die Färbung der Schnitte mit Hämalaun nach Mayer zu starken Überlagerungen und Hintergrundsignalen kam, konnten die Gewebeschnitte im Folgenden nicht ausgewertet werden. Die DAB-Färbungen wurden daher ohne eine Kernfärbung wiederholt.

Da die Farbkomplexe bei Tageslicht zerfallen, wurden auch diese Präparate lichtgeschützt aufbewahrt. Die Dokumentation erfolgte am Mikroskop mithilfe des Programms *analySIS* (siehe Kap. 3.4.).

#### 4.6.2.3. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Die Gewebeschnitte wurden außerdem mithilfe der indirekten Immunfluoreszenz gefärbt (siehe Kap. 4.6.1.). Das Protokoll dieser Färbung ist angelehnt an das Protokoll der DAB-Färbungen. Die Schnitte wurden vorab wie im Kap. 4.6.2.2. beschrieben entparaffiniert und anschließend mit Citratpuffer vorbehandelt. Um unspezifische Antikörperverbindungen zu verhindern folgte eine Blockade mit BSA (5 % in PBS) für 20 Minuten.

Im Anschluss an die 60-minütige Inkubation des Primärantikörper Anti- $\beta$ -Catenin (in AK Verdünnungsmedium DAKO) (siehe Kap. 3.2.) bei 37 °C, der mit einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen wurde, wurden die Präparate zweimal kurz und einmal für 5 Minuten in PBS gewaschen, um die nichtgebundenen Primärantikörper zu entfernen. Die Negativkontrollen wurden ohne Primärantikörper, lediglich mit dem AK-Verdünnungsmedium DAKO eingedeckt. Als Sekundärantikörper wurde ein TRITC-gekoppelter Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 aufgetragen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe (5 Minuten 70 % Ethanol, 5 Minuten 80 % Ethanol, 5 Minuten 100 % Ethanol) entwässert. Anschließend folgte die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI-Reagenz, wofür die Schnitte für 5-10 Minuten in DAPI-Lösung (1  $\mu$ g/ml DAPI Gebrauchslösung in Methanol) inkubiert und im Anschluss mit Methanol gewaschen wurden.

Nachdem die Präparate für mindestens 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet wurden konnten sie abschließend mit Antifade eingedeckt werden. Die Auswertung und Aufbewahrung entspricht denen der Immunfluoreszenzfärbungen der Zellkulturpräparate (siehe Kap. 4.6.1).

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Mutationsanalyse

#### 5.1.1. Sequenzierungen des $\beta$ -Catenin-Gen (CTNNB1-Gen)

$\beta$ -Catenin wird am amino-terminalen Ende an Serin- und Threoninresten durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert und dadurch zum Abbau markiert (Peifer et al., 1994, Yost et al., 1996). Bislang wurden durch Abraham und Mitarbeiter ein 200 Basenpaar (bp) großes Fragment im Exon 3 des  $\beta$ -Catenin-Gens amplifiziert (Codons 14 bis 80), welches diese GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle beinhaltet (Abraham et al., 2001). Zur Bestätigung der bereits bekannten Mutationen und um nach bislang nicht bekannten Mutationen zu suchen, wurden bei 2 gesunden Nasenmuschelgeweben und 5 Angiofibromgeweben die Codons 21 bis 422 (entspricht Nukleotid (NT) 329 bis 1535) sequenziert. In diesem Bereich befinden sich unter anderem die Bindungsstellen für Axin2 und APC. Mituntersucht wurde auch das Codon 393, welches für die Aminosäure Threonin 393 codiert. Diese stellt die hauptsächliche Phosphorylierungsstelle für CK2 (Song et al., 2003, Wu et al., 2009).

Das untersuchte Tumorkollektiv bestand aus 5 juvenilen Angiofibromen mit den Tumorgraden II bis IV nach Andrews (siehe Kap. 2.1.2.). Das Alter der Patienten lag zwischen 9 und 19 Jahren (siehe Tab. 3). Aus den Geweben wurde nach den in Kap. 4.1. dargestellten Protokollen RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Alle Sequenzreaktionen wurden nach der in Kap. 4.2. dargelegten Methode durchgeführt. Beispielhaft ist in Abb. 6 eine Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der amplifizierten DNA in Fragmente gezeigt. Für die Sequenzierungen und die vorangegangenen PCRs (siehe Kap. 4.1.6.) wurden die in Kap. 3.5. aufgeführten Primer verwendet. Nach der Bestimmung der Basensequenz durch die Firma GATC Biotech, Konstanz wurden diese über das National Center for Biotechnology Information (NCBI) gegen das Nasenmuschelgewebe NM\_001904 abgeglichen.

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz des  $\beta$ -Catenin-Gens wurde die Vorlage NM\_001904.3 herangezogen.

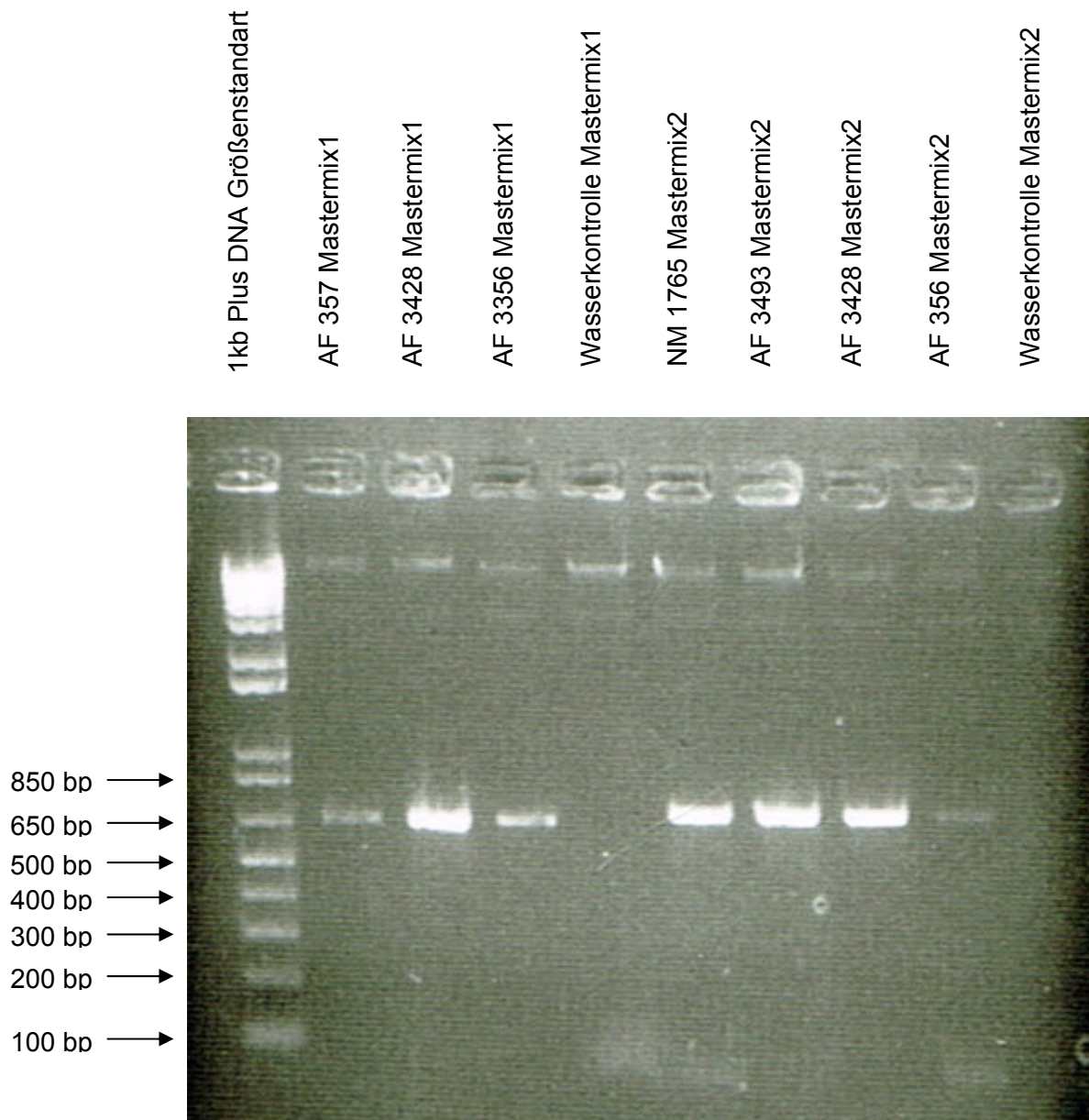


Abb. 6: Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der zuvor mittels PCR amplifizierten DNA. Die Ansätze für die PCR mit dem Mastermix1 enthielten die Primer  $\beta$ -Catenin 269for und 942rev, dem Ansatz mit Masermix2 waren die Primer  $\beta$ -Catenin 839for und 1550rev zugefügt. Die amplifizierte DNA der aufgezeigten Angiofibrome und Nasenmuscheln wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel gegen jeweils eine Wasserkontrolle ohne DNA aufgetrennt. Die Größen des aufgetrennten DNA-Markers sind in Basenpaare (bp) angegeben. Die Ansätze mit Mastermix1 ergaben ein 673 bp großes, die mit Masermix2 ein 711 bp großes Fragment.

### 5.1.1.1. Mutationen

In 4 von 5 Tumoren wurden Punktmutationen in den Codons 32 oder 33 nachgewiesen, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Im Codon 32 kommt es durch die Mutation zu einem Austausch von Asparaginsäure (Asp) und Valin (Val) und im Codon 33 wird Serin (Ser) durch Cystein (Cys) ersetzt (siehe Abb. 7, Tab. 9), wodurch der Serinrest nicht mehr durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert werden kann. Die Mutation im Codon 32 wurde bislang für juvenile Angiofibrome noch nicht beschrieben.

Des Weiteren zeigten sich in den Angiofibromen AF 3428, AF 356 und AF 357 Nukleotidüberlagerungen in den Codons 34 und 35, welche jedoch zu keinem relevanten Aminosäureaustausch führen (siehe Abb. 7 A). Im Codon 34 bleibt die Aminosäure Glycin (Gly) durch die Umwandlung der Nukleotidsequenz GGA in GGC erhalten, im Codon 35 wird durch die Überlagerung aus ATC die Sequenz CTC und somit aus der Aminosäure Leucin ihr Konstitutionsisomer Isoleucin. Eine minimale Überlagerung war auch im Nasenmuschelgewebe NM 1765 sichtbar (siehe Abb. 7 C).

Im Bereich der Aminosäure Threonin 393, welche mit der Proteinkinase CK2 interagiert, wurde in keinem der Gewebe Veränderungen gefunden. Im gesamten untersuchten Bereich konnten außer den Mutationen und den beschriebenen Nukleotidüberlagerungen im Exon 3 keine weiteren Normabweichungen festgestellt werden.

Der Abgleich der Sequenzen gegen das Nasenmuschelgewebe NM\_001904 ist in Abb. 8 beispielhaft für den Bereich der Punktmutationen dargestellt.

Tab. 9: Zusammenfassung der nachgewiesenen  $\beta$ -Catenin-Mutationen

Gewebe	Alter	Grad	Lokalisation	Mutation	Aminosäureaustausch
NM 1765			-	-	-
NM 1914			-	-	-
AF 3076	9	II	Codon 33	TCT $\leftrightarrow$ TGT	Ser $\leftrightarrow$ Cys
AF 3493	10	Re (3076)	Codon 33	TCT $\leftrightarrow$ TGT	Ser $\leftrightarrow$ Cys
AF 3428	19	III	Codon 33 Codon 34 Codon 35	TCT $\leftrightarrow$ TGT GGA $\leftrightarrow$ GGC ATC $\leftrightarrow$ CTC	Ser $\leftrightarrow$ Cys Gly Ile $\leftrightarrow$ Leu
AF 356	13	IV	Codon 32 Codon 34 Codon 35	GAC $\leftrightarrow$ GTC GGA $\leftrightarrow$ GGC ATC $\leftrightarrow$ CTC	Asp $\leftrightarrow$ Val * Gly Ile $\leftrightarrow$ Leu
AF 357	18	II	Codon 34 Codon 35	GGA $\leftrightarrow$ GGC ATC $\leftrightarrow$ CTC	Gly Ile $\leftrightarrow$ Leu

Re: Rezidiv, \*: bislang nicht vorbeschrieben für AFs

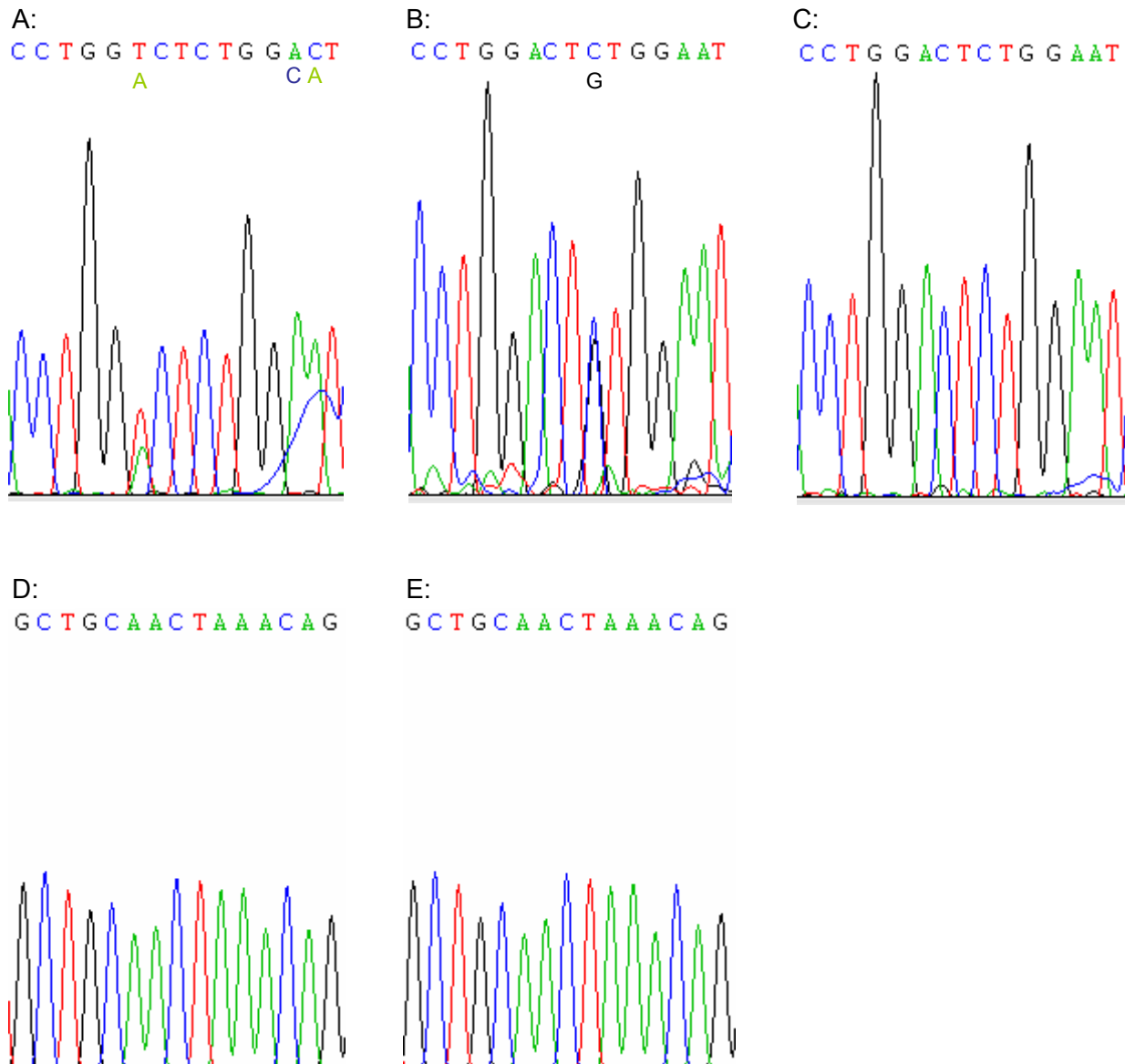


Abb. 7: Das Sequenzchromatogramm von  $\beta$ -Catenin.

A zeigt beispielhaft die Mutation in Codon 32 bei AF 356 sowie die Überlagerung durch das Nukleotid C in den Codons 34 und 35, B die Mutation in Codon 33 bei AF 3493, in C sieht man beispielhaft die Nasenmuschel NM 1765 ohne Veränderungen (dargestellt sind jeweils NT 358 bis 372). In D ist das Codon 393 (ACT) beispielhaft bei AF 3493 dargestellt, welches ebenso wie bei der Nasenmuschel NM 1765 in E keine Veränderungen aufweist und für die Aminosäure Threonin 393 codiert (dargestellt sind jeweils NT 1439 bis 1453).



NM_001904:	GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATC
NM 1765:	GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATC
NM 1914:	GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATC
AF 3076:	GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACT <span style="border: 1px solid black; background-color: #cccccc;">G</span> TGGAATC
AF 3493:	GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACT <span style="border: 1px solid black; background-color: #cccccc;">G</span> TGGAATC
AF 3428:	GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACT <span style="border: 1px solid black; background-color: #cccccc;">G</span> TGGAATC
AF 356:	GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGG <span style="border: 1px solid black; background-color: #cccccc;">T</span> CTCTGGAATC
AF 357:	GCGGCTGTTAGTCACTGGCAGCAACAGTCTTACCTGGACTCTGGAATC
NM_001904:	CATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC
NM 1765:	CATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC
NM 1914:	CATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC
AF 3076:	CATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC
AF 3493:	CATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC
AF 3428:	CATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC
AF 356:	CATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC
AF 357:	CATTCTGGTGCCACTACCACAGCTCCTTCTCTGAGTGGTAAAGGC

Abb. 8: Sequenzvergleich der cDNA von 5 Angiofibromen und 2 Naselmuschel-Normalgeweben mit dem Nasenmuscheltgewebe NM\_001904, gezeigt ist der Ausschnitt der Codons 20 bis 50 (entspricht NT 326 bis 418). Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primer  $\beta$ -Catenin 269for, die Amplifizierung mittels PCR mit den Primern  $\beta$ -Catenin 269for und 942rev (siehe Kap. 3.5.), die Primersequenzen liegen außerhalb des dargestellten Bereichs. Punktmutationen wurden eingerahmt und grau schattiert.

### 5.1.2. Sequenzierungen des Axin2-Gen

Von 2 Nasenmuschelgeweben und 4 Tumoren wurden die Codons 1 bis 507 (entspricht NT 290 bis 1808) analysiert, was den Exons 2 bis 5 entspricht. Die GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle befindet sich im Bereich der Exons 2 bis 4, die  $\beta$ -Catenin-Bindungsstelle ist im Exon 5 enthalten. Im Tumor AF 357 konnten nur die Codons 1 bis 70 (entspricht NT 290 bis 497) und Codons 267 bis 389 (entspricht NT 1088 bis 1454) sequenziert werden.

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz des Axin2-Gens wurde die Vorlage NM\_004655.3 herangezogen.

#### 5.1.2.1. Punktmutationen

Im untersuchten Bereich konnten eine Punktmutation, welche zu keinem Aminosäureaustausch führt, und eine Missense-Mutation detektiert werden.

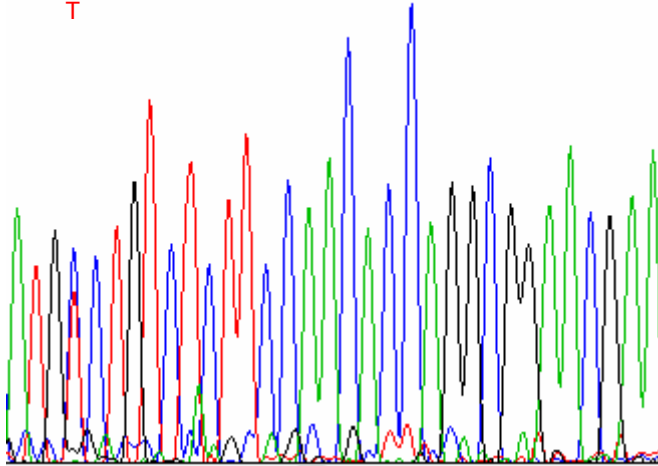
In einem Nasenmuschelgewebe und in allen 5 untersuchten Tumoren wurden Punktmutationen des NT 437 im Codon 50 nachgewiesen, welche zu einem Austausch der Aminosäure Serin durch Prolin führt. Im Gewebe der Nasenmuschel und in 4 Tumoren zeigte sich eine heterogene Ausprägung beider Varianten, in einem Tumor war nur die veränderte Form homogen vorhanden, welche auf Proteinebene die Aminosäure Prolin codiert. Die Sequenzierungen wurden anschließend zur Kontrolle an einem gesunden Zahnfleischgewebe durchgeführt, wo ebenfalls nur die mutierte Variante gefunden wurde, sodass von einem Polymorphismus ausgegangen wurde.

Die Mutation liegt innerhalb der Codons 18 bis 59. In diesem Abschnitt läuft eine zweite Sequenz unterhalb der regulären Sequenz mit, was im folgenden Abschnitt 5.1.2.2. näher beschrieben wird. Die beschriebene Mutation hebt sich jedoch deutlich von der zusätzlichen Sequenz ab, sodass sie als eigenständige Veränderungen gewertet wurde (siehe Abb. 9).

Eine weitere Sequenzvariation wurde in beiden Nasenmuschelgeweben im Codon 462 nachgewiesen, welche jedoch zu keiner Veränderung auf Proteinebene führt (siehe Tab. 10).

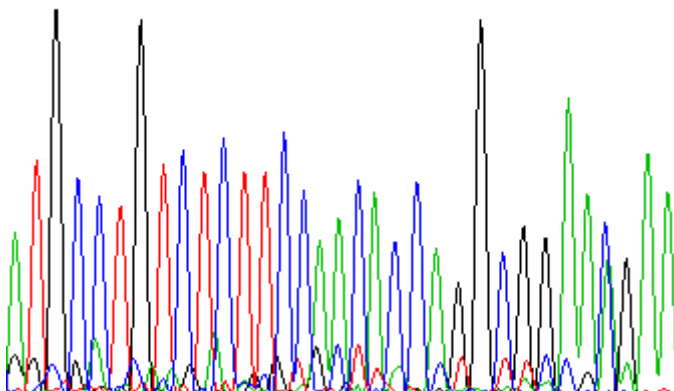
A:

A T G C C T G T C T C T T C C A A C A C C A G G C G G A A C G A A  
 T



B:

A T G C C T G T C T C T T C C A A C A C C A G G C G G A A C G A A



C:

A T G T C T G T C T C T T C C A A C A C C A G G C G G A A C G A A

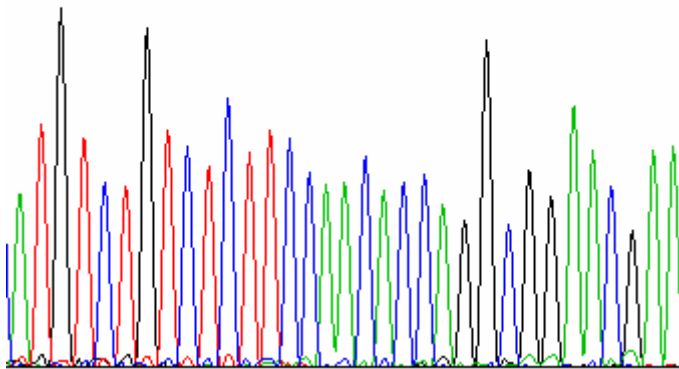


Abb. 9:

Das Sequenzchromatogramm von Axin2. A zeigt beispielhaft die Mutation im Codon 50 in der Sequenzierung des Tumors AF 3493, B stellt die Sequenzierung von gesundem Zahnfleischgewebe mit der homogenen Mutation im Codon 50 dar, in C sieht man beispielhaft die Nasenmuschel NM 1914 ohne Veränderungen (dargestellt sind jeweils NT 434 bis 466).

Tab. 10: Zusammenfassung der nachgewiesenen Axin-Mutationen

<b>Gewebe</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Mutation</b>	<b>Aminosäureaustausch</b>
NM 1765	Codon 50	TCT ↔ CCT	Ser ↔ Pro
	Codon 462	CCT ↔ CCC	Pro
NM 1914	Codon 462	CCT ↔ CCC	Pro
Zahnfleisch	Codon 50	CCT	Pro
AF 3076	Codon 50	TCT ↔ CCT	Ser ↔ Pro
AF 3493	Codon 50	TCT ↔ CCT	Ser ↔ Pro
AF 3428	Codon 50	TCT ↔ CCT	Ser ↔ Pro
AF 356	Codon 50	TCT ↔ CCT	Ser ↔ Pro
AF 357	Codon 50	CCT	Pro

## 5.1.2.2. Spleißvariante

Bei der Auftrennung der mittels PCR amplifizierten DNA durch die Gelelektrophorese fielen im Bereich der Primer Axin2 221for und 577rev bei 4 von 5 Angiofibromen neben der Hauptbande eine kleinere Nebenbande auf (siehe Abb. 10, verwendete Primer siehe Kap. 3.5.). Die Hauptbande hatte eine Größe von 356 bp, die Nebenbande lag bei einer Größe um 240 bp. In den beiden Nasenmuschelgeweben war nur die erwartete Hauptbande sichtbar.

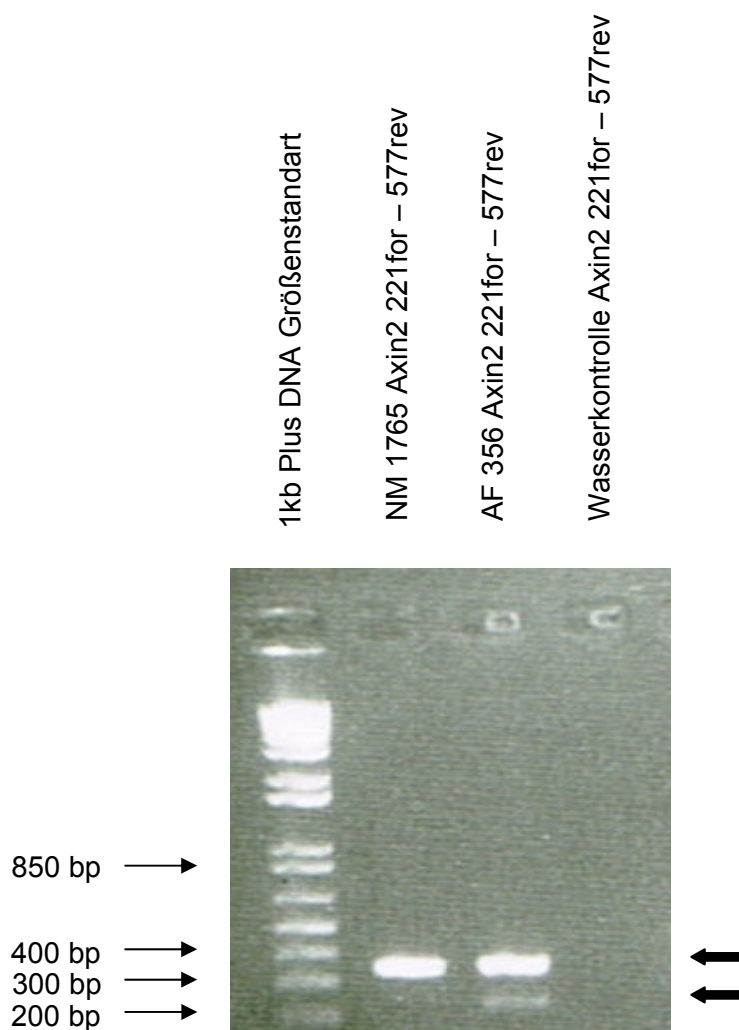


Abb. 10: Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung der zuvor mittels PCR amplifizierten DNA. Die PCR wurde mit den Primern Axin 2 221for und 577rev durchgeführt, die amplifizierte DNA wurde in einem 1,5 %igen Agarosegel gegen eine Wasserkontrolle ohne DNA aufgetrennt. Die Größen des aufgetrennten DNA-Markers sind in Basenpaare (bp) angegeben. Die Größe der beiden Banden sind durch Pfeile gekennzeichnet: Ca. 356 bp bei der großen Bande, ca. 240 bp bei der kleinen Bande.

Die anschließende Sequenzierung dieser DNA wurde sowohl mit dem Forward-Primer 221for, als auch mit dem Reverse-Primer 577rev durchgeführt. Neben den in Kap. 5.1.2.1. beschriebenen Punktmutationen fiel auf, dass in 4 von 5 Tumoren im Bereich NT342 bis NT457 unter der Hauptsequenz eine zweite Sequenz mitläuft (siehe Abb. 11). In den Nasenmuscheln konnte diese parallel laufende Sequenz nicht nachgewiesen werden. Die Nebensequenzen wurden abgelesen und ebenfalls gegen das Nasenmuschelgewebe NM\_001904 abgeglichen. Bei der Auswertung zeigte sich, dass die zweite Sequenz vermutlich durch eine 115 bp große Deletion zustande kommt.

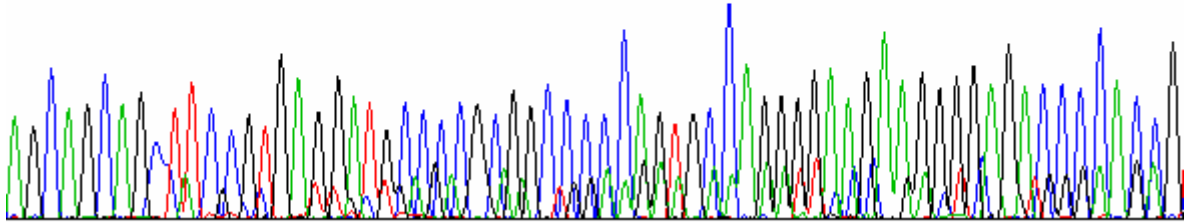
Nachdem die zweite Sequenz nur in den Tumoren aufgefallen war, wurde als weiteres gesundes Gewebe eine Zahnfleischprobe auf dieselbe Art untersucht, welche ebenfalls die Axin2-Nebensequenz aufzeigte.

Im Folgenden wurden neue Primer (Axin2 Mut for, Axin2 Mut rev, Axin2wt, siehe Kap. 3.5.) erstellt mit dem Ziel, lediglich die Axin2-Nebensequenz und den Axin2-Wildtyp zu amplifizieren und zu sequenzieren. Die entsprechenden Sequenzierungen lieferten jedoch keine eindeutigen Sequenzen.

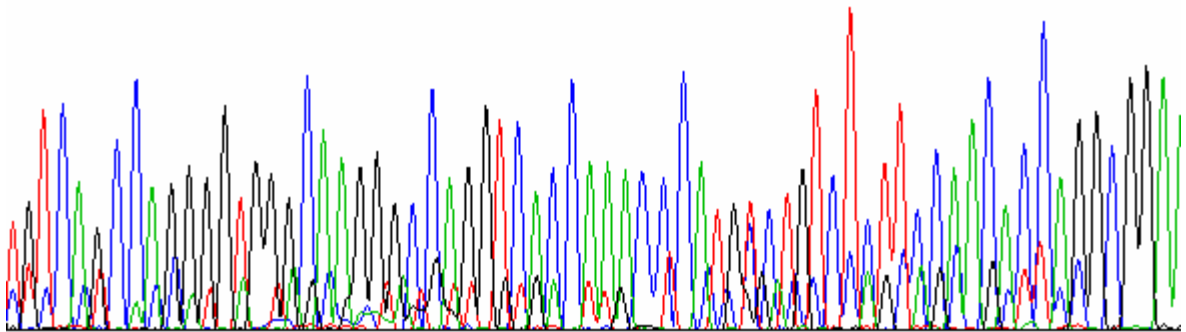
Um die nachgewiesene Veränderung genauer zu charakterisieren, wurde die zweite Bande mit einer Größe von ca. 240 bp mittels Klonierung vervielfältigt. Nachdem die amplifizierte Plasmid-DNA wieder aus den Bakterien isoliert worden war, wurde zur Bestätigung eine PCR durchgeführt und die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt. Es konnte eine Bande mit der Größe von ca. 240 bp nachgewiesen werden, die Plasmid-DNA wurde daraufhin mit den Primern 221for und 577rev sequenziert. Die Sequenzierung von 2 Plasmiden bestätigte die vermutete Deletion von 115 bp von NT 342 bis NT 457, die zu einer Rahmenverschiebung führt (siehe Abb. 11). Die Schnittstellen dieser entfernten Sequenz sind identisch mit den allgemein bekannten Consensus-Sequenzen einer Spleißstelle, die der GT-AG-Regel entsprechen, die Donor- und Acceptor-Stelle sind in Abb. 11 markiert. Zusammenfassend sind in Tab. 11 alle relevanten Mutationen der Gene  $\beta$ -Catenin und Axin2 der untersuchten Angiofibrome aufgelistet.

A:

A G C A G C A G C T T C C G T G A G G A T G C C C C G C G G C C C C C A G T G C C A G G G G A A G A A G G G G A G A C C C C A C C G



T G T C A G C C A G G G G T G G G C A A G G G C C A G G T C A C C A A A C C C A T G T C T G T C T C T T C C A A C A C C A G G C G G A



B:

```
aactggaaga agaaaaattc ccagactcag tgggaagagc tcctcaccatgtagtagcgc
tatgttggtg acttgctctc cggaccccag cagcagcttc cgtgaggatg ccccggggcc
cccagtgccg ggggaagaag gggagacccc accgtgtcag ccaggggtgg gcaagggcca
ggtcaccaaaa cccatgcctg tctcttccaa caccaggcgg aacgaagatg ggttggggga
gccggagggg cgggcatctc cggattcccc tctgaccggt tggaccaagt cttacactc
```

Abb. 11: A: Hier ist beispielhaft das Sequenzchromatogramm von Axin2 im Bereich NT 329 bis 362 mit einer zweiten, parallel laufenden Sequenz dargestellt. Die Sequenzierung von AF 3428 wurde mit dem Primer 577rev durchgeführt. B zeigt die reguläre Sequenz von Axin 2 von NT 241 bis 540. Das Codon 1 wurde schwarz umrahmt. Die 115 bp große Deletion ist grau gefärbt, die linke Spleiß-Donor-Stelle und die rechte Spleiß-Acceptor-Stelle sind grau unterstrichen.

Tab. 11: Zusammenfassung der zu einem Aminosäureaustausch oder zu einer Rahmenverschiebung führenden Veränderungen, die in der cDNA im untersuchten Bereich des  $\beta$ -Catenin-Gen und des Axin2-Gen gefunden wurden

<b>Gewebe</b>	<b>Veränderungen <math>\beta</math>-Catenin (NT 329 - 1535)</b>	<b>Veränderungen Axin2 (NT 290 - 1808)</b>
NM 1765	-	-
NM 1914	-	-
Zahnfleisch	Nicht sequenziert	Deletion NT 342 - 457
AF 3076	NT 366 C $\leftrightarrow$ G	Deletion NT 342 - 457
AF 3493	NT 366 C $\leftrightarrow$ G	Deletion NT 342 - 457
AF 3428	NT 366 C $\leftrightarrow$ G	Deletion NT 342 - 457
AF 356	NT 363 A $\leftrightarrow$ T	Deletion NT 342 - 457
AF 357	-	-



## 5.2. Expressionsanalyse

### 5.2.1. quantitative Realtime-PCR

Um die Transkriptmengen der WNT-Weg-Gene  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , APC, Axin1 und Axin2 im juvenilen Angiofibrom auf RNA-Ebene zu bestimmen, wurden quantitative *real-time PCRs* (qRT-PCR) nach den in Kap. 4.4. beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Die untersuchten Tumoren zeigten teils deutlich erhöhte Transkriptmengen von  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , Axin2 und APC (siehe Abb 12).  $\beta$ -Catenin war hierbei im Vergleich zu den beiden gesunden Nasenmuschelgeweben in allen Angiofibromen 2 bis 23,5fach erhöht. GSK3 $\beta$  zeigte in 4 von 5 Tumoren ein 3 bis 12,5fach erhöhte Transkriptrate, die RNA-Expression von Axin2 war in allen Tumoren 3 bis 9fach erhöht. APC war in 4 von 5 Tumoren 2 bis 19fach erhöht. Die Transkriptrate von Axin1 zeigte in keinem der 5 untersuchten Tumoren auffällige Veränderungen.

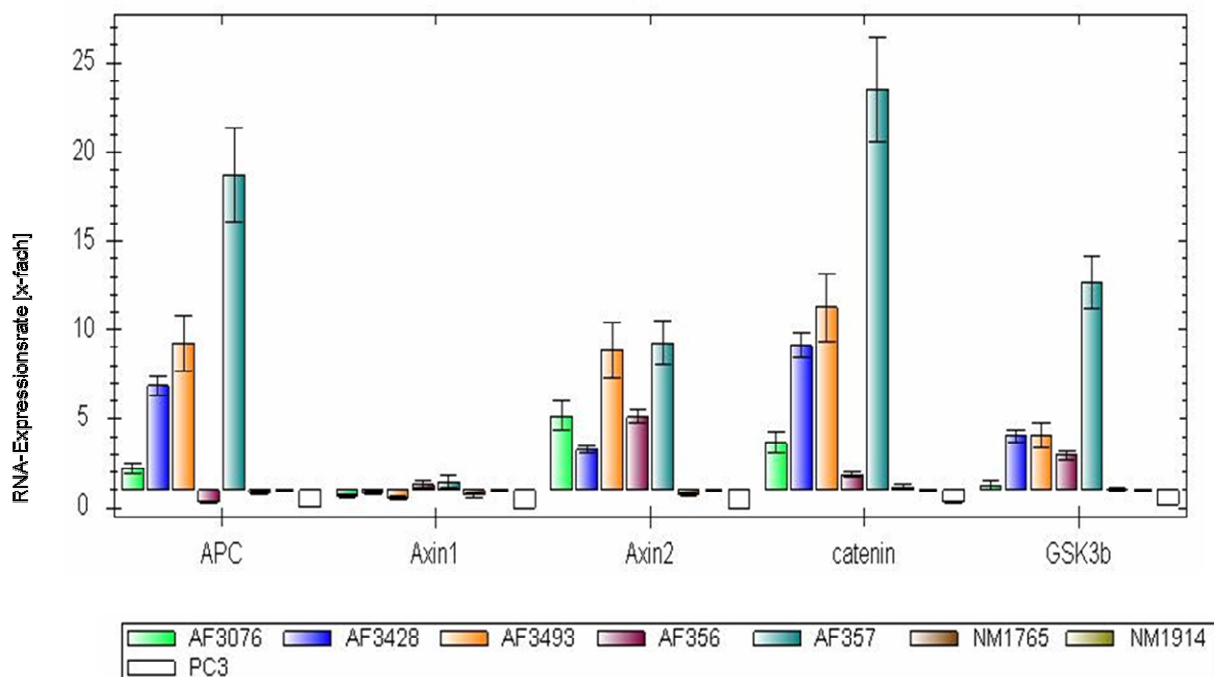


Abb. 12: RNA-Expressionsrate der Gene APC, Axin1, Axin2,  $\beta$ -Catenin und GSK3 $\beta$  in 5 juvenilen Angiofibromen und 2 Nasenmuschel-Normalgeweben - normalisiert gegen die Gene G6PDH, GAPDH und RP II. PC3 diente als interne Plattenkontrolle.

Diese Ergebnisse wurden durch ergänzende qRT-PCR-Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Angiofibrom-Geweben und Nasenmuschel-Geweben von unserem Kooperationspartner Herr Dr. rer. nat. O. Wendler und Mitarbeiter der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikum Erlangen bestätigt und die Daten freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die absoluten RNA-Expressionsraten der Gene  $\beta$ -Catenin, Axin2, APC und GSK3 $\beta$  von 14 juvenilen Angiofibromgeweben und einem Angiofibrom-Gemisch, bestehend aus der RNA von 12 juvenilen Angiofibromen, wurden mit der Anzahl der RNA-Kopien von 10 Nasenmuschel-Geweben und einem Nasenmuschel-Gemisch, bestehend aus 10 Nasenmuschel-Geweben, als Normalgewebe verglichen. Des Weiteren wurde die qRT-PCR zur Bestimmung der Transkriptionslevel der neuen Axin2-Variante an der genannten RNA eingesetzt, nachdem spezifische Oligonukleotide anhand der neu detektierten Deletion entworfen wurden.

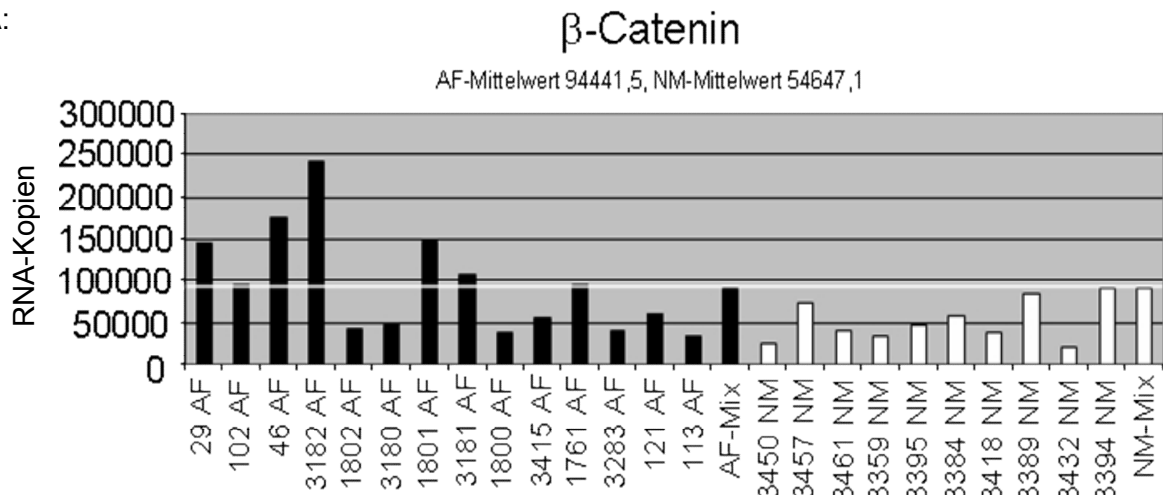
In 7 von 14 Angiofibromen konnten erneut deutlich erhöhte RNA-Expressionsraten von  $\beta$ -Catenin im Vergleich zum Nasenmuschelgewebe nachgewiesen werden, der Mittelwert der Tumoren lag bei 94441,5 RNA-Kopien bei einem Vergleichs-Mittelwert von 54647,1 bei den Nasenmuscheln (siehe Abb. 13 A).

Sowohl die Transkriptionslevel der bekannten Axin2-Sequenz, als auch die der neuen Axin2-Variante zeigten sich in den Angiofibrom-Geweben erhöht (siehe Abb. 13 B, C). Die Anzahl der RNA-Kopien von Axin2 war in 9 von 14 Angiofibrom-Geweben bis 4,3fach erhöht im Vergleich zum höchsten Wert des Vergleichsgewebes. Die Axin2-Variante wurde in 13 von 14 juvenilen Angiofibromen und in allen gesunden Nasenmuscheln exprimiert, jedoch in 11 Angiofibromen bis 15fach höher als in den Nasenmuschel-Geweben. Insgesamt war die Anzahl der RNA-Kopien der bekannten Axin2-Sequenz allerdings deutlich höher als die der Axin2-Variante.

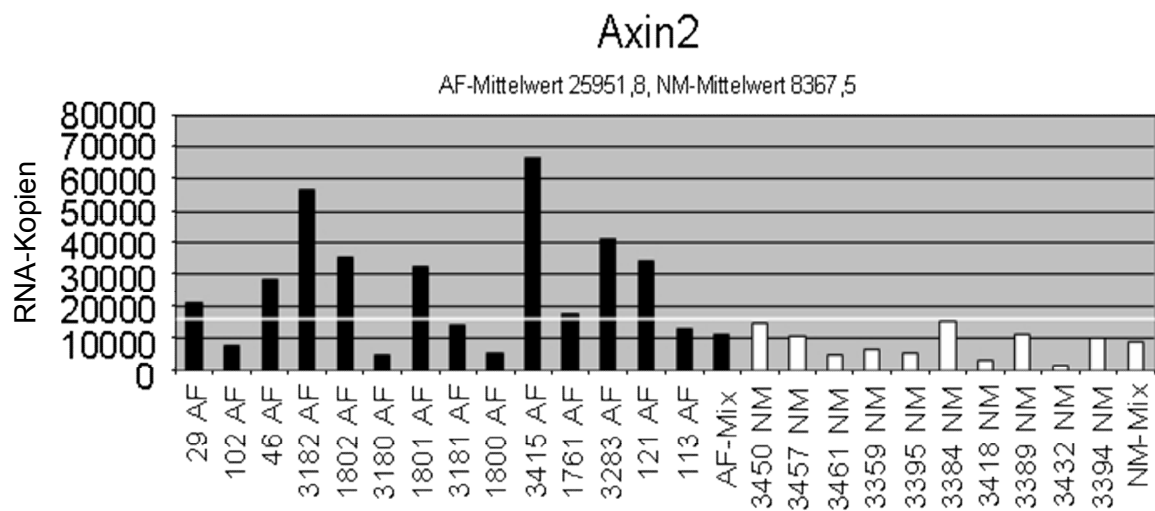
Auffallende Unterschiede zwischen den Tumor- und den Nasenmuschel-Geweben konnten auch bei den Transkriptionsleveln von APC nachgewiesen werden, hier waren in 13 von 14 Angiofibromen die Level bis 12fach höher (siehe Abb. 13 D).

Die RNA-Kopien von GSK3 $\beta$  zeigten sich in 5 von 14 Angiofibromen bis 2,9fach erhöht im Vergleich zur höchsten Anzahl der gesunden Gewebe (siehe Abb. 13 E).

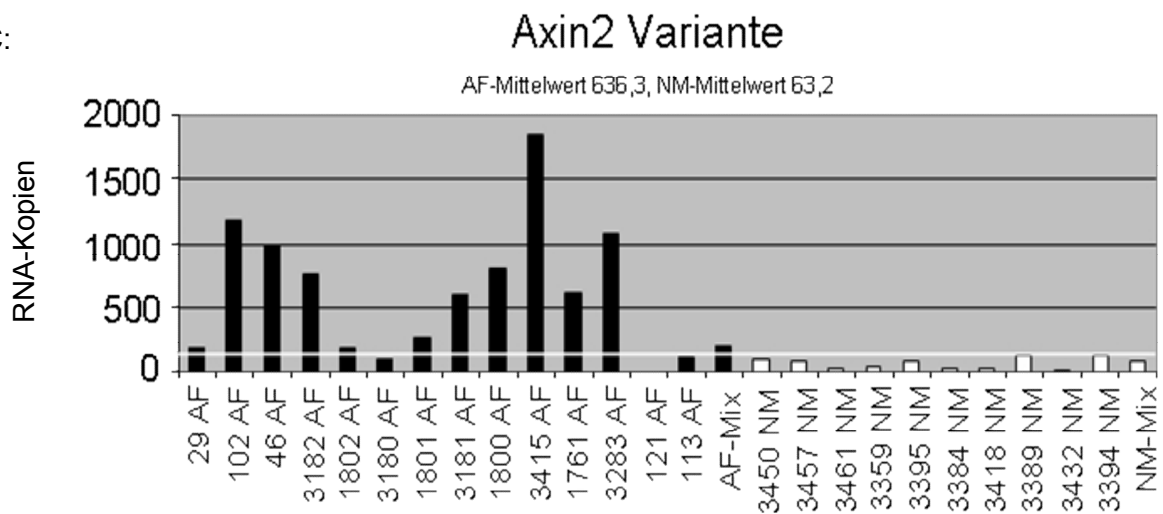
A:



B:



C:



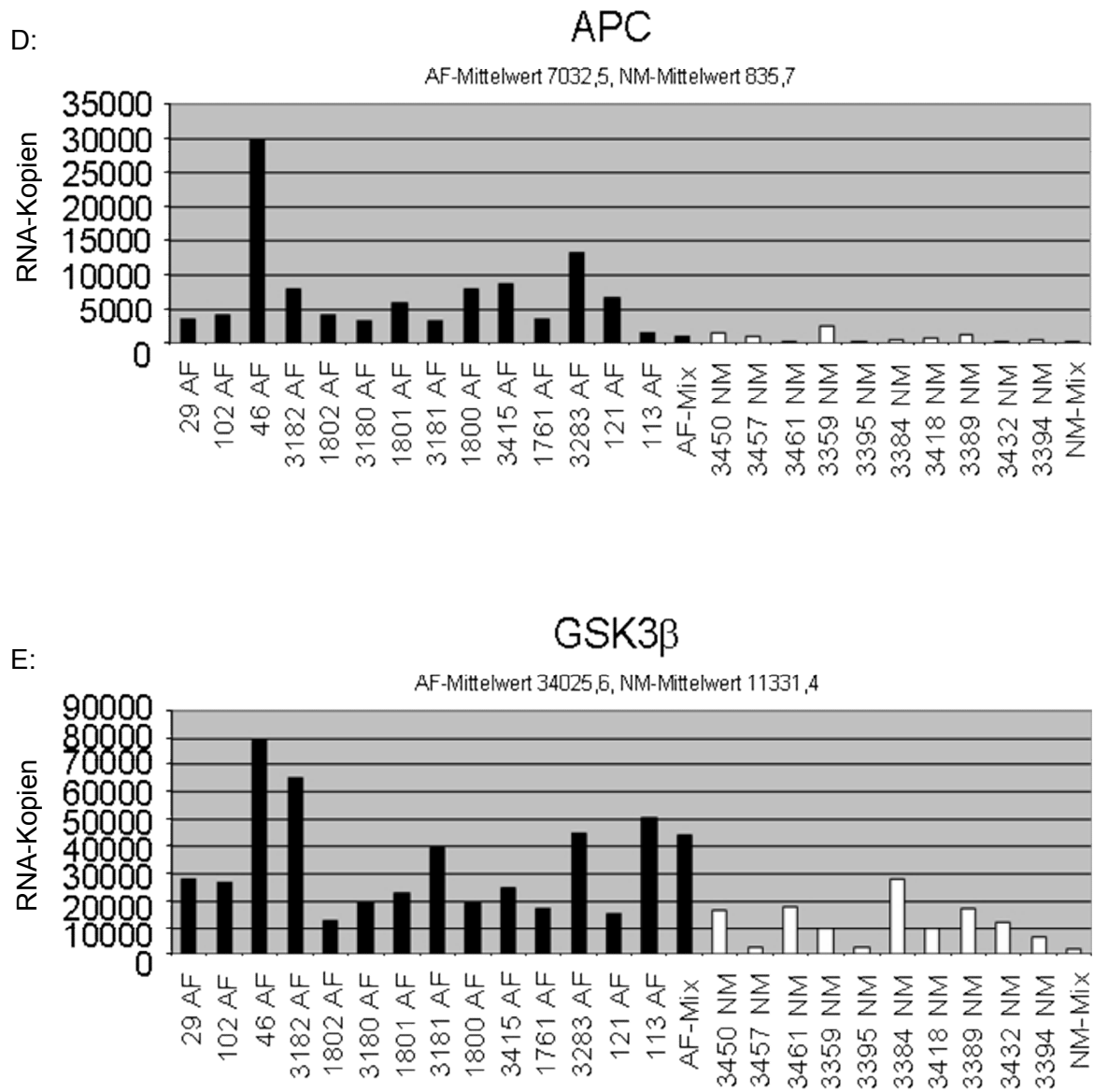


Abb. 13 A-E: RNA-Expressionsraten der Gene  $\beta$ -Catenin, Axin2, Axin2-Variante, APC und GSK3 $\beta$  von 14 Angiofibromen (AF) und einem Angiofibrom-Gemisch im Vergleich zu 10 Nasenmuschelgeweben (NM) und einem Nasenmuschel-Gemisch.

### 5.2.2. Ergebnisse der immunhistologischen Färbungen

Nachdem teils erhöhte Transkriptmengen der WNT-Weg-Gene im juvenilen Angiofibrom gezeigt werden konnten, sollte überprüft werden, ob die WNT-Weg-Proteine im Vergleich zum Normalgewebe ebenfalls verstärkt exprimiert werden. Hierfür wurden immunhistologische Färbungen von  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , APC, Axin1 und Axin2 an 8 Angiofibrom-Gewebeschnitten und 2 Nasenmuschel-Gewebeschnitten als Vergleichsgewebe durchgeführt. Die Bedingungen für die Färbung sind in Kap. 4.6.2. beschrieben. Zu jedem Gewebeschnitt wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Primärantikörpern mitgefärbt. Aufgrund der limitierten Gewebeproben konnten nicht dieselben Gewebe wie in der qRT-PCR und den Sequenzierungen verwendet werden.

### 5.2.2.1. $\beta$ -Catenin – Proteinexpression

In allen 8 Angiofibromen zeigten sich diffuse Anreicherungen des  $\beta$ -Catenin-Proteins, sowohl in Endothel- als auch in Bindegewebszellen. Hiervon waren 2 der Tumoren etwas schwächer gefärbt. Auch in den beiden Nasenmuschel-Geweben war lediglich eine schwache Färbung der Endothel- und Bindegewebszellen sichtbar. Das Drüsengewebe färbte sich in den Nasenmuschel-Geweben deutlich an, besonders stark waren die Zell-Zell-Verbindungen mit  $\beta$ -Catenin-Protein angereichert.

In Abb. 14 wurden beispielhaft die Schnitte eines juvenilen Angiofibroms und einer Nasenmuschel jeweils mit Negativkontrolle dargestellt.

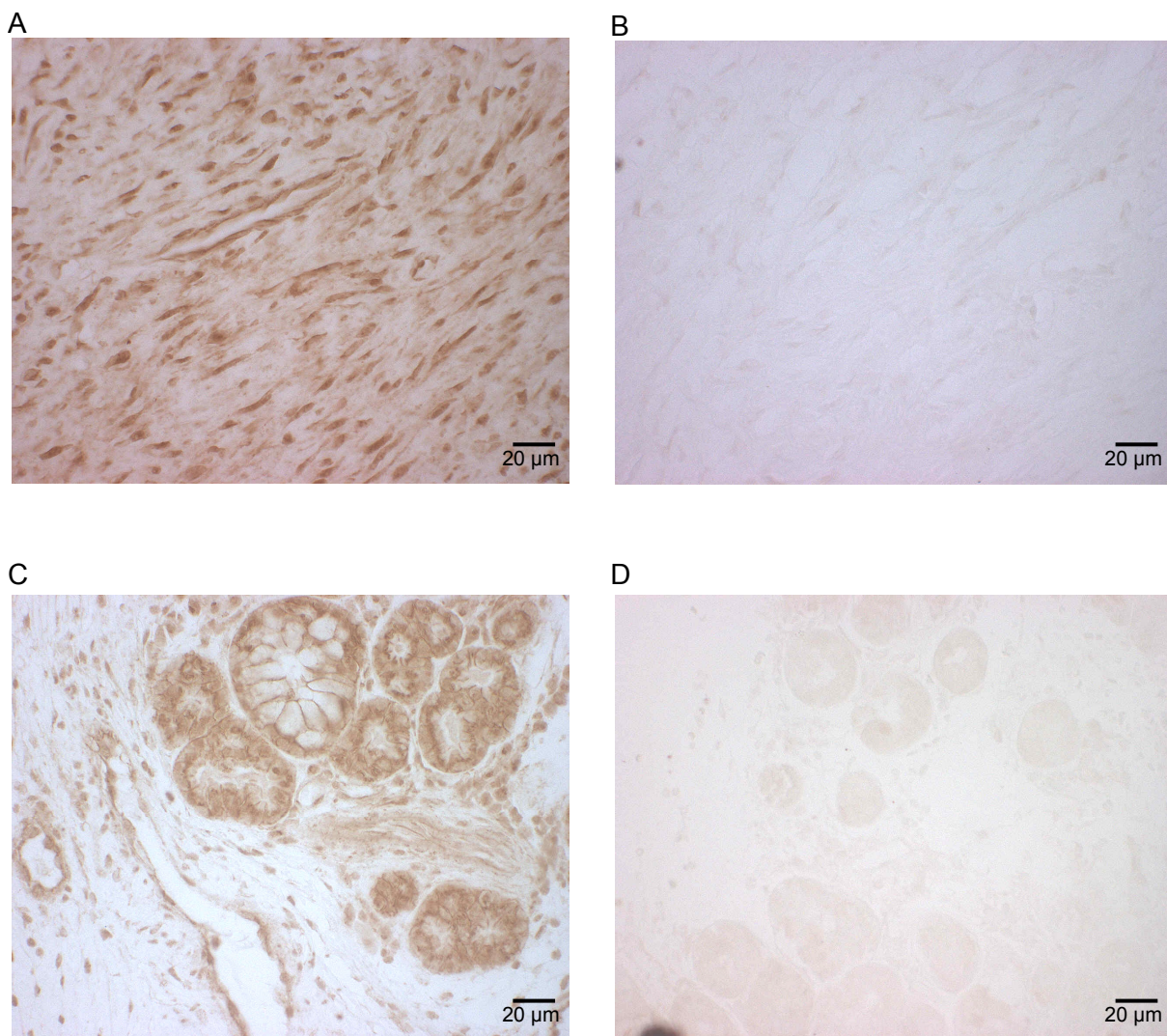


Abb. 14: Immunhistologische Färbung mit DAB zur Darstellung der  $\beta$ -Catenin-Expression. A zeigt den Schnitt des AF 074 mit der zugehörigen Negativkontrolle ohne Primärantikörper in B. In C ist die  $\beta$ -Catenin-Expression in einem histologischen Schnitt der NM 2284 dargestellt, erneut mit der Negativkontrolle in Bild D. Alle Ausschnitte wurden mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.



### 5.2.2.2. Axin2 – Proteinexpression

In 8 von 8 Tumor-Geweben zeigte sich eine diffuse Anreicherung von Axin2, sowohl in Endothel- als auch in Bindegewebszellen. In den beiden Nasenmuschel-Geweben ergab sich eine schwächere Färbung ebenfalls der Endothel- und Bindegewebszellen, sowie der Drüsengewebszellen (siehe Abb. 15).

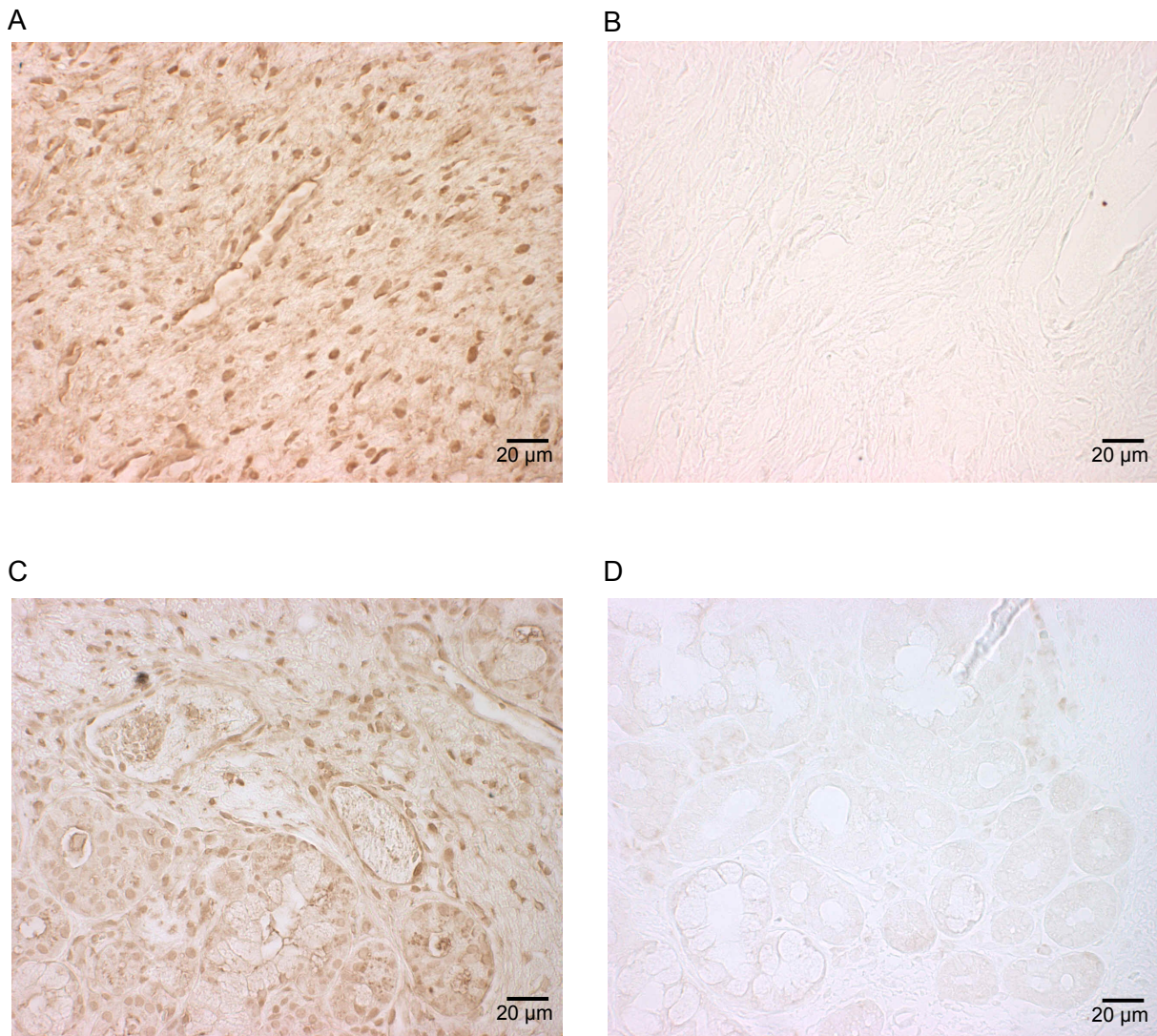


Abb. 15: Immunhistologische Färbung mit DAB zur Darstellung der Axin2-Expression. A zeigt einen Schnitt des AF 074 mit der zugehörigen Negativkontrolle ohne Primärantikörper in B. In C ist die Axin2-Expression in einem histologischen Schnitt der NM 2284 dargestellt, erneut mit der Negativkontrolle in Bild D. Alle Ausschnitte wurden mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.



### 5.2.2.3. GSK3 $\beta$ – Proteinexpression

Eine Expression des GSK3 $\beta$ -Proteins konnte in Endothel- und Bindegewebszellen von 6 von 8 juvenilen Angiofibromen nachgewiesen werden. Die Färbung war in 3 von 6 Geweben schwächer. In 2 von 8 Tumorgeweben zeigte sich wiederholt keine Anreicherung des GSK3 $\beta$ -Proteins im Vergleich zur Negativkontrolle. Im Normalgewebe waren ebenfalls schwache Färbungen in den Endothel- und Bindegewebszellen, sowie stärkere in den Drüsenzellen zu sehen (siehe Abb. 16).

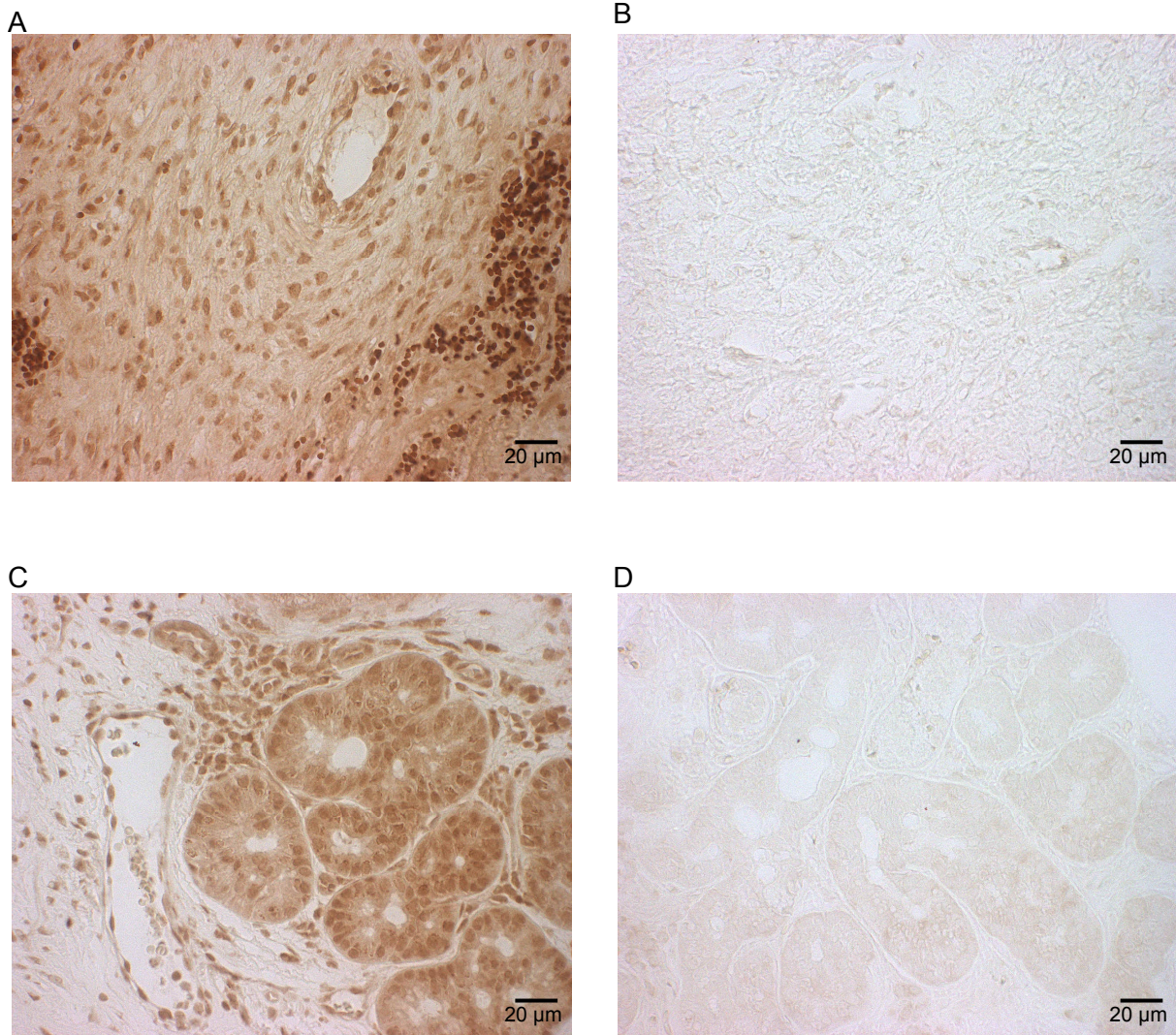


Abb. 16: Immunhistologische Färbung mit DAB zur Darstellung der GSK3 $\beta$ -Expression. A zeigt einen Schnitt des AF 17438 mit der zugehörigen Negativkontrolle ohne Primärantikörper in B. In C ist die GSK3 $\beta$ -Expression in einem histologischen Schnitt der NM 2268 dargestellt, erneut mit der Negativkontrolle in Bild D. Alle Ausschnitte wurden mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.



#### 5.2.2.4. APC – Proteinexpression

Das WNT-Weg-Protein APC wurde in allen 8 untersuchten Angiofibromen in Bindegewebs- und Endothelzellen exprimiert, es konnten hier jedoch keine wesentlichen Unterschiede in der Stärke der Färbung im Vergleich zu den gesunden Geweben festgestellt werden. 3 der Tumoren zeigten sogar eine etwas schwächere Färbung als die Nasenmuschel-Gewebe (siehe Abb 17).

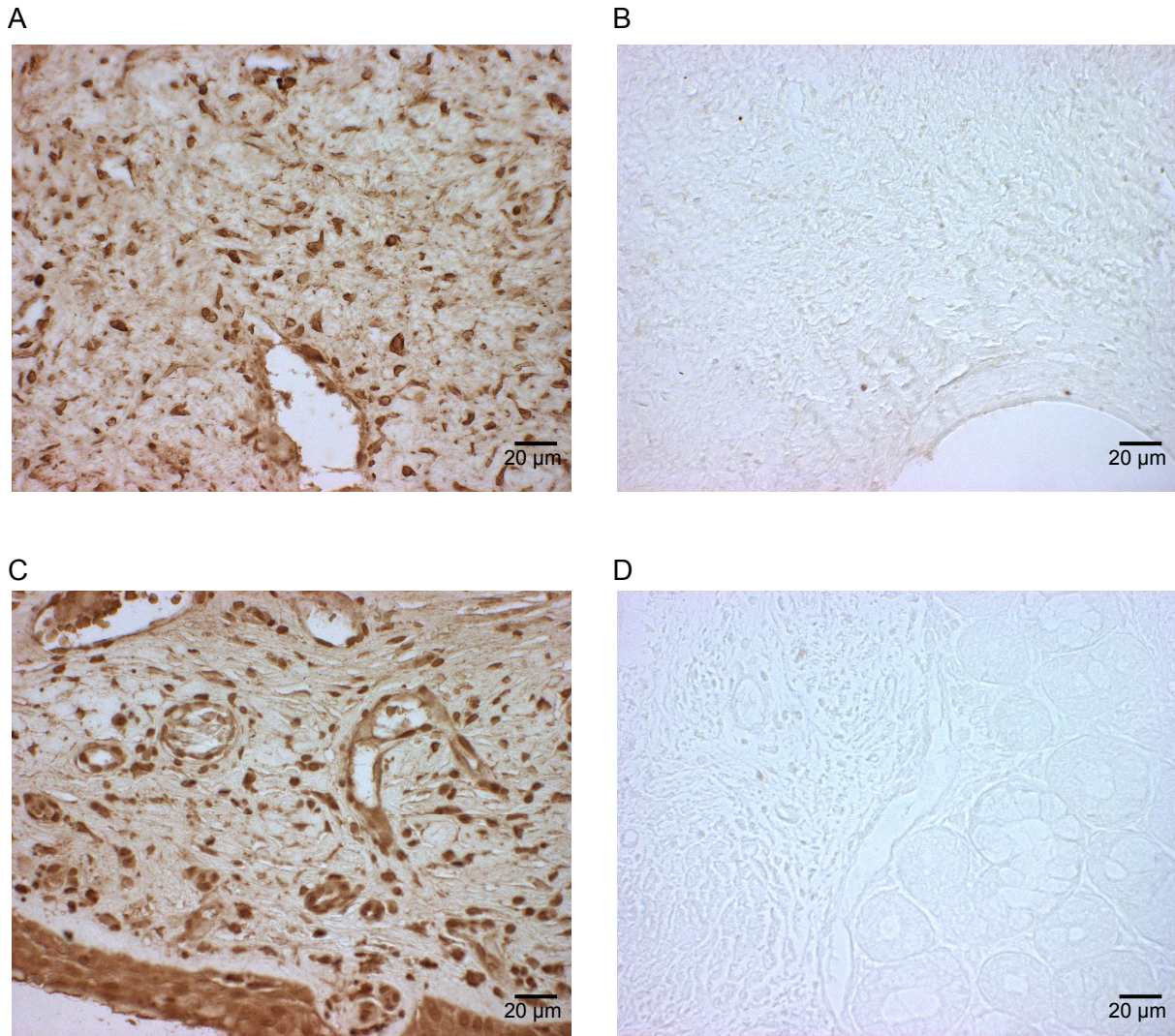


Abb. 17: Immunhistologische Färbung mit DAB zur Darstellung der APC-Expression. A zeigt einen Schnitt des AF 2970 mit der zugehörigen Negativkontrolle ohne Primärantikörper in B. In C ist die APC-Expression in einem histologischen Schnitt der NM 2268 dargestellt, erneut mit der Negativkontrolle in Bild D. Alle Ausschnitte wurden mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.

### 5.2.2.5. Axin1 – Proteinexpression

Das Axin1-Protein ließ sich in 3 von 8 Angiofibrom-Geweben in Endothel- und Bindegewebszellen schwach darstellen, in 5 von 8 Tumoren war im Vergleich zur Negativkontrolle keine Proteinexpression zu erkennen. Beide Nasenmuschel-Gewebe zeigten ebenfalls eine schwache Expression in Endothel und Bindegewebe und ein deutlicheres Färbemuster im Drüsengewebe (siehe Abb 18).

In Tab. 12 sind die Intensitäten der DAB-Färbungen aller Tumoren und Normalgewebe zusammengefasst.

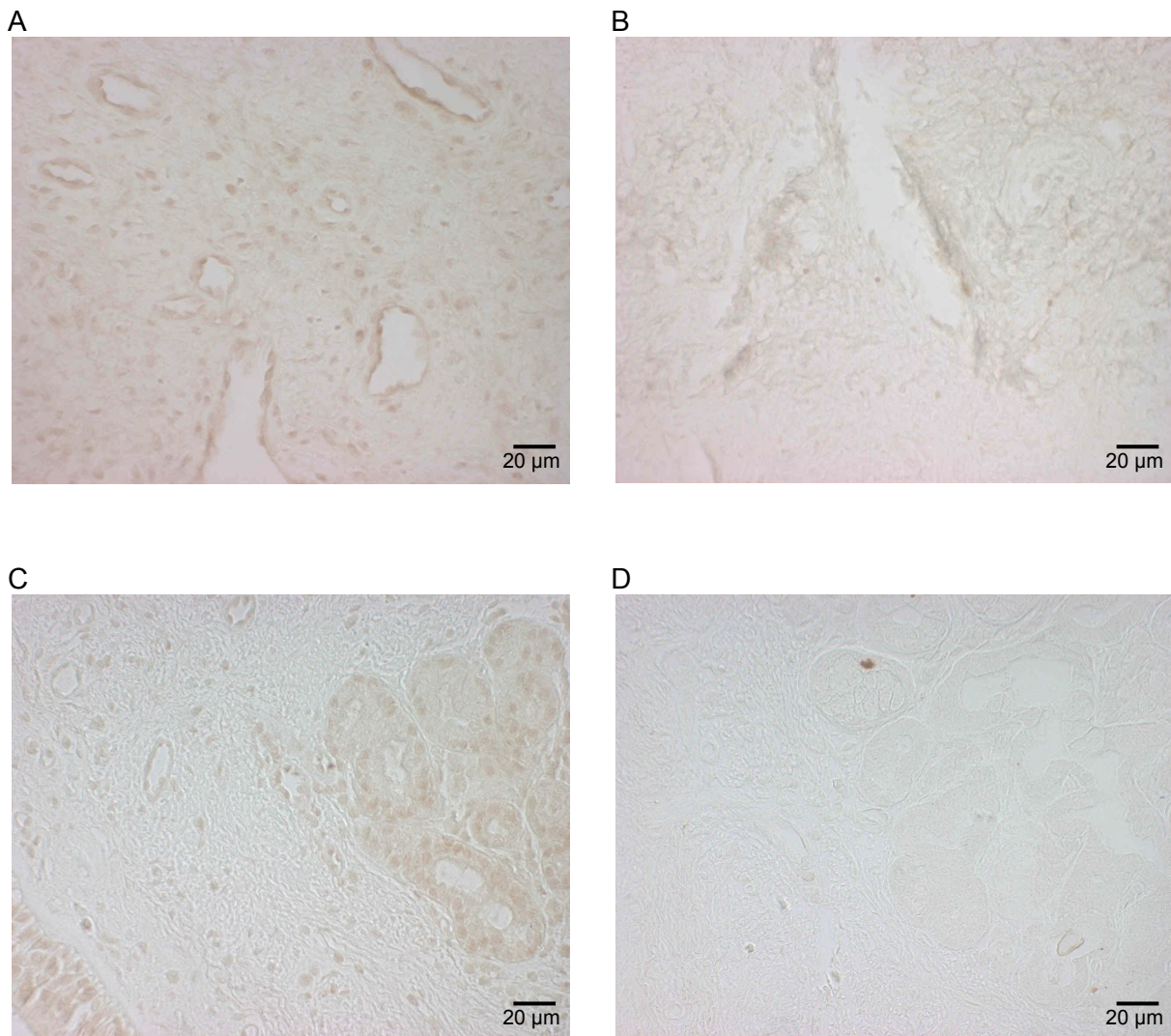


Abb. 18: Immunhistologische Färbung mit DAB zur Darstellung der Axin1-Expression. A zeigt einen Schnitt des AF 2336 mit der zugehörigen Negativkontrolle ohne Primärantikörper in B. In C ist die Axin1-Expression in einem histologischen Schnitt der NM 2284 dargestellt, erneut mit der Negativkontrolle in Bild D. Alle Ausschnitte wurden mit einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.

Tab. 12: Zusammenfassung der Intensität der DAB-Färbungen der Bindegewebs- und Endothelzellen in den juvenilen Angiofibromen und den Nasenmuschelgeweben. Die Färbungen der Drüsen sind in dieser Tabelle nicht berücksichtigt

Gewebe	β-Catenin	Axin2	GSK3β	APC	Axin1
AF 046	(+)	+	(+)	(+)	-
AF 074	+	+	+	(+)	(+)
AF 119	(+)	+	-	+	-
AF 2336	+	+	(+)	+	(+)
AF 2970	+	+	(+)	+	-
AF 3076	+	+	+	+	-
AF 3428	+	+	-	+	-
AF 17438	+	+	+	(+)	(+)
NM 2268	(+)	(+)	(+)	+	(+)
NM 2284	(+)	(+)	(+)	+	(+)

+: starke Färbung, (+): schwache Färbung, -: negativ



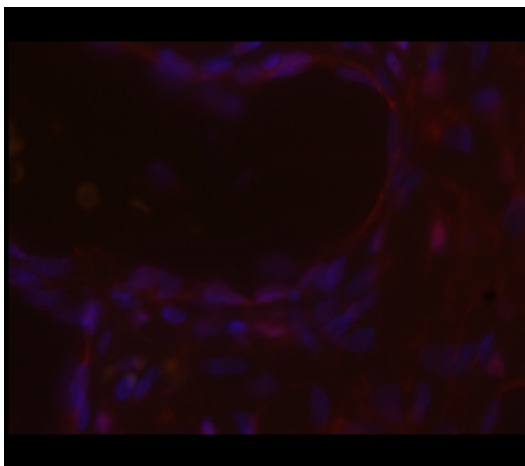
### 5.2.3. Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen

#### 5.2.3.1. $\beta$ -Catenin-Expression in Gewebeschnitten

Mittels den in Kap. 5.2.2. beschriebenen immunhistologischen Färbungen von Gewebeschnitten konnte gezeigt werden, dass juvenile Angiofibrome im Vergleich zum Nasenmuschel-Normalgewebe eine veränderte Proteinexpression der WNT-Weg-Proteine  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$  und Axin2 aufweisen. Diese Beobachtung stimmt mit den erhöhten Transkriptionsraten, die in der qRT-PCR (siehe Kap. 5.2.1.) beobachtet wurden, überein. Da in dieser Arbeit für die Färbungen mit DAB keine Kernfärbung vorgenommen wurde, waren kaum Aussagen über die exakte Lokalisation der Proteine in den Zellen, also einer Expression im Zellkern oder im Zytoplasma, möglich.

Um Angaben über die genaue Lokalisation der exprimierten Proteine im juvenilen Angiofibrom machen zu können, wurden exemplarisch Immunfluoreszenzfärbungen nach den in Kap. 4.6.2.3. beschriebenen Vorschriften mit dem Antikörper Anti- $\beta$ -Catenin an Angiofibrom- und Nasenmuschelgeweben durchgeführt. Diese waren jedoch aufgrund von starken Hintergrundsignalen nicht auswertbar (siehe Abb. 19).

A



B

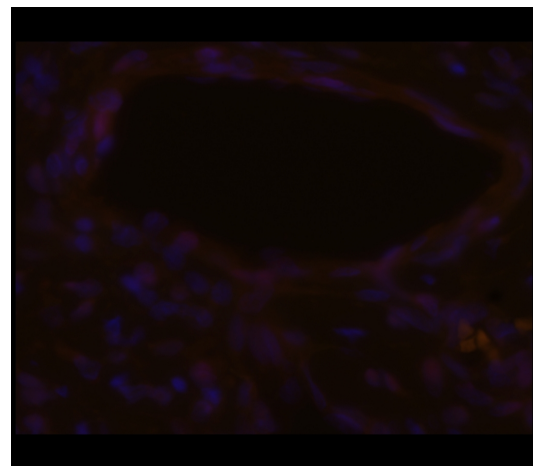


Abb. 19: Immunfluoreszenzfärbung eines Angiofibrom-Gewebes.

A zeigt das mit Antikörper benetzte Gewebe, B die zugehörige Negative Kontrolle. Die Ausschnitte wurden mit einer 60fachen Vergrößerung aufgenommen.

### 5.2.3.2. $\beta$ -Catenin-Expression in Zellkulturen

Die  $\beta$ -Catenin-Expression auf Proteinebene wurde bislang ausschließlich mittels immunhistologischen Färbungen von Gewebeschnitten betrachtet (Rippel et al, 2003, Abraham et al, 2001). Da in dieser Arbeit bislang weder durch die IHC-Färbung von Gewebeschnitten noch durch Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten eine genaue Lokalisation der Anreicherung der WNT-Weg-Proteine definiert werden konnte, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von Zellkulturproben vorgenommen. Die Techniken zur Kultivierung der Zelllinien sind in Kap. 4.5. beschrieben. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden nach dem in Kap. 4.6.1. beschriebenen Protokoll mit dem Antikörper Anti- $\beta$ -Catenin (siehe Kap. 3.2.) durchgeführt.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen von 3 Angiofibrom-Zelllinien und 3 Hautfibroblasten-Zelllinien als Vergleichsgewebe zeigten keine Unterschiede. Sowohl bei den Zellen der Angiofibrome, als auch bei denen der gesunden Hautfibroblasten waren die Zellmembranen und teilweise auch das Cytoplasma stark angefärbt (siehe Abb. 20). Es konnte keine Anreicherung von  $\beta$ -Catenin in den Zellkernen gezeigt werden.

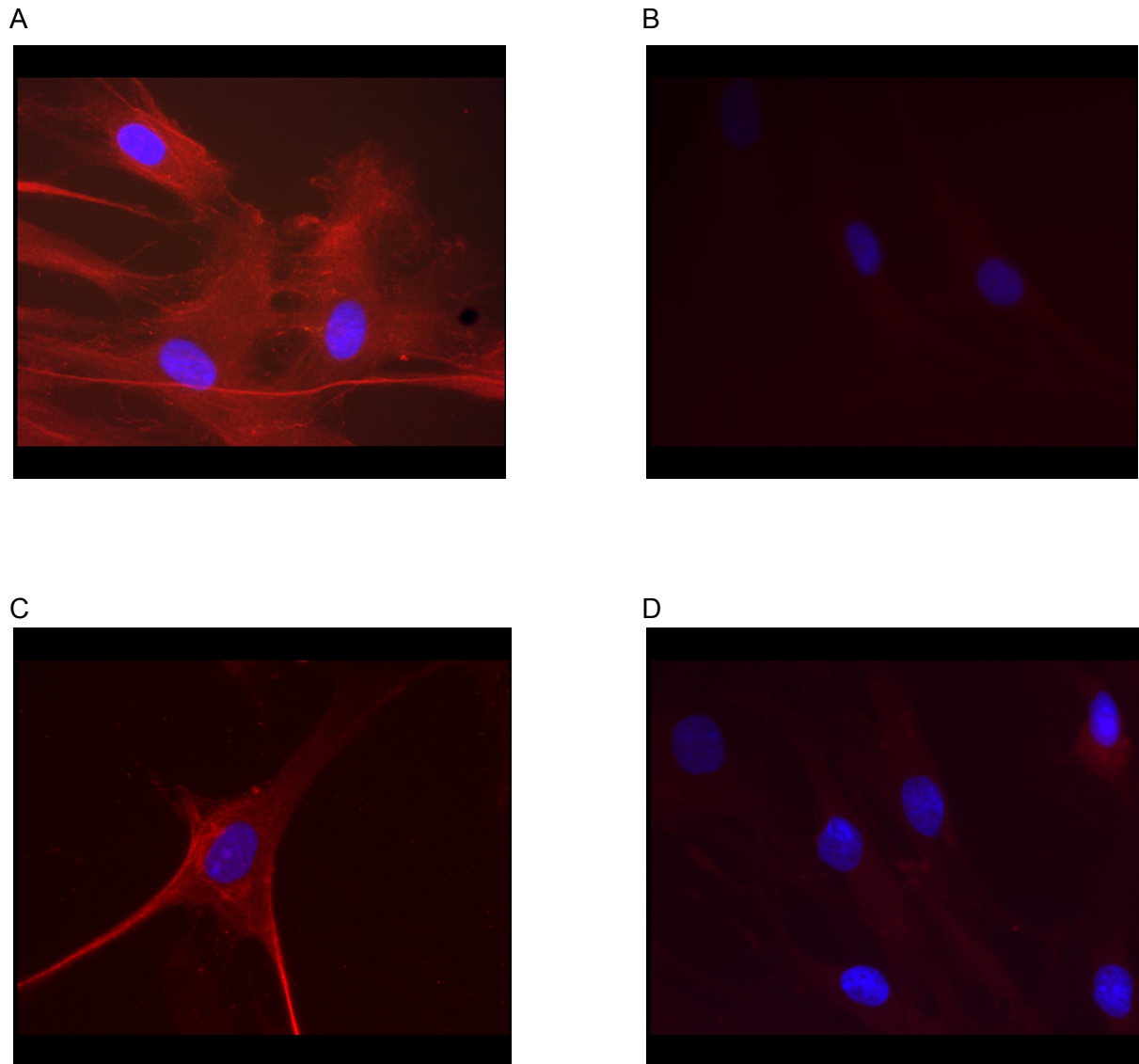


Abb. 20: Immunfluoreszenzfärbung von Zellen mit dem Antikörper Anti- $\beta$ -Catenin (rot detektiert) und einer blauen Kernfärbung mit DAPI. A zeigt die Färbung der Angiofibrom-Zellreihe AF 3076 mit der zugehörigen Negativkontrolle in B, C stellt die gleiche Färbung der Hautfibroblasten-Zellreihe DFF3 dar, D zeigt die entsprechende Negativkontrolle ohne Antikörper. Die Bilder sind mit einer 60fachen Vergrößerung aufgenommen.

## 6. DISKUSSION

Über die Ätiologie des juvenilen Angiofibroms wird seit der Mitte des 19. Jahrhunderts viel diskutiert. Es existieren eine Vielzahl von Theorien über den Ursprung und die Pathogenese des Tumors.

Im Jahr 1942 wurde erstmalig von einer vaskulären Komponente des Tumors berichtet, nachdem endothelial ausgekleidete Gefäßspalten im Tumorgewebe beschrieben wurden (Brunner, 1942). Jahrzehnte später wurden in immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen irreguläre Gefäßstrukturen beobachtet, sodass die Tumoren als vaskuläre Malformation betrachtet wurden (Beham et al., 2000). Schick und Mitarbeiter untersuchten daraufhin die embryologische Gefäßentwicklung und erklärten die vaskuläre Fehlbildung durch die unvollständige Rückbildung der ersten Pharyngealbogenarterie, welche schließlich in der Adoleszenz durch Wachstumsreize zur Ausbildung des Tumors führen kann (Schick et al., 2000). Durch den Nachweis der Expression von Laminin alpha2 in Gefäßen des juvenilen Angiofibroms, welches das Vorhandensein von Gefäßen aus der frühen embryonalen Angiogenese markieren soll, wurde diese Theorie gefestigt (Starlinger et al., 2007). Es konnte außerdem eine signifikante Hochregulierung der Transkripte von *teashirt zinc finger homeobox 1* (TSHZ1) nachgewiesen werden, das Protein TSHZ1 ist ebenfalls bei der Entstehung der ersten Pharyngealbogenarterie beteiligt (Schick et al. 2011, Core et al. 2007).

Doch neben den Endothelzellen werden auch die Bindegewebszellen als Mitbeteiligte in der Tumorphathogenese diskutiert. Renkonen und Mitarbeiter fanden heraus, dass der Wachstumsfaktor C-KIT sowohl im Endothel, als auch im Bindegewebe des juvenilen Angiofibroms verstärkt exprimiert wird (Renkonen et al., 2011). Des Weiteren konnten Dillard und Mitarbeiter den Wachstumsfaktor *transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF $\beta$ 1) sowohl in Fibroblasten als auch in Endothelzellen des Tumors nachweisen (Dillard et al., 2000). Auch in immunhistochemischen Untersuchungen ergaben sich Hinweise, dass es sich bei den Bindegewebszellen um die neoplastischen Zellen des Tumors handeln könnte (Pauli et al., 2008, Abraham et al., 2001).

Eine weitere große Bedeutung wurde der Beobachtung zugeschrieben, dass nahezu ausschließlich männliche Jugendliche am juvenilen Angiofibrom erkranken. Im Jahr 1948 wurde erstmals vermutet, dass eine verminderte Androgenwirkung oder eine überhöhte Östrogenproduktion in der Tumorgenese eine Rolle spielen könnte (Martin et al., 1948). Ein von Dane und Mitarbeiter vermuteter Androgenüberschuss bei erkrankten Patienten konnte 1987 durch die Messung altersentsprechend normaler Serumspiegel von Testosteron, Dihydrotestosteron und Östradiol relativiert werden (Faray et al., 1987, Dane et al., 1954).

Im Verlauf wurden in den Tumorgeweben sowohl eine vermehrte Expression der Östrogenrezeptoren vom Typ B als auch der Androgenrezeptoren nachgewiesen (Montag et al., 2006, Hwang et al., 1998). Schließlich konnten Schick und Mitarbeiter signifikante Verluste des Y-Chromosoms beim juvenilen Angiofibrom zeigen, sowie zusätzliche X-Chromosomen in mehreren Tumoren (Schick et al., 2003, Brunner et al., 2003). Die Androgenrezeptoren sind auf dem X-Chromosom in der Region Xq11-12 lokalisiert, sodass diese Erkenntnisse für eine Androgen-Abhängigkeit des juvenilen Angiofibroms sprechen (Brown et al., 1989).

Neben den zusätzlichen X-Chromosomen und den Verlusten des Y-Chromosoms konnten weitere zahlreiche chromosomale Veränderungen im juvenilen Angiofibrom festgestellt werden. Es konnten sowohl Gewinne als auch Verluste auf verschiedenen Chromosomen nachgewiesen werden, wobei insgesamt häufiger chromosomale Gewinne beobachtet wurden, was zur Annahme führt, dass die Überexpression von Onkogenen eine größere Rolle in der Tumorgenese spielt, als der Verlust von Tumorsuppressorgenen (Heinrich et al., 2007, Schick et al., 2007). So wird unter anderem das Protoonkogen C-MYC und das Onkogen BMI-1 verstärkt in Bindegewebszellen des juvenilen Angiofibroms exprimiert (Renkonen et al., 2011). Des Weiteren wurden Deletionen auf Chromosom 17 aufgezeigt, wodurch es vermutlich zu einem Genverlust des Wachstumsfaktor-Rezeptor Her-2/neu und dem Tumorsuppressorgen p53 kommt (Schick et al., 2005).

Nachdem beobachtet wurde, dass Patienten mit FAP etwa 25 mal häufiger an einem juvenilen Angiofibrom leiden als zuvor gesunde Patienten, erhob sich der Verdacht, dass der WNT-Signalweg eine erhebliche Rolle in der Tumorentstehung spielen könnte (Ferouz et al., 1995, Giardiello et al., 1993). Denn für die Entstehung einer FAP sind Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen APC verantwortlich, welches wiederum über die Regulation des Proteins  $\beta$ -Catenin eine wichtige Rolle im WNT-Signalweg spielt (siehe Kap. 2.1.5 und Kap. 2.2) (Kinzler et al., 1991, Nishisho et al., 1991). Über den WNT-Signalweg werden die WNT-Zielgene im Zellkern und somit unter anderem der Zellzyklus aktiviert. Mutationen in dieser Signalkaskade führen über eine Akkumulation des  $\beta$ -Catenin-Proteins im Zellkern beispielsweise zu Krebserkrankungen (Clevers, 2006, Polakis, 2000).

Das Protein  $\beta$ -Catenin ist der Haupteffektor des WNT-Signalwegs.  $\beta$ -Catenin-Mutationen wurden in einer Vielzahl maligner Tumoren gefunden, unter anderem bei hepatozellulären Karzinomen, Tumoren der Prostata, der Haut und des Endometrium (Chan et al., 1999, Fukuchi et al., 1998, Miyochi et al., 1998, Voeller et al., 1998). Auch im juvenilen Angiofibrom konnten deutlich erhöhte  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel und  $\beta$ -Catenin-Mutationen in 75 % der untersuchten Tumoren nachgewiesen werden (Rippel et al. 2003, Zhang et al., 2003, Abraham et al., 2001). Neben den  $\beta$ -Catenin-Mutationen werden noch andere Mechanismen für die Erhöhung des Proteinlevels diskutiert.



So wird zum Beispiel der *Insulin-like growth factor II* (IGF-II) signifikant verstärkt im juvenilen Angiofibrom exprimiert, von dessen fetaler Form, dem *Insulin-like growth factor I* (IGF-I) bekannt ist, dass er als Inhibitor von GSK3 $\beta$  stabilisierend auf  $\beta$ -Catenin wirkt (Playford et al., 2000, Nagai et al., 1996). Des Weiteren konnten Lerner und Mitarbeiter eine verminderte Expression der microRNA 218 im juvenilen Angiofibrom nachweisen, was ebenfalls in der Stabilisierung und Akkumulation von  $\beta$ -Catenin resultiert (Lerner et al., 2014, Alqurashi et al., 2013, Uesugi et al., 2011, Katoh et al., 2006). Dass der WNT-Signalweg außerdem in der embryologischen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt und es durch Mutationen zu Fehlbildungen beim Neugeborenen kommen kann, unterstreicht den Gedanken das juvenile Angiofibrom als embryologische Gefäßmalformation einzustufen (Petersen et al., 2009, Beham et al., 2000).

Neben der Bedeutung im WNT-Signalweg ist das Protein  $\beta$ -Catenin unter anderem auch als Co-Aktivatoren von Androgenrezeptoren wirksam, sodass hier wiederum eine Verbindung mit der Androgenabhängigkeit des juvenilen Angiofibroms gesehen werden kann (Koh et al., 2002, Pawlowski et al., 2002). Insgesamt wird in dem Protein  $\beta$ -Catenin und dem WNT-Signalweg aufgrund der häufigen Nachweise von Mutationen ein wichtiger Faktor in der Tumorphathogenese des Angiofibroms vermutet.

### 6.1. Veränderungen des WNT-Signalwegs auf DNA-Ebene

Trotz des erhöhten Risikos der an FAP erkrankten Patienten ein juveniles Angiofibrom zu entwickeln, konnten bislang keine Mutationen im APC-Gen im juvenilen Angiofibrom festgestellt werden (Abraham et al., 2001, Guertl et al., 2000, Ferouz et al., 1995). Abraham und Mitarbeiter fanden jedoch in 75 % ihrer untersuchten Tumoren Mutationen im Exon 3 des  $\beta$ -Catenin-Gens (Abraham et al., 2001). Dies sind größtenteils Punktmutationen in den Codons 33 und 37, welche zum Verlust der Serin- / Threonin-Bindungsstelle für GSK3 $\beta$  führen, sodass es in der Folge zu einer verminderten Phosphorylierung und somit zum reduzierten Abbau von  $\beta$ -Catenin kommt (Aberle et al., 1997, Yost et al., 1996, Pfeifer et al., 1994). Hieraus resultieren erhöhte  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel in der Zelle und im Zellkern. Die Mutationen im Bereich der GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle wurden auch in kolorektalen und hepatozellulären Karzinomen, sowie in Tumoren der Haut und den Geschlechtsorganen nachgewiesen (Spaans et al., 2014, Chan et al., 1999, Miyochi et al., 1998, Voeller et al., 1998, Rubinfeld et al., 1997).

Durch die Untersuchungen dieser Arbeit konnte die Beobachtung von Abraham und Mitarbeiter bestätigt werden (Abraham et al., 2001). Neben den bereits bekannten Punktmutationen im Codon 33 wurde in einem der 5 Tumoren eine nach unserem Wissen bislang für juvenile Angiofibrome nicht vorbeschriebene Mutation im Codon 32 detektiert. Diese Punktmutation führt nicht wie die Mutation im Codon 33 direkt zum Verlust der Serin-Bindungsstelle, sie liegt jedoch in unmittelbarer Nähe dazu, sodass der Verdacht nahe liegt, dass auch diese Mutation die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin beeinträchtigt. In anderen Tumoren wie dem hepatozellulären Karzinom, Desmoid-Tumoren und beim Endometrium-Karzinom ist die Punktmutation im Codon 32 bereits bekannt, was ebenfalls dafür spricht, dass es durch den Aminosäureaustausch von Asparagin und Valin zu signifikanten Veränderungen am  $\beta$ -Catenin-Protein kommt (Flucke et al., 2014, Spaans et al., 2014, De la Coste et al., 1998). Anhand von weiteren Sequenzierungen durch unsere Arbeitsgruppe an einer größeren Anzahl von Tumoren konnten im Exon 3 weitere fünf Missense-Mutationen und eine Deletion im Bereich der GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle gezeigt werden, die ebenfalls bereits in anderen Tumoren, jedoch bislang nicht im juvenilen Angiofibrom, gesichert wurden (Wemmert et al., 2015, De la Coste et al., 1998, Iwao et al., 1998).

Um nach weiteren Mutationen in bislang nicht untersuchten Bereichen des  $\beta$ -Catenin-Gens zu suchen, wurden in dieser Arbeit die Codons 21 bis 422 sequenziert, welche neben der GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle unter anderem auch die Bindungsstellen von APC und Axin2 beinhalten. In diesem Bereich konnte in keinem der 5 juvenilen Angiofibrome relevante Veränderungen detektiert werden. Mituntersucht wurde auch die Aminosäure Threonin 393, welche die hauptsächliche Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase CK2 darstellt. CK2 ist ein positiver Regulator des WNT-Signalwegs und führt über die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin an der Aminosäure Threonin 393 zu einer gesteigerten Resistenz gegen die Proteasomen und damit zu einem erhöhten  $\beta$ -Catenin-Level. Auch hier zeigten sich in keinem der 5 Tumoren Mutationen.

Als wichtigstes Bindungsprotein für den WNT-Signalweg wurde außerdem das Axin2-Gen auf Mutationen untersucht. In kolorektalen Karzinomen, bei denen weder APC- noch  $\beta$ -Catenin-Mutationen vorhanden waren, konnten Lammi und Mitarbeiter für die Tumorentstehung verantwortliche Axin2-Mutationen im Exon 7 aufzeigen (Lammi et al., 2004).

In dieser Arbeit wurden die Codons 1 bis 507 des Axin2-Gens sequenziert, welche den Bereich der Exons 2 bis 5 beinhalten. In diesem Abschnitt liegen sowohl die GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle als auch die  $\beta$ -Catenin-Bindungsstelle. In allen 5 Tumoren konnte eine Punktmutation im Codon 50 nachgewiesen werden, welche zu einem Austausch der Aminosäure Serin durch Prolin führt.

Nachdem die Mutation auch in einem der beiden gesunden Nasenmuschelgeweben gefunden wurde, folgte zur Kontrolle eine Sequenzierung von gesundem Zahnfleischgewebe, in welchem die Mutation ebenfalls gezeigt werden konnte. Somit ist zu vermuten, dass es sich hier um einen Polymorphismus ohne größere Relevanz für die Tumorentstehung handelt.

Neben dieser Punktmutation konnte im untersuchten Sequenzbereich eine nach unserem Wissen bislang unbekannte Axin2-Variante in 4 von 5 untersuchten Tumoren nachgewiesen werden. Durch die Deletion von 115 bp kommt es zu einer Rahmenverschiebung am N-terminalen Ende. Bei genauerem Hinsehen erkennt man, dass die Schnittstellen der entfernten Sequenz identisch sind mit den allgemein bekannten Consensus-Sequenzen einer Spleißstelle, sodass es sich hier mutmaßlich um eine neue Spleißvariante des Axin2-Gens handelt. Dass die Axin2-Variante nur in den Tumoren, nicht aber in den gesunden Nasenmuschelgeweben nachgewiesen wurde, passt zum fehlenden Nachweis von sonstigen relevanten Mutationen im Axin2-Gen und lässt eine Rolle in der Tumorphagenese vermuten. Die deletierte Sequenz beinhaltet sowohl die GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle, als auch einen Teil der  $\beta$ -Catenin-Bindungsstelle, was diese These noch verstärkt (Behrens et al., 1998). Des Weiteren konnten Liu und Mitarbeiter in einer vorangegangenen Studie am Kolonkarzinom zeigen, dass es in Zellen, die zuvor mit einer mutierten Axin2-Variante transfiziert wurden, zu einer Induktion der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Transkription der Zielgene im Zellkern kommt (Liu et al., 2000). Die Autoren vermuteten, dass es durch die Axin2-Frameshift-Mutation zu einer Aktivierung des WNT-Signalwegs über den Verlust des negativen Feedback durch Axin2 kommt (Liu et al., 2000).

## 6.2. Veränderungen des WNT-Signalwegs auf RNA-Ebene

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation des  $\beta$ -Catenin-Gens, die zur Verlängerung der Halbwertszeit des  $\beta$ -Catenin-Proteins führt, nicht der einzige Mechanismus ist, durch welchen es zu einer Anreicherung von  $\beta$ -Catenin kommt. Es wurden qRT-PCRs für die WNT-Weg-Gene  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , APC, Axin1 und Axin2 an denselben 5 juvenilen Angiofibromen und 2 Nasenmuschelgeweben durchgeführt, die auch für die Sequenzierungen verwendet wurden. Die untersuchten Tumoren zeigten teils deutlich erhöhte RNA-Expressionsraten an  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , APC und Axin2 im Vergleich zu den gesunden Geweben. Lediglich die Transkriptrate von Axin1 zeigte in keinem der Tumoren auffällige Veränderungen.

Die erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinspiegel scheinen folglich eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung des juvenilen Angiofibroms zu spielen, da nun bereits zwei Mechanismen, sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene bekannt sind, die darauf abzielen  $\beta$ -Catenin in der Zelle anzureichern. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass der einzige Tumor (AF 357), in dem keine Mutation im  $\beta$ -Catenin-Gen nachgewiesen werden konnte, die höchsten Transkriptionslevel für  $\beta$ -Catenin aufweist. Im Tumorgewebe AF 356, in welchem die bislang für juvenile Angiofibrome nicht bekannte Mutation im Codon 32 dokumentiert wurde, konnten in der qRT-PCR nur 2fach erhöhte Transkriptionsraten von  $\beta$ -Catenin im Vergleich zum gesunden Gewebe nachgewiesen werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Punktmutation, welche in unmittelbarer Nähe zur GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle liegt, sogar noch höhere  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel zur Konsequenz hat als die bereits bekannten Mutationen.

Bis auf Axin1 waren auch die RNA-Expressionsraten der anderen untersuchten Gene teils deutlich erhöht. Dies könnte auf den Versuch einer automatischen Signalregulation hindeuten, um die pathologisch erhöhten  $\beta$ -Catenin-Level zu senken. Diese Reaktionen sind jedoch vermutlich aufgrund der Mutation an der GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle zumindest in 4 von 5 Tumoren ineffektiv. Axin1 und Axin2 sind in vivo funktionell gleich, wobei Axin1 konstitutiv aktiv ist und Axin2 erst durch das WNT-Signal aktiviert wird und als negatives Feedback wirkt (Chia und Constantini, 2005, Leung et al., 2002, Jho et al., 2002, Behrens et al., 1998). Somit spielt nur Axin2 eine Rolle in der Signalregulation und wird vom Tumor verstärkt exprimiert. Von den anderen Proteinen, bei denen ebenfalls erhöhte Transkriptlevel gezeigt werden konnten, ist bislang kein transkriptionelles Feedback bekannt. Die vermehrte Transkription von Axin2 könnte außerdem aufgrund der neuen Axin2-Variante ineffizient sein, da der fehlende Sequenzbereich die GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle, sowie einen Teil der  $\beta$ -Catenin-Bindungsstelle, enthält. Die Hochregulierung von GSK3 $\beta$  kann möglicherweise aufgrund einer möglichen Inhibierung durch IGF-I ineffektiv sein.

Um die Ergebnisse der erhöhten Transkriptionsraten zu verifizieren, wurden qRT-PCRs der Gene  $\beta$ -Catenin, Axin2, APC und GSK3 $\beta$  an einer größeren Anzahl von juvenilen Angiofibromen und gesunden Nasenmuscheln durch unsere Kooperationspartner der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikum Erlangen durchgeführt. Die teils deutlich erhöhten RNA-Expressionsraten konnten hierdurch bestätigt werden. Des Weiteren wurden die Transkriptionsraten der neuen Axin2-Variante bei den Tumoren und den gesunden Geweben bestimmt. Die Axin2-Variante wurde in allen Geweben exprimiert, jedoch in den Angiofibrom-Geweben deutlich verstärkt im Vergleich zu den Nasenmuschel-Geweben. Diese größtenteils deutlich erhöhten Transkriptlevel der Axin2-Variante in den juvenilen Angiofibromen könnten ein weiterer Mechanismus für die erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel darstellen.

### 6.3. Veränderungen des WNT-Signalwegs auf Proteinebene

Die Proteinlevel der WNT-Signalweg-Proteine wurden durch Abraham und Mitarbeiter für  $\beta$ -Catenin mittels immunhistochemischer Färbungen bestimmt (Abraham et al., 2001). Es konnten erhöhte  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel in den Nuklei von Bindegewebszellen nachgewiesen werden, was die Untersuchungen von Zhang und Mitarbeiter nachfolgend bestätigten (Zhang et al., 2003, Abraham et al., 2001). Die Verfasser äußerten deshalb die Vermutung, dass es sich bei den Bindegewebszellen, die in den Angiofibromen größtenteils undifferenziert ausgebildet sind, und nicht bei den Endothelzellen um die neoplastischen Zellen des juvenilen Angiofibroms handeln müsse (Pauli et al., 2008, Abraham et al., 2001). Bis dato waren aufgrund der Vielzahl von überwiegend irregulär geformten und nicht vollständig ausgebildeten Gefäßen eher die Endothelzellen als die vorwiegend neoplastischen Zellen diskutiert worden (Schick et al., 2002, Beham et al., 2000, Beham et al., 1993, Schiff, 1959, Hubbard, 1958, Sternberg et al., 1954, Brunner 1942). Rippel und Mitarbeiter zeigten im Verlauf, dass  $\beta$ -Catenin in Angiofibromen ebenso vermehrt in den Endothelzellen exprimiert wird (Rippel et al., 2003). Insgesamt ist das Verhältnis von Gefäßen und Bindegewebe sehr variabel, es sind sowohl Bereiche mit einem überwiegenden Anteil von Gefäßstrukturen, als auch Abschnitte mit vermehrtem Bindegewebsstroma vorhanden (Schick, 2007).

In dieser Arbeit wurden neben  $\beta$ -Catenin erstmals die Proteinexpressionen der WNT-Weg-Proteine GSK3 $\beta$ , APC, Axin1 und Axin2 im juvenilen Angiofibrom untersucht. Aufgrund der begrenzten Gewebemenge konnten hierfür nicht dieselben Gewebe wie in der qRT-PCR und den Sequenzierungen verwendet werden, sodass ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen hier nicht möglich ist. Das  $\beta$ -Catenin-Protein reicherte sich diffus in allen 8 untersuchten Angiofibrom-Geweben, sowohl in den Endothel- als auch in den Bindegewebszellen, an. Hiervon zeigten 6 von den 8 Tumoren deutlich stärkere Färbungen als die Nasenmuschel-Gewebe. Hiermit kann die Beobachtung von Abraham und Mitarbeiter einer verstärkten  $\beta$ -Catenin-Expression in juvenilen Angiofibromen bestätigt werden (Abraham et al., 2001). Deren Vermutung, dass es sich aufgrund einer betont nukleären Anreicherung in den Fibroblasten um einen Tumor mit neoplastischem Ursprung in den Bindegewebszellen handelt, kann jedoch durch unsere Ergebnisse nicht geteilt werden. Die  $\beta$ -Catenin-Anreicherung konnte in dieser Arbeit sowohl in den Bindegewebs- als auch in den Endothelzellen nachgewiesen werden, was die Untersuchungen von Rippel und Mitarbeiter mittels FISH-Analysen bestätigt (Rippel et al., 2003). Aus diesen Ergebnissen können keine Rückschlüsse über den Ursprung der neoplastischen Zellen gezogen werden. Da aufgrund von zu starken Signalen keine Hämalaun-Kernfärbungen durchgeführt wurden, kann auch keine Aussage über die genaue Lokalisation der Proteinanreicherung gemacht werden.

Dass  $\beta$ -Catenin ebenfalls eine wichtige Funktion als Zell-Zell-Verbindung innehat, zeigte sich bei den Drüsen der gesunden Nasenmuschel-Gewebe, die in diesem Bereich verstärkt  $\beta$ -Catenin exprimiert hatten. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die starken Schwankungen der  $\beta$ -Catenin-Expression in den Nasenmuschel-Geweben bei der qRT-PCR sein. Die teils höheren Expressionsraten könnten durch vermehrtes Drüsengewebe im aufgearbeiteten Gewebstück zustande kommen. In den juvenilen Angiofibromen zeigten sich die  $\beta$ -Catenin-Anreicherungen im Vergleich zur Nasenmuschel deutlich weniger an den Zell-Zell-Verbindungen und vermehrt im Zellinneren.  $\beta$ -Catenin könnte in den Tumoren eine geringere Bedeutung als Zytoskelett als im gesunden Gewebe haben.

Alle untersuchten juvenilen Angiofibrome zeigten starke Anreicherungen von Axin2 im Vergleich zu einer schwachen Färbung der Nasenmuschelgewebe. Anderson und Mitarbeiter konnten in kolorektalen Polypen und Karzinomen ebenfalls eine veränderte Proteinexpression in den Zellen im Vergleich zu gesunden Geweben feststellen (Anderson et al., 2002). Dies deutet erneut auf den Versuch einer automatischen Signalregulation hin, um die erhöhten  $\beta$ -Catenin-Level in den juvenilen Angiofibromen zu senken.

Keine wesentlichen Unterschiede in der Expression zwischen juvenilen Angiofibromen und den gesunden Geweben konnte beim Protein APC festgestellt werden. Bei kolorektalen Polypen und Karzinomen konnte gezeigt werden, dass APC nicht mehr im Zellkern, sondern vermehrt im Zytoplasma lokalisiert ist (Anderson et al., 2002). Diese Differenzierung war hier nicht möglich, da die Färbungen ohne die Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer ausgewertet wurden. Das Protein GSK3 $\beta$  zeigte in 6 Tumoren sehr variabel starke Färbungen, in 2 Angiofibromen jedoch keine Anreicherungen. Die gesunden Normalgewebe waren beide schwach gefärbt. Auch bei GSK3 $\beta$  waren wieder verstärkte Färbungen der Drüsengewebe bei den Normalgeweben zu finden, hier waren ebenfalls starke Schwankungen in der qRT-PCR beobachtet worden. Alternativ könnten die sehr unterschiedlichen RNA-Expressionen und Proteinanreicherungen bei GSK3 $\beta$  auch im Rahmen von möglichen, bislang nicht untersuchten Mutationen diskutiert werden. Passend zu den Ergebnissen der qRT-PCR konnte gleich wie auf RNA-Ebene beim Protein Axin1 kaum eine Expression in den Angiofibrom-Geweben und in den Nasenmuschel-Geweben nachgewiesen werden, vermutlich da es in der Signalregulation keine Rolle spielt.

Um genauere Aussagen bezüglich der exakten Lokalisation der Proteinanreicherung im juvenilen Angiofibrom machen zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit einem  $\beta$ -Catenin-Antikörper an Angiofibrom- und Nasenmuschelgewebsschnitten durchgeführt, welche jedoch aufgrund von zu starken Hintergrundsignalen nicht ausgewertet werden konnten.

Die Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin war bislang nur an Gewebeschnitten untersucht worden, nicht aber an Zellkulturen.

Daher wurden Zellkulturlinien von Angiofibromen und gesunden Hautfibroblasten etabliert und hieran Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen  $\beta$ -Catenin und einer DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Sowohl bei den Angiofibromzellen als auch bei den Zellen der Hautfibroblasten waren das Zytoplasma und verstärkt die Zellmembranen angefärbt. Die hier fehlende Anreicherung von  $\beta$ -Catenin in den Zellkernen der Angiofibromzellen lässt vermuten, dass  $\beta$ -Catenin in der Zellkultur von Angiofibromen nur noch Funktion als Zytoskelett hat. Alternativ könnten in den Zellkulturen nur Fibroblasten anstatt Tumorzellen gewachsen sein, in denen  $\beta$ -Catenin vordergründig als Strukturprotein an Zell-Zell-Verbindungen beteiligt ist.

#### 6.4. Ausblick

Verschiedene Mechanismen führen zu erhöhten  $\beta$ -Catenin-Level im juvenilen Angiofibrom, was für eine hohe Relevanz des WNT-Signalwegs in der Tumorphathogenese spricht. Die erhöhten  $\beta$ -Catenin-Spiegel führen nicht nur zur erhöhten Zellproliferation über die Aktivierung des TCF/LEF-Komplexes und weiterer Zielgene im Zellkern.  $\beta$ -Catenin fungiert unter anderem auch als Coaktivator von Androgenrezeptoren, von denen ebenfalls eine gesteigerte Expression im juvenilen Angiofibrom nachgewiesen wurde, und stimuliert hierdurch als Folge der Wirkung von Dihydrotestosteron die Transkription (Koh et al., 2002, Pawlowski et al., 2002, Yang et al., 2002, Hwang et al., 1998). Die Androgenrezeptoren interagieren wiederum mit dem  $\beta$ -Catenin-Protein und funktionieren als Transportprotein für die nukleäre Translokation des zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenins, welches aufgrund seiner Größe von ca. 95-kDa nicht alleine in den Zellkern übertreten kann (Pawlowski et al., 2002). Die erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinlevel in Verbindung mit der gesteigerten Expression der Androgenrezeptoren und der Interaktion zwischen beiden erklärt, warum das juvenile Angiofibrom hauptsächlich in der Adoleszenz bei männlichen Jugendlichen proliferiert (Rippel et al., 2003). Dass eine antiandrogene Therapie nur zu einer partiellen Regression der Angiofibrome führt, kann wiederum durch die hohe  $\beta$ -Catenin-Expression begründet sein, da diese die Absenkung des Hormonspiegels teilweise kompensieren kann (Yang et al., 2002, Gates et al., 1992).

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass neben der erhöhten Proteinhalbwertszeit durch den verminderten Abbau bereits auf RNA-Ebene erhöhte  $\beta$ -Catenin-Transkriptmengen entstehen. Nun müssen weitere Untersuchungen folgen, die die hierfür ursächlichen genetischen oder regulatorischen Veränderungen identifizieren können.

Anschließende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe mittels CGH, FISH und genomischer Real-time PCR zeigten diesbezüglich bereits, dass Zugewinne der Genkopien des  $\beta$ -Catenin-Gen im juvenilen Angiofibrom vorliegen (Wemmert et al., 2015). Dies spricht für einen weiteren Mechanismus, der zu erhöhten  $\beta$ -Catenin-Proteinleveln führt und der in vorangegangenen Untersuchungen bei Magentumoren ebenfalls als Verursacher von hohen Proteinleveln diskutiert wurde (Suriano et al., 2005). Nicht zu vergessen sind Untersuchungen von Yang und Mitarbeiter, die zeigen, dass eine nukleare Akkumulation von  $\beta$ -Catenin auch unabhängig des WNT-Signalweges durch phosphoryliertes p68 hervorgerufen werden kann (Yang et al., 2006). p68 ist eine RNA Helicase, welche  $\beta$ -Catenin vom Axin-Komplex entfernen und in den Zellkern transportieren kann. Der Einfluss dieses Proteins auf die  $\beta$ -Catenin-Akkumulation im juvenilen Angiofibrom wurde bislang ebenfalls nicht untersucht. Außerdem gilt es herauszufinden, ob Veränderungen des  $\beta$ -Catenin-Proteinlevels in vitro möglich sind und sich begünstigend auf den Tumor auswirken können. Es sind beispielsweise Versuche mit Antikörpern gegen aktiviertes  $\beta$ -Catenin auf Proteinebene denkbar.

Des Weiteren könnte die Sequenzierung des GSK3 $\beta$ -Gens weiterführende Ergebnisse für die Tumorphagenese liefern, da nicht alle Tumoren Mutationen im  $\beta$ -Catenin-Gen an der GSK3 $\beta$ -Bindungsstelle aufweisen. Möglicherweise sind neben den gezeigten  $\beta$ -Catenin-Mutationen, den  $\beta$ -Catenin-Gen-Amplifikationen und den erhöhten RNA-Expressionsraten auch Veränderungen im GSK3 $\beta$ -Gen für die Hochregulierung von  $\beta$ -Catenin verantwortlich.

Ein weiteres Thema von Forschungen muss das Axin2-Gen mit der neu identifizierten Spleißvariante sein. Die Axin2-Variante konnte in dieser Arbeit zwar nicht im gesunden Nasenmuschelgewebe, jedoch in gesundem Zahnfleischgewebe nachgewiesen werden. Es müssen daher Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Tumoren und gesundem Gewebe erfolgen, um die Relevanz für die Tumorentstehung zu bestätigen. Die Variante könnte auch in anderen Tumoren eine Rolle in der Tumorphagenese spielen. Es gilt herauszufinden, zu welchen Veränderungen im Protein es durch die veränderte Sequenz kommt. Interessant ist auch, dass die Axin2-Variante in den Tumoren erhöhte Transkriptlevel aufzeigt. Dieser Mechanismus muss ebenfalls geklärt werden.

In der vorliegenden Dissertation nur teils untersucht wurde die im Exon 1 liegende APC-Bindungsdomäne des Axin2-Gens. Neben dieser sollte auch das Exon 7 des Axin2-Gens Gegenstand von nachfolgenden Forschungen sein, denn in kolorektalen Karzinomen konnten hier für die Pathogenese relevante Mutationen detektiert werden (Lammi et al., 2004).



## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997) Beta-Catenin is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *The EMBO journal* 16:3797-3804
2. Abraham SC, Montgomery EA, Giardiello FM, Wu TT (2001) Frequent beta-catenin mutations in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *The American journal of pathology* 158:1073-1078
3. Alqurashi N, Hashimi SM, Wei MQ (2013) Chemical Inhibitors and microRNAs (miRNA) Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway: Potential for Novel Anticancer Therapeutics. *International journal of molecular sciences* 14:3874-3900
4. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I (2002) Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes & development* 16:1066-1076
5. Anderson CB, Neufeld KL, White RL (2002) Subcellular distribution of Wnt pathway proteins in normal and neoplastic colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8683-8688
6. Andrews JC, Fisch U, Valavanis A, Aeppli U, Makek MS (1989) The surgical management of extensive nasopharyngeal angiofibromas with the infratemporal fossa approach. *The Laryngoscope* 99:429-437
7. Beham A, Beham-Schmid C, Regauer S, Aubock L, Stammberger H (2000) Nasopharyngeal angiofibroma: true neoplasm or vascular malformation? *Advances in Anatomic Pathology* 7:36-46
8. Beham A, Fletcher CD, Kainz J, Schmid C, Humer U (1993) Nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistochemical study of 32 cases. *Virchows Archiv.A, Pathological anatomy and histopathology* 423:281-285
9. Beham A, Kainz J, Stammberger H, Aubock L, Beham-Schmid C (1997) Immunohistochemical and electron microscopical characterization of stromal cells in nasopharyngeal angiofibromas. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 254:196-199
10. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science (New York, N.Y.)* 280:596-599
11. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382:638-642
12. Bienz M (1998) TCF: transcriptional activator or repressor? *Current opinion in cell biology* 10:366-372
13. Bosraty H, Atef A, Aziz M (2011) Endoscopic vs. open surgery for treating large, locally advanced juvenile angiofibromas: a comparison of local control and morbidity outcomes. *Ear, nose, & throat journal* 90:529-534

14. Brentani MM, Butugan O, Oshima CT, Torloni H, Paiva LJ (1989) Multiple steroid receptors in nasopharyngeal angiofibromas. *The Laryngoscope* 99:398-401
15. Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF (1989) Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 44:264-269
16. Brunner H (1942) Nasopharyngeal angiofibroma. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol.* 51:29-65
17. Brunner C, Urbschat S, Jung V, Praetorius M, Schick B, Plinkert PK (2003) Chromosomal alterations in juvenile angiofibromas. *HNO* 51:981-985
18. Carrau RL, Snyderman CH, Kassam AB, Jungreis CA (2001) Endoscopic and endoscopic-assisted surgery for juvenile angiofibroma. *The Laryngoscope* 111:483-487
19. Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E (1999) A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nature genetics* 21:410-413
20. Chia IV and Costantini F (2005) Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent in vivo. *Molecular and cellular biology* 25:4371-4376
21. Choi J, Park SY, Costantini F, Jho EH, Joo CK (2004) Adenomatous polyposis coli is down-regulated by the ubiquitin-proteasome pathway in a process facilitated by Axin. *The Journal of biological chemistry* 279:49188-49198
22. Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-480
23. Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA (2008) Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes & development* 22:746-755
24. Core N, Caubit X, Metchat A, Boned A, Djabali M, Fasano L (2007) Tshz1 is required for axial skeleton, soft palate and middle ear development in mice. *Developmental biology* 308:407-420
25. Coutinho CM, Bassini AS, Gutierrez LG, Butugan O, Kowalski LP, Brentani MM, Nagai MA (1999) Genetic alterations in Ki-ras and Ha-ras genes in juvenile nasopharyngeal angiofibromas and head and neck cancer. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina* 117:113-120
26. Dajani R, Fraser E, Roe SM, Yeo M, Good VM, Thompson V, Dale TC, Pearl LH (2003) Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3beta to the axin-APC scaffold complex. *The EMBO journal* 22:494-501
27. DANE WH (1954) Juvenile nasopharyngeal fibroma in state of regression. *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology* 63:997-1014
28. Daniels DL and Weis WI (2005) Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology* 12:364-371
29. Dare AO, Gibbons KJ, Proulx GM, Fenstermaker RA (2003) Resection followed by radiosurgery for advanced juvenile nasopharyngeal angiofibroma: report of two cases. *Neurosurgery* 52:1207-11; discussion 1211

30. de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C (1998) Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:8847-8851
31. de Necochea Campion R, Ghochikyan A, Josephs SF, Zacharias S, Woods E, Karimi-Busheri F, Alexandrescu DT, Chen CS, Agadjanyan MG, Carrier E (2011) Expression of the Epigenetic factor BORIS (CTCF) in the Human Genome. *Journal of translational medicine* 9:213
32. Dillard DG, Cohen C, Muller S, Del Gaudio J, Reichman O, Parrish B, Rackley D, Gal AA (2000) Immunolocalization of activated transforming growth factor beta1 in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Archives of Otolaryngology--Head & Neck Surgery* 126:723-725
33. Dohar JE and Duvall AJ,3rd (1992) Spontaneous regression of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology* 101:469-471
34. Duerr S, Wendler O, Aigner T, Karosi S, Schick B (2008) Metalloproteinases in juvenile angiofibroma--a collagen rich tumor. *Human pathology* 39:259-268
35. Ewing JA and Shively EH (1981) Angiofibroma: a rare case in an elderly female. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 89:602-603
36. Farag MM, Ghanimah SE, Ragaie A, Saleem TH (1987) Hormonal receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *The Laryngoscope* 97:208-211
37. Ferouz AS, Mohr RM, Paul P (1995) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma and familial adenomatous polyposis: an association? *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 113:435-439
38. Flucke U, Tops BB, van Diest PJ, Slootweg PJ (2014) Desmoid-type fibromatosis of the head and neck region in the paediatric population: a clinicopathological and genetic study of seven cases. *Histopathology* 64:769-776
39. Fodde R (2003) The multiple functions of tumour suppressors: it's all in APC. *Nature cell biology* 5:190-192
40. Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S (1998) Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer research* 58:3526-3528
41. Gates GA, Rice DH, Koopmann CF,Jr, Schuller DE (1992) Flutamide-induced regression of angiofibroma. *The Laryngoscope* 102:641-644
42. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Offerhaus JA, Booker SV, Petersen GM (1993) Nasopharyngeal angiofibroma in patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 105:1550-1552
43. Giavroglou C, Constantinidis J, Triaridis S, Daniilidis J, Dimitriadis A (2007) Angiographic evaluation and embolization of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *HNO* 55:36-41
44. Glad H, Vainer B, Buchwald C, Petersen BL, Theilgaard SA, Bonvin P, Lajer C, Jakobsen J (2007) Juvenile nasopharyngeal angiofibromas in Denmark 1981-2003: diagnosis, incidence, and treatment. *Acta Oto-Laryngologica* 127:292-299

45. Goepfert H, Cangir A, Lee YY (1985) Chemotherapy for aggressive juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Archives of otolaryngology* (Chicago, Ill.: 1960) 111:285-289
46. Gramann M, Wendler O, Haeberle L, Schick B (2009a) Expression of collagen types I, II and III in juvenile angiofibromas. *Cells, tissues, organs* 189:403-409
47. Gramann M, Wendler O, Haeberle L, Schick B (2009b) Prominent collagen type VI expression in juvenile angiofibromas. *Histochemistry and cell biology* 131:155-164
48. Guertl B, Beham A, Zechner R, Stammberger H, Hoefler G (2000) Nasopharyngeal angiofibroma: an APC-gene-associated tumor? *Human pathology* 31:1411-1413
49. Ha NC, Tonzuka T, Stamos JL, Choi HJ, Weis WI (2004) Mechanism of phosphorylation-dependent binding of APC to beta-catenin and its role in beta-catenin degradation. *Molecular cell* 15:511-521
50. Heinrich UR, Brieger J, Gosepath J, Wierzbicka M, Sokolov M, Roth Y, Szyfter W, Bittinger F, Mann WJ (2007) Frequent chromosomal gains in recurrent juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Cancer genetics and cytogenetics* 175:138-143
51. Herman P, Lot G, Chapot R, Salvan D, Huy PT (1999) Long-term follow-up of juvenile nasopharyngeal angiofibromas: analysis of recurrences. *The Laryngoscope* 109:140-147
52. Hsu W, Zeng L, Costantini F (1999) Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *The Journal of biological chemistry* 274:3439-3445
53. Huang H and He X (2008) Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Current opinion in cell biology* 20:119-125
54. HUBBARD EM (1958) Nasopharyngeal angiofibromas. *A.M.A. archives of pathology* 65:192-204
55. Hwang HC, Mills SE, Patterson K, Gown AM (1998) Expression of androgen receptors in nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistochemical study of 24 cases. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11:1122-1126
56. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *The EMBO journal* 17:1371-1384
57. Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY (1998) Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Current biology : CB* 8:591-594
58. Iwao K, Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Kinoshita M, Fukui T, Ishiguro S, Nakamura Y, Miyoshi Y (1998) Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations. *Cancer research* 58:1021-1026
59. Jafek BW, Krekorian EA, Kirsch WM, Wood RP (1979) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: management of intracranial extension. *Head & neck surgery* 2:119-128
60. Jeng YM, Peng SY, Lin CY, Hsu HC (2004) Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10:2065-2071

61. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F (2002) Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 22:1172-1183
62. Kamel RH (1996) Transnasal endoscopic surgery in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *The Journal of laryngology and otology* 110:962-968
63. Katoh M and Katoh M (2006) Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. *Cancer biology & therapy* 5:1059-1064
64. Kimelman D and Xu W (2006) Beta-Catenin Destruction Complex: Insights and Questions from a Structural Perspective. *Oncogene* 25:7482-7491
65. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science (New York, N.Y.)* 253:661-665
66. Klein A, Reichardt W, Jung V, Zang KD, Meese E, Urbchat S (2004) Overexpression and amplification of STK15 in human gliomas. *International journal of oncology* 25:1789-1794
67. Koh SS, Li H, Lee YH, Widelitz RB, Chuong CM, Stallcup MR (2002) Synergistic coactivator function by coactivator-associated arginine methyltransferase (CARM) 1 and beta-catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *The Journal of biological chemistry* 277:26031-26035
68. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science (New York, N.Y.)* 275:1784-1787
69. Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P (2004) Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *American Journal of Human Genetics* 74:1043-1050
70. Lee DA, Rao BR, Meyer JS, Prioleau PG, Bauer WC (1980) Hormonal receptor determination in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Cancer* 46:547-551
71. Lee E, Salic A, Kruger R, Heinrich R, Kirschner MW (2003) The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS biology* 1:E10
72. Lee JT, Chen P, Safa A, Juillard G, Calcaterra TC (2002) The role of radiation in the treatment of advanced juvenile angiofibroma. *The Laryngoscope* 112:1213-1220
73. Lerner C, Wemmert S, Schick B (2014) Preliminary analysis of different microRNA expression levels in juvenile angiofibromas. *Biomedical reports* 2:835-838
74. Leung JY, Kolligs FT, Wu R, Zhai Y, Kuick R, Hanash S, Cho KR, Fearon ER (2002) Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 277:21657-21665
75. Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH, 3rd, Sussman DJ, Jonkers J, Kimelman D, Wu D (1999) Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *The EMBO journal* 18:4233-4240
76. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837-847

77. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN (2000) Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nature genetics* 26:146-147
78. Liu X, Rubin JS, Kimmel AR (2005) Rapid, Wnt-induced changes in GSK3beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Galpha proteins. *Current biology : CB* 15:1989-1997
79. Lloyd G, Howard D, Phelps P, Cheesman A (1999) Juvenile angiofibroma: the lessons of 20 years of modern imaging. *The Journal of laryngology and otology* 113:127-134
80. Logan CY and Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20:781-810
81. Luo W, Peterson A, Garcia BA, Coombs G, Kofahl B, Heinrich R, Shabanowitz J, Hunt DF, Yost HJ, Virshup DM (2007) Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *The EMBO journal* 26:1511-1521
82. Lustig B, Jerchow B, Sachs M, Weiler S, Pietsch T, Karsten U, van de Wetering M, Clevers H, Schlag PM, Birchmeier W, Behrens J (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and cellular biology* 22:1184-1193
83. Lyons BM and Donald PJ (1992) Intracranial juvenile angiofibroma with intradural and cavernous sinus involvement. *Skull base surgery* 2:87-91
84. MacDonald BT, Tamai K, He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* 17:9-26
85. Mallick S, Benson R, Bhasker S, Mohanti BK (2015) Long-term treatment outcomes of juvenile nasopharyngeal angiofibroma treated with radiotherapy. *Acta Otorhinolaryngologica Italica : Organo Ufficiale Della Societa Italiana di Otorinolaringologia e Chirurgia Cervico-Facciale* 35:75-79
86. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH,3rd, Flynn C, Yuan H, Takada S, Kimelman D, Li L, Wu D (2001) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Molecular cell* 7:801-809
87. Martin H, Ehrlich HE, Abels JC (1948) Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma. *Annals of Surgery* 127:513-536
88. Maurice M MM (1981) Pathogenesis of juvenile nasopharyngeal fibroma. (A new concept). *Journal of Laryngology and Otology* 95(11):1121-1126
89. Midilli R, Karci B, Akyildiz S (2009) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: analysis of 42 cases and important aspects of endoscopic approach. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 73:401-408
90. Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Nakamura Y (1998) Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer research* 58:2524-2527
91. Montag AG, Tretiakova M, Richardson M (2006) Steroid hormone receptor expression in nasopharyngeal angiofibromas. Consistent expression of estrogen receptor beta. *American Journal of Clinical Pathology* 125:832-837
92. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, N.Y.)* 275:1787-1790

93. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1:263-273
94. Nagai MA, Butugan O, Logullo A, Brentani MM (1996) Expression of growth factors, proto-oncogenes, and p53 in nasopharyngeal angiofibromas. *The Laryngoscope* 106:190-195
95. Nicolai P, Schreiber A, Bolzoni Villaret A (2012) Juvenile angiofibroma: evolution of management. *International journal of pediatrics* 2012:412545
96. Nicolai P, Villaret AB, Farina D, Nadeau S, Yakirevitch A, Berlucchi M, Galtelli C (2010) Endoscopic surgery for juvenile angiofibroma: a critical review of indications after 46 cases. *American journal of rhinology & allergy* 24:e67-72
97. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P (1991) Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science (New York, N.Y.)* 253:665-669
98. Osborn DA and Sokolovski A (1965) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma in a female. Report of a case. *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill.: 1960)* 82:629-632
99. Park CK, Kim DG, Paek SH, Chung HT, Jung HW (2006) Recurrent juvenile nasopharyngeal angiofibroma treated with gamma knife surgery. *Journal of Korean medical science* 21:773-777
100. Patrocinio JA, Patrocinio LG, Borba BH, Bonatti Bde S, Guimaraes AH (2005) Nasopharyngeal angiofibroma in an elderly woman. *American Journal of Otolaryngology* 26:198-200
101. Pauli J, Gundelach R, Vanelli-Rees A, Rees G, Campbell C, Dubey S, Perry C (2008) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistochemical characterisation of the stromal cell. *Pathology* 40:396-400
102. Pawlowski JE, Ertel JR, Allen MP, Xu M, Butler C, Wilson EM, Wierman ME (2002) Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 277:20702-20710
103. Peifer M, Sweeton D, Casey M, Wieschaus E (1994) wingless signal and Zeste-white 3 kinase trigger opposing changes in the intracellular distribution of Armadillo. *Development (Cambridge, England)* 120:369-380
104. Petersen CP and Reddien PW (2009) Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 139:1056-1068
105. Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM (2000) Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12103-12108
106. Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes & development* 14:1837-1851
107. Ramos HF, Takahashi MT, Ramos BF, Gomes Mde Q, Sennes LU (2011) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma with intradural extension. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 77:677
108. Reddy KA, Mendenhall WM, Amdur RJ, Stringer SP, Cassisi NJ (2001) Long-term results of radiation therapy for juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *American Journal of Otolaryngology* 22:172-175

109. Renkonen S, Hayry V, Heikkila P, Leivo I, Haglund C, Makitie AA, Hagstrom J (2011) Stem cell-related proteins C-KIT, C-MYC and BMI-1 in juvenile nasopharyngeal angiofibroma--do they have a role? *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 458:189-195
110. Riese J, Yu X, Munnerlyn A, Eresh S, Hsu SC, Grosschedl R, Bienz M (1997) LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell* 88:777-787
111. Rippel C, Plinkert PK, Schick B (2003) Expression of members of the cadherin-/catenin-protein family in juvenile angiofibromas. *Laryngo- rhino- otologie* 82:353-357
112. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P (1997) Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science (New York, N.Y.)* 275:1790-1792
113. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467
114. Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y (2000) AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature genetics* 24:245-250
115. Schick B (2007) Specific aspects of juvenile angiofibromas. *HNO* 55:17-20
116. Schick B, Długaiczek J, Wendler O (2014) Expression of sex hormone receptors in juvenile angiofibromas and antiproliferative effects of receptor modulators. *Head & neck* 36:1596-1603
117. Schick B and Kahle G (2000) Radiological findings in angiofibroma. *Acta Radiologica (Stockholm, Sweden : 1987)* 41:585-593
118. Schick B, Kahle G, Hassler R, Draf W (1996) Chemotherapy of juvenile angiofibroma--an alternative? *HNO* 44:148-152
119. Schick B, Plinkert PK, Prescher A (2002) Aetiology of Angiofibromas: Reflection on their Specific Vascular Component. *Laryngo- rhino- otologie* 81:280-284
120. Schick B, Rippel C, Brunner C, Jung V, Plinkert PK, Urbschat S (2003) Numerical sex chromosome aberrations in juvenile angiofibromas: genetic evidence for an androgen-dependent tumor? *Oncology reports* 10:1251-1255
121. Schick B, Veldung B, Wemmert S, Jung V, Montenarh M, Meese E, Urbschat S (2005) p53 and Her-2/neu in juvenile angiofibromas. *Oncology reports* 13:453-457
122. Schick B, Wemmert S, Bechtel U, Nicolai P, Hofmann T, Golabek W, Urbschat S (2007) Comprehensive genomic analysis identifies MDM2 and AURKA as novel amplified genes in juvenile angiofibromas. *Head & neck* 29:479-487
123. Schick B, Wemmert S, Jung V, Steudel WI, Montenarh M, Urbschat S (2006) Genetic heterogeneity of the MYC oncogene in advanced juvenile angiofibromas. *Cancer genetics and cytogenetics* 164:25-31
124. Schick B, Wemmert S, Willnecker V, Długaiczek J, Nicolai P, Siwiec H, Thiel CT, Rauch A, Wendler O (2011) Genome-wide copy number profiling using a 100K SNP array reveals novel disease-related genes BORIS and TSHZ1 in juvenile angiofibroma. *International journal of oncology* 39:1143-1151



125. SCHIFF M (1959) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. a theory of pathogenesis. *The Laryngoscope* 69:981-1016
126. Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R, Virshup DM (1999) Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science (New York, N.Y.)* 283:2089-2091
127. Sennes LU, Butugan O, Sanchez TG, Bento RF, Tsuji DH (2003) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: the routes of invasion. *Rhinology* 41:235-240
128. Song DH, Dominguez I, Mizuno J, Kaut M, Mohr SC, Seldin DC (2003) CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 278:24018-24025
129. Spaans VM, Trietsch MD, Crobach S, Stelloo E, Kremer D, Osse EM, Haar NT, van Eijk R, Muller S, van Wezel T, Trimbos JB, Bosse T, Smit VT, Fleuren GJ (2014) Designing a high-throughput somatic mutation profiling panel specifically for gynaecological cancers. *PLoS one* 9:e93451
130. Spielmann PM, Adamson R, Cheng K, Sanderson RJ (2008) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: spontaneous resolution. *Ear, nose, & throat journal* 87:521-523
131. Spink KE, Polakis P, Weis WI (2000) Structural basis of the Axin-adenomatous polyposis coli interaction. *The EMBO journal* 19:2270-2279
132. Stadel R and Basler K (2005) Dissecting nuclear Wntless signalling: recruitment of the transcriptional co-activator Pygopus by a chain of adaptor proteins. *Mechanisms of development* 122:1171-1182
133. Starlinger V, Wendler O, Gramann M, Schick B (2007) Laminin expression in juvenile angiofibroma indicates vessel's early developmental stage. *Acta Oto-Laryngologica* 127:1310-1315
134. STERNBERG SS (1954) Pathology of juvenile nasopharyngeal angiofibroma; a lesion of adolescent males. *Cancer* 7:15-28
135. Su Y, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, Shitoh K, Schreiber EM, Day BW, Liu B (2008) APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Molecular cell* 32:652-661
136. Sun XC, Wang DH, Yu HP, Wang F, Wang W, Jiang JJ (2010) Analysis of risk factors associated with recurrence of nasopharyngeal angiofibroma. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale* 39:56-61
137. Suriano G, Vrcelj N, Senz J, Ferreira P, Masoudi H, Cox K, Nabais S, Lopes C, Machado JC, Seruca R, Carneiro F, Huntsman DG (2005) beta-catenin (CTNNB1) gene amplification: a new mechanism of protein overexpression in cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 42:238-246
138. Takacs CM, Baird JR, Hughes EG, Kent SS, Benchabane H, Paik R, Ahmed Y (2008) Dual positive and negative regulation of wntless signaling by adenomatous polyposis coli. *Science (New York, N.Y.)* 319:333-336
139. Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X (2004) A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular cell* 13:149-156
140. Tewfik TL, Tan AK, al Noury K, Chowdhury K, Tampieri D, Raymond J, Vuong T (1999) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *The Journal of otolaryngology* 28:145-151

141. Thakar A, Gupta G, Bhalla AS, Jain V, Sharma SC, Sharma R, Bahadur S, Deka RC (2011) Adjuvant therapy with flutamide for presurgical volume reduction in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Head & neck* 33:1747-1753
142. Tillaux P (ed) (1878) *Traité d'anatomie topographique avec applications à la chirurgie*. 2nd ed ed. P. Asselin, Paris
143. Truica CI, Byers S, Gelmann EP (2000) Beta-catenin affects androgen receptor transcriptional activity and ligand specificity. *Cancer research* 60:4709-4713
144. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J (2011) The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer research* 71:5765-5778
145. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H (1997) Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF. *Cell* 88:789-799
146. Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP (1998) Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer research* 58:2520-2523
147. Wang HW, Su WY, Wang JY (1994) Noradrenergic innervation of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 251:123-126
148. Wang QY, Chen HH, Lu YY (2011) Comparison of two approaches to the surgical management of juvenile nasopharyngeal angiofibroma stages I and II. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale* 40:14-18
149. Wemmert S, Willnecker V, Kulas P, Weber S, Lerner C, Berndt S, Wendler O, Schick B (2016) Identification of CTNNB1 mutations, CTNNB1 amplifications, and an Axin2 splice variant in juvenile angiofibromas. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37:5539-5549
150. Wendler O, Długaiczek J, Birk S, Schick B (2012) Anti-proliferative effect of glucocorticoids on mesenchymal cells in juvenile angiofibromas. *Head & neck*
151. Wendler O, Schafer R, Schick B (2007) Mast cells and T-lymphocytes in juvenile angiofibromas. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 264:769-775
152. Wu AW, Mowry SE, Vinuela F, Abemayor E, Wang MB (2011) Bilateral vascular supply in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *The Laryngoscope* 121:639-643
153. Wu H, Symes K, Seldin DC, Dominguez I (2009) Threonine 393 of beta-catenin regulates interaction with Axin. *Journal of cellular biochemistry* 108:52-63
154. Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B, Sun Z (2002) Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 277:11336-11344
155. Yang L, Lin C, Liu ZR (2006) P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* 127:139-155

- 
156. Yost C, Farr GH, 3rd, Pierce SB, Ferkey DM, Chen MM, Kimelman D (1998) GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis. *Cell* 93:1031-1041
  157. Yost C, Torres M, Miller JR, Huang E, Kimelman D, Moon RT (1996) The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes & development* 10:1443-1454
  158. Zeng X, Huang H, Tamai K, Zhang X, Harada Y, Yokota C, Almeida K, Wang J, Doble B, Woodgett J, Wynshaw-Boris A, Hsieh JC, He X (2008) Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development (Cambridge, England)* 135:367-375
  159. Zeng X, Tamai K, Doble B, Li S, Huang H, Habas R, Okamura H, Woodgett J, He X (2005) A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature* 438:873-877
  160. Zhang PJ, Weber R, Liang HH, Pasha TL, LiVolsi VA (2003) Growth factors and receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma and nasal polyps: an immunohistochemical study. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 127:1480-1484
  161. Zhang W, Yang J, Liu Y, Chen X, Yu T, Jia J, Liu C (2009) PR55 alpha, a regulatory subunit of PP2A, specifically regulates PP2A-mediated beta-catenin dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 284:22649-22656
  162. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer research* 61:6050-6054
  163. Zito J, Fitzpatrick P, Amedee R (2001) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *The Journal of the Louisiana State Medical Society: official organ of the Louisiana State Medical Society* 153:395-398

## 8. DANKSAGUNG

Ich danke ganz besonders Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schick für die Überlassung des Themas und der Materialien, sowie für die allseits hilfreiche Beratung, die konstruktiven Denkanstöße und die immer freundliche Unterstützung.

Ausgesprochen großer Dank gelten Frau Dr. rer. nat. Willnecker und Frau Dr. rer. nat. Wemmert für die sehr gute Betreuung, für die Durchsicht der Arbeit und ihre stete Geduld und Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Monika Hoffmann und Frau Ulrike Bechtel möchte ich mich herzlich für die Vermittlung zahlreicher Arbeitsmethoden und das sehr gute Arbeitsklima bedanken.

Weiterer Dank gilt unserem Kooperationspartner Herr Dr. rer. nat. Wendler und den Mitarbeitern der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikum Erlangen für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit und Unterstützung. Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. med. Unteregger und allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Urologie für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien, für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank gelten meinem Mann und meiner Familie, die mich jeder Zeit ermutigt und immer liebevoll unterstützt haben.

---

## 9. PUBLIKATIONEN

### 9.1. Publikation

Wemmert S, Willnecker V, Kulas P, Weber S, Lerner C, Berndt S, Wendler O, Schick B (2016) Identification of CTNNB1 mutations, CTNNB1 amplifications, and an Axin2 splice variant in juvenile angiofibromas.

Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 37:5539-5549

### 9.2. Tagungsbeitrag

Kurzvortrag zu nachfolgend genanntem Poster auf der 81. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., 12. – 16. Mai 2010 Wiesbaden.

Dem Poster wurde der 1. Posterpreis verliehen.

Weber S, Willnecker V, Wendler O, Schick B

Partiell deutlich erhöhte Transkriptionslevel der WNT-Pathway-Gene  $\beta$ -Catenin, GSK3 $\beta$ , APC und Axin2 im juvenilen Angiofibrom