

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. B. Schick

Amplifikationen des β -Cateninens bei juvenilen Angiofibromen

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

vorgelegt von Sabrina Berndt, geb. Schwichtenberg,

geboren am 28.10.1982 in Pfullendorf

Tag der Promotion: 12.10.2020
Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. A. Bozzato,

Prof. N. Graf

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	10
1.1 ZUSAMMENFASSUNG	10
1.2 ABSTRACT	11
2 EINLEITUNG.....	12
2.1 KLINIK, DIAGNOSE, THERAPIE	12
2.2 KLASSIFIKATION.....	16
2.3 ÄTIOLOGIE	18
2.4 HISTOLOGIE	20
2.5 GENETISCHE VERÄNDERUNGEN.....	21
2.6 STEROIDHOMONE.....	23
2.7 WACHSTUMSFAKTOREN	25
2.8 β -CATENIN UND WNT-SIGNALWEG.....	26
3 MATERIAL UND METHODIK.....	30
3.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN.....	30
3.2 VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER.....	31
3.3 GERÄTE	33
3.4 GEWEBEPROBEN	33
3.5 PARAFFINEINBETTUNG DER GEWEBEPROBEN	35
3.6 SILANISIERUNG DER OBJEKTTRÄGER.....	35
3.7 PRIMÄRKULTUR VON ANGIOFIBROMEN.....	36
3.8 CHROMOSOMENPRÄPARATION VON LYMPHOZYTEN	37
3.9 FLUORESCENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (FISH).....	38
3.9.1 DNA-Sonden.....	39
3.9.2 Herstellung von β -Catenin-Sonden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
3.9.3 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	42
3.9.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus Bacterial artificial chromosomes (BAC's).....	43
3.9.5 Herstellung indirekt markierter β -Catenin-Sonden.....	45
3.9.6 Herstellung direkt markierter β -Catenin-Sonden.....	46
3.9.7 FISH an Zellkultur- und Lymphozytenpräparaten.....	46
3.9.8 FISH an Gewebeschnitten	48
4 ERGEBNISSE.....	51
4.1 HERSTELLUNG UND ANWENDUNG DER PCR-GENERIERTEN β -CATENINSONDE.....	51
4.2 HERSTELLUNG UND ANWENDUNG DER BAC-GENERIERTEN β -CATENINSONDE.....	53
4.3 GEWEBEBEHANDLUNG UND DURCHFÜHRUNG DER FISH AN ZELLKULTUR.....	54
4.4 GEWEBEBEHANDLUNG UND DURCHFÜHRUNG DER FISH AM PARAFFINSCHNITT	54

4.5	ERGEBNISSE DER FISH UNTERSUCHUNG AN LYMPHOZYTENPRÄPARATEN	55
4.6	ERGEBNISSE DER FISH-UNTERSUCHUNG AN TONSILLENGEWEBE	56
4.7	ERGEBNISSE DER FISH-UNTERSUCHUNG AN DER ZELLKULTUR.....	57
4.8	ERGEBNISSE DER FISH UNTERSUCHUNG AN DEN PARAFFINSCHNITTEN	62
4.9	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	67
5	DISKUSSION	68
5.1	TUMORGEWEBE	68
5.2	UNTERSUCHUNGSTECHNIK MITTELS FISH	69
5.3	β-CATENIN IN DER TUMORPATHOGENESE	70
5.4	AUSBlick	72
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	DANKSAGUNG UND DANKSAGUNG	85
8	LEBENS LAUF	87

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Arterie
Abb.	Abbildung
AF	Angiofibrom
AK	Antikörper
APC	<i>Adenomatous-polyposis-coli</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AUKRA	Aurorakinase A
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolyolphosphat
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
bio-11-dUTP	mit Biotin über eine Kohlenstoffkette verknüpftes Desoxyuridintriphosphat- molekül
BMPR1	<i>Bone morphogenetic protein receptor, type 1</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BORIS	<i>brother of the regulator of imprinted sites</i>
Bzw.	beziehungsweise
Ca.	zirka
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
CH	Schweiz
CGH	vergleichende genomische Hybridisierung

cm	Zentimeter
CT	Computer-Tomographie
CTA	<i>Cancer-Testis Antigen</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dig-11-dUTP	mit Digoxygenin über eine Kohlenstoffkette verknüpft Desoxyuridinribosephosphatmolekül
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dvl	<i>Dishevelled</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
et al.	et alteri
evt.	eventuell
F	Foramen
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis coli
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLT-1	<i>Fms-like Tyrosine Kinase-1</i>
FSH	follikelstimulierendes Hormon
FZ	<i>Frizzled</i>
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
GTG-Bänderung	Giemsa Trypsin-Bänderung
H	Stunde
HCl	Salzsäure

HE	Hämatoxylin-Eosin
hMSC	Humane Mesenchymale Stromazellen
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
JA	juveniles Angiofibrom
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
KCl	Kaliumchlorid
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LH	Luteinisierendes Hormon
m	Mol
min	Minute
mm	Millimeter
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MR	Magnet-Resonanz
m-RNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MSC	mesenchymale Stammzellen
nb	nicht bekannt
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
neg	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NM	Nasenmuschel
NNH	Nasennebenhöhlen
OP	Operation

p	kurzer Arm des Chromosoms
P	Passage
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF-b	<i>Platelet-derived growth factor subunit B</i>
PIGF	<i>Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis</i>
q	langer Arm des Chromosoms
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
s	siehe
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
β-Cat.	β-Catenin
T	Tag
TCF	<i>T-cell factor</i>
TCF/Lef	<i>T-cell factor/Lymphoid enhancer factor</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNM	<i>TNM Classification of Malignant Tumours</i>
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TSHZ1	<i>teashirt zinc finger homebox 1</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
upm	Umdrehungen pro Minute

VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor</i>
Vol	Volumen
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i>
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Hintergrund: Das juvenile Angiofibrom ist eine gutartige Neoplasie mit lokal destruktivem Wachstum, das fast ausschließlich bei männlichen Jugendlichen im Alter zwischen neun und 19 Jahren auftritt. Der Tumor ist histologisch durch seine irregulären Gefäßstrukturen, die in ein bindegewebig imponierendes Stroma eingebettet sind, gekennzeichnet. Eine eindeutige Klärung der Pathogenese ist bis jetzt nicht gelungen. In molekularpathologischen Untersuchungen konnten sowohl Mutationen im β -Catenin-Gen als auch eine Überexpression der β -Catenin m-RNA nachgewiesen werden. Dies führte zu der Feststellung, dass der WNT Pathway und mit ihm β -Catenin eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Angiofibroms spielt. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob neben den bekannten Mutationen auch eine Amplifikation des β -Cateningens vorliegt, die einen erhöhten Proteinlevel ohne Mutation der GSK3 β erklären können.

Methoden: Um Veränderungen von β -Catenin auf genomischer Ebene nachzuweisen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit spezifische Sonden mittels PCR als auch mittels kommerziell erworbenen *bacterial artificial chromosomes* (BAC) generiert, die FISH an unterschiedlichen Ausgangsmaterialien (4 Zellkulturpräparate, Paraffinschnitte von 6 Tumoren) etabliert und angewandt werden konnten.

Ergebnisse: Während mit den PCR-Sonden keine visuelle Auswertung der Signale möglich war, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die FISH mit BAC-Sonden erfolgreich an den zu untersuchenden Ausgangsgeweben etabliert werden. In vier von sechs untersuchten Angiofibromen wurden sowohl Gewinne als auch Amplifikationen von β -Catenin in Paraffingewebeschnitten nachgewiesen. Zwei Tumore zeigten weder Gewinne noch Amplifikationen. In der untersuchten Zellkultur zeigten zwei der vier untersuchten Tumoren Amplifikationen, einer Gewinne und einer sowohl Gewinne als auch Amplifikationen.

Schlussfolgerungen: Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Amplifikationen des β -Cateningens im juvenilen Angiofibrom vorliegen und neben den bereits bekannten Mutationen einen weiteren Mechanismus zur Erhöhung des intrazellulären β -Catenins darstellen. Mit dem Nachweis von Gewinnen und Amplifikationen des β -Catenin-Gens haben wir einen weiteren Mechanismus der Beteiligung des WNT-Pathways in der Tumorbologie gefunden.

1.2 Abstract

Background: Juvenile angiofibromas are benign neoplasms presenting with local destructive behavior and growth patterns. They are diagnosed predominantly in young males between 9 and 19 years old. The tumor histology shows irregular vessels embedded in a fibrous stroma. Its pathogenesis is still unclear. However, CTNNB1 (gene encoding for β -catenin) mutations as well as the overexpression of the β -catenin m-RNA have been demonstrated in these tumors leading to the assumption of WNT pathway importance in JA pathogenesis. The presented work intends to answer if beside reported mutations gains as well as amplifications of the CTNNB1 gene contribute further to elevated protein levels in JAs.

Methods: To detect changes at the genomic level, FISH probes were generated with PCR as well as using bacterial artificial chromosomes (BAC). These probes were applied to paraffin sections of 6 tumors as well as on 4 cell cultures of juvenile angiofibromas.

Results: While the PCR-based probes didn't allow a visual interpretation the BAC-probes worked well. In 4 out of the 6 analyzed JAs CTNNB1 gains and amplifications were proved. In two specimens whether gains nor amplifications were found. In cell culture two times amplifications, in one case gains and in the other probe gains as well amplifications were noted.

Conclusion: The presented study proves for the first time gains and amplifications of the CTNNB1 gene in JAs as a further contribution in the tumor pathophysiology stressing on the importance of the WNT pathway in JAs.

2 Einleitung

Das juvenile Angiofibrom (JA) ist ein benigner Tumor, der vor allem bei männlichen Jugendlichen im Alter von neun bis 19 Jahren auftritt (Lund et al., 2010). Er ist sehr selten und hat einen Anteil von etwa 0,05 – 0,5 % an den Neoplasien des Kopf- und Hals-Bereiches (Gullane et al., 1992; Lund et al., 2010). Von seinem Ursprung in räumlicher Nähe zum Foramen sphenopalatinum am hinteren Ende des Ansatzes der mittleren Muschel ausgehend, dehnt sich das JA in den meisten Fällen einseitig im hinteren Bereich der Nasennebenhöhlen aus. In frühen Tumorstadien sind meist nur die Fossa pterygopalatina und der Nasopharynx betroffen, weshalb das juvenile Angiofibrom auch als Nasenrachenfibrom bezeichnet wurde. In fortgeschrittenen Stadien ist durch das lokal destruierende Wachstum (Eivazi et al., 2009) auch eine Schädigung angrenzender Strukturen möglich. So beschrieben Schick und Kahle (2000) eine mögliche Ausbreitung des Tumors in die Fossa infratemporalis, die Orbita und den intrakraniellen Raum. Ein Durchbruch durch die Dura wurde aber meist nur bei Rezidiven beobachtet (Jafek et al., 1972; Butugan et al., 1995; Ramos et al., 2011). Die Rezidivrate des juvenilen Angiofibroms wird je nach Publikation mit sechs bis 50 % angegeben (Bremer et al., 1986; Jacobsson et al., 1988; Siniluoto et al., 1993; Llyod et al., 1999; Glad et al., 2007; Nicolai et al., 2010). Dabei scheint die Rezidivrate sowohl von der inkompletten Resektion (Liu et al., 2002) als auch vom präoperativen Tumorstadium abhängig zu sein (Herman et al., 1999). Antoniadou und Mitarbeiter (2002) beschreiben ein erneutes Auftreten von Symptomen ein Jahr postoperativ, sofern ein Residuum vorgelegen hat.

2.1 Klinik, Diagnose, Therapie

Die Erstsymptomatik des juvenilen Angiofibroms zeigt sich eher unspezifisch mit behinderter Nasenatmung sowie rezidivierender einseitiger Epistaxis. Bei fortgeschrittenem Tumorwachstum kann es durch Tumoreinbruch in die Kieferhöhle und die Orbita zu einem Exophthalmus kommen. Eher selten treten Anosmie, Hyposmie, Wangendeformitäten und Otagie auf (Tewfik et al., 2002). Der Einbruch des Tumors in die Schädelhöhe und ein ausgeprägtes intrakranielles Wachstum können eine Hirndrucksymptomatik auslösen.

Bereits in der Nasenendoskopie ist der Tumor oft sichtbar und lässt die Verdachtsdiagnose eines juvenilen Angiofibroms zu. Aufgrund des hohen

Blutungsrisikos wird auf eine präoperative Biopsie zur Diagnosesicherung verzichtet. Zur weiteren Abklärung ist die Bildgebung ausschlaggebend. So gibt das Computertomogramm (CT) Aufschluss über die Ausdehnung des Tumors (s. Abb. 2.1.) und vorliegende knöcherne Läsionen.

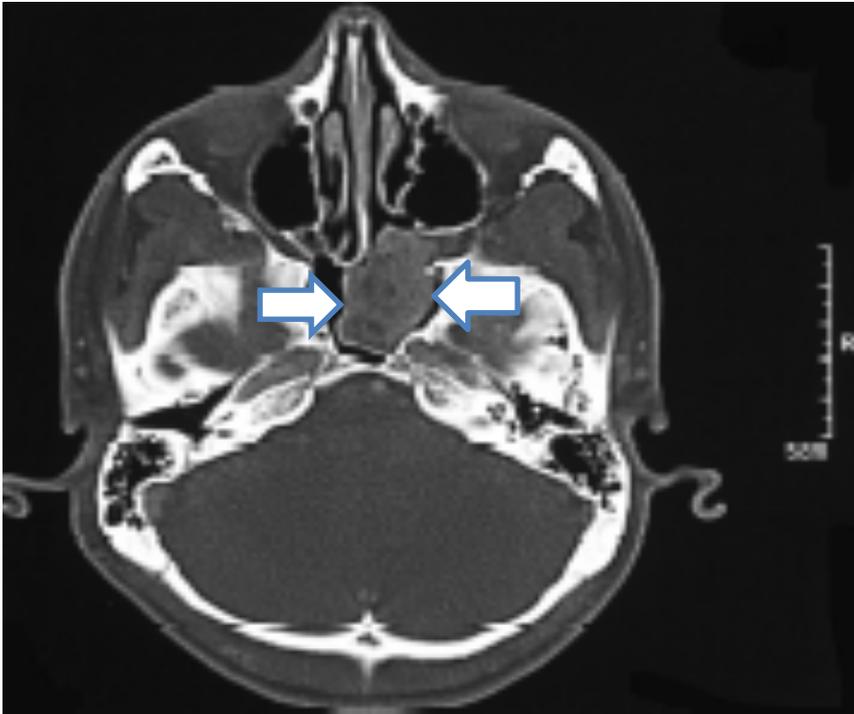


Abbildung 2.1 Computertomographie eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24 Jahre alten Patienten. Die Pfeile markieren die Ausdehnung. Die Abbildung wurde freundlicherweise durch die Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie am UKS zur Verfügung gestellt.

Ergänzend wird im Magnetresonanztomogramm (MRT) die Weichteilschwellung und ggf. der Sekretverhalt der betroffenen Nasennebenhöhlen dargestellt, wodurch eine exakte Darstellung der Tumorgöße und eine genaue Lokalisation möglich ist. Um die Gefäßversorgung des Tumors präoperativ darzustellen, ist heutzutage eine Angiographie obligat (Schick und Kahle, 2000, Beispiel s. Abb. 2.2.)

Umstritten ist bis jetzt die präoperative Embolisation des Tumorstromgebietes über die Äste der Arteria carotis externa. Fagan und Mitarbeiter (1997) zeigten in einer Studie die Minimierung des intraoperativen Blutverlustes durch diese Methode. Während die Mehrheit der Autoren eine Embolisation präoperativ empfiehlt (Schick et al., 2000; Scholtz et al., 2001; Nicolai et al., 2003), wird diese von anderen durchaus kritisch gesehen. Neben dem Blutverlust wird von Gegnern der Embolisation auch das Risiko einer unvollständigen Tumorresektion nach Embolisation als Argument angeführt:

Residualgewebe könne ohne Embolisation durch die vermehrte Blutungsneigung von gesundem Gewebe besser abgegrenzt werden (Mc Combe et al., 1990; Llyod et al., 1999).

Die präoperative Tumorembolisation sollte frühestens zwei Tage vor der geplanten Tumorresektion erfolgen, um eine Bildung von Gefäßkollateralen zu vermeiden (Bales et al., 2002). Kleine juvenile Angiofibrome werden meist ausschließlich von der A. sphenopalatina und der A. maxillaris versorgt (s. Abb. 2.2), bei fortgeschrittenen Tumoren kommt die A. pharyngea ascendens als versorgende Arterie hinzu (Schick et al., 2000).



Abbildung 2.2 Angiogramm eines juvenilen Angiofibroms. Angiographische Darstellung der Tumorgefäße sowie der Versorgung durch die A. maxillaris. Die Bereitstellung der Abbildung erfolgte freundlicherweise durch die Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Klinikum Fulda.

Eine chirurgische Resektion über einen endonasalen Zugang ist nach heutigen Gesichtspunkten die Therapie der Wahl. So ist eine vollständige Resektion bei einer Tumorausdehnung in den Nasopharynx, die Nasenhöhle, die Keilbeinhöhle, die Fossa pterygopalatina und die Fossa infratemporalis möglich (Schick et al. 1999;

Nicolai et al 2011). Ältere operative Zugangswege stellen das „Midfacial degloving“ als auch die laterale Rhinotomie dar. Gerade die laterale Rhinotomie wird wegen der ausgedehnten Narbenbildung nur noch selten angewandt (Schick et al., 1999). Um Tumore im Bereich der Schädelbasis mikrochirurgisch zu resezieren, wird ein Zugang über die Fossa infratemporalis gewählt. Dadurch ist eine Entfernung sowohl im Bereich der mittleren Schädelgrube als auch im lateralen Teil des Sinus cavernosus möglich (Andrews et al., 1999). McLaughlin und Mitarbeiter (2016) beschäftigten sich mit einer Alternative zur klassischen endoskopischen Resektion. Sie betrachteten eine Gruppe von 29 Patienten mit juvenilen Angiofibromen, von denen 16 endonasal endoskopisch reseziert wurden im Vergleich zu 13 Patienten, die eine Radiofrequenzablation erhielten hinsichtlich Operationsdauer, Blutverlust, stationärem Aufenthalt und Rezidivrate. Dabei ließ sich kein signifikanter Unterschied der beiden Kohorten evaluieren.

Neben der Tumorembolisation stehen weitere Verfahren zur Vermeidung einer allogenen Transfusion zur Verfügung. So kann präoperativ eine Eigenblutspende in Betracht gezogen werden, ebenso wie die Anwendung von rekombinantem Erythropoetin (Goodnough et al., 1994). Intraoperativ findet die Hämodilution und die Infusion von durch die „Cell Saver“ Technik aufbereitetem Patientenblut Anwendung (Bell et al., 1992).

Eine Bestrahlung des Tumors, ebenso wie eine Chemotherapie, finden in der Therapie nur in Ausnahmefällen Anwendung. Beide sollten aufgrund ihrer Langzeitschäden und Nebenwirkungen inoperablen Tumoren vorbehalten bleiben. So zeigte sich in 85 % der 15 untersuchten Fälle nach Bestrahlung eine Tumorrogression, es kam jedoch bei 3 Patienten zur Kataraktentwicklung (Reddy et al., 2001). Auch die Beeinträchtigung des im Wachstum befindlichen Skeletts muss berücksichtigt werden (Bales et al., 2002). Eine von Mallick und Mitarbeitern (2015) veröffentlichte retrospektive Studie von 31 Patienten mit einem juvenilen Angiofibrom (Radkowski IIIa/IIIb) zeigte bei 90,3 % der bestrahlten Patienten eine Tumorkontrolle über 1 Jahr. Jedoch manifestierte sich bei einem der Patienten 14 Jahre nach Therapieende ein Plattenepithelkarzinom im Bestrahlungsgebiet. Eine Reduktion der Tumormasse konnte auch unter Chemotherapie nachgewiesen werden (Schick et al., 1996), jedoch sind eine Knochenmarksuppression und die damit verbundenen Folgeerscheinungen nicht auszuschließen (Goefert et al., 1985).

Kontroversen gibt es bezüglich der Hormontherapie mittels Flutamid. Diese kann sowohl präoperativ als auch postoperativ angewendet werden. Gates und Mitarbeiter

(1992) beobachteten eine 44 %ige Reduktion, hingegen sahen Labra und Mitarbeiter (2004) keinen Benefit für die Patienten.

2.2 Klassifikation

Grundlage für die Klassifikation des juvenilen Angiofibroms bildet die Bildgebung. Dabei orientiert sich die Nomenklatur nicht an der TNM-Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* (UICC 1950; Wittekind et al., 2014), da eine Metastasierung des JA bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt ist. Stattdessen sind die Tumorausdehnung und –lokalisierung entscheidend für die Stadieneinteilung.

Tabelle 2.1 Überblick über die Klassifikationssysteme für Angiofibrome in Anlehnung an Schick und Kahle (2000)

Fisch 1983	Andrews et al. 1989	Sessions et al., 1981	Radkowski et al., 1996
I. Tumor begrenzt auf den Nasopharynx und die Nasenhöhle ohne knöcherne Beteiligung	I. Tumor begrenzt auf den Nasopharynx und die Nasenhöhle. Die Knochendestruktion ist unwesentlich oder auf das F. sphenopalatinum begrenzt	Ia. Tumor begrenzt auf die hintere Nasenhöhle und/oder Nasopharynx, keine Ausdehnung auf die Nasennebenhöhlen	Ia. Tumor begrenzt auf Nase oder Nasopharynx
II. Tumor infiltriert die Fossa pterygomaxillaris, die Maxilla oder die NNH mit knöcherner Beteiligung	II. Tumor infiltriert die Fossa pterygomaxillaris, die Maxilla oder die NNH mit knöcherner Beteiligung	Ib. Neben 1a auch Ausdehnung auf die Nasennebenhöhlen	Ib. Ausdehnung in mind. eine NNH

III. Tumor infiltriert die Fossa infratemporalis, die Orbita und die parasellare Region, bleibt aber lateral des Sinus cavernosus	IIIa. Tumor dringt in die Fossa infratemporalis oder die Orbitaregion ein ohne intrakranielle Beteiligung	Ila. Minimale laterale Ausdehnung in Richtung F. sphenopalatinum in die Fossa pterygomaxillaris	Ila. Minimale Ausdehnung in die Fossa pterygomaxillaris
IIIb. Tumor mit massivem Wachstum in den Sinus cavernosus, die Chiasma-opticus- oder die Hypophysenregion	IIIb. Tumor dringt in die Fossa infratemporalis oder die Orbitaregion ein mit intrakranieller Beteiligung	IIb. Vollständige Ausfüllung der Fossa pterygomaxillaris, Verschiebung der A. maxillaris, eine Erosion der Orbita ist möglich	IIb. Vollständige Ausdehnung in die Fossa pterygomaxillaris mit oder ohne Erosion der Orbita
			IIc. Beteiligung der Fossa infratemporalis mit oder ohne Beteiligung der Wange
			IIIa. Erosion der Schädelbasis, minimal intrakraniell
			IIIb. Erosion der Schädelbasis, ausgedehnt intrakraniell, mit oder ohne Beteiligung des Sinus cavernosus

Abkürzungen: NNH = Nasennebenhöhlen; F = Foramen

Chandler und Mitarbeiter (1984) erarbeiteten eine Klassifikation, die sich an der Einteilung von nasopharyngealen Malignomen orientiert. Heutzutage jedoch finden die Klassifikationen von Andrews und Mitarbeiter (1989) als auch Radkowski und Mitarbeiter (1996) Anwendung, die als eine Weiterentwicklung der Klassifikation von Fisch und Mitarbeiter (1983) und Sessions und Mitarbeiter (1981) gelten. Diese priorisierten die Ausdehnung des juvenilen Angiofibroms innerhalb des Schädels und das Wachstumsverhalten. Die Abwandlungen von Andrews und Radkowski sind der in der Zwischenzeit verbesserten Bildgebung geschuldet.

Eine Angabe der verwendeten Klassifikation ist aufgrund der Unterschiede in der Stadieneinteilung zur Vergleichbarkeit zwingend (s. Tabelle 2.1).

2.3 Ätiologie

Die Pathogenese des juvenilen Angiofibroms ist weiterhin ungeklärt.

Die ersten Theorien zur Entstehung stammen bereits aus dem Jahre 1853. Nélaton mutmaßte den Ursprung in Periostschichten bzw. embryonalem Knorpelgewebe der nasopharyngealen Schädelbasisanteile.

Der hormonelle Einfluss auf das Periostgewebe wurde 1940 postuliert (Som et al., 1940). Kurz darauf wurde aufgrund der histologisch nachgewiesenen Gefäßspalten eine vaskuläre Komponente angenommen (Brunner et al., 1942).

Auch andere Autoren nahmen die vaskuläre Komponente in ihre Überlegungen auf. So wurde das juvenile Angiofibrom als Hämangiom eingeordnet und auch als ekto- versprengtes Gefäßgewebe betrachtet (Sternberg et al., 1954; Hubbard et al., 1958; Schiff et al., 1959).

Aufgrund des fast ausschließlichen Auftretens von juvenilen Angiofibromen bei männlichen Jugendlichen rückte der Hormoneinfluss auf die Tumorgenese in den Fokus. Sowohl ein Androgenüberschuss als auch ein Androgenmangel bei relativem Östrogenüberschuss wurden als wichtige Faktoren vermutet (Martin et al., 1948; Dane et al., 1954;). Untersuchungen hinsichtlich der Serumspiegel von Dihydrotestosteron, Testosteron und Estradiol bei Patienten mit juvenilen Angiofibrom zeigten allerdings altersentsprechende Normwerte (Farag et al., 1987).

Neuere Theorieansätze beschreiben das juvenile Angiofibrom als einen embryonalen

Atavismus. Beham und Mitarbeiter (2000) ordnete den Tumor als Gefäßmalformation ein. Seine Annahme wird durch die fehlende sympathische Innervation und die irregulär geformten Gefäßwände gestützt. Auch Schick und Mitarbeiter postulierten aufgrund von morphologischen und molekularbiologischen Befunden eine Entstehung des JA aus embryonalen Gefäßresten (Schick et al. 2002; Schick und Urbschat, 2004; Starlinger et al., 2007; Gramann et al., 2009; Schick et al., 2011). So komme es zu einer unvollständigen Rückbildung der ersten Kiemenbogenarterie und damit zu Plexusresten im Bereich des Foramen spenopalatinum, der typischen Ursprungslokalisation des JA (s. Abb. 2.3.).

Zusätzlich unterstützt die nachgewiesene Induktion des Endothelzellmarkers CD31 in Mesenchymzellen des JA *in vitro* die Theorie einer endothelialen-mesenchymal Transformation bei der Tumorentstehung (Kulas et al., 2015), wodurch auch die charakteristische Zusammensetzung des Tumors aus vaskulären Anteilen und mesenchymalen erklären werden kann (s. Kapitel 2.6).

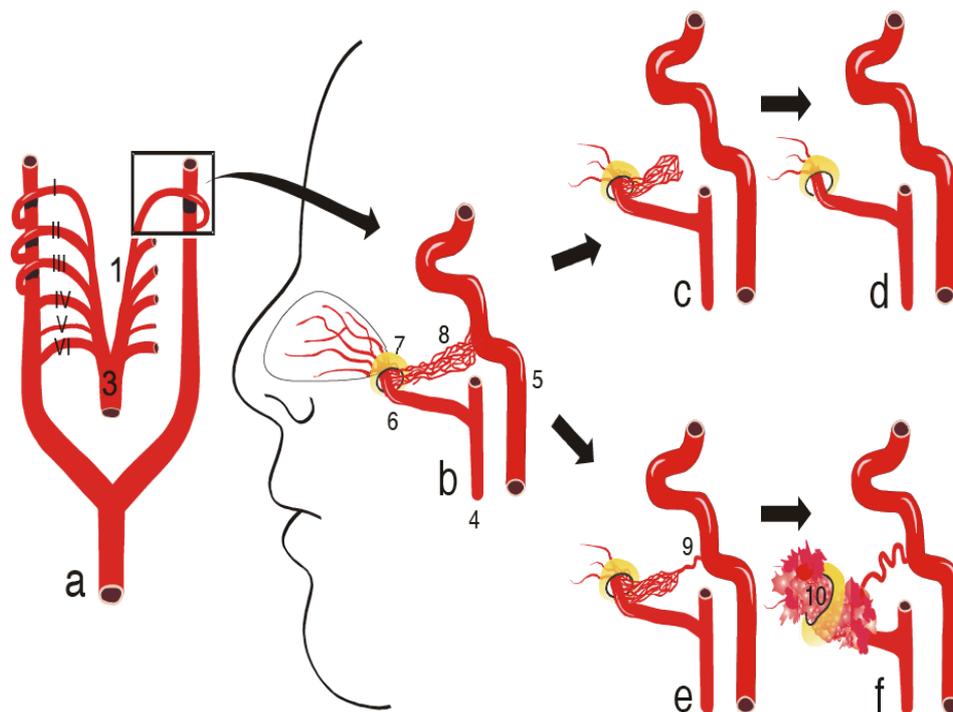


Abbildung 2.3 Reguläre Entwicklung und Rückbildung der ersten Pharyngealarterie nach Schick und Mitarbeiter (2000): Die Abbildungen a bis d stellen die reguläre Rückbildung der 1. Pharyngealbogenarterie dar, wohingegen die Abbildungen e bis f die Entwicklung eines A Angiofibroms aus Plexusresten der 1. Pharyngealbogenarterie verdeutlichen. (1: ventrale Aorta, 3: Aufzweigung der ventralen Aorta, 4: A. carotis externa, 5: A. carotis interna, 6: A.

sphenopalatina ,7: Foramen sphenopalatinum, 8: Plexusreste, 9: Plexusverbindung zur A. carotis interna, 10: Angiofibrom)

2.4 Histologie

Histologisch zeigt das juvenile Angiofibrom ein typisches Bild aus Gefäßspalten und einem bindegewebigem Stroma (s. Abb. 2.4.). Die Gefäßspalten sind mit Endothel ausgekleidet (Beham et al., 1993). Die Endothelschicht ist wie in Normalgewebe durchgängig, allerdings sind Perizyten nur partiell oder gar nicht vorhanden (Beham et al., 2002). Neben der starken Vaskularisation des Tumors erklärt die in großen Teilen fehlende Muskelschicht im Bereich der Gefäße die erhöhte Blutungsneigung des juvenilen Angiofibroms, da eine effektive Kontraktion bei einer Verletzung der Tumorgefäße nicht möglich ist (Beham et al., 2000; Nicolai et al., 2011). Ein weiterer Grund für die erhöhte Blutungsneigung wird in der fehlenden sympathischen Innervation des Tumors gesehen (Wang et al., 1994). Der Anteil von Stroma- zu Endothelzellen ist sehr unterschiedlich und für jeden einzelnen Tumor charakteristisch. So lassen sich die Tumore in Gefäß-, Bindegewebs- oder Mischtypen einteilen, können aber auch in sich inhomogen sein. Die Gefäßstruktur zeigt auch innerhalb eines Tumors regionale Unterschiede (Harison et al., 1987; Schick et al., 2007).

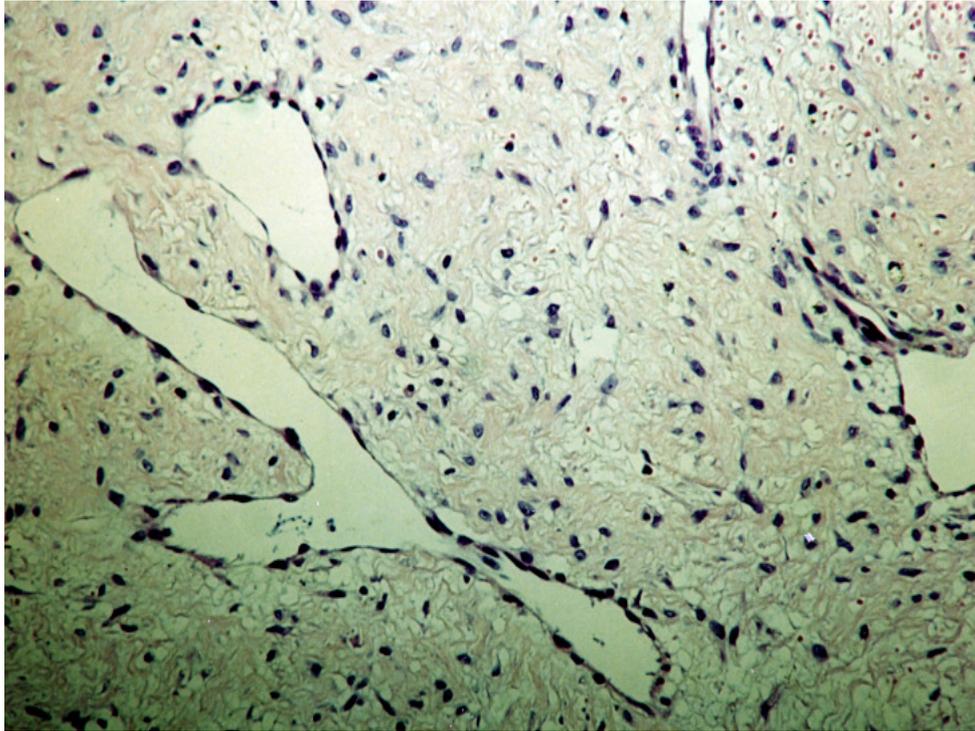


Abbildung 2.4 Paraffinschnitt eines juvenilen Angiofibrom (Hämatoxylin/Eosin Färbung; 60-fache Vergrößerung). Die Abbildung wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie am Klinikum Fulda zur Verfügung gestellt.

Neben den genannten Zellen fanden Wendler und Mitarbeiter (2007) ein erhöhtes Vorkommen von T-Lymphozyten und Mastzellen. In einzelnen Tumoranteilen machten sie bis zu 90 % der Zellen aus. Mastzellen haben durch die Produktion von proangiogenetischen Faktoren, die eine Rolle im Entstehungsmechanismus des juvenilen Angiofibroms zu spielen scheinen (vgl. Kapitel 2.7.), Anteil an der Neoangiogenese.

2.5 Genetische Veränderungen

Auf der Suche nach der Ätiopathogenese des JA wurden unterschiedliche Methoden zum Nachweis von genetischen Veränderungen eingesetzt. Um einen Überblick über die in einem Tumor vorliegenden genetischen Veränderungen zu erhalten, wurde die Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH = *comparative genomic hybridization*) durchgeführt. Diese ermöglicht durch den Vergleich von Tumor und Normalgewebe, numerische Veränderungen sowohl ganzer Chromosomen als auch einzelner Chromosomenabschnitte nachzuweisen (Kallioniemi et al., 1992).

Dabei werden im gleichen Verhältnis DNA des Tumors als auch „gesunde“ Referenz-DNA unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und auf Metaphasechromosomen eines gesunden Spenders hybridisiert. Es konkurrieren die Tumor-DNA und die unveränderte DNA um die Bindung an den Metaphasechromosomen. Liegt nun z.B. ein Gewinn einer Region auf Chromosom 3 des Tumors vor, bindet im Verhältnis mehr genomische Tumor-DNA an dieser Stelle. Um die Zuordnung der Chromosomen zu ermöglichen, werden sie mit einem DNA-interkalierenden Farbstoff gegengefärbt und an einem Fluoreszenzmikroskop mittels einer entsprechenden Software ausgewertet. Die unterschiedlichen Signalintensitäten der verwendeten Fluorochrome werden graphisch dargestellt, wobei eine DNA-Überrepräsentation als Ausschlag nach rechts und ein DNA-Verlust als Ausschlag nach links dargestellt wird.

So konnten Schick und Mitarbeiter (2001; 2003; 2007) Gewinne („*gains*“) im Bereich der Chromosomenabschnitte 4q, 5p, 6q, 7q, 12q, 13q, 14q, 18q, 21q und des X-Chromosoms feststellen, sowie Verluste („*losses*“) auf den Chromosomen 8, 16, 17, 22 und Y nachweisen. Eine von Schick und Mitarbeitern (2006) durchgeführte Untersuchung zeigte in Array-CGH Analysen Genamplifikationen von AURKA und MDM2. AURKA ist eine mitotische Serin/Thyrosin Kinase, die am Zellzyklus beteiligt ist, wohingegen MDM2 als Regulator des Tumorsuppressorgens p53 fungiert. Eine weitere CGH-Studie an Formalin-fixiertem Gewebe von 22 Tumoren zeigte Gewinne auf 1q, 9q, 10q, 12q, 16, 17q, 19, 20q und 22 sowie Verluste der Geschlechtschromosomen (Heinrich et al., 2007).

Das Auflösungsvermögen der CGH ist relativ gering. So sollte ein Gewinn zwischen 10 bis 20 Millionen Basenpaare betragen, ein amplifizierter Genabschnitt mindestens 2 Millionen Basenpaare lang sein, um detektiert zu werden. Verluste sind hingegen noch schwerer zu erkennen (Kallioniemi et al., 1993).

Zur weiteren Spezifizierung der gefundenen Aberrationen kam die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) zum Einsatz (John et al., 1969; Pardue et al., 1969; siehe auch Kapitel 4.4.). Schick und Mitarbeiter (2003) führten eine Studie mit zentromerspezifischen Sonden für das X- und Y-Chromosom sowie einer Sonde für den Androgenrezeptor auf dem X-Chromosom durch. Dabei zeigten sechs von sieben untersuchten Tumoren in 11,5 – 63,8 % einen Y-Verlust. Ein Gewinn des X-Chromosoms konnte bei 5 von 7 Tumoren in 12 – 34 % der Zellkerne nachgewiesen werden. Dabei ging der Gewinn des X-Chromosoms mit dem Gewinn des Androgenrezeptor-Gens einher. Amplifikationen des Androgenrezeptorgens konnten nicht nachgewiesen werden.

Auch die Aberrationen auf Chromosom 8 wurden mittels FISH weiter untersucht. Dabei stand das C-MYC Onkogen im Fokus des Interesses. C-MYC hat in der Aktivierung als auch an der Unterdrückung unterschiedlichster Gene Anteil, zum Beispiel als ein Bestandteil des WNT-Pathways, sowie des MAPK/ERK-Pathways. Als ein Transkriptionsfaktor ist C-MYC bei ca. 15 % aller menschlicher Gene (Kress et al., 2015) beteiligt. Eine Studie zu C-MYC in Angiofibromen untersuchte 7 juvenile Angiofibrome. Dabei waren vier Tumore im Stadium II, zwei Tumore im Stadium III und einer im Stadium IV der Klassifikation nach Fisch. In allen untersuchten Angiofibromen konnten signifikante Verluste des C-MYC Gens festgestellt werden, während in drei Tumoren der Stadien III und IV derselben Klassifikation ebenso Gewinne des C-MYC Gens gezeigt werden konnten. Dies zeigt eine genetische Heterogenität mit einer deutlichen erhöhten Expression sowohl auf der Transkript- als auch der Translationsebene der fortgeschrittenen Tumoren (Schick et al., 2006).

In weiteren Studien wurde eine deutliche Hochregulation der Transkripte der Gene BORIS (*brother of the regulator of imprinted sites*) sowie TSHZ1 (*teashirt zinc finger homebox 1*) nachgewiesen (Schick et al., 2011). Dieser Nachweis gelang mittels eines *single nucleotide polymorphism (SNP) microarray*. BORIS wird der Gruppe der *Cancer Testis Antigene (CTA)* zugeordnet. Diese kommen, außer in der Plazenta und im Hoden, nicht in gesundem Gewebe vor (Klenova et al., 2002). TSHZ1 ist ein Protein, das sowohl an Entstehungsprozessen als auch an deren Regulation beteiligt ist. Unter anderem konnte die Beteiligung des Proteins an der Entstehung der ersten Pharyngealbogenarterie gezeigt werden (Long et al., 2001). So kann der Nachweis der Amplifikation des TSHZ1 im juvenilen Angiofibrom als Untermauerung der Entstehungstheorie aus der ersten Pharyngealarterie erachtet werden (Schick et al., 2011).

2.6 Steroidhormone

Aufgrund des nahezu ausschließlichen Auftretens bei männlichen Jugendlichen wurde früh eine Rolle von Sexualhormonen bei der Pathogenese des juvenilen Angiofibroms vermutet (vgl. Kapitel 2.4). Auch die Größenreduktion des Tumors durch die präoperative Gabe von Östrogen (Hulthén et al., 1976) legte einen entsprechenden Zusammenhang nahe. Erhöhte Serumwerte der Sexualhormone konnten aber bei keinem der untersuchten Patienten mit einem juvenilen Angiofibrom nachgewiesen

werden (Farag et al., 1987; Hagen et al., 1991). Daher rückten in der Folge die Rezeptoren der Sexualhormone in den Fokus des Interesses.

So analysierten mehrere Studien die Proteinexpression des Androgen- und Progesteronrezeptors. Jedoch zeigten sich inkonsistente Ergebnisse: die Expressionsrate des Androgenrezeptors reichte von 25 - 100 % der untersuchten Tumoren, beim Progesteronrezeptor lag die Expressionsrate zwischen 0 - 58 % (Lee et al. 1980, Farag et al. 1987, Antonelli et al. 1987, Brentani et al 1989, Hwang et al. 1998, Gatalica et al. 1998, Saylam et al. 2006, Montag et al 2006).

Montag und Mitarbeiter untersuchten immunhistologisch Isoformen des Östrogenrezeptors. Sie beschrieben eine Überexpression der β -Form, die α -Form zeigte sich in den 13 untersuchten JA keine wesentliche Änderung (Montag et al., 2006). Für Montag und seine Mitarbeiter ergab sich als Konsequenz ihrer Ergebnisse auch eine Beeinflussung des Tumors durch Östrogen. Auch weitergehende Untersuchungen in einer Studie von Schlauder und Mitarbeitern (2009) betrachteten die Möglichkeit einer Östrogenbeeinflussung auf das juvenile Angiofibrom. So wurde in fünf juvenilen Angiofibromen die P450-Aromatase nachgewiesen, welche die Umwandlung von Androgen in Östrogen katalysiert. Damit besteht die Möglichkeit, dass Testosteron im JA auch über Östrogenrezeptoren eine tumorproliferative Wirkung entfalten kann.

Die mRNA-Expression von Sexualhormon-Rezeptoren im JA wurde bislang nur in einer Studie analysiert (Schick et al., 2014). Hierbei zeigten Androgen- und α -Östrogen-Rezeptoren sowie Rezeptoren für follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) erhöhte Transkriptraten in JA-Gewebe im Vergleich zum Stroma der Nasenschleimhaut.

Auch die Auswirkung einer exogenen Zufuhr von Steroiden bzw. deren Antagonisten wurden untersucht. Mit der Wirkung von Testosteron auf das Wachstum des juvenilen Angiofibroms beschäftigten sich Sterling und Mitarbeiter (2009). Sie beschreiben den Fall eines JA-Rezidivs 20 Jahre nach operativer Sanierung bei exogener Testosterontherapie. Das Wachstum des Tumors stagnierte nach Absetzen der Hormontherapie und der Tumor konnte histologisch nach operativer Resektion das Rezidiv nachgewiesen werden (Sterling et al., 2009).

Androgenrezeptor-Antagonisten werden präoperativ zur Reduktion des Tumorumfanges bei JA eingesetzt. So zeigte sich nach Anwendung des partiellen Androgenrezeptor-Antagonisten Flutamid bei vier von fünf Tumoren eine Reduktion

von maximal 44 % (Gates et al., 1992). Eine weitere prospektive Studie unter Einsatz von Flutamid konnte jedoch bei sieben Angiofibromen nur eine Volumenreduktion von 11 % nachweisen (Labra et al., 2004). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten sich durch die unterschiedliche anfängliche Tumorgöße als auch durch die unterschiedlich lange Therapiedauer erklären. Eine Studie an 20 Patienten mit einem juvenilen Angiofibrom, die präoperativ Flutamid erhielten, zeigte eine durchschnittliche Reduktion der Tumormasse um 16,5 %, wobei die größte Reduktion bei postpubertären Patienten mit bis zu 40 % erreicht wurde. In einer *in vitro* Studie hemmte der selektive Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen die Proliferation von mesenchymalen Zellen eines JA in ähnlichem Ausmaß wie Flutamid (Schick et al., 2014), wodurch sich zusätzlich zu Androgenrezeptor-Antagonisten neue Ansatzpunkte für eine Hormontherapie des JA ergeben.

Die Rolle einer weiteren Gruppe der Steroidhormone in der Entstehung des juvenilen Angiofibroms beschäftigte 2 Studien. Sie untersuchten die Expression von Glukocorticoidrezeptoren. So untersuchten Brentani und Mitarbeiter (1989) 12 juvenile Angiofibrome auf die Expression von Glukocorticoidrezeptoren. Sie fanden in 84 % der untersuchten Tumoren eine deutliche erhöhte Konzentration der Glukocorticoidrezeptoren im Zytosol im Vergleich zur untersuchten Nasenschleimhaut.

Eine neue Studie von Wendler und Mitarbeiter (2012) untersuchte 30 JA mittels quantitativer reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Sie zeigte eine deutliche erhöhte Transkriptionsrate des Rezeptors im Tumor als auch erhöhte Proteinlevel in der Neubildung.

2.7 Wachstumsfaktoren

Für das Angiofibrom wurde bisher die Rolle der Wachstumsfaktoren TGF- β (*tumor growth factor β*), IGF II (*insulin-like growth factor II*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und VEGF (*vascular endothelial-like growth factor*) detailliert untersucht.

Saylam und Mitarbeiter (2006) analysierten die Expression von TGF- β bei der Entstehung des JA. Sie konnten in 14 von 27 Fällen TGF- β nachweisen.

Eine Studie von Dillard und Mitarbeitern (2000) konnte in allen 19 untersuchten juvenilen Angiofibromen TGF- β im Stroma und in den Endothelien nachweisen.

Neben TGF- β wurde IGF II getestet. Es konnte eine Überexpression in 52 % der untersuchten JA von IGF II mRNA detektiert werden (Coutinho- Camillo et al., 2003).

bFGF, ein weiterer wichtiger Faktor der Angiogenese, konnte im Endothelbereich von juvenilen Angiofibromen nachgewiesen werden (Schiff et al., 1992), wobei eine Korrelation zwischen Gefäßdichte und der Konzentration in den Stromazellen vorzuliegen schien (Schuon et al., 2006).

Brieger und Mitarbeiter (2004) fanden in 87 % der untersuchten acht Angiofibromen VEGF in den Stroma- und Endothelzellen. Dabei korrelierte die Höhe der VEGF-Expression mit der Gefäßdichte. Hingegen ergaben sich kein Zusammenhang zwischen VEGF-Expression und Tumorgröße bzw. Wachstumsgeschwindigkeit. Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch eine immunhistochemische Versuchsreihe von Saylam und Mitarbeitern (2006). Sie untersuchten 27 JA auf VEGF und konnten eine Expression in 24 JA bestätigen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von VEGF und bFGF zum Kulturmedium von JA-Fibroblasten *in vivo* die Expression des Endothelzellmarkers CD31 in diesen mesenchymalen Zellen induziert wurde (Kulas et al., 2015). Diese Beobachtung spricht für eine endotheliale-mesenchymale Transformation bei der Pathogenese des juvenilen Angiofibroms (s. Kapitel 2.3).

2.8 β -Catenin und WNT-Signalweg

Aufgrund des um 25 % häufigeren Auftretens von juvenilen Angiofibromen bei Patienten mit einer familiären adenomatösen Polyposis (FAP) rückte das APC (*adenomatous polyposis coli*)-Gen, welches bei dieser Erkrankung mutiert vorliegt, in den Fokus des Interesses (Ferouz et al., 1995; Giardiello et al., 1993). Es wurden bislang keine APC-Mutationen bei juvenilen Angiofibromen nachgewiesen. Jedoch darf das APC-Gen nicht isoliert betrachtet werden, da es ein wichtiger Bestandteil des sog. WNT-Signalwegs ist. Dieser Regelkreis ist ein hochkonservierter Signaltransduktionsweg, der eine große Rolle in der Embryonalentwicklung und der Tumorentstehung spielt (Logan et al., 2004). Mutationen der beteiligten Gene führen sowohl zu Fehlbildungen als auch zu Malignomen (Clevers et al., 2006).

Unterschieden werden ein kanonischer und ein nicht-kanonischer Signalweg, wobei in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf dem kanonischen Signalweg liegt, dessen Bestandteil β -Catenin ist (Abb. 2; Logan und Nusse, 2004).

Bindet kein WNT-Signalmolekül an den LRP (*low density lipoprotein related receptor protein*) - und *Frizzled*-Rezeptor in der Zellmembran, bildet β -Catenin einen Komplex mit dem Tumorsuppressorprotein APC und mit Axin. Damit wird die Phosphorylierung von β -Catenin durch die Serin-Threonin-Kinasen CK (casein kinase)-I α und GSK(glycogen synthase kinase)-3 β erleichtert. Das phosphorylierte β -Catenin wird schließlich an Ubiquitin gebunden und im Proteasom abgebaut (Willert et al., 1998), wodurch die intrazellulären β -Catenin-Spiegel niedrig gehalten werden (s. Abb. 2.5.).

Bindet hingegen ein WNT-Signalmolekül an den *Frizzled*/LRP-Rezeptor, kommt es zur Aktivierung des WNT-Signalweg. Die Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK-3 β wird gehemmt (Siegfried et al., 1992). Dadurch kumuliert β -Catenin im Zytoplasma, wandert in den Zellkern und aktiviert seinerseits die Transkriptionsfaktoren TCF (*T cell specific transcription factor*) und LEF (*lymphoid enhancer-binding factor*), welche die Transkription der Zielgene des WNT-Signaltransduktionsweges induzieren (Van Leeuwen et al., 1994, Huber et al., 1996). Hierzu gehört u.a. auch das Onkogen C-MYC, welches in fortgeschrittenen juvenilen Angiofibromen eine erhöhte Expression auf Transkript- und Proteinniveau aufweist (Schick et al., 2006; vgl. auch Kapitel 2.5).

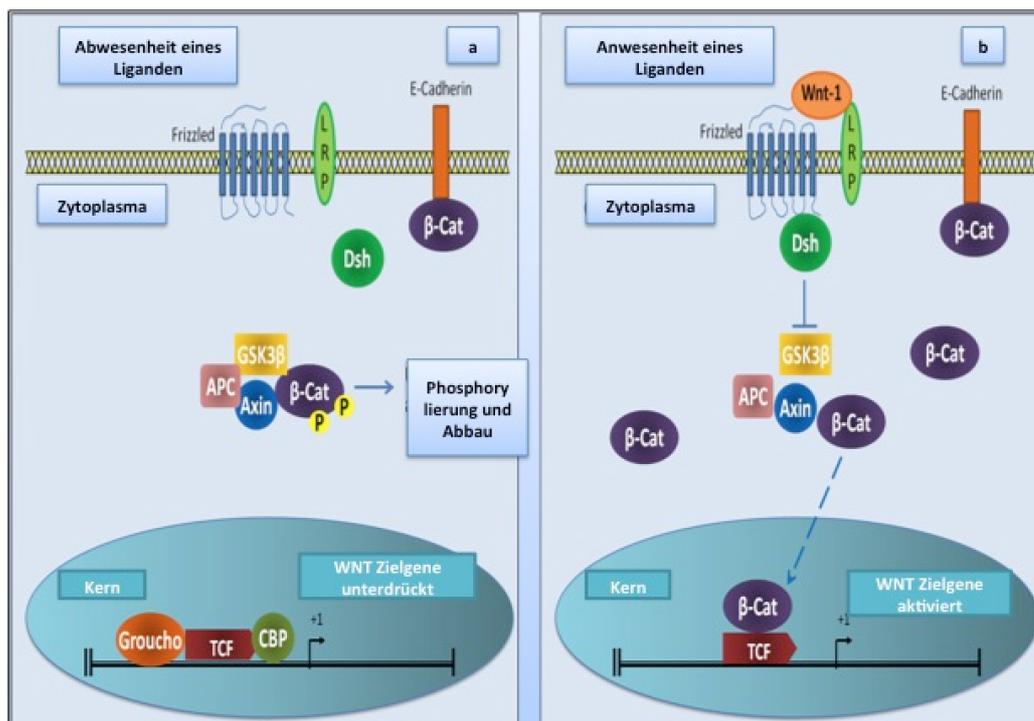


Abbildung 2.5 Der WNT-Signalweg und die Rolle des β -Catenin (aus Altieri et al., 2013).

a: Signalweg in Abwesenheit eines Liganden gezeigt. β Catenin wird durch den Enzymkomplex aus APC, GSK3 β und Axin gebunden, phosphoryliert und zum Abbau markiert.

b: ein Ligand bindet und aktiviert das Protein *dishevelled*. Dieses wiederum inhibiert den Enzymkomplex, der für den Abbau des β -Catenin verantwortlich ist. Es kommt zur nukleären

Anhäufung von β -Catenin und Aktivierung der Transkription von Tcf/Lef1 abhängigen Genen. (Details s. Text).

Neben der Rolle im Wnt-Signalweg ist β -Catenin ein wichtiger Bestandteil von Strukturproteinen, sogenannten *adherens junctions*. So steht β -Catenin mit der zytosolischen Seite des Transmembranproteins E-Cadherin in Verbindung (Aberle et al. 1996) und verbindet E-Cadherin über α -Cadherin mit dem Aktin-Zytoskelett (Nelson und Nusse, 2004).

Eine weitere Rolle scheint β -Catenin als Co- Aktivator mit dem Androgenrezeptor in Gonadotropin sezernierenden neuronalen Zellen zu haben (Pawlowski et al., 2002). Die erhöhte Expressionsrate von β -Catenin im JA wird daher auch als mögliche Ursache der erhöhten Androgensensitivität des Tumors diskutiert (Urbschat und Schick, 2004).

Mutationen des β -Cateningens (*CTNNB1*) konnten bereits in malignen Tumoren, wie z. B. im Kolon-Karzinom, hepatozellulären Karzinom und Magenkarzinom nachgewiesen werden (Fukuchi et al., 1998, Miyochi et al., 1998, Voeller et al., 1998; Chan et al., 1999). Betrifft die Mutation die codierenden Genabschnitte für das N-terminale Ende des Proteins, ist keine Phosphorylierung mehr möglich (Morin et al., 1997). Dadurch kommt es zu einer Akkumulation des β -Catenin-Proteins in der Zelle (Rippel et al., 2003; Zhang et al., 2003; Weber et al., 2010).

Bei Untersuchungen an juvenilen Angiofibromen konnten in 75 % der Fälle sowohl Mutationen in der GSK3 β -Bindungsstelle als auch immunhistochemisch eine erhöhte Expression von β -Catenin-Proteinen nachgewiesen werden (Abraham et al. 2001; Zhang et al., 2003; Rippel et al., 2003.; Weber et al., 2010). Der Nachweis von erhöhten Transkriptmengen von β -Catenin, GSK3 β , APC und Axin 2 gelang Weber und Mitarbeitern (Weber et al 2010).

Da die o.g. Mutationen nicht in allen Tumoren gefunden wurden, reichen sie alleine nicht aus, um die erhöhte Expressionsrate von β -Catenin im JA zu erklären. Ein weiterer möglicher Mechanismus wurde für Magenkarzinome nachgewiesen. So konnten Amplifikationen des *CTNNB1*-Gens in Abwesenheit von *CTNNB1*-Mutationen nachgewiesen werden (Suriano et al., 2005). Bislang liegen keine Informationen über derartige Amplifikationen im JA vor.

2.9. Eigene Fragestellung

Der WNT-Signalweg spielt bei der Tumorentstehung wie z.B. beim Magenkarzinom eine Rolle. Hierbei scheinen sowohl Mutationen in der GSK3 β verantwortlich zu sein als auch eine erhöhte Expression von β -Catenin. Neben diesen Befunden zeigen sich in der CGH Gewinne in der für β -Catenin codierenden Region, so dass die Möglichkeit einer Vervielfältigung des Gens als Grundlage für diese Arbeit postuliert wurde. In dieser Arbeit bestand die Aufgabe, eine Sonde für das β -Catenin-Gen herzustellen, die sowohl an Paraffinschnitten als auch an Zellkulturen des JA angewendet werden kann, um die Frage nach Gengewinnen und Genamplifikationen im JA beantworten zu können.

3 Material und Methodik

3.1 verwendete Chemikalien

Aceton	MERCK Darmstadt
Bovine Serum Albumin BSA	Jackson ImmunoResearch, USA
Colcemid	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Cot 1-DNA, human	Roche Diagnostics, Mannheim
DAPI (Vectashield® with DAPI)	Vector Laboratories, USA
Difco LB Medium	Becton, Dickinson and Company, USA
DMEM/F-12 + Glutamax	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Dulbecco`s-PBS steril	PAA, USA
Ethanol	MERCK, Darmstadt
Fixogum	Marabu, Tamm
Formaldehyd	MERCK Darmstadt
Gentamycin	Pan- Biotech, Aidenbach
L-Glutamine	Pan- Biotech, Aidenbach
Mischbettionenaustauscher	Sigma, München
Paraffin	Vogel, Giessen
PBS-Puffer unsteril (pH7,2-7,4)	Apotheke der Universität des Saarlandes, Homburg
Penicillin/ Streptomycin	GIBCO, Karlsruhe
Pepsin P6887	Sigma, München
Paraformaldehyd (PFA)	MERCK Darmstadt
Phytohämagglutinin	GIBCO, Karlsruhe
Pretreatment	Appligene Oncor, Illkirch Graffenstaden
Proteinase K	MERCK Darmstadt

Protein-Digesting Enzym	Appligene Oncor, Illkirch Graffenstaden
RNase (10mg/ml)	Sigma, München
Streptavidin-FITC	Vector, USA
Triethoxysilylpropylamin (10%)	MERCK Darmstadt
Trypsin-EDTA	PAA, USA
Xylol	MERCK, Darmstadt

Alle hier nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den nachfolgenden Firmen in reinster Form bezogen: Sigma Aldrich (München), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und der Apotheke des Uniklinikums des Saarlandes (Homburg/Saar).

3.2 verwendete Lösungen und Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit Aqua dest. unter reinen Bedingungen angesetzt.

Blaumarker- Stammlösung	50 % Glycerin
	0,25 % Brophenolblau
	50 nM EDTA
Formamid deionisiert:	100 ml Formamid
	10 g Mischbettionenaustauscher
Fixativ	4 g Paraformaldehyd
	100 ml PBS
PBS (nach Dulbecco pH 7,4):	8 g NaCl,
	0,2 g KCl,
	1,15 g Na ₂ PO ₄ ,
	0,2 g KH ₂ PO ₄
	1 Liter Aqua dest

RNAse Stammlösung	10mg/ml in 2x SSC
20x SSC	3M NaCl
	0,3 M NaCitrat (pH 7,0)
10 % Triethoxysilylpropylamin	180 ml 100 % Aceton
	20 ml Triethoxysilylpropylamin (Silan)
TE- Puffer	10 mM Tris·Cl, pH 8.0
	1 mM EDTA

Spezial-Medium für Angiofibromfibroblasten

DMEM/F12	PAA-Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
10 % Fötale Kälberserum	GIBCO BRL, Life technologies, Karlsruhe
2% Penicillin/Streptomycin	PAA, Piscataway, USA
2% L-Glutamin	Pan Biotech, Aidenbach
1% Na-pyruvat	PAA-Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
0,05 µg/ml Gentamycin	Pan Biotech, Aidenbach
2,5 µg/ml Amphotericin B	PAA-Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Nährmedium Lymphozytenpräparate:

RPMI	Sigma, München
10% Fötale Kälberserum	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe

Wachstumsfaktoren:

5 ng/ml EGF	Sigma, München
5 µg/ml Insulin	Sigma, München

1µg/ml Hydrocortison Sigma, München

Kits

Nucleo Spin Extract II Kit Clontech USA

Bio Prime DNA Labeling Kit Invitrogen USA

Plasmid Maxi Kit Qiagen, Hilden

Atto488 Nick Translation Labeling Kit Jena Bioscience, Jena

DIG HIGH Prime Roche Diagnostics, Mannheim

Gewebsverdau-Kit Oncor, USA

3.3 Geräte

Hypercenter XP Shandon GB

Zentrifuge Z233MK Hermle, Wehingen

Mikroskop BX61 Olympus, Hamburg

Thermocycler mastercycler gradient Eppendorf, Hamburg

NanoDrop Thermo Scientific, USA

3.4 Gewebeproben

Alle Patienten hatten im Vorfeld ihre Einwilligung zur Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke gegeben. Ihre Daten wurden nachfolgend verschlüsselt. Ein Ethikvotum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes lag vor (218/10).

Das verwendete Angiofibromgewebe stammte aus Operationen, die an den Universitätskliniken für Hals-Nasen-Ohren Heilkunde in Homburg/Saar, Erlangen und Aachen durchgeführt wurden. Die Diagnose eines juvenilen Angiofibroms (JA) wurde aufgrund der klinischen Symptomatik/Untersuchung sowie der histopathologischen Begutachtung gestellt, wie von Schick und Mitarbeiter (2014) beschrieben. Das Tumorgewebe wurde in Paraffin oder flüssigem Stickstoff konserviert.

Tabelle 3.1 Übersicht des verwendeten Tumorgewebes

Fall-Nummer	Alter	Geschlecht
74	46 Jahre	m
680	13 Jahre	m
691	15 Jahre	m
895	12 Jahre	m
896	15 Jahre	m
2336	unbekannt	m
3544	13 Jahre	m

Tonsillengewebe und Gewebestücke von unteren Nasenmuscheln, die im Rahmen von Tonsillektomien und Conchotomien an der Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes entnommen wurden, dienen als Kontrollgewebe. Diese wurden, wie das Tumorgewebe, postoperativ in Paraffin zur Konservierung eingebettet.

3.5 Paraffineinbettung der Gewebeproben

Vor der Paraffineinbettung wurde das Gewebe für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einem Überkoprotator in 3,7% Formalinlösung fixiert. Danach erfolgte eine Behandlung im Hypercenter XP. Das Hypercenter ist ein computergesteuertes Gerät, das vollautomatisiert Gewebeproben fixiert, dehydriert und in Paraffin nachfolgendem Schema einbettet:

Tabelle 3.2 Schema zur Paraffineinbettung

Zeit	Lösung	Temperatur
1 Stunde	4 % Formalin (pH 7,4)	37°C
1 Stunde	70 % Ethanol	37°C
2 Stunden	70 % Ethanol	37°C
3 Stunden	70 % Ethanol	37°C
1 Stunde	96 % Ethanol	37°C
2 Stunden	96 % Ethanol	37°C
3 Stunden	96 % Ethanol	37°C
1 Stunde	100 % Xylol	37°C
2 Stunden	100 % Xylol	37°C
3 Stunden	100 % Xylol	37°C
2 Stunden	Paraffin	59°C
2 Stunden	Paraffin	59°C

3.6 Silanisierung der Objektträger

Für die nachfolgenden Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen wurden 6 µm-Paraffingewebeschnitte auf silanisierten Objektträgern angefertigt. Für die Silanisierung wurden die Objektträger zunächst in 100 % Aceton entfettet. Danach wurden sie in 10 % Triethoxysilylpropylan für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend 3x in 100 % Aceton für wenige Sekunden gewaschen. Es folgte eine dreimalige Spülung mit Aqua dest. und die Trocknung über Nacht bei 45 °C.

3.7 Primärkultur von Angiofibromen

Die Herstellung der Zellkulturen erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse von Caplan und Mitarbeiter (2001), Pittenger und Mitarbeiter (1999) und Janeczek Portalska und Mitarbeiter (2012), die zeigten, dass sich aus mesenchymalen Stammzellen unterschiedliche Gewebetypen z.B. Knorpelzellen, Knochenzellen und Endothelzellen differenzieren.

Alle notwendigen Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt und die verwendeten Materialien waren entweder steriles Einmalmaterial oder wurden vor ihrer Anwendung im Autoklaven (120 °C) sterilisiert.

Für die Generierung der Zellkultur aus Angiofibromgewebe wurde das Tumorgewebe mechanisch zerkleinert und mit sterilem PBS (pH 7,4) gespült. Danach wurden die Gewebestücke in eine Zellkulturschale gelegt und 30 Minuten bei Raumtemperatur zwecks besserer Anheftung angetrocknet, bevor die Zugabe von Fibroblastenmedium erfolgte.

Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchte von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Der Mediumwechsel wurde in einem 2-3 Tage Rhythmus durchgeführt. Bei einer Konfluenz von 90 %, wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gespült. Danach wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst. Es erfolgte die Zugabe von 2 ml Kulturmedium und eine Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 1000 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3, je nach Zelldichte und Wachstumsverhalten, passagiert.

Zur späteren Verwendung in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Im Anschluss wurde 2 ml Kulturmedium zugegeben und 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte die Fixation durch Zugabe von eiskaltem Methanol/ Eisessig (Verhältnis 3:1; -20°C). Das Gemisch wurde vorsichtig resuspendiert und die Zellen 1 Stunde bei -20°C fixiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 1000 rpm für 8 Minuten. Nach erneuter Zugabe von frischem Fixativ und der anschließenden Zentrifugation wurde entsprechend der Pelletgröße frisches Fixans zugegeben, resuspendiert, jeweils 1-2 Tropfen auf gereinigte Objektträger aufgetropft und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.8 Chromosomenpräparation von Lymphozyten

Als Kontrollgewebe wurden Lymphozytenpräparate aus heparinisiertem Vollblut von männlichen Spendern eingesetzt. Diese dienen zur Überprüfung der Effizienz der Sonden sowie den gewählten Hybridisierungsbedingungen der FISH.

Hierzu wurden Kurzzeitkulturen nach Standardprotokoll (Araki und Sparkes, 1963) aus der Blutprobe eines gesunden Probanden unter sterilen Bedingungen als Vollblutkultur angelegt. Dazu wurden 8 ml Nährmedium (RPMI, 10 % fetales Kälberserum (FCS) Penicillin/Streptomycin, 0,4 ml Phytohämagglutinin) und 0,8 µl heparinisiertes Vollblut in eine sterile Kulturflasche gegeben. Phytohämagglutinin regt die Lymphozyten zur Teilung an und FCS enthält unter anderem wichtige Hormone für das Zellwachstum.

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 72 Stunden in einem Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂-Atmosphäre. 2 Stunden vor Beendigung der Inkubationszeit wurde Colcemidlösung in einer Endkonzentration von 0,1µg/ml zu dem Ansatz gegeben. Colcemid als Spindelgift verhindert, dass die Lymphozyten die Teilung vollenden können. So verbleiben die Zellen in der Metaphase der Mitose.

Danach wurden die Zellen 8 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem Pellet wurde tropfenweise 0,0375 M KCl-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde 5 bis 7 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese Hypotoniebehandlung ist abhängig von Luftdruck, Umgebungstemperatur und Luftfeuchte und führt dazu, dass die Erythrozyten platzen und die Lymphozyten aufquellen.

Nach erneuter Zentrifugation für 8 Minuten bei 800 rpm wurde der Überstand verworfen und zu dem Pellet tropfenweise das eisgekühlte Fixativ (-20°C) Methanol/Eisessig (3:1) zugegeben. Während der Zugabe wurde die Lösung vorsichtig suspendiert, um die Entstehung von Luftblasen verhindert, welche die Lymphozyten zum Platzen bringen würden. Das Zellpellet wurde mindestens 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation mit 800 rpm für 8 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem, tiefgekühlten Fixativ resuspendiert. Der letzte Schritt wurde so lange wiederholt, bis alle Erythrozytenreste entfernt waren und das Pellet eine weiße Farbe hatte.

Die Zellsuspension wurde auf Objektträger, die in 50% Ethanol bei -20 C° gelagert waren, aufgetropft. Die Objektträger wurden anschließend luftgetrocknet, mikroskopisch begutachtet und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.9 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Entwickelt wurde die in situ-Hybridisierung 1969 parallel von John und Mitarbeitern sowie von Pardue und Gall (1969). Sie dient dem Nachweis von DNA- oder RNA Sequenzen in Geweben. So lassen sich mit dieser Methode numerische Veränderungen nachweisen. Die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung funktioniert über die komplementäre Paarung der Basen zweier Nukleinsäurestränge. Ist die Basensequenz des zu untersuchenden DNA-Abschnittes bekannt, lässt sich eine komplementäre Sonde herstellen, welche mit fluoreszierenden Haptenen indirekt oder auch direkt markiert ist (s. Abb. 4.1).

Damit die Sonde an die zu untersuchende DNA binden kann, müssen diese denaturiert, d.h. in Einzelstränge aufgetrennt werden. Dazu wird die DNA über ihren jeweiligen Schmelzpunkt erhitzt. Der Schmelzpunkt eines bestimmten DNA-Fragmentes hängt vom Gehalt der einzelnen Basen ab und kann mit Hilfe folgender Formel errechnet werden:

$$T_m = 0,41 (\%G+C) + 16,6 \log (\text{mol Na}^+/\text{l}) - 500/n - 0,61 (\%FA) + 81,5^\circ\text{C}$$

(Leitchl. J; 1994); (T_m = melting temperature)

Fügt man Formamid (FA) hinzu, sinkt die benötigte Schmelztemperatur, da die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen abgeschwächt werden. Es folgt die Hybridisierung, bei der die Sonde spezifisch an das gesuchte DNA-Fragment bindet. Abhängig ist die Renaturierung von der Temperatur, der Konzentration der DNA als auch dem Salzgehalt der Stringenzwaschlösung als auch des Hybridisierungsmixes.

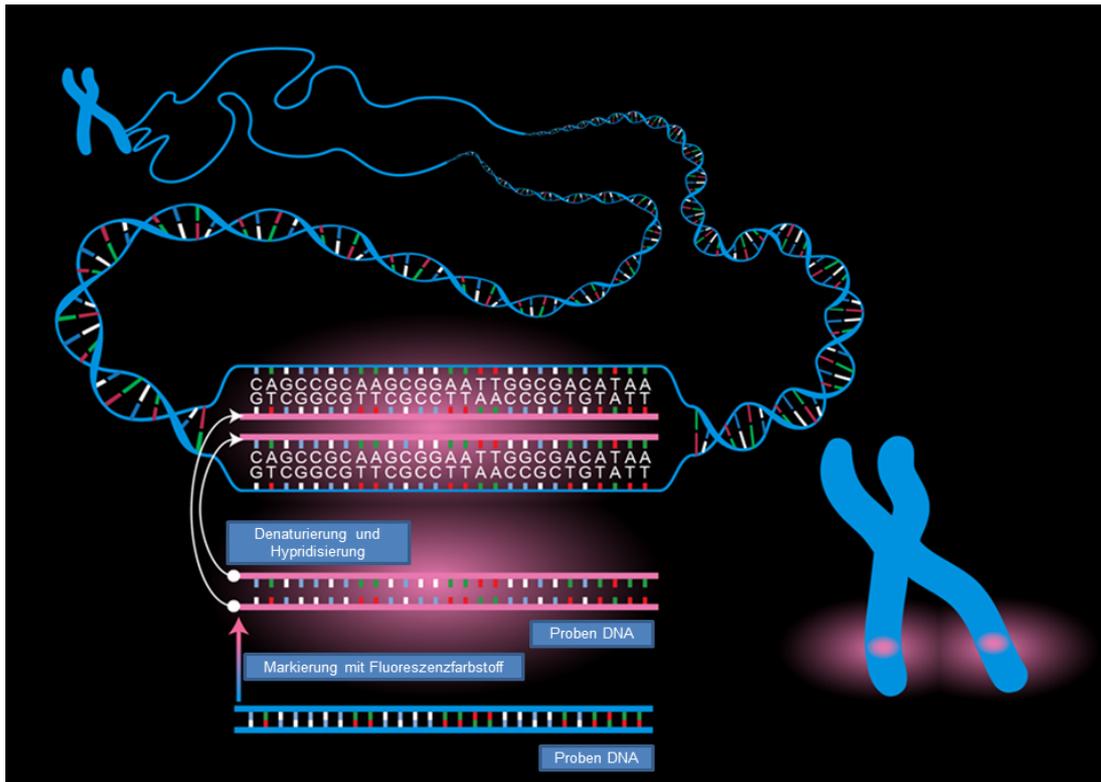


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Denaturierung und Hybridisierung bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (Darryl Leja. NHGRI-Homepage www.genome.gov): Nach der Markierung durch Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt mittels Denaturierung die Voraussetzung, dass die markierten DNA-Abschnitte an den korrespondierenden Chromosomenabschnitte hybridisieren können. Anhand der häufiger gebundenen farbmarkierten Abschnitte sind dadurch Hinweise auf vorliegende genetische Gewinne und Verlust in dem zu untersuchenden Gewebe zu erhalten.

3.9.1 DNA-Sonden

Bei DNA-Sonden handelt es sich um kurze DNA-Fragmente, die so gewählt werden, dass sie zum untersuchenden DNA-Abschnitt komplementär sind.

Zur Herstellung von Sonden lassen sich unterschiedliche Methoden heranziehen. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich große Mengen generieren, allerdings ist die Methode auf kurze und mittellange Sonden limitiert. Für größere Sonden werden Gensequenzen in lebende Organismen eingebracht. Dabei unterscheiden sich die Klonierungsvektoren in ihrer Kapazität. Während Plasmide eine Aufnahmekapazität von 3 kb haben, sind bei Bakterien (*bacterial artificial chromosomes* BAC) 300 kb und Hefe (*yeast artificial chromosome* YAC) über 1000 kb möglich.

Sie können sowohl radioaktiv, indirekt mit Biotin, Haptenen oder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden und entsprechend nachgewiesen bzw. detektiert werden.

In der vorliegenden Studie wurden Sonden sowohl mittels Polymerasekettenreaktion generiert als auch BAC's (s. Kapitel 4.5.2.) verwendet, die jeweils unterschiedlich markiert wurden (s. Kapitel 4.5.3 und 4.5.4).

3.9.2 Herstellung von β -Catenin-Sonden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) dient dazu, bestimmte DNA-Abschnitte *in vitro* zu vervielfältigen.

Die PCR macht sich dabei die Fähigkeiten der DNA-Polymerase zu Nutze, von einem Primer ausgehend einen komplementären Strang zur bestehenden Matrize (*Template*) zu synthetisieren. Die Primer (Oligonukleotidpaare) werden so gewählt, dass sie sowohl am Anfang als auch am Ende der zu vervielfältigenden Sequenz binden. Sie stellen mit ihrer Hydroxygruppe das Startsignal für die Polymerase dar. Neben den Primern und der hitzestabilen Polymerase werden Desoxynukleosidtriphosphate (dATPs, dTTP, dGTP, dCTP), sowie ein geeigneter Reaktionspuffer zugesetzt.

Als erstes wird die DNA, die den gewünschten Abschnitt enthält, auf bis zu 96°C erhitzt. Durch diese Denaturierung wird die DNA in Einzelstränge aufgetrennt. Als nächstes lagern die spezifischen Primer, die die zu vervielfältigende DNA begrenzen und komplementär sind, an die DNA-Einzelstränge an. Dieser Ligationsschritt wird bei einer Temperatur durchgeführt, der von der Länge und der Zusammensetzung der Primer abhängig ist und meist zwischen 52 – 62°C liegt. Nun kann die DNA-Polymerase am 3'-Ende ansetzen und die Stränge mit freien Nukleotiden synthetisieren (Elongation). Dabei verbleibt der Primer an der DNA und bildet den Anfang des neu synthetisierten Stranges. Die Arbeitstemperatur der Polymerase liegt durchschnittlich zwischen 68-72 °C. Alle heutzutage verwendeten DNA-Polymerasen stammen aus thermophilen Organismen und sind für hohe Temperaturen geeignet.

Nach erfolgter Elongation werden alle Schritte meist in 25-30 Zyklen wiederholt. Durch die Mitverwendung der synthetisierten Stränge als *Template* erfolgt die Amplifikation nahezu exponentiell.

Mithilfe der PCR wurden 4 unterschiedliche Fragmente aus dem β -Catenin-Gen vervielfältigt und anschließend markiert. Alle 4 Fragmente sollten zusammen hybridisiert werden, um eine ausreichende Signalintensität zu erreichen.

So wurden 4 Fragmente innerhalb des β -Catenin-Gens gesucht, die keine repetitiven Sequenzen enthielten, um eine unspezifische Bindung an eine andere Region zu verhindern. Die jeweiligen Fragmente enthielten am Anfang und Ende jeweils 20 Basenpaare ohne Triplets sowie einen Cytosin- und Guanin-Anteil von ca. 50 %.

Tabelle 3.3 Sequenzen der Primer für die β -Catenin-Fragmente

Fragment	Primersequenz
Fragment 1	5'AGTGGTAAGTTGCAACTTGC 3' 3'AATCAACCAATGCACACAC 5'
Fragment 2	5'AGCAGATCAGTGAACCATTCC 3' 3'CAGAATGCAGTACTACTTCCTTC5'
Fragment 3	5'TAGACTGCTGATCTTGGACTTG3' 3'CTTGTGATCCATTCTTGTGC5
Fragment 4	5'AGGAGAGATGCTCACAGATG3' 3'CCACCTGAGCCTATTCTAGC5'

Zum Erhalt der 4 Fragmente wurden die Temperaturen sowie die verwendeten Mengen der DNA mehrfach verändert. So variierte die Annealingtemperatur zwischen 53°C–60°C. Als DNA-Matrize wurde sowohl DNA aus EDTA-Blut von männlichen Spendern als auch isolierte β -Catenin-DNA der BACs benutzt.

Der Ansatz bestand aus: 10 μ l PCR-Puffer, 1,5 μ l freie Nukleotide, 1 μ l hitzestabile Polymerase, 2 ng/ μ l DNA und 3 μ l der Fragment-spezifischen Primer. Das Restvolumen wurde mit Aqua dest. auf 100 μ l aufgefüllt.

Die Polymerasekettenreaktion fand nachfolgendem Schema in einem Thermocycler statt.

Tabelle 3.4. PCR Programm zur Vervielfältigung der β Catenin Fragmente

Temperatur	Zeit	
95°C	15 sec	Initiales Denaturieren, Aktivierung der Polymerase
94°C	30 sec	Denaturierung
56°C	30 sec	Ligation
72°C	5 min	Elongation
72°C	10 min	Finale Elongation

4°C	∞	Inkubation
-----	---	------------

Die Schritte von der Denaturierung bis zur finalen Elongation wurden 32 mal wiederholt.

3.9.3 Agarose-Gel-Elektrophorese

Mit der Gelelektrophorese ist eine Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihres Molekulargewichts durch Anlegen einer elektrischen Spannung möglich. Dabei wandern die negativ geladenen DNA Moleküle durch die Gel-Matrix zur Anode, wobei Kleinere schneller als Große aufgetrennt werden. Für die Auftrennung ist dabei neben der Spannung auch die Agarosekonzentration entscheidend. Die Größe der einzelnen DNA-Fragmente wird durch den Vergleich mit einem parallel aufgetragenem DNA-Molekulargewichtsmarker bestimmt.

Um die generierten β -Catenin-Fragmente nachzuweisen, wurde ein 1%-iges Agarosegel verwendet. Ein Gramm Agarose wurde in 100ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer- (TAE) gelöst und in der Mikrowelle erhitzt, bis das Gemisch homogen war. Nach Abkühlung auf 60°C wurde 10 μ l Ethidiumbromid, ein interkalierender Farbstoff, zugesetzt. Nach Auspolymerisieren des Gels in einer Kammer wurden 30 μ l des PCR-Produktes mit 12 μ l Blaumarker-Stammlösung (50 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 50 mM EDTA) versetzt und für 60-80 Minuten bei 101 Volt aufgetrennt. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden unter UV-Kontrolle mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und mit dem NucleoSpin Extract II Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt sowie eluiert.

Hierzu wurde je 100 mg Agarosegel 200 μ l Puffer NT zugegeben und bei 50°C für 5-10 Minuten inkubiert. Der Ansatz wurde auf eine Säule pipettiert und 1 Minute bei 8500 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, 700 μ l Puffer NT3 auf die Säule aufpipettiert und erneut für 1 Minute bei 8500 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen. Zur Trocknung der Membran erfolgte eine erneute Zentrifugation für 2 Minuten. Zur Elution der DNA wurden 20 μ l NE-Puffer (5 mM Tris-Cl, pH 8.5) auf die Säule pipettiert, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss eine Minute bei 8500 rpm zentrifugiert.

3.9.4 Isolierung der Plasmid-DNA aus *Bacterial artificial chromosomes* (BAC's)

Bacterial artificial chromosomes (BACs) dienen als Vektoren für DNA-Fragmente und werden in *E. coli* Bakterien eingebracht (s. Abb, 3.2.). Im Gegensatz zur PCR können hier größere DNA-Abschnitte bis zu 300 kb verwendet werden (Shizuya und Kourou-Mehr, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 3 unterschiedliche BAC's, welche alle spezifisch für das humane β -Catenin-Gen auf Chromosom 3p21 sind, verwendet

1. AQ679397 RPCIB753A171008Q
2. AQ202052 RPCIB753H1661Q
3. AQ452619 RPCIB753M0860Q

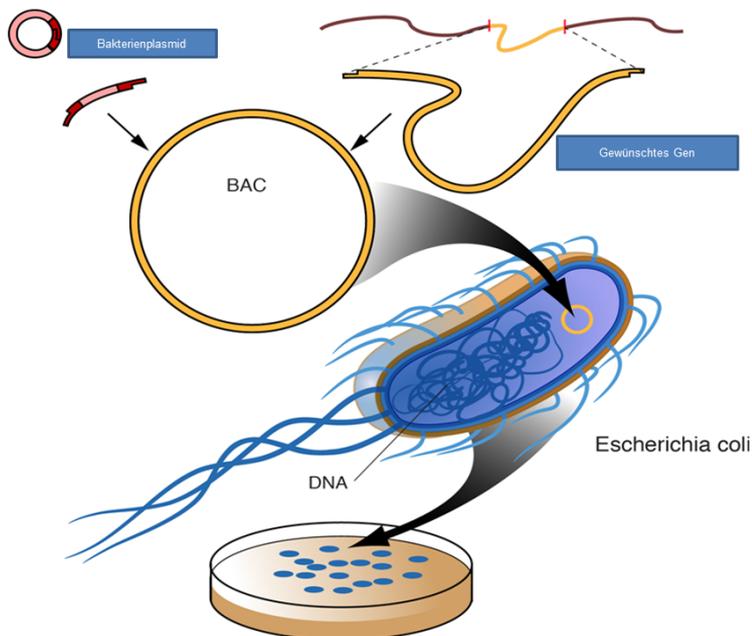


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Sondenherstellung von bacterial artificial chromosomes (Darryl Leja. NHGRI- Homepage www.genome.gov) in *Escherichia coli*: Das gewünschte Gen wird in das Bakterienplasmid eingebracht, welches in das Bakterium überführt wird und dadurch vermehrt werden kann.

Für die Kultivierung wurden 2x 800 ml DIFCO LB (Luria Bertani)-Medium entsprechend den Herstellerangaben angesetzt und autoklaviert. Nachdem das Medium abgekühlt war, wurde es mit Chloramphenicol versetzt. Das Anzüchten der Einzelkolonien erfolgte auf Agarplatten. Hierfür wurde das DIFCO-LB-Agar-Medium nach Angaben des Herstellers angesetzt und bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Nach Herunterkühlen auf 60 °C wurde das Agar-Medium in Petrischalen gegossen.

Aus den als Glycerolstocks erworbenen E.coli Bakterien mit den entsprechenden BACs wurde eine Spatelspitze entnommen und auf den Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C gelagert. Auf dem Chloramphenicol-haltigen Nährmedium erfolgte ein selektives Wachstum der BAC-haltigen Bakterien aufgrund des vorhandenen Resistenzgenes gegen Chloramphenicol. Alle Bakterien, die kein Resistenzgen aufwiesen und damit auch nicht das gewünschte β -Cateningen enthielten, wuchsen nicht auf den vorbereiteten Nährmedien.

Um das Bakterienwachstum zu synchronisieren und damit eine größere Ausbeute zu erhalten, wurde zunächst eine Vorkultur angelegt. Dafür wurden 3 Chloramphenicol-resistente Bakterienkolonien in Erlenmeyer-Kolben mit 5 ml LB-Medium und Chloramphenicol überimpft und 8 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde für die Gebrauchskultur 250ml LB-Medium und Chloramphenicol (50 μ l) mit einem ml Vorkultur beimpft und 12-16 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert.

Zur Isolierung der BACs wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Hierfür wurden die Bakterienkulturen 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Resuspensionspuffer (P1) mit RNase resuspendiert (10 ml Puffer/500ml Bakterienkultur). Zur Lyse der Bakterienbestandteile wurde der Lysepuffer (P2) in gleicher Menge zugefügt, vorsichtig gemischt und für 5 Minuten inkubiert. Nach Zugabe des Neutralisationspuffers (P3) wurde die Lösung abermals gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 30 Minuten bei 1500 rpm. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand mit der gelösten BAC-DNA wurde anschließend weiter aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde der Überstand auf eine mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Säule überführt. Nach 2 weiteren Waschschritten mit jeweils 15 ml QC-Puffer wurde die DNA schließlich mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Zur Verbesserung der Ausbeute wurde der Puffer zuvor auf 50 °C erwärmt.

Es folgte die Fällung mit 17,5 ml Isopropanol (4 °C) bei 4000 rpm für 45 Minuten (4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 5 ml 70%igem Ethanol (4 °C) gewaschen und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet und im Anschluss bei 4 °C über Nacht gelöst. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden photometrisch mittels NanoDrop bestimmt.

3.9.5 Herstellung indirekt markierter β -Catenin-Sonden

Zur indirekten Markierung der Sonden wurden je nach Versuchansatz das *BioPrime DNA Labeling Kit* und das *Dig High Prime Labeling Kit* entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Für die Markierung mit dem *BioPrime DNA Labeling KIT* wurden 100 ng der aufgereinigten BAC DNA als auch die Fragmente mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt und 20 μ l der eisgekühlten beiliegenden Primerlösung (2,5x Random Primer Solution) hinzugefügt. Im anschließenden Denaturierungsschritt bei 98 °C für 5 Minuten wurden die Doppelstränge der DNA getrennt. Nach Lagerung des Reaktionsgemisches auf Eis wurden 5 μ l des beiliegenden 10x dNTP-Mix zugegeben, welcher zusätzlich die Biotin-gekoppelten dCTP-Moleküle (biotin-14-dCTP) zur indirekten Markierung der DNA-Sonden enthält. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 49 μ l aufgefüllt, gemischt und kurz zentrifugiert. Als Polymerase wurde 1 μ l Klenow-Fragment zugesetzt.

Die Replikation wurde bei 37 °C für 1 Stunde durchgeführt und durch die Zugabe von 5 μ l Stopppuffer beendet.

Für die Markierung mit dem *Dig High Prime Labeling Kit* wurden 100 ng aufgereinigte BAC-DNA und Fragmente mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 16 μ l aufgefüllt. Es folgte die Denaturierung für 10 Minuten bei 95 °C. Nach der Inkubation auf Eis für fünf Minuten wurde 4 μ l des beiliegenden Dig High Prime Mix (Random Primer, Nukleotide, DIG-dUTP, Klenow Enzym, Puffer) zugefügt, gemischt und kurz zentrifugiert. Der Replikationsschritt erfolgte für 4,5 Stunden bei 37 °C. Die Beendigung der Reaktion wurde durch die Erhitzung des Gemisches auf 65 °C für 10 Minuten beigeführt.

Die Fällung erfolgte in beiden Ansätzen jeweils mit 0,1x Vol 3M Natriumacetat (NaAc, pH 5,5) und 2,5x Ethanol absolut (-20 °C) für 30 Minuten bei -80 °C. Es schloss sich eine Zentrifugation mit 14000 rpm für 30 Minuten bei 4 °C an. Der Überstand wurde verworfen, mit 200 μ l 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 14000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Getrocknet wurde die DNA anschließend auf der Wärmeplatte bei 37 °C für 30 Minuten. Danach wurde das Pellet in 40 μ l Aqua dest. für eine Stunde bei 4 °C gelöst.

3.9.6 Herstellung direkt markierter β -Catenin-Sonden

Zur direkten Markierung der Sonden-DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto 488 wurde das *Nick Translation Labeling Kit* entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

Für die Markierung wurden 2 μ l 10x NT-Markierungspuffer, 2 μ l Atto-488-NT - Markierungsmix (0.5 mM dATP, 0.5 mM dCTP, 0.5 mM dGTP, 0.25 mM dTTP, 0.25 mM Atto488- dUTP, pH 7.5), 2 μ l 10x Enzymmix (2 U/ μ l Polymerase I, 0.02 U/ μ l DNAse I) mit 1-1,5 μ g DNA gemischt. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 20 μ l aufgefüllt und nochmals gemischt. Alle Schritte erfolgten im Dunkeln, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern. Das Reaktionsgefäß wurde 90 Minuten bei 15 °C im Thermocycler inkubiert und die Reaktion mit 5 μ l 0.5 M EDTA, pH 8.0 abgestoppt.

Die Fällung der markierten DNA erfolgte analog zur Fällung in 4.5.3

3.9.7 FISH an Zellkultur- und Lymphozytenpräparaten

Zunächst wurden die Präparate kurz in 2x SSC gestellt. Für die Entfernung von RNA aus Zytoplasma und Zellkern wurde 1 μ l RNase A-Stammlösung (10mg/ml 2x SSC) in 100 μ l 2x SSC auf das Präparat pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und 15 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Im Anschluss wurde das Deckglas entfernt und die Präparate auf dem Schüttler 3 x 5 Minuten in 2x SSC bei RT gewaschen. Ein Teil der Präparate wurde vor dem Pepsinverdau mit 1 M NaSCN (80 °C) für 10 Minuten vorbehandelt, um die Permeabilität zu erhöhen und anschließend für 1 Minute in Aqua dest. und 2 x 3 Minuten in 2x SSC gewaschen. Es folgten bei allen Präparaten ein Pepsinverdau, um die Permeabilität der Zellkern-Membran zu erhöhen. Dazu wurden 100 μ l Pepsin-Stammlösung (5% in Aqua dest.) in 100 ml 0,01N HCl gemischt, da Pepsin nur in saurem Medium aktiv ist. Der Verdau fand bei 37 °C statt. Die Zeitdauer des Verdau war vom Präparat abhängig und betrug zwischen 1 und 2 Minuten. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS für 5 Minuten erfolgte die Fixierung des Präparates mit 4% PFA/PBS (4°C) für 10 Minuten. Im Anschluss an 2 weitere Waschschrift mit PBS für jeweils 5 Minuten wurde eine Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 100%) für jeweils 5 Minuten durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Auf die vorbereiteten Präparate wurde der Sondenmix aufpipettiert (5µl deionisiertes Formamid, 1µl Cot-DNA, 1µl steriles 20x SSC und 3µl Atto 488-, Biotin- oder Digmarkierter Sonde der BAC als auch der Fragmente). Hierbei wurden sowohl die 3 unterschiedlichen BAC's (A = AQ679397; H= AQ202052; M= AQ452619) einzeln sowie in verschiedenen Kombinationen variiert (unterschiedlichen Fragmente miteinander als auch die Menge der Cot-Dann). Die Cot-DNA ist menschliche plazentare DNA, mit einer Größe von 50 bis 300 bp, die repetitive DNA-Sequenzen blockiert, um eine unspezifische Hybridisierung zu verhindern. Neben den β -Catenin-sonden wurde eine zentromerspezifische Sonde für das Chromosom 3 auf die Präparate aufgebracht.

Für die fluoreszenzmarkierten Sonden wurden die entsprechenden Arbeitsschritte im Dunkeln ausgeführt.

Die Präparate wurden nach Aufbringen der jeweiligen Sonde mit Deckgläsern abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet. Nach der Trocknung des Fixogum erfolgte die Denaturierung für 5 Minuten bei 75 °C auf der Heizplatte.

Alternativ erfolgte eine Versuchsreihe mit einer getrennten Denaturierung. Hierzu wurden die Präparate in 70 % Formamid/2xSSC bei 72°C denaturiert und ein Renaturieren durch eine nachfolgende eiskalte aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, jeweils 2 Minuten) verhindert. Nach dem Lufttrocknen wurde der Sondenmix 5 min. im Wasserbad bei 75 °C denaturiert und im Anschluss auf die denaturierten Präparate pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet.

Die Hybridisierung der Sonden an die Ziel-DNA erfolgte je nach Versuchsansatz über Nacht oder 2 Nächte im Wärmeschrank bei 37 °C in einer feuchten Kammer.

Zur Reduktion unspezifischer Bindungen erfolgte im Anschluss eine Stringenzwaschung. Hierzu wurden die Präparate nach Entfernung der Deckgläser bei 42°C im Wasserbad mit 50% Formamid/2x SSC für 3x 5 Minuten gewaschen. Es folgten 2 weitere Waschschrte mit 2x SSC ebenfalls bei 42 °C für jeweils 5 Minuten.

Da bei einer direkt fluoreszenzmarkierten Sonde keine Detektion erforderlich ist, wurden diese Präparate anschließend in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 100%) dehydriert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Abschließend erfolgten die Applikation von DAPI-Antifade und die Auflage eines Deckgläschens. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an die AT-reichen Regionen der DNA bindet und somit die Zellkerne sichtbar macht. Durch sein Emissionsmaximum bei 461 nm kann man DAPI noch mit weiteren Fluoreszenzfarbstoffen, die ein höheres Emissionsmaximum haben, kombinieren.

Die Präparate mit den indirekten Sonden wurden nach der Stringenzwaschung für 5 Minuten in 4x SSC/0,1% TritonX-100 eingestellt und danach mit 5% *bovine serum albumine* (BSA = Rinderalbumin)/4x SSC für 20 Minuten zur Reduktion einer unspezifischen Antikörperbindung des Fluoreszenzfarbstoffes geblockt. Die Detektion des Biotin-Signals erfolgte mit Streptavidin- Fluorescein- Isothiocyanate- Conjugate (FITC) (1:100) in 5 % BSA/4x SSC. Die folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt.

Dafür wurden die Präparate für 45 Minuten in einer feuchten Kammer im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in 4x SSC/0,1% TritonX-100 bei 37 °C für 3x 5 Minuten gewaschen. TritonX-100 wurde den Waschlösungen zur Erhöhung der Zellmembran-Permeabilität zugesetzt. Es folgte ein erneutes Blocken durch 5% BSA/4x SSC bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals wurden die Präparate mit Bio-Anti-Streptavidin 1:100 in 5 % BSA / 4x SSC für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert bzw. das Digoxigenin mit Anti- Dig-Cy3 1: 200 detektiert. Es folgten 3 Waschschrte für je 5 Minuten in 4x SSC/0,1% TritonX-100 bei 37 °C. Nach erneutem Blocken der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen mit 5 % BSA/4x SSC bei Raumtemperatur für 10 Minuten, wurde zur Bindung an Bio-Anti-Streptavidin erneut Streptavidin-FITC 1:100 aufpipettiert bzw- zur Verstärkung des Cy3 Signals Gam (goat anti mouse) - Cy3 1:400 und bei 37 °C inkubiert.

Nach 30 Minuten erfolgte der letzte Waschschrte in 4x SSC/0,1 % TritonX-100 bei 37 °C für 3x 5 Minuten. Die Dehydrierung wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 80%, 100% für jeweils 5 Minuten durchgeführt. Die Präparate trockneten für 30 Minuten. Auch hier erfolgte die Gegenfärbung der Kernstrukturen mit DAPI-Antifade.

Die Lagerung der Präparate erfolgte im Dunkeln bei 4 °C. Sie wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 61 ausgewertet.

3.9.8 FISH an Gewebeschnitten

Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte über Nacht in den Wärmeschrank bei 60 °C gestellt und anschließend für 2x 10 Minuten in Xylol gegeben. Die Rehydrierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 80%, 70%) für jeweils 3 Minuten. Nach Trocknung der Präparate auf einer Heizplatte (30 Minuten bei 50 °C) wurden sie mit 0,2 N HCl in Aqua dest. bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Nach Waschschrten mit Aqua dest. und PBS für jeweils 5 Minuten folgte eine

Fixierung in 4 % PFA/BPS bei 4°C für 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte nochmals für 5 Minuten in PBS gestellt.

Für den Verdau wurde der Gewebsverdau-Kit nach Herstellervorgaben bei 45 °C im Wasserbad verwendet. Nach kurzer Spülung mit 2x SCC wurde eine Vorbehandlung der Schnitte mit „Pretreatment“-Lösung (15 g „Pretreatment“-Puffer in 50 ml 2x SCC) durchgeführt. Im Anschluss an einen erneuten kurzen Waschschrift mit 2x SCC folgte der eigentliche Verdau mit „Protein-Digestin-Enzym“. Dafür wurden 400 µl Enzym-Stammlösung mit 40 ml 2x SSC gemischt. Nach Spülung der Präparate in 2x SSC für 2x 5 Minuten wurden die Schnitte in 2x SSC für 30 Minuten bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und im Anschluss bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten getrocknet.

Die Zeiten für Vorbehandlung und Verdau variierten in Abhängigkeit vom Bindegewebsanteil der Tumorgewebeschnitte zwischen jeweils 8 und 20 Minuten.

Tabelle 3.5.: Verdauzeiten der einzelnen Fälle

Fall	Vorbehandlung und Verdau
T 820	jeweils 8 Minuten
AF 74	jeweils 12 Minuten
AF 680	jeweils 16 Minuten
AF 691	jeweils 16 Minuten
AF 895	jeweils 16 Minuten
AF 896	jeweils 20 Minuten
AF 2336	jeweils 16 Minuten

T = Tonsille, AF= Angiofibrom

Vor dem Aufbringen der Sonde wurden die Schnitte bei 80 °C für 15 - 20 Minuten auf der Heizplatte denaturiert. Auch bei der Anwendung am Paraffinschnitt wurden der Hybridisierungsmix bezüglich der verwendeten Sonden BACs, der Fragmente und der Menge der Cot- DNA in verschiedenen Versuchsreihen zunächst ausgetestet.

Der Hybridisierungsmix bestand aus 5 µl deionisiertem Formamid, 1 µl sterilem 20x SSC, 1 µl Cot-DNA und 3 µl Atto 488- oder Biotin-markierter β-Catenin-Sonde. Neben

der β -Catenin-Sonde wurde eine zentromerspezifische Sonde für das Chromosom 3 verwendet.

Dieses Gemisch wurde bei 75 °C für 5 Minuten im Wasserbad denaturiert und zur Verhinderung der Renaturierung direkt auf Eis gelagert. Nach dem Aufbringen des Hybridisierungsmix wurde ein Deckglas aufgebracht und mit Fixogum verschlossen. Sobald das Fixogum getrocknet war, wurden die Präparate bei 80 °C für 90 Minuten erneut im Wasserbad denaturiert und anschließend bei 37 °C in einer feuchten Kammer über Nacht hybridisiert.

Die Stringenzwaschung wurde nach Entfernen des Deckglases wie in 4.2.1 beschrieben durchgeführt. Hierbei wurden jedoch alle Waschschriffe für jeweils 10 Minuten durchgeführt. Die Detektion erfolgte identisch mit den Präparaten der Zellkultur und der Lymphozyten. Abschließend wurden die Präparate bei 4°C im Dunkeln gelagert und an einem Olympus BX61 Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hierzu wurden wenn möglich 200 möglichst intakte Zellkerne entsprechend den Kriterien von Hopman und Mitarbeiter (1991) ausgewertet.

4 Ergebnisse

β -Catenin als Bestandteil des WNT-Signalwegs wird als ein maßgeblicher Faktor in der Tumorphogenese des JA angesehen. Eine erhöhte β -Catenin-Expression konnte durch den Nachweis von Mutationen im β -Catenin-Gen in bis zu 75 % der untersuchten Angiofibrome erklärt werden. Die β -Catenin-Überexpression bei fehlender Mutation ist bis jetzt nicht verstanden. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob ein Gengewinn/eine Amplifikation von β -Catenin im juvenilen Angiofibrom vorliegt.

Hierfür wurden sechs Paraffinschnitte und vier Zellkulturlinien von Angiofibromen untersucht. Als Referenzgewebe dienten Lymphozytenpräparate aus Vollblut und Tonsillengewebe.

4.1 Herstellung und Anwendung der PCR-generierten β -Cateninsonde

Die Herstellung der Sonden erfolgte nach dem in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Protokoll. Von den vier ausgewählten Fragmenten ließen sich nicht alle amplifizieren. Nur die Fragmente 2 und 3 konnten mittels PCR in ausreichender Anzahl und reproduzierbar generiert werden

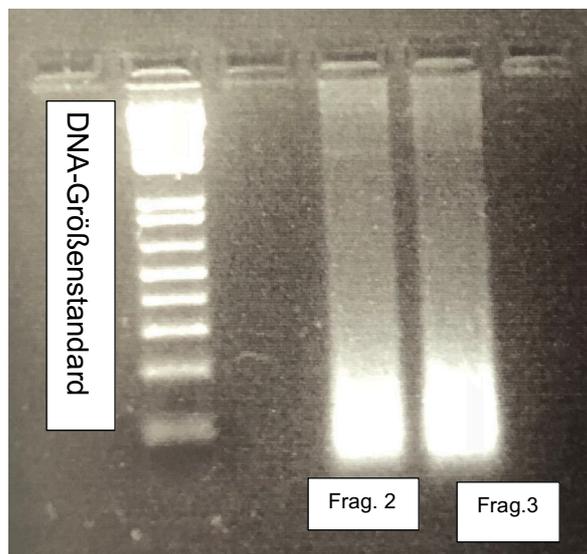


Abbildung 4.1: Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung der mittels PCR amplifizierten β – Cateninfragmente. Die Ansätze enthielten die DNA für die Fragmente 2 und 3. Die Fragment-DNA hat eine Größe von ca. 100 kb bis 300 kb

Die aufgereinigten Fragmente wurden anschließend direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto 488 als auch indirekt mit Biotin oder Digoxin markiert (siehe Kapitel 4.5). Die indirekte Markierung mit dem *Dig High Prime Labeling Kit* zeigte nach der Fällung eine sehr geringe und nicht ausreichende Sondenmenge, so dass nur die Markierung mit dem *Bio Prime Labeling Kit* weitergeführt wurde.

Die FISH der mittels PCR generierten Fragmente erfolgte an Lymphozytenpräparaten, der Angiofibromzellkultur und den Angiofibrom-Paraffinschnitten. Die Sonden zeigten eine spezifische Bindung an die β -Catenin codierende Region auf Chromosom 3 an Mitosen von Lymphozytenpräparaten.

Die Signale waren am Mikroskop jedoch zunächst nicht auswertbar. Erst nach langer Anregungszeit, Bildaufnahme und der Bildbearbeitung waren die Signale detektierbar. Durch die lange Anregungszeit erhöhte sich die Autofluoreszenz des Gewebes und erschwerte die Auswertung durch eindeutige Zuordnung der Signale (Abb. 5.2.), die aus diesen Gründen zur Vermeidung von fehlerhaften Auswertungen verworfen wurde.

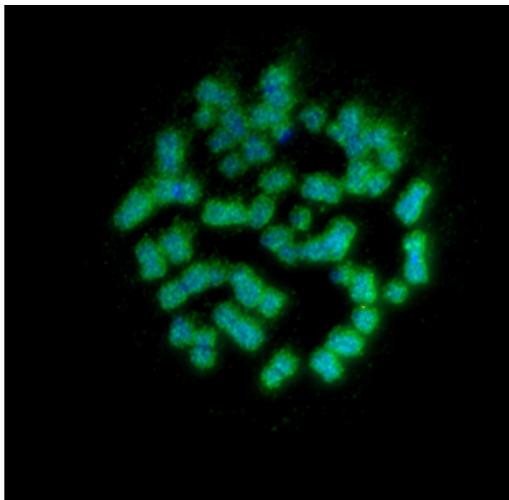


Abbildung 4.2: Chromosomen eines Lymphozyten in der Mitose direkt markiert mit Atto488 nach ca. zwei Minuten Anregungszeit. Grün erscheint hierbei die verwendete Sonde, Blau ist die Färbung mit DAPI. Das Bild wurde mit einer 60fachen Vergrößerung aufgenommen. Zu erkennen ist, dass die Auswertung der Signale im Grenzbereich der Verstärkung sehr schwierig war und aufgrund möglicher Fehler nicht weiterverfolgt wurde.

4.2 Herstellung und Anwendung der *BAC*-generierten β -Cateninsonde

Die β -Catenin-Sonden wurden wie unter 4.5.3 und 4.5.4 beschrieben direkt und indirekt markiert und am Lymphozytenpräparat, der Angiofibromzellkultur und den Paraffinschnitten angewandt.

Die drei verschiedenen *BACs* wurden nach der Markierung sowohl einzeln als auch in Kombination markiert und hybridisiert. Die Signalintensität der einzelnen hybridisierten *BACs* zeigte sich schwächer als die Kombination von *BAC* H mit *BAC* M. So konnten alle anderen Kombinationen (*BAC* H mit A, *BAC* A mit M) erst nach langer Anregungszeit und anschließender Aufnahme mit Bildbearbeitung ausgewertet werden.

Die direkt markierten Sonden benötigten für ein detektierbares Signal eine sehr lange Anregungszeit (mehr als 2 Minuten). Das Signal zeigte sich sehr klein (s. Abb 5.3.), so dass die Auswertungen nur mit der indirekten Markierung fortgesetzt wurden.

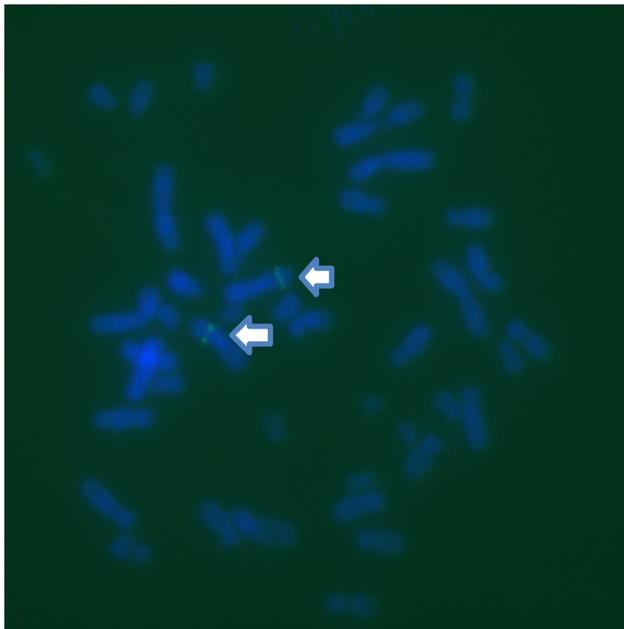


Abbildung 4.3: Chromosomen eines Lymphozyten in der Mitose direkt markiert mit Atto488 nach ca. zwei Minuten Anregungszeit und anschließender Bearbeitung. Grün ist die verwendete β -Catenin-Sonde (Markierung durch Pfeile), Blau ist die Färbung mit DAPI. Das Bild wurde mit einer 60fachen Vergrößerung aufgenommen.

4.3 Gewebebehandlung und Durchführung der FISH an Zellkultur

Für die Permeabilität der Zellmembran wurden unterschiedliche Verdauzeiten mit Pepsin ausgetestet. Dabei zeigte die Anwendung über eineinhalb Minuten eine gute Permeabilität für die Sonde und die Integrität der Chromosomen. Eine zusätzliche Anwendung von NaSCN brachte keine signifikanten Vorteile durch bessere Permeabilität der Sonde und damit Reduktion der Verdauzeit. Jedoch führte der weitere Arbeitsschritt zur Verlängerung der Versuchsdauer.

Die Sonde wurde in einer Versuchsreihe gemeinsam mit dem Präparat denaturiert, ebenso wurde eine getrennte Denaturierung ausgetestet mit einer Hybridisierungsdauer von 1-2 Nächten. Die gemeinsame Denaturierung und die Hybridisierung für eine Nacht erbrachten die besseren Ergebnisse. Im Vergleich beider Methoden war die Versuchsdauer kürzer und die Hybridisierung war spezifischer.

4.4 Gewebebehandlung und Durchführung der FISH am Paraffinschnitt

Aufgrund der Heterogenität des juvenilen Angiofibroms variierten die Vorbehandlung und der Verdau. Der Verdau der einzelnen Gewebeschnitte war abhängig von dem Aufbau des Tumorgewebes (unterschiedlicher Anteil der fibrösen Komponente) und teilweise aus Voruntersuchungen bekannt.

Tabelle 4.1: Verdauzeiten der einzelnen Fälle

Fall	Vorbehandlung und Verdau
T 820	jeweils 8 Minuten
AF 2336	jeweils 16 Minuten
AF 74	jeweils 12 Minuten
AF 680	jeweils 16 Minuten
AF 691	jeweils 16 Minuten
AF 896	jeweils 20 Minuten
AF 895	jeweils 16 Minuten

T = Tonsille, AF= Angiofibrom

Bei der Denaturierung zeigte sich eine getrennte Denaturierung von Sonde und Präparat von Vorteil gegenüber der gemeinsamen Denaturierung. Die Sonde hybridisierte besser und erbrachte eindeutigere Signale nach getrennter Denaturierung.

4.5 Ergebnisse der FISH Untersuchung an Lymphozytenpräparaten

In einem ersten Schritt wurde die FISH-Untersuchung an 200 Zellkernen eines Lymphozytenpräparats ausgeführt (Abb. 5.4), um die angewandte Sonde zu evaluieren. Neben der β -Catenin-Sonde wurde eine Zentromersonde für das Chromosom 3 eingesetzt, um Aussagen zum Chromosom 3 über das auf dem Chromosom 3 lokalisierte β -Catenin hinaus treffen zu können.

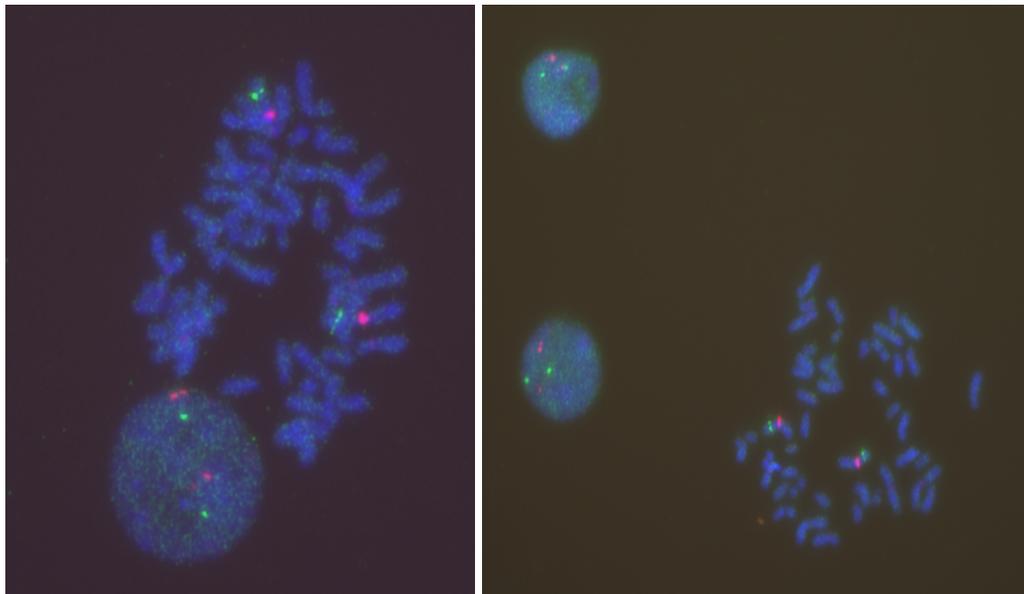


Abbildung 4.4: Mitose und Zellkern eines Lymphozytenpräparates, Grün= β -Cateninsonde (BACs H/M), Rot= Zentromersonde Chromosom 3, Blau = DAPI Kernfärbung, 60fache Vergrößerung.

Bei der Auswertung des Lymphozytenpräparates zeigten sich 193 (96,5 %) von 200 Zellkernen mit normalem Verteilungsmuster, drei der Zellkerne (1,5 %) hatten einen Verlust des Chromosom 3, ebenso viele Zellkerne zeigten nur ein β -Cateninsignal. Bei einem der ausgezählten Zellkerne (0,5 %) lagen zwei β -Cateninsignale vor, jedoch nur ein Zentromersignal (Tab. 5.2). Entsprechend dieses Ergebnis konnte die Sonde für die Analyse von Gewebe genutzt werden.

Tabelle 4.2: Auswertung des Lymphozytenpräparates

		3 cen				
		0	1	2	3	4
β-Cat	0					
	1		3	3		
	2		1	193		
	3					
	4					
	4					

Bei dem untersuchten Lymphozytenpräparat wurden keine Gewinne durch die Zentromersonde am Chromosom 3 und der β-Catenin-Sonde bei 200 untersuchten Zellkernen detektiert (β-Cat = BAC Sonde des β-Catenin, 3 cen = Zentromersonde für Chromosom 3).

4.6 Ergebnisse der FISH-Untersuchung an Tonsillengewebe

Im nächsten Schritt erfolgte nach der Untersuchung der Lymphozyten die Analyse eines Kontrollgewebes. Hierfür wurde Tonsillengewebe ausgewählt. Zur Auswertung kamen 200 Zellkerne. 167 (83,5%) der 200 Zellkerne hatten eine normale Signalverteilung, bei drei (1,5 %) lag jeweils nur ein Signal vor. Ein β-Cateninsignal jedoch kein Zentromersignal hatte ein Zellkern (0,5 %) und drei der Zellkerne (1,5 %) hatten zwei β-Cateninsignale und kein Zentromersignal. Bei 15 Zellkernen (7,5 %) fanden sich zwei β-Cateninsignale und nur ein Zentromersignal. Zwei Zentromersignale, aber ein Signal für β-Catenin wiesen vier der untersuchten Zellkerne (2 %) auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.3 übersichtlich dargestellt und zeigten keine Hinweise auf vorliegende genomische/chromosomale Gewinne.

Tabelle 4.3: Auswertung des Tonsillengewebes

		3 cen				
Signale		0	1	2	3	4
β-Cat	0					
	1	1	5	4		
	2	3	15	167		
	3					
	4					

Bei dem untersuchten Tonsillengewebe wurden keine Gewinne durch die Zentromersonde am Chromosom 3 und der β-Catenin-Sonde bei 200 untersuchten Zellkernen detektiert (β-Cat = BAC Sonde des β-Catenin, 3 cen = Zentromersonde für Chromosom 3).

4.7 Ergebnisse der FISH-Untersuchung an der Zellkultur

Die Markierung mit der indirekt markierten Sonde erfolgte an den Zellkulturen der Tumoren Nr. 895, 896, 3544 und 691.

Die erste Auswertung erfolgte bei der Zellkultur gewonnen von dem Tumorgewebe 895. In Abbildung 4.3 ist exemplarisch das Ergebnis an ausgewählten Zellkernen dargestellt. Während die umgebenden Zellkerne eine Normalverteilung für beide Sonden zeigen, findet sich zentral für die β-Cateninsonde in einem Zellkern ein in der Anzahl gesteigertes Signal.

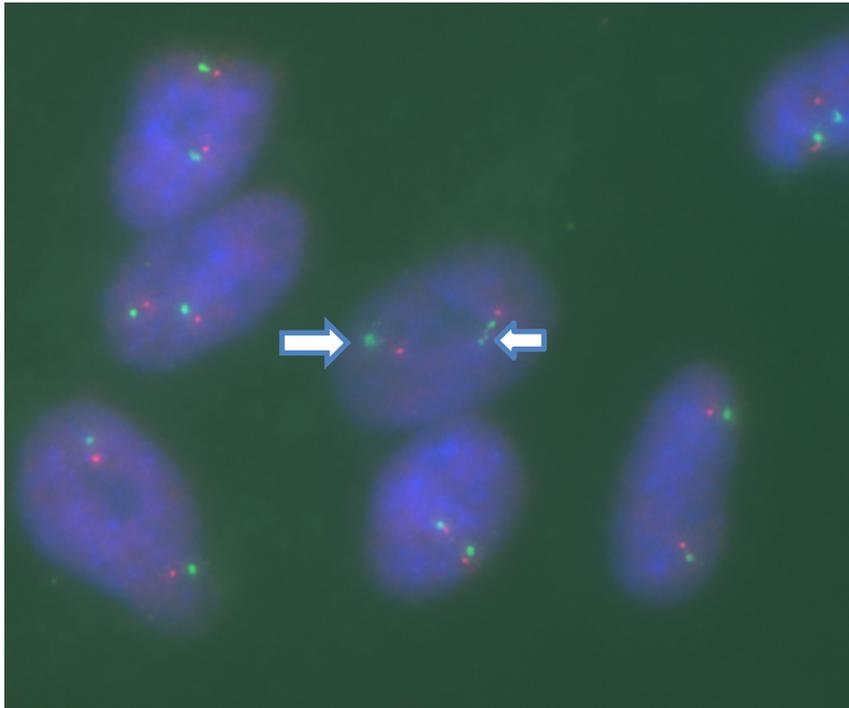


Abbildung 4.5: Zellkerne der Zellkultur 895 nach Einsatz der Sonden mit dem Befund einer gesteigerten β -Catenin-Aktivität (grün = β -Catenin-Sonde; rot = Zentromersonde Chromosom 3, blau = DAPI, 60fache Vergrößerung)

Bei 193 (96,5 %) der 200 Zellkerne zeigte sich eine Normalverteilung der Signale. Ein Signal für Chromosom 3 lag bei einem (0,5 %) der ausgezählten Zellkerne vor. Jeweils nur ein Signal für β -Catenin bei zwei Zentromersignalen und umgekehrt lagen bei zwei der Zellkerne (1 %) vor. Daneben zeigte ein Zellkern (0,5 %) Gewinne beim β -Catenin. Zusätzlich zu den Gewinnen konnten bei einem diploiden Chromosomensatz für Chromosomen drei Amplifikationen nachgewiesen werden (Abb. 5.3).

Tabelle 4.4: Auswertung der Zellkultur 895

		3 cen				
	Signale	0	1	2	3	4
β-Cat	0					
	1		1	2		
	2		2	193		
	3					
	4			1		1

Die Abbildung zeigt die Anzahl der Detektionen in 200 Zellkernen in einer Zellkultur des Angiofibroms mit der Nummer 895. In zwei Zellkernen fanden sich jeweils vier β-Catenin-Signale, die einmal mit vier Zentromersonde-Signalen des Chromosoms drei einherging (β-Cat = β-Catenin-Sonde; 3 cen = Zentromersonde 3).

Die FISH an Zellkulturpräparaten von Fall 896 ergab in 178 (89 %) der 200 Zellkerne zeigten eine normale Signalverteilung. Bei einem Zellkern (0,5 %) fand sich nur ein Signal für Chromosom drei bzw β-Catenin. Ebenfalls bei einem (0,5 %) lag bei normalem Signal für die Zentromersonde nur ein Signal für β-Catenin vor. Drei der untersuchten Zellkerne (1,5 %) hatten drei Signale für das Chromosom drei und drei (1,5 %) hatten bei zwei Zentromersignalen drei β-Cateninsignale. Jeweils vier Signale für β-Catenin und die Zentromersonde hatten vier Zellkerne (2 %), Gewinne im Sinne von vier β-Cateninsignalen bei normaler Zentromersonde lagen bei 10 Zellkernen (5 %) vor. Jeweils vier β-Cateninsignale mit drei Zentromersignalen hatten fünf der Zellkerne (2,5 %).

Es konnten neben den oben beschriebenen Signalen noch Amplifikationen gezeigt werden.

Tabelle 4.5: Auswertung der Zellkultur 896

3 cen

Signale	0	1	2	3	4
0					
1		1	1		
2			178		
3			3	3	
4			10	5	4

In der Tabelle sind die 200 ausgezählten Zellkerne aufgeführt. In drei Zellkernen fanden sich zwei Zentromersignale jedoch drei β -Cateninsignale. Bei weiteren 10 Zellkernen konnte ein diploider Chromosomensatz mit vier β -Cateninsignalen nachgewiesen werden. Drei Zellkerne zeigten jeweils drei Signale für die Zentromersonde als auch für das β -Catenin. Bei fünf Zellkernen fanden wir drei Zentromersignale, jedoch fünf β -Cateninsignale. Vier Zellkerne zeigten jeweils vier Signale für die Zentromersonde und die β -Cateninsonde.

Als nächstes untersuchten wir den Tumor mit der Nummer 3544. Hier zeigten 179 (89,5 %) der 200 Zellkerne eine normale Verteilung der Signale. Bei einem (0,5 %) Zellkern gab es nur ein Signal für das Chromosom drei. 11 (5,5 %) Zellkerne zeigten einen Verlust des β -Cateninsignals und drei Zellkerne (1,5 %) hatten drei Signale für das β -Catenin. Jeweils vier Signale für das β -Catenin ließ sich in 2 Zellkernen (1%) nachweisen. Ein Zellkern (0,5%) hatte drei Signale sowohl für die Zentromersonde als auch das β -Catenin. Ebenso ein Zellkern (0,5 %) hatte drei Signale für das β -Catenin, jedoch vier Signale für die Zentromersonde. Zwei der Zellkerne hatten jeweils vier Signale. Interessanterweise fanden sich bei diploiden Chromosomen für das Chromosom drei Amplifikationen des β -Cateningens

Tabelle 4.6: Auswertung der Zellkultur 3544

		3 cen				
Signale		0	1	2	3	4
β-Cat	0					
	1		1	11		
	2			179		
	3			3	1	1
	4			2		2

Bei drei der untersuchten Zellkerne zeigte sich ein diploider Chromosomensatz jedoch drei Signale für das β-Catenin. Bei zwei weiteren mit diploidem Chromosomensatz konnten vier β-Cateninsignale nachgewiesen werden. Ein Zellkern hatte jeweils drei Signale. Bei einem Zellkern lagen vier Signale für die Zentromersonde vor, jedoch nur drei für das β-Catenin. Bei zwei Zellkernen fanden wir je vier Signale.

Als letztes untersuchten wir die Zellkultur des Tumors 691. In der Abbildung 4.6 ist ein Zellkern dargestellt mit einer normalen Signalanzahl für die Zentromersonde des Chromosoms 3 und 3 Signalen für das β-Catenin zu sehen.

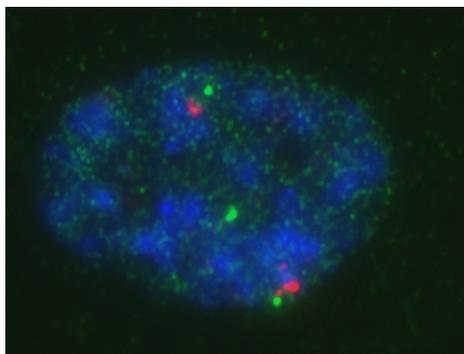


Abbildung 4.6: Zellkern der Zellkultur 691 mit einem zusätzlichen Signal nach Markierung für β-Catenin (grün = β-Catenin-Sonde; rot = Zentromersonde Chromosom 3, blau = DAPI, 60fache Vergrößerung)

Eine Normalverteilung wiesen 190 (95 %) der 200 Zellkerne auf. Drei (1,5 %) hatten drei β-Cateninsignale, vier (2%) Zellkerne hatten vier β-Cateninsignale und zwei (1%) hatten fünf β-Cateninsignale. Bei einem (0,5 %) der untersuchten Zellkerne ließen sich fünf Signale für das β-Catenin nachweisen, jedoch auch drei Signale der Zentromersonde.

Tabelle 4.7: Auswertung der Zellkultur 691

		3 cen				
	Signale	0	1	2	3	4
β-Cat	0					
	1					
	2			190		
	3			3		
	4			4		
	5			2	1	

Bei drei Zellkernen mit diploidem Chromosomensatz konnten wir drei Signale für das β-Catenin detektieren. Vier weitere Zellkerne mit diploidem Chromosomensatz hatten vier Signale für das β-Catenin, zwei Zellkerne hatten fünf. Ein Zellkern hatte drei Signale für die Zentromersonde und fünf β-Cateninsignale.

4.8 Ergebnisse der FISH Untersuchung an den Paraffinschnitten

Wie in Tabelle 4.1 bereits beschrieben, wurden die Schnitte AF 74 AF 680 AF 691, AF 2336, AF 896, AF 896 mit der β-Cateninsonde hybridisiert und jeweils 200 Zellkerne ausgewertet. Als Kontrollgewebe wurde Gewebe aus einer Tonsille verwendet.

Es folgen die Auswertung der Zellkerne des AF 680, AF 691, AF895, AF896. Das Angiofibrom 74 zeigte ein normales Verteilungsmuster, jedoch vereinzelt Amplifikationen, das Angiofibrom 2336 zeigte keine Gewinne oder Amplifikationen.

Als erstes erfolgte die Auswertung an dem Paraffinschnitt des Tumorgewebes 680. In der Abbildung 4.7 ist ein Zellkern mit der Amplifikation des Signales für β-Catenin zu erkennen.

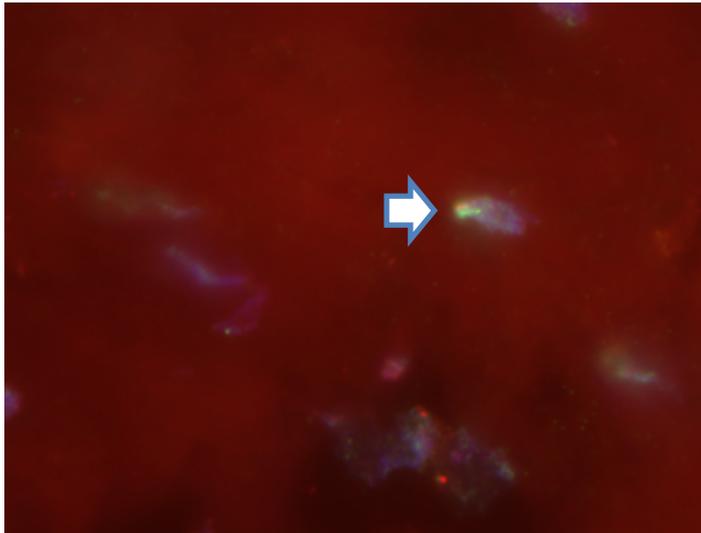


Abbildung 4.7: Paraffinschnitt AF 680; Grün= BAC Sonde für β -Catenin (Pfeil), Rot= Zentromersonde für Chromosom 3, Blau = DAPI, 60fache Vergrößerung

Von den 200 untersuchten Zellkernen zeigten 189 (94,5%) keine Veränderung der Signale. Bei einem (0,5%) fand sich nur ein Zentromer wie auch β -Cateninsignal. Ebenfalls ein Zellkern (0,5%) hatte nur ein Zentromersignal, jedoch drei Signale für β -Catenin. Bei vier Zellkernen fanden sich zwei β -Cateninsignale (1%) und nur ein Signal der Zentromersonde. Bei einem diploiden Chromosomensatz hatten zwei Kerne (1%) drei β -Cateninsignale und drei Zellkerne (1,5%) vier β -Cateninsignale. Neben den beschriebenen Veränderungen fand sich in einem Zellkern auch eine Amplifikation des β -Cateninsignales.

Tabelle 4.8: Auswertung am Paraffinschnitt 680

		3 cen				
Signale		0	1	2	3	4
β -Cat	0					
	1		1			
	2		4	189		
	3		1	2		
	4			3		

Bei zwei Zellkernen mit einem diploiden Chromosomensatz konnten drei Signale für das β -Catenin detektiert werden und bei drei weiteren Zellkernen vier Signale für das β -Catenin.

Tabelle 4.9: Auswertung am Paraffinschnitt 691

3 cen

Signale	0	1	2	3	4
0					
1		2	2		
2		6	84	1	
3		1	3		
4					1

Bei drei Zellkernen mit diploidem Chromosomensatz zeigten sich drei Signale für das β -Catenin. Bei einem Zellkern lagen drei Signale für die Zentromersonde des Chromosoms drei vor, jedoch nur zwei Signale für das β -Catenin. Ein Zellkern wies jeweils für Signale für die Zentromersonde als auch für das β -Catenin auf.

Auf dem nachfolgenden Bild des Tumorgewebes 895 sind sowohl Zellkerne mit einer Normalverteilung ersichtlich als auch ein Zellkern mit Amplifikationen

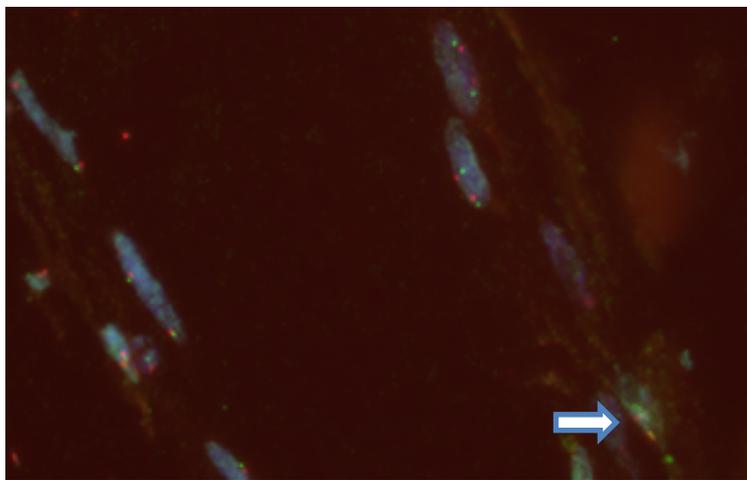


Abbildung 548: Paraffinschnitt AF 895; der Pfeil markiert den Zellkern mit den zwei Signalen für die Zentromersonde des Chromosoms drei und die amplifizierten Signale der β -Cateninsonde, Grün= BAC Sonde für β -Catenin, Rot= Zentromersonde für Chromosom 3, Blau = DAPI, 60fache Vergrößerung

Bei 187 (93,5 %) der 200 Zellkerne wurde eine Normalverteilung beobachtet. Jeweils nur ein Signal zeigten zwei der Zellkerne (1 %). Zwei β -Cateninsignale mit nur einem

Zentromersignal hatten drei der Zellkerne (1,5 %). Ebenso drei (1,5 %) hatte vier β -Cateninsignale, bei normal verteilter Zentromersonde. Drei β -Cateninsignale lagen bei vier (2%) der Zellkerne vor und zwei (1%) hatten vier β -Cateninsignale bei nur einem Zentromersignal. Es konnten neben den beschriebenen Gewinnen beim diploiden Chromosom drei und auch interessanterweise Amplifikationen nachgewiesen werden.

Tabelle 4.10: Auswertung am Paraffinschnitt 895

3 cen

		0	1	2	3	4
β -Cat	Signale					
	0					
	1		1			
	2		3	187		
	3			4		
4		2	3			

Bei vier Zellkernen mit zwei Zentromersignalen fanden sich drei Signale für das β -Catenin. Drei weitere Zellkerne mit diploidem Chromosomensatz hatten vier Signale für das β -Catenin. Zwei Zellkerne hatten nur ein Signal für die Zentromersonde des Chromosoms drei jedoch zwei Signale für das β -Catenin.

Die nächste Auswertung erfolgte am Tumorgewebe 896. In der Abbildung 4.9 ist beispielhaft ein Zellkern mit Amplifikationen markiert.

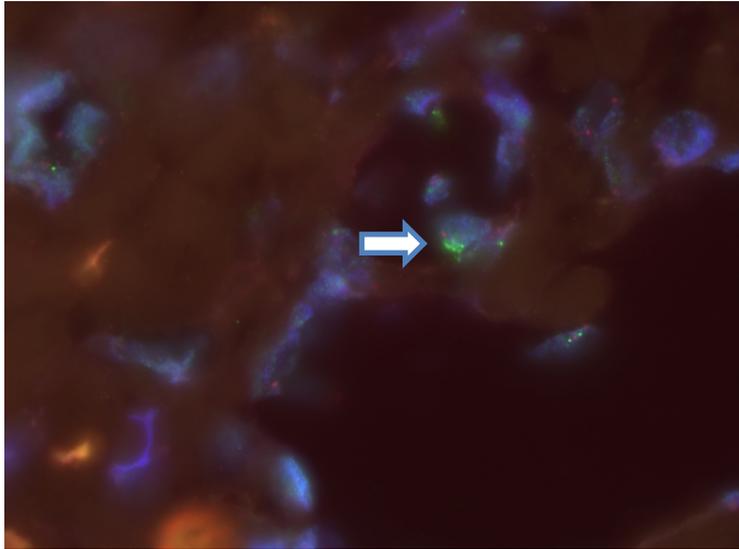


Abbildung 4.9: FISH am AF 896, der Pfeil markiert den Zellkern mit den Amplifikationen, Grün = β Sonde für β - Catenin; Rot = Zentromersonde, Blau = DAPI, 60fache Vergrößerung, Eine normale Signalverteilung zeigten 190 der 200 Zellkerne (95 %) und in einem Zellkern (0,5 %) zeigte sich nur jeweils ein Signal. Bei zwei der Zellkerne (1%) fanden sich vier β -Cateninsignale und nur ein Zentromersignal. Vier Zellkerne (2%) hatten drei β -Cateninsignale und drei Zellkerne (1,5 %) hatten vier β -Cateninsignale. Neben den gezeigten Gewinnen konnten im Paraffinschnitt bei diploidem Chromosom drei eindeutige Amplifikationen nachgewiesen werden.

Tabelle 4.11: Auswertung am Paraffinschnitt 896

		3 cen					
		Signale	0	1	2	3	4
β -Cat	0						
	1			1			
	2				190		
	3					4	
	4			2		3	

Vier Zellkerne mit zwei Signalen für die Zentromersonde des Chromosoms drei hatten drei Signale für das β -Catenin, drei weitere Zellkerne mit zwei Signalen für die Zentromersonde hatten vier Signale für das β -Catenin.

4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den untersuchten Normalgeweben der Tonsille und des Lymphozytenpräparates konnten keine Gewinne und Amplifikationen nachgewiesen werden. In allen untersuchten Zellkulturen als auch in vier der untersuchten Paraffinschnitten konnten Gewinne des β -Catenin als auch Amplifikationen auf genomischer Ebene nachgewiesen werden. Ein Paraffinschnitt zeigte keine Gewinne jedoch in einem Zellkern Amplifikationen. Nur ein Paraffinschnitt zeigte weder Gewinne noch Amplifikationen.

5 Diskussion

Die genetischen und molekularpathologischen Untersuchungen des juvenilen Angiofibroms haben gezeigt, dass deutliche β -Catenin-Expressionen auf Proteinebene im Tumorgewebe vorliegt. Neben dem Nachweis von β -Cateninmutationen in einem wesentlichen Anteil der juvenilen Angiofibrome haben weitere Untersuchungen Veränderungen in der weiteren Analyse des Wnt-Pathways belegen können. Diese Befunde legen nahe, dass β -Catenin eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieses Tumors spielen. Genetische Untersuchungen in Form der CGH-Untersuchungen und der SNP-Analysen haben auf chromosomaler Ebene Gewinne auf dem Chromosom 3 in dem Bereich des β -Cateninens beim juvenilen Angiofibrom gezeigt. Bereits bei der Analyse von Magenkarzinomen wurde festgestellt, dass β -Cateninamplifikationen auf Genebene vorliegen und wurde pathogenetisch als bedeutend angesehen. Damit stellt sich die Frage, ob auch Gewinne des β -Cateninens im juvenilen Angiofibrom vorliegen und einen weiteren Mechanismus darstellen, der im Tumorgewebe zu einer Erhöhung der β -Cateninexpression führen können.

5.1 Tumorgewebe

Histologisch ist das juvenile Angiofibrom durch einen hohen Gehalt extrazellulärer Matrix gekennzeichnet. Durch den unterschiedlich hohen Anteil an Extrazellulärmatrix, der auch innerhalb des Tumors variiert, ist der Verdau zu Exposition von Zellen sehr unterschiedlich. Entsprechend mussten für die in der Arbeit untersuchten Paraffinschnitte eine optimale Verdauzeit etabliert werden, um der Sonde Zugang zum Zellkern zu ermöglichen. Als weiterer erschwerender Punkt kommt in der Analyse dieses Tumors hinzu, dass unterschiedliche Zellen vorliegen, deren Verteilung je nach Region des Tumors variiert. Weiterhin ist bisher die Ursprungszelle nicht bekannt, so dass nur in einem Prozentsatz die Untersuchung von Tumorzellen am Schnitt erwartet werden darf. Aus diesen Überlegungen ergibt sich die Wertung, dass der Nachweis von einzelnen genetischen Gewinnen bei der Auswahl von 200 Zellkernen einen großen Stellenwert besitzt. Bei den Zellkulturen ist zu beachten, dass nach der Charakterisierung überwiegend Bindegewebszellen aufgenommen wurden und andere Zellentitäten wie Gefäßzellen oder Entzündungszellen nicht berücksichtigt werden. Der Untersucher kann nicht davon ausgehen, dass die Zellkulturen zwingend die Ursprungszellen enthalten.

5.2 Untersuchungstechnik mittels FISH

Die FISH ermöglicht es, mit der Sonde eine absolute Kopienzahl der für die Sonde komplementären DNA nachzuweisen. Dies ist an unterschiedlichen Ausgangsgeweben möglich. Nachteilig zeigt sich die unterschiedliche Exposition der Zellkerne gegenüber der Sonde aufgrund der unterschiedlichen Gewebebeschaffenheit und damit verbundenem notwendigem Verdau. Auch kann es durch die Schnittdicke der Präparate zu Kernanschnitten und damit zu methodisch bedingten genetischen Verlusten und damit zu fehlerhafter Auswertung kommen.

Neben vorgetäuschten Verlusten kann eine unzureichende Stringenzwaschung Gewinne und Amplifikationen vortäuschen. Eine Bindung an DNA-Abschnitte mit nicht vollständig komplementärer DNA ist nicht auszuschließen (Hopmann et al., 1992). Zur internen Hybridisierungskontrolle und Nachweis der numerischen Anzahl des Chromosoms 3 wurde zusätzlich eine Zentromersonde für das Chromosom drei verwendet.

Rogan und Mitarbeiter (2000) postulierten die Anwendung der Sequenz-basierten-Herstellung von genomischen DNA Proben für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Dadurch sollten Sonden als Einzelstrang ohne repetitive Sequenzen vorliegen. Bei der Auswahl der DNA-Sequenz muss auf den Anteil der einzelnen Aminosäuren und auf ihre Einzigartigkeit geachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode zur Herstellung von 4 Fragmenten angewendet. Jedoch zeigte sich in unserem Versuchsaufbau die Amplifikation der einzelnen Fragmente als problematisch. Während die Amplifizierung der Fragmente 2 und 3 in ausreichender Menge möglich war, konnten Fragment 1 und 4 nicht erfolgreich generiert werden.

Ihre Anwendung in der FISH erbrachte jedoch nur sehr kleine Signale. Durch die geringere Basenpaarlänge ließen sich nur wenige fluoreszenzmarkierte Nukleotide einbauen, die daraus resultierend zu einer geringeren Fluoreszenzmarkierung führten. Eine mikroskopische Auswertung war mit dieser Markierung nicht möglich. Es benötigte eine lange Anregungszeit, die sich nachteilig bei einer Erhöhung der Autofluoreszenz des Gewebes auswirkte. Eine Auswertung war nur nachträglich mittels Signalverstärkung durch die Software nach Aufnahme des Schnittes machbar. Aufgrund dessen erfolgte die Umstellung auf eine Sondengenerierung mittels *BAC*'s.

5.3 β -Catenin in der Tumorphathogenese

Patienten mit einer familiären Polyposis coli (FAP) haben ein erhöhtes Risiko der Manifestation eines juvenilen Angiofibroms (Ferouz et al., 1995; Giardiello et al., 1993). Bei der Entstehung der FAP spielt die Mutation des APC, eines Tumorsuppressorgens, eine entscheidene Rolle. Die Mutation des FAP-Gens auf Chromosom fünf konnte jedoch nicht im juvenilen Angiofibrom nachgewiesen werden (Abraham et al., 2001; Guertl et al., 2000).

APC als auch β -Catenin sind wichtige Bestandteile des WNT-Signalweges. In verschiedenen Untersuchungen konnten sowohl Mutationen in der Signalkaskade als auch im β -Catenin in malignen Tumoren - unter anderem in Tumoren der Prostata, der Haut und der Leber (Chan et al., 1999; Miyochi et al., 1998; Voeller et al., 1998) - nachgewiesen werden.

Physiologisch liegt β -Catenin nur in sehr geringer Konzentration im Zytoplasma und Zellkern vor. Meist liegt es gebunden mit APC, Axin 1 und 2, GSK3 β und CK1 vor und wird zum Abbau markiert. Wird der *WNT-Pathway* aktiviert, kommt es zu einer Phosphorylierung von LRP5/6 und resultierend wird die Markierung zum Abbau von β -Catenin gehemmt. β -Catenin reichert sich im Zytoplasma und im Zellkern an und aktiviert die Transkription TCF/LEF Zielgenen.

In 75 % der untersuchten juvenilen Angiofibrome konnten Mutationen im Exon 3 des β -Catenin und signifikant erhöhte Proteinlevel nachgewiesen werden (Abraham et al., 2001). Die vorbeschriebenen Mutationen als auch neue Mutationen konnten aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. In 5 der untersuchten Angiofibrome zeigten sich Punktmutationen im Codon 32 und im Codon 33. Es kommt hierdurch nicht zum Verlust der Serin-Bindungsstelle, jedoch lässt sich eine Beeinflussung der Phosphorylierung von β -Catenin durch die Nähe zur eigentlichen Bindungsstelle vermuten. Durch Sequenzierungen einer höheren Fallzahl konnten die Deletion im Bereich der GSK3 β -Bindungsstelle sowie fünf Missense-Mutationen im Exon 3 (Wemmert et al., 2015, De la Coste et al., 1998, Iwao et al., 1998) gezeigt werden.

Ist die Bindungsstelle der Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) verändert, kann β -Catenin nicht abgebaut werden und es kommt zu erhöhten Plasmaspiegeln. β -Catenin wird daraufhin in den Zellkern transportiert und dient als Koaktivator für die Transkription z.B. von Cyclin D1 und c-Myc. Diese beiden Proteine nehmen Einfluss auf die Differenzierung und das Wachstum der Zellen (He et al., 1998; Shtutman et al.,

1999; van Noort et al., 2002; Komiya et al., 2008). β -Catenin nimmt ebenfalls Anteil an der Neoangiogenese durch den Einfluss auf die Transkription von VEGF und ist beteiligt an der Differenzierung von Endothelzellen (Zhang et al., 2001; Easwaran et al., 2003; Skurk et al., 2005). Die Neoangiogenese ist entscheidend für das Tumorwachstum, da hiermit die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr gesichert wird.

In einer neueren Untersuchung konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang molekularer Interaktionen zwischen FGF/VEGF, Ras/FGF, Ras/VEGF, FGF/c-Kit, sowie c-Myc/p53 nachgewiesen werden. Eine erhöhte Transkription von VEGF, FGF und Ras ging mit einem späteren Erkrankungsbeginn und einem erhöhten intraoperativen Blutverlust einher. Eine Infiltration der Schädelbasis war eher bei erhöhten Transkriptmengen von Ras, VEGF und c-Kit nachweisbar (Mishra et al., 2018).

Neben dem erhöhten Proteinlevel des β -Catenin konnten auch erhöhte RNA-Expressionsraten nachgewiesen werden (Beck et al., 2017). Hier wurde mit Unterstützung einer Arbeitsgruppe aus Erlangen um Wendler in 7 der 14 untersuchten Angiofibromen erhöhte RNA-Expressionsraten von β -Catenin nachgewiesen im Vergleich zu dem mituntersuchten Nasenmuschelgewebe. Unter den untersuchten Angiofibromen war allerdings keiner der hier untersuchten Tumoren.

Lerner und Mitarbeiter konnten 2014 durch ihre Arbeit einen weiteren Mechanismus zur Akkumulation von β -Catenin eruieren. Dies geschieht durch die verminderte Expression der micro RNA-218.

Neben den Mutationen konnten in Magenkarzinomen Amplifikationen des β -Catenin im Zellkern nachgewiesen werden (Suriano et al., 2005), so dass in dieser Arbeit eine Amplifikation als weiterer Mechanismus in der Entstehung des juvenilen Angiofibroms untersucht werden sollte.

Durch die in der vorliegenden Arbeit etablierte FISH mit einer β -Catenin spezifischen Sonde konnten wir erstmals Amplifikationen als weitere Veränderung in juvenilen Angiofibromen nachweisen. Diese waren sowohl in vier von sechs der angefertigten Paraffinschnitten als auch in allen untersuchten Zellkulturen zu finden. Aus Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe liegen CGH-Ergebnisse einiger der untersuchten Paraffinschnitte vor. So wurden in den Paraffinschnitten des AF 680 und AF 896 Gewinne im Bereich des Genlocus 3p22 nachgewiesen, auf dem β -Catenin kodiert ist. In den untersuchten Paraffinschnitten des AF 691 und 895 war dies nicht möglich. Dies kann sowohl an dem Auflösungsvermögen der CGH als auch an der Notwendigkeit liegen, dass mindestens 35% der untersuchten Zellen Gewinne aufweisen müssen

(Schröck et al., 1994; Joos et al., 1995). Die gefundenen Gewinne und Amplifikationen waren nur in wenigen Zellkernen nachweisbar.

Eine weitere Arbeit aus der Arbeitsgruppe aus dem Jahre 2011 untersuchte 14 Angiofibrome mittels eines 100K SNP DNA Microarrays. Hierbei konnten in insgesamt sieben Fällen Gewinne im Genlocus 3p22 nachgewiesen werden.

Obwohl das juvenile Angiofibroms eine seltene Entität ist und hiermit einhergehend die Fallzahlen gering sind, konnten Amplifikationen des β -Cateninens verifiziert werden. β -Cateninamplifikationen sind auf dem Boden dieser Arbeit weitere Veränderungen im juvenilen Angiofibrom, die zu einer gesteigerten β -Cateninexpression beitragen können und die Bedeutung des Wnt-Pathway im juvenilen Angiofibrom unterstreicht,

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben den bereits bekannten Mechanismen der β -Catenin-Anreicherung durch fehlenden Abbau, auch eine Veränderung auf DNA-Ebene existiert, wie sie bereits in Magenkarzinomen (Suriano et al., 2005) nachgewiesen ist.

Der Arbeitsgruppe um Wang (2016) gelang es, Endothelzellen des juvenilen Angiofibrom in der Zellkultur zu vermehren. Da in der vorliegenden Arbeit mit einer Zellkultur gearbeitet wurde, die fast ausschließlich auf mesenchymalen Zellen beruht, wäre eine Versuchsreihe mit einer reinen Endothelzellkultur auch im Hinblick eines Vergleiches bezüglich des Vorkommens von Amplifikationen in beiden Zelllinien interessant.

In der Tumorthherapie rücken Immuntherapien weiter in den Fokus. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer T-Zell Inflammation deutlicher von einer Immuncheckpointblockade profitieren als Patienten ohne Inflammation. Untersuchungen von Melanomen am Mausmodell zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen dem *WNT-Pathway* und herunterregulierter Immunzellenzahl innerhalb des Tumorgewebes. Wesentlich Immunzellinfiltrate wurden bereits im juvenilen Angiofibrom nachgewiesen, so dass dieser Zusammenhang Gegenstand weiterer Untersuchungen sein kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R. (1997) β -catenin is a target for the ubiquitin–proteasome pathway. *The EMBO Journal* **16**, 3797–3804.
2. Abraham, S. C., Montgomery, E. A., Giardiello, F. M., Wu, T.-T. (2001) frequent β -Catenin Mutations in Juvenile Nasopharyngeal Angiofibromas. *The American Journal of Pathology* **158**, 1073–1078.
3. Andrews, J. C., Fisch, U., Valavanis, A., Aeppli, U., Makek, M. S. (1989) The surgical management of extensive nasopharyngeal angiofibromas with the infratemporal fossa approach. *The Laryngoscope* **99**, 429–437.
4. Antonelli, A. R. et al. Diagnosis, staging, and treatment of juvenile nasopharyngeal angiofibroma (JNA). *The Laryngoscope* **97**, 1319–1325 (1987).
5. Antoniadis, K., Antoniadis, D. Z., Antoniadis, V. (2002) Juvenile angiofibroma: report of a case with intraoral presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **94**, 228–232.
6. Bagatella, F., Mazzone, A. (1995) Microsurgery in juvenile nasopharyngeal angiofibroma: a lateronasal approach with nasomaxillary pedicled flap. *Skull Base Surg* **5**, 219–226
7. Bales, C. et al. (2002) Craniofacial resection of advanced juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **128**, 1071–1078
8. Beck, Stefanie. (2017). Expressions- und Mutationsanalyse des β -Catenin-Signalweges im juvenilen Angiofibrom.
9. Beham, A., Beham-Schmid, C., Regauer, S., Auböck, L., Stammberger, H. (2000) Nasopharyngeal angiofibroma: true neoplasm or vascular malformation? *Adv Anat Pathol* **7**, 36–46
10. Beham, A., Fletcher, C. D., Kainz, J., Schmid, C., Humer, U. (1993) Nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistochemical study of 32 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **423**, 281–285

11. Beham, A., Kainz, J., Stammberger, H., Auböck, L., Beham-Schmid, C. (1997) Immunohistochemical and electron microscopical characterization of stromal cells in nasopharyngeal angiofibromas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **254**, 196–199
12. Bell, K., Stott, K., Sinclair, C. J., Walker, W. S., Gillon, J. (1992) A controlled trial of intra-operative autologous transfusion in cardiothoracic surgery measuring effect on transfusion requirements and clinical outcome. *Transfus Med* **2**, 295–300
13. Bremer, J. W., Neel, H. B., DeSanto, L. W., Jones, G. C. (1986) Angiofibroma: treatment trends in 150 patients during 40 years. *The Laryngoscope* **96**, 1321–1329
14. Brentani, M. M., Butugan, O., Paiva, L. J., Oshima, C. T. F., Torloni, H. (1989) Multiple steroid receptors in nasopharyngeal angiofibromas. *The Laryngoscope* **99**, 398–401
15. Brunner, C. et al. (2003) Chromosomale Alterationen beim juvenilen Angiofibrom. *HNO* **51**, 981–985
16. Brunner H. et al. (1942) Nasopharyngeal angiofibroma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **51**: 29-65
17. Butugan O, Sennes LU, de Almeida ER, Miniti (1995) A. Intracranial Juvenile Angiofibroma With Dural and Cavernous Sinus Invasion. *Rev Bras Otorrinolaringol.* **61**(5):400-12.
18. Chan, E., Gat, U., McNiff, J. M., Fuchs, E. (1999) A common human skin tumour is caused by activating mutations in β -catenin. *Nature Genetics* **21**:4 **21**, 410–413
19. Chandler, J. R., Goulding, R., Moskowitz, L., Quencer, R. M. (1984) Nasopharyngeal angiofibromas: staging and management. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **93**, 322–329
20. Coré, N. et al. (2007) Tshz1 is required for axial skeleton, soft palate and middle ear development in mice. *Developmental Biology* **308**, 407–420
21. Coutinho-Camillo, C. M., Brentani, M. M., Nagai, M. A. (2008) Genetic alterations in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Head Neck* **30**, 390–400
22. Dane, W. H. (2016) Juvenile Nasopharyngeal Fibroma in State of Regression: *Annals of Otolary, Rhinology & Laryngology* **63**, 997–1014

23. Dillard, D. G. et al. (2000) Immunolocalization of Activated Transforming Growth Factor β 1 in Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **126**, 723–725
24. Duerr, S., Wendler, O., Aigner, T., Karosi, S., Schick, B. (2008) Metalloproteinases in juvenile angiofibroma--a collagen rich tumor. *Hum. Pathol.* **39**, 259–268 (2008).
25. Eivazi, B. et al. (2009) Update on hemangiomas and vascular malformations of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **266**, 187–197
26. Eivazi, B., Werner, J. (2013) A. Management of vascular malformations and hemangiomas of the head and neck--an update. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* **21**, 157–163
27. Erren, T. C. (2007) Ten simple rules for doing your best research, according to Hamming. *PLoS Comput Biol* **3**, 1839
28. Fagan, J. J., Snyderman, C. H., Carrau, R. L., Janecka, I. P. (1997) Nasopharyngeal angiofibromas: selecting a surgical approach. *Head & Neck* **19**, 391–399
29. Farag, M. M., Ghanimah, S. E., Ragaie, A., Saleem, T. H. (1987) Hormonal receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *The Laryngoscope* **97**, 208–211
30. Ferouz, A. S., Mohr, R. M. ,Paul, P. (1995) Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma and Familial Adenomatous Polyposis: An Association?: *Otolaryngology—Head and Neck Surgery* doi: 113:435-439
31. Fisch, U. (1983) The infratemporal fossa approach for nasopharyngeal tumors. *The Laryngoscope* **93**, 36–44
32. Fukuchi, T. et al. (1998) Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res.* **58**, 3526–3528
33. Gatalica, Z. (1998) Immunohistochemical analysis of steroid hormone receptors in nasopharyngeal angiofibromas. *Cancer Letters* **127**, 89–93
34. Gates GA, Rice DH, Koopmann CF, Jr, Schuller DE (1992) Flutamide-induced regression of angiofibroma. *The Laryngoscope* **102**, 641–644
35. Giardiello, F. M. et al. (1993) Nasopharyngeal angiofibroma in patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* **105**, 1550–1552
36. Glad, H. et al. (2007) Juvenile nasopharyngeal angiofibromas in Denmark 1981-2003: diagnosis, incidence, and treatment. *Acta Oto-Laryngologica* **127**, 292–299

37. Goepfert, H., Cangir, A., Lee, Y. Y. (1985) Chemotherapy for aggressive juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Arch Otolaryngol* **111**, 285–289
38. Goodnough, L. T. (1994) Clinical application of recombinant erythropoietin in the perioperative period. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **8**, 1011–1020
39. Gramann, M., Wendler, O., Haeberle, L., Schick, B. (2009) Expression of collagen types I, II and III in juvenile angiofibromas. *Cells Tissues Organs (Print)* **189**, 403–409
40. Gramann, M., Wendler, O., Haeberle, L., Schick, B. (2009) Prominent collagen type VI expression in juvenile angiofibromas. *Histochem. Cell Biol.* **131**, 155–164
41. Guertl, B., Beham, A., Zechner, R., Stammberger, H., Hoefler, G. (2000) Nasopharyngeal angiofibroma: an APC-gene-associated tumor? *Hum. Pathol.* **31**, 1411–1413
42. Guertl, B., Beham, A., Zechner, R., Stammberger, H., Hoefler, G. (2000) Nasopharyngeal angiofibroma: an AM-Gene-Associated tumor? *Hum. Pathol.* **31**, 1411–1413
43. Gullane, P. J., Davidson, J., O’Dwyer, T., Forte, V. (1992) Juvenile angiofibroma: a review of the literature and a case series report. *The Laryngoscope* **102**, 928–933
44. Hagen, R., Schweikert, H. U., Schwab, B., Romalo, G. (2008) Zur Hormonabhängigkeit des juvenilen Nasenrachenfibroms (JNF). *Laryngo-Rhino-Otol* **70**, 279–283
45. Harrison, D. F. N. (1987) The Natural History, Pathogenesis, and Treatment of Juvenile Angiofibroma: Personal Experience With 44 Patients. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **113**, 936–942 (
46. He, T.-C. et al. (1998) Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* **281**, 1509–1512
47. Heinrich UR, Brieger J, Gosepath J, Wierzbica M, Sokolov M, Roth Y, Szyfter W, Bittinger F, Mann WJ (2007): Frequent chromosomal gains in recurrent juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Cancer Genet Cytogenet* 175: 138-143.
48. Herman, P., Lot, G., Chapot, R., Salvan, D., Huy, P. T. (1999) Long-term follow-up of juvenile nasopharyngeal angiofibromas: analysis of recurrences. *The Laryngoscope* **109**, 140–147
49. Hopman, A. H. N. et al. (1988) In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry* **89**, 307–316

50. Hubbard E.M. (1958) Nasopharyngeal angiofibromas. *AMA Arch Path* **65**:192-204
51. Hulthen, U. L., Toremalm, N. G. (1976) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *J Otolaryngol* **5**, 55–63
52. Hwang, H. C., Mills, S. E., Patterson, K., Gown, A. M. (1998) Expression of androgen receptors in nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistochemical study of 24 cases. *Mod Pathol* **11**, 1122–1126
53. Jacobsson, M., Petruson, B., Svendsen, P., Berthelsen, B. (1988) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. A report of eighteen cases. *Acta Oto-Laryngologica* **105**, 132–139
54. Jafek, B. W., Krekorian, E. A., Kirsch, W. M. , Wood, R. P. (1979) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: management of intracranial extension. *Head Neck Surg* **2**, 119–128
55. Kaga, S., Zhan, L., Altaf, E. ,Maulik, N. (2006) Glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin promotes angiogenic and anti-apoptotic signaling through the induction of VEGF, Bcl-2 and survivin expression in rat ischemic preconditioned myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **40**, 138–147
56. Kallioniemi, O. P. et al. (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* **10**, 231–243
57. Klenova, E. M., Morse III, H. C., Ohlsson, R. , Lobanenkova, V. V. (2002) The novel BORIS+CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Seminars in Cancer Biology* **12**, 399–414
58. Komiya, Y., Habas, R. (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68–75
59. Kress, T. R., Sabo, A., Amati, B. (2015) MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nat Rev Cancer* **15**, 593–607
60. Kulas, P. A. (2014) Untersuchungen zur Pathogenese des juvenilen Angiofibroms und die Therapiemöglichkeiten des beta-Blockers Propranolol.
61. Labra, A., Chavolla-Magaña, R., Lopez-Ugalde, A., Alanis-Calderon, J., Huerta-Delgado, A. (2004) Flutamide as a preoperative treatment in juvenile angiofibroma (JA) with intracranial invasion: report of 7 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg* **130**, 466–469

62. Lee, D. A., Rao, B. R., Meyer, J. S., Prioleau, P. G. , Bauer, W. C. (1980) Hormonal receptor determination in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Cancer* **46**, 547–551 (1980).
63. Lerner, C., Wemmert, S., Schick, B. (2014) Preliminary analysis of different microRNA expression levels in juvenile angiofibromas. *Biomedical Reports* **2**, 835–838
64. Liu, L. et al. (2002) Analysis of intra-operative bleeding and recurrence of juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Clin Otolaryngol Allied Sci* **27**, 536–540
65. Liu, Z. et al. (2015) Hormonal receptors and vascular endothelial growth factor in juvenile nasopharyngeal angiofibroma: immunohistochemical and tissue microarray analysis. *Acta Oto-Laryngologica* **135**, 51–57
66. Lloyd, G., Howard, D., Phelps, P., Cheesman,(1999) A. Juvenile angiofibroma: the lessons of 20 years of modern imaging. *J Laryngol Otol* **113**, 127–134
67. Logan, C. Y., Nusse, R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*. 20:781-810
68. Long, Q., Park, B. K., Ekker, (2001) M. Expression and regulation of mouse *Mtsh1* during limb and branchial arch development. *Developmental Dynamics* **222**, 308–312
69. Lund, V. J. et al. (2010) European position paper on endoscopic management of tumours of the nose, paranasal sinuses and skull base. *Rhinol. Suppl.* **22**, 1–143
70. Makek, M. S., Andrews, J. C., Fisch, U. (1989) Malignant transformation of a nasopharyngeal angiofibroma. *The Laryngoscope* **99**, 1088–1092
71. Mallick, S., Benson, R., Bhasker, S., Mohanti, (2015) B. Long-term treatment outcomes of juvenile nasopharyngeal angiofibroma treated with radiotherapy. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* **35**, 75–79
72. Mallick, S., Benson, R., Bhasker, S. & Mohanti, B. K. (2015) Conformal radiotherapy for locally advanced juvenile nasopharyngeal angio-fibroma. *J Cancer Res Ther* **11**, 73–77
73. Martin, H., Ehrlich, J. Abels (1948) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Ann. surg.* 127:513—536
74. McCombe, A., Lund, V. J., Howard, D. J. (1990) Recurrence in juvenile angiofibroma. *Rhinology* **28**, 97–102

75. McLaughlin, E. J. et al. (2016) Endoscopic Radiofrequency Ablation-Assisted Resection of Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma: Comparison with Traditional Endoscopic Technique. *Otolaryngol Head Neck Surg* **154**, 1145–1148
76. Mehawej, C. et al. (2018) Homozygous mutation in ELMO2 may cause Ramon syndrome. *Clin. Genet.* **93**, 703–706
77. Mishra, A. et al. (2016) Current status and clinical association of beta-catenin with juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *The Journal of Laryngology & Otology* **130**, 907–913
78. Mishra, A., Jaiswal, R., Amita, P., Mishra, S. C. (2019) Molecular interactions in juvenile nasopharyngeal angiofibroma: preliminary signature and relevant review. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **276**, 93–100
79. Mishra, A., Mishra, S. C., Tripathi, A. M., Pandey, (2018) A. Clinical correlation of molecular (VEGF, FGF, PDGF, c-Myc, c-Kit, Ras, p53) expression in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **275**, 2719–2726
80. Miyoshi, Y. et al. (1992) Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *PNAS* **89**, 4452–4456
81. Montag, A. G., Tretiakova, M., Richardson, M. (2006) Steroid Hormone Receptor Expression in Nasopharyngeal Angiofibromas Consistent Expression of Estrogen Receptor β . *Am J Clin Pathol* **125**, 832–837
82. Morin, P. J. et al. (1997) Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC. *Science* **275**, 1787–1790
83. Nelson, W. J. , Nusse, R. (2004) Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science* **303**, 1483–1487
84. Nicolai, P. et al. (2003) Endoscopic surgery for juvenile angiofibroma: when and how. *The Laryngoscope* **113**, 775–782
85. Nicolai, P., Schreiber, A., Bolzoni Villaret, A. (2012) Juvenile angiofibroma: evolution of management. *International Journal of Pediatrics* **2012**, 412545–11
86. Nicolai, P. et al. (2010) Endoscopic surgery for juvenile angiofibroma: a critical review of indications after 46 cases. *Am J Rhinol Allergy* **24**, e67-72
87. Pawlowski, J. E. et al. (2002) Liganded Androgen Receptor Interaction with β -Catenin nuclear co-localisation and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 20702–20710

88. Phadtare, A., Bahmani, A., Shah, A., Pietrobon, R. (2009) Scientific writing: a randomized controlled trial comparing standard and on-line instruction. *BMC Medical Education* **9**, 27
89. Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., Clevers, H. (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* **17**, 1709–1713
90. Ponti, G. et al. (2008) Wnt pathway, angiogenetic and hormonal markers in sporadic and familial adenomatous polyposis-associated juvenile nasopharyngeal angiofibromas (JNA). *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **16**, 173–178
91. Radkowski, D., McGill, T., Healy, G. B., Ohlms, L., Jones, D. T. (1996) Angiofibroma. Changes in staging and treatment. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **122**, 122–129
92. Ramos, H. F., Takahashi, M. T., Ramos, B. F., Gomes, M. de Q. T., Sennes, L. U. (2011) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma with intradural extension. *Braz J Otorhinolaryngol* **77**, 677
93. Reddy, K. A., Mendenhall, W. M., Amdur, R. J., Stringer, S. P., Cassisi, N. J. (2001) Long-term results of radiation therapy for juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Am J Otolaryngol* **22**, 172–175
94. 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
95. Rippel, C., Plinkert, P. K., Schick, B. (2003) Expression of members of the cadherin-/catenin-protein family in juvenile angiofibromas. *Laryngo-Rhino-Otol* **82**, 353–357
96. Rogan, P. K., Cazcarro, P. M., Knoll, J. H. (2001) Sequence-based design of single-copy genomic DNA probes for fluorescence in situ hybridization. *Genome Res.* **11**, 1086–1094
97. Saylam, G., Yücel, O. T., Sungur, A., Onerci, M. (2006) Proliferation, angiogenesis and hormonal markers in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* **70**, 227–234
98. Schick, B., el Rahman el Tahan, A., Brors, D., Kahle, G., Draf, W. (1999) Experiences with endonasal surgery in angiofibroma. *Rhinology* **37**, 80–85 (

99. Schick, B., Kahle, G. (2000) Radiological findings in angiofibroma. *Acta Radiol* **41**, 585–593
101. Schick, B., Kahle, G., Hässler, R., (1996) Chemotherapy of juvenile angiofibroma--an alternative? *HNO* **44**:148-152
100. Schick, B., Kind, M., Draf, W., Weber, R., Lackmann, G. M. (1998) Extranasopharyngeal angiofibroma in a 15-month-old child. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* **43**, 99–104
101. Schick, B. Expressions- und Mutationsanalyse des β -Catenin-Signalweges im juvenilen Angiofibrom. (2017).
102. Schick, B., Brunner, C., Praetorius, M., Plinkert, P. K., Urbschat, S. (2002) First Evidence of Genetic Imbalances in Angiofibromas. *The Laryngoscope* **112**, 397–401
103. Schick, B. et al. (2003) Numerical sex chromosome aberrations in juvenile angiofibromas: genetic evidence for an androgen-dependent tumor? *Oncology Reports* **10**, 1251–1255
104. Schick, B., Urbschat, S. (2004) New aspects of pathogenesis of juvenile angiofibroma. *Hosp Med* **65**, 269–273
105. Schick, B. et al. (2005) p53 and Her-2/neu in juvenile angiofibromas. *Oncol. Rep.* **13**, 453–457
106. Schick, B. et al. (2007) Comprehensive genomic analysis identifies MDM2 and AURKA as novel amplified genes in juvenile angiofibromas. *Head Neck* **29**, 479–487
107. Schick, B. et al. (2006) Genetic heterogeneity of the MYC oncogene in advanced juvenile angiofibromas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **164**, 25–31
108. Schick, B. et al. (2011) Genome-wide copy number profiling using a 100K SNP array reveals novel disease-related genes BORIS and TSHZ1 in juvenile angiofibroma. *Int. J. Oncol.* **39**, 1143–1151
109. Schiff M. (1959): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. A theory of pathogenesis. *Laryngoscope* **69**: 981-1016
110. Schiff, M., Gonzalez, A., Ong, M., Baird, A. (1992) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma contain an angiogenic growth factor: Basic FGF. *The Laryngoscope* **102**, 940–945
111. Schlauder, S. M., Knapp, C., Steffensen, T. S., Bui, M. M. (2009) Aromatase may play a critical role in the pathogenesis of juvenile nasopharyngeal angiofibroma *Fetal and Pediatric Pathology* **28**, 232–238

112. Scholtz, A. W., Appenroth, E., Kammen-Jolly, K., Scholtz, L. U., Humfart, W. F. (2001) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: management and therapy. *The Laryngoscope* **111**, 681–687
113. Schuon, R. et al. (2006) Immunohistochemical analysis of growth mechanisms in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **264**, 389–394
114. Sessions, R. B., Bryan, R. N., Naclerio, R. M., Alford, B. R. (1981) Radiographic staging of juvenile angiofibroma. *Head Neck Surg* **3**, 279–283
115. Shtutman, M. et al. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *PNAS* **96**, 5522–5527
116. Siegfried, E., Chou, T.-B., Perrimon, N. (1992) wingless signaling acts through zeste-white 3, the drosophila homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell* **71**, 1167–1179
117. Siniluoto, T. M., Luotonen, J. P., Tikkakoski, T. A., Leinonen, A. S., Jokinen, K. E. (1993) Value of pre-operative embolization in surgery for nasopharyngeal angiofibroma. *J Laryngol Otol* **107**, 514–521
118. Skurk, C. et al. (2005) Glycogen-Synthase Kinase3 β / β -Catenin Axis Promotes Angiogenesis Through Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Signaling in Endothelial Cells. *Circulation Research* **96**, 308–318
119. Starlinger, V., Wendler, O., Gramann, M., Schick, B. (2007) Laminin expression in juvenile angiofibroma indicates vessel's early developmental stage. *Acta Otolaryngol.* **127**, 1310–1315
120. Sternberg S.S. (1954) Pathology of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. A lesion of adolescent males. *Cancer* **7**: 15-28
121. Sun, X. et al. (2014) Prognostic value of matrix metalloproteinase 9 expression in patients with juvenile nasopharyngeal angiofibroma: Tissue microarray analysis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* **78**, 1232–1238
122. Suriano, G. et al. (2005) β -Catenin (CTNNB1) gene amplification: A new mechanism of protein overexpression in cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* **42**, 238–246
123. Tewfik, T. L. et al. (1999) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *J Otolaryngol* **28**, 145–151
124. Valavanis, A., Baltasvias, G. (2017) Embolization of Juvenile Angiofibromas. Springer, Cham **17**, 99–116

125. van Leeuwen, F., Samos, C. H., Nusse, R. (1994) Biological activity of soluble wingless protein in cultured *Drosophila* imaginal disc cells. *Nature* 1994 368:6469 **368**, 342–344
126. van Noort, M., Meeldijk, J., van der Zee, R., Destree, O., Clevers, H. (2002) Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **277**, 17901–17905
127. Voeller, H. J., Truica, C. I., Gelmann, E. P. (1998) Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.* **58**, 2520–2523
128. Wang, H. W., Su, W. Y., Wang, J. Y. (1994) Noradrenergic innervation of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **251**, 123–126
129. Wang, J. et al. (2016) The isolation and characterization of endothelial cells from juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *abbs* **48**, 856–858
130. Wemmert, S. et al. (2016) Identification of CTNNB1 mutations, CTNNB1 amplifications, and an Axin2 splice variant in juvenile angiofibromas. *Tumour Biol.* **37**, 5539–5549
131. Wendler, O., Dlugaiczyk, J., Birk, S., Schick, B. (2012) Anti-proliferative effect of glucocorticoids on mesenchymal cells in juvenile angiofibromas. *Head & Neck* **34**, 1615–1621
132. Wendler, O., Schäfer, R., Schick, B. (2007) Mast cells and T-lymphocytes in juvenile angiofibromas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **264**, 769–775
133. Willert, K., Shibamoto, S., Nusse, R. (1999) Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev.* **13**, 1768–1773
134. Wittekind, C., Tischoff, I. (2004) [Tumor classifications]. *Pathologe* **25**, 481–490
135. Wu, E. C., Chark, D. W., Bhandarkar, N. D. (2014) Bilateral juvenile nasopharyngeal angiofibroma: Report of a case. *International Forum of Allergy & Rhinology* **4**, 603–606
136. Zhang, P. J., Weber, R., Liang, H.-H., Pasha, T. L., LiVolsi, V. A. (2003) Growth factors and receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma and nasal polyps: an immunohistochemical study. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **127**, 1480–1484
137. Zhang, X., Gaspard, J. P., Chung, D. C. (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* **61**, 6050–6054

7 Danksagung und Danksagung

1. 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

2. Tagungsbeitrag Poster auf der 86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., 13. – 16. Mai 2015 Berlin

S. Berndt, S. Wemmert, V. Willnecker, B. Schick Amplifikationen von β -Catenin im juvenilen Angiofibrom

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schick für die Überlassung des Themas und der Materialien sowie für die hilfreiche Beratung, die Denkanstöße und die immer freundliche Unterstützung.

Ausgesprochen großer Dank gelten Frau Dr. rer. nat. Wemmert und Frau Dr. rer. nat. Willnecker für ihre Unterstützung, ihren Rat und vor allem für die Korrekturhilfe der Arbeit.

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

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

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

