
Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zum Einfluss der
Cadherin/Catenin-Proteinfamilie und des
Androgenrezeptors auf die Pathogenese des
juvenilen Angiofibroms**

**Dissertation
zur Erlangung des
Grades einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2006**

vorgelegt von Catharina Rippel
geb. am 04.05.1978 in Homburg/Saar

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS DER CADHERIN/CATENIN-
PROTEINFAMILIE UND DES ANDROGENREZEPTORS AUF DIE
PATHOGENESE DES JUVENILEN ANGIOFIBROMS** **I**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **1**

1 ZUSAMMENFASSUNG **3**

1 SUMMARY **5**

2 EINLEITUNG **7**

2.1 DAS JUVENILE ANGIOFIBROM **7**

2.1.1 KLINIK UND HISTOLOGIE **7**

2.1.2 DIAGNOSTIK UND THERAPIE **11**

2.1.3 ÄTIOLOGIE **14**

2.2 DER APC/ β -CATENIN SIGNALWEG **16**

2.3 β -CATENIN UND DER ANDROGENREZEPTOR **20**

2.4 DIE CADHERIN/CATENIN-PROTEINFAMILIE **22**

2.4.1 B-CATENIN **22**

2.4.2 γ -CATENIN **23**

2.4.3 E-CADHERIN **24**

2.4.4 N-CADHERIN **24**

2.4.5 α -CATENIN **25**

2.5 ZIELSETZUNG DER EIGENEN ARBEIT **26**

3 MATERIAL UND METHODEN **27**

3.1 MATERIAL **27**

3.1.1 TUMORGEWEBE **27**

3.1.2 REFERENZGEWEBE **27**

3.2 METHODEN **29**

3.2.1 IMMUNHISTOLOGIE **29**

3.2.1.1 FIXIERUNG UND PARAFFINEINBETTUNG **29**

3.2.1.2 SCHNITTTECHNIK **30**

3.2.1.3 HERSTELLUNG VON KRYOPRÄPARATEN **30**

3.2.1.4	DURCHFÜHRUNG DER IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	30
3.2.2	FISH-UNTERSUCHUNG	33
3.2.2.1	EINFÜHRUNG IN DIE FISH-TECHNIK	33
3.2.2.1.1	DENATURIERUNG UND HYBRIDISIERUNG	33
3.2.2.1.2	STRINGENZWASCHUNG	35
3.2.2.1.3	DETEKTION	36
3.2.2.2	MATERIAL	36
3.2.2.3	FISH AN ANGIOFIBROMGEWEBESCHNITTEN	37
3.2.2.3.1	VORBEREITUNG DER GEWEBESCHNITTE	37
3.2.2.3.2	DENATURIERUNG UND HYBRIDISIERUNG	39
3.2.2.3.3	STRINGENZWASCHUNG UND DETEKTION	40
3.2.2.4	FISH AN LYMPHOZYTENPRÄPARATEN	41
3.2.2.4.1	CHROMOSOMENPRÄPARATION	41
3.2.2.4.2	FIXIERUNG DER CHROMOSOMEN	42
3.2.2.4.3	VORBEREITUNG DER LYMPHOZYTENPRÄPARATE	42
3.2.2.4.4	DENATURIERUNG UND HYBRIDISIERUNG	43
3.2.3	BILDAUFNAHME UND AUSWERTUNG	43
3.2.3.1	BILDAUFNAHMEN	45
3.2.3.2	AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN	45
3.2.3.3	AUSWERTUNG DER FISH-UNTERSUCHUNG	45
4	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>47</u>
4.1	ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	47
4.1.1	KONTROLLGEWEBE	47
4.1.2	DIE CADHERIN/CATENIN-PROTEINE IM ANGIOFIBROM	49
4.1.2.1	DIE β -CATENIN-EXPRESSION	49
4.1.2.2	DIE γ -CATENIN-EXPRESSION	52
4.1.2.3	DIE N-CADHERIN-EXPRESSION	53
4.1.2.4	DIE E-CADHERIN-UND α -CATENIN-EXPRESSION	54
4.1.3	DER ANDROGENREZEPTOR IM ANGIOFIBROM	54
4.2	ERGEBNISSE DER FISH-UNTERSUCHUNGEN	56
4.2.1	DAS X-CHROMOSOM	56
4.2.2	DAS ANDROGENREZEPTOR-GEN	56
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>59</u>
5.1	β -CATENIN: ZENTRALE ROLLE IN TUMORGENESE UND ZELLADHÄSION	59
5.2	β -CATENIN IM JUVENILEN ANGIOFIBROM	62
5.3	DIE ROLLE DER CADHERINE, CATENINE UND ANDERER WACHSTUMSFAKTOREN IM JUVENILEN ANGIOFIBROM: DARSTELLUNG SPEZIFISCHER INTERAKTIONEN	63
5.4	B-CATENIN UND DER ANDROGENREZEPTOR	67
5.5	THERAPIEANSATZ	71
5.6	SCHLUSSFOLGERUNG	73
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>75</u>

7	<u>ANHANG</u>	<u>86</u>
7.1	LÖSUNGEN UND PUFFER	86
8	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>89</u>
9	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>90</u>

Abkürzungsverzeichnis

#	Chromosom
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arteria
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
AR	Androgenrezeptor
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CBP	CREB- binding protein
CGH	Comparative Genetic Hybridisation
CREB	cAMP-element binding protein
Cy3	Rhodamin
DAPI	4-6-Diamidino-2-Phenylindol
DG	Deckglas
DHEA	Dehydroepiandrosteron
5α-DHT	5α-Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco´s Mod Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dsh	Dishevelled
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Formamid
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	Fetal Calf Serum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinthiocyanat
G	Guanin
GSK3β	Glykogensynthasekinase-3-β
H	Stunde
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
IGF II	Insulin-like Growth Factor II
kDa	Kilo Dalton

I	Liter
JA	Juveniles Angiofibrom
LEF-1	Lymphoid Enhancer Factor-1
Log	Logarithmus
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Na	Natrium
MRT	Magnetresonanztomographie
N.	Nervus
NNH	Nasennebenhöhlen
OT	Objektträger
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF-B	platelet derived growth factor-B
PFA	Paraformaldehyd
RAR	Retinoic Acid Receptor
rev ish	Reverse in situ Hybridization
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Duodecyl-Sulfat
s. o.	siehe oben
SSC	Sodium Saline Citrate
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TCF	T-cell factor
β -TrCP	β -Transducin Repeat-containing Protein
U	Umdrehungen
U/ min	Umdrehungen pro Minute
ü. N.	über Nacht
u. a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VOL	100 Volumenprozent
W	Watt
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Zusammenfassung

Einleitung: Juvenile Angiofibrome (JA) treten als gutartige, aber lokal aggressiv wachsende Neoplasien nahezu ausschließlich bei männlichen Jugendlichen auf. Bis heute sind jedoch weder die genetischen Ursachen hierfür noch die Frage nach dem Ursprungsgewebe dieser gefäßreichen, in ein Bindegewebsstroma eingebetteten Neubildung abschließend geklärt. Nachdem vielfältige klinische Erklärungsversuche zu keinem allgemein akzeptierten Entstehungsmodell geführt haben, wurden erste molekularpathologische Untersuchungen des juvenilen Angiofibroms durchgeführt. Der Nachweis von β -Catenin-Mutationen bei Angiofibromen und der immunhistochemische Nachweis von β -Catenin in den Kernen der Bindegewebszellen war als Hinweis auf eine Bedeutung des β -Catenin-Stoffwechsels bei juvenilen Angiofibromen und auf eine Tumorentstehung aus den Bindegewebszellen gewertet worden

Material und Methoden: Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurde Paraffingewebe von 13 Angiofibromen immunhistochemisch bezüglich der Expression von Mitgliedern der Cadherin/Catenin-Proteinfamilie untersucht. Als Kontrollgewebe diente die bedeckende, regulär differenzierte Nasenschleimhaut an der Oberfläche der Angiofibrome. Im zweiten Teil wurde eine Zweifarben-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur molekularzytogenetischen Untersuchung des X-Chromosoms und des auf diesem Chromosom lokalisierten Androgenrezeptorgens in Angiofibromen durchgeführt. Zur Untersuchung der 7 in Paraffin eingebetteten Angiofibromgewebe wurden eine zentromerspezifische X-Chromosomsonde und eine lokusspezifische Androgenrezeptorsonde verwendet.

Ergebnisse: Die Bindegewebszellen aller Angiofibrome zeigten eine starke β -Catenin-Expression in Zellkernen und Zytoplasma. In 10 von 13 Angiofibromen konnte ebenfalls eine deutliche β -Catenin-Expression in den Endothelzellen der Gefäßspalten nachgewiesen werden. Während γ -Catenin in 53% der Angiofibrome in beiden Zellarten nachweisbar war, beschränkte sich die N-Cadherin-Expression bei 8 der 13 Angiofibrome auf die Bindegewebszellen. E-Cadherin und α -Catenin zeigten keine wesentliche Expression.

Die FISH-Untersuchungen zeigten in 5 der 7 untersuchten Angiofibrome einen signifikanten X-chromosomalen Gewinn, der in allen Fällen mit einem Androgenrezeptorgengewinn korreliert war. Bei 5 von 7 der untersuchten Angiofibrome zeigten 12-34% der Kerne zwei X-Chromosomensignale. Bei der gleichen Anzahl wurden in 11,5-30% der Zellkerne zwei Androgenrezeptorgensignale beobachtet.

Diskussion: Die immunhistochemischen Untersuchungen belegen durch den Nachweis von β -Catenin in den Endothel- und in den Bindegewebszellen des juvenilen Angiofibroms, dass die immunhistologische β -Catenin Darstellung keinen sicheren Hinweis auf die Ursprungstumorzelle bietet. Die Erstbeschreibung einer N-Cadherin und γ -Catenin-Expression in juvenilen Angiofibromen zeigt, dass weitere Mitglieder der Catenin/Cadherin-Proteinfamilie bei der Molekularpathogenese des Angiofibroms zu beachten sind. Der Nachweis eines signifikanten X-Chromosomengewinns einhergehend mit einem Androgenrezeptorgengewinn bei juvenilen Angiofibromen bietet, insbesondere in Anbetracht des immunhistologischen Nachweises einer deutlichen Androgenrezeptorproteinexpression und der bekannten β -Catenin-Mutationen, einen neuen Erklärungsansatz für die nahezu ausschließliche Tumormanifestation bei männlichen Jugendlichen. Indem der Übertritt des β -Catenins in den Zellkern durch den Androgenrezeptor ermöglicht wird und β -Catenin die Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors steigert, können die β -Catenin-Mutationen und der Androgenrezeptorgewinn eine gesteigerte Transkription androgenrezeptorabhängiger Gene erklären.

1 Summary

Introduction: Juvenile angiofibromas are benign, locally aggressive growing tumours occurring almost exclusively in adolescent males. To date neither the genetic cause nor the tissue of origin of this fibrovascular neoplasm is known. Many clinical attempts to describe a generally acknowledged model of etiology have failed and lead to the first molecular pathological research on juvenile angiofibromas. The detection of β -catenin mutations in angiofibromas and the immunohistochemical findings of β -catenin in the nuclei of stromal cells in this tumour have been proposed as evidence for stromal cells to be the neoplastic origin of angiofibromas.

Material and Methods: In the first part of this study paraffin embedded tissue of 13 angiofibromas was analysed immunohistochemically for expression of members of the cadherin/catenin protein family. Regular nasal mucosa covering the surface of the angiofibromas was used as control tissue. In the second part of the study a bicolour fluorescence in situ hybridisation was performed in order to genetically analyse the distribution of X-chromosome and androgen receptor gene, which is located on X-chromosome. For the analysis of the 7 paraffin embedded angiofibromas a centromer specific X-chromosome probe and a locus specific androgen receptor probe were used.

Results: The stromal cells of all examined angiofibromas showed strong β -catenin expression in their nuclei and cytoplasm. In 10 out of 13 examined angiofibromas strong immunoreaction was also observed in endothelial cells covering the irregular lined vascular spaces. While γ -catenin was detected in 53% of all angiofibromas in both cell types, N-cadherin expression in 8 out of 13 angiofibromas was confined to connective tissue. E-cadherin and α -catenin showed no significant immunoreaction.

The fluorescence in situ hybridizations showed in 5 of 7 examined angiofibromas a statistically significant gain in X-chromosome which was in all cases linked to a gain in androgen receptor gene. In 5 of 7 examined tumours

12-34% of the nuclei showed 2 X-chromosome signals and 11.5-30% showed two androgen receptor gene signals.

Conclusion: Proof of β -catenin in endothelial and stromal cells of angiofibromas supports the assumption that immunohistochemical findings of β -catenin are no reliable evidence of the tissue of origin. Due to detection of N-cadherin and γ -catenin in juvenile angiofibromas it may be presumed that other members of the cadherin/catenin protein family play a role in molecular pathogenesis of angiofibromas as well. Proof of significant gain in chromosome X linked to a gain in androgen receptor gene in angiofibromas provides a new explanation for tumour manifestation almost exclusively in adolescent males especially if considering the strong immunoreaction of the androgen receptor protein and the well known β -catenin mutations. Androgen receptor facilitates transfer of β -Catenin into the cell nucleus and β -catenin increases androgen receptor transcription activity. Therefore a gain of androgen receptor genes in combination with frequent β -catenin mutations are fit to explain increase of transcription of androgen dependant genes in juvenile angiofibromas.

2 Einleitung

2.1 Das juvenile Angiofibrom

2.1.1 Klinik und Histologie

Das juvenile Angiofibrom ist ein seltener gutartiger Tumor, der unter den Neoplasien des Kopf- und Halsbereiches einen Anteil von 0,05 bis 0,5% ausmacht (Gullane P.J., 1992). Klinisch ist das juvenile Angiofibrom durch seine charakteristische Lokalisation, sein geschlechtsspezifisches Auftreten und sein eindeutiges histologisches Erscheinungsbild gekennzeichnet.

Das Angiofibrom entsteht im hinteren Abschnitt der Nasenhaupthöhle, in enger Lagebeziehung zum Foramen sphenopalatinum, und wird als gefäßreicher Tumor primär durch die A. sphenopalatina versorgt, die der A. maxillaris entspringt (Schick B., 2000). Das Angiofibrom manifestiert sich nahezu ausschließlich bei männlichen Jugendlichen zwischen dem 12. und dem 16. Lebensjahr, wobei das mittlere Alter bei Diagnosestellung 15,3 Jahre beträgt (Bremer J.W., 1986).

Obwohl das juvenile Angiofibrom nach histologischen Kriterien als gutartiger Tumor einzuordnen ist, zeigt diese Neubildung ein lokal aggressives Wachstum, so dass nach einer operativen Behandlung häufig Residualtumoranteile beobachtet werden (Hubbard E.M., 1958; McCombe A., 1990; Twefik T.L., 1999). Die meisten dieser Residualtumore werden bereits innerhalb des ersten Jahres nach der Operation symptomatisch (Antoniades K., 2002). Bei fortschreitendem Tumorwachstum können angrenzende Strukturen wie der Nasopharynx, die Nasennebenhöhlen, die Orbita, die Fossa infratemporalis und die Schädelbasis betroffen sein, ein intrakranielles Wachstum ist möglich (Tewfik T.L., 2002; Schick B., 1996). In frühen Stadien zeigen die Tumoren häufig eine Ausdehnung in den Nasopharynx und die Fossa pterygopalatina. Anteriores Wachstum kann einseitig die gesamte Nasenhöhle ausfüllen und zu Septumverlagerungen führen. Durch superiores

Wachstum sind die Nasennebenhöhlen betroffen. Die laterale Ausdehnung richtet sich gegen die Fossa pterygopalatina und bei weiterem Wachstum gegen die Fossa infratemporalis. Greift der Tumor über die Fissura orbitalis inferior auf die Orbita über, so kann durch Druckschädigung des Nervus opticus eine Erblindung die Folge sein.

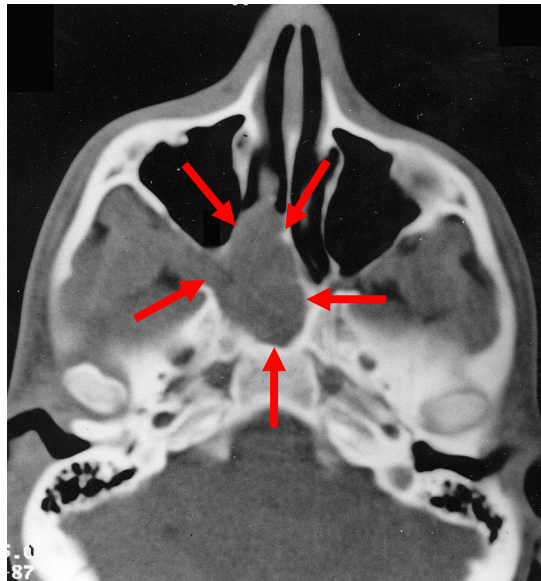


Abb.2-1: Schädel-CT: Typische Lokalisation des JA in der hinteren Nasenhaupthöhle; Pfeile beschreiben die Tumorausdehnung

Aus dem beschriebenen Wachstumsverhalten lassen sich die klinischen Symptome ableiten. Nasale Obstruktion ist besonders im Anfangsstadium das häufigste Symptom, gefolgt von unilateralem, rezidivierendem Nasenbluten bis hin zum hämorrhagischen Schock. Bei etwa 10% der Patienten treten Kopfschmerzen auf, die auf eine Affektion der Nasennebenhöhlen zurückzuführen sind. Eine Beteiligung der Tuba Eustachii kann eine Hörminderung bewirken. In seltenen Fällen können auch Symptome wie unilaterale Rhinorrhoe, Anosmie, Hyposmie, Otagie und Wangendeformitäten auftreten (Tewfik T.L., 2002). Bei ausgedehntem intrakraniellm Wachstum kann es zu einer Hirndrucksymptomatik kommen.

Tab. 2-1: Überblick über die Klassifikationssysteme für Angiofibrome in Anlehnung an Schick und Mitarbeiter (Schick B., 2000)

Fisch, 1983	Andrews et al., 1989	Sessions et al., 1981	Radkowski et al., 1996
I. Tumor auf NHH oder NP beschränkt, keine knöcherne Beteiligung	I. Tumor begrenzt auf NP und NHH, Knochendestruktion vernachlässigbar oder auf F.sphenopalatinum beschränkt	IA. Tumor begrenzt auf hintere NHH und /oder NP, keine Ausdehnung auf die NNH	IA. Tumor begrenzt auf die Nase und/oder den NP
II. Invasion der Fossa pterygo-maxillaris oder der NNH, mit knöcherner Beteiligung	II. Invasion der Fossa pterygo-maxillaris oder der NNH mit knöcherner Beteiligung	IB. Zusätzlich zu IA Ausdehnung in die NNH	IB. Ausdehnung in mind.1 oder mehr NNH
III. Invasion der Fossa infratemporalis, der Orbita und parasellärer Regionen; Tumor bleibt lateral des Sinus cavernosus	IIIa. Invasion der Fossa infratemporalis oder der Orbitaregion ohne intrakranielle Ausdehnung	IIA. Minimale laterale Ausdehnung durch F.sphenopalatinum in Fossa pterygo-maxillaris	IIA. Minimale Ausdehnung in Fossa pterygo-maxillaris
IV. Invasion von Sinus cavernosus, Chiasma opticum oder Hypophysenregion	IIIb. Invasion von Fossa infratemporalis oder Orbitaregion mit intrakranieller extraduraler (parasellärer) Ausdehnung	IIB. Tumor füllt Fossa pterygomaxillaris vollständig aus, mit oder ohne Erosion der Orbita	IIB. Tumor füllt Fossa pterygomaxillaris komplett aus; mit oder ohne Erosion der Orbita
	IVa. Intrakranieller intraduraler Tumor ohne Infiltration von Sinus cavernosus, Hypophysenregion oder Chiasma opticum	IIC. Ausdehnung durch Fossa pterygomaxillaris in Fossa temporalis und Wange	IIC. Beteiligung der Fossa infratemporalis mit oder ohne Wange
	IVb. Intrakranieller intraduraler Tumor mit Infiltration von Sinus cavernosus, Hypophysenregion oder Chiasma opticum	III. Intrakranielle Ausdehnung	IIIA. Erosion der Schädelbasis; minimal intrakraniell
			IIIB. Erosion der Schädelbasis ausgedehnt intrakraniell; mit oder ohne Sinus cavernosus

NHH=Nasenhaupthöhle; NNH=Nasennebenhöhlen; NP=Nasopharynx; F.=Foramen

Die Stadieneinteilung orientiert sich am Wachstumsverhalten juveniler Angiofibrome und ist radiologisch begründet. Es wurden verschiedene Klassifikationssysteme vorgeschlagen, die in Tabelle 2-1 zusammengefasst sind. Im klinischen Gebrauch am weitesten verbreitet ist z. Zt. die Klassifikation von Fisch und Sessions.

Histomorphologisch ist das Angiofibrom charakterisiert durch irreguläre endothelial ausgekleidete Gefäßspalten, die in ein bindegewebiges Stroma eingebettet sind (siehe Abb. 2-2). Das Verhältnis von Endothelspalten zu Bindegewebsstroma ist von Tumor zu Tumor unterschiedlich. Je nach vorherrschendem Gewebe spricht man von einem Bindegewebs-, einem Gefäss oder einem Mischtyp. Auch im Bezug auf Größe und Architektur verhalten sich die Gefäße sehr uneinheitlich, sodass es praktisch unmöglich ist, morphologisch identische Areale innerhalb eines Tumors zu entdecken (Harrison D.F., 1987). Charakteristisch, besonders für die Gefäßwand größerer Endothelspalten, ist die Unregelmäßigkeit bzw. die völlige Abwesenheit glatter Muskelzellschichten (Beham A., 2000), welche sich klinisch in der starken Blutungsneigung dieses Tumors äußert.

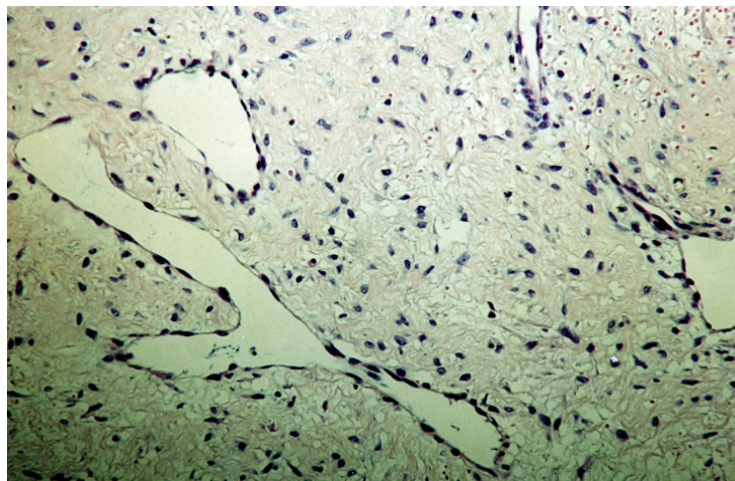


Abb.2-2: Lichtmikroskopische Aufnahme eines JA-Paraffinschnitts: unregelmäßig begrenzte Gefäßspalten in Bindegewebsstroma; Hämatoxylin/Eosin Färbung; 60-fache Vergrößerung

2.1.2 Diagnostik und Therapie

Die Therapie des Angiofibroms stützt sich seit 1955 (Bremer J.M., 1986) auf die operative Resektion. Als moderne Verfahren kommen heute insbesondere das Midfacial Degloving und das endonasale Vorgehen zur Anwendung (Schick B., 1999). Wenngleich das Tumorstadium in Einzelfällen auch durch Bestrahlung zum Stillstand gebracht werden konnte, sollte diese Methode auf inoperable, lebensbedrohliche Tumoren beschränkt bleiben (Fagan J.J., 1997). Die Anwendung einer Strahlentherapie im Kindes- und Jugendalter birgt die Gefahr schwerwiegender Nebenwirkungen, u. a. maligne Entartung, Neuropathien, Hirnstammeinklemmung und die Beeinträchtigung des noch im Wachstum befindlichen Gesichtsskeletts (Bales C., 2002). Eine Regression von juvenilen Angiofibromen konnte auch durch Chemotherapie erreicht werden (Schick B., 1996). Aufgrund des Risikos einer Knochenmarkssuppression mit sämtlichen bekannten Folgeerscheinungen (Goepfert H., 1985) bleibt auch diese Therapieoption inoperablen Tumoren im Einzelfall vorbehalten.

Die dritte, adjuvante bzw. neoadjuvante Behandlungsmöglichkeit bildet schließlich die Hormontherapie, die zu einer Reduktion von Tumorgröße und Vaskularität und dadurch zu einer Verbesserung der Resektabilität führen soll (Johns M.E., 1980; Zhang J., 2003). In der Literatur wird die präoperative Hormongabe sehr unterschiedlich bewertet. Während Gates und Mitarbeiter unter Flutamidtherapie von einer mittleren Reduktion der Tumoren um 44% berichten (Gates G.A., 1992), können andere Autoren weder auf die Tumorgröße noch auf die intraoperative Blutungsneigung statistisch signifikante Auswirkungen der Hormontherapie erkennen (Labra A., 2004). Endgültige Aussagen können aufgrund der geringen Fallzahlen der bisher durchgeführten Studien jedoch noch nicht getroffen werden.

Die durch die vaskuläre Struktur des juvenilen Angiofibroms begründete Blutungsneigung und die geringe Blutverlusttoleranz der meist jungen Patienten machen das Auftreten starker intraoperativer Blutungen zu einer häufigen und gefürchteten Komplikation. Eine wichtige Maßnahme zur vollständigen präoperativen Evaluation der Blutversorgung ist die Durchführung einer

detaillierten Angiographie mit Beurteilung des Stromgebiets der A. carotis externa, der A. carotis interna und der A. vertebralis auf beiden Seiten. In den Frühstadien wird der Tumor meist allein durch die A. sphenopalatina oder die A. maxillaris versorgt. Andere Äste der A. carotis externa, wie die A. pharyngea ascendens, kommen in ausgedehnteren Tumoren als Versorgungsgefäße hinzu (Schick B., 2000). Insbesondere die A. sphenopalatina und die A. pharyngea ascendens werden im Rahmen der angiographischen Untersuchung bezüglich der Möglichkeit einer Tumorembolisation beurteilt. Eine Embolisation trägt wesentlich zur Minimierung des Blutverlusts bei (Fagan J.J., 1997).

Obwohl nicht in allen Untersuchungen eine Reduktion des intraoperativen Blutverlusts durch die Embolisation nachgewiesen werden konnte, wird die präoperative Embolisation von der Mehrheit der Autoren empfohlen (Schick B., 2000; Scholtz A.W., 2001; Nicolai P., 2003). Wenige Autoren lehnen eine präoperative Embolisation mit dem Hinweis auf eine höhere Rate unvollständiger Tumorsektionen ab, da Residualtumorgewebe durch die starke Blutungsneigung erkannt werden könne (Lloyd G., 1999). Unter Berücksichtigung der Fortschritte in der präoperativen radiologischen Diagnostik und der Möglichkeit intraoperativer Schnellschnittuntersuchungen darf dieses Argument aber kritisch hinterfragt werden. Die Embolisation wird ein bis zwei Tage vor der Operation durchgeführt, da ein zu früher Verschluss der versorgenden Gefäße die Kollateralenbildung anregen und die Effizienz des Verfahrens beeinträchtigen kann (Bales C., 2002). Im Einzelfall kann die Durchführung einer Ballontestokklusion der A. carotis interna vor einer Tumorentfernung im Bereich dieses wichtigen Gefäßes sinnvoll sein (Zhang M., 1998).

Zusätzliche Maßnahmen zur Vermeidung homologer Bluttransfusionen bei der operativen Behandlung dieses gefäßreichen Tumors sind die präoperative Eigenblutspende, intraoperative Hämodilution und die Rücktransfusion des mit der Cell Saver-Technik aufbereiteten Eigenbluts (Bell K., 1992). In dem Bemühen um Vermeidung einer Fremdbluttransfusion wurde auch die Gabe von rekombinantem Erythropoietin angeregt (Goodnough L.T., 1994).

Die Form des operativen Zugangs ist abhängig von Tumorlokalisation, der Ausdehnung, der Tumolvaskularisation und den Möglichkeiten einer

präoperativen Embolisation. Im Vordergrund stehen das transnasale Vorgehen, der Zugang über ein Midfacial Degloving und der paranasale Zugang (laterale Rhinotomie). Der mikroskopisch-endoskopische, transnasale Zugang ist der am wenigsten traumatische (Schick B., 1997, Mann W.J., 2004). Verschiedene Zentren haben belegen können, dass Angiofibrome, die auf den Nasopharynx, die Nasenhaupthöhle und den Sinus ethmoidales bzw. sphenoidales und die Fossa pterygopalatina begrenzt sind, endoskopisch vollständig reseziert werden können (Schick B., 1999). Der Vorteil dieser Methode besteht in der minimalen Traumatisierung von Weichteilgewebe und Knochen, welches insbesondere im Hinblick auf das noch nicht abgeschlossene Wachstum bei der Mehrzahl der jungen Patienten von besonderer Bedeutung ist.

Die Anwendung der medialen Maxillektomie nach Midfacial Degloving bietet einen weiteren Zugangsweg, der im Vergleich zum transnasalen Vorgehen eine übersichtlichere Darstellung von Tumoren im Bereich der Fossa pterygopalatina und Fossa infratemporalis ermöglicht. Tumoranteile im Bereich des Sinus cavernosus und der A. carotis interna lassen sich bei diesem Zugang ebenfalls häufig entfernen. Eine mediale Maxillektomie ist auch über die laterale Rhinotomie möglich, die eine der ältesten Zugangsformen zur Resektion eines Angiofibroms darstellt. Aufgrund der entstehenden Narbenbildung findet dieser Zugang aber immer seltener Anwendung (Schick B., 1999). Einen mikrochirurgischen Zugang zur Schädelbasis erlaubt der infratemporale Zugang über die Fossa infratemporalis, der auch für große Tumoren mit Ausdehnung in die Fossa infratemporalis und mit Befall der mittleren Schädelbasis und des lateralen Teils des Sinus cavernosus geeignet ist (Andrews J.C., 1999).

2.1.3 Ätiologie

Die ersten Ursprungstheorien zum juvenilen Angiofibrom wurden von der Vorstellung getragen, dass diese Tumore im Bereich des Nasenrachens entstehen. Bereits im 19. Jahrhundert findet sich die Vermutung der Tumor entstünde aus Periostschichten bzw. embryonalem Knorpelgewebe der Schädelbasis im Nasenrachenabschnitt (Nélaton M., 1853; Verneuil V., 1861; Tillaux P., 1878). Anfang des 20. Jahrhunderts wurde die Theorie entwickelt, nicht-ossifizierte Anteile des Chondrokraniums im Bereich der Sphenococcipitalis seien das Ursprungsgewebe des Angiofibroms (Coenen H., 1923), während andere erneut das Periost als Ursprungsgewebe postulierten (Sébileau P., 1923; Ringertz N., 1938). Dieser Vorstellung wurde 1940 der Gedanke des Einflusses hormoneller Faktoren auf das Periostgewebe hinzugefügt (Som M.L., 1940). Die vaskuläre Komponente des Angiofibroms fand erstmals Beachtung durch die Beschreibung von endothelial ausgekleideten vaskulären Spalten (Brunner H., 1942).

Auch die Einordnung als Hämangiom (Sternberg S.S., 1954; Hubbard E.M., 1958), sowie die Vermutung der Entwicklung aus ektopem Gefäßgewebe (Schiff M., 1959) fokussierte die vaskuläre Komponente des Angiofibroms als Ursprungsgewebe. Osborn beispielsweise betrachtete Angiofibrome als vaskuläre Neoplasien und wertete die Fibrosen in der Umgebung der Gefäße als Folge von Einblutungen (Osborn D.A., 1959).

Bereits Martin und Mitarbeiter diskutierten die Bedeutung hormoneller Einflüsse (Martin H., 1948), Dane und Mitarbeiter richteten ihren Blick ebenfalls auf hormonelle Aspekte und erachteten einen Androgenüberschuss als Ursache der Angiofibromentstehung (Dane W.H., 1954). Die Serumspiegel für Dihydrotestosteron, Testosteron und Estradiol-17B lagen jedoch, im Einklang mit der normalen sexuellen Entwicklung der Patienten, im Normbereich (Farag M.M., 1987). Einzelne Untersuchungen von Angiofibromen lieferten aber dennoch Hinweise auf eine mögliche Androgenbedeutung im Rahmen der Tumorentwicklung. Lee und Mitarbeiter konnten im Zytosol von 3 Tumoren Komponenten von spezifischen Bindungsstellen für Dihydrotestosteron und

Testosteron nicht aber für Progesteron und Östrogen nachweisen (Lee D.A., 1980). Hwang und Mitarbeiter wiesen immunhistochemisch in 18 von 24 untersuchten Angiofibromen eine starke Androgenrezeptorexpression nach (Hwang H.C., 1998).

Andere Theorien lassen die Unsicherheit, wie dieser seltene Tumor einzuordnen ist, noch deutlicher werden. Sie umfassen die Einordnung als vaskuläres Hamartom, dessen Ursprungsgewebe versprengtes Schwellkörpergewebe sei (Maurice M., 1981), als pathologische Gefäßreaktion (Liang J., 2000) oder als Teratom (Farag M.M., 1987). Eine weitere Theorie sieht den Tumorursprung aus nicht-chromaffinen Ganglienzellen in der Umgebung der A. maxillaris (Girgis I.C.H., 1973). Detaillierte morphologische Untersuchungen haben die Einordnung des juvenilen Angiofibroms als Gefäßmissbildung nahegelegt (Beham A., 2000), die embryologisch als Atavismus der 1. Pharyngealbogenarterie erklärt werden kann (Schick B., 2002).

Die Beobachtung, dass sich Angiofibrome im Vergleich zu einer Kontrollgruppe bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis coli (FAP) etwa 25mal häufiger manifestieren als in der Normalbevölkerung (Ferouz A.S., 1995; Giardiello F.M., 1993), legte eine ätiologische Bedeutung des für die FAP wichtigen APC-Gens nahe. Die FAP ist eine autosomal dominante Erkrankung, die charakterisiert ist durch multiple Adenome des Gastrointestinaltrakts, durch maligne Entartung mit obligater Entwicklung kolorektaler und periampullärer Karzinome sowie durch verschiedene extraintestinale Manifestationen, welche benigne epidermale Zysten, Osteome, Desmoide und maligne Tumoren von Schilddrüse, Leber, Gallenblase und Gehirn einschließen (Gardener E.J., 1962; Klemmer S., 1987; Krush A.J., 1988; Walsh N., 1987; Hamilton S.R., 1995). Als Ursache der FAP konnte eine Mutation des auf Chromosom 5q gelegenen APC-Gens ausgemacht werden. Mutationen des APC-Gens in Angiofibromen konnten in genetischen Untersuchungen jedoch nicht nachgewiesen werden (Guertl B., 2000).

Trotz dieser Vielzahl an Ursprungstheorien, die sowohl den Gedanken einer Bindegewebsneoplasie als auch eines Gefäßtumors miteinschließen, ist die Ätiologie des Angiofibroms bisher nicht abschließend geklärt.

2.2 Der APC/ β -Catenin Signalweg

Betrachtet man das o.g. APC-Gen nicht isoliert, sondern als Teil des APC/ β -Catenin Signalwegs (Brabletz T., 2002), so wird deutlich, dass die Bedeutung des APC-Tumorsuppressorproteins in der Regulation des Onkogenprodukts β -Catenin liegt (Barth A.I., 1997). β -Catenin erfüllt in der Zelle unterschiedliche, voneinander unabhängige Funktionen. Es existieren zwei verschiedene Pools, von denen einer als Teil der membrangebundenen, Cadherin-assoziierten Zelladhäsionsproteinkomplexe vorliegt und der andere in einer Schlüsselfunktion an der Wnt-vermittelten Transkription Tcf/LEF-1 abhängiger Gene beteiligt ist (Polakis P., 2000; Hajra K.M., 2002). Alternativ wird dieser Signalweg auch als Wnt/wingless-Signalweg bezeichnet.

Zusammen mit den Proteinen Axin bzw. Conductin und Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) bildet das APC-Protein einen Multiproteinkomplex, der regulär einen grossen Anteil des zytoplasmatischen β -Catenins abbaut. Axin scheint dabei als Gerüst zu fungieren, da es Bindungsstellen für alle anderen Mitglieder des Komplexes besitzt und als einziges beteiligtes Enzym in der Lage ist, Glykogen Synthase Kinase 3 β zu binden (Rubinfeld B., 1996; Hart M.J., 1998; Behrens J., 1998).

Das aminoternale Ende des β -Catenins ist Ziel der Phosphorylierung durch die GSK3 β , welche die Ubiquitinierung und in der Folge die proteasomale Degradierung desselben einleitet (Yang F., 2002; Orford K., 1997; Aberle H., 1997). Ein nicht-phosphoryliertes β -Catenin entgeht der Erkennung durch β -TRCP (β -transducin repeat-containing protein), einer Komponente der Ubiquitin Ligase, und somit dem Abbau (Behrens J., 1996; Hart M., 1999).

In der gesunden Zelle liegt β -Catenin bei geringen Plasmakonzentrationen vorwiegend in den Zelladhäsionsproteinkomplexen vor. Eine Akkumulation im Kern und damit übermäßige Transkription wird durch zytoplasmatischen, APC/GSK3 β /Conductin bzw. Axin-Multiproteinkomplex vermittelten Abbau des β -Catenins verhindert (siehe Abb.2-3). Außerdem findet ein aktiver nukleärer Export des β -Catenins aus dem Kern ins Zytoplasma statt (Henderson B.R., 2002).

Der Mechanismus der nukleären Translokation von β -Catenin ist noch weitgehend unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise auf eine Shuttlefunktion des APC-Proteins (Henderson B.R., 2000). Auch TCF (Behrens J., 1996) und der Androgenrezeptor (Pawlowski J.E., 2002) werden in dieser Funktion diskutiert.

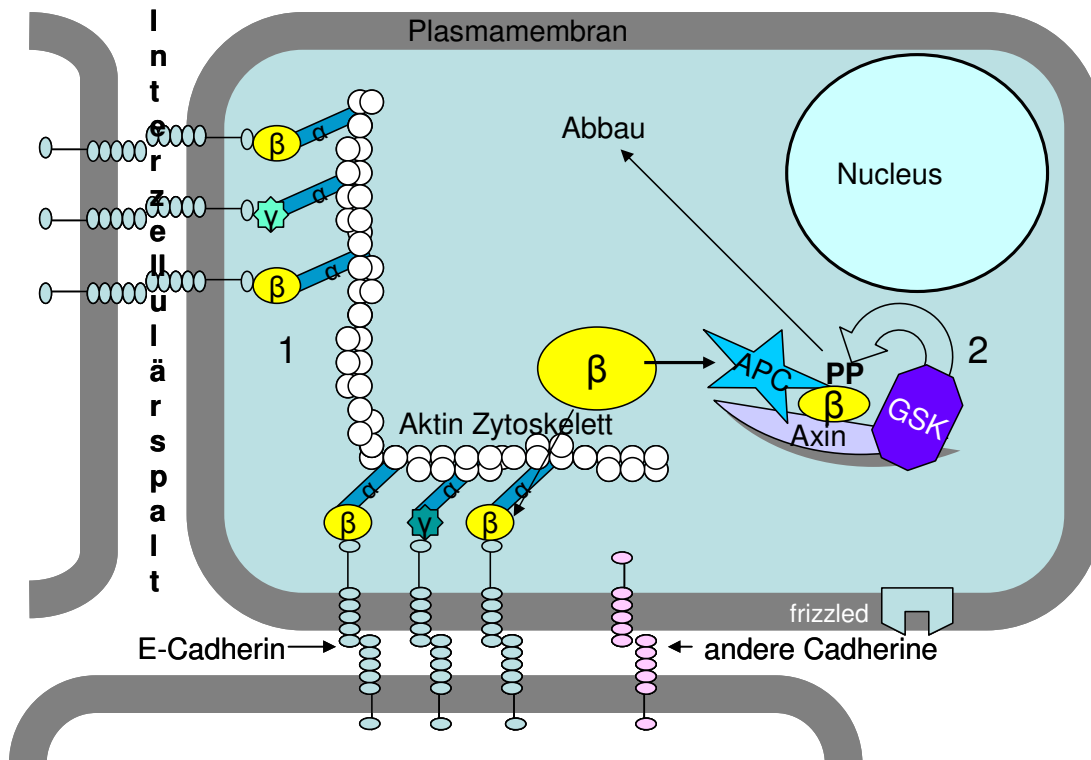


Abb.2-3: Schematische Darstellung der β -Catenin Verteilung in der gesunden, inaktiven Zelle: 1. β -Catenin als Bestandteil der Zelladhäsionskomplexe; 2. Phosphorylierung des zytoplasmatischen β -Catenins durch den Multienzym-Komplex APC/GSK3 β /Axin und dadurch Einleitung des Abbaus.

β = β -Catenin; γ = γ -Catenin; α = α -Catenin; GSK=GSK3 β ; APC=Adenomatöse Polyposis Coli-Protein (Schaubild in Anlehnung an Conaci-Sorell und Mitarbeiter (2002)).

Der Abbau von β -Catenin kann durch physiologische Stimulation von Extrazellulär (Wnt-signaling) verhindert werden. Das Wnt/wingless Glykoprotein interagiert mit Rezeptoren, die durch die *frizzled* Genfamilie kodiert werden. Als Antwort auf das Wnt-Signal aktivieren *frizzled*-Rezeptoren das zytoplasmatische Protein *dishevelled*. Dieses assoziiert sich daraufhin mit Axin und inhibiert so die Phosphorylierung des β -Catenins durch die Serin/Threonin

Kinase GSK3 β (Barth A., 1997), Folge ist ein zytoplasmatischer Konzentrationsanstieg von β -Catenin. Nach einer nukleären Anreicherung von β -Catenin kommt es konsekutiv zur Transkriptionsstimulation Tcf/Lef1 abhängiger Gene (siehe Abb. 2-4).

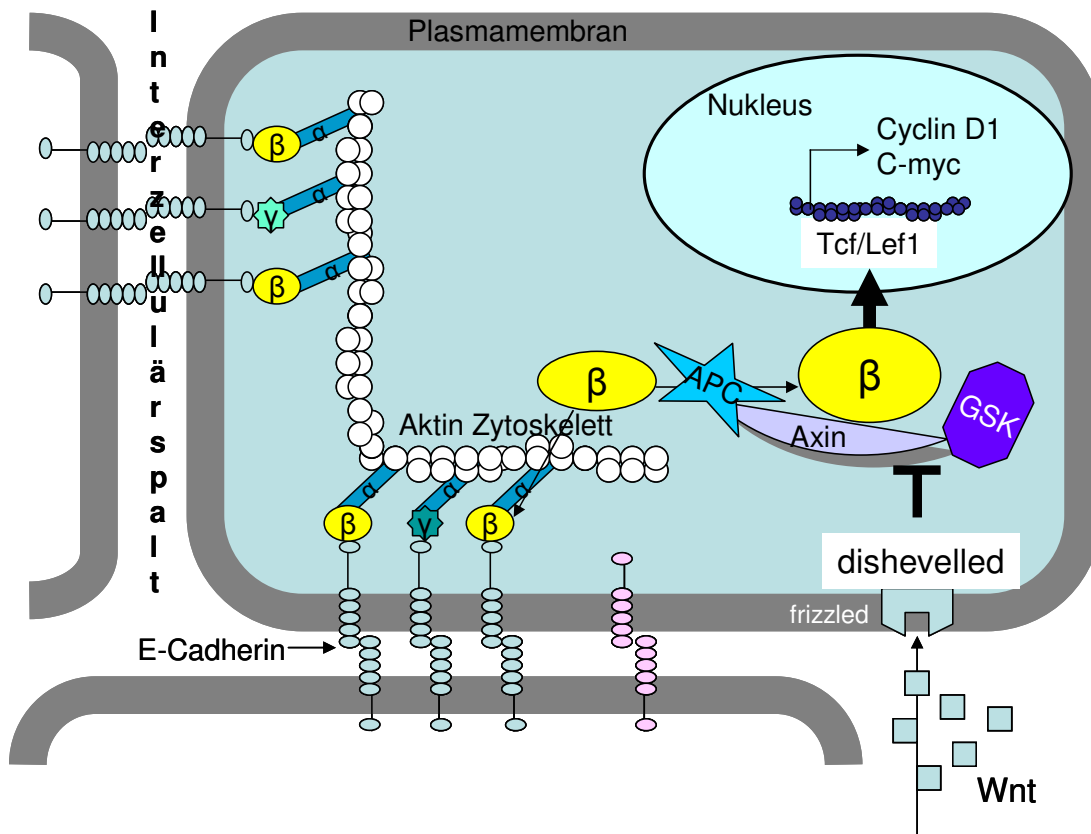


Abb.2-4:Schematische Darstellung der Stabilisierung des β -Catenins im Rahmen des Wnt/wingless-Signalwegs: Wnt aktiviert durch Bindung an den *frizzled* Rezeptor das Protein *dishevelled*; *dishevelled* inhibiert den abbauenden Enzymkomplex. Daraus resultiert ein Konzentrationsanstieg des β -Catenins im Plasma; es kommt zur nukleären Translokation und konsekutiv zur Aktivierung der Transkription Tcf/Lef1 abhängiger Gene. β = β -Catenin; γ = γ -Catenin; α = α -Catenin; GSK= GSK3 β ; APC= APC Protein

In einer pathologischen Situation kann eine Stabilisierung des β -Catenin-Proteins durch Mutation eines der am Abbau beteiligten Gene (z. B. APC-oder Axin-Gen) induziert werden. In diesem Fall steigt die Konzentration im Plasma unkontrolliert an und β -Catenin tritt konsekutiv in den Zellkern über (nukleäre Translokation), wo es als Koaktivator die Trankriptionsprozesse von Genen wie Cyclin D1 (Shtutman M., 1999) und c-myc (He T.C., 1998), Matrix Metalloproteinase-7 (Crawford H.C., 1999), Fra und Jun (Mann B., 1999) und

WISP-1 (Eklof Spink K.E., 2001) aktiviert. Diese Gene sind an der Regulation von Wachstum, Differenzierung und Invasivität von Zellen beteiligt und sind sowohl in die Regulation einer normalen Entwicklung als auch in die Tumorgenese involviert (Pawlowski J.E., 2002; van Aken E., 2001). An der Aktivierung dieser Gene sind weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt wie z. B. Creb binding protein (CBP) und TATA binding protein (TBP), die gleichfalls mit dem Tcf/LEF-1 Komplex interagieren (Hecht A., 1999; Takemaru K.I., 2000). Unabhängig von der Inaktivierung des enzymatischen Abbaukomplexes kann die Stabilisierung des β -Catenins auch durch eine Mutation im Aminoterminus des β -Catenins selbst erfolgen, der die Bindungsstellen für die abbauenden Proteine enthält (Polakis P., 1999). Auch diese Mutation führt zu unkontrolliertem Anstieg der zytosolischen β -Catenin-Konzentration und damit zu einer Transkriptionsstimulation im Zellkern (siehe Abb. 2-5).

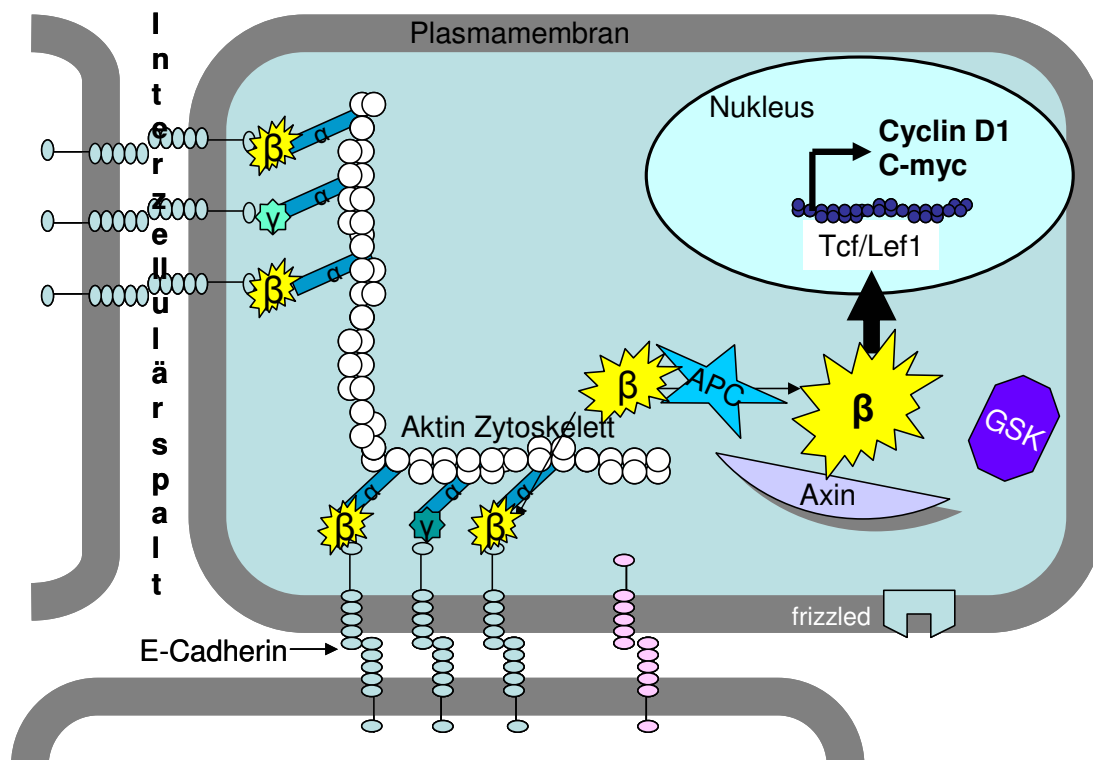


Abb.2-5: Durch eine Mutation im aminoterminalen Ende des β -Catenin kommt es zur permanenten Aktivierung des Wnt/wingless Signalwegs: β -Catenin wird auch in Abwesenheit von Wnt nicht mehr abgebaut; es kommt zur permanenten Stimulation der Tcf/LEF1 abhängigen Transkription der Zielgene, z.B. Cyclin D1 und c-myc

Im Sinne dieser Zusammenhänge ist die Beobachtung von Mutationen in Exon 3¹ des β -Catenin-Gens in juvenilen Angiofibromen bemerkenswert und legt nahe, dass β -Catenin an der Entstehung dieses Tumors beteiligt ist. Gestützt wird dieser Gedanke durch den Nachweis von zum Primärtumor identischen β -Catenin-Mutationen in Angiofibrom-Rezidiven (Abraham S.C., 2001). Dies kann als deutlicher Hinweis auf die Bedeutung des APC/ β -Catenin-Signalwegs für die Pathogenese des Angiofibroms gewertet werden. Die immunhistochemisch beschriebene Anreicherung von β -Catenin in den Zellkernen der Bindegewebszellen wird von den Autoren als Hinweis auf das Ursprungsgewebe interpretiert (Abraham S.C., 2001).

2.3 β -Catenin und der Androgenrezeptor

Der Androgenrezeptor (AR) gehört einer „Superfamilie“ von Steroidhormonrezeptoren an und ist von zentraler Wichtigkeit für die normale geschlechtliche Entwicklung von männlichen Jugendlichen. Er wird in einer grossen Anzahl unterschiedlicher Gewebe exprimiert, die weit über primäre und sekundäre Geschlechtsorgane hinausreicht (Lindzey J., 1994).

In Abwesenheit eines Liganden ist der inaktive AR (110 kDa) im Zytoplasma androgenabhängiger Gewebe an einen Korepressor-Komplex gebunden. Von diesem löst er sich erst durch Bindung eines Liganden, also Androgenen wie Testosteron oder 5 α -Dihydrotestosteron (5 α -DHT). Der Liganden-AR-Rezeptor-Komplex transloziert in den Kern (Masiello D., 2002). Dort bindet der aktive AR an Androgen-sensible Elemente in den Promotoren der Zielgene und führt dadurch entweder zur Stimulation oder zur Suppression der entsprechenden Gene (Chesire D.R., 2003). Der Ligand/Rezeptor-Komplex stimuliert die Transkription androgenabhängiger Gene, die an der Regulation von Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind. Dabei wirkt der AR nicht direkt auf den basalen Transkriptionsapparat ein, sondern stimuliert die Transkription der Zielgene über die Formierung eines

¹ Exon 3 kodiert für die Armadillo Repeat Region, die die Bindungsstelle für GSK3 β und viele

Koaktivatorkomplexes, dessen Funktion unter anderem die Initiierung der Polymerase ist (Pawlowski J.E., 2002).

Wichtige Regionen für die Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors sind die zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD), die am C-Terminus gelegene Ligandenbindungsdomäne und eine große N-terminale Transaktivierungsdomäne (Chesire D.R.; 2003; Amir A.L., 2003). Der schematische Aufbau des AR ist in Abb. 2-6 dargestellt.

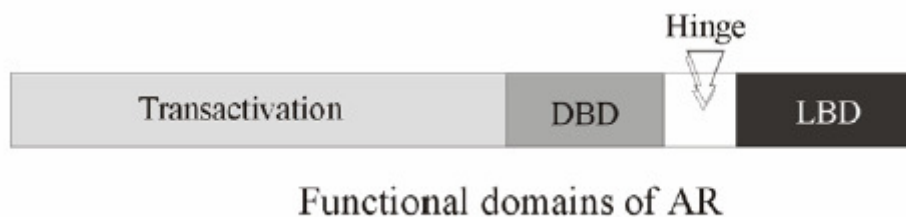


Abb.2-6: Schematische Darstellung der Struktur des Androgenrezeptors. Von links nach rechts: Transactivation =große N-terminale Transaktivierungsdomäne; DBD =DNA-Bindungsdomäne; Hinge =Brückenregion, die DBD und LBD verbindet; LBD =Ligandenbindungsdomäne (Shang J, 2002)

Im Hinblick auf die Entstehung des juvenilen Angiofibroms ist interessant, dass die Expression des AR in diesem Tumor nachgewiesen wurde (Hwang H.C., 1998) und dass zwischen β -Catenin und dem Androgenrezeptor spezifische Interaktionen stattfinden (Yang F., 2002).

Das AR-Gen ist auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xq11-q12) lokalisiert. Da im JA mittels vergleichender genomischer Hybridisierung Geschlechtschromosomenaberrationen nachgewiesen werden konnten (Schick B., 2001), erscheint die weitergehende Analyse des Androgenrezeptors in dem Bemühen um die Entschlüsselung der Molekularpathogenese des juvenilen Angiofibroms sinnvoll. Die oben dargelegten Beobachtungen in Verbindung mit dem geschlechtsspezifischen Auftreten des juvenilen Angiofibroms legen die Vermutung nahe, dass auch der Androgenrezeptor in die Pathogenese des Angiofibroms involviert ist.

2.4 Die Cadherin/Catenin-Proteinfamilie

Veränderungen des gesamten Cadherin/Catenin-Proteinkomplexes und seiner Adhäsion vermittelnden Eigenschaften werden für die Entwicklung und Progression von Tumoren diskutiert. Die Funktion dieser Proteine besteht in der Herstellung eines Zusammenhaltes zwischen den einzelnen Zellen eines Gewebes und einer Verbindung zwischen Zellmembran und Matrix. Cadherine sind Calcium-abhängige, transmembranöse Proteine, die aus einem extra- und einem intrazellulären Anteil bestehen. Catenine sind eine Gruppe von Proteinen, die mit dem intrazellulären Abschnitt der Cadherine interagieren (Jiang W.G., 1996). Eine schematische Darstellung der morphologischen Zusammenhänge zeigen die Abb. 2-3 bis 2-5. Als Regulatoren der Cadherine und Catenine werden verschiedene Tyrosinkinasen und -phosphatasen diskutiert (Barth A., 1997). Veränderungen in der Expression von Cadherin/Catenin-Proteinen wurden unter anderem in Tumoren von Blase, Mamma, Zervix, Kolon, Ösophagus, Kopf-und Hals, Magen, Prostata und Haut beschrieben (Papadavid E., 2001).

2.4.1 β -Catenin

β -Catenin ist ein 88 kDa schweres Protein, dessen kodierendes Gen auf Chromosom 3p21 lokalisiert ist. Seine Rolle im Rahmen der Zelladhäsion und als Teil des APC/ β -Catenin Signalwegs wurde bereits in 2.2 besprochen. Es besitzt eine hochkonservierte, zentrale Region, die 12 unvollständige so genannte Armadillo-repeats besitzt, welche die Bindung an eine Vielfalt von Proteinen vermittelt, inklusive α -Catenin, E-Cadherin, APC-Protein, Axin/Conductin und die Tcf-Transkriptionsfaktoren (Takeichi M., 1991; Barker N., 2000), von denen die meisten am Wnt/wingless Pathway beteiligt sind. Eine andere konservierte Region ist verantwortlich für die N-terminale Phosphorylierung durch GSK3 β , was den Abbau des β -Catenins im

Ubiquitin/Proteasomen-Signalweg einleitet. Die Struktur von β -Catenin und dem strukturell sehr ähnlichen γ -Catenin ist in Abbildung 2-6 dargestellt.

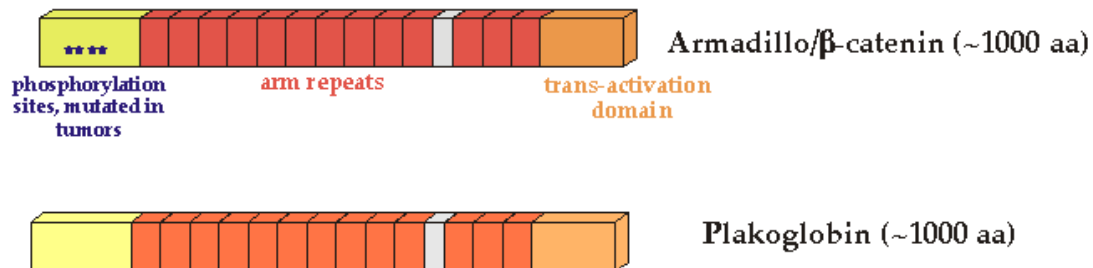


Abb. 2-7: Schematische Darstellung der Struktur von β - und γ -Catenin: gelb: Ort der Phosphorylierung durch GSK3 β am N-Terminus; rot: 14 Armadillorepeat-Region; orange: Transaktivierungsdomäne am C-Terminus (Nusse R, Wnt-Homepage).

2.4.2 γ -Catenin

Aufgrund der gemeinsamen Armadillo-repeat Region und der für die N-terminale Phosphorylierung zuständigen Region geht man davon aus, dass die Funktionen des γ -Catenins² (82 kDa) denen des β -Catenins sehr ähnlich sind. Wie β -Catenin verbindet γ -Catenin als Bestandteil der Zelladhäsion E-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett der Zelle, im Unterschied zu diesem ist es jedoch nicht nur Bestandteil der adherens junctions sondern ist auch am Aufbau der Desmosomen beteiligt. Die Funktion des γ -Catenins im Wnt/wingless Signalweg ist mit der des β -Catenins vergleichbar (Ben-Ze'ev A., 1998; Behrens J., 1999), doch trotz dieser Gemeinsamkeiten wird vermutet, dass γ -Catenin eine sich von β -Catenin unterscheidende Funktion im Wnt/wingless Signalweg, bei der Regulation der Gentranskription und somit in der Tumorentstehung hat (Kolligs F.T., 2000).

² In der Literatur auch als Plakoglobin bezeichnet

2.4.3 E-Cadherin

E-Cadherin³ ist die zentrale strukturelle Komponente der Zelladhäsionskomplexe, die eine wichtige Rolle bei Tumorgenese und Metastasierung spielen. E-Cadherin ist ein Calcium-abhängiges 120 kDa Glykoprotein, das mit seinem extrazellulären Anteil hauptsächlich homotypische Zellkontakte zu anderen E-Cadherin-Molekülen vermittelt, z.B. zwischen benachbarten Epithelzellen, jedoch auch heterotypische Kontakte zwischen unterschiedlichen Cadherinen ermöglicht. Der intrazelluläre Proteinteil ist über die Catenine α -, β - oder γ -Catenin mit dem Aktinzytoskelett der Zelle verbunden (Jiang W.G., 1996; van Aken E., 2001). E-Cadherin ist in allen Epithelien des Körpers nachweisbar.

Über seine Funktion als Zelladhäsionsmolekül hinaus hat E-Cadherin die Funktion der Signaltransduktion von der äußeren Zellmembran zum Zytoskelett und wirkt stabilisierend. Durch seine Verbindung zu vielen anderen Signalvermittelnden Systemen spielt E-Cadherin ausserdem möglicherweise eine Rolle bei der Invasion von Tumorzellen (Noe V., 1999).

Der Verlust von E-Cadherin oder seine abnorme Expression ist ein häufiges Ereignis in vielen verschiedenen Tumoren und assoziiert mit deren Fähigkeit zu Progression, Invasion und Metastasierung (Jiang W.G., 1996; Papadavid E., 2001), was zu der Annahme führt, dass das auf Chromosom 16q22.1 gelegene E-Cadherin Gen CDH1 sowohl als Invasionssuppressor-Gen als auch als Tumorsuppressor-Gen fungiert (van Aken E., 2001).

2.4.4 N-Cadherin

N-Cadherin (neurales Cadherin) ist ein 140 kDa Protein. Es fördert das Neuritenwachstum in vivo und ist ein essentielles Adhäsionsmolekül in Herzmuskelzellen (Redies C., 1996; Riehl R., 1996). In Epithelzellen kommt es beim Gesunden nicht vor. Es gibt jedoch Hinweise auf eine Rolle des N-

³ in der Literatur auch als Uvomorulin bezeichnet

Cadherins in verschiedenen Tumoren mit Expression in Epithelien bei gleichzeitiger Downregulation von E-Cadherin. Dieser Vorgang wird als „*Cadherin Switching*“ bezeichnet. In manchen Versuchszelllinien schien die N-Cadherin Expression die E-Cadherin Expression zu unterdrücken (Barth A., 1997), in Mammakarzinomzellen entfaltete sich die Motilität und Invasion fördernde Wirkung des N-Cadherins jedoch unabhängig von der E-Cadherin Expression (Niemann, 1999).

Gesteigerte N-Cadherin Expression wird daher mit erhöhter Zellmotilität und gesteigerter Invasionsfähigkeit des Tumors in Verbindung gebracht. Insgesamt ist über die N-Cadherin-Funktion jedoch wenig bekannt.

2.4.5 α -Catenin

α -Catenin, ein 102 kDa Protein das auf Chromosom 5q21-22 liegt, bindet ebenfalls an E-Cadherin bzw. β - oder γ -Catenin und stellt die Verbindung zu den Aktinfilamenten des Zytoskeletts her. Seine Expression ist in vielen Tumoren vermindert und eine mit E-Cadherin vergleichbare Funktion als Invasionssuppressor kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden (Hajra KM, 2002). In Karzinomen von Lunge, Prostata, Ovar und Kolon wurden inaktivierende Mutationen nachgewiesen (Breen E, 1993; Oda T, 1993). In Nacktmäusen führte die Introduktion von Wildtyp α -Catenin in einer Zelllinie mit defektem Protein zur Wiederherstellung von Zellkontakten, Verlangsamung von Zellwachstum und zur Reduktion des Tumorstadiums (Watabe M, 1994). Beim juvenilen Angiofibrom gibt es bis dato keine Erfahrungen.

2.5 Zielsetzung der eigenen Arbeit

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen die Expression von Vertretern der Cadherin/Catenin-Proteinfamilie in juvenilen Angiofibromen zu untersuchen. Insbesondere die Beobachtung der Verteilung dieser Proteine auf die verschiedenen Zellkompartimente und ihrer Expression in den verschiedenen Zelltypen des juvenilen Angiofibroms sollten, bei der unverändert offenen Frage nach dem Ursprungsgewebe des juvenilen Angiofibroms, Hinweise auf die tumorbestimmende Zellart geben.

Ausgehend von den Beobachtungen von Mutationen im Exon 3 des β -Catenin-Gens in diesem geschlechtsspezifischen Tumor und dem Wissen um die engen Interaktionen von β -Catenin und dem Androgenrezeptor, wurden im zweiten Teil molekularzytogenetische Untersuchungen des X-Chromosoms und des auf dem X-Chromosom lokalisierten Androgenrezeptor-Gens (Xq11-q12) durchgeführt. Da in Voruntersuchungen mit Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) X-chromosomale Veränderungen im juvenilen Angiofibrom nachgewiesen worden waren, wurden in dieser Arbeit mit der spezifischen Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) Aberrationen des X-Chromosoms und des Androgenrezeptor-Gens analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tumorgewebe

Vom Institut für Pathologie des Klinikums Fulda (Direktor: Prof. Dr. H. Arps) wurde freundlicherweise das in Paraffin eingebettete Gewebe von 13 Angiofibromen zu Verfügung gestellt. Die Diagnose eines juvenilen Angiofibroms war in allen Fällen bereits präoperativ aufgrund des klassischen klinischen Erscheinungsbilds gestellt worden und konnte histologisch nach Hämatoxylin-/Eosinanfärbung durch den Nachweis der charakteristischen endothelial begrenzten, in ein Bindegewebsstroma eingelagerten Gefäßspalten sowie durch immunhistologische Untersuchungen (CD31, CD34, Faktor-8-assoziiertes Antigen, Neuronen-spezifische-Enolase, S-100-Protein und Vimentin) bestätigt werden. Die Charakteristika der einzelnen Gewebeproben sind in Tabelle 3-1 aufgeführt.

3.1.2 Referenzgewebe

Als Kontrollgewebe für die Immunhistologie diente die den Tumor bedeckende, normal differenzierte Nasenschleimhaut sowie Larynxkarzinom- und Tonsillengewebe, die ebenfalls in Paraffin eingebettet worden waren. Als Negativkontrolle wurden Angiofibromgewebeschnitte verwendet, bei denen ohne Anwendung eines Primärantikörpers die Inkubation nur mit dem Sekundärantikörper erfolgte. Für die FISH-Untersuchungen wurden nach einem modifizierten Standardprotokoll (Arakaki D.T., 1963) Metaphasechromosomen

von Blutlymphozyten gesunder junger Männer (46,XY) präpariert und zur Kontrolle herangezogen.

Tabelle 3-1: Zusammenstellung der verfügbaren Patientendaten

Tumor	Geschlecht /Alter des Patienten	Histologische Einteilung	Tumortyp
029	M/15	BGW	PT
030	M/13	G	PT
031	M/14	BGW	PT
046/2	M/*	G	PT
066	M/37	M	PT
073	M/16	M	PT
074	M/46	M	R
089	M/13	G	PT
F15867	M/*	G	PT
F8182	M/*	BGW	PT
F2316	M/*	BGW	PT
F4996	M/*	G	PT
F2811	M/*	M	PT
F7344	M/*	M	PT

PT = Primärtumor; R = Rezidivtumor; M = männlich; BGW = Bindegewebstyp; G = Gefäß-Typ; M = Mischtyp; * =Daten nicht verfügbar

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistologie

3.2.1.1 Fixierung und Paraffineinbettung

Für immunhistologische Untersuchungen wurden die Angiofibrompräparate 2 h in einem Überkopfschüttler in einer 3,7%-igen Formalinlösung und 0,1 M PBS (pH=7,4) bei RT fixiert. Vorbereitend für die Paraffineinbettung wurden die Präparate danach im Hypercenter XP (Shandon, England) folgender Behandlung unterzogen:

Tab.3-1: Fixierung der Angiofibrompräparate im Hypercenter als Vorbereitung auf die Paraffineinbettung.

Lösung	Temperatur	Vakuum	Zeitdauer
4%Formalin in 1xPBS (pH=7,4)	37°C	+	1h
70%Ethanol	37°C	+	1h
70%Ethanol	37°C	+	2h
70%Ethanol	37°C	+	3h
96%Ethanol	37°C	+	1h
96%Ethanol	37°C	+	2h
96%Ethanol	37°C	+	3h
100%Xylol	37°C	+	1h
100%Xylol	37°C	+	2h
100%Xylol	37°C	+	3h
Paraffin	59°C	+	2h
Paraffin	59°C	+	2h

Die Präparate sowohl für die immunhistologischen Untersuchungen als auch für die FISH-Untersuchungen wurden in gleicher Weise in Paraffin (Histo-Comb Gewebeeinbettmittel, Vogel, Deutschland) eingebettet. Diese Einbettung der

Präparate wurde in einem Histocentre 2 (Shandon, Großbritannien) durchgeführt.

3.2.1.2 Schnitttechnik

An einem SM 2000 R Microtom (Leica, Deutschland) wurden für die immunhistologischen Untersuchungen 5 µm dicke Schnitte der Paraffin-eingebetteten Angiofibrompräparate angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgebracht, wohingegen die Schnitte für die FISH-Untersuchung mit einer Dicke von nur 3-4 µm hergestellt wurden.

3.2.1.3 Herstellung von Kryopräparaten

Das native Tumorgewebe von 4 juvenilen Angiofibromen wurde in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Anfertigung von Kryostatschnitten wurde das Tumorgewebe bei -21 °C im Kryostat (Leica CM 3050S) in Tissue Tec® (Satura) eingebettet. Die Schnittdicke betrug 5-8 µm. Die Präparate wurden zwecks besserer Anheftung bei RT auf die Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden sie für 10 Minuten in 10 °C kaltem Aceton fixiert, luftgetrocknet und über Nacht bei 55 °C inkubiert.

3.2.1.4 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Um die Schnittanheftung zu verbessern, wurden die 5 µm dicken Paraffinschnitte über Nacht bei 55 °C im Wärmeschrank behandelt. Die Entparaffinisierung erfolgte in Xylol, einer absteigenden Alkoholreihe und H₂O dest. (Xylol 15 Minuten, je drei Waschschriffe in drei weiteren Xylolbädern, je drei Waschschriffe in drei 96%-igen Ethanolbädern, je drei Waschschriffe in drei 70%-igen Ethanolbädern, je drei Waschschriffe in zwei H₂O dest.-Bädern). Um eine Antigendemaskierung zu erreichen, wurden die Objektträger mit 10 mM Na-Citrat (6432, Merk, Deutschland) und 2 mM Zitronensäure (244, Merk,

Deutschland) oder mit Target Retrieval Solution (S 3308, DAKO Diagnostics, Deutschland) in H₂O dest. bedeckt und 40 Minuten bei 90° C im Wasserbad behandelt. Im Anschluss wurden die Präparate 20 Minuten lang in Eiswasser abgekühlt und in 0,1 M PBS (pH=7,4) gewaschen (1x5 Minuten, je 3x kurz in zwei Bädern). Die Kryostatschnitte wurden lediglich in 0,1 M PBS gespült und dann wie die Paraffinschnitte weiterbehandelt.

Nach einem ersten 20 minütigen Blockierungsschritt mit 5% Rinderalbumin in 1x PBS (pH=7,4) bei Raumtemperatur wurden die Objektträger mit 0,1 M PBS (pH=7,4) gewaschen. Nach einem zweiten Blockierungsschritt mit FCS über einen Zeitraum von 20 Minuten bei RT folgte direkt das Aufpipetieren der Primärantikörper auf die Gewebeschnitte, wobei die monoklonalen β -Catenin- und E-Cadherin-Antikörper der Maus (Zymed, USA) beide 1:100 verdünnt zur Anwendung kamen. Die Stammlösung dieser Antikörper hatte eine Konzentration von 0,5 mg/ml. Die Stammlösung des monoklonalen Mausantikörpers N-Cadherin (Zymed, USA) besaß ebenfalls eine Konzentration von 0,5 mg/ml und wurde 1:66 verdünnt. Der monoklonale γ -Catenin-Antikörper der Maus (Zymed, USA) wurde ausgehend von der Stammlösung (Konzentration=10 mg/ml) 1:5 verdünnt. Bei dem polyklonalen Ziegen-Antikörper α -Catenin (sc-1495, Santa Cruz, USA) mit einer Stammlösungskonzentration von 0,2 mg/ml wurde eine Verdünnung von 1:50 hergestellt. Der monoklonale Mausantikörper gegen den Androgenrezeptor (Clone AR 441; DAKO M 3562, DAKO Diagnostics, Deutschland) wurde von der Stammlösung ausgehend ebenfalls 1:50 verdünnt. Alle Verdünnungen der Primärantikörper-Stammlösungen erfolgten mit Antikörper-Verdünnungsmedium (DAKO S 3022, DAKO Diagnostics, Deutschland). Zusammenfassend sind die Primärantikörper und ihre Verdünnungen in Tab. 3-3 dargestellt. Zur Inkubation wurden die Objektträger mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden die Präparate zweimal kurz und einmal fünf Minuten in PBS (pH=7,4) gewaschen. Die Detektion der Primärantikörper der Maus erfolgte mit gegen Maus gerichtetem Cy3-konjugierten goat-anti-mouse IgG Sekundärantikörper (Dianova 115-166-071, Deutschland). Der α -Catenin-Antikörper wurde mit FITC-konjugiertem mouse-anti-goat IgG Sekundärantikörper (F4891, Sigma, Deutschland) detektiert,

indem je 50 µl verdünnter Antikörperlösung auf die Präparate aufpipetiert und mit den Präparaten für 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Beide Sekundärantikörper wurden 1:400 mit 0,05 M Tris-Puffer (pH=7,6) verdünnt. Die Präparate wurden wiederum mit 1x PBS (pH=7,4) gespült, um den überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen. Die Kernfärbung wurde darauf folgend in Form einer DAPI-Gegenfärbung durchgeführt (DAPI 1:2000 in H₂O dest., ausgehend von der Stammlösung 0,5 mg/ml, 6335.1, Roth, Deutschland). Um eine Ausbleichung zu verhindern, wurden nach drei Waschschritten in H₂O dest. die Präparate mit Mounting Medium (Invitro, Deutschland) eingedeckt. Alle Präparate wurden bei 4°C im Dunkeln bis zur Auswertung aufbewahrt.

Tab. 3-3: Übersicht über die in den immunhistologischen Untersuchungen verwendeten Antikörper

Primär-AK	Hersteller	Herkunft	Konzentration	Verdünnung
E-Cadherin	Zymed, USA	Monoklonaler AK/ Maus	0,5 mg/ml	1:100
N-Cadherin	Zymed, USA	Monoklonaler AK/ Maus	0,5 mg/ml	1:66
α-Catenin	Santa Cruz, USA	Polyklonaler AK/ Ziege	0,2 mg/ml	1:50
β-Catenin	Zymed, USA	Monoklonaler AK/ Maus	0,5 mg/ml	1:100
γ-Catenin	Zymed, USA	Monoklonaler AK/ Maus	10 mg/ml	1:5
Androgen- rezeptor, Clone AR 441	DAKO Diagnostics, Deutschland	Monoklonaler AK/ Maus		1:50

3.2.2 FISH-Untersuchung

3.2.2.1 Einführung in die FISH-Technik

3.2.2.1.1 Denaturierung und Hybridisierung

Die Technik der in-situ-Hybridisierung wurde voneinander unabhängig von Pardue und Gall sowie John und Mitarbeitern 1969 entwickelt. Das Prinzip der Hybridisierung basiert auf einer komplementären Basenpaarung zwischen der genomischen DNA im Untersuchungsmaterial und den eingesetzten markierten Einzelstrang-Sonden (Probensequenzen). Dazu werden die komplementären Stränge der genomischen DNA-Doppelhelix zunächst durch Denaturierung getrennt. Die In-situ-Hybridisierungstechnik erlaubt die Detektion spezifischer Sequenzen in Chromosomen, in isolierten Zellen oder am Gewebeschnitt (in-situ) sowohl an Metaphase- als auch an Interphasekernen. Bei der in den 80-er Jahren eingeführten Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgt der Nachweis der bei der Hybridisierung eingesetzten Sonden mittels Fluoreszenzmarkierung. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden mit einer bestimmten Lichtwellenlänge angeregt und emittieren Licht einer anderen, üblicherweise längeren Wellenlänge. Dabei können so viele Zielsequenzen gleichzeitig untersucht werden, wie es unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gibt. Die fluoreszenzmarkierte Probensequenz wird nach der Denaturierung zur genomischen DNA hinzugegeben und hybridisiert mit der spezifischen Zielsequenz.

Entscheidend für die Denaturierung und auch die Hybridisierung der DNA ist die Stabilität der Doppelstränge, welche durch die Schmelztemperatur T_m festgelegt ist. Diese bezeichnet die Temperatur, bei der die Hälfte der doppelsträngigen Moleküle in Einzelstränge dissoziiert. Je stabiler die Doppelhelix, umso höher ist die Schmelztemperatur, d.h. umso höher ist die zur Denaturierung benötigte Energie. Berechnen lässt sich T_m mit der folgenden Gleichung (Leitch I.J., 1994):

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

Aus dieser Gleichung werden die Parameter ersichtlich, welche einen direkten Einfluss auf die Denaturierung bzw. die Reassoziaton haben. So erhöht die Anwesenheit monovalenter Na^+ -Kationen die Stabilität der Doppelstränge. Weiterhin ist der prozentuale Anteil von Guanin und Cytosin von Bedeutung, da GC-Paare über drei Wasserstoffbrückenbindungen fester miteinander verbunden sind, als AT-Paare, welche lediglich zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Zwischen der Schmelztemperatur von DNA-Doppelsträngen und dem Verhältnis von AT zu GC besteht ein linearer Zusammenhang. Formamid hemmt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und wirkt auf diese Weise destabilisierend, die Denaturierung wird erleichtert. Jedes Prozent Formamid im Hybridisierungsmix senkt die T_m um $0,72^\circ\text{C}$. Letztlich spielen auch die Eigenschaften der DNA selbst eine Rolle bei der Denaturierung, wie z. B. die Länge der DNA, ihre Konformation, die Assoziation mit verschiedenen Proteinen sowie die Anzahl fehlerhaft gepaarter Basenpaare und auch die Art des Nukleinsäurehybrids (Darzynkiewicz Z., 1990). Die Denaturierungstemperatur wird üblicherweise so gewählt, dass sie etwa 30°C über der errechneten Schmelztemperatur liegt. In der folgenden Abbildung (Abb. 3-1-1) ist der Vorgang der Denaturierung und Hybridisierung graphisch dargestellt:

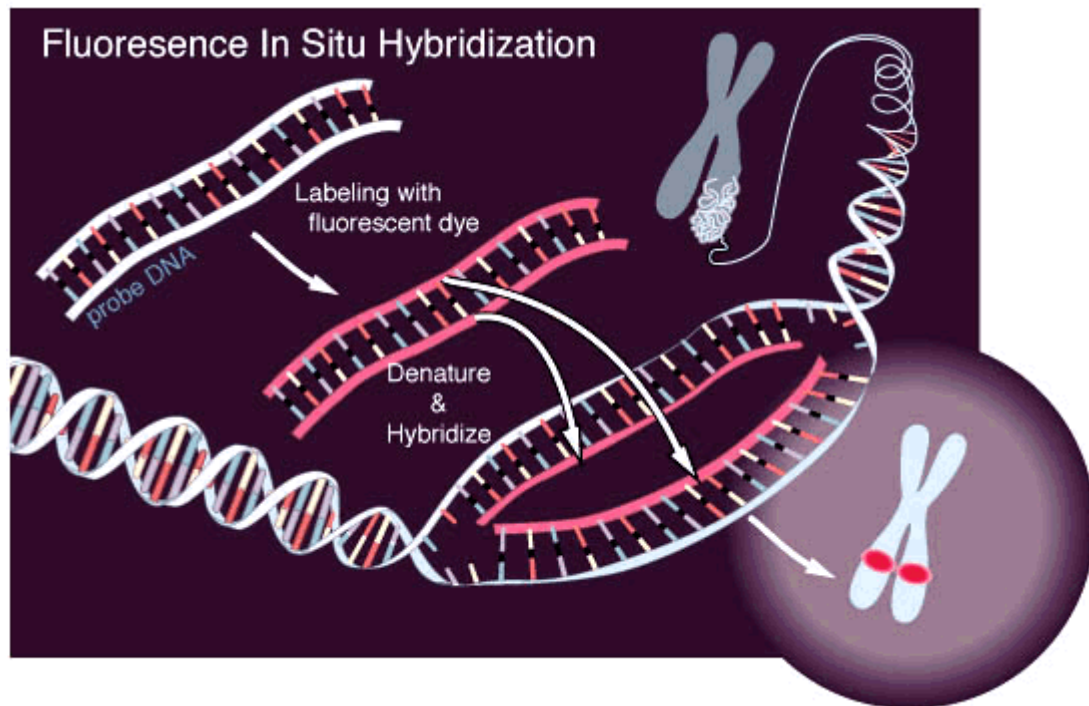


Abbildung 3-1-1 Schematische Darstellung von Denaturierung und Hybridisierung bei der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung: 1. Denaturierung: Aufspaltung der Fluoreszenzmarkierten Proben-DNA und der genomischen DNA in Einzelstränge 2. Hybridisierung: Anlagerung der Proben-DNA an die genomische DNA (Leja D, 1998; NHGRI-Homepage)

3.2.2.1.2 Stringenzwaschung

Unter Stringenz versteht man den Prozentsatz korrekt gepaarter Nukleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz. Somit stellt die Stringenz ein Maß für die Präzision der Hybridisierung dar. Nach der Hybridisierung werden Waschungen des Objektträgers vorgenommen, wobei nun die Bedingungen stringenter gewählt werden, um nur ähnliche und dadurch falsch oder nur partiell gebundene DNA-Moleküle zu entfernen. Um derartige unerwünschte Ereignisse zu vermindern, werden eine höhere Temperatur und eine niedrigere Kationenkonzentration gewählt. So stoßen sich anionische DNA-Phosphatgruppen gegenseitig ab und nicht spezifisch gepaarte Hybride werden getrennt.

3.2.2.1.3 Detektion

In einem letzten Schritt werden die Sonden, die mit Reportermolekülen gekennzeichnet sind, mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Direkt markierte Sonden sind unmittelbar mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z. B. Cy3, Rhodamin oder FITC, konjugiert und bedürfen daher keiner gesonderten Detektion. Sie können ohne Zwischenschaltung eines weiteren Detektionsschritts im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Eine Amplifikation des Signals ist hier nicht möglich (Swiger R.R., 1996).

Indirekt markierte Sonden (z.B. Biotin, Digoxin) müssen hingegen nach der Hybridisierung mit einem Fluorochrom, z.B. Streptavidin-FITC, detektiert werden. Eine Amplifikation des Signals kann beispielsweise durch Zwischenschalten eines biotinylierten anti-Streptavidin-Antikörpers und einer erneuten Streptavidin-FITC-Detektion erfolgen.

3.2.2.2 Material

Als Material für die FISH-Untersuchung dienten 7 in Paraffin eingebettete Angiofibrome, die sich alle von ihrer ursprünglichen Lokalisation in der hinteren Nasenhöhle in die Fossa pterygopalatina ausgedehnt hatten. Die A. sphenopalatina war in allen Fällen das Hauptversorgungsgefäß. Die klinische Diagnose wurde, wie in 3.1.1 beschrieben, durch immunhistochemische Untersuchungen bestätigt. Es wurden 7 Tumore ausgewählt, die bei Vorversuchen zu den korrekten Gewebeverweilzeiten, d.h. Freilegung der Chromosomen ohne Zerstörung der DNA, und bei Hybridisierungen mit anderen Sonden auswertbare Ergebnisse geliefert hatten. Als Kontrollgewebe für die Anhaftung der Sonden und zur Bestimmung des cut-offs wurden in der Metaphase befindliche Lymphozytenpräparate verwendet.

3.2.2.3 FISH an Angiofibromgewebeschnitten

3.2.2.3.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die 3-4 µm dicken Präparate wurden auf silanisierte Objektträger aufgezogen und als erster Schritt der Entparaffinierung über Nacht bei 65°C im Wärmeschrank behandelt. Im Anschluss fand die endgültige Deparaffinierung in Xylol (2x 10 Minuten) statt.

Zur Rehydrierung des Gewebes wurden die Objektträger je 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe behandelt (96%, 80%, 70%, 50%) und dann 30 Minuten auf einer 50°C warmen Heizplatte getrocknet. Eine Fixierung der Lymphozyten wurde durch 10 minütige Behandlung mit 4% PFA/1xPBS erreicht, was die Chromosomen stabilisiert und einem chromosomalen DNA-Verlust durch die Denaturierung (Raap A.K., 1986) vorbeugt. Es folgte eine 5 minütiger Waschschrift mit 1xPBS (pH=7,0).

Um die Zellkerne der Angiofibrome mit der darin befindlichen DNA freizulegen und somit für die Sonden zugänglich zu machen, wurde das Angiofibromgewebe mit Proteinasen aus einem Gewebeverdau-Kit (Appligene Oncor, France) angedaut. Zu diesem Zweck wurden die Angiofibrome mit einem Pretreatment-Puffer vorbehandelt, kurz mit 2xSSC (pH=7,0) abgespült und schließlich mit „Protein-Digesting-Enzyme“ (Appligene Oncor, France) verdaut. Nachdem dieses Produkt nicht mehr nachgeliefert werden konnte, wurde für diesen Schritt Proteinase K von der Firma Qbiogene (Deutschland) verwendet. Sowohl die Zeiten für die Vorbehandlung als auch die Verdauezeiten für die einzelnen Angiofibrome waren sehr unterschiedlich und mussten für jeden Tumor einzeln ausgetestet werden. Die endgültigen Zeiten, mit denen die besten Ergebnisse erzielt wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tab.3-2: Verdauzeiten der Angiofibromgewebe

Fallnummern der Tumorproben	Pretreatment	Proteinase-K=PDE
030	3,5 min	3,5 min
031	6 min	6 min
046/2	8 min	7 min
066	5 min	4 min
073	1 min	2 min
074	12 min	12 min
089/2	5,5 min	5,5 min

Durch Auflösen von 12 g des Pretreatment-Pulvers in 40 ml 2xSSC (pH=7,0) wurde eine 30%-ige Lösung hergestellt. Die Proteinase K-Lösung zum eigentlichen Gewebeverdau wurde hergestellt, indem 400 µl der Proteinase K-Stammlösung (Konzentration 25mg/ml 2xSSC) in 40 ml 2xSSC (pH=7,4) aufgenommen wurden. Um die volle Aktivität des Enzyms zu gewährleisten, musste das Vermischen der beiden Inhaltstoffe direkt vor der Benutzung stattfinden.

Alle Gewebeverdauschritte wurden in einer Küvette bei 45°C im Wasserbad durchgeführt. Das Verdauenzym wurde anschließend durch zweimaliges fünfminütiges Spülen mit 2xSSC (pH=7,0) und 30 Minuten Inkubation bei 70°C, ebenfalls in 2xSSC (pH=7,0), entfernt. Danach wurden die Objektträger jeweils zwei Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und über Nacht luftgetrocknet.

3.2.2.3.2 Denaturierung und Hybridisierung

Zunächst wurden pro Objektträger 10 µl Hybridisierungsmix hergestellt, welcher sich zusammensetzte aus 5 µl 50%-igem Formamid, 1 µl H₂O_{dd}, 1 µl 20xSSC (pH=7,0), 0,5 µl ssss-DNA, 1 µl zentromerspezifischer X-Chromosomen-Sonde (DXZ1, Appligene Oncor, France) oder 1,5 µl lokusspezifischer Androgenrezeptor-Sonde (#30-190040, Vysis, USA). Letztere war mit Digoxigenin konjugiert, welches direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin markiert war und so direkt detektiert werden konnte, während die X-Chromosomen-Sonde mit nicht-fluoreszierendem Biotin konjugiert war und daher indirekt markiert war.

Der Hybridisierungsmix wurde fünf Minuten bei 73 °C im Wasserbad denaturiert, um die DNA-Doppelstränge für die Hybridisierung in Einzelstränge aufzutrennen. Aus dem gleichen Grund wurden die Gewebeschnitte eine halbe Stunde lang bei 80 °C auf einer Heizplatte denaturiert. Nach der Hitzebehandlung kamen sowohl der Hybridisierungsmix als auch die Objektträger sofort auf Eis, um eine Rehybridisierung der nun als Einzelstränge vorliegenden DNA zu verhindern.

Dann wurden je 10 µl Hybridisierungsmix auf das Hybridisierungsfeld aufpipettiert, mit einem Deckgläschen bedeckt und mit Fixogum abgedichtet. Sobald das Fixogum getrocknet war, kamen die Objektträger direkt vom Eis in einer feuchten Kammer in ein 80 °C heißes Wasserbad, wo die auf dem Schnitt aufgebrauchten Sonden erneut für 90 Minuten denaturiert wurden.

Zur Hybridisierung wurden die Objektträger bei den anfänglichen Versuchen über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Bessere Ergebnisse im Sinne einer stärkeren Farbintensität wurden allerdings später durch längere Inkubationszeiten erreicht. Sonden und Gewebeschnitte wurden bei 37 °C 48 h lang inkubiert.

3.2.2.3.3 Stringenzwaschung und Detektion

Nach zwei Tagen wurde das Fixogum mit einer Pinzette abgezupft. Die Objektträger wurden in 2xSSC (pH=7,0) gewaschen, um so die Deckgläschen vorsichtig zu entfernen. Dieser und alle nachfolgenden Waschschrirte wurden unter ständigem Schütteln und im Dunkeln durchgeführt, da die direkt markierten Sonden bzw. Fluoreszenzfarbstoffe, die der Sichtbarmachung der indirekt markierten Sonden dienen, lichtempfindlich sind.

Als nächster Schritt folgte eine Stringenzwaschung bei 42°C, bei der die Objektträger nacheinander für je 10 Minuten in drei Bäder mit 2xSSC (pH=7,0) und drei Küvetten mit 50% Formamid (pH=7,0) eingestellt wurden. Darauf folgte bei Raumtemperatur ein zehnminütiges Bad in 4xSSC (pH=7,0). Um eine unspezifische Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen zu minimieren, wurden die schon hybridisierten Schnitte nun mit 5% BSA/4xSSC geblockt. Auf jeden Objektträger wurden 100 µl Blocking-Reagenz aufpipetiert und mit einem Deckgläschen bedeckt und daraufhin bei 37°C in einer feuchten Kammer 15 Minuten inkubiert. Durch dieses Verfahren wurden die Hintergrundsignale reduziert.

Die Detektion der mit Biotin konjugierten X-Chromosom-Sonde erfolgte mit Streptavidin-FITC (Vector Laboratories, USA), das mit 5% BSA/4xSSC (pH=7,0) 1:100 verdünnt wurde. Pro Objektträger wurden 100 µl dieser Lösung aufgetragen, mit einem DG bedeckt und in einer feuchten Kammer bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Das Streptavidin-FITC wurde durch zwei 5 minütige Bäder in 4xSSC/0,1% Triton (pH=7,0) wieder abgewaschen. Dann wurde Triton zugesetzt, um die Oberflächenspannung herabzusetzen. Im nächsten Schritt wurde durch Auftragen eines biotinylierten Anti-Streptavidin Antikörpers (BA-0500, Linaris), der gleichfalls mit 5% BSA/4xSSC (pH=7,0) 1:100 verdünnt war, eine Amplifikation der an Biotin gebundenen X-Chromosom-Sonde erreicht. Wiederum wurden die Schnitte mit 100 µl pro Objektträger betropft, mit einem DG abgedeckt, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach 2x5 Minuten in 4xSSC/0,1% Triton (pH=7,0) gewaschen. Die X-Chromosom-Sonde wurde, wie schon im ersten Detektionsschritt, mit Streptavidin-FITC detektiert, welches in

gleicher Menge mittels DG aufgetragen und 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert wurde.

Nach erneutem Waschen in 4xSSC/0,1%Triton (pH=7,0) für 2x5 Minuten wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Zu diesem Zweck wurden sie je 2 Minuten mit 50%-igem, 70%-igem, 80%-igem und 96%-igem Alkohol behandelt und im Anschluss luftgetrocknet. Schließlich wurden die OT's mit DAPI-Antifade (0,1 µl/ml, Vectashield, Vector Laboratories, USA) betropft und mit einem DG bedeckt. Die Aufbewahrung erfolgte im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

3.2.2.4 FISH an Lymphozytenpräparaten

3.2.2.4.1 Chromosomenpräparation

Metaphase-Präparate aus peripherem Blut gesunder, männlicher Probanden wurden vom Institut für Humangenetik in Homburg zur Verfügung gestellt. Die Chromosomenpräparation wurde nach dem modifizierten Protokoll des humangenetischen Instituts/ Homburg durchgeführt. Dieses beinhaltet folgendes Vorgehen.

Zunächst werden 0,075 M KCl sowie Colcemid (Roche, Mannheim, Deutschland) bereitgestellt. Phythämagglutinin wird gelöst und aliquotiert. Anschließend wird vorbereitend das Medium hergestellt, bestehend aus 500 ml DMEM (Gibco, Scotland, UK), 5 ml Penicillin/ Streptomycin (10 000 U/ml), 5 ml 200 mM L-Glutamin (Gibco, Scotland, UK), sowie 50 ml FCS (Biochrom KG).

Nach Abschluss der Vorbereitungen wurde in einer Kulturflasche eine Blutkultur angelegt. Zu diesem Zweck wurden 8 ml des Mediums zusammen mit 400 µl Phythämagglutinin und 800 µl heparinisierten Vollbluts in die Kulturflasche pipetiert und über 69 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach exakt 69 Stunden wird 200 µl Colcemid hinzugegeben, um den Zellzyklus der Lymphozyten in der Metaphase zu stoppen. Anschließend wird die Kultur bei 37°C über 2 Stunden inkubiert.

Daraufhin wird die Blutkultur mit einer Pasteurpipette resuspendiert, in ein Spitzröhrchen mit Deckel überführt und bei 800 U/min bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert, um die Lymphozytenfraktion zu sedimentieren. Mit einer Pasteurpipette und einer Wasserstrahlpumpe wird der Überstand vorsichtig abgesaugt.

Um die Chromosomen freizulegen, wurden mit einer zweiten Pasteurpipette je nach Größe bis zu 8 ml einer auf 37°C erwärmten 0,075 M KCl-Lösung auf das Pellet aufgetropft und resuspendiert. Nach einer Zeit von 6-9 Minuten (abhängig von der Luftfeuchtigkeit) wurde das Röhrchen bei 800 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand nochmals mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

3.2.2.4.2 Fixierung der Chromosomen

Zur Fixierung der Chromosomen wurden 5 Tropfen eines Fixans, bestehend aus Methanol und Eisessig (-20°C) im Verhältnis 3 zu 1 auf das Zellpellet gegeben und gut gemischt. Dann wurden zuerst zweimal 2 ml, dann 4 ml Fixans zugegeben und resuspendiert.

Daraufhin wurde das Pellet bei -20°C 60 Minuten inkubiert und im Anschluss 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und es wurden wiederum zweimal 2 ml und einmal 4 ml Fixans aufgetropft, resuspendiert und für 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Der gesamte Arbeitsschritt wurde zweimal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet je nach Größe in Fixans aufgenommen.

3.2.2.4.3 Vorbereitung der Lymphozytenpräparate

Um eine Verbesserung der Hybridisierung zu erreichen, wurden die Lymphozytenpräparate einer Vorbehandlung unterzogen. Um die unspezifische Hybridisierung an RNA-Fragmenten zu verhindern, wurde das Präparat bei 37°C 20 Minuten mit RNAse (Stammlösung =10 mg/ml) inkubiert, die mit 2xSSC (pH=7,0) 1:100 verdünnt worden war. Darauf folgte ein Waschschrift

(3x5 Minuten) mit 2xSSC (pH=7,0) bei Raumtemperatur. Um das Hybridisierungsergebnis zu verbessern, wurden die Lymphozyten einem Pepsin-Verdau (1x3 Minuten) unterzogen, wobei 50 µl 10%-iges Pepsin mit 100 ml 0,01 N HCl verdünnt wurde. Diese Behandlung befreit die Lymphozyten von Protein- und Geweberesten und macht sie für die Hybridisierung zugänglicher. Im Anschluss wurden die Präparate bei RT 5 Minuten in 1xPBS (pH=7,0) gestellt. Fixiert wurden die Lymphozyten durch eine 10 minütige Behandlung mit 4% PFA/1xPBS. Schließlich wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-ig, 80%-ig, 96%-ig) für je 2 Minuten dehydriert und über Nacht bei RT an einem staubfreien Ort luftgetrocknet.

3.2.2.4.4 Denaturierung und Hybridisierung

Am darauffolgenden Tag fand die Hybridisierung statt. Pro OT wurden 10 µl Hybridisierungsmix aufgetragen, der mit einem DG abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet wurde. Der Hybridisierungsmix besaß die gleiche Zusammensetzung wie für die Angiofibromgewebeschnitte (siehe Kapitel. 3.2.2.3.2). Denaturiert wurden Sonden und Präparat gemeinsam, indem sie für 10 Minuten auf eine 80°C heiße Heizplatte aufgestellt wurden. Die Hybridisierung fand zusammen mit den Angiofibromgewebeschnitten über 2 Tage in einer feuchten Kammer bei 37°C statt. Die weitere Behandlung war identisch mit dem Protokoll für die Angiofibromgewebeschnitte (s. o.).

3.2.3 Bildaufnahme und Auswertung

Die Bildaufnahme und Auswertung sowohl der Immunhistologie als auch der FISH-Untersuchung wurden an einem Olympus BX51 bzw. BX61-Fluoreszenzmikroskop vorgenommen. Eine CCD-Videokamera (JAI CV-M300/Photometrics CH 250) diente gemeinsam mit dem ISIS digital image analysis system (Metasystems GmbH, Altlußheim, Deutschland) zur Dokumentation der einzelnen Untersuchungsbefunde. Bildgebendes Verfahren,

computergestützte Aufnahme, Bearbeitung und Auswertung sind sowohl bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als auch bei der Immunhistochemie eng miteinander verknüpft. Erster Schritt ist hierbei die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie. Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit Photonen einer bestimmten Wellenlänge. Die hierbei freiwerdende Energie wird teilweise wieder als Licht einer größeren Wellenlänge emittiert und somit sichtbar. Als primäre Lichtquelle dient eine Quecksilberdampfampe, mit 100 W, welche Licht von ultraviolett bis infrarot aussendet. Dieses Licht wird durch einen entsprechenden Anregungsfilter im Mikroskop über das Objektiv auf das Präparat fokussiert. Der Filter wird so gewählt, dass die geeignete Wellenlänge den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff anregt. Hierbei wurden Schmalbandfilter benutzt, bei welchen jeweils nur Licht eines schmalen, definierten Spektrumausschnittes passiert. Dieses Anregungslicht wird im Folgenden im Winkel von 45° über einen dichromatischen Teilerspiegel, der kurzwelliges Licht reflektiert, auf das Präparat gelenkt. Der Teilerspiegel lässt das längerwellige, emittierte Fluoreszenzlicht auf dem Rückweg passieren und auf den sogenannten Langwellen-Sperrfilter treffen, welcher nur für Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchlässig ist. Das auf diesem Weg detektierte Lichtsignal kann nun über das Okular betrachtet, mit einer Kamera fotografiert oder über eine CCD-Kamera digital visualisiert und gespeichert werden. Bei dem benutzten Olympus BX51 bzw. BX61 Mikroskop (Objektiv: Plan Apo 60x; 1,40 Oil) sind die entsprechenden Filterkombinationen (Olympus Optical) für die benutzten Fluorochrome über ein Wechselrad integriert. So ließen sie sich schnell und genau auf das jeweils zu detektierende Fluorochrom anpassen. Da diese Filter genau justiert waren, entfiel eine spätere Verschiebekorrektur der Aufnahmen.

Tab.4-0-1: Fluorochrome mit den zugehörigen Detektionsfiltersets

FARBSTOFF	ANREGUNG	ANREGUNGSFILTER	TEILERSPIEGEL	SPERRFILTER	FARBE
DAPI	ultraviolett	BP 360-370	DM 400	BA 420	blau
FITC	violett	BP 460-490	DM 505	BA 515-550	grün

Rhodamin	grün	BP 520-550	DM 565	BA 580 IF	rot
----------	------	------------	--------	-----------	-----

3.2.3.1 Bildaufnahmen

Von jedem zu untersuchenden Lymphozytenpräparat wurden Metaphasen ausgesucht, bei denen die Chromosomen gut gespreitet und möglichst ohne Überlagerungen waren. Auch bei den Angiofibrompräparaten wurden möglichst Gewebeabschnitte gewählt, in denen die Kerne gut abgrenzbar waren. Diese wurden dann bei entsprechender Vergrößerung (Objektiv: Plan Apo 60x; 1,40 Oil) mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Es wurde hierfür pro untersuchtem Gewebeabschnitt jede Fluoreszenzmarkierung separat als monochromes Graustufenbild kodiert. Somit waren jedem untersuchten Gewebeabschnitt bzw. jeder Metaphase drei Bilder zugehörig. Die Software erlaubt eine für jedes Bild individuelle Integrationszeit. Sie ordnet der Lichtintensität die Funktion der Lichtmenge zu und bildet das Integral dieser Funktion, welches graphisch dargestellt wird. Anhand dieses Integrals kann die richtige Belichtungszeit beurteilt und gegebenenfalls so geändert werden, dass die Aufnahme optimal belichtet wird. Die CCD-Kamera ist mit einem Computer verbunden, in welchem die Bilder in dem Softwareprogramm ISIS (Version 2.5) abgespeichert werden.

3.2.3.2 Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen

Die Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen wurde an einem Olympus BX51-Fluoreszenzmikroskop vorgenommen. Eine CCD-Kamera (Photometrics CH 250) diente gemeinsam mit dem ISIS digital image system (Metasystems GmbH, Altlußheim, Deutschland) zur Dokumentation der einzelnen Untersuchungsbefunde.

3.2.3.3 Auswertung der FISH-Untersuchung

Entsprechend den Kriterien von Hopman und Mitarbeitern (Hopman A.H.N., 1988) wurden nur gut abgrenzbare Kerne mit gut definierten Kernsignalen für die Auswertung herangezogen. Helle und kräftige, distinkte Signale wurden als positiv gewertet, während Hybridisierungssignale mit geringerer Intensität im Vergleich zu den optimalen Kontrollsignalen der Lymphozytenpräparate und solche mit irregulärer, unklarer Fluoreszenzanfärbung verworfen wurden. In jedem Fall wurde eine Gesamtheit von 200 Kernen ausgewertet.

Anhand der Lymphozytenfärbung wurde der Cut-off bestimmt, der für die X-Chromosomen-Sonde 2% und für die Androgenrezeptorsonde 3% betrug. D. h. wenn mehr als 2% der ausgezählten Kerne Monosomien oder Trisomien/Polysomien für das X-Chromosom aufwiesen, wurde die Probe als aneuploid klassifiziert. Die Hybridisierungsergebnisse für das Androgenrezeptor-Gen wurden mit der Anzahl der X-Chromosomen-Signale verglichen, um zwischen vermehrten AR-Gen Signalen aufgrund von numerischen X-Chromosomen-Gewinnen und AR-Gen-Gewinnen zu unterscheiden.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der immunhistologische Untersuchungen

4.1.1 Kontrollgewebe

Die bedeckende regulär differenzierte Nasenschleimhaut sowie Tonsillen- und Larynxkarzinompräparate dienten als Kontrollgewebe. In der Nasenschleimhaut zeigten die untersuchten Cadherine und Catenine in Übereinstimmung mit ihrer Funktion als Zelladhäsionsmoleküle und wie in der Literatur vorbeschrieben (Pannone G, 1998) eine Expression entlang der Zellmembranen, während die Kerne der Epithelzellen ausgespart blieben. Beispielhaft ist dies in Abbildung 4-1 die E-Cadherin Expression und in Abbildung 4-2 die beobachtete γ -Catenin Expression dargestellt.

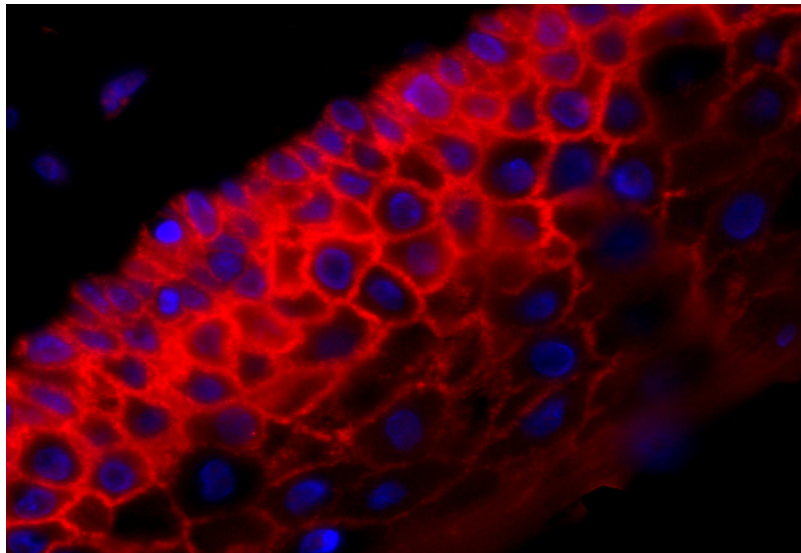


Abb. 4-1: E-Cadherin-Expression (rot) in der Nasenschleimhaut; Expression entlang der Zellmembranen; Kernfärbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x.

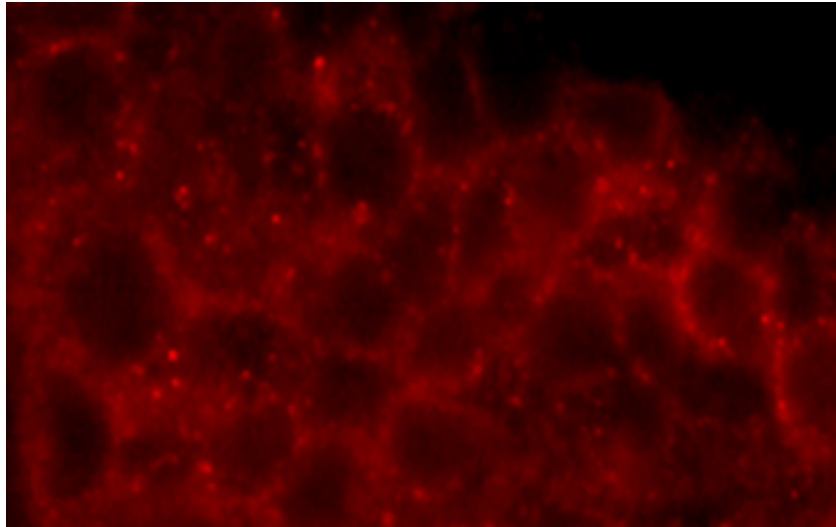


Abb. 4-2: γ -Catenin-Expression (rot) in der normal differenzierten Mukosa entlang der Zellmembranen, Zellkerne und Zytoplasma sind weitgehend signalfrei; Vergrößerung: 60x.

Die Expression der Adhäsionsproteine war in den Larynxkarzinomen wesentlich schwächer ausgeprägt als in der gesunden Mukosa. Die Lokalisation beschränkte sich im Wesentlichen auf die Zellmembranen, Zellkerne und Zytoplasma blieben weitgehend signalfrei (siehe Abbildung 4-3). Auch im Kontrollgewebe der Tonsille wurden die Cadherin/Catenin-Proteine gemäß ihrer Funktion als Adhäsionsproteine entlang der Zellmembranen exprimiert, wie in Abbildung 4-4 am Beispiel des β -Catenins gezeigt wird.

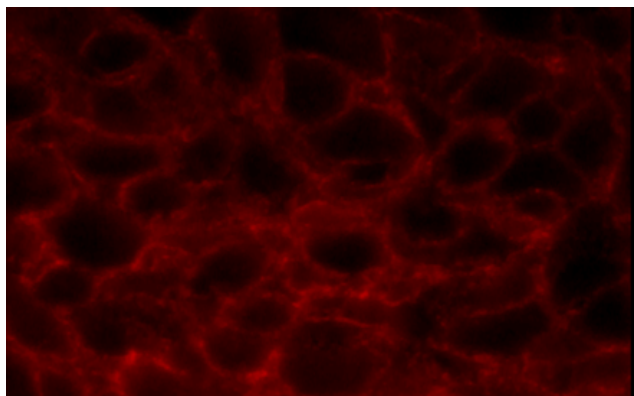


Abb. 4-3: N-Cadherin Expression im Larynxkarzinom; Vergrößerung: 60x.

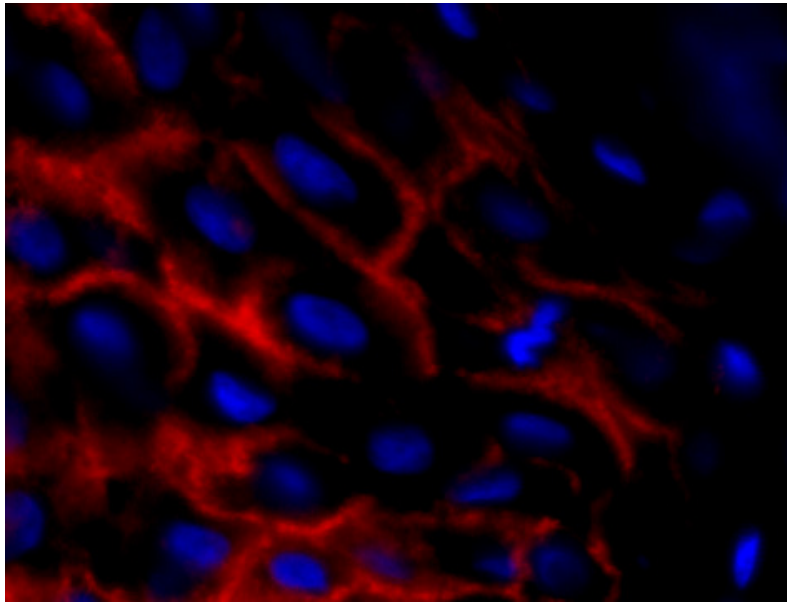


Abb. 4-4: β -Catenin-Expression (rot) entlang der Zellmembranen im Kontrollgewebe Tonsille; Kernfärbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x.

4.1.2 Die Cadherin/Catenin-Proteine im Angiofibrom

4.1.2.1 Die β -Catenin-Expression

Aus der Gruppe der untersuchten Cadherine und Catenine ragte im Bereich des Angiofibromgewebes das β -Catenin aufgrund seiner starken Expression eindeutig hervor. Die Signale waren in 66-100% aller Zellen pro untersuchtem Schnitt zu erkennen. Übereinstimmend mit den Beobachtungen von Abraham und Mitarbeitern zeigten sich die β -Catenin-Expressionen in den Zellkernen der Bindegewebszellen (Abbildung 4-5) auch in dieser Untersuchungsserie.

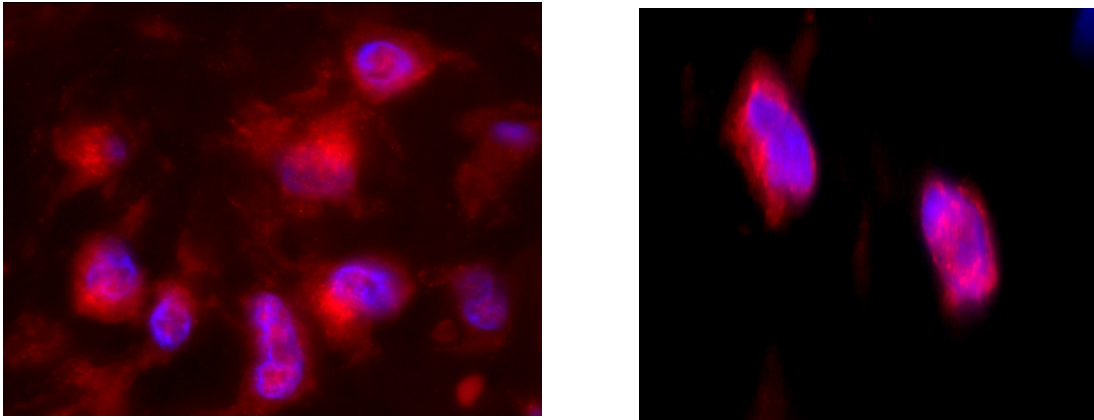


Abb. 4-5: β -Catenin-Expression (rot) in Bindegewebszellkernen; Kernfärbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x

Die β -Catenin Expression war aber nicht auf den Zellkern der Bindegewebszellen beschränkt. Auch im Zytoplasma der untersuchten Fibroblasten war nach Anwendung der immunhistochemischen Färbemethoden eine starke Proteinexpression zu erkennen (Abbildung 4-6).

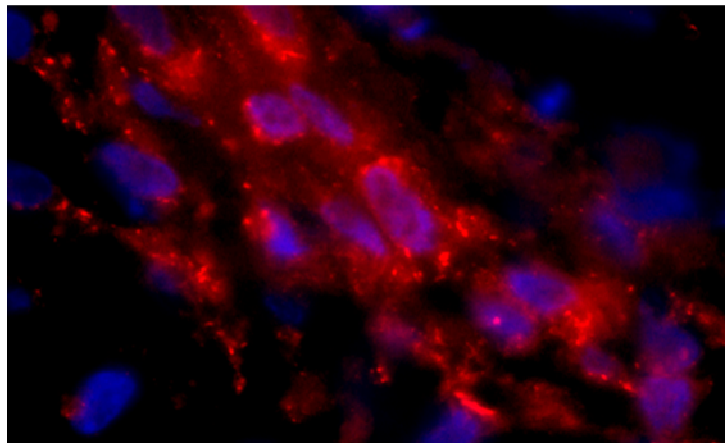


Abb.4-6: ausgeprägte β -Catenin-Expression (rot) im Zytoplasma der Fibroblasten; Kern-färbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x.

Die Bindegewebszellen in allen 13 Angiofibromen wiesen eine starke β -Catenin-Expression auf. Außerdem war auch bei 10 der 13 untersuchten Angiofibrome eine β -Catenin-Expression in den Endothelzellen der Gefäßspalten zu erkennen, die sowohl im Bereich des Zytoplasmas als auch der Zellkerne vorlag (Abbildung 4-7).

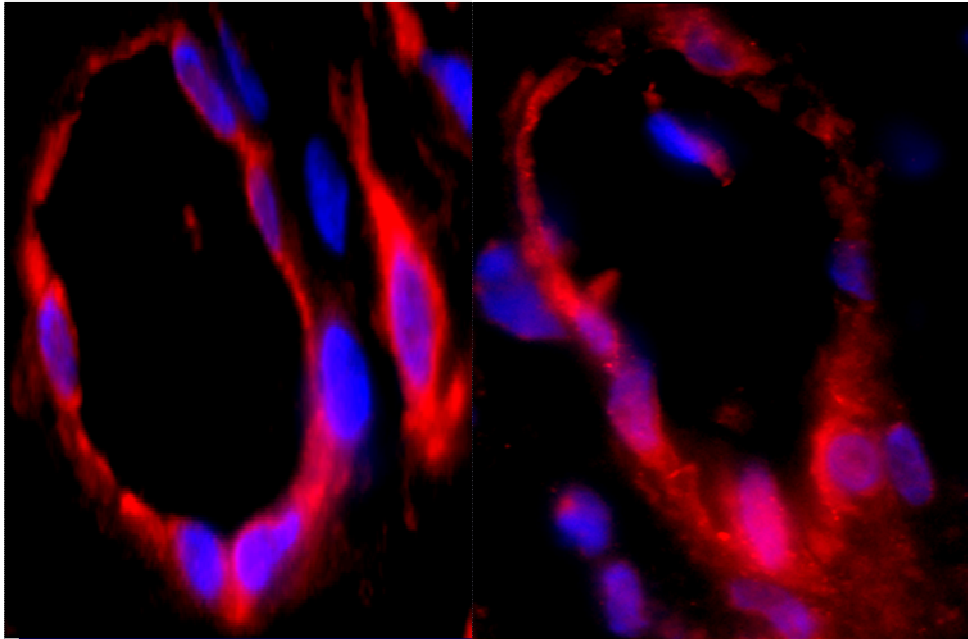


Abb.4-7: β -Catenin-Expression (rot) in Zytoplasma und Zellkernen von Endothelzellen; Kernfärbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x.

Die Verteilungsmuster und die Ausprägung der β -Catenin-Signale in den einzelnen Tumoren ist in Tabelle 4-1 dargestellt.

Tabelle 4-1: Übersicht über die β -Catenin-Expression in Gefäß- und Bindegewebszellen von 13 Angiofibromen

Angiofibrome	B- Catenin Vorkommen	
	Gefäße	Bindegewebe
30	(+)	+
66	++	++
74	++	++
31	++	++
46	++	++
29	+	+
93	(+)	++
F8182	-	++
F2316	(+)	++
F4996	(+)	++
F2811	(+)	++
F15867	-	++
F7344	++	+

- =keine Expression; (+) =schwache Expression; + =starke Expression; ++ =sehr starke Expression

4.1.2.2 Die γ -Catenin-Expression

γ -Catenin war in 7 der 13 untersuchten Angiofibrome sowohl im Bereich der Bindegewebszellen als auch in den Endothelzellen zu beobachten. Sowohl das Zytoplasma als auch der Zellkern wiesen jeweils γ -Catenin Signale auf (Abbildung 4-6). Die Intensität der Signale war im Vergleich zur β -Catenin Expression deutlich schwächer und nur in 33-66% der Zellen des jeweils untersuchten Gewebeschnitts nachweisbar.

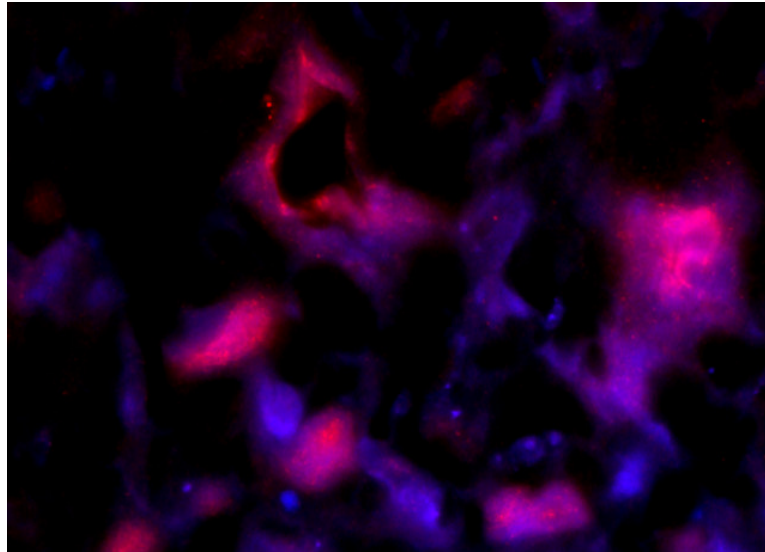


Abb.4-8: γ -Catenin-Expression (rot) in Zytoplasma und Zellkernen von Bindegewebs- und Endothelzellen; Kernfärbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x.

4.1.2.3 Die N-Cadherin-Expression

N-Cadherin war in Form charakteristischer punktförmiger nukleärer Signale in etwa einem Drittel der Bindegewebszellen bei 8 der 13 untersuchten Angiofibrome zu erkennen (Abbildung 4-9). Endothelzellen zeigten keine N-Cadherin-Expression in der vorliegenden Studie.

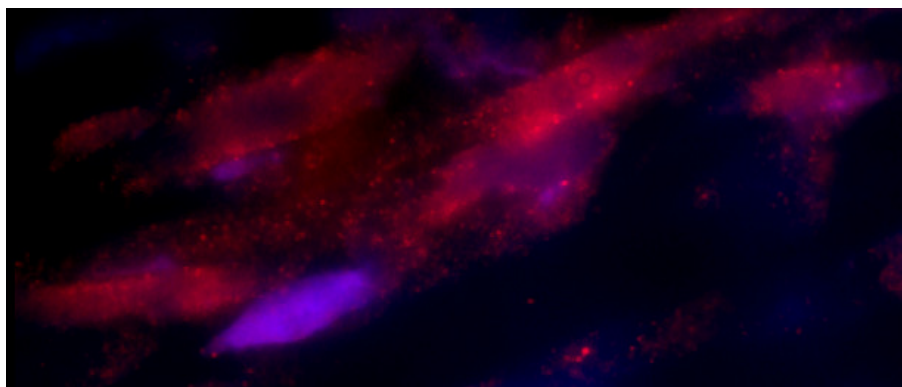


Abb.4-9: N-Cadherin-Expression (rot) in Fibroblasten; Kernfärbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x.

4.1.2.4 Die E-Cadherin- und α -Catenin-Expression

E-Cadherin war nur vereinzelt in Form eines schwachen Signals bei 3 von 13 Angiofibromen in weniger als 10% der Bindegewebs- und Endothelzellen zu erkennen. E-Cadherin ist als Adhäsionsprotein mit Tumorsuppressorfunktion in fast allen Epithelien des Körpers nachweisbar. In Bindegewebs- und Endothelzellen ist es nicht beschrieben. Daher kann das Ergebnis der immunhistologischen Untersuchung als physiologisch gewertet werden. Auch eine α -Catenin-Expression wurde in den untersuchten Angiofibromen nur bei vereinzelt Zellen beobachtet. Alle immunhistologischen Ergebnisse sind in Tabelle 4-2 nochmals zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Zusammenfassung: Expression der Cadherin/Catenin Proteinfamilie in 13 Angiofibromen (BGW=Bindegewebe)

	β-Catenin	γ-Catenin	α-Catenin	N-Cadherin	E-Cadherin
Gefäß	10/13	7/13	2/13	3/13	3/13
BGW	13/13	7/13	2/13	8/13	3/13

4.1.3 Der Androgenrezeptor im Angiofibrom

Die immunhistologischen Untersuchungen zur Expression des Androgenrezeptors in Angiofibromen wurden an einer Untersuchungsreihe von 4 Angiofibromen durchgeführt, die als Kryostatschnitte vorlagen. Sowohl in den Endothel- als auch in den Bindegewebszellen aller 4 untersuchten juvenilen Angiofibrome wurde eine Androgenrezeptorexpression beobachtet (Abbildung 4-10). Aufgrund der bereits bestehenden Literaturhinweise zur Androgen-

rezeptorproteinexpression im juvenilen Angiofibrom (Hwang H.C., 1998) wurden die Untersuchungen an dieser Stelle nicht weitergeführt, sondern als Bestätigung einer Androgenrezeptorproteinexpression im Angiofibrom gewertet.

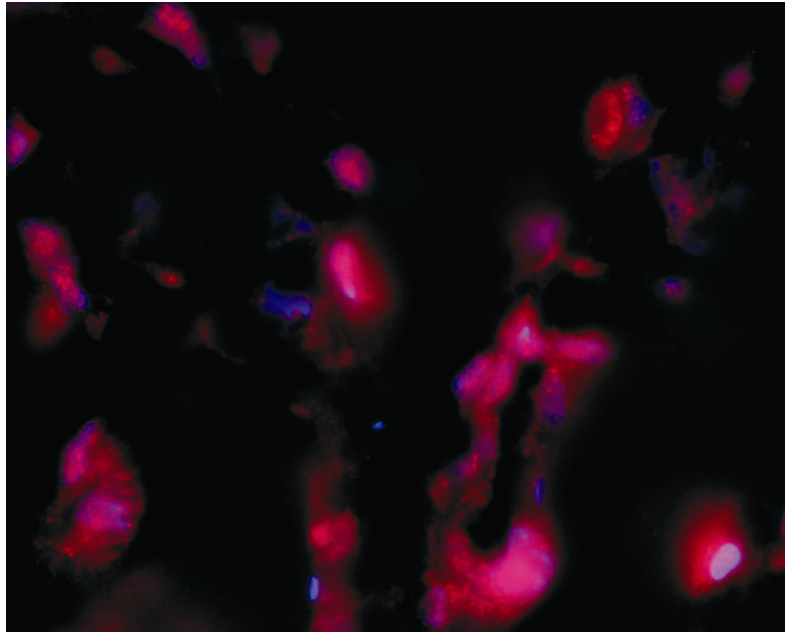


Abb. 4-10: Androgenrezeptor-Expression (rot) in Endothelzellen und dem Tumorstroma; Kernfärbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x.

4.2 Ergebnisse der FISH-Untersuchungen

Die FISH-Analyse des X-Chromosoms, die mittels einer zentromerspezifischen Sonde durchgeführt wurde, wurde kombiniert mit einer lokusspezifischen, gegen das Androgenrezeptor-Gen gerichteten Sonde.

Pro untersuchtem Gewebeschnitt wurden zur Auswertung 200 einzeln liegende Kerne herangezogen, die deutliche und klar identifizierbare Signale aufwiesen.

4.2.1 Das X-Chromosom

Die Untersuchungen wurden an 7 Angiofibromen durchgeführt. In 12-34% der Kerne (Mittelwert 25%) von 5 Angiofibromen wurden zwei X-Chromosomen detektiert (Abb. 4-11), was einen X-chromosomalen Gewinn bei den ausschließlich männlichen Patienten darstellt. In zwei Tumoren wurde kein signifikanter X-chromosomaler Gewinn gefunden: ein Fall zeigte in 5% der Kerne zwei X-Chromosomen, in dem anderen Fall konnte ein zweites X-Chromosom nur in 1% der untersuchten Kerne gefunden werden. Bei beiden Tumoren konnten jedoch hauptsächlich nur endotheliale Zellen in die Auswertung miteinbezogen werden, da die Bindegewebszellkerne, die in eine extensive kollagene Matrix eingelagert waren, nur vereinzelt gut definierte und auswertbare Signale lieferten. Trotz mehrerer Versuche mit unterschiedlich langen Gewebeverdauerzeiten, gelang es nicht, die Bindegewebszellkerne durch Gewebeverdau so freizulegen, dass sie für die Sonden hinreichend zugänglich waren, ohne dass die Zellkerne dadurch ebenfalls zerstört wurden.

4.2.2 Das Androgenrezeptor-Gen

Signifikante Amplifikationen des Androgenrezeptor-Gens wurden nicht gefunden. In den meisten Zellkernen war das Signal des Androgenrezeptor-

Gens mit dem der zentromerspezifischen X-Chromosom-Sonde co-lokalisiert (Abb. 4-11). Entsprechend wurden in allen 5 Angiofibromen, die einen signifikanten X-chromosomalen Gewinn zeigten, ein Androgenrezeptor-Gengewinn in einer vergleichbaren Frequenz beobachtet. In 11,5-30% (Mittelwert 23,8%) der ausgewerteten Kerne wurden zwei AR-Gen Signale detektiert. In keinem der untersuchten juvenilen Angiofibrome wurde ein signifikanter X-chromosomaler Verlust oder ein Verlust des Androgenrezeptor-Gens beobachtet. X-Chromosomen-Gewinne und AR-Gengewinne sind in Tabelle 4-3 dargestellt.

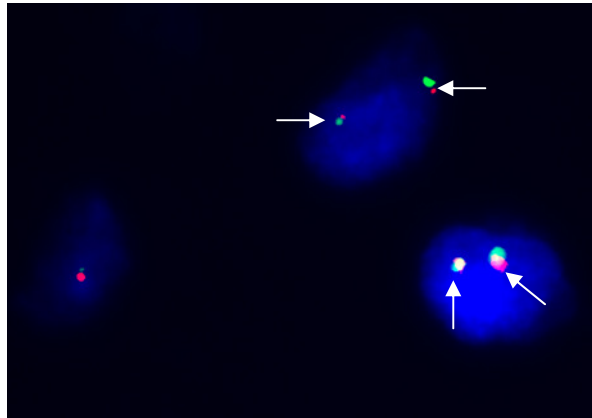


Abb.4-11: gemeinsame Darstellung von AR-Gen-Signalen (rot) und X-Chromosom-Signalen (grün); es besteht eine co-Lokalisation von AR-Gen und X-Chromosom; Kernfärbung mit DAPI (blau); Vergrößerung: 60x

Tab.4-3: X-chromosomale Gewinne in 7 juvenilen Angiofibromen; Auswertung von je 200 Kernen

Tumor	029	030	031	046	066	074	89
0 X-Chromosom Signale	–	–	–	–	–	–	–
1 X-Chromosom Signal	99%	87%	95%	70,5%	66%	66,5%	84%
2 X-Chromosom Signale	1%	12%	5%	29,5%	34%	33,5%	16%
>2 X-Chromosom Signale	–	1%	–	–	–	–	–

Tab.4-4: AR-Gen Gewinne in 7 juvenilen Angiofibromen

Tumor	029	030	031	046	066	074	089
0 AR-Gen Signale	5%	–	7%	5%	2%	5,5%	–
1 AR-Gen Signal	90%	88,5%	90,5	65%	68%	67%	80%
2 AR-Gen Signale	5%	11,5%	2,5	30%	30%	27,5%	20%
>2 AR-Gen Signale	–	–	–	–	–	–	–

5 Diskussion

5.1 β -Catenin: Zentrale Rolle in Tumorgenese und Zelladhäsion

Das juvenile Angiofibrom ist ein Tumor, dessen Pathogenese und Ätiologie schon seit mehr als 150 Jahren (Nelaton M., 1853) Gegenstand vielfältiger Überlegungen sind. Das Ursprungsgewebe dieser gefäß- und bindegewebsreichen Neoplasie ist ebenso wenig geklärt wie der molekulare Mechanismus ihrer Entstehung. Deshalb wurde die Beobachtung einer hohen Expression des Onkogen-Produkts β -Catenin auf dem Boden einer Mutation in diesem Tumor als wegweisend betrachtet (Abraham S.C., 2001).

Hohe β -Catenin-Konzentrationen wurden in einer Vielzahl maligner Tumoren gefunden, u. a. in Melanomen, Kolonkarzinomen, Mammakarzinomen, Prostatakarzinomen, anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs (Hajra K.M., 2002; Henderson B.R., 2002). Die β -Catenin-Bedeutung erstreckt sich jedoch nicht nur auf metastasierende maligne Neoplasien, sondern wurde auch bei Desmoidtumoren beobachtet, die ähnlich dem juvenilen Angiofibrom ein lokal aggressives Wachstum von Mesenchymzellen ohne Metastasierung aufweisen (Tejpar S., 1999).

β -Catenin übernimmt in der eukaryontischen Zelle verschiedene entscheidende und voneinander unabhängige Funktionen und kommt in mindestens zwei verschiedenen Pools innerhalb der Zelle vor. Schon seit den 80-er Jahren ist es als strukturelle Komponente der Zelladhäsionskomplexe bekannt (Ozawa M., 1989), deren Funktion darin besteht, einen Zusammenhalt zwischen den einzelnen Zellen eines Gewebes und eine Verbindung zwischen Zellmembran und Matrix herzustellen. Dabei verbindet β -Catenin das transmembranöse E-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett.

Etwas später erst wurde die zentrale Stellung des β -Catenin im Wnt/wingless Signalweg bekannt (Riggemann B., 1989 und 1990; Noordermeer J., 1992), in dessen Rahmen β -Catenin an Transkriptionsprozessen und letztlich an der

Entstehung der verschiedenen Tumoren beteiligt ist. Wie diese zwei unabhängigen Pools reguliert werden und wie ein einziges Protein zwei so unterschiedliche Funktionen erfüllt ist noch nicht gänzlich geklärt. Unter in vitro Bedingungen wurde beobachtet, dass bei Überexpression von Cadherinen eine Downregulation der β -Catenin-vermittelten Transkription stattfindet (Fagotto F., 1996), umgekehrt führte die verminderte Expression von Cadherinen zu einer verstärkten Aktivität des β -Catenin-Signalwegs (Gottardi C.J., 2004). Es wurde vermutet, dass Cadherine als kompetitive Inhibitoren der β -Catenin-Tcf-Komplexbildung und damit der β -Catenin-induzierten Transkription wirken (Gottardi C.J., 2001). In vivo hingegen verhalten sich die beiden Pools weitgehend unabhängig voneinander (Caca K., 1999), ein Wnt-Signal führt also nicht zwangsläufig zu einer Veränderung des Adhäsionsverhaltens. Neuere Studien geben Anlass zu der Annahme, dass die unterschiedlichen Funktionen des Onkogenprodukts über Konformationsänderungen reguliert werden, die wiederum Änderungen in der Bindungsselektivität des β -Catenins verursachen. Gottardi und Mitarbeiter unterscheiden zwei verschiedene Konformationen und sprechen von einer offenen und einer geschlossenen Form. Die offene Form kann Komplexe sowohl mit Cadherinen als auch mit Tcf bilden. Durch Wnt-Signale wird die Bildung einer geschlossenen β -Catenin-Form induziert. Deren C-terminale Region interagiert mit der eigenen Armadillo Region, verhindert dadurch eine Bindung an Cadherine und ist somit Tcf-selektiv (Gottardi C.J., 2004). Wie sich die Konformation und das Bindungsverhalten des β -Catenins im Falle einer Mutation verändern, bleibt zu untersuchen.

Die in der vorliegenden Studie beobachtete häufig fehlende Expression der Adhäsionsproteine α -Catenin und E-Cadherin im Angiofibrom zeigt, dass eine Downregulation des β -Catenins durch diese Proteine nicht zu erwarten ist. Im juvenilen Angiofibrom stehen α -Catenin und E-Cadherin dem β -Catenin als Bindungspartner nicht in nennenswertem Umfang zu Verfügung.

Die im Zusammenhang mit der Pathogenese des Angiofibroms wesentliche Funktion des β -Catenins ist seine Rolle als Transkriptionsfaktor. Außerhalb der Adhäsionskomplexe ist freies β -Catenin physiologischerweise nur in sehr

geringen Konzentrationen in Zytoplasma und Zellkern einer Zelle zu finden. Der größte Teil assoziiert sich im Zytoplasma relativ schnell mit dem APC/GSK3 β /Axin-Multienzymkomplex, wird durch GSK3 β phosphoryliert und damit der proteolytischen Degradierung zugänglich gemacht (Hart M.J., 1998; Barker N., 2000).

Im Rahmen des Wnt/wingless Signalwegs kann der Abbau dieses zentralen Proteins physiologisch inhibiert werden. Wnt führt über einen transmembranösen *frizzled* (Bhanot P., 1996; Yang-Snyder J., 1996) zu einer Hemmung des Abbaukomplexes und konsekutiv zu Stabilisierung von monomerem β -Catenin. Ein Teil davon bildet Komplexe mit verschiedenen Proteinen, z.B. APC, Cadherinen, Cateninen und anderen Effektorproteinen, die unter anderem als Shuttleproteine in Betracht kommen. In weit größerem Maße jedoch wird monomeres, freies β -Catenin stabilisiert (Papkoff J., 1996), sodass insgesamt die Konzentration des freien β -Catenins im Zytoplasma ansteigt und schließlich eine Translokation des Proteins in den Nukleus stattfindet.

Pathologische Stabilisierung von β -Catenin im Zytoplasma, z. B. infolge eines Defekts im degradierenden Multienzymkomplex oder auch durch eine Mutation des für den Abbau kritischen N-Terminus des β -Catenins, hinterlässt ein β -Catenin, das einer Downregulation gegenüber immun ist und sich in der Zelle unkontrolliert anreichert. Auf die Anreicherung im Zytoplasma folgt der Übertritt des überschüssigen β -Catenins in den Nukleus, wo es zu einer Interaktion mit einem spezifischen Sequenzmotiv am N-Terminus des Tcf kommt (Barker N., 2000). Die Stimulation des LEF/Tcf-Komplexes vermittelt die Transkription von Genen, die in der Pathogenese verschiedenster Tumoren eine Rolle spielen (Aoki M., 1999). Auf molekularer Ebene betrachtet kommt es nach Bindung des β -Catenins an den LEF/Tcf-Komplex zur Dislokation eines Korepressor-Komplexes (Billin A.N., 2000), was eine Aktivierung der Transkription bewirkt. β -Catenin wirkt also als Koaktivator. Umgekehrt requiriert Tcf in Abwesenheit von nukleärem β -Catenin das Korepressor Protein Groucho zu den Zielgen-Enhancern und hemmt somit aktiv die Transkription (Barker N., 2000). Eine solche Sequenz ist in Anbetracht des nukleär angereicherten β -Catenin bei

juvenilen Angiofibromen zu erwarten. Barker und Mitarbeiter vermuten, dass auch das CREB-binding-protein (CBP) als Korepressor-Protein und somit als Antagonist des β -Catenin wirken kann.

5.2 β -Catenin im juvenilen Angiofibrom

In juvenilen Angiofibromen wurde von häufigen β -Catenin-Mutationen berichtet (Abraham S.C., 2001). Übereinstimmend wird von allen damit beschäftigten Arbeitsgruppen der Nachweis einer starken β -Catenin-Expression im JA beschrieben. Allerdings herrscht über das Vorkommen in den verschiedenen Zelltypen und über die Aussagekraft des immunhistologischen Nachweises in diesen Zellen bisher keine Einigkeit. Im Rahmen der vorliegenden Studie kann die Beobachtung einer starken β -Catenin-Expression in Angiofibromen bestätigt werden (Abraham S.C., 2001; Zhang P.J., 2003). Während Abraham und Mitarbeiter signifikante β -Catenin-Expression jedoch auf die Kerne der Fibroblasten beschränkt fanden, berichten Zhang und Mitarbeiter darüber hinaus von einem immunhistologischen Nachweis des β -Catenins im Zytoplasma von Bindegewebs- und Endothelzellen. In dieser Studie wurde eine nukleäre Expression in Bindegewebszellen kombiniert mit einer zytoplasmatischen Expression in beiden Zellarten beobachtet. Erstmals wurde β -Catenin auch in den Kernen der Endothelzellen von 77% der untersuchten Angiofibrome gefunden.

Demzufolge kann die von Abraham und Mitarbeitern formulierte, auf die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen gestützte Vermutung einer Bindegewebsätiologie des Angiofibroms durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht gestützt werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass mittels immunhistologischer Untersuchungen der β -Catenin-Expression keine Aussage über das Ursprungsgewebe des JA gemacht werden kann.

Die genauen molekularen Vorgänge und Interaktionen, die in ihrer Gesamtheit zur Entstehung des Angiofibroms führen, sind noch lange nicht aufgeklärt. Wenn auch eine Beteiligung mutierten β -Catenins angenommen werden darf,

so sind die molekularen Vorgänge im juvenilen Angiofibroms bislang weitgehend unbekannt. Auf mögliche Reaktionspartner und Wechselwirkungen soll im Folgenden eingegangen werden.

5.3 Die Rolle der Cadherine, Catenine und anderer Wachstumsfaktoren im juvenilen Angiofibrom: Darstellung spezifischer Interaktionen

Bisherige Erfahrungen deuten darauf hin, dass γ -Catenin ebenso wie das β -Catenin auf LEF/Tcf-abhängige Transkriptionsprozesse einwirkt, sodass dem γ -Catenin ebenfalls eine wichtige Funktion in der Entwicklung von Tumoren beigemessen wird. Der γ -Catenin-Abbau wird ebenfalls durch APC reguliert, im Gegensatz zu β -Catenin werden Mutationen jedoch relativ selten beobachtet. In Versuchsreihen von Kolligs und Mitarbeitern wurde beobachtet, dass mutierte γ -Catenin-Formen ihre Fähigkeit zur Tcf-Bindung verlieren, wohingegen hohe Konzentrationen des Wildtyps als Ergebnis einer Genamplifikation für eine onkogene Transformation genügen. Daher ist dies als wahrscheinlichster Mechanismus anzunehmen. Es wird berichtet, dass γ -Catenin insbesondere die Expression des Onkogens c-myc stimuliert (Kolligs F.T., 2000). Bei einer Deregulation beider Proteine werden synergistische Effekte im Hinblick auf die Tumorentstehung erwartet (Hajra K.M., 2002). Die Beobachtung einer γ -Catenin-Expression in Angiofibromen im Rahmen der vorliegenden Arbeit, die eine Erstbeschreibung darstellt, ist vor diesem Hintergrund bemerkenswert und sollte weiter erforscht werden.

Bei fortgeschrittenen oder gering differenzierten Neoplasien wurde eine verminderte oder sogar aufgehobene E-Cadherin-Expression beobachtet, die mit einem aggressiven Tumorwachstum assoziiert ist (Guilford P., 1998). In analoger Weise wird auch α -Catenin als ein auf die Invasivität der Tumorzellen hemmend wirkendes Protein aufgefasst. Der Verlust an E-Cadherin in Tumoren kann mit einer inadäquaten Expression von nicht-epithelialen Cadherinen wie dem N-Cadherin einhergehen (Hajra K.M., 2002). Dieser Vorgang wird als „cadherin switching“ bezeichnet und soll zu einer Veränderung des Zellphänotyps von epithelialen zu fibroblatischen Zellen führen (Islam S., 1996)

und die Invasion einer Extrazellulärmatrix bei fehlenden weiteren Zellen begünstigen (Nieman M.T., 1999). Der Nachweis des mit Tumorinvasivität und Motilität in Zusammenhang gebrachten N-Cadherins (Cavallaro U., 2004) in juvenilen Angiofibromen wird in dieser Arbeit zum ersten Mal erbracht. Eine Abnahme der E-Cadherin-Expression bei einem Anstieg der N-Cadherin-Expression wurde z. B. unter dem Einfluß von TGF- β 1 beobachtet (Bhowmick N.A., 2001). Eine starke Expression von aktiviertem TGF- β 1 konnte immunhistologisch sowohl in den Fibroblasten als auch in den Endothelzellen des Angiofibroms bereits nachgewiesen werden (Dillard D.G., 2000).

Gottardi und Mitarbeiter beobachteten, dass E-Cadherin die Transkriptionsaktivität des β -Catenins deutlich senkt, ohne dabei jedoch nachweisbar dessen Konzentration im Zytoplasma oder im Nukleus zu verringern (Gottardi C.J., 2001). Die Konzentration war bisher als Kontrollmechanismus des β -Catenin-Signalwegs angenommen worden (Polakis P., 2000). Auch in anderen Studien fanden sich Hinweise auf einen Regulationsmechanismus, der unabhängig von der Konzentration oder einer Stabilisierung des β -Catenins sein muss (Young C.S., 1998; Nelson R.W., 1999). Andere beobachteten hingegen, dass E-Cadherin die zelluläre β -Catenin-Konzentration modulieren kann (Yang F., 2002). Eine Redistribution von E-Cadherin in E-Cadherin-negativen Zellen führte vermehrt zu membranöser Lokalisation des zytoplasmatischen β -Catenins und zur Abnahme der β -Catenin-vermittelten AR-abhängigen Transkription.

Immunhistologischen Studien zufolge stellt sich der Vascular endothelial growth factor (VEGF) als möglicher Wachstumsstimulus für das gefäßreiche Angiofibrom dar (Brieger J., 2004). Untersuchungen auf RNA-Ebene ergaben jedoch eine vergleichbare Expression von VEGF in Kontrollgeweben (Nagai M.A., 1996). Es fand sich dafür aber eine statistisch signifikante Erhöhung des Insulin like growth factors-II (IGF-II) und des Platelet derived growth factor-B (PDGF-B). Das bei Erwachsenen vorkommende IGF-II wird von Nagai und Mitarbeitern als ein möglicher Regulator des Angiofibromwachstums eingestuft. Diese Vermutung läuft der hier vertretenen Auffassung einer β -Catenin-Beteiligung nicht zuwider, da IGF-I, die fetale Form des Wachstumsfaktors, als

Inhibitor der GSK3 β stabilisierend auf β -Catenin (Playford M.P., 2000) und somit synergistisch mit diesem wirkt.

Außerdem wird eine Überexpression des Tumorsuppressorgens p53 in juvenilen Angiofibromen beschrieben (Nagai M.A., 1996). Dieses Tumorsuppressor-Protein inhibiert in Rhabdomyosarkomen IGF-II und führt dadurch zu einer Überexpression dieses Wachstumsfaktors. Das für die genomische Integrität zuständige p53 bewirkt bei physiologischer Aktivierung die Unterbrechung des Zellzyklus bzw. einen apoptotischen Zelluntergang und wird daher als Tumorsuppressor bezeichnet. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fand sich bei Untersuchungen auf mRNA-Ebene eine erhöhte p53-Expression in juvenilen Angiofibromen bei gleichzeitigen, mittels CGH detektierten Genverlusten (Schick B., 2005). Es wird berichtet, dass eine gesteigerte β -Catenin Expression durch Interferenz mit dem Abbaumechanismus des p53 zu einer Akkumulation des Tumorsuppressor-Proteins führt (Dalamas A., 1999). Erhöhte p53-Aktivität wirkt als Schutzschild gegen β -Catenin, da p53 und β -Catenin kompetitiv als Bindungspartner der Acetyltransferase CBP/p300 miteinander konkurrieren. Ein mutiertes, stabiles β -Catenin kann diese Schutzfunktion aber vermutlich überwinden. Da häufige β -Catenin-Mutationen im JA nachgewiesen wurden, ist die Inaktivierung von p53 bei gleichzeitiger Überexpression von p53 in diesem Tumor möglich.

In Mamma-Karzinomen wurde co-exprimiert mit p53 das Onkogen-Produkt Her-2/neu gefunden (Choi D.H., 2003). Her-2/neu gehört der erb-B Onkogen-Familie an und ist mit dem EGFR (epidermal-growth-factor-receptor) verwandt (Zeillinger R., 1989). Interessant in diesem Kontext ist, dass das über den MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalweg aktivierte Her-2/neu den AR androgenunabhängig stimulieren kann (Craft N., 1999). Bei Brustkrebs ist Her-2/neu bereits verlässliches Ziel einer Antikörper-gestützten Therapie und darüber hinaus Indikator für den Erfolg einer Chemotherapie (Hammock .L, 2003). Genetische Untersuchungen zu Her-2/neu in JAs zeigten jedoch Genverluste im Gegensatz zu den bei Mamma-Karzinomen beobachteten Amplifikationen (Schick B., 2005). Eine AR-Stimulation durch Her-2/neu ist daher unwahrscheinlich und Her-2/neu kommt als Ziel einer Antikörper-Therapie im juvenilen Angiofibrom nicht in Frage. Da bisher aber noch keine

Untersuchungen auf Protein-Ebene durchgeführt wurden, kann keine abschließende Aussage zur Her-2/neu-Expression in JA gemacht werden.

Weiterhin interessant sind im Hinblick auf die Pathogenese des Angiofibroms die Zielgene des durch β -Catenin stimulierten Transkriptionskomplexes Tcf/LEF. Cyclin D1, ein Regulatorprotein des Zellzyklus, das je nach Kontext die Proliferation stimulieren oder aber Apoptose herbeiführen kann (Ceschi M., 2005), konnte immunhistologisch im JA nicht nachgewiesen werden (Schick B., 2004, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch Untersuchungen zur Expression der Matrix-Metalloproteinase-7 (MMP-7) zeigten wider Erwarten eine Downregulation auf RNA-Ebene (Schick B., 2005, unveröffentlichte Ergebnisse). Der Abbau der Extrazellulärmatrix durch Metalloproteinasen wird als wichtiger Mechanismus bei der Tumorentstehung gewertet und die Überexpression von MMP-7 wurde in verschiedenen gastrointestinalen Tumoren in Zusammenhang mit der Progression der Tumoren beobachtet (Li Y.J., 2005). Es ist festzuhalten, dass der Nachweis einer β -Catenin induzierten spezifischen Gentranskription bis heute aussteht.

In Kolonkarzinomen und malignen Melanom-Zelllinien wurde beobachtet, dass eine Überexpression von β - und γ -Catenin via LEF/Tcf-Komplex die extensive Bildung von Nr-CAM induziert (Conacci-Sorrell M.E., 2002). Auch das Zelladhäsionsmolekül Nr-CAM wird mit Stimulation von Zellwachstum, Steigerung der Motilität und Induktion einer Zelltransformation in Verbindung gebracht (Conacci-Sorrell M.E., 2002). In juvenilen Angiofibromen liegen dazu bisher jedoch noch keine Erfahrungen vor.

Das β -Catenin-Zielgen c-myc (8q24) wird seit Jahrzehnten mit der Entstehung von Tumoren assoziiert. Chromosomale Translokationen, Amplifikationen, Mutationen und virale Insertionen mit Deregulation von c-myc wurden in vielen verschiedenen Malignomen nachgewiesen (Levens D., 2002). C-myc ist in verschiedenen zellulären Prozessen involviert, die von Zellwachstum über Proliferation und Verlust der Differenzierung bis hin zur Apoptose reichen (Pelengaris S., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass c-myc in Fibroblasten die Angiogenese induziert und zur Bildung eines unreifen vaskulären Netzwerks anregt. Diese sehr unterschiedlichen Funktionen kann das Proto-Onkogen erfüllen, da es sowohl als Aktivator als auch als Suppressor

zahlreicher Gene wirkt (O'Connell B.C., 2003). Im juvenilen Angiofibrom wurde auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene eine Überexpression von c-myc gefunden. Bei FISH-Untersuchungen zeigten sich in 6 von 7 untersuchten juvenilen Angiofibrome Genverluste, die bei den fortgeschrittenen Tumoren der Untersuchungsreihe jedoch mit Gengewinnen im Sinne einer genetischen Heterogenität kombiniert waren. Da c-myc ausserdem mit β -Catenin und dem Androgenrezeptor direkt interagiert (Amir A.L., 2003), vermuten Schick und Mitarbeiter eine Beteiligung des c-myc am aggressiven Wachstumsverhalten des juvenilen Angiofibroms (Schick B., 2006). Als Hinweis auf eine Rolle des γ -Catenins im Angiofibrom darf in diesem Zusammenhang die Beobachtung gelten, dass γ -Catenin die c-myc-Expression in noch stärkerem Maße aktiviert als β -Catenin (Kolligs F.T., 2000).

5.4 β -Catenin und der Androgenrezeptor

Klinisch ist das Angiofibrom besonders durch seine Manifestation bei männlichen Jugendlichen zwischen dem 12. und 16. Lebensjahr charakterisiert. Diese Beobachtung legte schon vor langem den Gedanken einer Hormonabhängigkeit dieses Tumors nahe. Es konnten, obwohl dieses Thema Gegenstand mehrerer Studien war, keine erhöhten Sexualhormonkonzentrationen im Blut der sexuell normal entwickelten Patienten festgestellt werden (Kruk-Zagajewski A., 2002). Im Gegensatz zu den physiologischen Testosteronkonzentrationen im Patientenblut gelang jedoch im Tumorgewebe der Nachweis einer gesteigerten Androgenrezeptor-Expression (Hwang H.C., 1998; Farag M.M., 1987). Der Androgenrezeptor stimuliert im Normalfall in Anwesenheit von Androgenen die Transkription spezifischer Gene, die an der Regulation von Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation und Apoptose beteiligt sind.

In einer immunhistologischen Studie von Hwang und Mitarbeitern zeigten sich in 75% der untersuchten Angiofibrome in den Kernen der Bindegewebs- und Endothelzellen des Tumors deutliche Androgenrezeptor-Signale (Hwang H.C.,

1998). Im Gegensatz dazu wurden in einer anderen Studie nur schwache AR-Signale in einer Minderheit der beiden Zelltypen des Angiofibroms gefunden, ähnlich der Expression im Kontrollgewebe Nasenschleimhaut (Gatalica Z., 1998). Die ungewisse Expression des Androgenrezeptors wurde in Übereinstimmung mit der unvorhersehbaren Reaktion der jungen Patienten auf die Hormontherapie gesehen.

In der vorliegenden Studie zeigten die immunhistologischen Untersuchungen des Androgenrezeptors deutliche Signale in beiden Zelltypen des juvenilen Angiofibroms. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse der FISH-Untersuchung Verdopplungen des AR-Gens, welches auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Da auch Verdopplungen des X-Chromosoms vorlagen und beide Signale colokalisiert beobachtet wurden, kann als Ursache für den AR-Gen-Gewinn ein X-chromosomaler Gewinn in etwa einem Drittel der Zellen im juvenilen Angiofibrom angenommen werden. Untermuert werden diese Ergebnisse durch den schon früher mittels CGH (Comparative Genetic Hybridisation) erbrachten Nachweis X-chromosomaler Gewinne im juvenilen Angiofibrom (Schick B, 2002). Diese Ergebnisse deuten, besonders im Hinblick auf das Entstehungsalter des Tumors und des fast ausschließlich männlichen Geschlechts der Patienten, auf eine pathogenetische Bedeutung des AR hin.

Die These einer ätiologischen Bedeutung des AR im Angiofibrom steht zu den unterschiedlichen und insgesamt eher unbefriedigenden Erfahrungen einer Hormontherapie nicht im Widerspruch, denn als Teil komplizierter Transkriptionsprozesse wirkt der AR mit vielen anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren zusammen und wird durch diese reguliert. Neueren Forschungsergebnissen zufolge besteht eine bemerkenswerte Verbindung des AR zum β -Catenin. Es fanden sich Hinweise darauf, dass zwischen β -Catenin und dem AR spezifische Interaktionen stattfinden (Yang F., 2002), u.a. dass β -Catenin durch direkte Proteinbindung an den Liganden-gebundenen AR bindet. Diese Bindung führt unter anderem zu einer Translokation des β -Catenins in den Zellkern, sodass der AR als Shuttle-Protein für die nukleäre Translokation des zytoplasmatischen β -Catenin bezeichnet werden kann (Pawlowski P., 2002). Die Bedeutung des Androgenrezeptors wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass β -Catenin bei einer Größe von 95 kDa nicht passiv in den

Zellkern übertreten kann. Da auch keine spezifischen Kanäle oder Carrier in der Kernmembran existieren und β -Catenin keine NLS-Region (nuclear localization signal) enthält, ist β -Catenin auf die Bindung an akzessorische Proteine angewiesen, um in den Zellkern zu gelangen (Pawlowski J.E., 2002). Wie das APC-Protein (Henderson B.R., 2000) und Tcf (Behrens J., 1996), welche in dieser Funktion diskutiert werden, ist auch der ligandengebundene Androgenrezeptor mittels seiner C-terminalen Region in der Lage, diese Transport- oder Shuttlefunktion zu übernehmen. Die Fähigkeit des AR zur Kolokalisierung von β -Catenin im Nukleus ist einzigartig unter den Steroidhormonrezeptoren, denn Progesteron-, Östrogen- und Glukokortikoidrezeptoren sind dazu nicht in der Lage (Pawlowski J.E., 2002). An der selektiven, ligandenabhängigen Bindung des ARs an β -Catenin sind die Ligandenbindungsdomäne (LBD) und der N-Terminus des Androgenrezeptors sowie die ersten 6 Armadillopeats und der N-Terminus des β -Catenins beteiligt. Durch die direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen wird die AR-abhängige Transkription gesteigert (Yang F., 2002; Chesire D.R., 2002).

β -Catenin kann auch unabhängig von der Induktion der LEF/Tcf-vermittelten Transkription über nukleäre Rezeptoren wie den Androgenrezeptor und den Retinoic Acid Receptor (RAR) eine Transkriptionsstimulation bewirken (Koh S.S., 2002). Der Mechanismus, durch welchen β -Catenin die Transkription beeinflusst, steht erst am Anfang seiner Entschlüsselung. Wahrscheinlich ist, dass β -Catenin zusammen mit anderen Koaktivatoren, z. B. Histon-Methyltransferase CARM1, LIM Protein FHL2 und der Acetyltransferase CBP/p300, einen synergistischen Komplex bildet, welcher sowohl auf LEF/Tcf als auch auf den Androgenrezeptor stimulierend wirkt (Labalette C, 2004). Man unterscheidet dabei zwischen primären Koaktivatoren, zu denen β -Catenin zählt, welche den Komplex in einem Enhancer-Binding-Protein verankern, und sekundären Koaktivatoren, die die Aktivierung der Transkription vermitteln, z. B. durch Remodelling von Chromatin oder durch direkte Aktivierung der RNA Polymerase II. FHL2 ist ein Protein der LIM-Gruppe, einer Familie von Proteinen, die eine funktionelle Modifikation von Proteininteraktionen koordinieren und die als molekulare Adapter zur Formation eines Multienzymkomplexes agieren. Es wurde nachgewiesen, dass FHL2 spezifisch

mit β -Catenin interagiert und dessen stimulierende Wirkung auf den LEF/Tcf-Transkriptionskomplex potenziert. Isoliert kann FHL2 keine aktivierende Wirkung auf den LEF/Tcf-Komplex ausüben. Auf den AR wirkt FHL2 unabhängig von β -Catenin aktivierend und hat somit einen additiven Effekt. Es wird angenommen, dass FHL2 über spezifische Proteinbindung an β -Catenin zu Tcf-abhängigen Promotoren rekrutiert wird (Wei Y., 2003). Darüberhinaus interagiert FHL2 auch direkt mit CBP/p300. Man nimmt an, dass beide Koaktivatoren zusammen mit β -Catenin einen ternären Komplex bilden, der sowohl auf den LEF/Tcf-Komplex als auch auf den AR aktivierend wirkt (Labalette C., 2004). Diese Interaktionen sind im juvenilen Angiofibrom bisher nicht untersucht und bedürfen weiterer Erforschung.

Dass β -Catenin seinen aktivierenden Effekt auf den Androgenrezeptor vermutlich nicht isoliert entfaltet, wird auch durch andere Arbeiten bestätigt (Koh S.S., 2002). So wurde bei Koexpression von CBP/p300, CARM1 und β -Catenin in Zellkulturen eine 7-fache Verstärkung der AR-Aktivität, wobei keiner der Koaktivatoren für sich alleine eine signifikante Aktivitätssteigerung bewirken konnte. Auch die Kombination von β -Catenin mit lediglich einem der beiden Koaktivatoren zeigte keinen wirkungssteigernden Effekt.

Bei androgenabhängigen Prostatakarzinomen wurde beobachtet, dass mutiertes β -Catenin spezifisch die Androgenrezeptoraktivität steigert und eine Zunahme der AR-vermittelten Gentranskription bewirkt. Darüber hinaus veränderte β -Catenin die Sensitivität des AR gegenüber schwachen Androgenen so, dass in Anwesenheit von β -Catenin auch Androstendion und Östrogen eine AR-vermittelte Transkription induzierten, die mit der Wirkung von DHT vergleichbar war. Die hemmende Wirkung des Antiandrogens Bicalutamid auf den AR wurde durch mutiertes β -Catenin vermindert (Truica C.I., 2000). Die Interaktion zwischen β -Catenin und dem AR fördert das Zellwachstum sowohl in normalem als auch in neoplastischem Prostata-Gewebe (Masiello D., 2004). Pawlowski und Mitarbeiter untersuchten über die Interaktionen dieser beiden Proteine hinausgehend die Wechselwirkungen zwischen AR, β -Catenin und Tcf und damit zwei Signalwege, die bis dahin als voneinander unabhängig galten. Sie beobachteten eine Abnahme der AR-abhängigen Transkription in neuronalen Zellen, die mit AR, β -Catenin und Tcf kotranskribiert worden waren.

Der β -Catenin/Tcf-Komplex verminderte die AR-Aktivität und umgekehrt führte die Anwesenheit eines ligandengebundenen AR zur Hemmung der Tcf/ β -Catenin-Aktivität. Die Konsequenzen einer Interaktion zwischen β -Catenin und AR könnten also abhängig sein von der Tcf-Konzentration und möglicherweise auch vom Tcf-Subtyp (Pawlowski J.E., 2002). Übereinstimmend mit dieser Annahme stellte sich heraus, dass der AR direkt mit Tcf4 interagiert und somit keinesfalls ein Tcf-unabhängiger Effektor des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs ist. Auch in dieser Studie fand sich eine Verminderung der AR-Aktivität durch Tcf4, die vermutlich zum Teil durch kompetitive Bindung des β -Catenins verursacht wurde, zum Teil aber durch Tcf-vermittelte Bindung des Korepressorproteins Groucho/TLE an den AR (Amir A.L., 2003). Im juvenilen Angiofibrom ist eine Hemmung der Transkriptionsaktivität des AR aufgrund des überexprimierten und stabilen β -Catenins eher unwahrscheinlich, da β -Catenin im Überschuss vorhanden ist und so zumindest die kompetitive Komponente der beschriebenen Interaktion vernachlässigbar ist. Vor diesem Hintergrund ist in Anbetracht der Überexpression von β -Catenin und Androgenrezeptor in Verbindung mit den nachgewiesenen genetischen Alterationen im juvenilen Angiofibrom eine Interaktion zwischen beiden wahrscheinlich, wenn auch bisher nicht nachgewiesen. Die Transkription spezifischer androgenabhängiger Gene unter dem Einfluss von Androgenrezeptor und mutiertem β -Catenin in juvenilen Angiofibromen ist vorstellbar.

Die Rolle möglicher Kofaktoren wie z.B: FHL2, CARM1 und CBP/p300 sollte weiter untersucht werden.

5.5 Therapieansatz

Geht man davon aus, dass es sich beim juvenilen Angiofibrom um einen androgenabhängigen Tumor handelt, liegt der Gedanke einer Behandlung mit Antiandrogenen nahe. Bei Wahl einer antiandrogenen Therapie erscheint jedoch denkbar, dass die Aktivitätssteigerung des Androgenrezeptors durch β -Catenin die Absenkung des Androgenspiegels im Blut kompensieren kann (Yang, 2002). Dieser Gedankengang kann die Beobachtung einer nur partiellen

Regression (um 44%) von Angiofibromen erklären, die mit einer antiandrogenen Therapie behandelt wurden (Gates GA, 1992) und bietet gleichzeitig Raum für Studien, die keinen Therapievorteil bei Behandlung mit Antiandrogenen feststellen konnten. Somit wäre das Ausmaß der β -Catenin-Mutationen beeinflussend für den Therapieerfolg einer antiandrogenen Therapie.

In letzter Zeit wurden neue Therapiestrategien entwickelt, wie z. B. der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Her-2/neu bei Mammakarzinomen, die ganz spezifische onkogene Signalwege zu unterbrechen suchen und dazu an endogenen Signalmolekülen angreifen. Diese Mittel sind sehr viel selektiver für Tumorgewebe und haben ein wesentlich geringeres Nebenwirkungspotential (Richter M, 2005). Her-2/neu als möglicher Pfad einer Androgen-unabhängigen Stimulation des Androgenrezeptors ist auf dem Boden der bisherigen Erfahrungen im JA jedoch nicht von zentraler Bedeutung, sodass eine Her-2/neu-basierte Therapie wenig Erfolg verspricht.

Eine für die Angiofibromentstehung ursächliche Verflechtung des androgenen und des β -Catenin-abhängigen Signalwegs lässt den Gedanken an eine kombinierte Therapie aufkeimen. Wenn das Ausmaß der β -Catenin-Mutationen tatsächlich bedeutsam ist für den Therapieerfolg antiandrogener Maßnahmen, so erscheint eine zusätzliche β -Catenin-Reduktion als sinnvolle Schlussfolgerung. Als molekulares Ziel einer medikamentösen Behandlung sind daher selektive Antiandrogene vorstellbar, die eine Interaktion des AR mit β -Catenin unterbinden. CPA, ein partieller Agonist des AR, bindet an den AR, verhindert aber eine Interaktion des CPA-AR-Komplexes mit β -Catenin (Amir AL, 2003). Beim Prostata-CA reduziert CPA das Tumorwachstum, möglicherweise aufgrund dieser fehlenden Interaktion, und wäre somit auch für das juvenile Angiofibrom ein denkbare Antiandrogen.

Vielversprechend erscheint als Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie auch ICAT (inhibitor of β -catenin and Tcf4), ein mit β -Catenin interagierendes Protein, das die Formation des β -Catenin/Tcf-Transkriptionskomplexes verhindert. ICAT inhibiert die Proliferation kolorektaler Tumorzellen, die eine APC- oder β -Catenin-Mutation tragen. Umgekehrt führte ICAT in normalen Zellen oder in Tumorzellen ohne Mutation dieser Gene aber nicht zu einer

Wachstumshemmung. ICAT führte in den mutierten Kolonkarzinomzellen zu einem G2-Zellzyklusarrest und zum konsekutiven Zelltod (Sekiya T, 2002). Song und Mitarbeiter fanden bei Untersuchungen am Prostatakarzinom heraus, dass ICAT darüber hinaus die Bindung von β -Catenin an den Androgenrezeptor gänzlich verhindert und die β -Catenin vermittelte Steigerung der androgenabhängigen Transkription blockiert (Song L.N., e2003). Die Expression von ICAT mit Hilfe von Gentherapie oder der Einsatz von Medikamenten, die die Wirkung von ICAT imitieren, könnte bei der Behandlung von JAs von Nutzen sein.

Da das juvenile Angiofibrom als androgenabhängiger Tumor betrachtet werden kann, erscheint es sinnvoll, Fortschritte bei der medikamentösen Behandlung des Prostatakarzinoms im Auge zu behalten. Das Prostatakarzinom gilt ebenfalls als androgenabhängiger Tumor, entwickelt sich in späteren Stadien, nach antiandrogener Therapie, jedoch oft androgenunabhängig weiter, was mit dem β -Catenin/AR-Signalweg in Verbindung gebracht wird. Daher bemühen sich neue Therapieansätze um eine kombinierte Blockade des β -Catenin/AR-Signalwegs. Sollte eine Behandlung des juvenilen Angiofibroms mit selektiven Antiandrogenen möglich sein, die die Nebenwirkungen dieser Therapieform minimiert, könnte dies eine echte Alternative zur chirurgischen Behandlung der meist sehr jungen Patienten darstellen.

5.6 Schlussfolgerung

Anders als bisher angenommen besteht die Möglichkeit, dass abgesehen von β -Catenin noch weitere Mitglieder der Cadherin/Catenin-Proteinfamilie an Entstehung und Progression des juvenilen Angiofibroms beteiligt sind. Der Nachweis einer gesteigerten γ -Catenin Expression ist vor dem Hintergrund einer mit β -Catenin synergistischen Wirkung beachtenswert und sollte, auch im Hinblick auf Wechselwirkungen mit dem Androgenrezeptor und dem im Angiofibrom nachgewiesenen c-myc, weiter untersucht werden. Die in dieser Studie beobachtete Reduktion der E-Cadherin Expression ist ebenfalls interessant, erhöht doch ein Verlust der E-Cadherin Expression die Aktivität β -

Catenin-abhängiger Transkriptionen (Gottardi C.J., 2001; Yang F., 2002). Sie wirkt somit zumindest additiv zu den bisher festgestellten β -Catenin Mutationen mit der Folge einer Aktivierung β -Catenin-abhängiger Signalwege. Die in 60% der untersuchten Angiofibrome vorgefundene N-Cadherin Expression bei gleichzeitiger Downregulation der E-Cadherin Expression („cadherin switching“) könnte als Beitrag zur Ausprägung des Tumortyps interpretiert werden, da ein „cadherin switching“ zur Änderung des Zellphänotyps von epithelialen zu fibroblastischen Zellen führen soll (Islam S, 1996) und es sich beim juvenilen Angiofibrom um einen fibrovaskulären Tumor handelt.

Die gesteigerte Expression von β -Catenin in juvenilen Angiofibromen und der Nachweis von häufigen Mutationen in Exon 3 des β -Catenin Gens in Verbindung mit dem immunhistologischen Nachweis des Androgenrezeptors und der Beobachtung von Gengewinnen des AR-Gens in diesem Tumor lassen an einen androgenabhängigen Tumor denken. Die dargestellten Interaktionen des β -Catenins mit dem Androgenrezeptor sind demnach geeignet zu erklären, warum sich diese Tumoren bei männlichen Jugendlichen gerade in der Phase der Adoleszenz manifestiert und ein entsprechendes Wachstum zeigen.

Demnach ist der in dieser Studie gefundene X-chomosome Gewinn in Kombination mit einem Gewinn an AR-Gen äußerst interessant. Das Vorliegen zweier AR-Kopien in einer signifikanten Anzahl von Angiofibromzellen als genetischer Hintergrund für den immunhistologischen Nachweis einer starken AR-Expression in Kombination mit der gesteigerten Expression mutierten β -Catenins in juvenilen Angiofibromen deutet darauf hin, dass beide Signalwege miteinander verflochten an der Entstehung des Angiofibroms beteiligt sind. Die Transkription einer Subpopulation androgenabhängiger Gene ist vorstellbar.

6 Literaturverzeichnis

1. Aberle H., A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, R. Kemler: β -Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997; 16: 3797-3804
2. Abraham S.C., E.A. Montgomery, F.M. Giardiello, T.T. Wu: Frequent β -Catenin Mutations in Juvenile Nasopharyngeal Angiofibromas. *American Journal of Pathology* 2001; 158: 1073-1078
3. Abraham S.C., C. Reynolds, J. Lee, E.A. Montgomery, B.L Baisden, A.M. Krasinskas, T. Wu: Fibromatosis of the Breast and Mutations involving the APC/ β -Catenin Pathway. *Human Pathology* 2002; 33: 39-46
4. Amir A.L., Barua M., McKnight N.C., Cheng S., Yuan Y., Balk S.P.: A direct β -catenin-independent interaction between androgen receptor and T cell factor 4. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278 (33): 30828-30834
5. Andrews J.C., Fisch U., Valavanis A., Aeppli U., Makek M.S.: The surgical management of extensive nasopharyngeal angiofibromas with the infratemporal fossa approach. *Laryngoscope.* 1989; 99(4): 429-37.
6. Antoniadou K., Antoniadou D.Z., Antoniadou V.: Juvenile angiofibroma: report of a case with intraoral presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(2): 228-32.
7. Aoki M., A. Hecht, U. Kruse, R. Kemler, P.K. Vogt: Nuclear endpoint of Wnt signaling: neoplastic transformation induced by transactivating lymphoid enhancer factor-1. *PNAS* 1999; 96: 139-144
8. Arakaki D.T., R.S. Sparks: Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogen* 1963, 2: 57-60
9. Bales C., Kotapka M., Loevner L.A., Al-Rawi M., Weinstein G., Hurst R., Weber R.S.: Craniofacial resection of advanced juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128(9): 1071-8.
10. Barker N., Morin P.J., Clevers H.: Yin-Yang of Tcf/ β -catenin signaling. *Adv Cancer Res.* 2000;77:1-24
11. Barth A.I., I.S. Nathke, W.J. Welson: Cadherins, Catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 683-690
12. Beham A., C. Beham-Schmid, S. Regauer, L. Auböck, H. Stammberger : Nasopharyngeal Angiofibroma. True neoplasm or vascular malformation? *Adv Anat Path* 2000, 7: 36-46
13. Behrens J., J.P. von Kries, M. Kuhl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, W. Birchmeier: Functional interaction of β -Catenin with the transcriptional factor LEF-1. *Nature* 1996; 382: 638-642
14. Behrens J., B.A. Jerchow, M. Würtele, J. Grimm, C. Asbrand, R. Wirtz, M. Kühl, D. Wedlich, W. Birchmeier: Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -Catenin, APC, and GSK3 β *Science* 1998; 280: 596-599

15. Behrens J.: Cadherins and catenins: Role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Met Rev* 1999; 18: 15-30
16. Bell B., E.L. Mazzaferri: Familial adenomatous polyposis (Gardner's syndrome) and thyroid carcinoma: a case report and review of literature. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 185-190
17. Bell K., K. Stott, C.J. Sinclair, W.S. Walker, J. A. Gillon: Controlled trial of intra-operative autologous transfusion in cardiothoracic surgery measuring effect on transfusion in cardiothoracic surgery measuring effect on transfusion requirements and clinical outcome. *Transfus Med* 1992; 2: 295-300
18. Ben Ze'ev A., B. Geiger: Differential molecular interactions of β -Catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol* 1998; 10:639-639
19. Bhanot P., Brink M., Samos C.H., Hsieh J.C., Wang Y., Macke J.P., Andrew D., Nathans J., Nusse R.: A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996; 382: 225-30
20. Bhowmick N.A., M. Ghiassi, A. Baki, M. Aakre, C.A. Lundquist, M.E. Engel, C.L. Arteaga, H.L. Moses: Transforming growth factor β -1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 2001; 12 27-36
21. Billin A.N., Thirlwell H., Ayer D.E.: Beta-catenin-histone deacetylase interactions regulate the transition of LEF1 from a transcriptional repressor to an activator *Mol Cell Biol* 2000; 20 (18): 6882-90
22. Brabletz T., A. Jung, T. Kirchner: β -Catenin and the morphogenesis of colorectal cancer. *Virchows Arch* 2002, 441: 1-11
23. Breen E., Clarke A., Steele G. Jr, Mercurio A.M.: Poorly differentiated colon carcinoma cell lines deficient in alpha-catenin expression express high levels of surface E-cadherin but lack Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun.* 1993; 1(3): 239-50
24. Bremer J.W., H.B. Neel, L.W. DeSanto, G.C. Jones: Angiofibroma: treatment trends in 150 patients during 40 years. *Laryngoscope* 1986, 96: 1321-9
25. Brieger J., Wierzbicka M., Sokolov M., Roth Y., Szyfter W., Mann W.J.: Vessel density, proliferation and immunolocalisation of vascular endothelial growth factor in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 727-31
26. Brunner H.: Nasopharyngeal angiofibroma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1942; 51: 29-65
27. Caca K., Kolligs F.T., Ji X., Hayes M., Qian J., Yahanada A., Rimm D.L., Costa J., Fearon E.R.: Beta-and gamma-catenin mutations, but not E-cadherin inactivation, underlie T-cell factor/lymphoid enhancer factor transcriptional deregulation in gastric and pancreatic cancer. *Cell Growth Differ* 1999; 10(6):369-76

28. Cavallaro U.: N-cadherin as an invasion promoter: a novel target for antitumor therapy?
Curr Opin Investig Drugs 2004; 5(12): 1274-8
29. Ceschi M., Sun C.L., Van Den Berg D., Koh W.P., Yu M.C., Probst-Hensch N.: The effect of cyclin D1 (CCND1) G870A-polymorphism on breast cancer risk is modified by oxidative stress among chinese women in Singapore.
Carcinogenesis 2005; Apr 21; (Epub ahead of print)
30. Chesire D.R., Ewing C.M., Gage W.R., Isaacs W.B.: In vitro evidence for complex modes of nuclear beta-catenin signaling during prostate growth and tumorigenesis.
Oncogene 2002 Apr 18;21(17):2679-94
31. Chesire D.R., Isaacs W.B.: Beta- catenin signaling in prostate cancer: an early perspective.
Endocr Relat Cancer 2003 Dec;10(4):537-60
32. Choi D.H., Shin D.B., Lee M. H., Lee D.W., Dhandapani D., Carter D., King B.L., Haffty B.G.: A comparison of five immunohistochemical biomarkers and HER-2/neu gene amplification by fluorescence in situ hybridisation in white and korean patients with early-onset breast carcinoma.
Cancer 2003; 98: 1587-1595
33. Coenen H.: Das Basalfibroid (typisches Nasenrachenangiofibrom) ein Skelettumor.
Münch Med Wochenschr 1923; 70: 829-833
34. Conacci-Sorrell M.E., Ben-Yedidia T., Shtutman M., Feinstein E., Einat P., Ben-Ze'ev A.: Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis.
Genes Dev 2002 Aug 15; 16(16):2058-72
35. Craft N., Shostak Y., Carey M., Sawyers C.L.: A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen-receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase.
Nat Med 1999; 5: 280-285
36. Crawford H.C., Fingleton B.M., Rudolph-Owen L.A., Goss K.J., Rubinfeld B., Polakis P., Matrisian L.M.: The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors.
Oncogene. 1999, 6;18(18): 2883-91.
37. Damalas A., Ben-Ze'ev A., Simcha I., Shtutman M., Fernando J., Leal M., Zhurinsky J., Geiger B., Oren M.: Excess β -catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53.
EMBO J 1999; 18: 3054-3063
38. Dane WH: Juvenile nasopharyngeal fibroma in state of regression.
Ann Otol Rhinol Laryngol 1954; 63: 997-1014
39. Darzynkiewicz Z.: Acid-induced denaturation of DNA in situ as a probe of chromatin structure.
Methods Cell Biol 1990; 33: 337-52
40. Dillard D.G., C. Cohen, S. Muller, J. Del Gaudio, O. Reichman, B. Parrish, D. Rackley, A.A. Gal: Immunolocalization of activated transforming growth factor β 1 in juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2000; 126: 723-725
41. Eklof Spink K., Fridman S.G., Weis W.I.: Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-

- catenin complex.
EMBO J. 2001; 20(22): 6203-12.
42. Fagan J.J., C.H. Snyderman, R.L. Carrau, I.P. Janecka: Nasopharyngeal Angiofibromas: Selecting A Surgical Approach.
Head and Neck 1997: 391-399
 43. Fagotto F., Funayama N., Gluck U., Gumbiner B.M.:
Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in xenopus.
J Cell Biol. 1996 Mar;132(6):1105-14
 44. Farag M.M., S.E. Ghanimah, A. Ragaie, T.H. Saleem: Hormone receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Laryngoscope 1987;97: 208-211
 45. Ferouz A.S., R.M. Mohr, P. Paul: Juvenile nasopharyngeal angiofibroma and familial adenomatous polyposis: an association?
Otolaryngol Head Neck Surg 1995,113: 435-439
 46. Gardner EJ: Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance dor a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas, and eepidermal cysts.
Am J Hum Genet 1962; 14: 376-390
 47. Gates G.A., D.H. Rice, C.G. Koopmann, D.E. Schuller: Flutamide-induced regression of angiofibroma.
Laryngoscope 1992; 102: 641-644
 48. Gatalica Z.: Immunohistochemical analysis of steroid hormone receptors in nasopharyngeal angiofibromas.
Cancer Letters 1998; 127: 89-93
 49. Giardello F.M., S.R. Hamilton, A.J. Krush, J.A. Offerhaus, S.V. Booker, G.M. Petersen: Nasopharyngeal angiofibroma in patients with familial adenomatous polyposis.
Gastroenterology 1993, 105: 1550-52
 50. Girgis I.C.H., S.A. Fahmy: Nasopharyngeal fibroma: its histo-pathological nature.
J Laryngol Otol 1973;87: 1107-1123
 51. Goepfert H., A. Cangir, Y. Lee : Chemotherapie for aggressive juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg1985; 111: 285-289
 52. Goodnough LT: Clinical application of recombinant erythropoietin in the perioperative period (Review).
Hematol Oncol Clin Nortz Am 1994; 8: 1011-1020
 53. Gottardi C.J., Wong E., Gumbiner B.M.: E-Cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting β -catenin signaling in an adhesion-independent manner.
J Cell Biol. 2001, 28; 153(5): 1049-60
 54. Gottardi C.J., Gumbiner B.M.: Distinct molecular forms of β -Catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes.
J Cell Biol 2004; 167: 339-349
 55. Guertl B., A. Beham, R. Zechner, H. Stammberger, G. Hoefler: Nasopharyngeal Angiofibroma: an APC-gene-associated tumor?
Hum Patholog 2000,31: 1411-1413

-
56. Guilford P., J. Hopkins, J. Harraway, M. McLeod, N. McLeod, P. Harawira, H. Taite, R. Scoular, A. Miller, A.E. Reeve: E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 1998; 392: 402-405
 57. Gullane P.J., Davidson J., O'Dwyer T., Forte V. : Juvenile angiofibroma: a review of the literature and a case series report. *Laryngoscope* 1992; 102(8): 928-33
 58. Hajra K.M., E.R. Fearon: Cadherin and Catenin Alterations in Human Cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2002; 34: 255-268
 59. Hamilton S.R., Liu B., Parsons R.E., Papadopoulos N., Jen J., Powell S.M., Krush A.J., Berk T., Cohen Z., Tetu B., et al.: The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med.* 1995; 30; 332(13):839-47.
 60. Hammock L., Lewis M., Phillips C., Cohen C.: Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridisation. *Hum Pathol* 2003; 34: 1043-1047
 61. Härmä R.A.: Nasopharyngeal angiofibroma: A clinical and histopathological study. *Acta Otolaryngol* 1958 ; Suppl. 146: 7-47
 62. Harrison D.F.: The natural history,pathogenesis and treatment of juvenile angiofibroma *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987, 113: 936-42
 63. Hart M., Concordet J.P., Lassot I., Albert I., del los Santos R., Durand H., Perret C., Rubinfeld B., Margottin F., Benarous R., Polakis P.: The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol.* 1999; 9(4):207-10
 64. Hart M.J., de los Santos R., Albert I.N., Rubinfeld B., Polakis P.: Downregulation of β -catenin by human axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β . *Curr.Biol.* 1998, 8:573-81
 65. He T.C., A.B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L.R. da Costa, P.J. Morin, B. Vogelstein, K.W. Kinzler: Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281: 1509-1512
 66. Hecht A., C.M. Littert, O. Huber, R. Kemler: Functional characterisation of multiple transactivating elements in β -Catenin, some of which interact with the TATA-binding proteine in vitro. *J Biol Chem* 1999; 274: 18017-18025
 67. Henderson B.R., M. Galea, S. Schuechner, L. Leung: Lymphoid enhancer factor-1 blocks APC-mediated nuclear export and degradation of β -Catenin: regulation by histone deacetylase 1 *J Biol Chem* 2002; 277: 24258-24264
 68. Hopman A.H.N., Ramaeckers F.C.S., Raap A.K., Beck J.L.M., Devilee P., van der Ploeg M., Vooijs G.P.: In situ hybridisation as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry* 1988; 89: 307-316
 69. Hubbard E.M.: Nasopharyngeal angiofibromas. *AMA Arch Path* 1958; 65:192-204

-
70. Hwang H.C., Mills S.E., Patterson K., Gown A.M.: Expression of androgen receptors in nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistochemical study of 24 cases. *Mod Pathol* 1998; 11: 1122-1126
 71. Islam S., T.E. Carey, G.T. Wolf, M.J. Wheelock, K.R. Johnson: Expression of N-Cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1996; 135: 1643-1654
 72. Jiang W.G.: E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg.* 1996; 83(4): 437-46
 73. Johns M.E: Estrogen receptors in nasopharyngeal angiofibromas. *Laryngoscope* 1980; 90: 628
 74. Klemmer S., L. Pascoe, J. DeCosse : Occurrence of desmoids in patients with familial adenomatous polyposis of the colon. *Am J Med Genet* 1987; 28:385-392
 75. Koh S.S., H. Li, Y.H. Lee, R.B. Widelitz, C.M. Chuong, M.R. Stallcup: Synergistic coactivator function by CARM1 and β -Catenin with two different classes of DNA-binding transcriptional activators. *J Biol Chem* 2002; 277: 26031-26035
 76. Kolligs F.T., B. Kolligs, K.M. Hajra, G. Hu, M. Tani, K.R. Cho, E. R. Fearon: γ -Catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of β -Catenin. *Genes and Development* 2000; 14: 1319-1331
 77. Kruk-Zagajewska A., Piatkowski K., Thielemann A.: [Value of free testosterone and estrogen-progesterone receptor concentration in juvenile patients with angiofibroma] [Article in Polish] *Otolaryngol Pol.* 2002; 56 (5): 561-5.
 78. Krush A.J., E.I. Traboulsi, G.J.A. Offerhaus, et al.:Hepatoblastoma, pigmented ocular fundus lesions and jaw lesions in Gardner syndrome. *Am J Med Genet* 1988; 29: 323-332
 79. Labalette C., Renard C.A., Neuveut C., Buendia M.A., Wei Y. : Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300 and beta-catenin. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 10698-702
 80. Labra A, Chavolla-Magana R, Lopez-Ugalde A, Alanis-Calderon J, Huerta-Delgado: Flutamide as a preoperative treatment in juvenile angiofibroma (JA) with intracranial invasion: report of 7 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004 Apr;130(4):466-9
 81. Lee DA, Rao BR, Meyer JS, Prioleau PG, Bauer WC: Hormonal receptor determination in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Cancer* 1980; 46: 547-551
 82. Leitch I.J., Heslop-Harrison J.S.: Detection of digoxigenin-labeled DNA probes hybridized to plant chromosomes in situ. *Methods Mol Biol.* 1994; 28: 177-85.
 83. Levens D.: Disentangling the MYC web. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5757-5759

-
84. Li Y.-J., Wei Z.-M., Meng Y.-X., Ji X.-R.: β -catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: Relationships with carcinogenesis and metastasis.
World J Gastroenterol 2005; 11(14): 2117-2123
 85. Liang J., Z. Yi, P. Liang : The nature of juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Otolaryngol Head Neck Surg 2000; 123: 475-481
 86. Lindzey J., Kumar M.V., Frossman M., et al: Molecular mechanisms of androgen action.
Vitam Horm 1994; 49: 383-432
 87. Lloyd G., D. Howard, P. Phelps, A. Cheesman: Juvenile angiofibroma: the lesson of 20 years of modern imaging.
J Laryngol Otol 1999; 113: 127-134
 88. Mann WJ., Jecker P., Amedee R.G.: Juvenile angiofibromas:changing surgical concept over the last 20 years.
Laryngoscope 2004 Feb; 114(2):291-3
 89. Martin H., H.E. Ehrlich, J.C. Abels: Juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Ann Surg 1948; 127: 513-536
 90. Masiello D., Chen S, Bublely G.J., Lu M.L., Balk S.P.: Biclutamide fuctions as an androgen receptor antagonist by assembly of a transcriptionally inactive receptor.
J Biol Chem. 2002 Jul 19;277(29):26321-6. Epub 2002 May 15
 91. Masiello D., Chen S., Y, Verhoeven MC, Choi E, Hollenberg AN, Balk SP: Recruitment of beta-catenin by wild-type or mutant androgen receptors correlates with ligand-stimulated growth of prostate cancer cells.
Mol Endocrinol. 2004 Oct;18(10):2388-401. Epub 2004 Jul 15
 92. Maurice M., M. Milad: Pathogenesis of juvenile nasopharyngeal fibroma.
J Laryngol Otol 1981; 95: 1121-1126
 93. McCombe A., V.J. Lund, D.J. Howard: Recurrence in juvenile angiofibroma
Rhinology 1990, 28: 97-102
 94. Nagai M.A., Butugan O., Logullo A., Brentani M.M.: Expression of growth factors, proto-oncogenes, and p53 in nasopharyngeal angiofibromas.
Laryngoscope 1996; 106 (2 Pt 1): 190-5
 95. Nélaton M.: Polype fibreux de la base du crâne. Considération générales.
Gaz Hop 1853; 26: 22
 96. Nelson R.W., Gumbiner B.M.: A cell-free assay system for beta-catenin signaling that recapitulates direct inductive events in the early xenopus laevis embryo.
J Cell Biol 1999; 147 (2): 367-74
 97. Nicolai P., Berlucchi M., Tomenzoli D., Cappiello J., Trimarchi M., Maroldi R., Battaglia G., Antonelli A.R.: Endoscopic surgery for juvenile angiofibroma: when and how.
Laryngoscope 2003; 113(5): 775-82
 98. Nieman M.T., R.S. Prudoff, K.R. Johnson, M.J. Wheelock : N-Cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-Cadherin expression.
J Cell Biol 1999; 147: 631-644
 99. Noe V., Chastre E., Bruyneel E., Gespach C., Mareel M.: Extracellular regulation of cancer invasion: the E-cadherin-catenin and other pathways.
Biochem Soc Symp. 1999; 65: 43-62

100. Noordermeer J., Johnston P., Rijsewijk F., Nusse R., Lawrence P.A.: The consequences of ubiquitous expression of the wingless gene in the *Drosophila* embryo. *Development* 1992; 116: 711-719
101. O'Connell B.C., Cheung A.F., Simkevich C.P., Tam W., Ren X., Mateyak M.K., Sedivy J.M.: A large scale genetic analysis of c-myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* 2003; 278: 12563-12573
102. Oda T., Kanai Y., Shimoyama Y., Nagafuchi A., Tsukita S., Hirohashi S.: Cloning of the human α -catenin cDNA and its aberrant mRNA in a human cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193: 897-904
103. Orford K., C. Crockett, J.P. Jensen, A.M. Weissman, S.W. Byers: Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of β -Catenin. *J Cell Biol* 1997; 272: 855-868
104. Osborn D.A. : The so-called juvenile angio-fibroma of the naso-pharynx. *J Laryngol Otol* 1959; 73: 295-316
105. Ozawa M., Baribault H., Kemler R.: The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO Journal* 1989; 8: 1711-1717
106. Pannone G., Lo Muzio L., Bucci P., Canfora M., Pannone G., Santacroce L., Bucci T., Staibano S.: [Physiopathology of beta and gamma catenin expression in the oral epithelium] *Minerva Stomatol.* 1998; 47(11): 583-8
107. Papadavid E., Katsambas A.: The interactions and role of epithelial cadherin and catenins in tumorigenicity. *Int J Dermatol.* 2001; 40(4): 254-7
108. Papkoff J., Rubinfeld B., Shryver B., Polakis P.: Wnt-1 regulates free pools of catenins and stabilizes Wnt-catenin complexes. *Mol Cell Biol.* 1996 May;16(5):2128-34
109. Pawlowski J.E., Ertel J.R., Allen M.P., Xu M., Butler C., Wilson E.M., Wierman M.E.: Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2002 Jun 7;277(23):20702-10. Epub 2002 Mar 26
110. Pelengaris S., Khan M., Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(10): 764-76.
111. Playford M.P., Bicknell D., Bodmer W.F., Macaulay V.M.: Insulin like growth factor 1 regulates the location, stability and transcriptional activity of beta- catenin. *PNAS* 2000; 97 (22): 12103-12108
112. Polakis P., Hart M., Rubinfeld B.: Defects in the regulation of beta-catenin in colorectal cancer. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 470: 23-32
113. Polakis P.: Wnt signaling and Cancer. *Genes Dev* 2000; 14: 1837-1851
114. Raap A.K., Marijnen J.G., Vrolijk J., van der Ploeg M.: Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures. *Cytometry.* 1986; 7(3): 235-42.

115. Redies C., Takeichi M.: Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions.
Dev Biol 1996;180: 413-423
116. Richer M., Zhang H.: Receptor-targeted cancer therapy.
DNA Cell Biol 2005; 24(5): 271-282
117. Riehl R., Johnson K., Bradley R., Grunwald G.B., Cornel E., Lilienbaum A., Holt C.E.: Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo.
Neuron 1996; 17: 837-848
118. Riggleman B., Wieschaus E., Schedl P.: Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene.
Genes and Development 1989; 3: 96-113
119. Riggleman B., Schedl P., Wieschaus E.: Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless.
Cell 1990; 63: 549-560
120. Ringertz N.: Benign fibromatous tumors in the nasal and paranasal region and maxilla. Juvenile basal fibroma.
Acta Otolaryngol 1938; Suppl 27: 158-161
121. Rubinfeld B., Albert I., Porfiri E., Fiol C., Munemitsu S., Polakis P.: Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly.
Science 1996; 272 (5264): 1023-6
122. Sanson B., White P., Vincent J.P.: Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*.
Nature. 1996; 383 (6601): 627-30.
123. Schick B., Kahle G., Hassler R., Draf W.: Chemotherapy of juvenile angiofibroma-an alternative?
HNO. 1996; 44(3): 148-52.
124. Schick B., Kind M., Schwarzkopf G., Weber R., Draf W.: [Early childhood angiofibroma in an unusual site]
HNO. 1997; 45(12): 1022-8.
125. Schick B., el Rahman el Tahan A., Brors D., Kahle G., Draf W.: Experiences with endonasal surgery in angiofibroma.
Rhinology. 1999; 37(2) :80-5.
126. Schick B., Kahle G.: Radiological findings in angiofibroma
Acta Radiol Radiological 2000, 41: 585-593
127. Schick B., Plinkert P.K., Prescher A.: Die vaskuläre Komponente: Gedanken zur Entstehung des Angiofibroms
Laryngo Rhino Otol 2002,81: 280-284
128. Schick B., Brunner C., Praetorius M., Plinkert P.K., Urbschat S.: First evidence of genetic imbalances in angiofibromas.
Laryngoscope. 2002; 112(2): 397-401
129. Schick B., Veldung B., Wemmert S., Jung V., Montenarh M., Meese E., Urbschat S.: p53 and Her-2/ neu in juvenile angiofibromas.
Oncol Rep 2005; 13(3): 453-457

130. Schick B., Wemmert S., Jung V., Meese E., Montenarh M., Urbschat S.: Genetic heterogeneity of the c-myc oncogene in extended juvenile angiofibromas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2006; 164(1):25-30
131. Schiff M.: Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. A theory of pathogenesis. *Laryngoscope* 1959; 69: 981-1016
132. Scholtz A.W., Appenroth E., Kammen-Jolly K., Scholtz L.U., Thumfart W.F.: Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: management and therapy. *Laryngoscope*. 2001 Apr;111(4 Pt 1):681-7
133. Sébilleau P. : Considérations sur les fibromes naso-pharyngiens. *Annales des Maladies de l'oreilles et du larynx* 1923; 38: 553-615
134. Sekiya T., Nakamura T., Kazuki Y., Oshimura M., Kohu K., Tago K., Ohwada S., Akiyama T. : Overexpression of Icat induces G2 arrest and cell death in tumor cell mutants for adenomatous polyposis coli, β -catenin, or axin. *Cancer Research* 2002 ; 62 : 3322-3326
135. Shang Y., Myers M., Brown M.: Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell*. 2003 Jun;11(6):1697
136. Shtutman M., J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell, A. Ben-Ze'ev: The cyclin D1 gene is target of the β -Catenin/LEF-1 pathway *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5522-5527
137. Som M.L., A.H. Neffson : Fibromas of the nasopharynx : juvenile and cellular types. *Ann Otol* 1940; 49: 211-218
138. Song L.N., Herrell R., Byers S., Shah S., Wilson E.M., Gelmann E.P.: β -Catenin binds to the activation function 2 region of the androgen receptor and modulates the effects of the N-terminal domain and TIF2 on ligand-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 2003; 23(5): 1674-1687
139. Sternberg S.S.: Pathology of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. A lesion of adolescent males. *Cancer* 1954; 7: 15-28
140. Swiger R.R., J.D. Tucker: Fluorescence in situ hybridization: a brief review *Environ Mol Mutagen* 1996, 27(4):245-54
141. Takeichi M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991; 251(5000): 1451-5.
142. Takemaru K.I., R.T. Moon : The transcriptional activator CBP interacts with β -Catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 2000; 149: 249-254
143. Tejpar S., F. Nollet, C. Li, J.S. Wunder, G. Michils, P. dal Cin, E. Van Cutsem, B. Bapat, F. Van Roy, J.J. Cassiman, B.A. Alman : Predominance of beta-catenin mutations and beta-catenin dysregulation in sporadic aggressive fibromatosis (desmoid tumor). *Oncogene* 1999 ; 18 : 6615-6620
144. Tewfik T.L., A.K.W. Tan, K. Al Noury, K. Chowdhury, D. Tampieri, J. Raymond, T. Vuong: Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *J Otolaryngol* 1999, 28: 145-151
145. Tewfik T.L.: Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma *EMedicine Journal*, May14 2002: Volume 3 Number 5

146. Thomas G.M., Frame S., Goedert M., Nathke I., Polakis P., Cohen P.A.: GSK3-binding peptide from FRAT1 selectively inhibits the GSK3-catalysed phosphorylation of axin and beta-catenin.
FEBS Lett. 1999; 458(2): 247-51
147. Tillaux P.: *Traité d'anatomie topographique avec applications à la chirurgie.*
2ndEd. Paris, P. Asselin, 1878: 348-349
148. Truica I.C., S. Byers, E.P. Gelmann: β -Catenin affects Androgen Receptor Transcriptional Activity and Ligand Specificity.
Cancer Research 2000, 60: 4709-4713
149. Van Aken E., O. De Wever, A.S. Correia da Rocha, M. Mareel: Defective E-Cadherin/catenin complexes in human cancer.
Virchows Arch 2001; 439: 725-751
150. Verneuil V.: Séances de la Société de Chirurgie de Paris pendant l'année 1860.
Bull Soc Chir 1861
151. Walsh N., A. Quizilbash, R. Banerjee, et al.: Biliary neoplasia in Gardner's syndrome.
Arch Pathol Lab Med 1987;111: 76-77
152. Watabe M, Nagafuchi ., Tsukia S., Takeichi M.: Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line.
J Cell Biol 1994; 127: 247-256
153. Wei Y., Renard C.A., Labalette C., Wu Y., Levy L., Neuvent C., Prieur X., Flajolet M., Prigent S., Buendia M.A.: Identification of the LIM protein FHL2 as a coactivator of beta-catenin.
J Biol Chem 2003; 278 (7): 5188-5194
154. Yang F., X.Li, M. Sharma, C.Y. Sasaki, D.L. Longo, B. Lim, Z. Sun: Linking β -Catenin to Androgen-signaling-Pathway
The Journal of Biological Chemistry 2002; 277: 11336-11344
155. Yang-Snyder J., Miller J.R., Brown J.D., Lai C.J., Moon R.T.: A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway.
Curr Biol. 1996; 6: 1302-6
156. Yost C., Farr G.H. 3rd, Pierce S.B., Ferkey D.M., Chen M.M., Kimelman D.: GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in *Xenopus* development and oncogenesis.
Cell. 1998; 93(6): 1031-41
157. Young C.S., Kitamura M., Hardy S., Kitajewsky J.: Wnt-1 induces growth, cytosolic β -catenin and Tcf/LEF transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts.
Mol Cell Biol 1998; 2474-2484
158. Zeillinger R., Kury F., Czerwenka K., Kubista E., Sliutz G., Knogler W., Huber J., Zielinski C., Reiner G., Jakez R.: Her-2/neu amplification, steroid receptors and epidermal growth factor receptor in primary breast cancer.
Oncogene 1989; 4: 109-114
159. Zhang M., W. Garvis, T. Linder, U. Fisch: Update on the Infratemporal Fossa Approaches to Nasopharyngeal Angiofibroma
Laryngoscope 1998; 108: 1717-1723
160. Zhang P.J., Weber R., Liang H.H., Pasha T.L., LiVolski V.A.: Growth factors and receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma and nasal polyps.
Arch Pathol Lab Med. 2003; 127(11): 1480-4.

7 Anhang

7.1 Lösungen und Puffer

Die folgende Aufstellung gibt die Zusammensetzung und Herstellung der häufig verwendeten Lösungen und Puffer an.

Blocking Reagenz:

5 % BSA in 4xSSC

5xPBS:

1g KCl

1g KH₂PO₄

40g NaCl

8,9g Na₂HPO₄

mit H₂O dest. auf 1l auffüllen, autoklavieren

für die Immunhistologie auf pH 7,4, für die Fish-Untersuchung auf pH 7,0 einstellen

Citratpuffer:

9 ml 0,1 M Citronensäure (21,01 g/l)

41 ml 0,1 M Natrium-Citrat (29,41 g/l)

450 ml H₂O dest.

20xSSC:

3Mol NaCl 175,32 g (für 1000 ml)

0,3Mol NaCitrat 88,23 g (für 1000 ml)

mit H₂O dest. Auf 1l auffüllen und mit Zitronensäure auf pH 7,0 einstellen

4xSSC/ 0,1% NP40:

120ml 20xSSC

mit H₂O dest.auf 600ml auffüllen und mit Zitronensäure auf pH 7,0

einstellen
pro 100 ml Lösung 100µl NP40

2xSSC:

60ml 20xSSC
mit H₂O dest.auf 600ml auffüllen und mit Zitronensäure auf pH 7,0
einstellen

4%PFA/1xPBS (500 ml):

20 g Paraformaldehyd in
500 ml 1xPBS lösen
bei 100°C 1 h kochen und rühren
anschliessend filtern, portionieren und bei -20° C lagern

Gewebeverdau mit Verdau-Kit (Appligene-Oncor oder Q-Biogene)Pretreatment:

20g Pretreatment-Pulver lösen in
40 ml 2xSSC (30%ige Lösung)

Protein-Digesting-Enzyme (PDE)/ Proteinase K:

400µl Stammlösung (25mg/ml)/ 40 ml 2xSSC

Hybridisierungs-Mix (10µl/ OT):

5µl Formamid 50%
1µl 20xSSC
1µl Aqua dest.
0,5µl ssss-DNA
1µl X-Sonde
1,5µl Androgenrezeptor-Sonde

Formamid (50%):

150 ml Formamid
120 ml Aqua dest.

30 ml 20xSSC
pH auf 7,0 einstellen

Tris-Puffer:

6,1 g Tris-Base in
50 ml H₂O dest. lösen
37 ml 1 N HCl
mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen
pH auf 7,6 einstellen

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
1 mM Na₂EDTA

TN-Puffer:

0,1 M Tris-HCl (pH 7,6)
0,15 M NaCl

TNT-Puffer:

0,1 M Tris-HCl (pH 7,6)
0,15 M NaCl
0,05 % Tween-20

0,01 N HCl:

120 µl 25% HCl mit 100 ml H₂O dest.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Bernhard Schick für die Überlassung des Promotionsthemas und die Bereitstellung der Versuchsumgebung sowie sämtlicher Präparate der untersuchten juvenilen Angiofibrome. Seine Geduld, seine Begeisterung und seine immerwährende Ansprechbarkeit auch über große Entfernung haben entscheidenden Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Eckhard Meese vom Institut für Humangenetik der Universität Homburg/Saar und seinen Mitarbeitern danke ich für die Einführung in die Methodik der Fluoreszenz in situ Hybridisierung sowie für die Bereitstellung der dafür erforderlichen Materialien. Insbesondere möchte ich Frau Dr. rer. nat. Stephanie Urbschat für die Korrekturhilfe der vorliegenden Arbeit und Herrn Dr. rer. nat. Volker Jung für die technische Hilfestellung danken.

Frau Monika Hoffmann, Iris Fuchs und Frau Ulrike Bechtel und danke ich für die Einführung in den Laboralltag und in die Grundlagen der Immunfluoreszenz. Ich möchte außerdem Frau Ute Behnfeld für die Hilfe bei der Bildbearbeitung danken und Herrn Dr. med. Christian Brunner für die Unterstützung bei Problemen mit den Tücken der computergestützten Mikroskopie.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden, die mich unterstützt und zum Durchhalten ermutigt haben, und besonders meinen Eltern, die, vor allem in den letzten Monaten, liebevoll aber bestimmt auf einen Abschluss der Arbeit bestanden.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Rippel
Vorname: Christine Catharina
Geburtsdatum: 04.05.1978
Geburtsort: Homburg/Saar

Chronologie

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Martinshöhe
1988-1997 Gymnasium Johanneum, Homburg
1997 Abschluss mit dem Abitur

Medizinstudium (1997-2004)

1999 ärztliche Vorprüfung (Physikum)
1999 - 2000 Austauschstudienjahr am University College Dublin im Rahmen eines ERASMUS-Stipendiums
2001 1. Ärztliche Prüfung
ab 2001 Dissertation am Institut für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
2003 2. Ärztliche Prüfung
2003/2004 Praktisches Jahr
- Urologie (Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika)
- Chirurgie (Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika)
- Innere Medizin (Universitätsklinik des Saarlandes)
Nov.2004 3. Ärztliche Prüfung
Seit 2005 Assistenzärztin für Urologie, Universitätsklinikum Carl-Gustav-Carus, Dresden

Publikationen, die im Zusammenhang mit der Dissertation entstanden sind

1. Rippel C., Plinkert P.K., Schick B.:
Expression von Proteinen der Cadherin- und Catenin Proteinfamilie bei Angiofibromen.

Laryngorhinootologie , May 2003; 83(5): 353-357

2. Auszugsweiser Vortrag auf der 86. Jahrestagung der
Südwestdeutschen Hals-Nase-Ohrenärzte, 27-28.09.2002

3. Schick B., Rippel C., Brunner C., Jung V., Plinkert P.K., Urbschat S:
Numerical sex chromosome aberrations in juvenile angiofibromas:
genetic evidence for an androgen-dependent tumor?

Oncology Report Sept-Oct 2003; 10(5): 125

