

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**p53 und Her2/neu im Juvenilen Angiofibrom**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von: Barbara Veldung

geb. am: 22. 08. 1978 in St.Ingbert

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung .....	5
3. Material.....	19
3.1 Bezugsquellen der Materialien.....	19
3.2 Lösungen und Puffer .....	20
3.3 DNA-Sonden.....	22
3.4 Primer .....	22
3.5 Kits für die PCR .....	25
3.6 Gewebeprobe.....	25
3.6.1 Tumorgewebe .....	25
3.6.2 Referenzgewebe.....	27
3.6.3 Tumorgewebe für die PCR .....	28
3.7 Geräte und Software.....	28
3.8 Abkürzungsverzeichnis .....	30
4. Methoden.....	32
4.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....	32
4.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Lymphozytenpräparat .....	32
4.1.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Tumorgewebeschnitt .....	33
4.1.3 Zellkernisolation .....	36
4.1.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Zellkernisolat .....	37
4.2 Polymerase-Kettenreaktion PCR .....	38
4.2.1 PCR.....	38
4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	48
4.2.3 PCR für $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor, Her2/neu und p53 .....	49

### III

4.2.4	Lasermikrodissektion.....	51
5.	Ergebnisse.....	53
5.1	FISH-Ergebnisse .....	53
5.1.1	FISH am Lymphozytenpräparat für p53 .....	53
5.1.2	FISH am Tumorgewebeschnitt für p53 .....	55
5.1.3	FISH am Zellkernisolat für p53 .....	67
5.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse für p53 .....	75
5.1.5	FISH am Lymphozytenpräparat für Her2/neu .....	80
5.1.6	FISH am Tumorgewebeschnitt für Her2/neu.....	82
5.1.7	FISH am Zellkernisolat für Her2/neu .....	89
5.1.8	Zusammenfassung der Ergebnisse für Her2/neu .....	94
5.2	PCR-Ergebnisse .....	98
5.2.1	Ergebnisse für $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor, Her2/neu und p53 aus Gesamt-Tumorgewebe .....	98
5.2.2	Ergebnisse von Stromazellen und Endothelzellen im Vergleich.....	98
5.2.3	Ergebnisse von Stromazellen.....	102
5.2.4	Ergebnisse von Endothelzellen.....	103
6.	Diskussion .....	105
7.	Literaturverzeichnis.....	114
8.	Danksagung .....	121
9.	Lebenslauf .....	123

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Intraoperative endoskopische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten. ....	6
Abbildung 2: Computertomographische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten. ....	6
Abbildung 3: Kernspintomographische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten. ....	7
Abbildung 4: Präoperative angiographische Darstellung der Gefäßversorgung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten vor Embolisation mit Darstellung eines stark vaskularisierten Tumors.....	8
Abbildung 5: Präoperative angiographische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten nach exzellenter Embolisation ohne weitere angiographische Tumordarstellung.....	8
Abbildung 6: Makroskopische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms.....	9
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung zur Erklärung der embryologischen Entwicklung eines juvenilen Angiofibroms .....	11
Abbildung 8: Schematische Darstellung der PCR.....	40
Abbildung 9: Schematische Darstellung der RT-PCR. ....	44
Abbildung 10: a-e: Lasermikrodissektion am Tumorgewebeschnitt.....	51
Abbildung 11: Mikroskopische Darstellung eines Lymphozyts, nach FISH-Untersuchung....	54
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung von Chromosom 17 und p53-Sonde an 200 Zellkernen eines Lymphozytenpräparates .....	55
Abbildung 13: Ergebnisse der FISH-Untersuchung mit Chromosom 17- und p53-Sonden am Tumorgewebeschnitt Nr. 29 an 100 Zellkernen als Diagramm.....	57
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Tumorgewebeschnitts Nr. 29... ..	58

Abbildung 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der zweiten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Chromosom 17- und p53-Sonde beim Tumorgewebeschnitt Nr. 29 an 200 Zellkernen als Diagramm.....	59
Abbildung 16: Mikroskopisches Bild des Tumorgewebeschnittes Nr. 46 nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	60
Abbildung 17: Zusammenfassung der Ergebnisse für die FISH-Untersuchung mit Chromosom 17- und p53-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 46 an 200 Zellkernen als Diagramm. ....	62
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Ergebnisse für die Zentromersonde 17 und p53-Sonde .....	63
Abbildung 19: FISH am Tumorgewebeschnitt Nr. 74.....	64
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung am Tumorgewebeschnitt Nr. 74 als Diagramm.....	65
Abbildung 21: Mikroskopische Darstellung des Tumorgewebeschnittes Nr. 89 nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der p53-Sonde(Cy3) und Zentromer17-Sonde(FITC) .....	66
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung des Tumorgewebeschnittes Nr. 89 .....	67
Abbildung 23: Graphische Darstellung Befunde der ersten FISH-Untersuchung am Zellkernisolat des Tumors Nr. 9. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt. ....	69
Abbildung 24: Mikroskopische Darstellung eines Zellkernisolates nach FISH bei Tumor Nr. 29. ....	70
Abbildung 25: Ergebnisse der zweiten FISH-Untersuchung am Zellkernisolat des Tumors Nr. 29 .....	71
Abbildung 26: Mikroskopische Darstellung der FISH-Untersuchung am Zellkernisolat des Tumors Nr. 31.....	72
Abbildung 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung für die p53-Sonde und Chromosom 17-Zentromersonde .....	73

## VI

Abbildung 28: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung des Tumors Nr. 113. ....	75
Abbildung 29: Gesamtergebnisse der Untersuchung von p53 und Chromosom 17 als Säulendiagramm. ....	80
Abbildung 30: Darstellung der Ergebnisse der Sondenaustestung am Lymphozytenpräparat für Her2/neu .....	81
Abbildung 31: Bild des Lymphozytenpräparates mit der Her2/neu-Sonde.....	82
Abbildung 32: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Tumors Nr. 29 für die Hybridisierung mit der Her2/neu- und Chromosom-17-Zentromersonde. ....	83
Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 46 als Säulendiagramm. ....	85
Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse für die Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 66 als Säulendiagramm.....	87
Abbildung 35: Darstellung der Ergebnisse für die Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 74 als Säulendiagramm.....	88
Abbildung 36: Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung von Her2/neu am Zellkernisolat Nr. 31 als Säulendiagramm .....	90
Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Zellkernisolates Nr. 31.....	90
Abbildung 38: Darstellung der Ergebnisse der Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat Nr. 89 als Säulendiagramm .....	92
Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat Nr. 89. ....	92
Abbildung 40: Darstellung der Ergebnisse für die Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat Nr. 113 als Säulendiagramm .....	94
Abbildung 41: Zusammenfassung der Ergebnisse aller Tumore für die Her2/neu Sonde .....	97

## VII

Abbildung 42: PCR der 28s-rRNA, $\beta$ -Catenin( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor(AR), p53 und Her2/neu an Bindegewebs- und Endothelzellen; gerade Zahlen: Stromazellen(S), ungerade Zahlen: Endothelzellen(E). .....	99
Abbildung 43: Tumor Nr. 30: PCR der 28s-rRNA, $\beta$ -Catenin( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor(AR), p53 und Her2/neu an Stroma(S)- und Endothelzellen(E). .....	99
Abbildung 44: Tumor Nr. 31: PCR der 28s-rRNA, $\beta$ -Catenin( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor(AR), p53 und Her2/neu an Stroma(S)- und Endothelzellen(E). .....	100
Abbildung 45: Tumor Nr. 46: PCR der 28s-rRNA, $\beta$ -Catenin( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor(AR), p53 und Her2/neu an Stroma(S)- und Endothelzellen(E). .....	100
Abbildung 46: Tumor Nr. 74: PCR der 28s-rRNA, $\beta$ -Catenin( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor(AR), p53 und Her2/neu an Stroma(S)- und Endothelzellen(E). .....	101
Abbildung 47: Tumor Nr. 89: PCR der 28s-rRNA, $\beta$ -Catenin( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor(AR), p53 und Her2/neu an Stroma(S)- und Endothelzellen(E). .....	101
Abbildung 48: Tumor Nr. 102 PCR der 28s-rRNA, $\beta$ -Catenin( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor(AR), p53 und Her2/neu an Stroma(S)- und Endothelzellen(E). .....	102

## 1. Zusammenfassung

Die vorgelegten Ergebnisse stellen eine Bereicherung in dem Bemühen der Entschlüsselung der Pathogenese des juvenilen Angiofibroms dar. Im ersten Abschnitt der Arbeit wurden mit der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) das Chromosom 17 mit einer Zentromersonde sowie die Gene p53 (17p13) und Her2/neu (17q11.2-q12) untersucht. In Vorarbeiten in Form von vergleichenden genomischen Hybridisierungen waren Hinweise auf Verluste des Chromosoms 17 zu erkennen gewesen, die es galt, in Form einer weiteren zytogenetischen Untersuchungstechnik zu überprüfen. Die FISH-Untersuchungen mit einer Zentromersonde für das Chromosom 17 sowie simultan für das Gen p53 beziehungsweise das Gen Her2/neu konnten signifikante Chromosom-17-Verluste in juvenilen Angiofibromen bestätigen.

Da die eigentliche Ursprungszelle des juvenilen Angiofibroms unbekannt ist und sowohl Endothelzellen als auch Fibroblasten als die eigentliche Tumorzelle diskutiert werden, wurde in einem zweiten Schritt der vorgelegten Arbeit die Expression der mRNA von p53 und Her2/neu zellspezifisch untersucht. Um dieses Ziel zu verfolgen, wurden Lasermikrodissektionen von Endothelzellen und Stromazellen juveniler Angiofibrome ausgeführt. Mit der Methode der RT-PCR wurden die mRNA-Transkripte amplifiziert und in einer semiquantitativen Untersuchungstechnik mit der Expression von 28s-rRNA verglichen. In diese Untersuchungen wurden Expressionsuntersuchungen von  $\beta$ -Catenin und dem Androgenrezeptor eingeschlossen. Sowohl  $\beta$ -Catenin als auch der Androgenrezeptor wurden als wesentliche pathogenetische Momente in der Molekularpathologie des juvenilen Angiofibroms zuvor beschrieben. Sowohl für  $\beta$ -Catenin und den Androgenrezeptor sowie das p53 und Her2/neu-Gen konnten in dieser semiquantitativen zellspezifischen Untersuchungstechnik keine wesentlichen Expressionsunterschiede auf RNA-Ebene zwischen den Endothelzellen und Stromazellen nachgewiesen werden, so dass die Antwort nach der Ursprungszelle des juvenilen Angiofibroms mit Hilfe der ausgeführten Untersuchungen unbeantwortet bleibt.

Die auf Genebene beobachteten p53-Verluste führten zur Arbeitshypothese, dass in Abwesenheit von mutiertem p53 und den bekannten  $\beta$ -Catenin-Mutationen sowie c-myc-Expressionen ein Verlust der p53-Schutzfunktion in juvenilen Angiofibromen vorliegt. Die Verluste für das Her2/neu-Gen sind dahingehend von Bedeutung, dass eine androgenunabhängige Her2/neu vermittelte Stimulation des Androgenrezeptors in juvenilen Angiofibromen



primär nicht zu erwarten ist. Im Rahmen einer zukünftigen spezifischen antiandrogenen Therapie beim juvenilen Angiofibrom ist auf dem Boden der vorgelegten Untersuchungen nicht primär mit einer Androgen-unabhängigen Her2/neu vermittelten Androgenrezeptor-Wachstumsstimulation im juvenilen Angiofibrom auszugehen.

## Summary

The results presented in this study contribute to improve understanding of juvenile angiofibroma pathogenesis. In the first section of the study, the method known as fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) was used to analyse chromosome 17, using a centromeric probe directed against chromosome 17 as well as probes directed against p53 gene and the Her2/neu gene. Previous comparative genomic hybridization studies had found evidence of chromosome 17 losses. The FISH examinations carried out using a centromeric probe for chromosome 17 and simultaneously for the p53 gene and/or the Her2/neu gene were able to confirm significant losses in chromosome 17, p53 gene and Her2/neu gene in juvenile angiofibromas.

Because the cell of tumour origin juvenile angiofibroma is still not known, and endothel cells as well as fibroblasts are currently under consideration as tumour cells, a second step was included in the study presented here, consisting of an examination in cell-specific terms of the expression level of the mRNA of the p53 gene and the Her2/neu gene. Pursuant to this objective, laser microdissections were carried out of the endothel cells and supporting cells in juvenile angiofibromas. Using the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, the mRNA transcripts were compared with the expression level of 28s-rRNA using a semi-quantitative testing technique. These tests also included examinations of the expression levels of  $\beta$ -catenin and of the androgen receptor. Both  $\beta$ -catenin and the androgen receptor have previously been described as significant pathogenetic candidates in the molecular pathology of juvenile angiofibromas. In respect of both  $\beta$ -catenin and the androgen receptor, and also of the p53 gene and the Her2/neu gene, this semi-quantitative, cell-specific examination technique was not able to detect any evidence of significant differences, on the RNA level, between the endothel cells and the supporting cells in terms of expression level, which means that even with the help of the examinations here carried out, the question of the tumor cell of juvenile angiofibroma remains unanswered.

The detected p53 gene losses have led to the working hypothesis that in the absence of mutated p53, known  $\beta$ -catenin mutations, and also of c-myc-expressions indicated by previous studies, juvenile angiofibromas are associated with a loss of the protective function of p53. The losses in respect of the Her2/neu gene are of significance insofar as an androgen-independent stimulation of the androgen receptor, generated by the Her2/neu, is based on these first Her2/neu examinations not likely in juvenile angiofibromas. Within the framework of a specific future antiandrogen-based therapy of juvenile angiofibromas, here reported find-

ings give a first link that an androgen-independent stimulation of the androgen receptor is not assumed in juvenile angiofibroma.

## **2. Einleitung**

Juvenile Angiofibrome sind seltene fibrovaskuläre Neubildungen, die nur einen Anteil von 0,5% aller Kopf- und Hals-Tumore bilden (Gullane und Mitarbeiter, 1992). In jüngster Zeit konnte in Dänemark eine Inzidenz des juvenilen Angiofibroms von 0,4 Tumore pro 1 Millionen Einwohnern berichtet werden (Glad und Mitarbeiter, 2007).

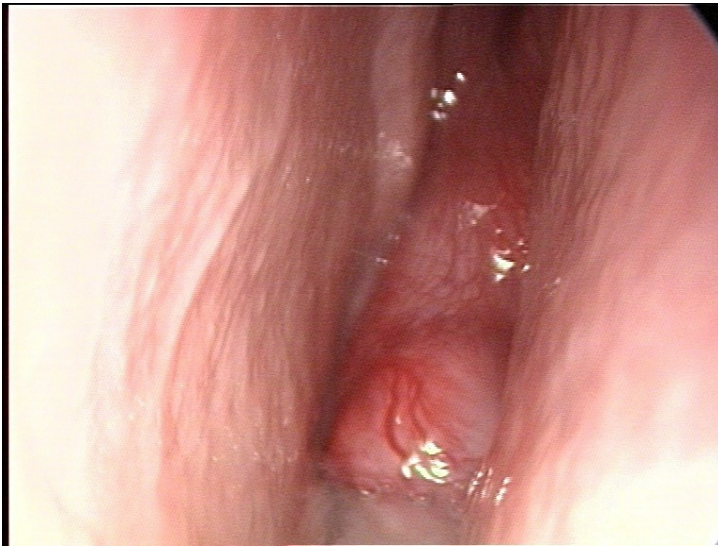
Der Tumor weist klinisch sehr charakteristische Besonderheiten auf (Schick und Urbschat, 2004). Das juvenile Angiofibrom entsteht im hinteren Abschnitt der Nasenhaupthöhle in Beziehung zum Foramen sphenopalatinum. Die Gefäßversorgung erfolgt hauptsächlich über die A. carotis externa in Form der A. maxillaris/A. sphenopalatina. In Einzelfällen ist aber ebenso eine weitere Gefäßversorgung aus dem C4-Segment der A. carotis interna zu beachten. Der Tumor manifestiert sich nahezu ausschließlich bei männlichen Jugendlichen. Klinisch zeigt die Neubildung trotz seiner histopathologischen gutartigen Einordnung häufig ein aggressives Wachstumsverhalten mit möglicher intrakranieller Tumorausdehnung (Schick und Kahle, 2000). Histologisch ist der Tumor durch eine Vielzahl irregulär konfigurierter Gefäße in einem kollagenreichen Tumorstroma gekennzeichnet (Beham und Mitarbeiter, 2000). Im Tumor sind desweiteren erhebliche Infiltrate verschiedener Entzündungszellen (u.a. Mastzellen, T-Lymphozyten) zu beachten (Wendler und Mitarbeiter, 2007).

### **Klinische Aspekte**

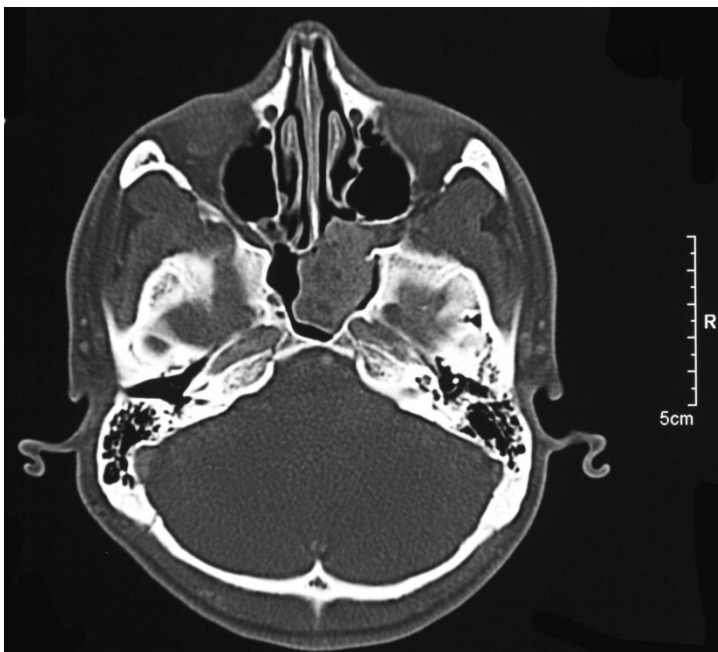
Patienten schildern als erste Symptome eine behinderte Nasenatmung und eine nasale Sprache. Auch rezidivierendes Nasenbluten sollte bei männlichen Jugendlichen an ein juveniles Angiofibrom denken lassen, muss aber nicht zwingend auftreten. Bei ausgedehnten Tumoren können die Patienten ein „froschähnliches“ Aussehen annehmen, was durch das Auseinanderweichen des Os maxillare und einen Exophthalmus bei Tumoreinbruch in die Kieferhöhle und die Augenhöhle bedingt ist.

Der Gefäßreichtum des Tumors und die irreguläre Gefäßwandarchitektur mit fehlender Kontraktionsmöglichkeit erklären die starke Blutungsneigung. Wegen der Gefahr erheblichen Blutverlustes wird bei den bereits sehr charakteristischen bildgebenden Untersuchungsbefunden auf eine Probebiopsie zur Diagnosesicherung verzichtet. Zur Diagnosesicherung werden nach einer nasalen Endoskopie (Abb.1) die bildgebenden Verfahren einer Computertomogra-

phie und Kernspintomographie ausgeführt. Die Computertomographie zeigt bei der Entstehung des Tumors in naher Beziehung zum Foramen sphenopalatinum häufig eine charakteristische Aufweitung des Foramen sphenopalatinum (Abb.2).



**Abbildung 1:** Intraoperative endoskopische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten.



**Abbildung 2:** Computertomographische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten mit Aufweitung des Foramen sphenopalatinum.

Bereits zu einem frühen Zeitpunkt dehnt sich der Tumor in den Nasenrachen aus, was zu der häufig irreführenden Bezeichnung des Tumors als Nasenrachenfibrom geführt hat (Schick und Kahle, 2000). Der Tumor kann durch Druckkarrosionen Knochen wie beispielsweise am

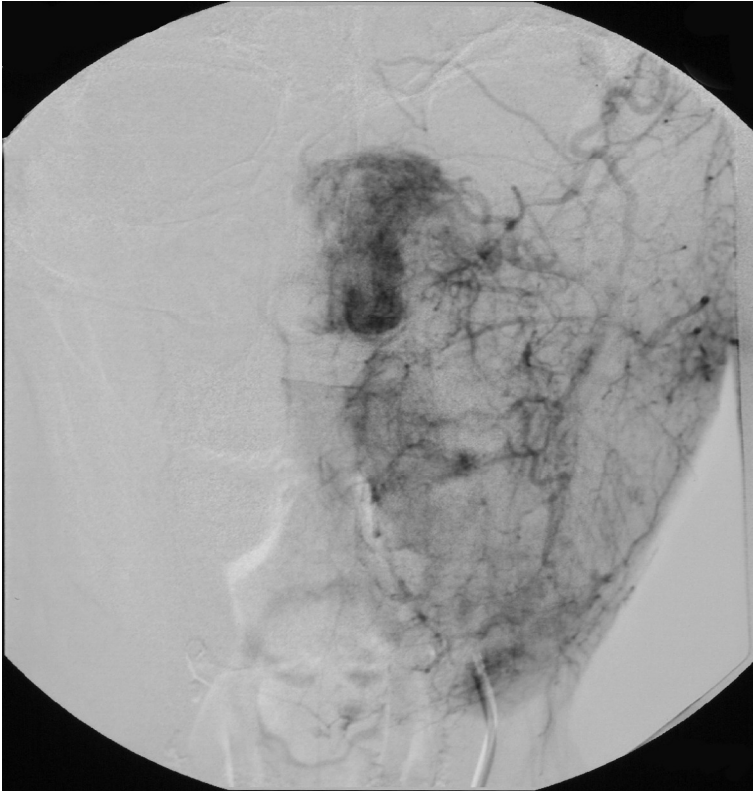
Klivus zerstören. Als wesentliche Ausdehnungswege nutzt er aber in erster Linie natürliche Spalten und Knochenkanäle. Der Tumor dehnt sich auf diese Weise in die Fossa pterygopalatina, die Fossa infratemporalis und die Augenhöhle aus. In Einzelfällen erreicht der Tumor den intrakraniellen Raum (Schick und Kahle, 2000).

Die Kernspintomographie bietet den besonderen Vorzug, Tumorgewebe von Schleimhautschwellungen und retiniertem Sekret in den Nasennebenhöhlen zu differenzieren (Abb. 3). In der Zusammenschau von Computertomographie und Kernspintomographie ist somit die exakte Darstellung der Tumorbegrenzung möglich.

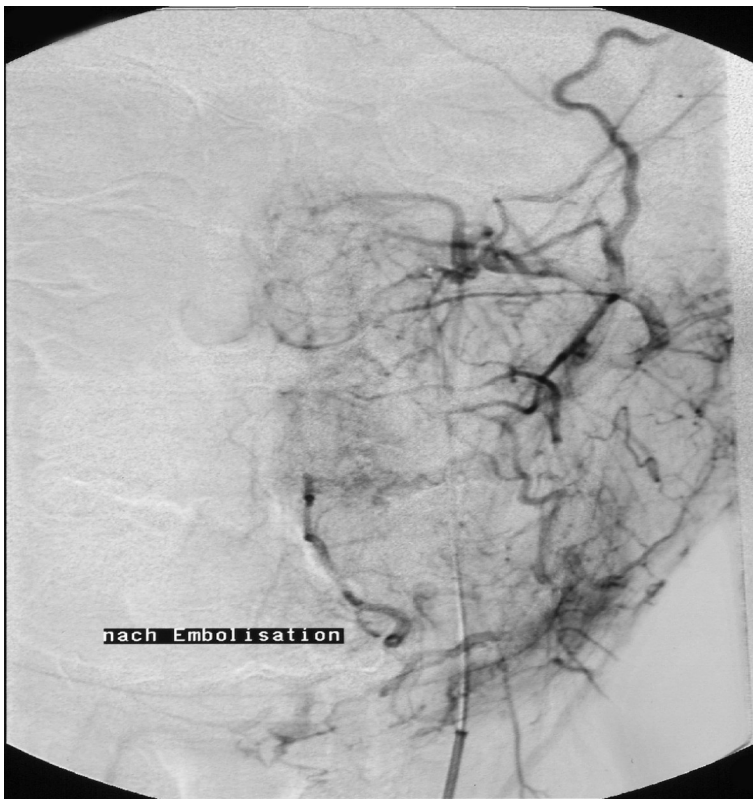


**Abbildung 3: Kernspintomographische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten. (\*) retiniertes Sekret**

Eine Angiographie wird präoperativ zur exakten Evaluation der Tumorgefäßversorgung ausgeführt und genutzt, um eine Tumorembolisation (Abb.4) auszuführen. Es lässt sich die genaue Blutversorgung des Tumors darstellen: Die Hauptgefäßversorgung erfolgt über die A. maxillaris, aber auch über die Aa. pharyngea ascendens, vertebralis und carotis interna. Bei Einbruch des Tumors in die Orbita können auch die Aa. meningea media, ophthalmica, ethmoidales und der Sinus cavernosus beteiligt sein.

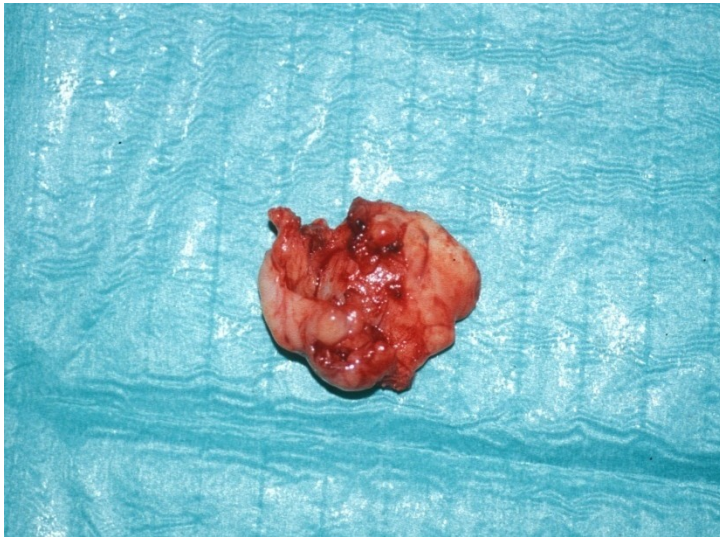


**Abbildung 4: Präoperative angiographische Darstellung der Gefäßversorgung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten vor Embolisation mit Darstellung eines stark vaskularisierten Tumors.**



**Abbildung 5: Präoperative angiographische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms bei einem 24-jährigen Patienten nach exzellenter Embolisation ohne weitere angiographische Tumordarstellung.**

Die gegenwärtige Therapie der Wahl des juvenilen Angiofibroms besteht in der kompletten Exstirpation des Tumorgewebes. Bei Anwendung mikroskopischer und endoskopischer Operationstechniken nach vorheriger Embolisation können vollständige Tumorresektionen in der Vielzahl der Fälle erreicht werden (Abb.6), wobei die Tumorgrosse Einfluss auf die Möglichkeit der vollständigen Resektion nimmt.



**Abbildung 6: Makroskopische Darstellung des juvenilen Angiofibroms. Der 3,5 x 3,5 x 4 cm grosse Tumor konnte endonasal unter Zuhilfenahme modernster endoskopisch und mikrochirurgischer Techniken in toto entfernt werden.**

Beachtet werden sollte, dass in Einzelfällen eine spontane Remission eines juvenilen Angiofibroms beobachtet wurde (Dohar und Duvall, 1992), ohne bisher klinische Kriterien zu besitzen, wann eine solche Rückbildung eintreten kann. Eine Radiotherapie wird nur bei inoperablen Fällen wegen der Gefahr der karzinogenen Effekte dieser Therapieoption durchgeführt. Bei inoperablen Tumoren konnte in Einzelfällen bemerkenswerterweise durch eine Chemotherapie eine Tumorrückbildung erreicht werden, so dass sie anstelle einer Strahlentherapie empfohlen wurde (Goepfert und Mitarbeiter, 1985; Schick und Mitarbeiter, 1996).

## **Ätiologie**

Trotz einer Vielzahl von Ursprungstheorien, die bis ins 19. Jahrhundert zurückreichen, ist die Ätiologie des Tumors nicht geklärt, was in der Vielfalt der Hypothesen, die überwiegend auf theoretischen Überlegungen basieren, zu erkennen ist. Sie reichen von der Vorstellung einer fibrösen Genese ausgehend vom Periost der Schädelbasis oder embryonalem Knorpelgewebe (Nealton, 1853; Verneuil, 1861; Tillaux, 1878), bis hin zur Annahme eines Gefäßtumors (Brunner, 1942; Schiff, 1959). Hormonelle Einflüsse in Form eines Androgenüberschusses bzw. eines Androgenmangels bei Östrogenüberschuss, wurden von Martin und Mitarbeitern



(1948) sowie von Dane (1954) und Härmä (1958) diskutiert. Die männlichen Patienten weisen jedoch keine veränderte Geschlechtsentwicklung auf, und die Serumkonzentrationen der Geschlechtshormone sind normal (Antonelli und Mitarbeiter, 1987). Veröffentlichungen, wonach der Tumor auch bei Frauen in sehr seltenen Fällen auftritt (Brooker und Mitarbeiter, 1989), werden sehr kritisch mit Anzweiflung der korrekten histopathologischen Einordnung des Tumors betrachtet.

Die Unsicherheit in der Einordnung der Ätiologie des juvenilen Angiofibroms spiegelt sich auch in Theorien wie der von Hughes (1941) wider, der die Entstehung aus Resten des Ductus craniopharyngeus annahm. Dahingegen glaubte Willis (1953) an eine Genese durch Autoimmunreaktionen. Die Entstehung aus nicht-chromaffinen Paraganglienzellen im Umgebungsabschnitt der A. maxillaris (Girgis und Fahmy, 1973) wurde ebenso diskutiert wie die Vorstellung eines Hamartoms in Form von versprengtem erektilen Gewebe des Schwellkörpers (Maurice und Milad, 1981) oder die Annahme eines Teratoms (Farag und Mitarbeiter, 1987).

Beham und Mitarbeiter (2000) ordneten Angiofibrome auf Grund von histomorphologischen Befunden als vaskuläre Fehlbildung ein. Schick und Mitarbeiter (2002) konnten hierfür eine sehr befriedigende embryologische Erklärung geben: durch die unvollständige Rückbildung der zwischen dem 22. und 24. Tag entstehenden ersten Pharyngealbogenarterie im Sinne eines Atavismus verbleiben am Foramen sphenopalatinum Plexusreste. Da die erste Pharyngealbogenarterie embryologisch eine Verbindung zwischen der späteren A. maxillaris und A. carotis interna ausbildet, kann ein sich auf dem Boden von Plexusresten entwickelnder Tumor sowohl vom Stromgebiet der A. carotis externa als auch der A. carotis interna versorgt werden, wie es für das juvenile Angiofibrom charakteristisch ist (Abb.7).

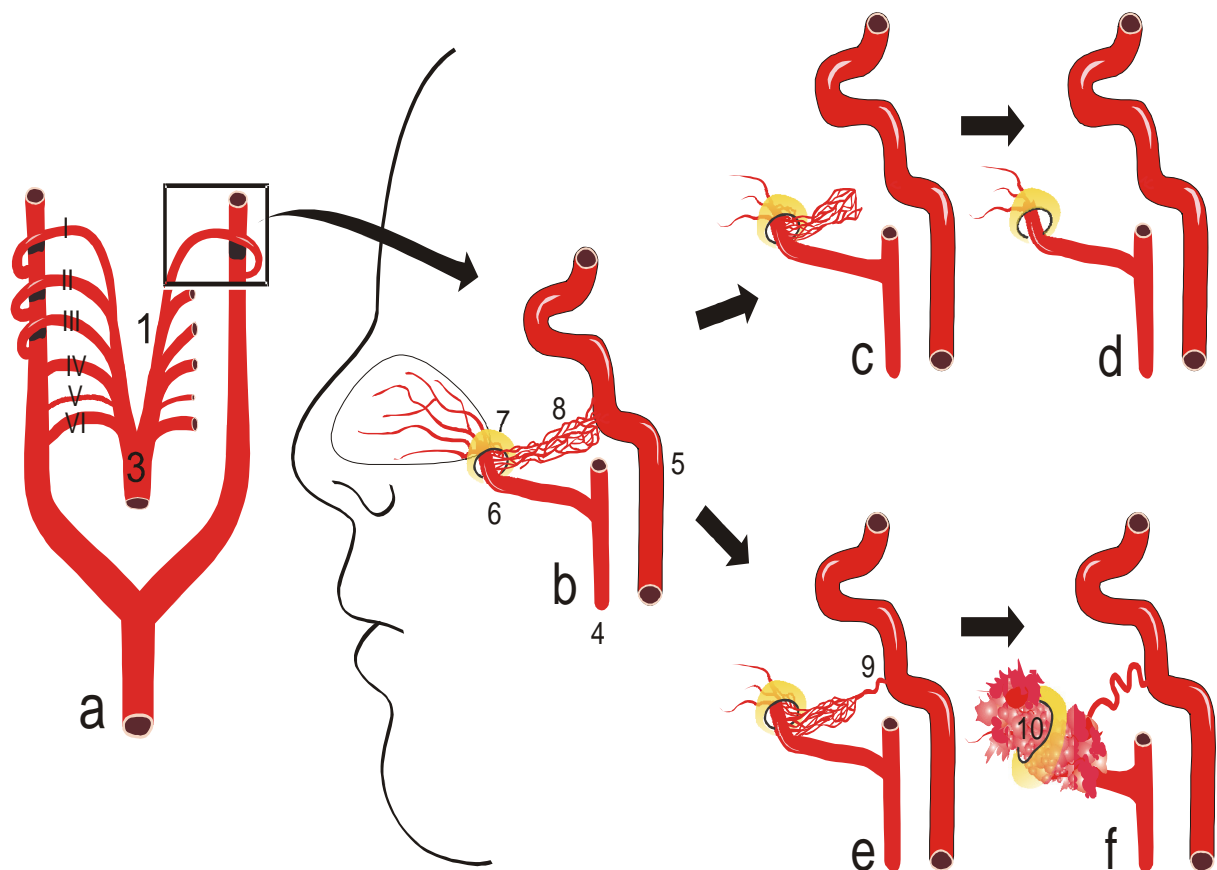


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung zur Erklärung der embryologischen Entwicklung eines juvenilen Angiofibroms (Schick und Mitarbeiter, 2002): Die Abbildungen a bis d stellen die reguläre Rückbildung der 1. Pharyngealbogenarterie dar, wohingegen die Abbildungen e bis f die Entwicklung eines Angiofibroms aus Plexusresten der 1. Pharyngealbogenarterie verdeutlichen. (1: ventrale Aorta, 3: Aufzweigung der ventralen Aorta, 4: A. carotis externa, 5: A. carotis interna, 6: A. sphenopalatina, 7: Foramen sphenopalatinum, 8: Plexusreste, 9: Plexusverbindung zur A. carotis interna, 10: Angiofibrom)

Die Annahme eines Atavismus der ersten Branchialbogenarterie kann erstmals die typische Lokalisation des juvenilen Angiofibroms im hinteren Abschnitt der Nasenhöhle und die Besonderheit der Tumervaskularisation (A. sphenopalatina und A. carotis interna) erklären.

### Genetik und Molekularbiologie des Tumors

Wenngleich der Tumor klinisch ausführlich charakterisiert ist, stehen genetische und molekularbiologische Untersuchungen des juvenilen Angiofibroms noch am Anfang. Die bisherigen Untersuchungen haben sich in erster Linie der Untersuchung von Steroidhormonrezeptoren, Wachstumsfaktoren, chromosomalen Veränderungen sowie ausgewählten Genen gewidmet.

### Steroidhormonrezeptoren

Die Entstehung des juvenilen Angiofibroms nahezu ausschließlich bei männlichen Jugendlichen hat vielfach das Forschungsinteresse auf die Analyse des Androgen-, Östrogen- und

Progesteronrezeptors gerichtet. Zur Anwendung kamen nach ersten Bindungsassaystudien immunhistologische Untersuchungen. Die verschiedenen Berichte beschreiben allerdings sehr unterschiedliche Expressionsraten der Rezeptoren im juvenilen Angiofibrom. Der Androgenrezeptor wurde in 25-100%, der Östrogenrezeptor  $\alpha$  in 0-25%, der Östrogenrezeptor  $\beta$  in nur einer Untersuchung in 100% und der Progesteronrezeptor in 0-58% der untersuchten Angiofibrome detektiert (Tabelle 1). Aufgrund dieser bisher sehr widersprüchlichen Literaturmitteilungen kann daher keine sichere Aussage zur Expression der Hormonrezeptoren im juvenilen Angiofibrom getroffen werden.

Autor	Anzahl der untersuchten Angiofibrome	Anzahl der Tumore positiv für Androgenrezeptor	Anzahl der Tumore positiv für Östrogenrezeptor	Anzahl der Tumore positiv für Progesteronrezeptor
Johns und Mitarbeiter (1980)	6	nicht untersucht	0	nicht untersucht
Lee und Mitarbeiter (1980)	8	3	0	0
Farag und Mitarbeiter (1987)	7	7	0	nicht untersucht
Antonelli und Mitarbeiter (1987)	5	5	0	0
Brentani und Mitarbeiter (1989)	12	3	3	7

Hwang und Mitarbeiter (1998)	24	18	0	2
Gatalica und Mitarbeiter (1998)	8	8	0	0
Saylam und Mitarbeiter (2006)	27	nicht untersucht	2	9
Montag und Mitarbeiter (2006)	13	5	13*	0

**Tabelle 1: Zusammenfassung der Analyse vor Steroidhormonrezeptorenexpressionen in juvenilen Angiofibromen.**  
\* Östrogenrezeptor- $\beta$ -Expression

Neben diesen Hormonrezeptorstudien existieren Erfahrungen mit Hormontherapien vor einer Tumorresektion, die mit dem Ziel einer Tumorverkleinerung ausgeführt wurden. Testosterongaben führten bei Patienten mit einem juvenilen Angiofibrom zu einem Tumorwachstum (Johnson und Mitarbeiter, 1966). Flutamid als partieller Androgenantagonist hat bei 4 von 5 Tumoren zu einer Tumorreduktion von maximal 44% geführt (Gates und Mitarbeiter, 1992). In einer zweiten prospektiven Untersuchung wurde bei 7 Angiofibromen eine maximale Tumolvolumenreduktion von nur 11,1% nach der Gabe von Flutamid beobachtet (Labra und Mitarbeiter, 2004). Präoperative Östrogengaben wurden mit den Effekten einer Reduktion des intraoperativen Blutverlustes und einer Zunahme des fibrotischen Tumoranteils berichtet (Küttner und Mitarbeiter, 1977; Ganzer und Meyer-Breiting, 1975). Im Gegensatz hierzu wurden auch Tumorvergrößerungen unter einer Östrogentherapie mitgeteilt (Hulthen und Torremalm, 1976).

### **Wachstumsfaktoren**

Als erste Wachstumsfaktoren wurden VEGF, TGF- $\beta$ , bFGF, PDGF-B und IGF-II im juvenilen Angiofibrom analysiert. VEGF und TGF- $\beta$  wurden immunhistochemisch in Stromazellen und Gefäßen nachgewiesen (Brieger und Mitarbeiter, 2004; Folkman, 2002). Beide Wachstumsfaktoren werden von den verschiedenen Autoren in erster Linie im Zusammenhang mit der Tumorangiogenese diskutiert. Gleichartige Wirkungen werden für bFGF (bisher Immunhistologie, Western blot) und PDGF-B (Northern blot) angenommen. In 53% der untersuchten Angiofibrome zeigten Northern blot und PCR-Untersuchungen erhöhte IGF-II-Expressionen, die in den Zusammenhang eines Proliferationsstimulus gesetzt wurden (Nagai und Mitarbeiter, 1996; Coutinho-Camillo und Mitarbeiter, 2003).

### **Genetische Untersuchungsbefunde**

Die genetische Analyse des juvenilen Angiofibroms begann mit der Analyse von 3 juvenilen Angiofibromen mit der Technik der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH). In dieser Pilotstudie zeigten sich eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen. Gewinne des X-Chromosoms und Verluste des Y-Chromosoms waren bei 2 der 3 untersuchten Tumoren zu beobachten. Bei allen 3 Patienten war ein Gewinn in der Region 8q12-q22 festzustellen. Weitere chromosomale Gewinne zeigten sich für die Abschnitte 4q, 5p, 6q, 7q, 12q, 13q, 14q, 18q, 21q. Chromosomale Verluste wurden ferner in den Bereichen 17, 19p und 22q beobachtet (Schick und Mitarbeiter, 2001). CGH-Analysen an weiteren 7 bzw. 29 Tumorproben bestätigten den Befund vielfältiger chromosomaler Aberrationen in dem Tumor (Brunner und Mitarbeiter, 2003; Schick und Mitarbeiter, 2007). Als wichtige Konsensusregionen wurden in diesen Untersuchungen Gewinne in den Bereichen 4q, 6, 12 und X sowie Verluste in den Bereichen 8,16, 17, 22 und Y bestimmt (Schick und Mitarbeiter, 2007). CGH-Untersuchungen an formalin-fixiertem Gewebe zeigt Gewinne in den Bereichen 1p, 9q, 10q, 12q, 16, 17q, 19, 20q und 22q und Verluste im Bereich des Chromosoms 4 sowie Veränderungen im Bereich der Geschlechtschromosomen (Heinrich und Mitarbeiter, 2007).

Genomische DNA-Array-Untersuchungen von 2 juvenilen Angiofibromen zeigten Hinweise auf eine Amplifikation des MDM2- und AURKA-Gens (Schick und Mitarbeiter, 2007). Wenngleich diese Kandidaten interessante Erklärungsansätze für die beobachtete chromosomale Instabilität bieten, ist die Expression und die Bedeutung dieser beiden Faktoren im juvenilen Angiofibrom bisher nicht weiter untersucht worden.

Die Aberrationen der Geschlechtschromosomen konnten durch FISH-Studien mit zentromerspezifischen Sonden für die Chromosomen X und Y und für das auf dem Chromosom X lokalisierte Androgenrezeptor-Gen an Paraffingewebeschnitten von Angiofibromen bestätigt werden (Schick und Mitarbeiter, 2003). Der in den CGH-Untersuchungen beobachtete Y-Verlust wurde durch FISH-Untersuchungen bei sechs von sieben Angiofibromen bestätigt - mit dem Ergebnis eines Y-Verlustes in 11,5-63,8 % der ausgewerteten 200 Zellkerne. Bei fünf der sieben Angiofibrome konnte ein zweites X-Chromosom in 12 bis 34 % beobachtet werden. Ohne den Hinweis auf eine Amplifikation des Androgenrezeptorgens ging die Verdopplung des Chromosoms X mit zwei Androgenrezeptorsignalen einher, so dass durch den Gewinn des Chromosom X ein Gewinn des Androgenrezeptor-Gens in juvenilen Angiofibromen vorliegt.

Im Zentrum der Bemühungen der Validierung der beobachteten chromosomalen Veränderungen am Chromosom 8 war in einer weiteren Untersuchung die Analyse des c-MYC-Onkogens. FISH-Analysen zeigten bei Tumoren in den Tumorstadium II nach Andrews und Mitarbeitern (1989) signifikante Verluste des c-MYC-Gens. Hingegen war bei fortgeschrittenen Tumoren (Tumorstadium III und IV) eine genetische Heterogenität des c-MYC-Gens zu beobachten, die mit deutlich erhöhten Expressionen auf Transkript- und Translationsebene assoziiert waren (Schick und Mitarbeiter, 2006).

Weitere molekulargenetische Untersuchungen zeigten im Rahmen der Untersuchung der K-ras- und Ha-ras-Genfamilien keine Veränderungen dieser Gene in juvenilen Angiofibromen (Coutinho-Camillo und Mitarbeiter, 1999), so dass von keiner Beteiligung des RAS-Signaltransduktionsweges beim juvenilen Angiofibrom ausgegangen wird.

Ein gänzlich anderer Zugang zur Tumorpathologie wurde auf dem Boden einer interessanten klinischen Beobachtung gewählt. Giardello und Mitarbeiter beobachteten in einer klinischen Studie (1993) ein gehäuftes Auftreten von juvenilen Angiofibromen bei familiärer adenomatöser Polyposis coli (FAP). Bei FAP-Patienten manifestierten sich juvenile Angiofibrome 25mal häufiger als bei der Normalbevölkerung. Die familiäre adenomatöse Polyposis-coli-Erkrankung ist eine autosomal-dominante Erkrankung, die durch eine Mutation des APC-Gens auf Chromosom 5q entsteht. Das Krankheitsbild äussert sich durch Bildung multipler Adenome des Gastrointestinaltraktes, aus denen sich periampulläre und kolorektale Karzinome entwickeln. Häufig geht das Krankheitsbild mit der Bildung anderer benignen und malignen Tumore, wie Osteome, Desmoide, Schilddrüsentumore, Leber- und Gehirntumoren einher

(Klemmer und Mitarbeiter, 1987). Dieser Zusammenhang ließ eine Veränderung im APC-Gen beim juvenilen Angiofibrom vermuten. Es war daher berechtigt zu diskutieren, ob Angiofibrome durch Veränderungen im APC-Gen (adenomatöses Polyposis coli-Gen) entstehen können, wodurch die zelluläre Funktion von APC als Mediator des Abbaus von zytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin aufgehoben wird. Guertl und Mitarbeiter (2000) konnten jedoch keine Mutationen des APC-Gens in elf untersuchten juvenilen Angiofibromen nachweisen (Guertl und Mitarbeiter, 2000). Demgegenüber wurde bei 1 von 4 Patienten mit einer FAP eine Mutation im APC-Gen nachgewiesen (Ponti und Mitarbeiter, 2008).

In 80 % der erblichen Kolonkarzinome ist das APC-Gen mutiert, so dass der feinregulierte Abbau von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma verhindert wird und sich  $\beta$ -Catenin im Kern anreichert. Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde aber deutlich, dass eine derartige Anreicherung von  $\beta$ -Catenin auch durch Mutationen des  $\beta$ -Catenins hervorgerufen werden kann. Mutationen des  $\beta$ -Catenins führen hierbei zu einer Stabilisierung des  $\beta$ -Catenins. In der Folge kann das mutierte  $\beta$ -Catenin nicht degradiert werden (Guertl und Mitarbeiter, 2001). Basierend auf diesem Wissen analysierten Abraham und Mitarbeiter (2001) das  $\beta$ -Catenin-Gen in juvenilen Angiofibromen und konnten in 75% der Neubildungen Mutationen im Exon 3 des  $\beta$ -Catenin-Gens nachweisen. Immunhistologische Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten betonte nukleäre Anreicherungen des  $\beta$ -Catenin-Proteins in Stromazellen (Abraham und Mitarbeiter, 2001).

Keine der bisher ausgeführten Untersuchungen konnte die Tumorzelle des juvenilen Angiofibroms zweifelsfrei detektieren.

## ZIELSETZUNG

Mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) konnten vielfältige quantitative chromosomale Veränderungen in juvenilen Angiofibromen nachgewiesen werden (Schick und Mitarbeiter, 2001; Brunner und Mitarbeiter, 2003; Schick und Mitarbeiter, 2007; Heinrich und Mitarbeiter, 2007). Es konnten sowohl Gewinne als auch Verluste aufgezeigt werden. Für das Chromosom 17 wurden bisher ausschließlich Verluste detektiert, die in der Synopsis aller Untersuchungsbefunde häufig beobachtet wurden. Eine Validierung dieser Beobachtung durch eine weitere Untersuchungstechnik war bisher nicht erfolgt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Promotionsschrift ist die Überprüfung des Untersuchungsbefundes von Verlusten des Chromosoms 17 durch die FISH-Analyse jeweils eines Gens lokalisiert auf dem Chromosomenabschnitten 17q und 17p in Kombination mit einer Zentromersonde. Als Zielgene wurden p53 (17p13) und Her2/neu (17q11.2-q12) gewählt, für die Veränderungen bei einer Vielzahl von Tumoren bekannt sind. p53 ist eines der meist untersuchten Tumorsuppressor-Gene. Physiologisch ist p53 an der Kontrolle des Zell-Zyklus und der Apoptose beteiligt. Die Schutzwirkung von p53 bei plötzlichen DNA-Veränderungen mit möglicher Aktivierung von Onkogenen (Vousden, 2002) ist von großer Bedeutung. p53 ist daher ein interessantes Kandidaten-Gen, um die beschriebenen CGH-Untersuchungsbefunde zu überprüfen und gleichzeitig weitere Einblicke in die molekularpathologischen Ursachen des juvenilen Angiofibroms zu erhalten.

Unter Berücksichtigung der wichtigen Rolle des Androgenrezeptors beim juvenilen Angiofibrom (Schick und Mitarbeiter, 2003) mit der grundsätzlichen Möglichkeit einer androgenunabhängigen Stimulation des Androgenrezeptors durch Her2/neu, wie dies für das Prostata-Karzinom gezeigt werden konnte, ist das Her2/neu-Onkogen ein zweites äußerst interessantes Zielgen in dem Bemühen um die Entschlüsselung der Molekularpathologie des juvenilen Angiofibroms und einer Überprüfung des CGH-Befundes häufiger Verluste des Chromosoms 17.

In Anbetracht der zellulären Heterogenität des Tumors, war das zweite Ziel der Arbeit die Expression von p53 und Her2/neu sowie weiteren Kandidaten (Androgenrezeptor,  $\beta$ -Catenin) auf Transkriptionsebene getrennt für die vaskuläre und stromale Tumorkomponente zu analysieren. Diese Untersuchungen verfolgen das Ziel, mögliche Hinweise auf Transkriptionsunterschiede in den verschiedenen Komponenten des Tumors und damit einen möglichen Hinweis auf die bisher nicht definierte Tumorzelle des juvenilen Angiofibroms zu erhalten.



Ziel dieser Arbeit ist zusammenfassend die Detektion der beiden Gene p53 und Her2/neu mittels FISH-Untersuchungen zur Validierung beobachteter Chromosom 17-Verluste in juvenilen Angiofibromen sowie eine zellspezifische Expressionsanalyse auf Transkriptionsebene, um mögliche Hinweise einer Bedeutung von Genverlusten in unterschiedlichen Komponenten des Tumors zu erhalten.

### **3. Material**

#### **3.1 Bezugsquellen der Materialien**

Ethanol: MERCK, Deutschland

Fixogum: MARABU, Deutschland

Formaldehyd: MERCK, Deutschland

Paraformaldehyd: MERCK, Deutschland

Pepsin: SERVA, Deutschland

Proteinase K: ROCHE, Deutschland

RNase: SIGMA, Deutschland

Xylol: MERCK, Deutschland

Colcemid: INVITROGEN, Deutschland

KCl: MERCK, Deutschland

HCl: MERCK, Deutschland

NaPO<sub>4</sub>: MERCK, Deutschland

Paraffin: SHERWOOD MEDICA, USA

Aceton: MERCK, Deutschland

Triethoxy-Silyl-propylan (Silan) : MERCK, 821619, Deutschland

Pretreatmentpulver: ONCOR, USA

Agarose: ROCHE, Deutschland

Kieselgel: MERCK, Deutschland

Ethidiumbromid: MERCK, Deutschland

Bromphenolblau (0,25%): SIGMA, Deutschland

Glycerin: MERCK, Deutschland

NaCl: MERCK, Deutschland

Natriumcitrat: MERCK, Deutschland

Methanol: MERCK, Deutschland

Eisessig: MERCK, Deutschland

Antifade: VECTOR LABORATORIES, Inc., Burlingame, CA 94010

### **3.2 Lösungen und Puffer**

#### **Formamid deionisiert:**

pro 100 ml Formamid 10 g Mischbettionenaustauscher (SIGMA, Deutschland, Lot. 86H1369) zusetzen, 1 h bei RT rühren, filtrieren.

#### **HE-Färbung:**

Mayer`s Hämatoxylin, MERCK, Deutschland.

#### **Eosin-Lösung:**

1 % Eosin in H<sub>2</sub>O dest. pro 100 µl Lösung mit 20 µl Eisessig.

#### **Paraformaldehyd:**

4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS (pH=7,4) unter Erhitzen lösen, filtrieren und auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

#### **PBS (gepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco):**

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1 Liter Aqua dest., pH 7,4 einstellen.

#### **PBS/PFA:**

4 g PFA (MERCK, Deutschland) in 100 ml PBS.

**Pepsin:**

10 % Pepsin in Aqua dest. bei Raumtemperatur lösen, bei  $-20^{\circ}$  C aufbewahren.

**Proteinase-K-Stammlösung:**

aus Pretreatment-Kit.

**RNase A :**

ROCHE, Deutschland

50 mg in 5 ml 2 x SSC 10 min kochen lassen (zerstört die DNase-Aktivität), auf Eis abkühlen und in Aliquots von 100  $\mu$ l bei  $-20^{\circ}$  C aufbewahren.

**20 x SSC:**

3,0 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat und auf pH=6,8 einstellen.

**Komplettmedium:**

PB Max (Difco) Lot.Nr. : 1125372

**Fixans:**

3 Teile Methanol + 1 Teil Eisessig

**DAPI:**

1  $\mu$ g DAPI/ ml gemischt mit 180  $\mu$ l McIlvaines Puffer

**McIlvaines Puffer:**

8 Teile 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 2 Teile 0,1 M Natriumcitrat

**Lysepuffer für die PCR:**

10  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol/ml RLT-Puffer (aus RNeasy Mini Kit 50, QIAGEN, Lot.Nr. : 74104)

**RDD-Puffer:**

DNase I, RNase free aus RNase free DNase-Set Kit QIAGEN, Lot.Nr. :7954

**Laufpuffer:**

Tris-Acetat-TAE

**TBE-Puffer:**

1 mol/ml Tris, 0,83 mol/l Borsäure, 10 mol/l EDTA x 2H<sub>2</sub>O

**RLT-Puffer:**

RNase free DNase-Set Kit QUIAGEN, Lot.Nr. :7954

**3.3 DNA-Sonden**

Chromosom 17p12 (Her2/neu) / Alphasatellite 17 Cocktail Probe, Dual colour, Direct labelled; Cat. no.: PONC1712; QBIOSYSTEMS, Deutschland

Chromosome17 p13 (p53) / Alphasatellite 17 Cocktail Probe, Dual colour directed labelled; Cat. no: PONC1753, QBIOSYSTEMS, Deutschland

**3.4 Primer**

28-sRNA for: 5'-TTGAAAATCCGGGGGAGAG-3'

Molekulargewicht: 5941,9

T<sub>m</sub>: 60,6 °C

QIAGEN Operon

28-sRNA rev: 5'-ACATTGTTCCAACATGCCAG-3'

Molekulargewicht: 6060,97

T<sub>m</sub>: 58,35 °C

QIAGEN Operon

β-Catenin for: 5'-AAAGCGGCTGTTAGTTAGTCACTGG-3'

Molekulargewicht: 6486,24

Tm: 62,57 °C

QIAGEN Operon

β-Catenin rev: 5'-GACTTGGGAGGTATCCACATCC-3'

Molekulargewicht: 6735,39

Tm: 64,54 °C

QIAGEN Operon

Androgenrezeptor for: 5'-TCTCACCAAGCTCCTGGACTC-3'

Molekulargewicht: 5997,89

Tm: 64,5 °C

QIAGEN Operon

Androgenrezeptor rev: 5'-CAGGCAGAAGACATCTGAAAG-3'

Molekulargewicht: 6497,27

Tm: 60,61 °C

QIAGEN Operon

Her2/neu for: 5'- CCAGGACCTGCTGAACTGGT-3'

Molekulargewicht: 6117,98

Tm: 64,5 °C

QIAGEN Operon

Her2/neu rev: 5'-TGTACGAGCCGCACATCC-3'

Molekulargewicht: 5444,54

Tm: 62,18 °C

QIAGEN Operon

p53 for: 5'-TTCCTAGCACTGCCCAACA-3'

Molekulargewicht: 5692,71

Tm: 60,16 °C

QIAGEN Operon

p53 rev: 5'-GACTGGAACTTTCCACTTG-3'

Molekulargewicht: 6091,99

Tm: 58,35 °C

QIAGEN Operon

DNA-Leiter: peqGOLD 50bp

Lot-Nr. : 1381

Konzentration: 0,5 mg DNA/ml

Bestell-Nr. : 25-2001 5x 50 µg 2x 1ml Ladepuffer (6x)

PEQLAB, Deutschland

### **3.5 Kits für die PCR**

RNeasy Mini Kit (50)

QIAGEN

Nr. :74104

RNase-free DNase-Set, Kit

QIAGEN

Nr. :7954

Omniscript Reverse Transcriptase Kit

QIAGEN

Nr. :205111

### **3.6 Gewebeproben**

#### **3.6.1 Tumorgewebe**

Freundlicherweise wurde uns Angiofibromgewebe vom Städtischen Klinikum Fulda (Direktor: Prof. Dr. W. Draf), der Universitäts-HNO-Klinik Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H.P. Zenner) und der Universitätsklinik Würzburg (Direktor: Prof. Dr. J. Helms) zur Verfügung gestellt. In HE-Färbungen und ausführlichen immunhistologischen Untersuchungen (CD34, CD31, Faktor VIII-Antigen, NSE, Vimentin S-100) konnte bei allen männlichen Patienten die Diagnose eines juvenilen Angiofibroms belegt werden. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der Tumorstadien der untersuchten juvenilen Angiofibrome entsprechend dem Klassifizierungsvorschlag von Andrews und Mitarbeitern (1989).



Tumor-Nr.	Tumorstadium
Tumor 29	II
Tumor 30	II
Tumor 31	II
Tumor 46	IIIa
Tumor 66	II
Tumor 74	IIIb
Tumor 89	IIIb
Tumor 102	IIIb

**Tabelle 2: Darstellung des Tumorstadiums der untersuchten juvenilen Angiofibrome.**

Die Einteilung des juvenilen Angiofibroms erfolgt nach Andrews und Mitarbeiter (1989):

**Stadium I:** Der Tumor ist auf den Nasopharynx und die Nasenhaupthöhle begrenzt. Die Knochendestruktion ist gering oder auf das Foramen sphenopalatinum beschränkt.

**Stadium II:** Der Tumor dehnt sich bis in die Fossa pterygopalatina aus und kann durch Knochendestruktion in die Nasennebenhöhlen vordringen.

**Stadium IIIa:** Der Tumor wächst in die Fossa infraorbitalis oder in die Orbita, dringt aber nicht bis ins Gehirn vor.

**Stadium IIIb:** Der Tumor dringt in die Fossa infratemporalis und Orbita ein und zeigt eine intrakranielle extradurale Tumorausdehnung.

**Stadium IVa:** Der Tumor dringt nach intradural vor, infiltriert aber noch nicht das Chiasma opticum oder den Sinus cavernosus.

**Stadium IVb:** Der Tumor zeigt eine intrakranielle intradurale Tumorausdehnung und infiltriert das Chiasma opticum oder den Sinus cavernosus

### 3.6.2 Referenzgewebe

Als Referenzgewebe diente uns ein aus männlichem Blut gewonnenes Lymphozytenpräparat. Dazu wurden in eine Kulturflasche 8 ml Kompletmedium PB-Max der Firma Difco (Lot.-Nr. 1125372) gefüllt und 800 µl Lithium-Heparinblut hinzugegeben. Das Gemisch wurde in der Kulturflasche 69 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach genau 69 Stunden werden 200 µl Colcemid hinzugegeben. Colcemid ist ein Spindelgift, das die Zellteilung in der Metaphase stoppt (Bayani und Squire, 2004). Das Gemisch wurde zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

#### Chromosomenpräparation

Nach genau zwei Stunden resuspendiert man die Blutkultur mit einer Pasteurpipette und überführt sie in ein Spitzröhrchen mit Deckel. Das Röhrchen wird zehn Minuten bei 800 upm zentrifugiert. Den Überstand saugt man mit der Pasteurpipette und der Wasserstrahlpumpe vorsichtig bis zum Knick des Spitzröhrchens ab. Mit einer zweiten Pasteurpipette wird das Pellet vorsichtig resuspendiert. Eine neue Pasteurpipette wird mit 0,52 %-igem KCl gefüllt, das vorher auf 37 °C erwärmt wurde. KCl bläht die Zellen auf und verbessert die Darstellung der Chromosomen. Man füllt das Pellet mit dem Inhalt der Pipette auf und resuspendiert sofort das Pellet aus der anderen Pipette. Ab diesem Zeitpunkt dauert es neuneinhalb Minuten

bis zur Zentrifugation. Vorher werden noch drei Pasteurpipetten 0,069 M KCl hinzugegeben und vorsichtig resuspendiert. Das Röhrchen wird nach Ablauf der 9,5 Minuten während zehn Minuten bei 800 upm zentrifugiert. Mit der Wasserstrahlpumpe wird der Überstand abgesaugt.

### **Fixierung der Chromosomen**

Das Fixans wird aus drei Teilen Methanol und einem Teil Eisessig bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  angesetzt und davon fünf Tropfen auf das Pellet pipettiert und gut gemischt. Anschließend gibt man je eine Pasteurpipette Fixans hinzu und resuspendiert. Es werden nochmals zwei Pasteurpipetten Fixans hinzugegeben und resuspendiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  wird bei 800 upm zehn Minuten lang zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Erneut werden nacheinander vier Pasteurpipetten Fixans hinzugegeben, resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Zyklus wird noch zweimal wiederholt, und nach dem letzten Absaugen des Überstandes wird das Pellet, in dem sich nun die aufgeblähten fixierten Lymphozyten befinden, in etwa 1,5 ml Fixans aufgenommen. Objektträger werden auf ein feuchtes Tuch gelegt und ein Tropfen Pellet auf jeden Objektträger gegeben. Die Objektträger bleiben bis zur Trocknung des Fixans auf dem feuchten Tuch liegen.

### **Lagerung der Chromosomenpräparate**

Die Objektträger wurden in einem Exsikator trocken gelagert, der mit Kieselgel ausgelegt war. Die Lagerung erfolgte bei Unterdruck und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , um ein Aufquellen der Lymphozyten zu verhindern.

## **3.6.3 Tumorgewebe für die PCR**

Das Tumorgewebe wurde als Kryogewebe in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Gewinnung von Tumorgewebe wird es kurzfristig aus dem Stickstoff entfernt und die benötigte Menge mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Restgewebe bleibt für spätere Versuche eingefroren.

## **3.7 Geräte und Software**

Deckgläser: 15 x 15 mm und 24 x 60 mm (MENZEL-GLÄSER, Deutschland)

Objektträger: 72 x 26 mm (MENZEL-GLÄSER, Deutschland)

Skalpell: MARTIN, Deutschland

Zentrifuge: HERAEUS, Deutschland

Heizplatte: MEDAX, Deutschland

Progene: TECHNE, England

Wärmeschrank: HERAEUS, Deutschland

Mikrotom: CM 30505 (LEICA, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop: OLYMPUS BX61, Japan

Ultra turrax T25 basic IKA

Qiashredder QIAGEN Kat.Nr. :79654

Photometer: Ultrospec®3000 UV/Visible Spectrophotometer, PHARMACIA Biotech, Cambridge

Cycler: MJ Research, PTC-200 Peltier

UV-Transilluminator

Kamera für PCR: IMAGO (B& L Systems, Niederlande)

PC: Metasystems, ISIS-Software

PC für Lasermikrodissektion: PALM Laser-Micro Beam System (P.A.L.M., Deutschland)

Vortexer: VFI, Janke&Kunkel GmbH IKA Labortechnik, Staufen

Elktrophoresekammer: Easy Cabt, Electrophoresis System, OWI Scientific Inc, Wobum/MA, USA

### 3.8 Abkürzungsverzeichnis

#	Chromosom
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
APC	adenomatöse Polyposis coli
Aqua dest.	Aqua destillata
a.d.	Aqua destillata
CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung
DAPI	4-6-Diamino-2-Phenylindol
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat-Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinthiocyanat
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hyb-Mix	Hybridisierungsmix
IGF	Insulin-like growth factor
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Na	Natrium
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SSC	Standard sodium citrate
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TGF	Tumor growth factor
Tm	Schmelztemperatur
TRIS	2- Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor

## **4. Methoden**

### **4.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

#### **4.1.1 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Lymphozytenpräparat**

Die Sondenaustestung erfolgte mit Hilfe eines Lymphozytenpräparates. Dabei wurde die Qualität der Sonde überprüft, indem sie an einem Lymphozytenpräparat mit normalem Chromosomensatz ohne zu erwartende chromosomale Veränderungen angewendet wurde. Es wurden sowohl die Sonde für Her2/neu als auch für p53 mit dieser Methode getestet. Das Lymphozytenpräparat wurde einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag begann die Vorbehandlung des Präparates, indem man es kurz bei Raumtemperatur in 2x SSC (pH=7,0) einstellte und anschließend einem 20-minütigen RNase-Verdau bei 37 °C unterzog. Die RNase-Stammlösung (10 mg/ml) wurde im Verhältnis 1:100 mit 2x SSC angesetzt. Das Präparat wurde dreimal während fünf Minuten in 2xSSC (pH=7,0) bei Raumtemperatur gewaschen, bevor es bei 37 °C 1,5 Minuten mit Pepsin verdaut wurde, um die Sondendurchgängigkeit zu erhöhen. Für den Pepsin-Verdau wurden 100 µl 5 % Pepsin in 100 ml 0,01 N HCl gegeben (0,01 N HCl: 100 ml a.d. + 120 µl 25 % HCl). Nach erneutem fünfminütigen Waschen in PBS (pH=7,0) bei Raumtemperatur wurde es zehn Minuten in 4 % PFA/PBS bei Raumtemperatur fixiert. Nach fünf Minuten Waschen in PBS bei Raumtemperatur dehydrierte man das Präparat mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 100 % je fünf Minuten) und lies es über Nacht an einem staubfreien Ort trocknen.

#### **Denaturierung und Hybridisierung**

Ein Denaturierungsmix aus 350 µl deionisiertem Formamid, 50 µl NaPO<sub>4</sub> (0,5 M), 50 µl sterilem 20x 2xSSC (pH=7,0) und 50 µl sterilem Aqua dest. wurde angesetzt und davon 100 µl pro Objektträger aufpipettiert. Die Denaturierung erfolgte während 15 Minuten auf einer Heizplatte bei 70 °C. Anschließend musste das Präparat sofort in einer -20 °C kalten aufsteigenden Alkoholreihe (70% ,80%, 100%) dehydriert werden und lufttrocknen. Erst dann denaturiert man die Sonde bei 96 °C während fünf Minuten im PCR-Ofen (Techne, England). Bevor man die denaturierte Sonde auf das Präparat gab, wurde dieses auf 37 °C erwärmt. Man legte ein Deckglas auf und dichtete es mit Fixogum ab. Dann lies man das Präparat in einer feuchten Kammer während zwei Tagen hybridisieren.

### **Stringenzwaschung und DAPI-Färbung**

Bei allen Waschschritten musste darauf geachtet werden, dass ohne direkte Lichteinwirkung auf das Präparat gearbeitet wird, da die Fluoreszenzsignale sonst verblassen und eine korrekte Auswertung nicht mehr möglich war. Nach Entfernen des Deckglases wurde das Lymphozytenpräparat bei 42 °C dreimal für zehn Minuten in 50 % Formamid/ 2 x SSC (pH=6,8) und zweimal während zehn Minuten bei 42 °C in 2 x SSC (pH=6,8) gewaschen. Für fünf Minuten überführte man das Präparat in Aqua dest. bei Raumtemperatur. Für die DAPI-Färbung wurde ein Gemisch aus 1500 Teilen Aqua dest. und 1 Teil DAPI hergestellt. 100 µl wurden auf den Schnitt gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und bei Raumtemperatur zehn Minuten inkubiert. Der Objektträger wurde mit destilliertem Wasser gut gespült und luftgetrocknet. Nach Auftragen des Antifade wurde ein Deckglas aufgelegt und das Lymphozytenpräparat konnte ausgewertet und damit die Qualität der Sonde bestimmt werden.

## **4.1.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Tumorgewebeschnitt**

### **Paraffineinbettung**

Zur Paraffineinbettung wurde Tumorgewebe für 48 Stunden in 4 % Paraformaldehyd gelöst in PBS (pH 7,4) gebracht und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Alkohol als organisches Lösungsmittel entzieht dem Gewebe das Wasser, da es selbst eine große Affinität zu Wasser hat.

Die Präparate wurden anschließend dreimal in 100 % Xylol gewaschen, um die Durchgängigkeit für Paraffin zu erhöhen. Nun konnte die eigentliche Paraffineinbettung erfolgen, indem die Präparate bei 60° C in Paraffin aufgenommen wurden. Paraffin eignet sich gut für die Einbettung, da es eine chemisch inaktive Substanz ist, die aus gesättigten Kohlenstoffketten besteht und deren Schmelzpunkt von der Kettenlänge abhängt.

Von den Präparaten wurden 5 µm-dicke Schnitte mit dem Mikrotom (Leica, Deutschland) angefertigt und auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Zur Herstellung silanisierter Objektträger wurden saubere fettfreie Objektträger (Waschen in 100% Aceton) in 10% Tri-ethoxysilyl-propylan (Silan) der Firma Merck (Nr. 821619) für zehn Minuten inkubiert und anschließend dreimal mit Aceton gespült. Dann wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült, abgeschüttelt und über Nacht bei 45 °C getrocknet.



### **Vorbereitung der Schnitte**

Die Paraffinschnitte wurden vor Versuchsbeginn über Nacht bei 65 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden sie in Xylol deparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe jeweils fünf Minuten in 100 %, 80 % und 70 % Ethanol rehydriert. Nun wurden sie auf einer Heizplatte bei 50 °C während 45 Minuten getrocknet und anschließend fünf Minuten in 2x SSC (pH =6,8) bei Raumtemperatur gewaschen.

### **Vorbehandlung der Präparate**

Nun erfolgte die eigentliche Vorbehandlung der Präparate. Sie ist wichtig, um eine unspezifische Hybridisierung der Sonde mit anderen Sequenzen als der Zielsequenz zu vermeiden und um Wechselwirkungen mit Proteinen oder anderen Zellbestandteilen, die an die Sonde binden könnten, zu verhindern. Die Vorbehandlungen erleichtern außerdem das Eindringen der Sonde und stabilisieren die Zielsequenz.

Auf Grund der unterschiedlichen Beschaffenheit der einzelnen Tumorgewebe mussten die verschiedenen Schnitte auf zwei Arten vorbehandelt werden. Die Schnitte 029-2 (p53/Her2/neu), 030 (p53), 031 (p53/Her2/neu), 89-2 (Her2/neu), 113 (Her-2-neu) wurden einem 20-minütigen RNase-Verdau (10 mg/ml, 1:100 in 2xSSC) bei 37 °C unterzogen. Dieser Schritt ist wichtig, damit die Sonde nicht mit der RNA im Zytoplasma oder im Kern hybridisiert. Durch die Inkubation mit RNase A wird einzelsträngige RNA im Kern und im Zytoplasma der Zelle abgebaut. Nach zwei jeweils fünfminütigen Waschschritten in 2xSSC (pH=6,8) bei Raumtemperatur und fünf Minuten PBS (pH=7,4) bei Raumtemperatur wurden die Präparate zehn Minuten lang in 4% PFA/PBS bei 4 °C oder Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Präparate in PBS (pH=7,4) über fünf Minuten aufgenommen. Nach der Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 100%, jeweils fünf Minuten) wurden die Objektträger 30 Minuten an einem staubfreien Ort luftgetrocknet.

Die restlichen Tumorschnitte mussten folgendermaßen vorbehandelt werden, um eine verbesserte Zugänglichkeit für die Sonde in das Gewebe zu garantieren: zehn Sekunden wurden die Objektträger in 45 °C warmes 2x SSC (pH=6,8) eingestellt, um sie dann mit dem Gewebsverdau-Kit Appligene – Oncor (ONCOR, Deutschland) zu behandeln. Die Inkubation mit proteinabbauenden Enzymen wie Pronase E, Proteinase K oder Pepsin/HCl macht das Gewebe für Nachweisreagentien penetrierbarer. Dieser Vorgang wird Permeabilisierung genannt. Die Wirkung der Enzyme besteht darin, dass sie die Nukleinsäuren von assoziierten Proteinen befreien.

Je nach Gewebeeigenschaft wurden die Präparate zwischen sechs und 33 Minuten in einem Ansatz aus 15 g Pulver der Firma ONCOR in 50 ml 2 x SSC (pH=6,8) bei 45 °C inkubiert, dann kurz in 2 x SSC (pH=6,8) eingetaucht, um anschließend mit der Proteinase K behandelt zu werden. Dabei wurden 400 µl Stammlösung (0,25 mg/ml 2 x SSC) mit 40 ml 2 x SSC (pH=6,8) auf 45 °C erwärmt und zwischen fünf und 33 Minuten auf die Schnitte wirken gelassen. Die unterschiedlichen Zeiten spiegeln die umfangreichen Erfahrungen aus vorherigen zahlreichen Versuchen mit diesen Tumorschnitten wider. Die Präparate wurden fünf Minuten in 2 x SSC (pH=6,8) bei Raumtemperatur sowie in PBS (pH= 7,4) gespült und in 4 % Paraformaldehyd/PBS bei 4 °C während zehn Minuten fixiert. Bei pH =7,4 wurden sie wieder in PBS und 2 x SSC (pH=6,8) jeweils fünf Minuten gespült. Im 70 °C warmen Wasserbad in 2 x SSC wurden die Objektträger inkubiert, um anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 100 %, je fünf Minuten) dehydriert zu werden. Über Nacht wurden die Gewebeschnitte an einem staubfreien Ort getrocknet.

### **Denaturierung und Hybridisierung**

Für die Denaturierung wurde ein Denaturierungs-Mix aus 350 µl deionisiertem Formamid, 50 µl NaPO<sub>4</sub> (0,5 M, pH=7), 50 µl sterilem Aqua dest. und 50 µl sterilem 20 x SSC, wovon 100 µl pro Objektträger mit dem Gewebe auf der Heizplatte denaturiert wurden. Die Gewebeschnitte, die mit der RNase vorbehandelt worden waren, wurden während zwei Minuten bei 72 °C denaturiert, wohingegen die Proteinase K behandelten Tumorschnitte bei 70 °C während 15 Minuten denaturiert wurden. Um ein Wiederanlagern der DNA zu verhindern, mussten die Objektträger direkt nach der Denaturierung in eine eiskalte aufsteigende Alkoholreihe gebracht werden (je fünf Minuten bei -20 °C ) und anschließend mindestens 30 Minuten staubfrei lufttrocknen. Auch die Sonde musste vor Aufbringen auf den Objektträger denaturiert werden (Sonde: Her2/neu, p53, QBiogene, Deutschland). Das geschah während fünf Minuten bei 95 °C im Progene (TECHNE, England). Währenddessen wurden die Schnitte auf 37 °C erwärmt und dann der Hyb-Mix auf die Schnitte gegeben. Ein aufgelegtes Deckgläschen wurde mit Fixogum abgedichtet, bevor man die Schnitte über zwei Tage in der feuchten Kammer hybridisierte.

### **Stringenz-Waschung und DAPI-Färbung**

Die anschließende Stringenz-Waschung und DAPI-Färbung erfolgte unter Abdunklung, um ein Ausbleichen der lichtempfindlichen Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Dabei wurden die Gewebeschnitte dreimal während jeweils zehn Minuten in 50 % Formamid/2 x SSC (pH=6,8) bei 42 °C gewaschen. Dann wurden sie zweimal während zehn Minuten in 2 x SSC (pH=6,8)

bei 42 °C eingestellt und anschließend fünf Minuten in Aqua dest. gespült. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Auch dieser Farbstoff ist lichtempfindlich und wurde im abgedunkelten Raum angesetzt. Während zehn Minuten erfolgte die Färbung mit einer Lösung aus DAPI in Aqua dest. (1:1500). Der überschüssige Farbstoff wurde mit Aqua dest. abgespült. Wieder wurde der Schnitt einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen (70%, 80%, 100%) und, bevor das Antifade (Vector Laboratories, Burlingame, Canada) aufgebracht wurde, luftgetrocknet. Nach Auflegen eines Deckglases war der Tumorgewebeschnitt bereit, unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet zu werden.

### **4.1.3 Zellkernisolation**

Die Zellkernisolierung für Angiofibrome erfolgte aus 60 µm Paraffinschnitten. Sechs dieser Schnitte eines Tumors wurden in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit Xylol zweimal 30 Minuten im 60 °C warmen Wasserbad inkubiert. Über Nacht wurden die Schnitte in frischem Xylol inkubiert. Zur Deparaffinierung der Schnitte im Eppendorfgefäß unterzog man die Schnitte zuerst fünf Minuten einer 100% Xylolbehandlung und anschließend einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 98 %, 80 %, 70 %, 50 %, je fünf Minuten).

#### **Pepsin-Verdau**

Vor dem anschließenden Pepsin-Verdau musste noch die Pepsingebrauchslösung angesetzt werden. Man gibt zu 930 µl Pepsinstammlösung 70 µl 1M HCl. Das Pepsin wird dadurch aktiviert. Die Pepsinstammlösung wurde hergestellt, indem man 25 mg Pepsin (Pepsin 7000, SIGMA, Deutschland) auf 18,6 ml destilliertes Wasser einwiegt, zur Lösung bringt und portioniert (930 µl/ Eppendorfgefäß). Die Stammlösung konnte bei – 20 °C gelagert werden.

Das Gewebe wurde mit dem aktivierten Pepsin bei 37 °C im Wasserbad während fünf Minuten inkubiert und das Eppendorfgefäß anschließend gemischt. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, durch eine Gaze filtriert und zehn Minuten bei 4000 upm zentrifugiert. Man kontrolliert, ob ein Pellet, also herausgelöste Zellkerne, vorhanden ist und gibt den Überstand des zentrifugierten Eppendorfgefäßes auf das ursprüngliche Gewebe. Dieses wurde wieder bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend gevortext. Dieser Arbeitsschritt wurde solange wiederholt, bis kein Pellet mehr vorhanden war.

Jedes Pellet wurde in 70 % Ethanol aufgenommen, und alle Pellets wurden in ein Eppendorfgefäß überführt. Dieses Eppendorfgefäß wurde bei 4000 upm während fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol aufgefüllt.

Während zehn Minuten wurde die Zellsuspension bei 1500 upm zentrifugiert und anschließend eine DAPI-Kontrollfärbung zur Darstellung der Zellkerne ausgeführt.

#### **4.1.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Zellkernisolat**

##### **Vorbehandlung der Präparate**

Die Objektträger wurden eine Minute in 2 x SSC (pH=6,8) eingestellt und dann einem 20-minütigen RNase-Verdau unterzogen (10 mg/ml, 1:100 in 2 x SSC bei 37 °C). Nach zweimal fünfminütiger Inkubation in 2 x SSC (pH=7, Raumtemperatur) und fünfminütiger Inkubation in PBS (pH=7,4) bei Raumtemperatur wurden die Präparate während zehn Minuten in 4 % PFA/PBS bei 4 °C fixiert. Für fünf Minuten wurden sie dann in PBS (pH=7,4) eingestellt und anschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (70 %, 80 %, 100 %, je fünf Minuten). Nach Trocknung der Objektträger erfolgte die Denaturierung.

##### **Denaturierung der Präparate**

Der Denaturierungsmix wurde aus 350 µl deionisiertem Formamid, 50 µl Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 M pH=7,0), 50 µl destilliertem Wasser und 50 µl sterilem 20 x SSC (pH=7,0) angesetzt. Auf jeden Objektträger wurden 100 µl Denaturierungsmix pipettiert und das Zellkernisolat während zwei Minuten bei 72 °C auf der Heizplatte denaturiert. Um ein Wiederanlagern der DNA zu verhindern, wurden die Isolate direkt in einer eiskalten aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 100 %, je fünf Minuten) unterzogen und anschließend luftgetrocknet.

Der Hybridisierungsmix wurde im Heizblock (PROGENE) während fünf Minuten bei 96 °C denaturiert und dann auf die Präparate pipettiert. Nach Auflegen eines Deckglases und Abdichten mit Fixogum lies man das Präparat für zwei Tage in der feuchten Kammer bei 37 °C hybridisieren.

##### **Stringenz-Waschung und DAPI-Färbung**

Nach dem Entfernen des Deckglases wurden die Objektträger dreimal für zehn Minuten in 50 % Formamid/2 x SSC (pH=6,8) bei 42 °C und anschließend zweimal für zehn Minuten in 2 x SSC (pH=6,8) eingetaucht. Die DAPI-Färbung erfolgte nach fünfminütiger Inkubation in destilliertem Wasser. DAPI wurde im Verhältnis 1:1500 mit destilliertem Wasser angesetzt und während zehn Minuten auf dem Objektträger inkubiert. Nach der Färbung wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gut abgespült und einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 100 %, je fünf Minuten) unterzogen. Nach Trocknung der Präparate wurde das Antifade

aufgetragen, und das Zellkernisolat konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

## **4.2 Polymerase-Kettenreaktion PCR**

### **4.2.1 PCR**

Die Methode der PCR als Verfahren zur Amplifikation beliebiger Nucleinsäureabschnitte zählt zu den größten wissenschaftlichen Entdeckungen der vergangenen Jahre. Die PCR ist in der Lage, aus einem einzelnen Nucleinsäureabschnitt unter optimalen Bedingungen binnen weniger Stunden *in vitro* bis zu  $10^{12}$  identische Moleküle zu erzeugen, die dann einem diagnostischen Nachweis oder anderen Methoden zur Verfügung stehen. Die DNA wird mit Hilfe von DNA-Polymerasen dupliziert. Für diesen Prozess wird ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende vorausgesetzt, das dann entsprechend verlängert wird. Diese kurzen Abschnitte schafft man künstlich durch Hinzufügen von DNA-Fragmenten in den Reaktionsansatz. Diese DNA-Fragmente haben eine Länge von ca. 20 Nukleotiden Länge und werden Primer oder Oligonukleotide genannt. Diese binden an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang (Annealing) und können nun von der Polymerase verlängert werden. Durch eine anschließende Temperaturerhöhung wird die neu synthetisierte doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge denaturiert, und neue Primermoleküle können binden. Der Vorgang beginnt von Neuem. Gibt man in jeden PCR-Ansatz zwei solcher Primer – einen, der am Sensestrang und einen, der am Gegenstrang (Antisensestrang) bindet – so erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts. Die PCR führt also zu einer exponentiellen Amplifikation, da auch die jeweils neugebildeten Stränge als Matrize zur Verfügung stehen (Abb.8).

Der PCR-Verlauf besteht in der Regel aus drei unterschiedlichen Temperaturstufen: Denaturierung, Annealing und Primersynthese. Durch eine Temperaturerhöhung auf 92 bis 98 °C wird die Reaktion gestartet und die DNA in ihre Einzelstränge denaturiert. Beim zweiten Schritt der Reaktion kommt es zur Anlagerung der Primer (Annealing). Dazu muss der Reaktionsansatz auf eine durch den Primer festgelegte Temperatur abgekühlt werden. Beim nächsten Schritt erhöht man die Temperatur auf 72° C. Diese Temperatur stellt ein Aktivitätsoptimum der Taq-DNA-Polymerase dar und gewährleistet die schnelle Verlängerung (Extension) der Primer. Für die beiden Schritte Annealing und Extension reichen in der Regel Zeiten von jeweils weniger als einer Minute aus. Nur bei sehr großen PCR-Produkten (über 1 kb) verlän-

gert man die Extensionszeit. Im nächsten Schritt der Reaktion heizt man auf 95 °C, um die DNA wieder in ihre Einzelstränge zu zerlegen. Nach 30-40 Zyklen liegt meist genügend PCR-Produkt für weitere Analysen vor.

Wichtige Anforderungen an DNA-Polymerasen für die PCR sind eine sehr gute Temperaturstabilität bei 95 °C und die Fähigkeit, bei 72 °C längere DNA-Abschnitte zu synthetisieren. Taq-, Tth-, Pwo- und Pfu-Polymerasen werden diesen Ansprüchen gerecht, wobei die Taq-Polymerase die gebräuchlichste unter ihnen ist und auch in dieser Arbeit zur Anwendung kam. Um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden, setzt man die sogenannte Hotstart-PCR ein. Die Aktivität der Polymerase setzt dann nur bei erhöhter Temperatur ein und unterdrückt eine Polymerisation an unspezifisch hybridisierte Primer bei niedrigen Temperaturen. Eine Möglichkeit besteht darin, das Enzym erst nach Erwärmung des Ansatzes hinzuzupipetieren.

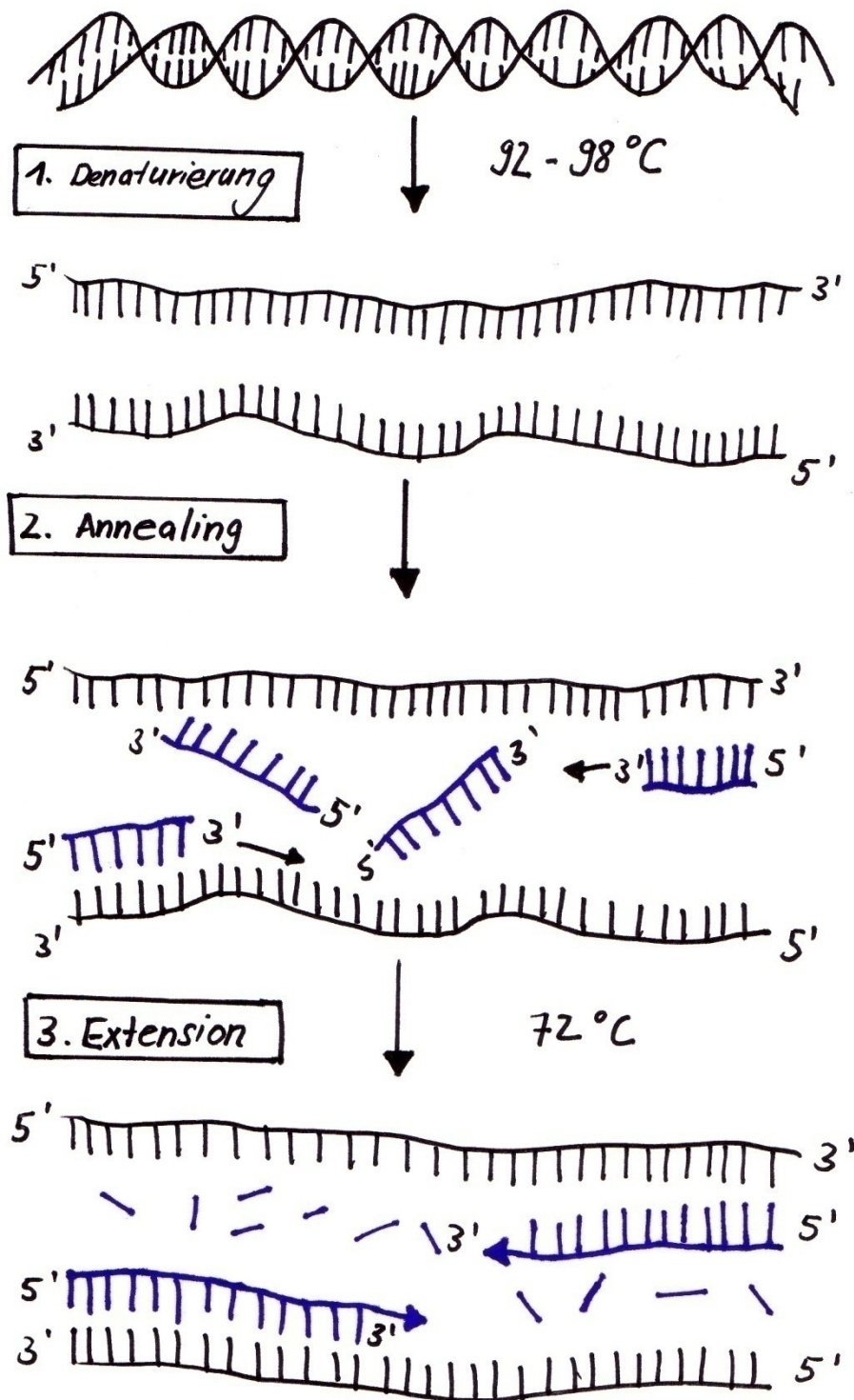


Abbildung 8: Schematische Darstellung der PCR

In dieser Arbeit verwendeten wir die Hotstart-Taq-Polymerase der Firma QIAGEN, Deutschland. Die Aktivierung des Enzyms erfolgte bei  $95^{\circ}\text{C}$  während 15 Minuten. Der Vorteil der Hotstart-Taq ist ihre erhöhte Spezifität und dass die einzelnen Komponenten des Reaktionsansatzes bei Raumtemperatur zusammengefügt werden können. Die Hotstart-Taq-Polymerase ist

eine modifizierte Form einer rekombinierten 94-kDa DNA-Polymerase, die ursprünglich aus *Thermus aquaticus* isoliert und in *E. coli* kloniert wurde. Ein Unit der Hotstart-Taq definiert dabei die Menge Enzym, die befähigt ist, 10 nmol Nukleotide (dNTPs) in einem säureunlöslichen Material bei 72 °C für 30 Minuten unter den von der Firma QIAGEN genannten Standardbedingungen einzubauen. Die Spezifität und Prozessivität der Gesamtreaktion wird durch die Ionenkonzentration im Puffer stark beeinflusst. Magnesiumchlorid spielt hierbei eine wichtige Rolle, wurde in den Versuchen dieser Arbeit jedoch nicht benötigt.

Zur Amplifikation wurde unter sterilen Bedingungen die umgeschriebene cDNA des Reverse-Transkriptase-Ansatzes als Template in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Um bei den kleinen Mengen Pipettierfehler möglichst gering zu halten, wurden alle anderen Reagenzien zunächst in einem sterilem Eppendorfgefäß zu einem Mastermix vermischt und erst dann auf die Reaktionsgefäße verteilt. Nachdem wir mit Hilfe der FISH quantitative Veränderungen von Genen in den Zellkernen der Tumorgewebeschnitte untersucht haben, wollten wir nun auch die Expression dieser Gene auf RNA-Ebene untersuchen. Dazu führten wir eine RT-PCR von isolierter RNA von Angiofibromgewebe aus.

Die PCR erfasst, ob ein Endprodukt der Gene auch entsteht, das heißt ob eine RNA von der DNA abgelesen wird und in ein Endprodukt verwandelt wird. Dazu wird die totale RNA aus dem gesamten Gewebe isoliert. Vom Gewebe, das als Kryogewebe in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wird, entnahm man etwa 300 mg und wiegt es auf gebackener Alufolie ab. Steriles Arbeiten bei dieser Methode ist sehr wichtig, um eine Verunreinigung mit anderer RNA zu vermeiden. Als Kit für die PCR diente uns der RNeasy Mini Kit (50) der Firma QIAGEN (Katalognummer: 74104).

#### **4.2.1.1 Homogenisierung des Präparates**

Zum Homogenisieren wurde ein Lysepuffer mit 10 µl β-Mercaptoethanol/ml RLT-Puffer angesetzt. Die 300 mg Gewebe versetzte man mit 1,2 ml RLT-Puffer (Raumtemperatur) in einem 15 ml Reaktionsgefäß und homogenisierte es im Ultra turrax, einem Homogenisator (T25 basic der Firma IKA). Das Reaktionsgefäß wurde während dieses Vorgangs auf Eis gesetzt, um eine Wärmeentwicklung und damit eine Zerstörung der RNA zu vermeiden. Sobald makroskopisch keine Gewebeteilchen mehr erkennbar waren, wird der Vorgang abgebrochen.



#### 4.2.1.2 Reinigung des Präparates

Mit Hilfe des Quiashredders (QIAGEN, Deutschland, Nr. 79654) wurde das Homogenisat gereinigt, indem es zwei Minuten bei 14000 upm zentrifugiert wurde. Die Säule des Quiashredders enthält einen Filter, der die festen Bestandteile zurückhält, aber für die RNA durchgängig ist. Somit konnten die festen Bestandteile auf dem Filter verworfen werden. Die RNA befand sich nun im Lysat und wurde erneut drei Minuten bei 13000 upm zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß gefüllt und im Verhältnis 1:1 mit 70%igem Ethanol versetzt. Dabei musste beachtet werden, dass auch hier das Ethanol RNase frei ist und setzte es mit RNase-freiem DPEC-behandeltem Wasser an. Nach vorsichtiger Durchmischung mit einer Pipette fiel die RNA aus. 600 µl dieses Gemisches gibt man auf die RNeasy Mini Spin Column und zentrifugierte es 15 Sekunden bei 10000 upm. Der Vorgang wurde nochmals wiederholt. Nun blieb die RNA im Sieb hängen, und das Eluat wurde verworfen.

#### 4.2.1.3 Waschen der RNA

Die folgenden Waschschritte erfolgten auf Eis. Beim ersten Waschschritt wurden 350 µl des Waschpuffers RW1 aus unserem Kit auf die Säule pipettiert. Nach 15 Sekunden Zentrifugation bei 10000 upm wurde das Eluat verworfen und der Überstand einem DNase-Verdau (RNase-free DNase-Set, Kit, QIAGEN, Deutschland, Nr. 7954) unterzogen. Dazu wurden 80 µl eines Gemisches aus 70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase I, RNase-free auf die RNA-Säule pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut 350 µl Waschpuffer RW1 hinzupipettiert und 15 Sekunden bei 10000 upm zentrifugiert. Bei dem nächsten Waschschritt wurde die Säule zuerst in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und mit 500 µl Waschpuffer RPE versetzt und bei 10000 upm 15 Sekunden lang zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Der Vorgang wurde wiederholt mit dem Unterschied, dass nun während zwei Minuten bei 10000 upm zentrifugiert wurde, um die RNA im Sieb zu trocknen. Zum Lösen der RNA führte man die Säule nun in ein Reaktionsgefäß über und gab 30-50 µl RNase-freies Wasser hinzu. Nach der Zentrifugation bei 10000 upm während einer Minute war die RNA nun im Eluat gelöst (Zentrifuge: Heraeus Biofuge pico, Deutschland; Frequenz 50/60Hz, maximale Drehzahl 13000 upm). Das verschlossene Reaktionsgefäß wurde bei -20 °C gelagert.

#### **4.2.1.4 Messung der optischen Dichte**

Um die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren zu erfassen, ist es notwendig, die optische Dichte des RNA-Gemisches in einem Photometer zu erfassen. Durch den Intensitätsunterschied der Emission absorbierten Lichtes einer bestimmten Wellenlänge kann abhängig von der Molekülzahl die Konzentration der zu bestimmenden Substanz gemessen werden. DNA und RNA haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm und Proteine bei 280 nm. Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wird photometrisch bestimmt. Dazu verdünnt man das Gemisch im Verhältnis 1:50 mit destilliertem Wasser. Im Photometer der Firma Pharmacia kann nun bei 260nm und bei 280nm der RNA-Gehalt quantifiziert werden. Unter Beachtung des Verdünnungsfaktors ergibt sich die Konzentration in µg/ml.

#### **4.2.1.5 RT-PCR**

Bei der RT-PCR handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe man RNA amplifizieren kann. Für diese Amplifikation ist es notwendig, die RNA zunächst in DNA umzuschreiben, da die RNA nicht direkt als Matrize von der Taq-Polymerase abgelesen werden kann. Hierfür gibt es mehrere Enzyme, die als Reverse Transkriptasen oder RNA-abhängige Polymerasen bezeichnet werden. Der gebildete DNA-Strang heißt auch komplementäre DNA (cDNA), und der Schritt, in der dieser entsteht wird als reverse Transkription bezeichnet (Abb.9).

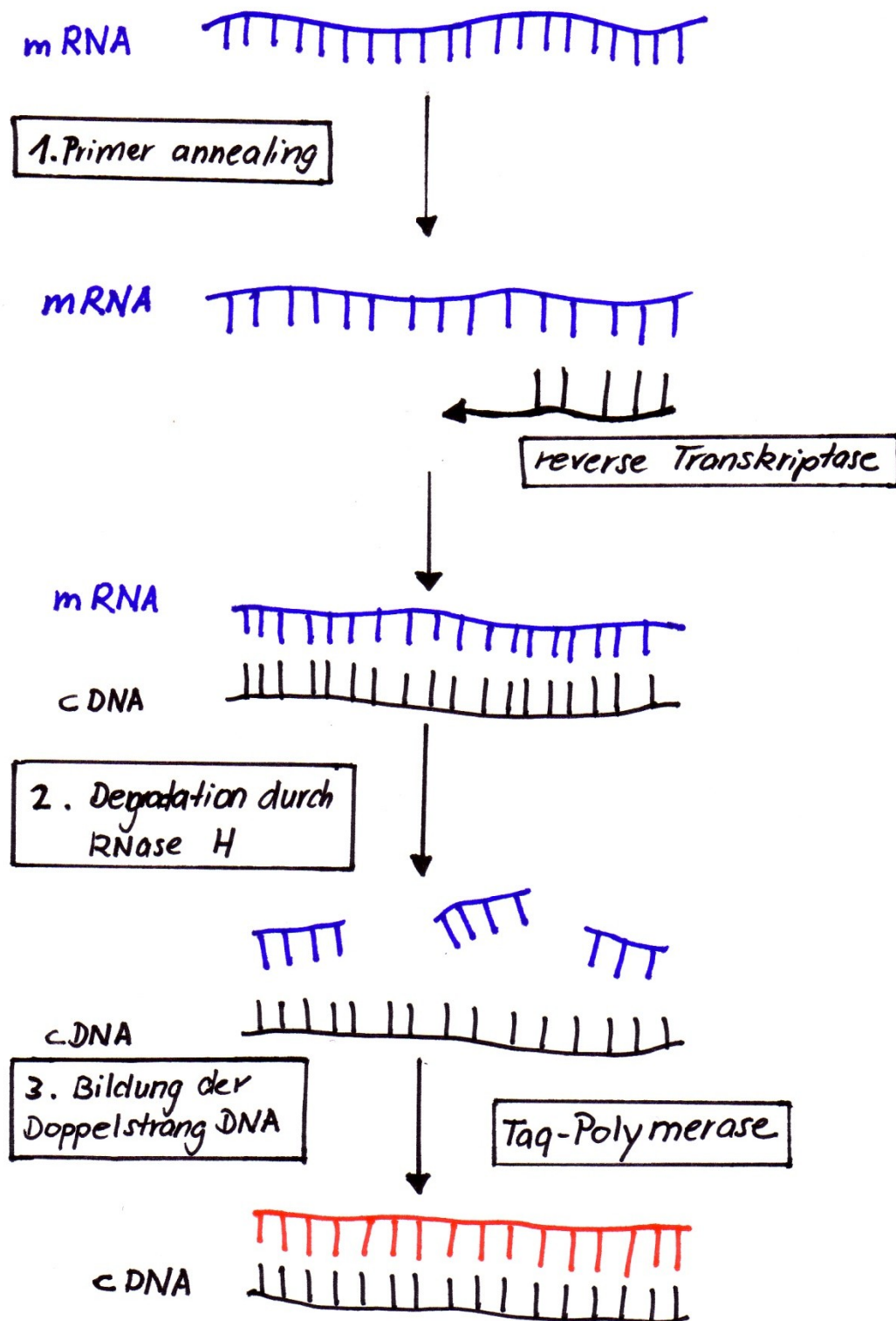


Abbildung 9: Schematische Darstellung der RT-PCR. 1.) Umschreiben der RNA in cDNA; 2.) Degradation der RNA durch RNase H; 3.) Mit Hilfe der Taq-Polymerase wird eine Doppelstrang-DNA gebildet.

Dabei erfolgt eine reverse Transkription der mRNA mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die eine cDNA herstellt. Durch die RNase H wird die mRNA zerstört, so dass wir unser gewünschtes Produkt, die cDNA, erhalten, mit der wir weiterarbeiten können.

Die Umschreibung erfolgt in einem Gesamtvolumen von 20µl mit folgendem Ansatz:

	Volumen(µl)	Endkonzentration:
10x 10fach RT-Puffer	2 µl	Einfach
dNTP-Mix (AS Mix)	2 µl	5 mM each dNTP
Oligo-dTprimer (10µM)*	2 µl	1 µM
RNase inhibitor (10 units/µl)	1 µl	10 Einheiten/20 µl Reaktionsvolumen
Omniscript Reverse Transcriptase	1 µl	4 Einheiten/20 µl Reaktionsvolumen
Rnase-freies Wasser	Variabel	je nach Menge der Proben RNA
Proben-RNA (Template RNA)	Variabel	

**Tabelle 3: Umschreibung in einem Gesamtvolumen von 20µl**

\*Oligo dT-Primer:

5-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3

QIAGEN, Deutschland

50mmol 18MER

Tm:37,1 °C

Molekulargewicht :5413,6

Die 20 µl Probengemisch wurden in den Cycler (MJ Research, PTC-200 Peltier Thermal Cycler) während 60 Minuten bei 37 °C gegeben und die Reaktion gestartet. Um die Reverse Transkriptase anschließend zu deaktivieren, wurde die Probe auf 93 °C für fünf Minuten erhitzt.

Damit war die Vorbehandlung für die PCR abgeschlossen und wurde bei –20 °C gelagert.

#### 4.2.1.6 28s-rRNA-RT-PCR

Um zu überprüfen, ob RNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurde in der PCR zunächst 28s-rRNA amplifiziert. Konnte diese amplifiziert werden und in einer Gel-Elektrophorese nachgewiesen werden, wurde die Reverse Transkription als erfolgreich gewertet.

Primer	Sequenz (5' → 3')
28s-RNA forward	TTG AAA ATC CGG GGG AGA G
28s-RNA reverse	ACA TTG TTC CAA CAT GCC AG

**Tabelle 4: Verwendete Primer für die 28s-RT-PCR und ihre Sequenz**

Für die PCR wurde die doppelte Menge angesetzt, um eine höhere Sicherheit für die Endkonzentration zu erreichen. Die Template DNA wurde erst zugegeben, wenn der Master Mix angesetzt war.

#### Probenansatz für die 28-sRNA-PCR

	Volumen/Reaktion	Volumen/Ansatz	Endkonzentration
10x PCR Puffer	2,5 µl	5 µl	1x
Aqua dest.	19,25 µl	38,5 µl	
dNTP Mix	0,5 µl	1 µl	200 µM each dNTP
28-sRNA reverse	0,25 µl	0,5 µl	0,1-0,5 µM

28-sRNA forward	0,25 µl	0,5 µl	0,1-0,5 µM
HotStar Taq-DNA-Polymerase	0,25 µl	0,5 µl	2,5 units/reaction
Template DNA (cDNA)	2 µl	4 µl	
Totales Volumen	25µl	50 µl	

**Tabelle 5: Probenansatz für die 28s-rRNA-PCR**

Der Mastermix besteht aus allen Komponenten außer der cDNA. 23 µl des Mastermix wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 2 µl cDNA aufgefüllt. Dann wurde die Polymerase-Kettenreaktion im PCR-Cycler gestartet. Die Aktivierung der Hotstart-Taq-Polymerase erfolgte bei 95 °C während 15 Minuten. Zum Aufspalten der DNA in Fragmente wurde die Temperatur um 1 °C auf 94 °C reduziert. Nach 45 Sekunden wurde zum Anlagern der Primer die Temperatur auf 56 °C heruntergefahren und für weitere 45 Sekunden gehalten. Das ist die sogenannte Annealing Temperatur, die für jeden Primer individuell bestimmt werden kann. Zur kurzfristigen Deaktivierung der Polymerase wurde die Temperatur für eine Minute auf 72 °C erhöht. Danach begann der Vorgang von neuem: die Aufspaltung der DNA bei 94 °C, das Anlagern der Primer bei 56 °C und die Deaktivierung der Polymerase bei 72 °C. Nach 39 dieser Zyklen wurde die PCR beendet, indem die Hotstart-Taq-Polymerase während fünf Minuten bei 72 °C deaktiviert wurde.

Temperatur (°C)	Zeit	Zyklenzahl
95	15 min	39x
94	45 sek	
56	45 sek	
72	1 min	
72	5 min	

**Tabelle 6:** Übersicht der Polymerase-Kettenreaktion im PCR-Cycler

Bis zur Weiterverarbeitung der PCR-Produkte wurde das Tube bei – 20 °C gelagert.

#### 4.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein biochemisches Verfahren, bei dem DNA-Fragmente im elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt und zur Größenbestimmung genutzt werden können.

Zur Auftrennung der Fragmente bedient man sich eines Trägermaterials, das aus einem aus Meeresalgen hergestellten Polysaccharid, Agarose besteht, das im polymerisierten Zustand eine gelartige Masse bildet. Unter gegebenen Pufferbedingungen bewirkt eine angelegte Spannung die Laufrichtung der negativ geladenen DNA zur Anode hin. Zusätzlich zur Ladung der DNA wird die Auftrennung der Fragmente auch durch den Siebeffekt des Gels bestimmt, der durch die Polymerisation der Agarose entsteht. Dabei werden DNA-Fragmente je nach ihrer Größe mehr oder weniger an ihrer Wanderung durch das Gel behindert. Kleinere Fragmente wandern schneller als große Fragmente. Neben der angelegten Spannung hängt die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen DNA-Fragmente wandern, auch von der Agarosekonzentration, der Art des Laufpuffers und dessen Ionengehalt ab. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist in der Regel proportional zur angelegten Spannung. In dieser Arbeit verwendeten wir als Laufpuffer Tris-Acetat-(TAE). Der TAE-Puffer ist zur Reisolierung von DNA-Fragmenten sehr gut geeignet, unterliegt aber während der Elektrophorese einer schnellen Zersetzung. Der Agarosegehalt bestimmt die Konzentration und damit die Trennschärfe im

Gel. Gele mit einer höheren Agarosekonzentration können kleinere Fragmente besser auftrennen, wobei große Fragmente kaum noch voneinander unterschieden werden können. Die durch Auftrennung der Fragmente entstandenen Banden können mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Der Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNA und wird durch UV-Licht der Wellenlänge 366 nm angeregt.

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurden 1,6%-ige Agarosegele in TBE-Puffer (1 mol/l Tris, 0,83 mol/l Borsäure, 10 mmol/l EDTA x 2 H<sub>2</sub>O, pH=6,8) verwendet. Dabei wurden 1,3 g Agarose (pro 10 ml TBE 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) abgewogen, mit 80 ml 1 x TBE in einem 100 ml Erlenmeyerkolben zusammengefügt und in der Mikrowelle bei 500 W für fünf Minuten unter mehrmaligem Schwenken aufgeköcht. Nach Abkühlung auf 50 bis 60 °C wurde Agarose luftblasenfrei in einen vorbereiteten horizontalen Gelträger mit Kamm gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer mit dem entsprechenden TBE-Laufpuffer gelegt und die Proben sowie 100 bp Marker (0,5 mM) in die Taschen aufgetragen. Um das Auftragen der Proben in die Taschen eines Gels zu vereinfachen, wurde zu jeder Probe zusätzlich 2 µl 6x Ladepuffer zugegeben. Das darin enthaltene Bromphenolblau (0,25%) wandert mit den Proben in Richtung Anode und dient der optischen Markierung der Lauffront im Gel. Dabei sorgt Glycerin (30%) durch Erhöhung der Dichte für ein Absinken der Proben in die Geltaschen. Anschließend wurden die Proben bei 90 V, 300mA über 120 Minuten aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator bei 320 nm betrachtet, über eine an einen Computer angeschlossene Kamera aufgenommen und digital gespeichert.

### **4.2.3 PCR für $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor, Her2/neu und p53**

Nachdem wir mit Hilfe der 28s-rRNA-PCR eine Kontrolle für die Reverse Transkription erreicht haben, konnten wir nun unser Produkt aus der RT-PCR für die Erfassung der Expression der gesuchten Gene benutzen und deren Expression in der Expressionsstärke der 28s-rRNA vergleichen (Tabelle 7).



Dabei setzen wir folgende Primer ein:

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>
β-Catenin forward	AAAGCGGCTGTTAGTTAGTCACTGG
β-Catenin reverse	GACTTGGGAGGTATCCACATCC
Androgenrezeptor forward	FCTCACCAAGCTCCTGGACTC
Androgenrezeptor reverse	CAGGCAGAAGACATCTGAAAG
Her2/neu forward	CCAGGACCTGCTGAACTGGT
Her2/neu reverse	TGTACGAGCCGCACATCC
p53 forward	TTCCTAGCACTGCCCAACA
p53 reverse	GACTGGAAACTTCCACTTG

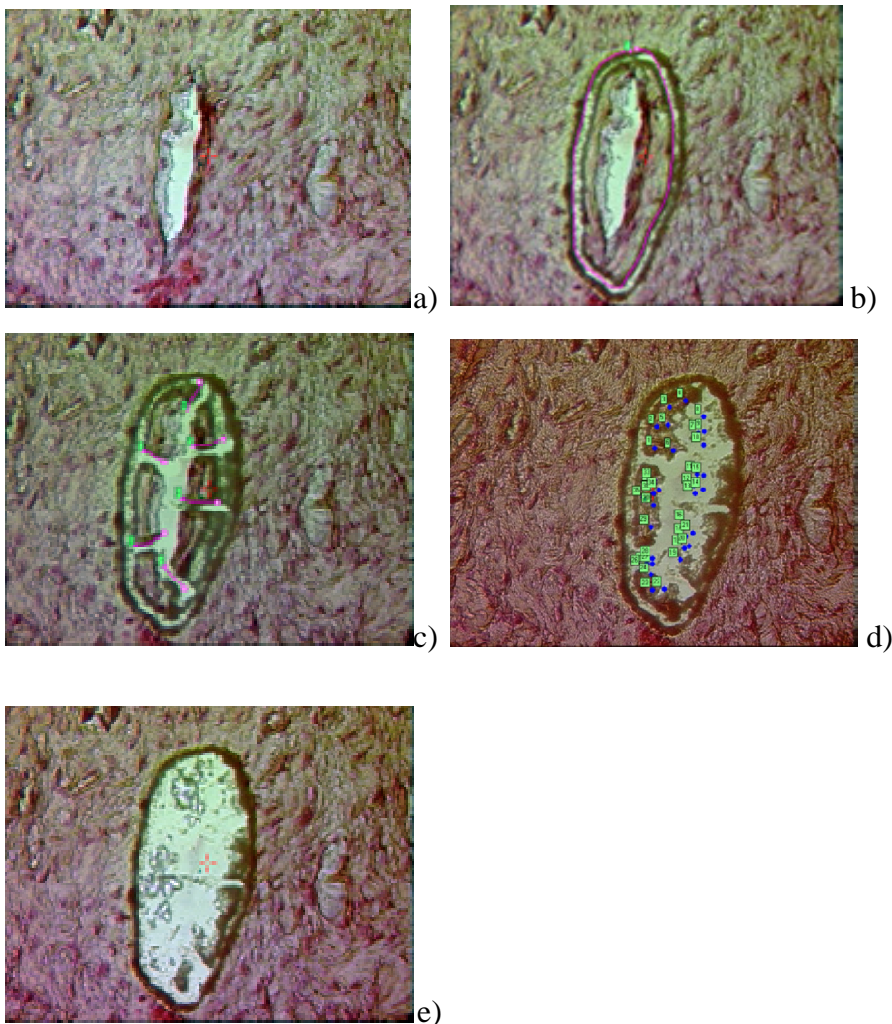
**Tabelle 7: Verwendete Primer für die PCR und ihre Sequenz**

Das Verfahren bei diesen Primern ist das gleiche wie bei der 28sRNA-PCR. Der Unterschied besteht nur in der Annealing-Temperatur. Diese beträgt bei allen untersuchten Primern 58 °C. Auch hier wurde zuerst ein Mastermix angesetzt, zu dem dann der Primer zupipettiert wurde. Nach der PCR wurde ebenfalls ein Gel gefahren und die Banden digital aufgenommen und gespeichert.

Als DNA-Leiter verwendeten wir den peqGold 50 bp von PEQLAB, der sich ideal für die Größen- und Mengenbestimmung im Bereich von 50 bis zu 1000 Basenpaaren eignet. Zur DNA-Quantifizierung werden 0.2 µl (0,1 µg) peq-Gold 50 bp DNA-Latter pro 1 mm Spurbreite des Gels aufgetragen. Der prozentuale Anteil der jeweiligen Banden sowie deren DNA-Gehalt wurden in ng ermittelt. Zusätzlich muss die Konzentration des Ladepuffers in allen Proben und im Marker gleich sein. Bezogen auf 1000 ng aufgetragenen Marker können der prozentuale Anteil der Banden und damit ihr DNA-Gehalt bestimmt werden.

#### 4.2.4 Lasermikrodissektion

Bei der Lasermikrodissektion verwendeten wir das PALM Laser-Mikro Beam System (P.A.L.M., Deutschland), um einzelne Zellen aus ihrem Zellverband herauszutrennen. Dabei isolierten wir Endothelzellen und Stromazellen aus HE-Schnitten. Der Schnitt wurde am Mikroskop eingestellt und mit dem fokussierten Laserstrahl die herauszulösende Zelle umschnitten. Um dieses ausgeschnittene Gebiet nun in ein über dem Schnitt liegendes Deckelchen eines 500 µl Eppendorfgefäßes zu bringen, wurde der Laser defokussiert. Durch die darunter angewendete Energie des Lasers wurde die Zelle in das Deckelchen katapultiert. Pro Schnitt lösten wir sowohl 100 Stromazellen als auch 100 Endothelzellen heraus, um sie jeweils getrennt einer PCR zu unterziehen (Abb.10).



**Abbildung 10:** a-e: Lasermikrodissektion am Tumorgewebeschnitt. Mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls können die Endothelzellen von den Stromazellen getrennt und einzelne Zellen ausgeschnitten werden, die dann in das Deckelchen eines Eppendorfgefäßes mit Hilfe des defokussierten Laserstrahls katapultiert werden. a HE-Schnitt mit Gefäßspalte im Zentrum und umliegendem Stroma. b Umschnitten der Gefäßspalte. c Segmentierung der umschnittenen Bereiche. d Darstellung der Laserpunkte für das Auslösen der Endothelzellen. e Darstellung des HE-Schnitts nach Gewinnung der Endothelzellen

#### **4.2.4.1 PCR der Endothelzellen**

Das Deckelchen, in dem sich die aus der Lasermikrodissektion gewonnenen Endothelzellen befanden, wurde nun auf ein Eppendorfgefäß gesetzt, in dem sich 40 µl RLT-Lysepuffer aus dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Deutschland, Nr. 7954) befanden. Damit der Lysepuffer mit den Zellen in Kontakt kam, wurde das Eppendorfgefäß über Nacht bei 4 °C auf dem Kopf gelagert. Damit konnte man die Zellen aus dem Deckelchen lösen. Die weiteren Schritte der PCR entsprechen der oben bereits beschriebenen PCR. Dem Reaktionsvolumen wurden 2 µl cDNA und 2.5 Einheiten Hotstar-Taq Polymerase zugegeben.

#### **4.2.4.2 PCR der Stromazellen**

Auch hier wurden die Fibroblasten aus dem Deckelchen in 40 µl RLT-Lyse-Puffer (Rneasy Mini Kit, QIAGEN, Deutschland, Nr. 7954) wie unter 4.2.5.1. beschrieben aufgenommen. Anschließend wurde die PCR unter denselben Bedingungen und mit denselben Kits wie die der Endothelzellen und wie unter 5.2.1. beschrieben durchgeführt.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 FISH-Ergebnisse**

#### **5.1.1 FISH am Lymphozytenpräparat für p53**

##### **Fragestellung**

Die Austestung der Zentromersonde für Chromosom 17 und p53 war wichtig, um die Qualität der Sonde und ihre Bindungsstärke festzustellen. Dafür wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an einem Lymphozytenpräparat ausgeführt und anschließend am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Es wurden 200 Zellkerne gezählt.

##### **Befunde**

Die Testung der Sonde erfolgte an einem Lymphozytenpräparat. Für das Chromosom 17 stellen wir eine Normalverteilung von 92,5 % fest. 5 % der Lymphozyten zeigten einen Verlust des Chromosoms 17, 2,5 % wiesen einen Gewinn von Signalen im Kern auf. p53 war in 90,0 % der Lymphozytenkerne normalverteilt. 6,5 % der Kerne zeigten keine zwei Cy3-Signale. In 3,5 % der Zellkerne war ein Gewinn von Cy3-Signalen zu beobachten. Diese Ergebnisse sind zusammenfassend in Abbildung 11 und 12 sowie Tabelle 8 dargestellt. Aufgrund der auch aus Voruntersuchungen des Instituts für Humangenetik (Frau Prof. Dr. S. Urbschat) bekannten Erfahrung, war bei dieser Normalverteilung keine Evaluation an weiteren Lymphozytenpräparaten notwendig. Als Signifikanzgrenze von Gewinnen und Verlusten wurde ein Wert von 10% angesetzt (Schick und Mitarbeiter, 2003). Die in diesem Vorexperiment gezeigte Normalverteilung ließ uns die Sonde als geeignet erscheinen, um das Tumorgewebe damit zu untersuchen.

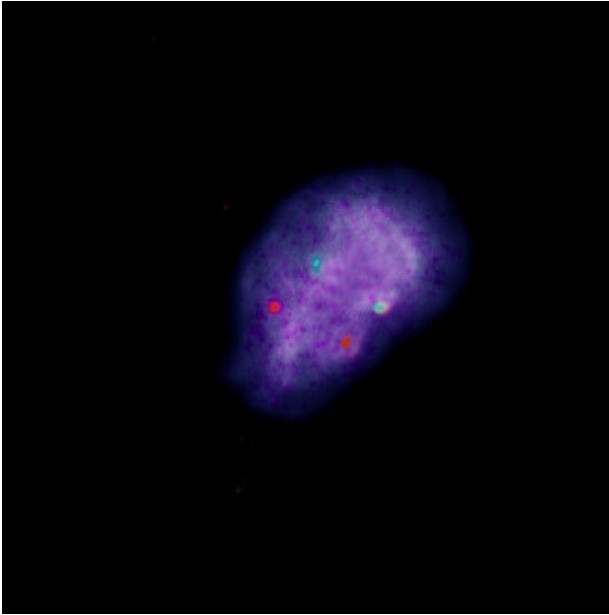


Abbildung 11: Mikroskopische Darstellung eines Lymphozyts, nach FISH-Untersuchung. Die Chromosom 17-Zentromersonde erscheint grün (FITC) und die p53-Sonde rot (Cy3). Hier ist im Zentrum ein einzelner Lymphozyt zu sehen, der 2 p53-Signale und 2 Chromosom-17-Signale zeigt.

### Tabellarische Übersicht

p53(Cy3)					
#17(FITC)	Anzahl der Signale	0	1	2	3
	0	-	-	-	-
	1	-	1 = 0,5 %	8 = 4 %	1 = 0,5 %
	2	-	12 = 6 %	171 = 85,5 %	2 = 1 %
	3	-	-	1 = 0,5 %	3 = 1,5 %
	4	-	-	-	1 = 0,5 %

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung von Chromosom 17 und p53-Sonde an 200 Zellkernen eines Lymphozytenpräparate mit Darstellung der Anzahl an Signalen für beide Sonden.

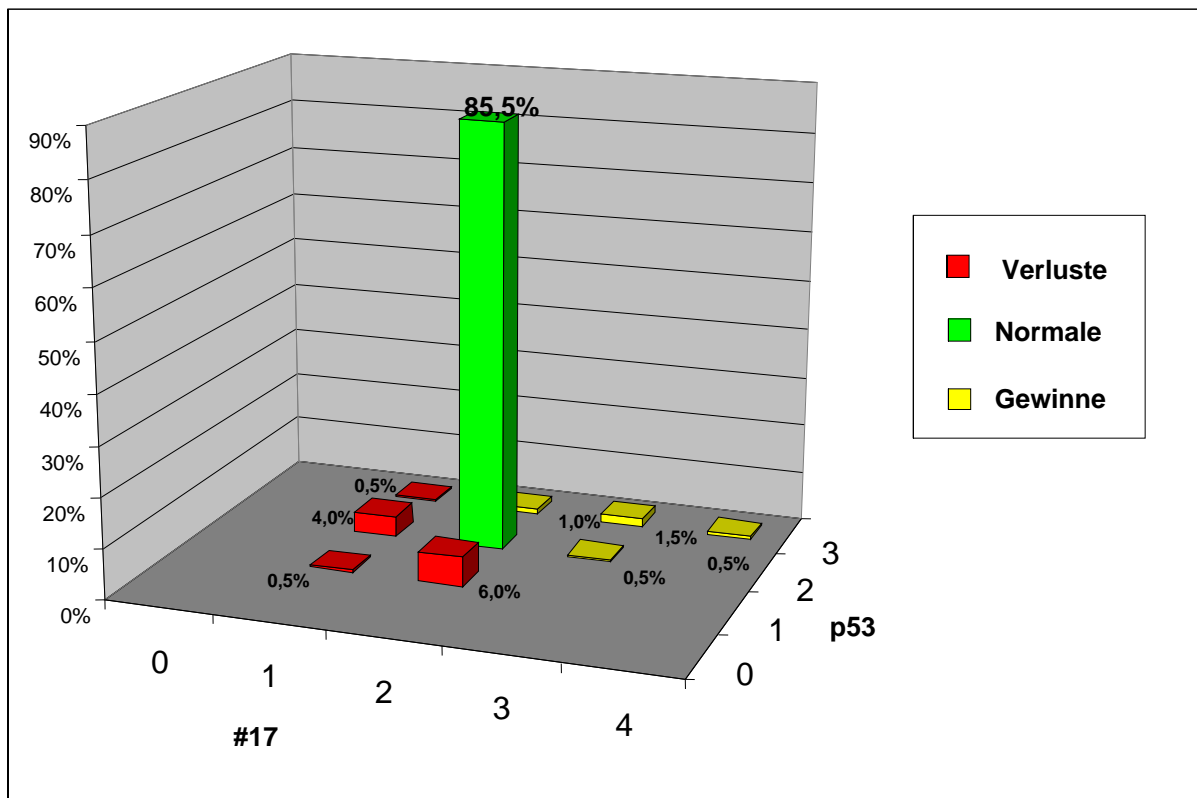


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung von Chromosom 17 und p53-Sonde an 200 Zellkernen eines Lymphozytenpräparates

### 5.1.2 FISH am Tumorgewebeschnitt für p53

Bei folgenden 7 Tumoren wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung am Tumorgewebeschnitt durchgeführt: Nr. 29, 30, 31, 46, 66, 74 und 89, um die Signale für die Zentromer-17-Sonde und p53-Sonde an 200 Zellkernen zu analysieren. Im Nachfolgenden sind aufgrund der zellulären Tumorerheterogenität die Befunde für jeden Einzeltumor dargestellt.

#### Tumor Nr. 29:

Dieser Tumorgewebeschnitt wurde zweimal einer Hybridisierung unterzogen, da bei einer ersten Hybridisierung lediglich 100 Zellkerne auszuwerten waren. Es war auffällig, dass der auszuzählende Teil der Zellkerne zu 90 % aus Endothelzellen bestand. Der Tumorgewebeschnitt wurde einer dreiminütigen Vorbehandlung aus dem Pretreatment-Kit unterzogen, bevor er während drei Minuten mit der Proteinase K verdaut wurde. Das ausgeprägte kollagene Bindegewebe gestattete offenbar keine ausreichende Penetration der Sonden in die Zellkerne der Stromazellen.

### Befunde

Das Chromosom 17 zeigte bei 28 % der untersuchten Zellkerne Verluste, wobei bei 10 % ein gleichzeitiger p53-Verlust festzustellen war.

Für p53 konnte bei 18 % Verlust eines Gensignals gezeigt werden. Dabei gingen 10 % mit einem gleichzeitigen einfachen Chromosom17-Verlust einher (Tabelle 9 und Abb. 13).

### Tabellarische Übersicht

# 17(FITC)	p53(Cy3)				
	Anzahl der Signale	0	1	2	3
0	----- --	-----	-----	-----	-----
1	----- --	10 = 10 %	18 = 18 %	-----	-----
2	----- --	8 = 8 %	64 = 64 %	-----	-----
3	----- --	-----	-----	-----	-----

**Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der ersten FISH-Untersuchung mit Darstellung der Anzahl der Signale für die Chromosom 17- und p53-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 29. Es wurden 100 Zellkerne ausgezählt.**

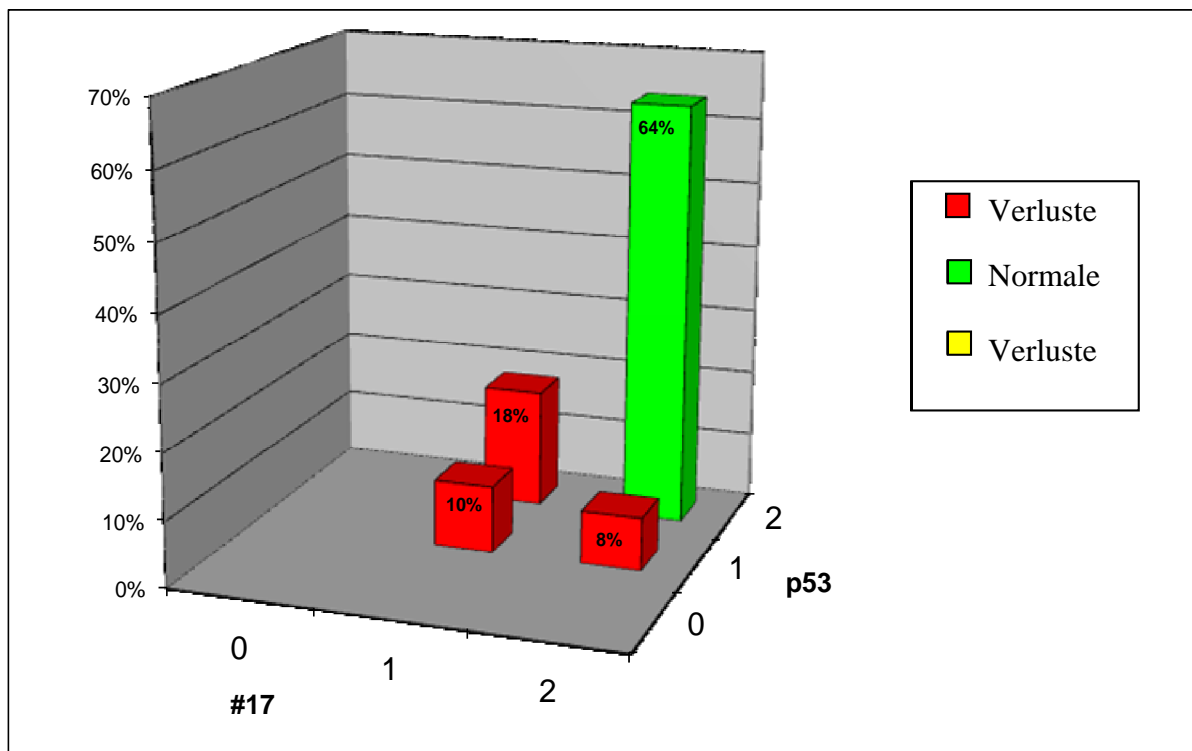


Abbildung 13: Ergebnisse der ersten FISH-Untersuchung mit Chromosom 17- und p53-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 29 an 100 Zellkernen als Diagramm

Bei der zweiten Hybridisierung wurde der Tumorgewebeschnitt einem längeren Verdau unterzogen, um eine bessere Penetration der Sonde in die Zellkerne zu gewährleisten. Die Vorbehandlung mit dem Pretreatmentpulver dauerte sechs Minuten, und der Schnitt wurde während sechs Minuten mit der Proteinase K verdaut.

### Befunde

Bei der zweiten Hybridisierung war der p53-Verlust doppelt so hoch wie bei der ersten Hybridisierung. Auch der Chromosom 17- Verlust war bei der zweiten Hybridisierung 10 % höher als bei der ersten. Ein p53-Verlust bei gleichzeitigem Vorhandensein von zwei Chromosomen 17 wurde bei der Auszählung von 100 Zellkernen in 8,0 % und bei der Auszählung der 200 Zellkerne in 18,5 % festgestellt. Ein gleichzeitiger Verlust eines Chromosoms 17 und eines p53 war bei der ersten Hybridisierung in 10 % und bei der zweiten Hybridisierung in 30,0 % zu beobachten. Bei beiden Hybridisierungen konnte kein signifikanter Gewinn von p53 oder Chromosom 17 festgestellt werden (Abbildungen 14 und 15 sowie Tabelle 10).



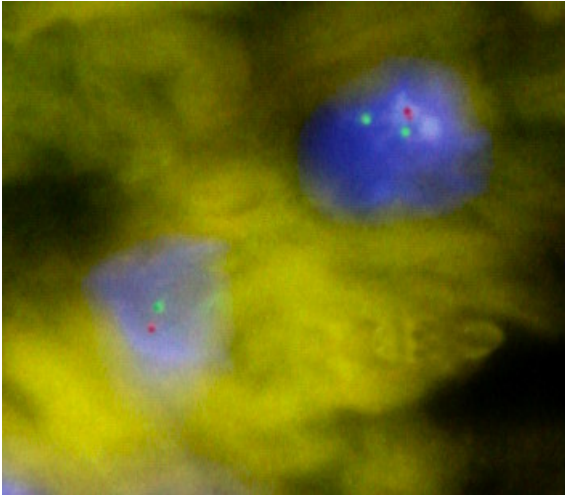


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Tumorgewebeschnitts Nr. 29. Es sind zwei Stromazellen zu erkennen. Die Zentromersonde des Chromosom 17 erscheint grün, die Sonde für p53 rot. Bei der linken Zelle erkennt man sowohl einen Chromosom 17- als auch einen p53-Verlust. In der rechten Zelle sind zwei FITC-Signale für #17 vorhanden, jedoch fehlt ein p53-Signal.

### Tabellarische Übersicht

	p53 (Cy3)				
	Anzahl der Signale	0	1	2	3
# 17(FITC)	0	-----	-----	4 = 2 %	-----
	1	2 = 1 %	60 = 30 %	10 = 5 %	1 = 0,5 %
	2	2 = 1 %	35 = 17,5 %	84 = 42 %	-----
	3	-----	-----	-----	2 = 1 %

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der zweiten FISH-Untersuchung mit Darstellung der Anzahl der Signale für die Chromosom 17- und p53-Sonden beim Tumorgewebeschnitt Nr. 29. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

Zusammenfassend ergibt sich für das juvenile Angiofibrom mit der Archivierungsnummer 29 für die Zentromersonde ein Verlust von 38% sowie für die p53-Sonde einen Verlust von 49,5%.

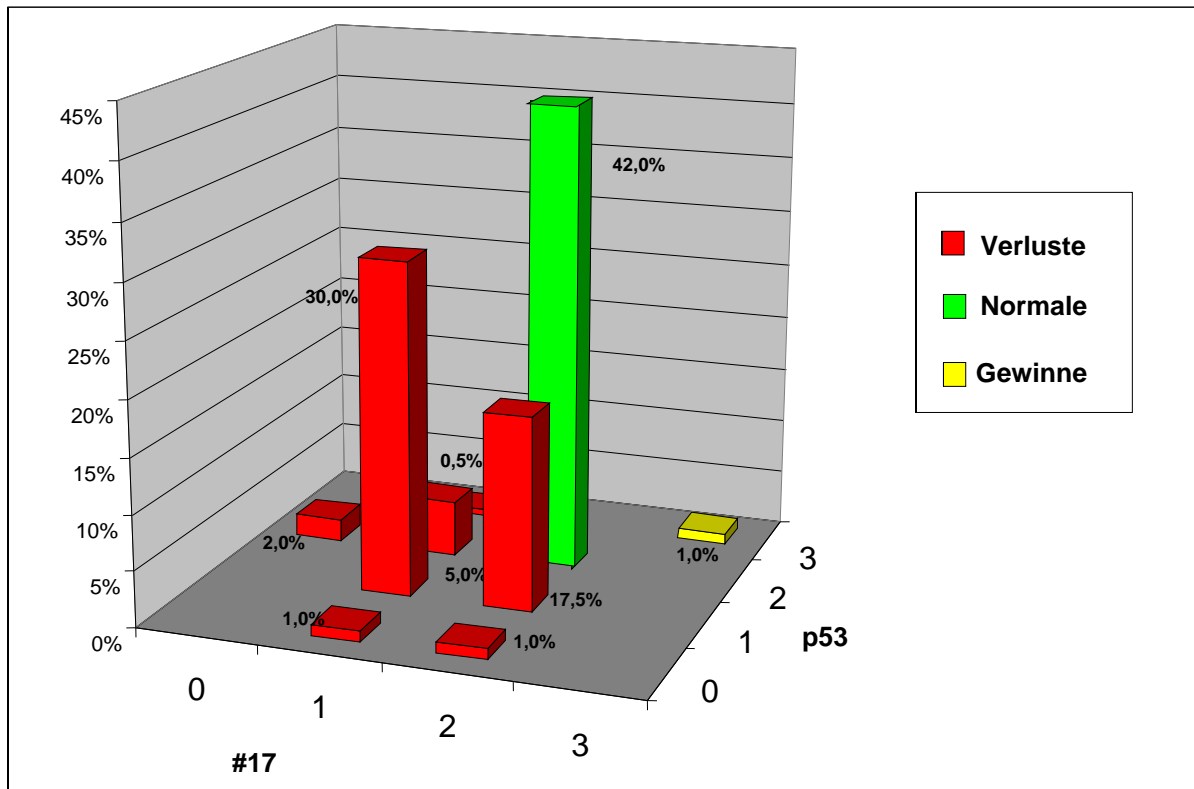


Abbildung 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der zweiten Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit Chromosom 17- und p53-Sonde beim Tumorgewebeschnitt Nr. 29 an 200 Zellkernen als Diagramm.

### Tumor Nr. 30:

Trotz mehrmaliger Hybridisierung dieses Tumorgewebeschnittes mit der Sonde für p53 und Chromosom 17 konnte keine Auswertung des Präparates erfolgen. Deshalb beschlossen wir, im Anschluss eine Zellkernisolierung durchzuführen und diese mit der Sonde zu hybridisieren (siehe Kapitel 5.1.3)

### Tumor Nr. 31:

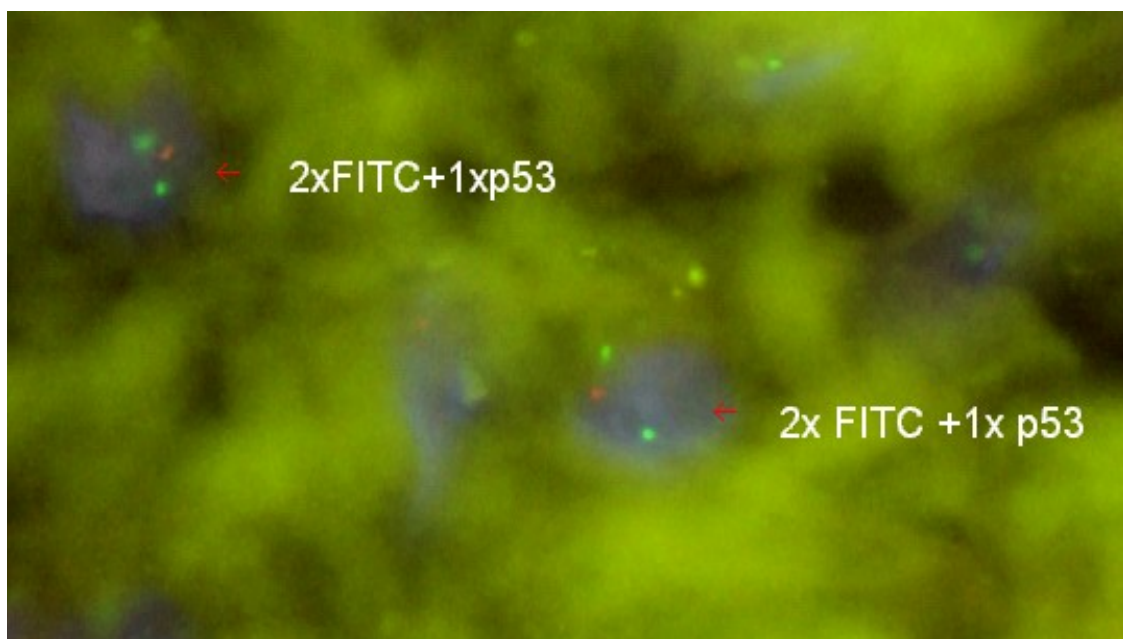
Es gelang uns an diesem Tumorpräparat keine Hybridisierung mit der p53-Sonde trotz verschiedener Verdauzeiten und wiederholten Hybridisierungsversuchen. Wir beschlossen, eine FISH-Untersuchung nach Zellkernisolation anzustreben (siehe Kapitel 5.1.3).

### Tumor Nr. 46:

Dieser Tumor wurde einer 33-minütigen Vorbehandlung aus dem Gewebsverdau-Kit (Appligene Oncor) unterzogen, bevor er 33 Minuten mit der Proteinase K verdaut wurde, um ein gutes Eindringen der Sonde zu ermöglichen.

### Befunde

Die Normalverteilung für Chromosom 17 lag bei 67 % und ein einfacher Verlust wurde in 28,5 % beobachtet. 0,5 % der ausgewerteten Zellkerne zeigten gar kein FITC-Signal. Bei 3,5 % der Kerne konnte ein drittes Chromosom 17 und bei 0,5 % ein viertes Chromosom 17 festgestellt werden. Für p53 war eine Normalverteilung von insgesamt 59,5 % zu beobachten, wobei 49 % in Zellkernen zu finden waren, die auch ein diploides Chromosom 17 besaßen. In 9 % der Zellkerne, die nur ein Chromosom 17 hatten, konnten jedoch zwei p53-Signale beobachtet werden. Einen p53-Verlust konnte man in 33,0 % feststellen, wobei 13 % Verluste in Zellkernen mit diploidem Chromosom 17 vorlagen (Abbildungen 16 und 17 und Tabelle 11).



**Abbildung 16:** Mikroskopisches Bild des Tumorgewebeschnittes Nr. 46 nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Es sind zwei Stromazellen gut zu erkennen, die beide einen Verlust eines p53-Signals zeigen. Die Zentromersonde (#17) erscheint grün, die p53-Sonde rot.

### Tabellarische Übersicht

		Cy3 = p53				
		0	1	2	3	4
FITC = #17	0	-----	1 = 0,5 %	-----	-----	-----
	1	3 = 1,5 %	36 = 18 %	18 = 9 %	-----	-----
	2	3 = 1,5 %	23 = 11,5 %	98 = 49 %	10 = 5 %	-----
	3	-----	-----	3 = 1,5 %	2 = 1 %	2 = 1 %
	4	-----	-----	-----	1 = 0,5 %	-----
		0	1	2	3	4

**Tabelle 11:** Zusammenfassung der Ergebnisse für die FISH-Untersuchungen mit Chromosom 17- und p53-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 46. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

Beim Tumorgewebeschnitt mit der Archivierungsnummer 46 ergibt sich für die Zentromer-sonde des Chromosom 17 ein Verlust von 29% sowie für die p53-Sonde ein Verlust von 33%.

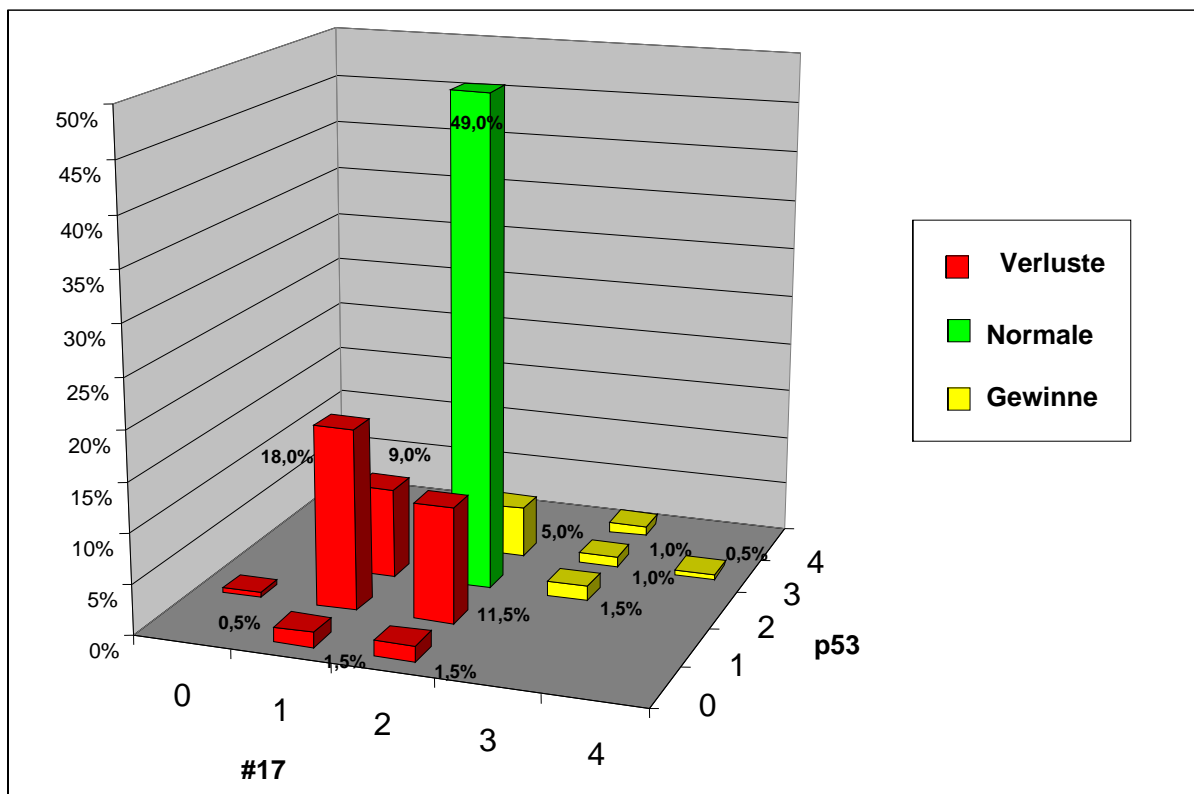


Abbildung 17: Zusammenfassung der Ergebnisse für die FISH-Untersuchung mit Chromosom 17- und p53-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 46 an 200 Zellkernen als Diagramm.

### Tumor Nr. 66:

Der Tumorgewebeschnitt wurde einer 30-minütigen Pretreatment-Behandlung und einem 30-minütigen Proteinase K-Verdau unterzogen.

### Befunde

Ein p53-Verlust zeigte sich in 8,5 %, wobei bei 1 % auch ein Chromosom 17-Verlust vorhanden war und in 7,5 % beide Zentromersignale des Chromosoms 17 zu erkennen waren. Lediglich in 2,5 % konnte ein Gewinn von p53 bei diploidem Chromosom 17 beobachtet werden. 0,5 % zeigten bei trisomen Chromosom 17 auch einen Gewinn eines p53-Signals (Tabelle 12 und Abbildung 18). Bei Berücksichtigung einer Signifikanzgrenze von 10% finden sich bei diesem Tumor keine sicheren Hinweise auf einen Verlust.

### Tabellarische Übersicht

		Cy3 = p53			
		0	1	2	3
FITC = # 17	0	-----	-----	-----	-----
	1	-----	2 = 1 %	12 = 6 %	-----
	2	1 = 0,5 %	14 = 7 %	165 = 82,5 %	5 = 2,5 %
	3	-----	-----	-----	1 = 0,5 %

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse für die FISH-Untersuchung mit Chromosom 17- und p53-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 66. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

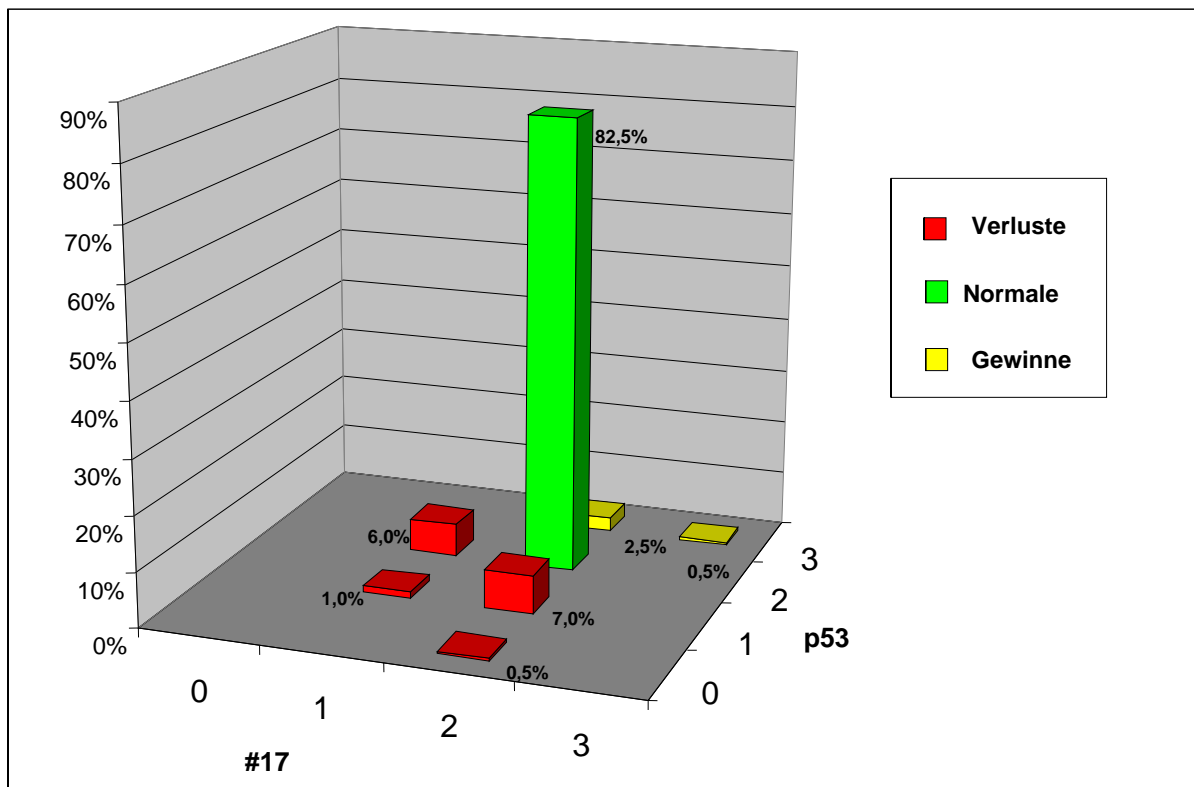


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Ergebnisse für die Zentromersonde 17 und p53-Sonde

### Tumor Nr. 74

Erst nach vier Versuchen einer Hybridisierung mit der Sonde für p53 mit jeweils unterschiedlichen Vorbehandlungs- und Verdauzeiten mit Proteinase K aus dem Gewebsverdau-Kit von ONCOR gelang es uns, ein befriedigendes Ergebnis zu erzielen. Eine Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop war bei den ersten drei Hybridisierungen nicht möglich. Der Schnitt wurde einer 35-minütigen Pretreatment-Vorbehandlung und einem 35-minütigem Proteinase K-Verdau unterzogen.

### Befunde

Das Chromosom 17 lag in 90 % diploid vor und zeigte in 8 % einen Verlust, wovon 4 % auch mit einem einfachen Verlust von p53 einhergingen. Ein p53-Verlust wurde in 18 % der diploiden Chromosom 17-Zellkerne beobachtet. Ein Gewinn von p53 wurde nicht festgestellt, bei 2 % wurde ein Chromosom 17-Gewinn beobachtet (Abbildung 19, 20 und Tabelle 13).

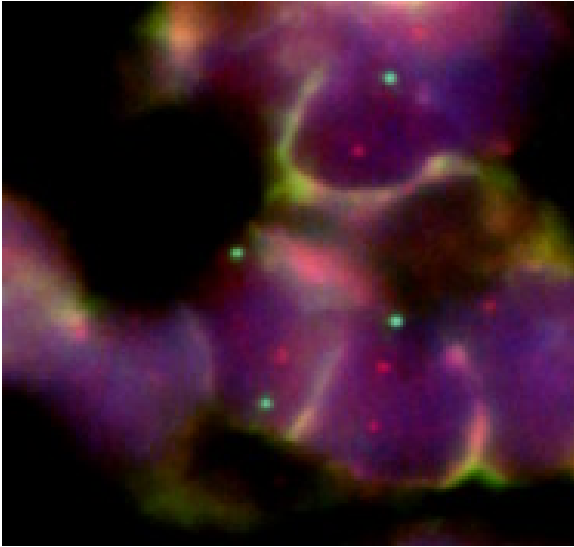


Abbildung 19: FISH am Tumorgewebeschnitt Nr. 74. Die Zentromersonde erscheint grün, die p-53-Sonde rot.

### Tabellarische Übersicht

#17(FITC)	P53(Cy3)				
	Anzahl der Signale	0	1	2	3
1	-----	8 = 4 %	8 = 4 %	-----	-----
2	8 = 4 %	28 = 14 %	144 = 72 %	-----	-----
3	-----	-----	3 = 1,5 %	-----	-----
4	-----	-----	1 = 0,5 %	-----	-----

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung mit Darstellung der Anzahl der Chromosom 17- und der p53-Sondensignale am Tumorgewebeschnitt Nr. 74. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

Zusammenfassend ergibt sich für das juvenile Angiofibrom mit der Archivierungsnummer 74 für die p53-Sonde ein Verlust von 22%. Die Verluste der #17-Sonde liegen mit 8,0 % unter dem festgelegten Signifikanzniveau.

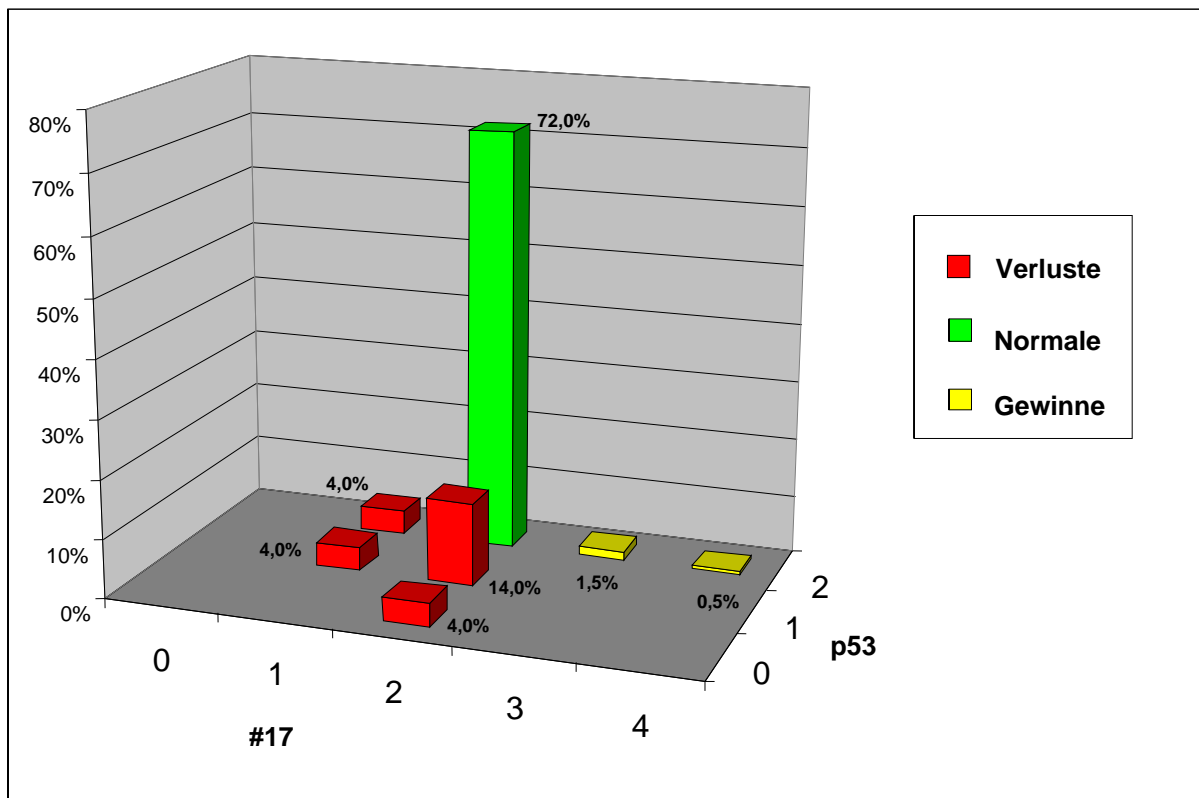


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung am Tumorgewebeschnitt Nr. 74 als Diagramm

### Tumor Nr. 89:

Der Tumor Nr. 89 zeigte nochmals in besonderer Weise die Schwierigkeiten eines Verdaus zur Freilegung der Zellkerne. Nach unterschiedlichen Verdauezeiten gelang erst im 3. Ansatz die Ausführung einer FISH-Untersuchung.

### Befunde

Der Tumor zeigte in 29,0 % einen p53-Verlust, bei einer gleichzeitigen Normalverteilung des Chromosoms 17 bei 92 %. Dabei setzten sich die Verluste sowohl aus einfachen als auch aus vollständigen p53-Verlusten zusammen. Es war auch zu beobachten, dass das Chromosom 17 dabei in 6,5 % monosom vorlag. Von den 92 % diploiden Chromosom 17-Zellkernen konnte man in 21 % einen einfachen Verlust von p53 und in 2,5 % auch einen kompletten Verlust von p53 feststellen. Einen Gewinn von p53 gab es lediglich in 2 % der diploiden Chromosom 17-Zellkerne und in 0,5 % der Zellkerne, in denen auch eine Chromosom 17-Trisomie vorlag (Abbildung 21, 22, und Tabelle 14.).



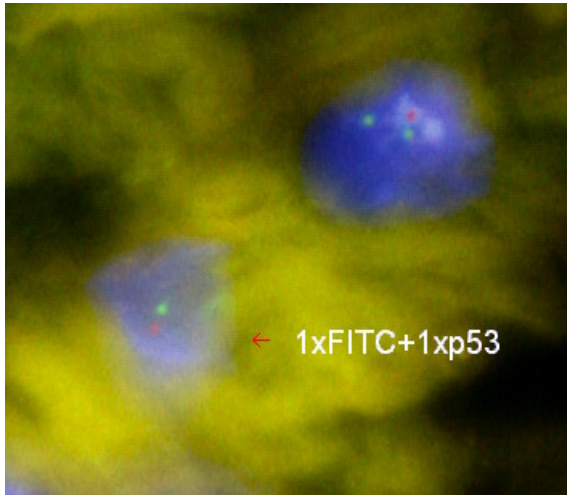


Abbildung 21: Mikroskopische Darstellung des Tumorgewebeschnittes Nr. 89 nach Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der p53-Sonde(Cy3) und Zentromer17-Sonde(FITC). Deutlich erkennbar ist der p53-Verlust in beiden dargestellten Zellen. In der rechten oberen Zelle leuchten zwei FITC-Signale für die Zentromersonde 17 grün. Die untere Zelle besitzt nur ein FITC-Signal.

### Tabellarische Übersicht

	Cy3 = p53				
	0	1	2	3	
FITC = #17	0	-----	-----	-----	-----
	1	2 = 1 %	9 = 4,5 %	4 = 2 %	-----
	2	5 = 2,5 %	42 = 21 %	133 = 66,5 %	4 = 2 %
	3	-----	-----	-----	1 = 0,5 %

Tabelle 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung der Chromosom 17- und p53-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 89. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

Zusammenfassend ergibt sich für den Tumorgewebeschnitt mit der Archivierungsnummer 89 ein Verlust der p53-Sonde in 29%. Die Verluste der Chromosom 17-Zentromersonde liegen mit 7,5% unter dem Signifikanzniveau.

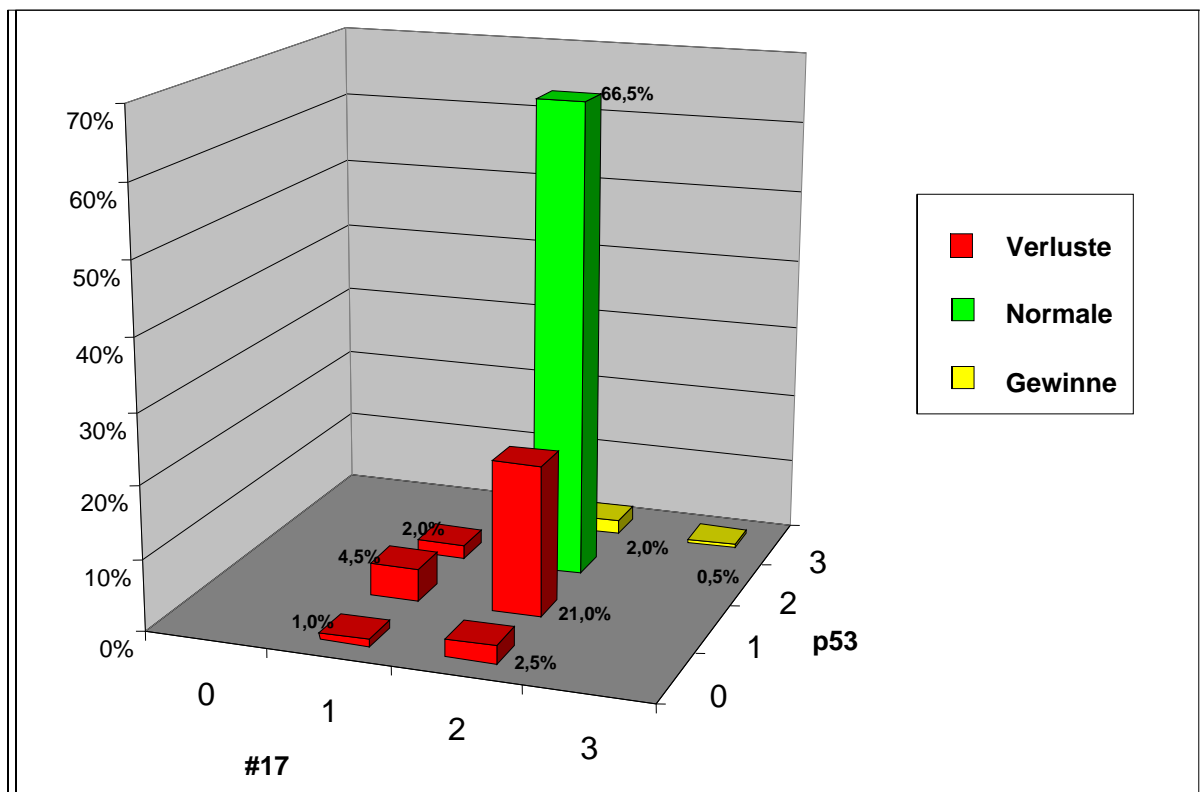


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung des Tumorgewebeschnittes Nr. 89

#### **Tumor Nr. 102:**

Bei diesem Tumorgewebeschnitt gelang es uns nicht, eine Hybridisierung durchzuführen. Deshalb entschlossen wir uns, eine anschließende Hybridisierung der Zentromersonde des Chromosoms 17 und der p53-Sonde an einem Zellkernisolat des Tumors vorzunehmen (siehe Kapitel 5.1.3.).

#### **Tumor Nr. 113:**

Auch dieser Gewebeschnitt war für eine Hybridisierung nicht geeignet und wurde einer Zellkernisolation unterzogen (siehe Kapitel 5.1.3.).

### **5.1.3 FISH am Zellkernisolat für p53**

#### **Tumor Nr. 29:**

Obwohl dieser Tumor bereits in einem Gewebeschnitt untersucht worden war, führten wir an ihm eine Hybridisierung an zwei Zellkernisolaten durch, um eventuelle Unterschiede in den Ergebnissen bei Anwendung abweichender Untersuchungstechniken zu erkennen.

### Befunde der ersten Zellkernisolation

Diese Hybridisierung am Zellkernisolat zeigt einen Verlust von Chromosom 17 bei 14,5 % der ausgewerteten Zellkerne. p53 war in 17,5 % verloren, wobei bei 7,5 % gleichzeitig das Chromosom 17 monosom vorlag. Ein Gewinn des Chromosoms 17 wurde nicht beobachtet, bei 8,5 % der Zellkerne wurde jedoch ein Gewinn von p53 festgestellt (Tabelle 15 und Abbildung 23).

	Cy3 = p53					
	Anzahl der Signale	0	1	2	3	4
FITC = #17	0	----- ----	-----	-----	-----	-----
	1	1 = 0,5 %	14 = 7 %	14 = 7 %	-----	-----
	2	2 = 1 %	18 = 9 %	134 = 67%	16 = 8 %	1 = 0,5 %
	3	----- ----	-----	-----	-----	-----
	4					

**Tabelle 15:** Darstellung der Ergebnisse für die Anzahl der Signale nach Hybridisierung der Chromosom 17- und p53-Sonde am Zellkernisolat des Tumors Nr. 29. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

### Diagramm der ersten Zellkernisolation:

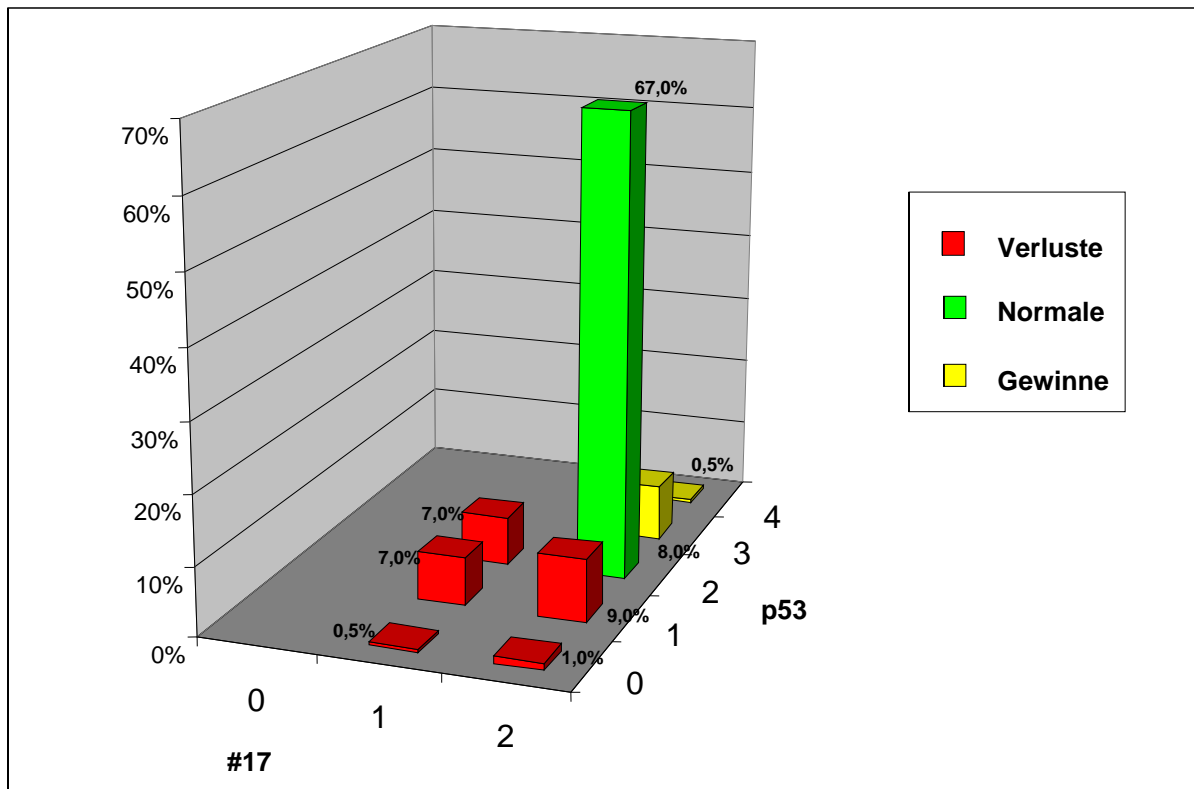


Abbildung 23: Graphische Darstellung Befunde der ersten FISH-Untersuchung am Zellkernisolat des Tumors Nr.29. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

Für die erste FISH-Untersuchung am Zellkernisolat des Tumors mit der Archivierungsnummer 29 ergibt sich ein Verlust der Chromosom 17-Zentromersonde von 14,5% sowie ein Verlust der p53-Sonde von 17,5%.

### Befunde der zweiten Zellkernisolation:

Bei diesem Zellkernisolat konnte bei der Hybridisierung mit der p53-Sonde ein Chromosom 17-Verlust in 12,5 % der ausgezählten Zellkerne festgestellt werden. Der Verlust von p53 lag bei 16,0 %. Es wurden keine Gewinne von Chromosom 17 festgestellt, und der Gewinn von p53 lag bei 3,0 % (Abbildung 24, 25, und Tabelle 16).

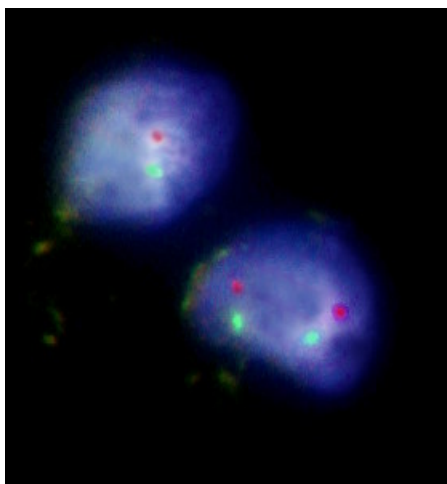


Abbildung 24: Mikroskopische Darstellung eines Zellkernisolates nach FISH bei Tumor Nr. 29. Bei der oberen Zelle ist sowohl das Chromosom 17- als auch das p53-Signal verloren gegangen. Die p53-Sonde erscheint rot, die Zentromersonde grün

#### Tabellarische Übersicht der zweiten Zellkernisolation

FITC = #17	Cy3 = p53				
	Anzahl der Signale	0	1	2	3
0	-----	-----	-----	-----	
1	-----	11 = 5,5 %	14 = 7 %	-----	
2	1 = 0,5 %	20 = 10 %	148 = 74 %	6 = 3 %	

Tabelle 16: Darstellung der Ergebnisse für die FISH-Untersuchung der Chromosom 17- und p53-Sonde am Zellkernisolat des Tumors Nr. 29. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt

### Befunde der zweiten FISH-Untersuchung als Diagramm

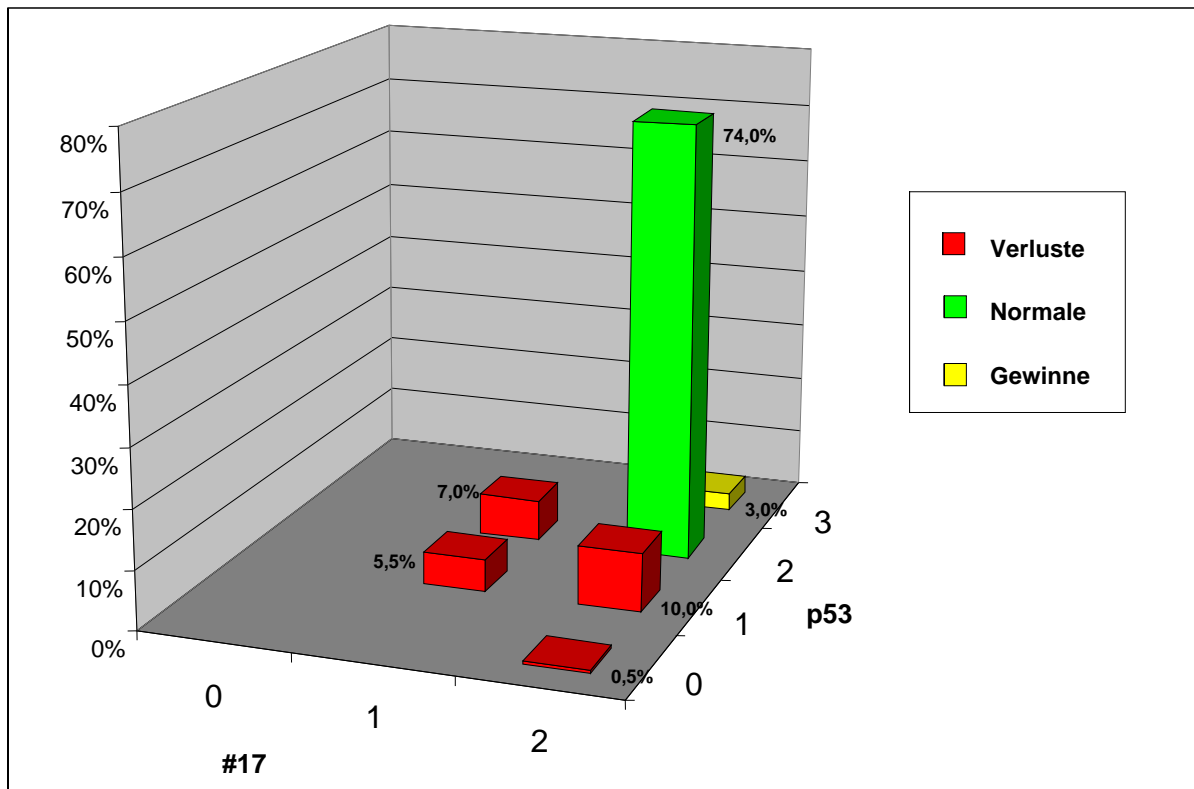


Abbildung 25: Ergebnisse der zweiten FISH-Untersuchung am Zellkernisolat des Tumors Nr. 29.

Somit zeigen sich keine grundlegenden Unterschiede zwischen den Hybridisierungen an den beiden Zellkernisolaten des Tumors Nr. 29. Der Chromosom 17-Verlust war beim Zellkernisolat mit 12,5 %-14,5 % geringer als beim Tumorgewebeschnitt, wo er zwischen 28,0 % und 38,5 % lag. Ebenso zeigte sich eine Differenz der p53-Verluste zwischen der Untersuchung am Tumorgewebeschnitt und der Untersuchung am Zellkernisolat. Beim Zellkernisolat betrug der Verlust 16,0 % und 17,5 %, und beim Tumorgewebeschnitt wurde ein Verlust von 18,0 % und sogar 49,0 % beobachtet. Somit war sowohl der p53-Verlust als auch der Chromosom 17-Verlust bei der Hybridisierung am Tumorgewebeschnitt höher als bei der Hybridisierung am Zellkernisolat. In allen Untersuchungen bestätigten sich aber übereinstimmend signifikante Verluste sowohl für die Zentromersonde 17 als auch die p53-Sonde.

### Tumor Nr. 31:

#### Befunde

Leider waren bei diesem Isolat nur 100 Zellkerne zum Auswerten geeignet. Dabei traten 25 % Verluste von p53 auf. Es konnten 21 % Verluste von p53 bei diploidem Chromosom 17 festgestellt werden und 4 % p53-Verluste bei monosomen Chromosom 17. Ein p53-Gewinn trat lediglich bei 4 % der ausgewerteten Zellkerne auf. Das Chromosom 17 war in 8 % der ausge-

werteten Zellkerne verloren und zeigte einen Gewinn in 2 % (Abbildung 26, 27 und Tabelle 17).

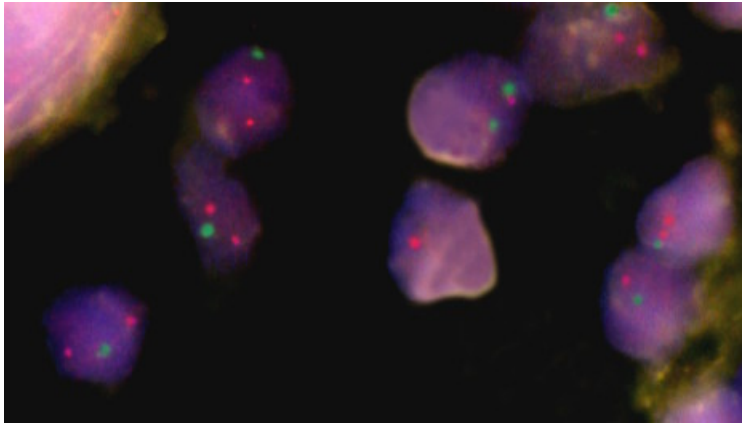


Abbildung 26: Mikroskopische Darstellung der FISH-Untersuchung am Zellkernisolat des Tumors Nr. 31. Es sind mehrere isolierte Zellkerne zu sehen. Die drei Zellkerne im linken Bildabschnitt zeigen alle einen Verlust von jeweils einem FITC-Signal (grün), also einen Verlust der Chromosom 17-Zentromersonde. Ein p53-Verlust ist bei den Zellen im mittleren Bildabschnitt dargestellt, dort erscheint nur jeweils ein rotes Cy3-Signal.

### Tabellarische Übersicht

	p53(Cy3)				
	Anzahl der Signale	0	1	2	3
#17(FITC)	0	-----	----- ---	----- -	-----
	1	1 = 1 %	3 = 3 %	3 = 3 %	1 = 1 %
	2	6 = 6 %	15 = 15 %	67 = 67 %	2 = 2 %
	3	-----	----- ---	1 = 1 %	1 = 1 %

Tabelle 17: Darstellung der Ergebnisse für die Hybridisierung mit der Chromosom 17- und p53-Sonde am Zellkernisolat des Tumors Nr. 31. Es wurden 100 Zellkerne ausgezählt.

## Diagramm

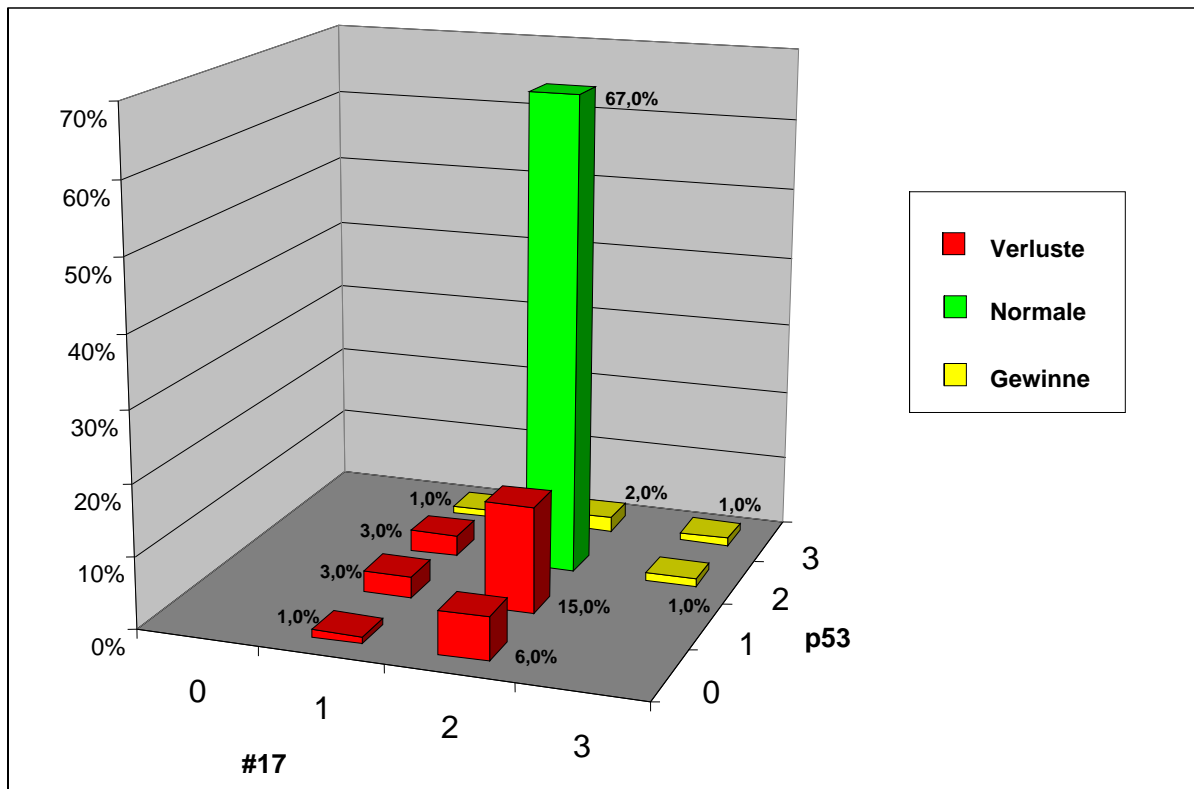


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung für die p53-Sonde und Chromosom 17-Zentromersonde.

Zusammenfassend ergibt sich für das Zellkernisolat des juvenilen Angiofibroms mit der Archivierungsnummer 31 für die p53-Sonde ein Verlust von 25%. Die Verluste der Chromosom-17-Zentromersonde lagen mit 8% unter dem Signifikanzniveau.

### Tumor Nr. 102:

Trotz des mehrmaligen Versuches einer Hybridisierung am Zellkernisolat gelang kein auswertbares Ergebnis. Bereits der Tumorgewebeschnitt erschien nicht geeignet für eine FISH-Untersuchung, und somit mussten wir bei diesem Tumor auf die Ergebnisse der Hybridisierung mit der Chromosom 17- und p53-Sonde verzichten.

### Tumor Nr. 113:

#### Befunde

Beim Zellkernisolat des Tumor Nr. 113 konnten 200 Zellkerne ausgewertet werden, in denen das Chromosom 17 in 86 % diploid vorlag und einen einfachen Verlust bei 14 % aufwies. Gewinne des Chromosoms konnten nicht beobachtet werden. Auch p53 lag in 89,5 % zweifach in jedem Zellkern vor und zeigte lediglich in 8 % einen Verlust. Bei 3 % konnte der Ver-



lust in Zellkernen beobachtet werden, die auch einen Chromosom 17-Verlust aufzeigten. Wiederum 3 % waren in Zellkernen zu finden, die noch über beide Chromosomen 17 verfügten. Ein kompletter p53-Verlust wurde in 2 % der Zellkerne mit diploidem Chromosom 17 beobachtet. Drei p53-Signale, also ein Gewinn von p53, konnte in 2,5 % der diploiden Chromosom 17-Zellkerne nachgewiesen werden (Tabelle 18, Abb. 28).

### Tabellarische Übersicht

	Cy3=p53				
	Anzahl der Signale	0	1	2	3
<b>FITC=#17</b>	0	-----	-----	-----	-----
	1	----- -----	6 = 3 %	22 = 11 %	
	2	4 = 2 %	6 = 3 %	157 = 78,5 %	5 = 2,5 %
	3	-----	-----	-----	-----

**Tabelle 18: Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung für die Anzahl der Signale der Chromosom-17- und p53-Sonden am Zellkernisolat des Tumors Nr. 113. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.**

Zusammenfassend ergibt sich für das juvenile Angiofibrom mit der Archivierungsnummer 113 für die Chromosom-17-Zentromersonde ein Verlust von 14,0 %. Bei Berücksichtigung einer Signifikanzgrenze von 10% liegen für p53-Verluste keine Hinweise vor.

## Diagramm

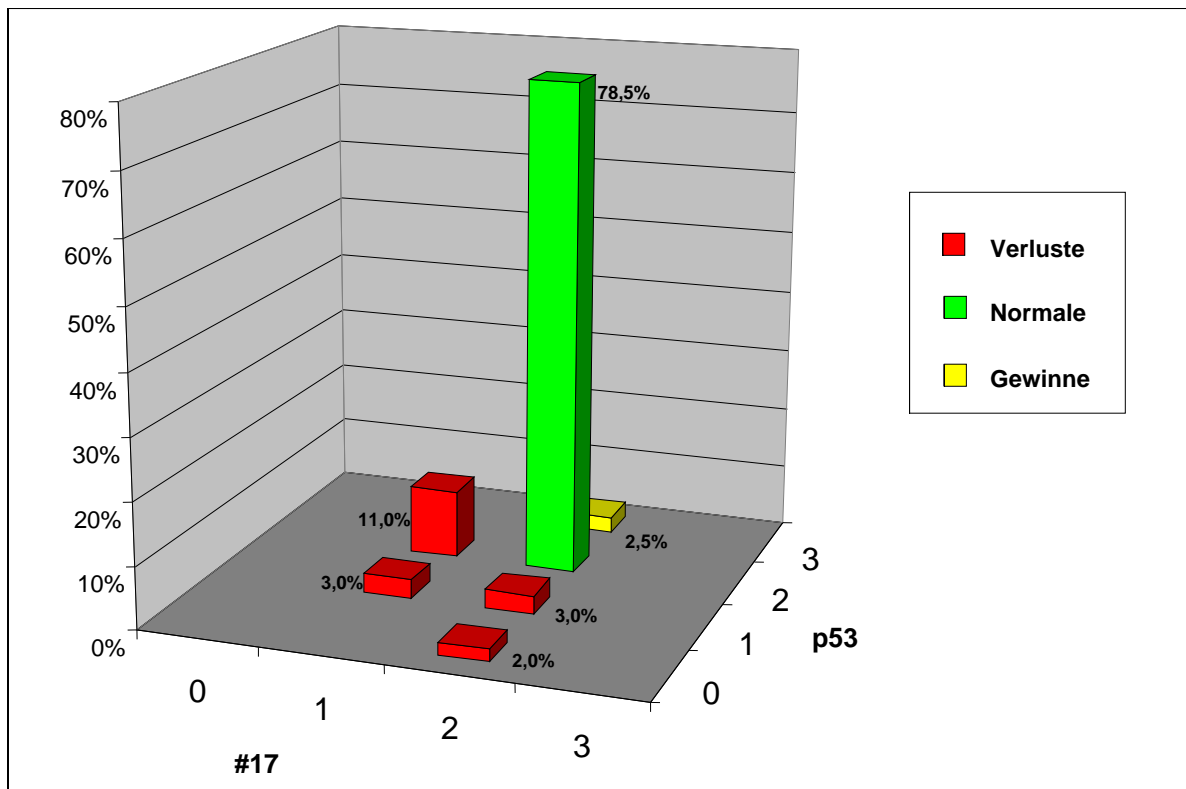


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung des Tumors Nr. 113.

### 5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse für p53

Bei einer Gesamtzahl von 9 Tumoren konnten bei 7 Angiofibromen eine erfolgreiche Hybridisierung mit der Chromosom 17- und p53-Sonde durchgeführt werden. Es wurden bei 5 Tumoren Hybridisierungen am Tumorgewebeschnitt durchgeführt und bei 3 Angiofibromen eine Hybridisierung am Zellkernisolat. Dabei konnten Ergebnisse mit Hilfe der Zellkernisolierung auch bei Tumoren erzielt werden, deren Tumorgewebeschnitte nur schlecht zu hybridisieren waren. Bei einem Tumor wurde eine Hybridisierung sowohl am Zellkernisolat als auch am Tumorgewebeschnitt durchgeführt. Die anschließende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit der Chromosom 17- und p53-Sonde.

<b>#17-p53</b>		
Tumor	Hybridisierung am Tumorgewebe- schnitt	Hybridisierung am Zellkernisolat
Nr. 29	<p>1. Untersuchung: 100 Zellkerne</p> <p>#17: 28,0 % Verluste</p> <p style="padding-left: 40px;">72,0 % Normalbefund</p> <p style="padding-left: 40px;">0,0 % Gewinne</p> <p>p53: 18,0 % Verluste</p> <p style="padding-left: 40px;">82,0 % Normalbefund</p> <p style="padding-left: 40px;">0,0 % Gewinne</p> <p>2. Untersuchung: 200 Zellkerne</p> <p>#17: 38,5 % Verluste</p> <p style="padding-left: 40px;">60,5 % Normalbefund</p> <p style="padding-left: 40px;">1,0 % Gewinne</p> <p>p53: 49,5 % Verluste</p> <p style="padding-left: 40px;">49,5 % Normalbefund</p> <p style="padding-left: 40px;">1,5 % Gewinne</p>	<p>1. Untersuchung: 200 Zellkerne</p> <p>#17: 12,5 % Verluste</p> <p style="padding-left: 40px;">87,5 % Normalbefund</p> <p style="padding-left: 40px;">0,0 % Gewinne</p> <p>p53: 16 % Verluste</p> <p style="padding-left: 40px;">81,0 % Normalbefund</p> <p style="padding-left: 40px;">3,0 % Gewinne</p> <p>2. Untersuchung: 200 Zellkerne</p> <p>#17: 14,5 % Verluste</p> <p style="padding-left: 40px;">85,5 % Normalbefund</p> <p style="padding-left: 40px;">0,0% Gewinne</p> <p>p53: 17,5 % Verluste</p> <p style="padding-left: 40px;">74,0 % Normalbefund</p> <p style="padding-left: 40px;">8,5 % Gewinne</p>

Nr. 30	Hybridisierung nicht möglich	
Nr. 31	Hybridisierung nicht möglich	100 Zellkerne: #17: 8,0 % Verluste 90,0 % Normalbefund 2,0 % Gewinne  p53: 25 % Verluste 71 % Normalbefund 4 % Gewinne
Nr. 46	200 Zellkerne: #17: 29 % Verluste 67 % Normalbefund 4,0 % Gewinne  p53: 3,0 % Verluste 59,5 % Normalbefund 7,5 % Gewinne	-----nicht ausgeführt-----
Nr. 66	200 Zellkerne: #17: 7,0 % Verluste	

	<p>88,5 % Normalbefund</p> <p>0,5 % Gewinne</p> <p>p53: 8,5 % Verluste</p> <p>88,5 % Normalbefund</p> <p>3,0 % Gewinne</p>	<p>-----nicht ausgeführt-----</p>
Nr. 74	<p>200 Zellkerne:</p> <p>#17: 8,0 % Verluste</p> <p>90,0 % Normalbefund</p> <p>2,0 % Gewinne</p> <p>p53: 22,0 % Verluste</p> <p>78,0 % Normalbefund</p> <p>0,0 % Gewinne</p>	<p>-----nicht ausgeführt-----</p>
Nr. 89	<p>200 Zellkerne:</p> <p>#17: 7,5 % Verluste</p> <p>92,0 % Normalbefund</p> <p>0,5 % Gewinne</p> <p>p53: 29,0 % Verluste</p>	<p>-----nicht ausgeführt-----</p>

	68,5 % Normalbefund  2,5 % Gewinne	
Nr. 102	Hybridisierung nicht möglich	
Nr. 113	Hybridisierung nicht möglich	200 Zellkerne:  #17: 14,0 % Verluste  86,0 % Normalbefund  0,0 % Gewinne  p53: 8,0 % Verluste  89,5 % Normalbefund  2,5 % Gewinne

**Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung mit der Zentromer 17- und p53-Sonde bei Zellkernisolaten und Tumorgewebeschnitten juveniler Angiofibrome**

Bei der Hybridisierung mit der Chromosom 17- und der p53- Sonde wurde vom Tumor Nr. 29 jeweils das Zellkernisolat und der Tumorgewebeschnitt zweimal analysiert. Dabei wurden für das Chromosom 17 Schwankungen beim Verlust zwischen 12,5 % und 38,5 % beobachtet. Der p53-Verlust lag zwischen 16,0 % und 49,5 %, wobei beim Tumorgewebeschnitt die Verluste höher waren. Bei den restlichen sechs Tumoren lag der Chromosom 17-Verlust zwischen 7,0 % und 29 %. Drei der sieben Tumore hatten Chromosom 17-Verluste über 10 % aufzuweisen. Der p53-Verlust lag bei den sieben Tumoren zwischen 8,0 % und 49,5 %. Fünf der sieben Tumore hatten einen p53-Verlust in über 10 % der ausgewerteten Zellkerne. (Abb. 29)

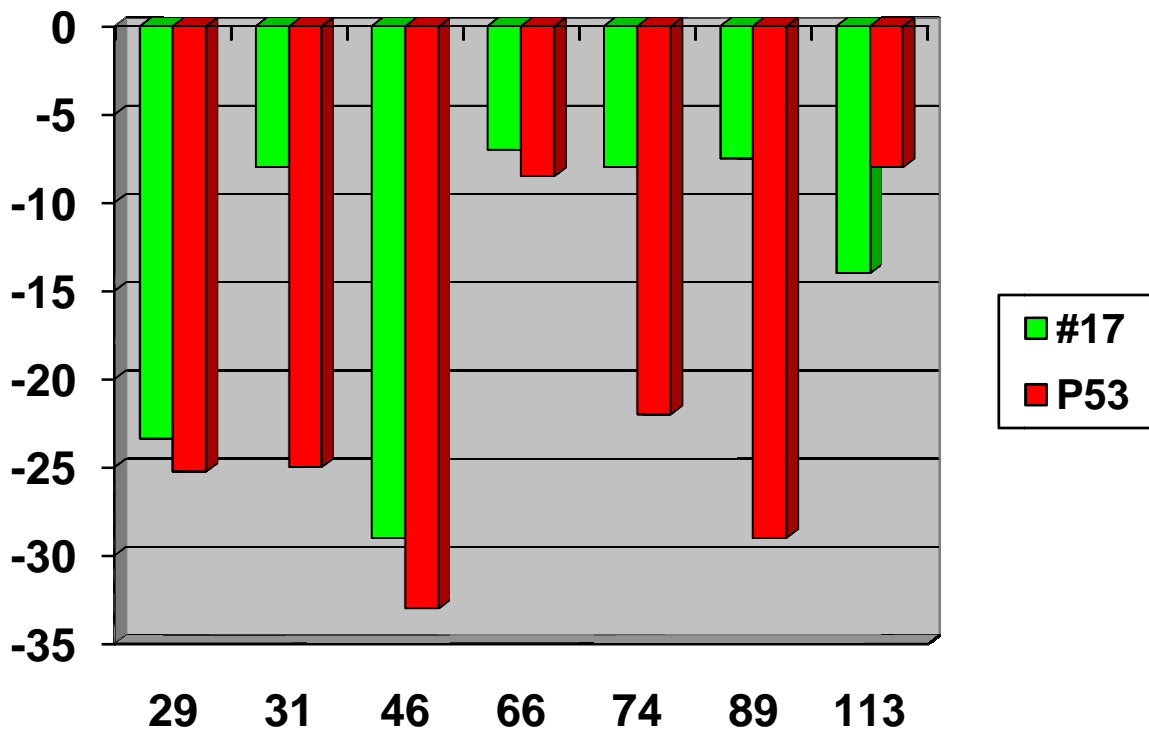


Abbildung 29: Gesamtergebnisse der Untersuchung von p53 und Chromosom 17 als Säulendiagramm. Ergebnisse von Untersuchungen sowohl am Gewebeschnitt als auch am Zellkernisolat wurden gemittelt.

### 5.1.5 FISH am Lymphozytenpräparat für Her2/neu

Auch die Sonde für Her2/neu wurde vor der Hybridisierung mit Tumorgewebeschnitten und Tumorkernisolaten an einem Lymphozytenpräparat auf ihre Qualität hin untersucht.

#### Befunde

Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt, von denen in 91,0 % die Zentromersonde an 2 Chromosomen 17 binden konnten. 8 % zeigten nur ein Zentromersignal in ihrem Zellkern, und bei 1 % wurde ein Gewinn eines Chromosoms 17 beobachtet. Jeweils zwei Signale für Her2/neu wurden in 98 % der Lymphozyten beobachtet, ein Signal bei 1 % und bei 1 % auch ein Gewinn eines Her2/neu-Signals. Mit diesem Ergebnis erschien uns die Sonde ausreichend spezifisch, um sie mit den Tumorgewebeschnitten und Zellkernisolaten zu hybridisieren (Tab. 20, Abb. 30, 31).

### Tabellarische Übersicht

FITC = #17	Cy3 = Her2/neu			
	0	1	2	3
0	-----	-----	-----	-----
1	-----	1 = 0,5 %	15 = 7,5 %	-----
2	-----	1 = 0,5 %	180 = 90 %	1 = 0,5 %
3	-----	-----	1 = 0,5 %	1 = 0,5 %

Tabelle 20: Darstellung der Hybridisierungsergebnisse der Zentromersonde 17 und der Her2/neu-Sonde am Lymphozytenpräparat. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

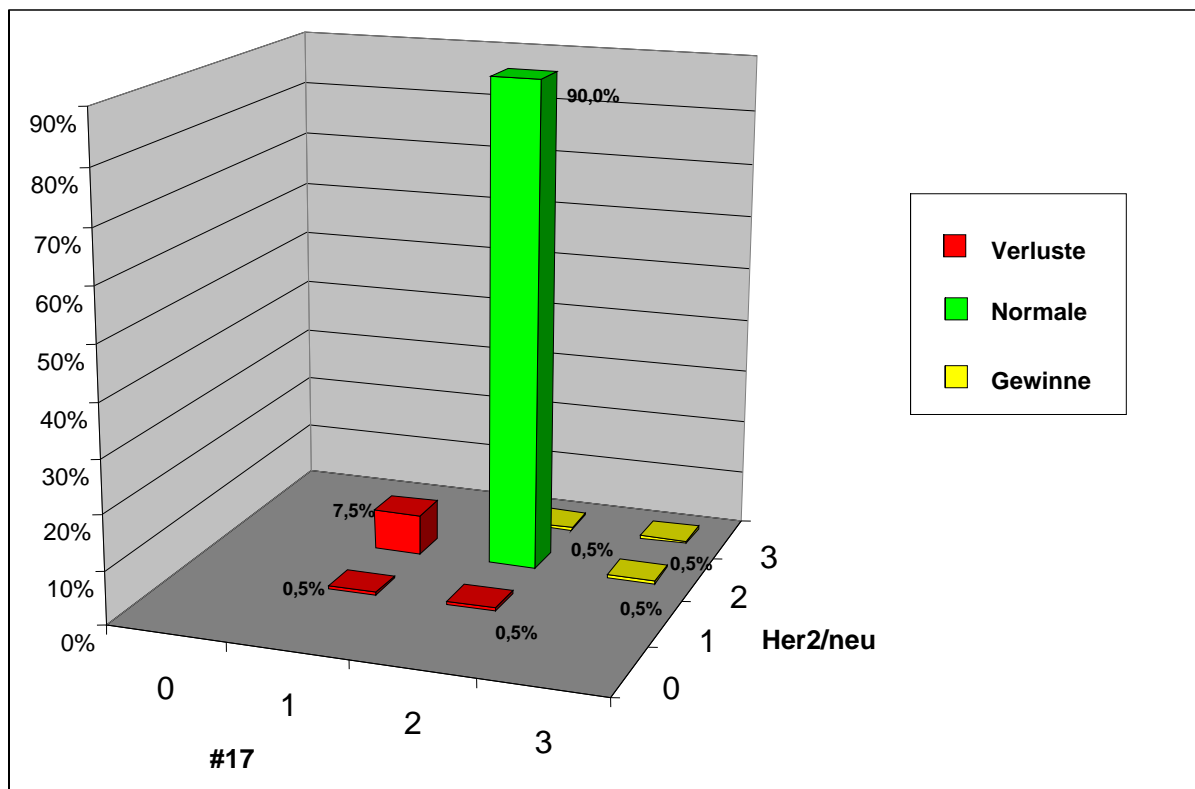
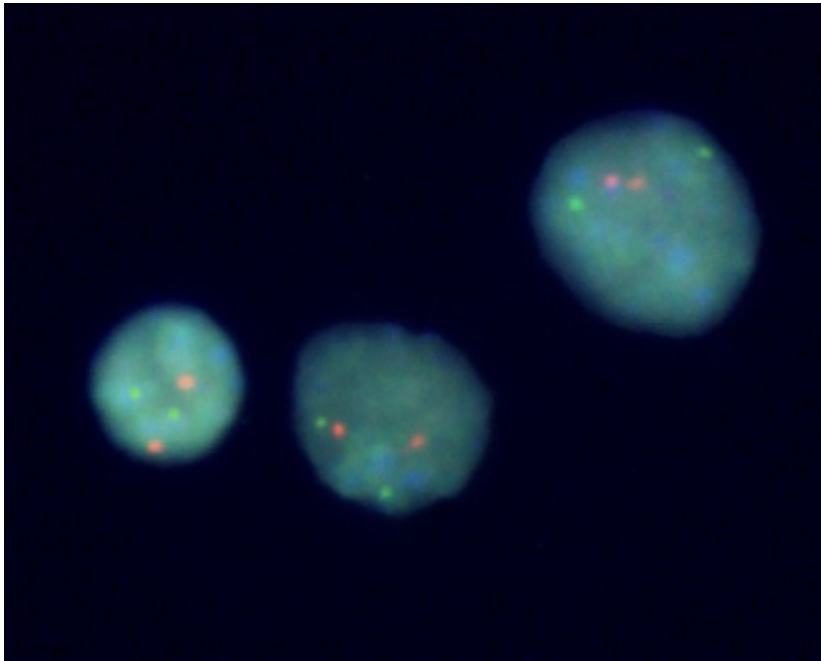


Abbildung 30: Darstellung der Ergebnisse der Sondaustestung am Lymphozytenpräparat für Her2/neu.





**Abbildung 31:** Bild des Lymphozytenpräparates mit der Her2/neu-Sonde. Die Zentromersonde des Chromosoms 17 erscheint grün, die Her2/neu-Sonde rot.

Bei Berücksichtigung der Signifikanzgrenze von 10% ergeben sich bei der Austestung der Her2/neu-Sonde und Chromosom17-Zentromersonde keine Hinweise auf Verluste und lässt uns die Sonde als geeignet erscheinen, um das Tumorgewebe damit zu untersuchen.

### **5.1.6 FISH am Tumorgewebeschnitt für Her2/neu**

Wir hybridisierten folgende fünf Tumorgewebeschnitte mit der Her2/neu Sonde: Nr. 29, Nr. 30, Nr. 46, Nr.66 und Nr. 74.

#### **Tumor Nr. 29:**

Dieser Tumorgewebeschnitt wurde einer 2,5-minütigen Pretreatment-Vorbehandlung und einem 2,5-minütigen Proteinase K-Verdau unterzogen, bevor man ihn mit der Chromosom 17- und Her2/neu-Sonde hybridisierte.

#### **Befunde**

Bei der Untersuchung des Tumorgewebeschnittes Nr. 29 mit der #17- und Her2/neu-Sonde konnten wir einen einfachen Verlust des Chromosoms 17 in 14 % beobachten, wobei 6,0 % mit einem gleichzeitigen Verlust von Her2/neu einhergingen. Insgesamt konnte ein Her2/neu-Verlust in 23,5 % der ausgezählten Zellkerne festgestellt werden. 17,5 % der Her2/neu-Verluste wurden in Zellkernen mit diploidem Chromosom 17 beobachtet. Ein Gewinn von Her2/neu wurde lediglich bei 0,5 % festgestellt (Tab. 21, Abb. 33).

## Tabellarische Übersicht

Die Hybridisierungsergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

FITC = #17		Cy3 = Her2/neu			
		Anzahl der Signale	0	1	2
0	-----	-----	-----	-----	-----
1	-----	-----	12 = 6 %	16 = 8 %	-----
2	1 = 0,5 %	34 = 17 %	136 = 68 %	1 = 0,5 %	-----
3	-----	-----	-----	-----	-----

Tabelle 21: Darstellung der Hybridisierungsergebnisse der Chromosom17- und Her2/neu-Sonde am Tumorgewebschnitt Nr. 29. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

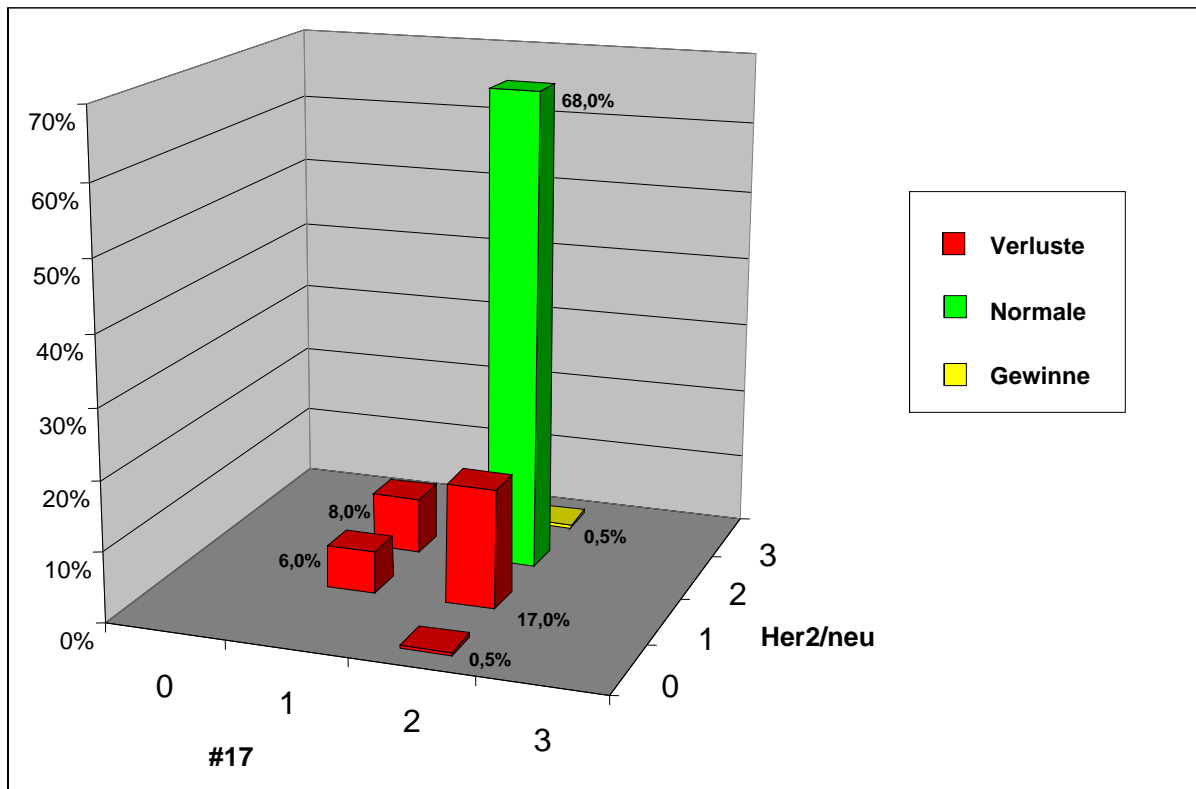


Abbildung 32: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Tumors Nr. 29 für die Hybridisierung mit der Her2/neu- und Chromosom-17-Zentromersonde.

**Tumor Nr. 30:**

Wie zuvor mit der p53-Sonde war auch mit der Her2/neu-Sonde eine Hybridisierung an den Gewebeschnitten des Tumors Nr. 30 nicht möglich.

**Tumor Nr. 46:**

Von dem Tumorgewebeschnitt Nr. 46 war aus vorherigen Versuchen in unserem Labor bekannt, dass eine Hybridisierung bei einer Vorbehandlung von 28 Minuten und einem Proteinase K-Verdau von 28 Minuten erfolgreich sein kann. Bei dieser Behandlung des Gewebeschnittes gelang es uns, 200 Zellkerne auszuwerten.

**Befunde**

Ein Verlust von Her2/neu wurde in insgesamt 10,5 % der Zellkerne beobachtet, wovon 8,5 % mit einem diploiden Chromosom-17-Signal einhergingen. Das Chromosom 17 war in 5 % verloren gegangen. Ein Gewinn von Her2/neu wurde in nur 2,0 % festgestellt (Tab. 22, Abb. 33).

**Tabellarische Übersicht**

Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt:

FITC = #17	Cy3 = Her2/neu				
	Anzahl der Signale	0	1	2	3
0	-----	-----	-	-----	-----
1	-----	4 = 2 %	6 = 3 %	-----	-----
2	2 = 1 %	15 = 7,5 %	169 = 84,5 %	3 = 1,5 %	-----
3	-----	-----	-----	1 = 0,5 %	-----

**Tabelle 22:** Darstellung der Hybridisierungsergebnisse mit der Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 46. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

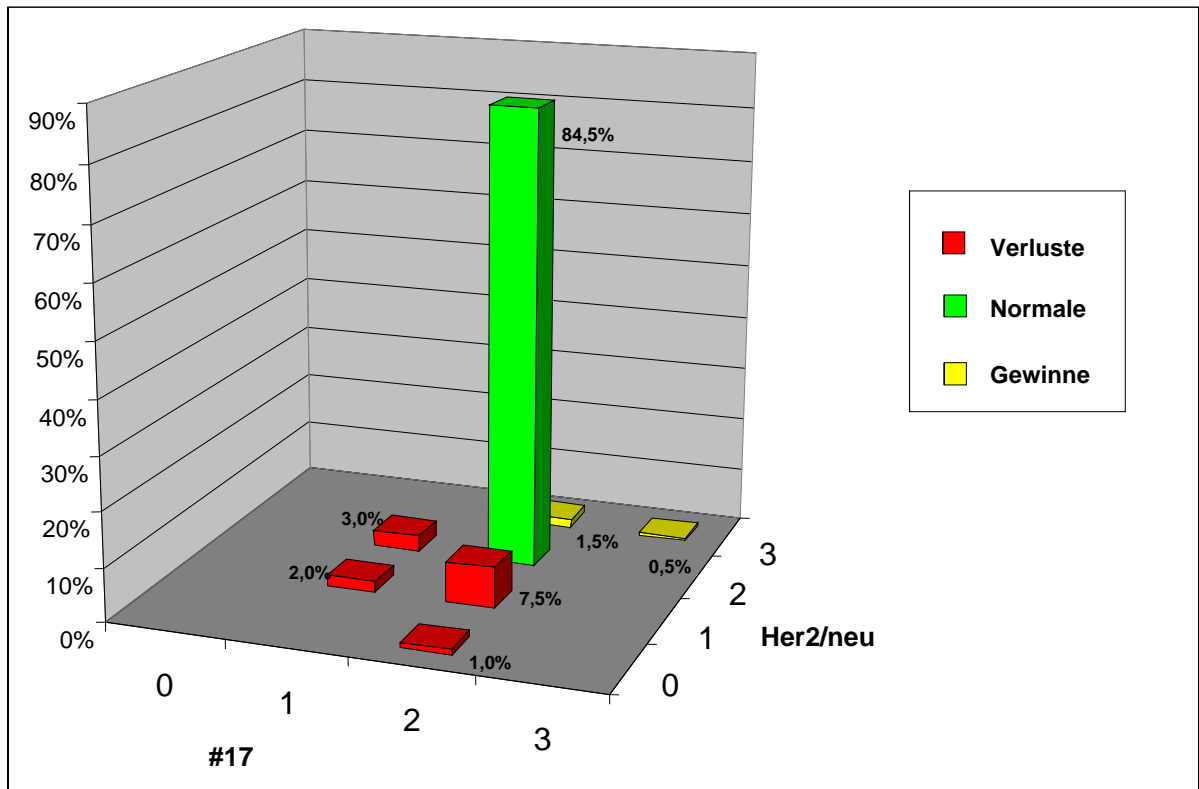


Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 46 als Säulendiagramm.

Zusammenfassend ergibt sich für das juvenile Angiofibrom mit der Archivierungsnummer 46 für die Her2/neu Sonde ein Verlust von 10,5%. Für die Chromosom-17-Zentromersonde gibt es unter Berücksichtigung des Signifikanzniveaus kein Hinweis auf Verluste.

#### **Tumor Nr. 66:**

Nachdem bereits eine erfolgreiche Hybridisierung der p53-Sonde an diesem Tumorgewebeschnitt gelungen war, entschlossen wir uns, auch die Her2/neu-Sonde mit dem Schnitt hybridisieren zu lassen und übernahmen die Verdauzeiten aus dem vorherigen Versuch (siehe 5.1.2.). Der Schnitt wurde einer 30-minütigen Pretreatment-Pulver-Behandlung (ONCOR, Deutschland) und einem anschließenden 30-minütigem Proteinase K-Verdau unterzogen.

#### **Befunde**

Das Chromosom 17 zeigte in 14,5 % eine Monosomie. Beim Tumorgewebeschnitt der p53-Sonde konnte man lediglich einen Verlust von Chromosom 17 in 1 % beobachten. Ein Verlust von Her2/neu wurde in 20,5 % beobachtet, ein Gewinn lediglich in 0,5 % (Tab. 23, Abb. 34).

**Tabellarische Übersicht**

	Cy3= Her2/neu				
	Anzahl der Signale	0	1	2	3
FITC = #17	0	-----	----- -	-----	-----
	1	2 = 1 %	17 = 8,5 %	10 = 5 %	-----
	2	12 = 6 %	10 = 5 %	148 = 74 %	1 = 0,5 %
	3	----- -	----- -	-----	-----

**Tabelle 23: Darstellung der Hybridisierungsergebnisse der Zentromersonde 17 und der Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 66. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.**

Zusammenfassend ergibt sich für das juvenile Angiofibrom mit der Archivierungsnummer 66 für die Chromosom-17-Zentromersonde ein Verlust von 14,5 % sowie für die Her2/neu-Sonde ein Verlust von 20%.

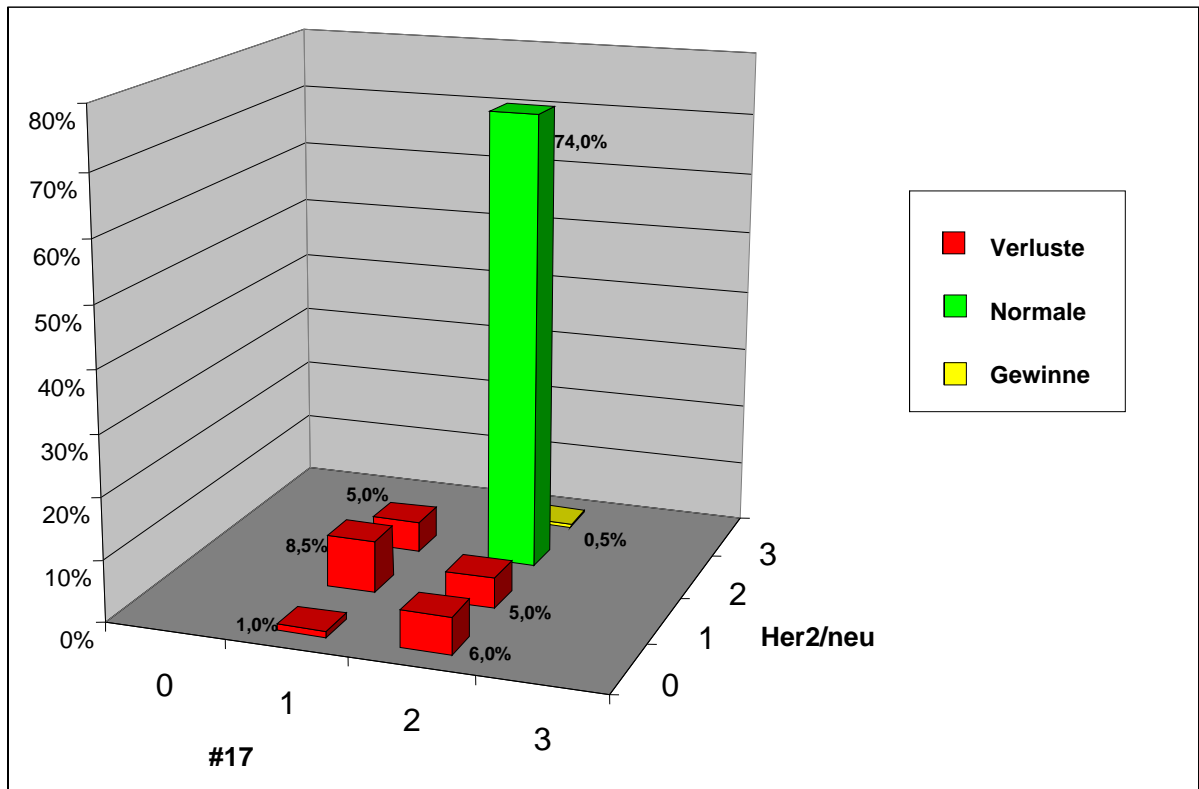


Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse für die Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 66 als Säulendiagramm.

#### Tumor Nr. 74:

Der Tumorschnitt Nr. 74 wurde 35 Minuten der Pretreatment-Pulver-Vorbehandlung (ONCOR) unterzogen und anschließend während 35 Minuten dem Proteinase K-Verdau unterzogen, um ein gutes Eindringen der Sonde zu gewährleisten. Es konnten 200 Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

#### Befunde

Ein Verlust des Chromosoms 17 konnte in 7,5 % beobachtet werden, während 92 % der Zellkerne diploid waren und 0,5 % eine Trisomie aufzeigten. Her2/neu zeigte einen Verlust bei 32 %, wovon 4,5 % in Zellkernen zu finden waren, die auch nur ein Chromosom 17 vorzuweisen hatten. 27 % waren in diploidem Chromosom 17-Zellkernen zu finden (Tab. 24, Abb. 35)

### Tabellarische Übersicht

#17(FITC)	Her2/neu(Cy3)			
	Anzahl der Signale	0	1	2
0	-----	-----	-----	-----
1	1 = 0,5 %	9 = 4,5 %	5 = 2,5 %	-----
2	8 = 4 %	46 = 23 %	128 = 64 %	2 = 1 %
3	-----	-----	-----	1 = 0,5 %

Tabelle 24: Darstellung der Hybridisierungsergebnisse der Zentromersonde 17 und Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 74. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.

Zusammenfassend kann beim Tumor Nr. 74 ein Verlust der Her2/neu-Sonde von 32,0% festgestellt werden. Einen Hinweis auf signifikante Chromosom 17 Verluste gibt es nicht.

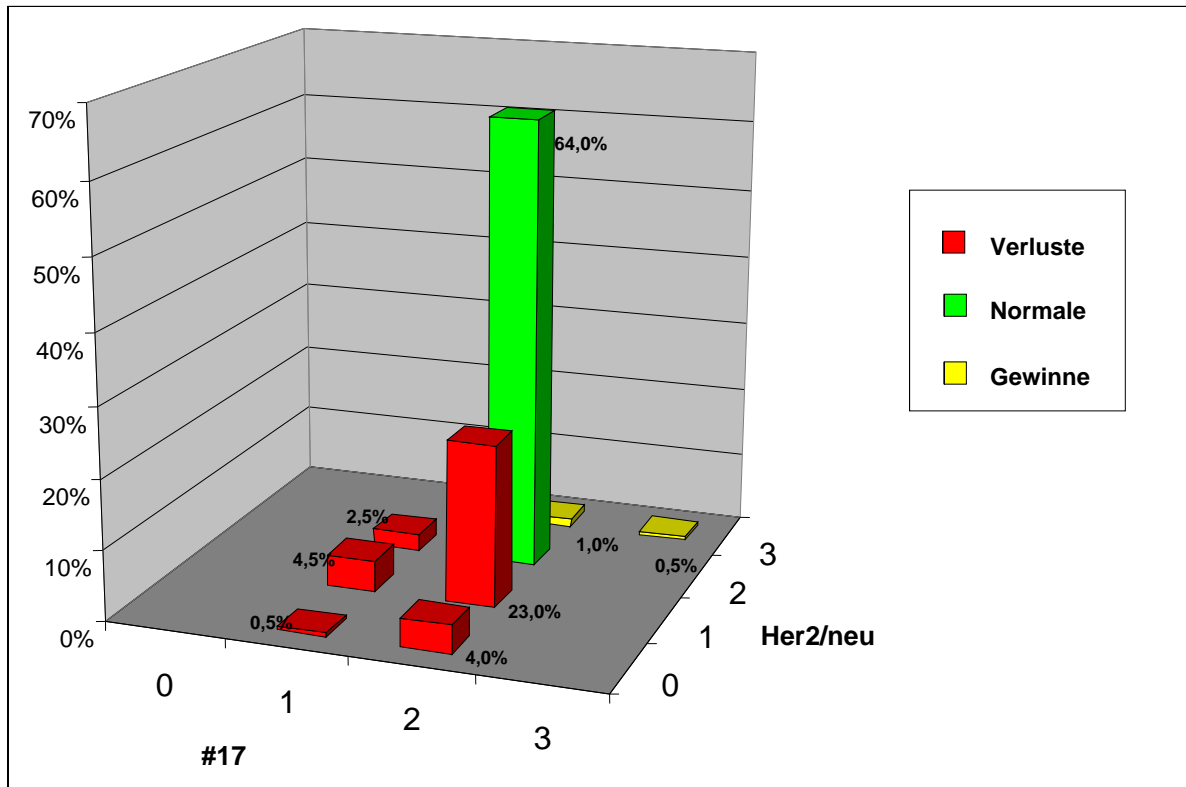


Abbildung 35: Darstellung der Ergebnisse für die Her2/neu-Sonde am Tumorgewebeschnitt Nr. 74 als Säulendiagramm

### 5.1.7 FISH am Zellkernisolat für Her2/neu

Eine Hybridisierung am Zellkernisolat erfolgte an folgenden fünf Tumoren: Nr. 30, Nr. 31, Nr. 89, Nr. 102 und Nr. 113.

#### Tumor Nr. 30:

Wie bereits bei den Hybridisierungsversuchen an Gewebeschnitten und Zellkernisolaten des Tumors mit der Chromosom 17 und p53-Sonde, wurde auch bei der Hybridisierung des Zellkernisolates mit der Her2/neu-Sonde kein auswertbares Ergebnis erzielt. An diesem Tumor konnten wir somit keine FISH-Untersuchung durchführen.

#### Tumor Nr. 31:

##### Befunde

Bei den 100 auswertbaren Zellkernen waren 10 % Verluste des Chromosoms 17 zu erkennen. Bei Her2/neu war ein Verlust von insgesamt 24 % zu beobachten, wovon 5 % in Zellkernen zu finden waren, die auch einen Chromosom 17-Verlust aufzuweisen hatten. 2 % der Zellkerne zeigten einen kompletten Her2/neu-Verlust in diploiden Chromosom 17-Zellkernen (Tab. 25, Abb. 36, Abb. 37).

##### Tabellarische Übersicht

	Her2/neu(Cy3)			
	0	1	2	3
#17(FITC)	-----	-----	-----	-----
0	-----	-----	-----	-----
1	-----	5 = 5 %	5 = 5 %	-----
2	2 = 2 %	17 = 17 %	71 = 71 %	-----
3	-----	-----	-----	-----

**Tabelle 25: Hybridisierungsergebnisse der Zentromersonde 17 und der Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat des Tumors Nr. 31. Es wurden 100 Zellkerne ausgezählt.**



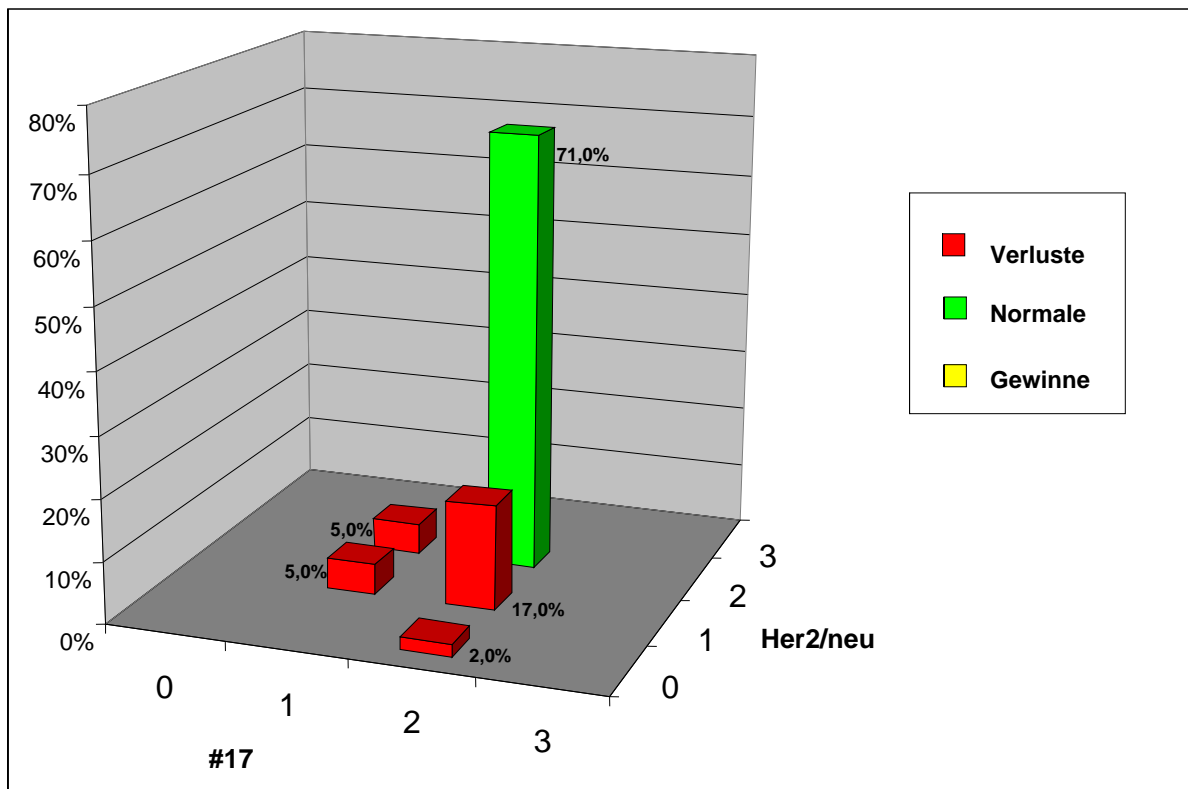


Abbildung 36: Darstellung der Ergebnisse der FISH-Untersuchung von Her2/neu am Zellkernisolat Nr. 31 als Säulendiagramm.

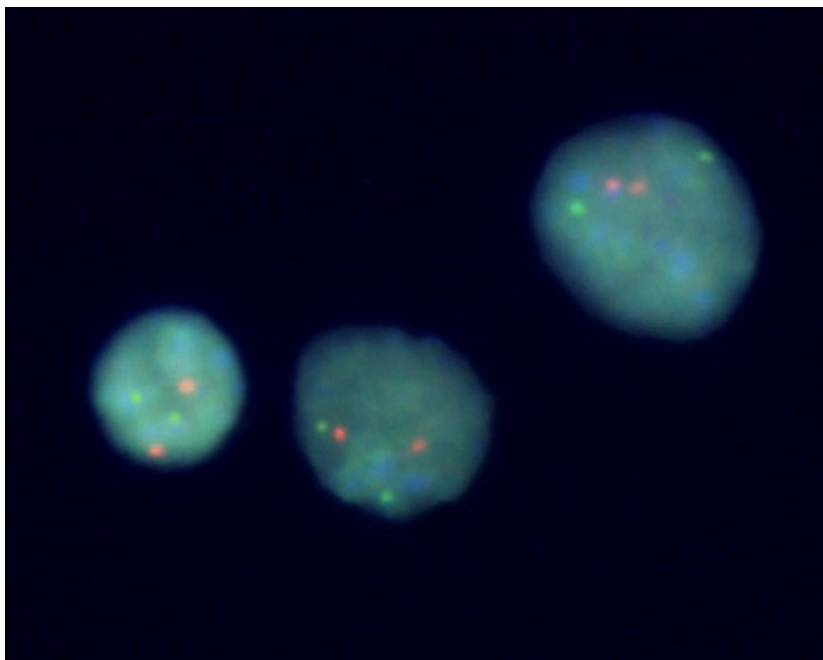


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des Zellkernisolates Nr. 31. Die Her2/neu-Sonde erscheint rot, die Zentromersonde grün. Die drei abgebildeten Zellen zeigen keine Verluste von Her2/neu und Chromosom 17.

Zusammenfassend ergibt sich für das juvenile Angiofibrom mit der Archivierungsnummer 31 für die Zentromersonde ein Verlust von 10% sowie für die Her2/neu-Sonde von 10%.

**Tumor Nr. 89:****Befunde**

Beim Zellkernisolat des Tumors Nr. 89 waren 200 Zellkerne auszuwerten, von denen 14 % einen Verlust des Chromosoms 17 aufzeigten. Ein Her2/neu-Verlust wurde in 7,5 % beobachtet, wovon 5 % in diploiden Chromosom 17 Zellkernen zu finden waren. Ein Gewinn von Her2/neu wurde lediglich in 2 % beobachtet (Tab. 26, Abb. 38, Abb. 39).

**Tabellarische Übersicht**

	Cy3 = Her2/neu					
	0	1	2	3	4	
FITC = #17	0	-----	-----	-----	-----	-----
	1	-----	5 = 2,5 %	23 = 11,5 %	-----	-----
	2	1 = 0,5 %	9 = 4,5 %	157 = 78,5 %	2 = 1 %	1 = 0,5 %
	3	-----	-----	1 = 0,5 %	1 = 0,5 %	

**Tabelle 26: Hybridisierungsergebnisse der Zentromersonde 17 und der Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat des Tumors Nr. 89. Es wurden 200 Zellkerne ausgezählt.**

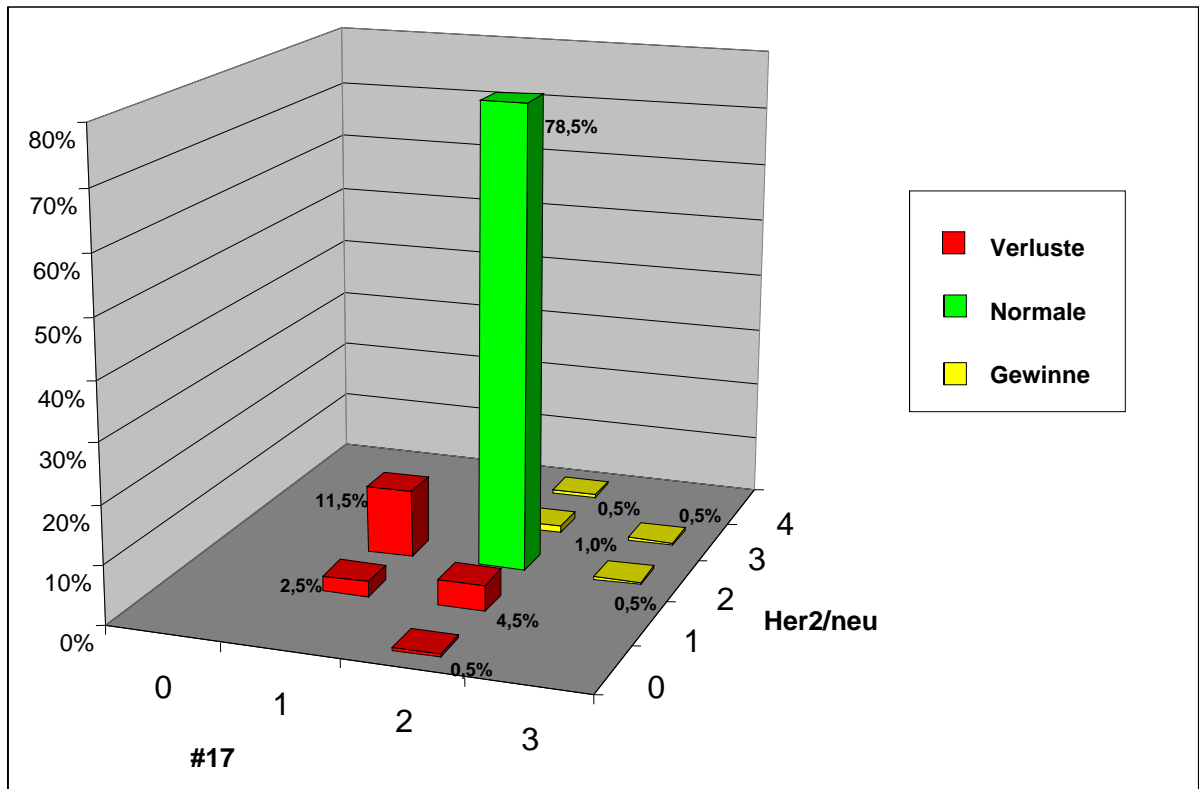


Abbildung 38: Darstellung der Ergebnisse der Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat Nr. 89 als Säulendiagramm

**Bild:**

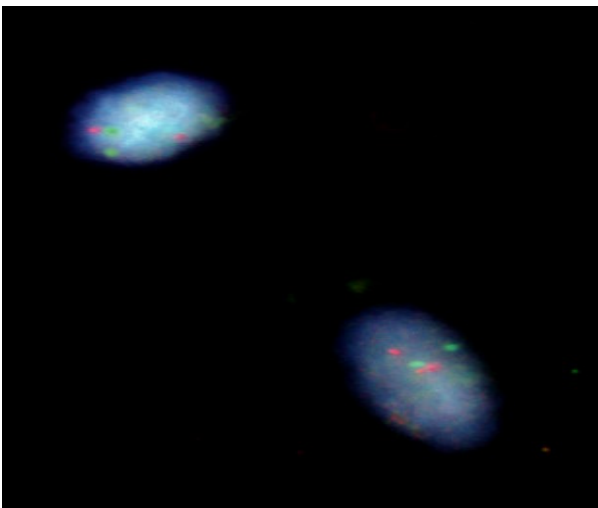


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat Nr. 89. Die Zentromer-sonde erscheint grün, die Her2/neu-Sonde rot. Beide abgebildeten Zellen enthalten jeweils 2 Signale für die Zentromer-sonde und jeweils 2 Signale für die Her2/neu-Sonde.

**Tumor Nr. 102:**

Eine FISH-Untersuchung war bei dem Zellkernisolat dieses Tumors wie zuvor auch bei dem Versuch der Hybridisierung mit der Chromosom 17- und p53-Sonde nicht möglich. Da auch

keine Ergebnisse bei den Tumorgewebeschnitten zu ermitteln waren, konnte der Tumor bei dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden.

### **Tumor Nr. 113:**

Bei diesem Zellkernisolat konnten trotz mehrfacher Hybridisierungsansätze nur 95 Zellkerne ausgewertet werden.

### **Befunde**

Chromosom 17 lag dabei in 12,6 % der Fälle monosom vor. Der Her2/neu-Verlust war mit 8,3 % auszumachen, und ein Gewinn konnte in 4,2 % bei ausschließlich diploiden Chromosom 17-Zellkernen beobachtet werden. Der Her2/neu-Verlust war bei 2,1 % der monosomen Chromosom 17-Zellkerne zu erkennen. Bei 1,1 % gab es einen zweifachen Her2/neu-Verlust in normalen Chromosom 17-Kernen und bei 5,2 % einen einfachen Verlust ebenfalls in normalen Chromosom 17-Zellkernen (Tab. 27, Abb. 40).

### **Tabellarische Übersicht:**

	Cy3 = Her2/neu			
	0	1	2	3
FITC = #17	-----	-----	-----	-----
0	-----	2 = 2,1 %	10 = 10,5 %	
1	1 = 1,1 %	5 = 5,2 %	74 = 77,8 %	4 = 4,2 %
2	-----	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	-----

**Tabelle 27: Hybridisierungsergebnisse der Zentromersonde 17 und der Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat des Tumors Nr. 113. Es wurden 95 Zellkerne ausgezählt.**

Zusammenfassend ergibt sich für das juvenile Angiofibrom mit der Archivierungsnummer 113 für die Zentromersonde ein Verlust von 12,6% sowie keinen signifikanten Verlust der Her2/neu-Sonde unter Berücksichtigung, dass nur 95 Zellen ausgezählt werden konnten.

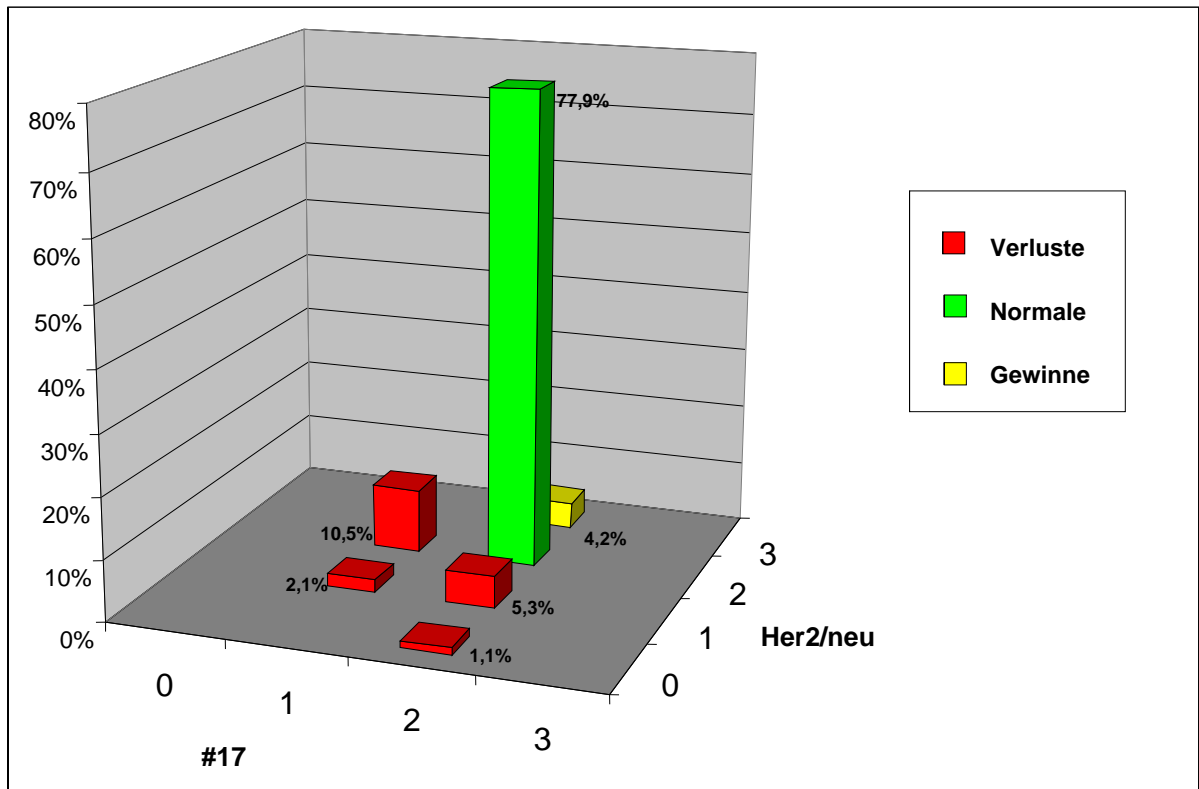


Abbildung 40: Darstellung der Ergebnisse für die Her2/neu-Sonde am Zellkernisolat Nr. 113 als Säulendiagramm

### 5.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse für Her2/neu

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Hybridisierung der Chromosom17- und Her2/neu-Sonde bietet folgende Tabelle:

#17-Her2/neu		
Tumor	Tumorgewebeschnitt	Zellkernisolat
Nr. 29	200 Zellkerne: #17: 14,0 % Verluste 86,0 % Normalbefund 0,0 % Gewinne  Her2/neu: 23,5 % Verluste 76,0 % Normalbefund	-----nicht ausgeführt-----

	0,0 % Gewinne	
Nr. 30	Hybridisierung nicht möglich	
Nr. 31	<p>-----nicht ausgeführt-----</p>	<p>100 Zellkerne:</p> <p>#17:        10,0 % Verluste</p> <p>              90 % Normalbefund</p> <p>              0,0 % Gewinne</p> <p>Her2/neu: 24,0 % Verluste</p> <p>              76,0 % Normalbefund</p> <p>              0,0 % Gewinne</p>
Nr. 46	<p>200 Zellkerne:</p> <p>#17:        5,0 % Verluste</p> <p>              94,5 % Normalbefund</p> <p>              0,5 % Gewinne</p> <p>Her2/neu: 10,5 % Verluste</p> <p>              87,5 % Normalbefund</p> <p>              2,0 % Gewinne</p>	<p>-----nicht ausgeführt-----</p>
Nr. 66	<p>200 Zellkerne:</p> <p>#17:        14,5 % Verluste</p> <p>              85,5 % Normalbefund</p> <p>              0,0 % Gewinne</p> <p>Her2/neu: 20,5 % Verluste</p> <p>              79,0 % Normalbefund</p>	<p>-----nicht ausgeführt-----</p>

	0,5 % Gewinne	
Nr. 74	200 Zellkerne: #17: 7,5 % Verluste 92,0 % Normalbefund 0,5 % Gewinne  Her2/neu: 32,0 % Verluste 66,5 % Normalbefund 1,5 % Gewinne	-----nicht ausgeführt-----
Nr. 89	-----nicht ausgeführt-----	200 Zellkerne: #17: 14,0 % Verluste 85,5 % Normalbefund 1 % Gewinne Her2/neu: 7,5 % Verluste 90,0 % Normalbefund 2,0 % Gewinne
Nr. 102	Hybridisierung nicht möglich	
Nr. 113	-----nicht ausgeführt-----	95 Zellkerne: #17: 12,6 % Verluste 88,1 % Normalbefund 4,2 % Gewinne  Her2/neu: 8,3 % Verluste 88,3 % Normalbefund 4,2 % Gewinne

**Tabelle 28: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Hybridisierung der Chromosom 17- und Her2/neu-Sonde an Tumorgewebeschnitten und Zellkernisolaten.**

Bei den sieben Tumoren mit einem auswertbaren Ergebnis wurde ein Chromosom 17-Verlust zwischen 5 % und 14,5 % beobachtet. Fünf der sieben Tumore zeigten Verluste über 10 %. Der Her2/neu-Verlust konnte zwischen 7,5 % und 32,0 % festgestellt werden, wobei fünf der sieben Tumore Verluste über 10,0 % und vier Tumore Verluste über 20,0 % aufwiesen. Ein signifikanter Gewinn von Her2/neu konnte nicht beobachtet werden. Auch der Chromosom 17-Gewinn lag bei fünf Tumoren unter 1 %. In zwei Fällen wurde ein Gewinn von 4,2 % beziehungsweise von 7,5 % beobachtet.

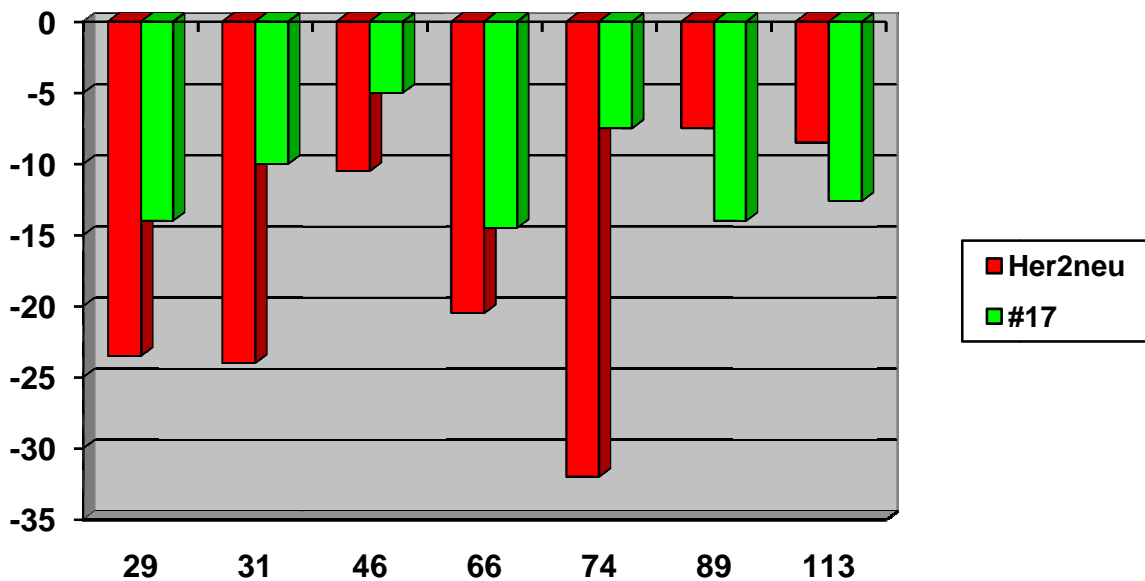


Abbildung 41: Zusammenfassung der Ergebnisse aller Tumore für die Her2/neu Sonde.



## **5.2 PCR-Ergebnisse**

### **5.2.1 Ergebnisse für $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor, Her2/neu und p53 aus Gesamt-Tumorgewebe**

Für eine RT-PCR-Untersuchung stand uns Gewebe von sieben juvenilen Angiofibromen bei – 70 °C zur Verfügung. Die Expression von  $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor, p53 und Her2/neu wurde mit der Expression der 28s-rRNA verglichen.

Folgende Fragmentlängen wurden aufgrund der Primerauswahl erwartet:  $\beta$ -Catenin (132 bp), Androgenrezeptor (247 bp), p53 (124 bp), Her2/neu (72 bp) und 28-S-rRNA (100bp). In einer semiquantitativen Auswertung wurden die einzelnen Banden mit der Intensität der 28s-rRNA verglichen.

Da wir die Frage nach einer zellspezifischen Expression (Endothelzellen, Fibroblasten) der Kandidatengene mittels semiquantitativer RT-PCR-Untersuchungen verfolgten, entschlossen wir uns, eine PCR an lasermikrodissezierten Zellen durchzuführen. Dabei wurden Stromazellen und Endothelzellen separat gewonnen und jeweils einer PCR unterzogen.

### **5.2.2 Ergebnisse von Stromazellen und Endothelzellen im Vergleich**

#### **Tumor Nr. 29:**

Die Bande von  $\beta$ -Catenin liegt bei 132 Basenpaaren. Das Ergebnis der PCR zeigt sowohl bei Stromazellen als auch bei Endothelzellen eine zweite Bande, die bei diesem Angiofibrom eine stärkere Expression im Vergleich zur 28s-rRNA besitzt. Das  $\beta$ -Catenin zeigt im Gegensatz zu den Endothelzellen eine stärkere Expression im Vergleich zur 28s-rRNA. Der Androgenrezeptor zeigt keinen Unterschied der Intensität der Banden zwischen Stromazellen und Endothelzellen. Allerdings ist er in beiden Zelltypen schwächer exprimiert als die 28s-rRNA. P53 ist im Vergleich zur 28s-rRNA in beiden Zelltypen gleich stark exprimiert. Die Expression von Her2/neu ist in Endothelzellen und in Stromazellen vergleichbar mit der Expression der 28s-rRNA. Die Ergebnisse sind in Abb. 42 gezeigt.

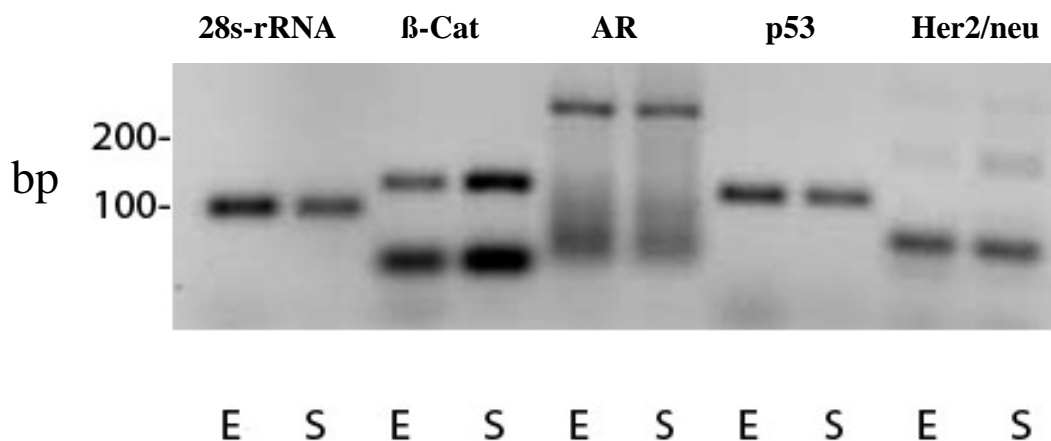


Abbildung 42: PCR der 28s-rRNA, β-Catenin(β-Cat), Androgenrezeptor(AR), p53 und Her2/neu an Endothelzellen (E) und Stromazellen (S).

### Tumor Nr. 30:

Beim Tumor Nr. 30 findet sich sowohl in Stroma- als auch Endothelzellen eine verstärkte β-Catenin-Expression. Auch die Androgenrezeptor, p53- und Her2/neu-Expression sind sowohl in Endothel- als auch in Stromazellen stärker als im Vergleich zur 28s-rRNA. Wesentliche Expressionsunterschiede sind im Vergleich von Endothel- und Stromazellen nicht festzustellen.

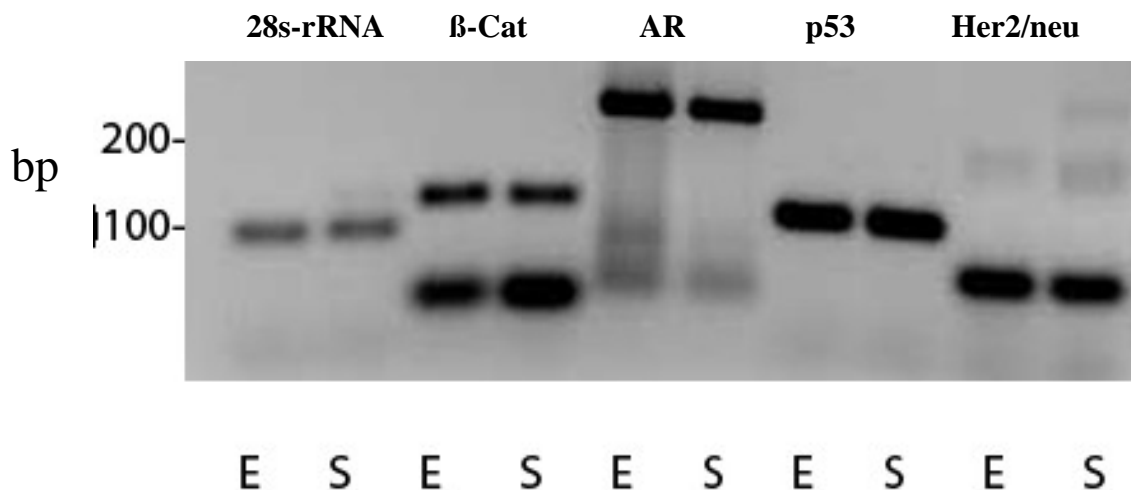


Abbildung 43: Tumor Nr. 30: PCR der 28s-rRNA, β-Catenin (β-Cat), Androgenrezeptor (AR), p53 und Her2/neu an Stroma (S)- und Endothelzellen (E).

### Tumor Nr. 31:

Auch hier fand sich jeweils eine weitere Bande bei β-Catenin unterhalb der 132 bp-Bande. Die Intensität der β-Catenin war stärker im Vergleich zur 28s-rRNA. Auch der Androgenre-

zeptor war sowohl bei Endothelzellen als auch bei Stromazellen stärker exprimiert. Bei p53 fand man ebenfalls eine stärkere Expression beider Zelltypen im Vergleich zur 28s-rRNA. Her2/neu war in Endothelzellen gleich stark exprimiert, aber in Stromazellen fand man nur eine schwache Bande, was für eine schwächere RNA- Expression spricht. Die Ergebnisse, die sich uns bei diesem Tumor boten, sind in folgender Abbildung zu sehen (Abb. 44).

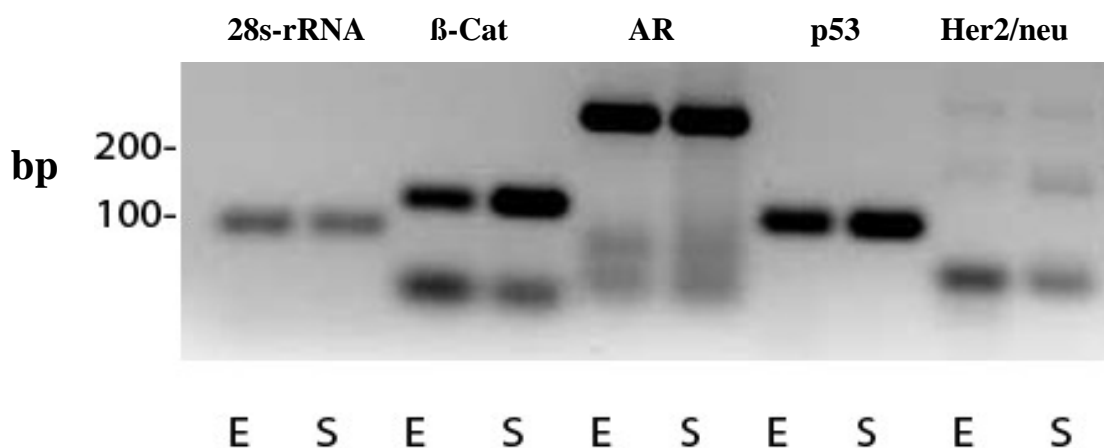


Abbildung 44: Tumor Nr. 31: PCR der 28s-rRNA, β-Catenin (β-Cat), Androgenrezeptor (AR), p53 und Her2/neu an Stroma (S)- und Endothelzellen (E).

#### Tumor Nr. 46:

Bei diesem Tumor konnte kein Unterschied zwischen der Expression der Banden von Endothelzellen und Stromazellen festgestellt werden. β-Catenin war überexprimiert vorzufinden, genauso wie der Androgenrezeptor. Auch die p53-Bande war bei beiden Zelltypen stärker ausgeprägt als die 28s-rRNA-Bande. Her2/neu zeigte in Endothelzellen eine stärkere Expression als in Stromazellen, die aber auch deutlich stärker ist als 28s-rRNA. Abbildung 45 zeigt die einzelnen Banden.

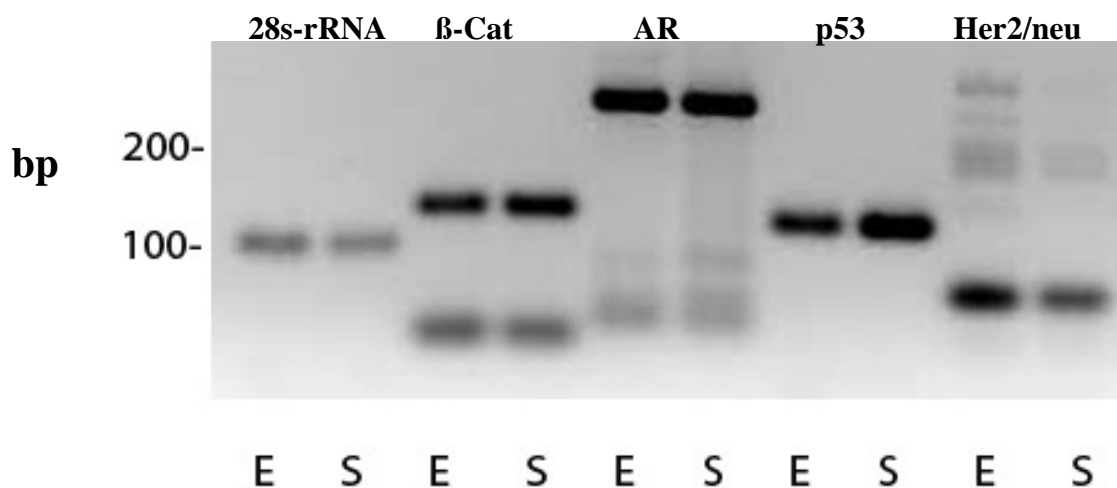


Abbildung 45: Tumor Nr. 46: PCR der 28s-rRNA, β-Catenin (β-Cat), Androgenrezeptor (AR), p53 und Her2/neu an Stroma (S)- und Endothelzellen (E).

**Tumor Nr. 74:**

Bei diesem Angiofibrom war das  $\beta$ -Catenin bei beiden Zelltypen in der gleichen Intensität wie die 28s-rRNA ausgebildet. Der Androgenrezeptor zeigte auch hier keinen Unterschied zwischen Stromazellen und Endothelzellen, war im Vergleich zur 28s-rRNA jedoch verstärkt exprimiert. Bei p53 zeigte sich ein Unterschied zwischen Endothel- und Stromazellen: es war eine stärkere Expression in Stromazellen vorhanden, während die Endothelzellen keinen Unterschied im Vergleich zur 28s-rRNA aufzeigen konnten. Her2/neu war bei beiden Zelltypen unterexprimiert (Abb. 46).

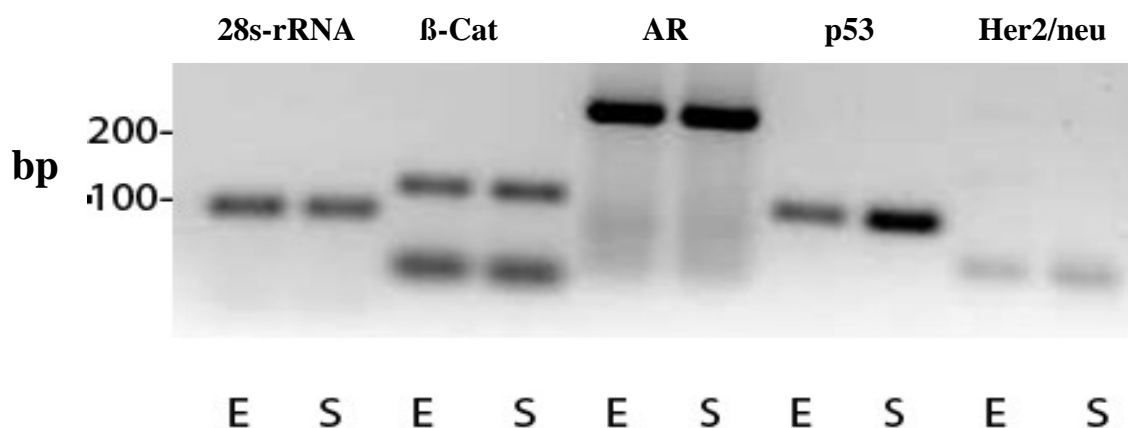


Abbildung 46: Tumor Nr. 74: PCR der 28s-rRNA,  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor (AR), p53 und Her2/neu an Stroma (S)- und Endothelzellen (E).

**Tumor Nr. 89:**

Bei diesem Angiofibrom wurde sowohl bei Endothel- als auch bei Stromazellen eine gering schwächere Expression von  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur 28s-rRNA gefunden. Der Androgenrezeptor war bei beiden Zelltypen verstärkt exprimiert. p53 zeigte keine Veränderung hinsichtlich der Expression gegenüber der 28s-rRNA. Her2/neu hingegen hatte eine geringere Intensität der Banden als die 28s-rRNA. Die Ergebnisse der PCR des Tumors Nr. 89 sind in folgender Abbildung zu sehen (Abb. 47).

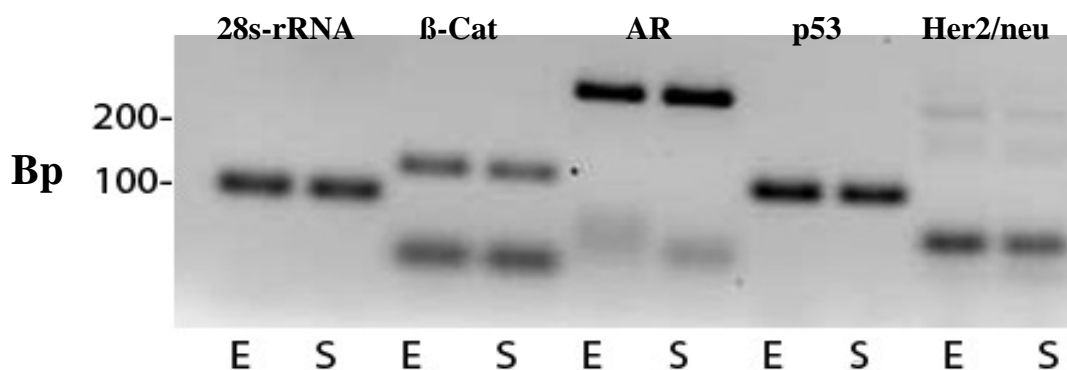


Abbildung 47: Tumor Nr. 89: PCR der 28s-rRNA,  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor (AR), p53 und Her2/neu an Stroma (S)- und Endothelzellen (E).

**Tumor Nr. 102:**

Bei beiden Zelltypen konnte jeweils eine zweite Bande bei  $\beta$ -Catenin beobachtet werden, die schwächer exprimiert waren, als bei der 28s-rRNA. Die Androgenrezeptorbande war sowohl bei den Stromazellen als auch bei den Endothelzellen mit einer verstärkten Intensität im Vergleich zur 28s-rRNA zu erkennen. Auch p53 war bei beiden Zelltypen gleich stark überexprimiert. Her2/neu zeigte eine geringe Abschwächung ihrer Banden im Vergleich zur 28s-rRNA-Bande. Die Ergebnisse der PCR sind in folgender Abbildung dargestellt (Abb. 48):

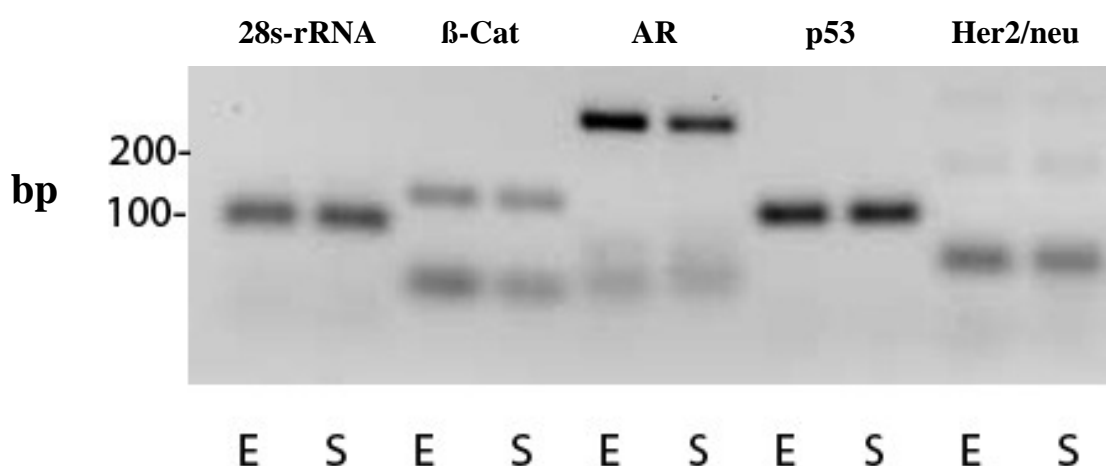


Abbildung 48: Tumor Nr. 102 PCR der 28s-rRNA,  $\beta$ -Catenin ( $\beta$ -Cat), Androgenrezeptor (AR), p53 und Her2/neu an Stroma (S)- und Endothelzellen (E).

### 5.2.3 Ergebnisse von Stromazellen

Nach der Lasermikrodissektion wurde von allen Tumoren eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Dabei wurden im Vergleich zur 28s-rRNA,  $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor, p53 und Her2/neu semiquantitativ auf ihre Expression hin untersucht. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der PCR an Stromazellen aller untersuchten Tumore im Überblick dargestellt. Tab. 29 zeigt die Expressionsunterschiede der untersuchten Proteine im Vergleich zur 28s-rRNA:

	$\beta$ -Catenin	AR	p53	Her2/neu
Nr. 29	↔	↑	↔	↔

Nr. 30	↑	↑	↑	↑
Nr. 31	↑	↑	↑	↑
Nr. 46	↑	↑	↑	↑
Nr. 74	↔	↑	↔	↓
Nr. 89	↓	↔	↔	↓
Nr. 102	↓	↑	↑	↓

**Tabelle 29: Ergebnisse der PCR der Stromazellen von  $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor (AR), p53 und Her2/neu im Vergleich zur 28s-rRNA. Die Expressionsunterschiede im Vergleich zur Intensität der 28s-rRNA sind durch Pfeile dargestellt. ↔ : vergleichbare Expression zur 28s-rRNA; ↑ : erhöhte Expression im Vergleich zur 28s-rRNA; ↓ : erniedrigte Expression im Vergleich zur 28s-rRNA.**

## 5.2.4 Ergebnisse von Endothelzellen

Auch die Endothelzellen wurden im Anschluss an die Lasermikrodissektion einer Polymerase-Ketten-Reaktion unterzogen. Eine Erhöhung oder Erniedrigung der Expression wird in Tab. 30 im Vergleich zur 28s-rRNA beschrieben.

	$\beta$ -Catenin	AR	p53	Her2/neu
Nr. 29	↔	↓	↔	↓
Nr. 30	↑	↑	↑	↑
Nr. 31	↑	↑	↑	↓
Nr. 46	↑	↑	↑	↑
Nr. 74	↔	↑	↑	↓
Nr. 89	↓	↔	↔	↓

Nr. 102	↓	↑	↑	↓
---------	---	---	---	---

**Tabelle 30:** Ergebnisse der PCR an Endothelzellen von  $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor (AR), p53 und Her2/neu im Vergleich zur 28s-rRNA. Die Expressionsunterschiede im Vergleich zur Intensität der 28s-rRNA sind durch Pfeile dargestellt.  $\leftrightarrow$  : gleiche Expression im Vergleich zur 28s-rRNA;  $\uparrow$  : gesteigerte Expression im Vergleich zur 28s-rRNA;  $\downarrow$ : erniedrigte Expression im Vergleich zur 28s-rRNA.

## 6. Diskussion

### Zelluläre Tumorheterogenität

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnten die Zellen direkt, das heißt ohne eine vorausgegangene Zellkultivierung, untersucht werden. Hierdurch konnten Fehler durch eine mögliche klonale Selektion vermieden werden. Es ist jedoch zu beachten, dass das juvenile Angiofibrom in seiner zellulären Zusammensetzung ein sehr heterogener Tumor ist. Neben den Endothelzellen und mesenchymalen Stromazellen sind perivaskuläre Zellen und verschiedene Entzündungszellen (Mastzellen, Makrophagen, T-Lymphozyten) zu beachten. Die Entzündungszellen repräsentieren im Durchschnitt 30% der Zellen im juvenilen Angiofibrom und können in einzelnen Bereichen des Tumors bis zu 90% der Zellen darstellen (Wendler und Mitarbeiter, 2007). Ferner ist die Gewebsarchitektur innerhalb eines Tumors sehr unterschiedlich. Regionen mit einer hohen vaskulären Dichte und Bereiche mit nur geringen Gefäßstrukturen sind ebenso wie Übergangsformen in dem Tumor ausgebildet. Darüberhinaus können zystische Bereiche im juvenilen Angiofibrom vorliegen (Starlinger und Mitarbeiter, 2007). Diese Tumorcharakteristika führen dazu, dass je nach verwendetem Gewebsareal des Tumors unterschiedliche Verhältnisse einzelner Zellkerne von Endothelzellen, perivaskulären Zellen, mesenchymalen Stromazellen und Entzündungszellen vorliegen. Diese zelluläre Tumorheterogenität ist eine Ursache für die beobachteten unterschiedlichen Häufigkeiten von in der FISH-Untersuchung detektierten Verlusten an verschiedenen Schnitten oder Zellkernisolaten eines Tumors.

Wenn nur in einem Zelltyp der chromosomale Verlust vorliegt, so wird bereits das Verhältnis der Zellen darüber entscheiden, ob ein signifikanter Genverlust für das jeweilige Gen mit der FISH-Untersuchungstechnik detektiert werden kann. Das aus den Voruntersuchungen von Lymphozyten abgeleitete Signifikanzniveau in einer Höhe von 10% bedarf daher einer besonderen Würdigung und darf nur als Orientierung verstanden werden. Die Befunde eines Genverlustes für p53 und Her2/neu in der vorliegenden Arbeit bei Anwendung von FISH-Untersuchungen zwischen 10 und 49% sind in Würdigung der zellulären Heterogenität des Tumors als deutliche Bestätigung der in den CGH-Untersuchungen detektierten Verluste des Chromosom 17 zu werten. Auch die Tatsache einer Bestätigung erhobener signifikanter Verluste in einem Tumor bei Wiederholung der Untersuchung an einem weiteren Gewebsschnitt oder Zellkernisolaten erhöht die Validität der detektierten Verluste.



Von erheblicher weiterer Konsequenz ist die sehr ausgeprägte kollagene Extrazellulärmatrix (Dürr und Mitarbeiter, 2008), die zur Freilegung der Zellkerne am Gewebsschnitt einen sehr individuellen Verdau erfordert. Es ist hierbei sehr schwierig abzuschätzen, welche Kerne der unterschiedlichen Zelltypen bei unterschiedlich stark ausgeprägter kollagener Extrazellulärmatrix im Bereich der Gefäße und des Stromas (persönliche Mitteilung, Schick) am Ende des Verdau den FISH-Sonden zugänglich sind. Auch diese Besonderheit des Tumors kann die Analyse von Kernen einzelner Zelltypen bevorzugen, so dass eine nicht vorhersagbare Gewichtung der Untersuchung erfolgt. Während für den Gewebsschnitt der Vorzug besteht, dass die Gewebsarchitektur erhalten bleibt und eine Zuordnungen zu Gefäßen und dem Stroma vorgenommen werden können, stellen Zellkernisolat eine Mischung von Kernen der verschiedenen Zelltypen dar. Die bereits erwähnte unterschiedlich stark ausgeprägte Extrazellulärmatrix des Tumors und das regional unterschiedliche zelluläre Verteilungsmuster können dazu führen, dass aus einzelnen Gewebsabschnitten bevorzugt Zellkerne einzelner Zelltypen wie beispielsweise den Endothelzellen gewonnen werden. Hieraus ergibt sich der Schluss, dass Kerne von Endothelzellen, perivaskulären Zellen, mesenchymalen Stromazellen und Entzündungszellen in einem unterschiedlichen Verhältnis in den Zellkernisolaten vorliegen. Vorliegende genetische Veränderungen in einzelnen Zelltypen werden unter diesen Umständen möglicherweise trotz des Vorliegens im Tumor nicht erkannt. Die genannten Besonderheiten der Untersuchungstechnik waren der Grund, die Untersuchungsergebnisse der FISH-Analysen für jeden Tumor getrennt darzustellen.

### **FISH-Untersuchungstechnik**

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wird mit einer lokusspezifischen Sonde die absolute DNA-Kopienzahl an dem untersuchten Genort nachgewiesen (Eastmond und Pinkel, 1990). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung besitzt im Gegensatz zur klassischen Zytogenetik viele Vorteile. Dazu gehört unter anderem, dass der Untersuchung keine Kultivierung vorausgehen muss, da sie an nicht-proliferierendem Gewebe durchgeführt wird. Weiterhin lassen sich in den Tests an einem Objektträger viele Zellen evaluieren. Des Weiteren kann an Tumorgewebeschnitten die Assoziation von genetischen Veränderungen und Morphologie hergestellt werden. Wie die vorgelegte Promotionsschrift zeigt, kann jedoch aufgrund der Einschränkung einer ausreichenden Exposition aller Zellkerne für die FISH-Sonden in einzelnen Tumoren – wie beispielsweise durch eine sehr ausgeprägte und unterschiedliche Extrazel-

lulärmatrix im juvenilen Angiofibrom die FISH-Untersuchung nicht bei allen Neubildungen am Gewebsschnitt erfolgen.

Die Technik der FISH birgt jedoch auch Nachteile. So kann es durch Kernanschnitte zu vorgetäuschten Verlusten von Signalen und damit zu Fehlinterpretationen kommen. Eine mögliche Ursache für vorgetäuschte Verluste im Rahmen der FISH-Untersuchungen sind Zellkernverletzungen im Rahmen der Fixierung und/oder des Proteinase K-Verdaus mit dem nachfolgenden Verlust von genetischem Material zu beachten. Der Untersuchungsbefund von mehr als zwei Gensignalen in der vorliegenden Promotionsschrift kann in einem Bereich von wenigen Prozent durch positive Hybridisierungsartefakte bedingt sein. Bei unzureichender Stringenz in den Waschschrinen können Hybridisierungen auch an Stellen auftreten, die nicht völlig homolog sind (Hopman und Mitarbeiter 1992). Der Anteil an Gewinnen von Signalen bei der p53-Sonde mit 6 % war größer als bei der Her2/neu-Sonde (2 %). Eine geringere Spezifität der p53-Sonde könnte hierfür der Grund sein.

Um diese Fehler auszuschließen beziehungsweise möglichst gering zu halten, ist es notwendig, eine Hybridisierung an Normalgewebe durchzuführen, bevor die Sonde mit dem Tumorgewebe hybridisiert wird. Die Hybridisierung des Tumorgewebes kann dann mit der des Normalgewebes verglichen werden. Als Normalgewebe wurde in dieser Arbeit ein Chromosomenpräparat aus Lymphozyten verwendet. Betrachtet man in Tabelle 8 die Ergebnisse der p53-Sondenaustestung und in Tabelle 20 die der Her2/neu-Sondenaustestung an Lymphozyten, so kann man feststellen, dass bei beiden Sonden eine Streuung um den Erwartungswert von zwei Signalen pro Kern vorliegt. Deutlich weniger als 10% der Zellkerne zeigten null, ein, drei oder vier Signale.

### **RT-PCR-Untersuchungen**

In dem zweiten Abschnitt der Promotionsschrift wurde bei den detektierten Verlusten des p53- und Her2/neu-Gens in den FISH-Untersuchungen eine Expressionsanalyse von p53 und Her2/neu auf Transkriptionsebene vorgenommen. Hierbei wurde in Anbetracht der bestehenden Tumorheterogenität eine Expressionsanalyse getrennt für Gefäß- und Stromazellen ausgeführt, um ergänzend mögliche Einblicke zu erhalten, welche Zellen von den chromosomalen Veränderungen betroffen sind. Dieser bereits im Jahre 2004 in der Promotionsschrift ausgeführte Untersuchungsansatz wird heute als bedeutend für die weitere Analyse der Tumorbiologie des juvenilen Angiofibroms gewertet, indem zellspezifische Analysen gefordert werden (Coutinho-Camillo und Mitarbeiter, 2008). Die Methode der Laserdissektion stellt hierfür

eine sehr interessante Untersuchungsoption dar. Die hierbei gewonnenen Gewebemengen reichen für eine genomische PCR-Analyse zur Validierung der Genverluste nicht aus, so dass für die Promotionsschrift die Analyse auf Transkriptionsebene gewählt wurde. Eine Einschränkung der Lasermikrodissektion liegt aber wiederum in der zellulären Tumorerogenität des juvenilen Angiofibroms begründet. Im Bereich der Gefäße sind Endothel- und perivaskuläre Zellen zu unterscheiden. Mesenchymale Zellen sind ebenso wie diverse Entzündungszellen im Tumorstroma zu beachten. Der Untersuchungsansatz der Promotionsschrift hat zunächst die getrennte Untersuchung von Gefäß- und Stromazellen gewählt. Die hierdurch reduzierte, aber weiter bestehende zelluläre Heterogenität kann eine Ursache für in der Mehrzahl der Untersuchungen nicht detektierte Expressionsunterschiede auf Transkriptionsebene sein. In zukünftigen Untersuchungen ist eine Markierung einzelner Zelltypen notwendig, um zellspezifische Aussagen treffen zu können. Ein aktueller neuer Ansatz wird durch die Etablierung von primären Zellkulturen des juvenilen Angiofibroms verfolgt (persönliche Mitteilung, Schick). Wenngleich bereits jetzt primäre mesenchymale Zellkulturen des Tumors analysiert werden, ist jedoch im Hinblick auf genetische Untersuchungen die Möglichkeit von Veränderungen unter den Zellkulturbedingungen in diesen Zelllinien zu beachten.

### **p53 und Her2/neu**

Die im Rahmen von FISH-Untersuchungen detektierten Verluste des p53- und Her2/neu-Gens in juvenilen Angiofibromen bestätigen den in vorangegangene CGH-Untersuchungen erhobenen Befund von häufigen Chromosom 17-Verlusten (Schick und Mitarbeiter, 2007). Derartige Verluste können grundsätzlich Teil der Tumorbilogie sein oder aber ein Epiphänomen multipler chromosomaler Aberrationen des Tumors ohne unmittelbaren Bezug zur Tumorigenese sein. Bei verschiedenen Tumoren der Atemwege wurden bereits die Befunde vielfältiger chromosomaler Aberrationen erhoben, so dass die These eines stetigen mutagenen Einflusses durch Umweltfaktoren formuliert wurde (Gebhart, 2004). Durch seine Lage im Bereich der Nasenhöhle ist der Tumor den Luftbelastungen unmittelbar ausgesetzt.

Ein Verlust von genetischer Information, nämlich der Gene Her2/neu und p53 ist nicht immer an einen Verlust des gesamten Chromosoms 17 geknüpft, wie bei den Tumoren Nr. 31 und 74 gezeigt werden konnte. Hier sind einzelne Gene verloren gegangen, ohne dass das gesamte Chromosom 17 abhanden gekommen ist. Eine Möglichkeit, einzelne Gene eines Chromosoms zu verlieren, ist das crossing-over. Dabei werden Genorte eines Chromosoms auf ein anderes Chromosom verlagert, indem sich die Arme des Chromosoms in der Metaphase überkreuzen

und Gene auf ein anderes Chromosom verlagern oder verloren gehen. Chromosomen gehen dabei nicht verloren.

Sollten die beobachteten p53- und Her2/neu-Genverluste auf Transkriptions- und Translations-ebene von Bedeutung sein, so ist neben der Wertung beider Kandidaten im Einzelnen auch das Wissen einer möglichen Interaktion beider Kandidaten bereits von Interesse. Beim Mammakarzinom wurden neben Her2/neu-Überexpressionen, die sich in der PCR gezeigt hatten, auch p53-Mutationen beobachtet, die gemeinsam ein besonders aggressives Tumorwachstum bedingen sollen (Choi und Mitarbeiter, 2003). Das Zusammenspiel der Her-Genfamilien und der p53-Kaskade wurde von Nanni und Mitarbeitern (2003) als mögliche Ursache beim Rhabdomyosarkom postuliert. Sie konnten die Entstehung von Rhabdomyosarkomen durch die Inaktivierung von p53 und Aktivierung von Her2/neu in genetisch veränderten Mäusen auslösen. Der Hinweis auf Verluste von Her2/neu spricht auf dem Boden dieser ersten Befunde gegen eine derartige Interaktion von p53 und Her2/neu im juvenilen Angiofibrom.

Her2/neu, auch bekannt als c-erb-B2, gehört zur erb-Onkogenfamilie (Zeilinger und Mitarbeiter, 1989). Her2/neu-Amplifikationen wurden in verschiedenen Tumoren beschrieben (Yeh und Mitarbeiter, 1999). Bei Mammakarzinomen mit Her2/neu-Amplifikationen lassen auf Antikörper basierende Therapien bereits Erfolge verzeichnen. Die Expression des Androgenrezeptors wurde nicht nur in juvenilen Angiofibromen (Hwang und Mitarbeiter, 1998), sondern auch im duktalem Carcinoma in situ und invasivem Mammakarzinom gefunden. G3-Läsionen zeigten sowohl eine Androgenrezeptor als auch eine Her2/neu-Expression, während G1-Läsionen immunhistologisch zwar androgenrezeptor-positiv, aber Her2/neu negativ waren (Moinfar und Mitarbeiter, 2003). In Abwesenheit von Androgen kann der Androgenrezeptor durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel Vertreter der Gruppe der Epidermal growth-Faktoren, zu den auch das Her2/neu-Onkogen gehört, aktiviert werden (Craft und Mitarbeiter, 1999). Für diese Aktivierung ist die MAPK-(Mitogen-aktivierte-Proteinkinase)-Transduktionskaskade verantwortlich (Yeh und Mitarbeiter, 1999). Von einer weiteren hormonunabhängigen Androgenrezeptorstimulation über die Akt-Transduktionskaskade wurde berichtet (Wen und Mitarbeiter, 2000).

Unsere Befunde von Her2/neu-Verlusten in juvenilen Angiofibromen und einer im Vergleich zu 28s-rRNA niedrigeren Expression von Her2/neu in Gefäßstrukturen in 5 von 7 Tumoren und im Stroma bei 4 von 8 juvenilen Angiofibromen geben einen ersten Hinweis, dass eine Her2/neu vermittelte Androgenrezeptorstimulation in der Tumorbilogie des juvenilen Angio-

fibroms nicht von Bedeutung sein könnte. Sollte in zukünftigen Untersuchungen gezeigt werden können, dass die bisher nicht bekannte Tumorzelle keine Fähigkeit einer hormonunabhängigen Androgenrezeptorwirkung durch Her2/neu besitzt, so ergeben sich hieraus mögliche therapeutische Konsequenzen. Bei einer antiandrogenen Therapie des juvenilen Angiofibroms ist unter dieser Annahme nicht eine unmittelbare hormonunabhängige Androgenrezeptorstimulation durch Her2/neu zu erwarten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Her2/neu-Expression durch eine Zellselektion ansteigen kann, sobald mit einer antiandrogenen Therapie begonnen wird und sich erst dann eine hormonunabhängige Stimulation des Androgenrezeptors durch Selektion von Zellen mit Her2/neu Amplifikationen ausbildet.

In juvenilen Angiofibromen wurde eine häufige Mutation von  $\beta$ -Catenin gefunden, die mit einer Anreicherung des Proteins im Zellkern verbunden ist (Abraham und Mitarbeiter, 2001).  $\beta$ -Catenin ist Teil der Wnt-Signal-Transduktionskaskade und zeigt darüber hinaus zahlreiche weitere Interaktionen wie beispielsweise mit dem Androgenrezeptor (Schick und Mitarbeiter, 2003) und p53 (Prange und Mitarbeiter, 2003). Die Bedeutung einer möglichen Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit dem Androgenrezeptor wurde als Erklärung für das nahezu ausschließliche Auftreten des juvenilen Angiofibroms bei männlichen Jugendlichen postuliert (Schick und Mitarbeiter, 2003).  $\beta$ -Catenin besitzt aber ebenso interessante Interaktionsmöglichkeiten mit p53.

Ein Überschuss von  $\beta$ -Catenin in der Zelle führt zu einer vermehrten Transkription von aktivem p53 im Zellkern (Smith und Mitarbeiter, 2005). Eine Akkumulation von beiden Proteinen, also von  $\beta$ -Catenin und p53, wurde beim hepatozellulären Karzinom beschrieben (Prange und Mitarbeiter, 2003). Weiterhin ist bekannt, dass p53 und  $\beta$ -Catenin gemeinsame Coaktivatoren wie CBP/p300 besitzen (Damalas und Mitarbeiter, 1999). Ein wichtiger Aspekt für die Interaktion von p53 und  $\beta$ -Catenin ist die Betrachtung, ob p53 und  $\beta$ -Catenin in ihrer Wildtypform oder in ihrer mutierten Form vorliegen. Wenn nicht-mutierte  $\beta$ -Catenin im Zellkern angereichert vorliegt, bewirkt es eine gesteigerte Transkription von Zielgenen, unter anderem wird vermehrt p53 von der DNA abgelesen. p53 als Tumorsuppressor-Gen wirkt in seiner Wildtypform wiederum hemmend auf eine Aktivierung von  $\beta$ -Catenin, so dass es eine Hemmung der weiteren p53-Transkription zu beobachten ist. Ist p53 jedoch mutiert, so fällt seine hemmende Wirkung auf  $\beta$ -Catenin weg.  $\beta$ -Catenin benötigt andererseits zum Ablesen der DNA ebenso wie p53 den Koaktivator, CBP/p300. Liegt nun  $\beta$ -Catenin in seiner mutierten Form im Zellkern vor, so bindet es an CBP/p300 und hemmt hierdurch kompetitiv p53 (Miyagishi und Mitarbeiter, 2000). p53 kann nicht mehr an CBP/p300 binden und seine

hemmende Wirkung auf  $\beta$ -Catenin fällt weg (Damalas und Mitarbeiter, 1999; Miyagishi und Mitarbeiter, 2000).

Es wurden häufige  $\beta$ -Catenin-Mutationen in juvenilen Angiofibromen gefunden, was in Anbetracht der gegebenen Erläuterung eine mögliche Unterdrückung der p53-Funktion bedeuten kann. Darüberhinaus zeigen unsere Befunde auf Genebene einen p53-Verlust, der in einem einzelnen Zelltyp des juvenilen Angiofibroms mit einer geminderten Expression von p53 assoziiert sein kann. Wenngleich ohne Zweifel weitere zellspezifische Untersuchungen in der Zukunft notwendig sind, wird in einer ersten Arbeitshypothese auf dem Boden der vorgestellten Untersuchungsbefunde und der erwarteten Interaktionen von p53 mit mutiertem  $\beta$ -Catenin ein Funktionsverlust von p53 im juvenilen Angiofibrom angenommen

Schon früher gab es Untersuchungen zur Expression der p53-mRNA in juvenilen Angiofibromen im Vergleich zur Expression von p53-mRNA in gesunder Nasenschleimhaut. Es wurde eine Erhöhung der p53-mRNA-Expression der Nasenschleimhaut in 50 % beobachtet, wohingegen die Überexpression von p53-mRNA in den juvenilen Angiofibromen lediglich bei 32 % zu beobachten war. Diese Befunde konnten jedoch nicht als statistisch signifikant gewertet werden (Nagai und Mitarbeiter, 1996). Immunhistochemische Untersuchungen fanden keine Überexpression von p53-Protein in Nasenschleimhaut (Fang und Mitarbeiter, 1998). Western Blot-Studien und immunhistologische Untersuchungen im eigenen Forschungslabor konnten keine wesentliche p53-Protein-Expressionen in juvenilen Angiofibromen nachweisen (unveröffentlichte Befunde), welches als ein Hinweis auf nicht vorliegende Mutationen (längere Halbwertszeit von p53 bei Mutationen) im juvenilen Angiofibrom zu werten ist. Weiterhin zeigte eine Studie, dass eine Überexpression von nicht-mutiertem p53 beim Rhabdomyosarkom IGF II hemmt. Die Beobachtung einer IGF II-Überexpression bei 8 von 22 juvenilen Angiofibromen (Coutinho-Camillo und Mitarbeiter, 2003) steht deshalb nicht im Widerspruch mit der These keiner wesentlichen Expression von nicht-mutiertem p53 in dem fibrovaskulären Tumor.

Eine andere interessante Beobachtung wurde bei der Interaktion von c-myc und p53 in vaskulären Strukturen gemacht. c-myc ist ein wichtiger Baustein der Wnt-Signaltransduktionskaskade und besitzt eine gefäßneubildende Kapazität, wobei eine lückenhafte, unausgereifte und instabile Angiogenese beobachtet wurde (Evan und Vousden, 2001). Die Überexpression von c-myc wurde als Grund für die reduzierte Expression von Thrombospondin-1, einem wichtigen Modulator der Tumorangiogenese (Janz und Mitarbeiter,

2000), beschrieben. Eine erhöhte Expression von Thrombospondin-1 wurde hingegen unter dem Einfluss von p53 beobachtet (Dameron und Mitarbeiter, 1994). In fortgeschrittenem Tumorstadium des juvenilen Angiofibroms wurde eine erhöhte c-myc-Expression detektiert (Schick und Mitarbeiter, 2006). In dieser Situation ist aufgrund der angenommenen Verluste des p53-Gens ohne Hinweise auf eine erhöhte p53-Expression die These einer reduzierten Thrombospondin-1-Expression formulierbar. Das histologische Bild des juvenilen Angiofibroms ist durch unregelmäßige Gefäßspalten und Fehlen von Endothelschichten gekennzeichnet, was u.a. Folge einer gestörten Expression von Thrombospondin-1 sein könnte.

Mit den Ergebnissen der Polymerase-Ketten-Reaktion nach der Lasermikrodissektion versprochen wir uns Aufklärung über die Ursprungszelle des juvenilen Angiofibroms. Da wir sowohl die Gefäßzellen als auch die Stromazellen getrennt voneinander untersuchen konnten, war die Möglichkeit gegeben, die Expression der uns interessant erscheinenden Gene auf RNA-Ebene miteinander zu vergleichen. Als Referenz setzten wir die 28s-rRNA ein und untersuchten die Expression von  $\beta$ -Catenin, Androgenrezeptor, p53 und Her2/neu. Wie die Ergebnisse aus Kapitel 5.2.4. zeigen, fanden wir jedoch keine signifikanten Unterschiede der Expression der untersuchten Gene in den Gefäß- und Stromaproben. Die Tumorzelle des juvenilen Angiofibroms ist bis heute nicht bekannt. Auch Hwang und Mitarbeiter konnte die Ätiologie des juvenilen Angiofibroms durch immunhistologische Untersuchungen nicht klären. Sie fanden den Androgenrezeptor sowohl in Endothel- als auch in Stromazellen (1998). Ebenso wurde von aktiviertem TGF- $\beta$ 1 berichtet, der in beiden Zelltypen zu finden war (Dillard und Mitarbeiter, 2000). Die von Abraham und Mitarbeitern nahegelegte Ätiologie aus Stromazellen durch den Nachweis von  $\beta$ -Catenin in Stromazellen, konnte von Rippel und Mitarbeiter (2003) sowie Zang und Mitarbeiter (2003) nicht bestätigt werden. Sie konnten  $\beta$ -Catenin in Bindegewebs- und Endothelzellen nachweisen und somit keinen Hinweis auf die Tumorzelle liefern. Auch die vorgestellten Untersuchungsergebnisse liefern keine neuen Hinweise auf die Tumorzelle.

Weitere Untersuchungen zur Tumorbilogie des juvenilen Angiofibroms sind notwendig. Das verbesserte Verständnis der Tumorgenese soll dazu beitragen, die Therapieoptionen des Tumors zu verbessern. Selektive medikamentöse Vorbehandlungen sollen in der Zukunft dazu beitragen, dass durch eine Tumorverkleinerung schonendere chirurgische Behandlungstechniken bei den jungen Patienten zur Anwendung kommen können.

Die vorliegende Arbeit bestätigte die in einer vorausgehenden CGH-Arbeit gefundenen Chromosom 17-Verluste und konnte Verluste von Genen auf diesem Chromosom nachweisen: p53 und Her2/neu. Beide Gene sind signifikant in juvenilen Angiofibromen verloren. Dieser Untersuchungsbefund ist insbesondere in Anbetracht der Tumorerogenität in besonderer Weise zu würdigen. Der Verlust von Her2/neu bedeutet, dass eine androgenunabhängige Stimulation des Androgenrezeptors durch Her2/neu in juvenilen Angiofibromen primär nicht zu erwarten ist. Die Beobachtung der signifikanten p53-Verluste im Zusammenhang mit einer früher beschriebenen Downregulation von p53 durch mutiertes  $\beta$ -Catenin lässt vermuten, dass im juvenilen Angiofibrom die Schutzfunktion von p53 nicht in vollem Umfang ausgeübt wird.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Abraham SC, Montgomery EA, Giardiello FM, Wu TT (2001) Frequent  $\beta$ -Catenin mutations in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Am J Pathol* 158: 1073-1078
2. Andrews JC, Fisch U, Valavanis A, Aeppli U, Makek MS (1989) The surgical management of extensive nasopharyngeal angiofibromas with the infratemporal fossa approach. *Laryngoscope* 99: 429-37
3. Antonelli AR, Capiello J, Donajo CA, Di Lorenzo D, Nicolai P, Orlandini A (1987) Diagnosis, staging and treatment of juvenile nasopharyngeal angiofibroma (JNA). *Laryngoscope* 97:1319-1325
4. Bayani J, Squire JA (2004) Preparation of cytogenetic specimens from tissue samples. *Curr Prototec Cell Biol* 22: Unit 22.2
5. Beham A, Beham-Schmid C, Regauer S, Auböck L, Stammberger H (2000) Nasopharyngeal angiofibroma: true neoplasm or vascular malformation. *Adv Anat Path* 7: 36-46
6. Bozzetti C, Personeni N, Nizzoli R, Guazzi A, Flora M, Bassano C, Negri F, Martella E, Naldi N, Franciosi V, Cascinu S (2003): Her2/neu amplification by fluorescence in situ hybridisation in cytologic samples from distant metastatic sites of breast carcinoma. *Cancer* 99: 310-315
7. Brentani MM, Butugan O, Oshima CTF, Torloni H, Paiva LJ (1989) Multiple steroid receptors in nasopharyngeal angiofibromas. *Laryngoscope* 99: 398-401
8. Brieger J, Wierzbicka M, Sokolov M, Roth Y, Szyfter W, Mann WJ (2004) vessel density, proliferation and immunolocalization of vascular endothelial growth factor in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130: 727-731
9. Brooker DS, Kenny B, Gibson RG, Primrose WJ (1989) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma in a static population: the implications of misdiagnosis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 14: 497-502
10. Brunner C, Urbschat S, Jung V, Paetorius M, Plinkert PK, Schick B (2003) Chromosomale Veränderungen beim juvenilen Angiofibrom. *HNO* 51: 981-985
11. Brunner H (1942) Nasopharyngeal angiofibroma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 51:29-65
12. Choi DH, Shin DB, Lee MH, Lee DW, Dhandapani D, Carter D, King BL, Haffty BG (2003) A comparison of five immunohistochemical biomarkers and Her2/neu gene

- amplification by fluorescence in situ hybridization in white and Korean patients with early-onset breast carcinoma. *Cancer* 98: 1587-1595
13. Coutinho-Camillo CM, Brentani MM, Butugan O, Torloni H, Nagai MA (2003) Relaxation of imprinting of IGF-II gene in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Diagn Mol Pathol* 12 : 57-62
  14. Coutinho-Camillo CM, Brentani MM, Nagai MA, (2008) Genetic alterations in juvenile nasopharyngeal angrofibromas. *Head Neck* 3: 390-400
  15. Coutinho-Camillo CM, Bassini AS, Gutierrez LG, Butugan O, Kowalski LP, Brentani MM, Nagai MA (1999) Genetic alterations in Ki-ras and Ha-ras genes in juvenile nasopharyngeal angiofibromas and head and neck cancer. *Sao Paulo Med J* 117: 113-120
  16. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL (1999) A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by Her2/neu tyrosine kinase. *Nat Med* 5: 280-285
  17. Damalas A, Ben-Ze'ev A, Simcha I, Shtutman M, Leal JF, Zhurinsky J, Geiger B, Oren M (1999) Excess  $\beta$ -Catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *EMBO J* 18: 3054-3063
  18. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265: 1582-1584
  19. Dane WH (1954) Juvenile nasopharyngeal fibroma in state of regression. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 63: 997-1014
  20. Dillard DG, Cohen C, Muller S, Del Claudio J, Reichman O, Parrish B, Rackley D, Gal AA (2000) Immunolocalization of activated transforming growth factor beta 1 in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126: 723-725
  21. Dohar JE, Duvall AJ 3<sup>rd</sup> (1992) Spontaneous regression of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 101: 469-71
  22. Duerr S, Wendler O, Aigner T, Karosi S, Schick B (2008) Metalloproteinases in juvenile angiofibroma - a collagen rich tumor. *Hum Pathol* 39: 259-268
  23. Eastmond DA, Pinkel D (1990) Detection of aneuploidy and aneuploid-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat Res* 234: 428-440
  24. Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348

25. Farag MM, Ghanimah SE, Ragaie A, Saleem TH (1987) Hormonal receptor in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Laryngoscope* 97: 208-211
26. Folkman J (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29: 15-18
27. Ganzer U, Meyer-Breiting E (1975) The treatment of inoperable juvenile angiofibromas. *Laryngol Rhinol Otol* 54: 871-874
28. Gatalica Z (1998) Immunohistochemical analysis of steroid hormone receptors in nasopharyngeal angiofibromas. *Cancer Lett* 127: 89-93
29. Gates GA, Rice DH, Koopmann CF, Schuller DE (1992) Flutamide induced regression of angiofibroma. *Laryngoscope* 102: 641-644
30. Gebhart E (2004) Comparative genomic hybridisation (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res* 104: 352-358
31. Giardello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Offerhaus JA, Booker SV, Peterson GM (1993) Nasopharyngeal angiofibromas in patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 105: 1550-1552
32. Girgis IH, Fahmy SA (1973) Nasopharyngeal fibroma: its histo-pathological nature. *J Laryngol Otol* 87: 1107-1123
33. Glad H, Vainer B, Buchwald C, Peterson BL, Theilgaard SA, Bonvin P, Lajer C, Jakobson J (2007) Juvenile nasopharyngeal angiofibromas in Denmark 1981-2003: diagnosis, incidence, and treatment. *Acta Otolaryngol* 127: 292-299
34. Goepfert H, Cangier A, Lee YY (1985) Chemotherapy for aggressive juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Arch Otolaryngol* 111:285-289
35. Guertl B, Beham A, Zechner R, Stammberger H, Hoefler G, (2000) Nasopharyngeal angiofibroma: An APC-gene-associated tumor? *Hum Pathol* 31: 1411-1413
36. Gullane PJ, Davidson J, O'Dwyer T, Forte V (1992) Juvenile angiofibroma: a review of the literature and a case series report. *Laryngoscope* 102: 928-933
37. Härmä RA. (1958) Nasopharyngeal fibroma: A clinical and histopathological study. *Acta Otolaryngol Suppl.* 146: 7-74
38. Heinrich UR, Brieger J, Gosepath J, Wierzbica M, Sokolov M, Roth Y, Szyfter W, Bittinger F, Mann WJ (2007) Frequent chromosomal gains in recurrent juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Cancer Genet Cytogenet* 175: 138-143

39. Hopman AH, van Hooren E, van de Kaa CA, Vooijs PG, Ramaekers FC (1991) Detection of numerical chromosome aberrations using in situ hybridization in paraffin sections of routinely processed bladder cancers. *Mod Pathol* 4: 503-513
40. Hughes TE (1941) Nasopharyngeal fibroma. *Arch Otolaryngol* 34: 57-68
41. Hulthen UL, Toremalm NG (1976) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *J Otolaryngol* 5: 55-63
42. Hwang HC, Mills SE, Patterson K, Gown AM (1998) Expression of androgen receptors in nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistological study of 24 cases. *Mod Pathol* 11: 1122-1126
43. Janz A, Sevignani C, Kenyon K, Ngo CV, Thomas-Tikhonenko A (2000) Activation of the myc oncoprotein leads to increased turnover of thrombospondin-1 mRNA. *Nucleic Acids Res* 28: 2268-2275
44. Johns ME, MacLeod RM, Cantrel RW (1980) Estrogen receptors in nasopharyngeal angiofibromas. *Laryngoscope* 90: 628-634
45. Johnson S, Kloster JH, Schiff M (1966) The action of hormones on juvenile nasopharyngeal angiofibroma . A case report. *Acta oOtolaryngol* 61:153-160
46. Klemmer S, Pascoe L, DeCosse J (1987) Occurrence of desmoids in patients with familial adenomatous polyposis of the colon. *Am J Med Genet* 28: 385-92
47. Küttner K, Katekamp D, Stiller D (1977) Hormone therapy of the juvenile angiofibroma. *Arch Otorhinolaryngol* 214: 331-338
48. Labra A, Chavolla-Magana R, Lopez-Ugalde A, Alanis-Calderon J, Huerta-Delgado A (2004) Flutamide as a preoperative treatment in juvenile angiofibroma (JA) with intracranial invasion. *Otolaryngol Head Neck Surg* 130: 466-469
49. Lee DA, Rao BR, Meyer JS, Prioleau PG, Bauer WC (1980) Hormonal receptor determination in juvenile nasopharyngeal angiofibromas. *Cancer* 46: 547-551
50. Martin H, Ehrlich HE, Abels JC (1948) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Ann Surg* 127:513-536
51. Maurice M , Milad M (1981) Pathogenesis of juvenile nasopharyngeal fibroma. *J Laryngol Otol* 95: 1121-1126
52. Miyagishi M, Fujii R, Hatta M, Yoshida E, Araya N, Nagafuchi A, Ishihara S, Nakajima T, Fukamizu A(2000): Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating  $\beta$ -catenin with CBP/p300. *J Biol Chem* 275: 35170-35175

53. Moinfar F, Okcu M, Tsybrovskyy O, Regitnig P, Lax SF, Weybora W, Ratschek M, Tavassoli FA, Denk H (2003) Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies. *Cancer* 98: 703-711
54. Montag AG, Tretiakova M, Richardson M (2006) Steroid hormone receptor expression in nasopharyngeal angiofibromas. *Am J Clin Pathol* 125: 832-837
55. Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Croci S, Astolfi A, Landuzzi L, Di Carlo E, Iezzi M, Musiani P, Lollini PL (2003) Development of rhabdomyosarcoma in Her2/neu transgenic p53 mutant mice. *Cancer Res* 63: 2728-2732
56. Nagai MA, Butugan O, Logullo A, Brentani MM (1996) Expression of growth factors, proto-oncogenes, and p53 in nasopharyngeal angiofibromas. *Laryngoscope* 106: 190-195
57. Néalton M (1853) Polype fibreux de la base du crâne. Considérations générales. *Gaz Hop* 26: 22
58. Ponti G, Losi L, Pellacani G, Rossi GB, Presutti L, Mattioli F, Villari D, Wannesson L, Ciuffelli MA, Izzo P, De Rosa M, Marone P, Seidenari S (2008) Wnt pathway, angiogenic and hormonal markers in sporadic and familial adenomatous Polyposis-associated juvenile angiofibromas (JNA). *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 16: 173-178
59. Prange W, Breuhahn K, Fischer F, Zilkens C, Pietsch T, Petmecky K, Eilers R, Dienes HP, Schirmacher P (2003)  $\beta$ -catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-I target genes. *J Pathol* 201: 250-259
60. Rippel C, Plinkert PK, Schick B (2003) Expression of members of the cadherin/catenin - protein family in juvenile angiofibromas. *Laryngo Rhinol Otol* 82: 353-357
61. Saylam G, Yucel OT, Sungur A, Onerci M (2006) Proliferation, angiogenesis and hormonal markers in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 70: 227-234
62. Schick B, Rippel C, Brunner C, Jung V, Plinkert PK, Urbschat S (2003) Numerical sex chromosome aberrations in juvenile angiofibromas: genetic evidence for an androgen-dependent tumor? *Oncol Rep* 10: 1251-1255
63. Schick B, Kahle G, Häßler R, Draf W (1996) Chemotherapie des juvenilen Angiofibroms - eine Alternative? *HNO* 44: 148-152
64. Schick B, El Rahman el Tahan A, Brors D, Kahle G, Draf W (1999) Experiences with endonasal surgery in angiofibroma. *Rhinology* 37: 80-85

65. Schick B, Kahle G (2000) Radiological findings in angiofibroma. *Acta Radiol* 41: 585-593
66. Schick B, Brunner C, Praetorius M, Plinkert PK, Urbschat S (2002) First evidence of genetic imbalances in angiofibromas. *Laryngoscope* 112: 397-401
67. Schick B, Plinkert PK, Prescher A (2002) Aetiology of angiofibromas: reflection on their specific vascular component. *Laryngo Rhino Otol* 81: 280-284
68. Schick B, Wemmert S, Bechtel U, Nicolai P, Hofman T, Golabek W, Urbschat S (2007) Comprehensive genomic analysis identifies MDM2 and AURKA as novel amplified genes in juvenile angiofibromas. *Head Neck* 29: 479-87
69. Schick B, Wemmert S, Jung V, Steudel WI, Montenarh M, Urbschat S (2006) Genetic heterogeneity of the MYC oncogene in advanced juvenile angiofibromas. *Cancer Genet Cytogenet* 164: 25-31
70. Schiff M (1959) Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. A theory of pathogenesis. *Laryngoscope* 69: 981-1016
71. Smith GV, Feakins R, Farthing MJ, Ballinger A (2005) Cyclooxygenase 2, p53, beta-catenin, and APC protein expression in gastric adenomatous polyps. *Am J Clin Pathol* 123: 415-20
72. Starlinger V, Wendler O, Gramann M, Schick B (2007) Laminin expression in juvenile angiofibroma indicates vessel's of early developmental stage. *Acta Otolaryngol* 22: 1-6
73. Tillaux P (1878) *Traité d'anatomie topographique avec applications à la chirurgie*. Ed. 2, P. Asselin, Paris, 348-349
74. Verneuil V. (1861) *Séances de la Société de Chirurgie de Paris pendant l'année 1860*. *Bul Soc Chir*
75. Vousden KH (2002) Switching from life to death: the Miz-ing link between Myc and p53. *Cancer Cell* 2: 351-352
76. Wen Y, Hu MC, Makino K, Spohn B, Bartholomeusz G, Yan DH, Hung MC (2000) Her2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res* 60: 6841-6845
77. Wendler O, Schäfer R, Schick B (2007) Mast cells and T-lymphocytes in juvenile angiofibromas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264: 769-775
78. Willis RA (1953) *Pathology of tumors*. Second Ed. London: Butterworth & Co, pp 650-653

79. Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B, Sun Z (2002) Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *J Biol Chem* 277: 11336- 11344
80. Yeh S, Lin HK, Kang HY, Thin TH, Lin MF, Chang C (1999) From Her2/neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5458-5463
81. Zang PJ, Weber R, Liang HH, Pasha TL, LiVolsi VA (2003) Growth factors and receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma and nasal polyps: an immunohistological study. *Arch Pathol Lab Med* 127:1480-1484
82. Zeillinger R, Kury F, Czerwenka K, Kubista E, Sliutz G, Knogler W, Huber J, Zielen-sky C, Reiner G, Jakez R (1989) Her2/neu amplification, steroid receptors and epi-dermal growth factor receptor in primary breast cancer. *Oncogene* 4: 109-114

## 8. Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernhard Schick, der mich für diese Arbeit immer wieder motiviert hat und für jede meiner Fragen ein offenes Ohr hatte. Durch die Zusammenarbeit mit ihm über meine Arbeit hinaus konnte ich nicht nur eine bewundernswerte Art der Arzt-Patienten-Beziehung kennenlernen, sondern auch seine Fähigkeit, eine überaus angenehme Arbeitsatmosphäre durch einen respektvollen liebenswerten Umgang mit Kollegen zu schaffen. Prof. Dr. Schick ist mir ein großes Vorbild.

Für die Bereitstellung von Angiofibromgewebe gilt mein Dank dem Städtischen Klinikum Fulda (Direktor: Prof. Dr. W. Draf), der Universitätsklinik Würzburg (Direktor: Prof. Dr. J. Helms) und der Universitäts-HNO-Klinik Tübingen (Prof. Dr. H.P. Zenner).

Frau PD Dr. S. Urbschat und ihrem Team danke ich für die Zusammenarbeit und stete Unterstützung.

Für die großartige Betreuung im Labor danke ich ganz besonders Frau Ulrike Bechtel und Frau Monika Hoffmann, ohne deren Hilfe und Enthusiasmus diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. Sie waren mir während meiner Arbeit zu jeder Zeit auch im privaten Bereich Ansprechpartnerinnen, und ich denke mit großer Freude an diese Zeit zurück.

Dr. Mark Prätorius danke ich für die große Unterstützung bei der Erstellung der Fotos am Fluoreszenzmikroskop, der Hilfe bei der Bewältigung aller computertechnischen Fragen – und vor allem für die Ausflüge in den Baumarkt.

Dr. Christian Brunner danke ich für die Erklärung seiner Vorarbeiten zum juvenilen Angiofibrom und für die Zeit, die ich während meiner Famulatur auf seiner Station verbringen durfte.

Für die freundliche Bereitstellung der radiologischen Aufnahmen des juvenilen Angiofibroms danke ich der Abteilung für Neuroradiologie der Universitätskliniken Erlangen-Nürnberg.

Meinen Eltern danke ich für den Weg, den sie mir bereitet haben, die Liebe, mit der sie mich erzogen haben, das Vorbild, was sie mir immer waren und für ihre Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

Meinem Bruder David danke ich für all seine Hilfe rund um den Computer und, dass er so tolle Freunde wie Christian hat, der bei der Erstellung der Diagramme behilflich war.



Marc Weißbaupt danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen und Verbesserungsvorschläge.

#### Publikationen

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Schick B, Veldung B, Wemmert S, Jung V, Montenarh M, Meese E, Urbschat S (2005) p53 and Her2/neu in juvenile angiofibromas. *Oncol Rep* 13: 453-457

## 9. Lebenslauf

Name: Veldung

Vorname: Petra Barbara

Geburtsdatum: 22.08.1978

Geburtsort: St.Ingbert

Eltern: Dr. Axel Veldung, Gabriela Veldung, geb. Schug

Geschwister: David Veldung (1979)

Ausbildung:

1985-1989: Grundschule Am Eisenwald, St. Ingbert-Hassel

1989-1998: Albertus-Magnus-Gymnasium, katholische staatlich anerkannte Privatschule, St. Ingbert

1998: Abitur

September 1998: vierwöchiges Praktikum in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe in der „Clinique La Sagesse“, Rennes, Frankreich

Okt. 1998-Feb. 1999: Studium der Humanmedizin am Centre Universitaire, Luxemburg

März 1999: Wechsel an die Universität des Saarlandes, Humanmedizin

September 1999: vierwöchiges Praktikum in Gynäkologie und Geburtshilfe an der „Clinique La Sagesse“, Rennes, Frankreich

September 2000: vierwöchiges Praktikum in Gynäkologie und Geburtshilfe am Josefinum-Krankenhaus, Augsburg

März 2001: Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung

- September 2001: Famulatur in der „Klinik Dr. Kotzlowski“ für Plastische Chirurgie in München
- März 2002: Ablegen des ersten Teils der Ärztlichen Prüfung
- August- September 2002: Famulatur in der Abteilung für Traumatologie in der „Clinica Queretaro“, Queretaro, Mexiko
- Oktober 2002 - Juni 2003: Studium der Humanmedizin in Lausanne, Schweiz, im Rahmen des ECTS-Austauschprogrammes
- Juli 2003 - August 2003: Famulatur in der Abteilung für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsklinik des Saarlandes, Homburg/Saar
- September 2003: Famulatur in der Abteilung für Plastisch rekonstruktive Chirurgie des CHUV, Lausanne, Schweiz
- September 2004: Ablegen des zweiten Teils der Ärztlichen Prüfung
- Oktober 2004 - Februar 2005: Tertian der Inneren Medizin in der Notaufnahme des Hôpital St. Antoine, Paris, im Rahmen des ECTS-Austauschprogrammes
- Oktober 2004 - Februar 2005: Operationsassistentin bei:
- Dr. Gilbert Zakine, Plastischer Chirurg, in der „Clinique Goffroy St. Hilaire“, Paris
- Dr. Marianne Cerceau, Plastische Chirurgin, in der „Clinique Rémusat“, Paris
- Dr. Sebastiano Montoneri, Plastischer Chirurg, in der „Clinique La Muette“ und „Clinique Trocadéro“, Paris
- Dr. Cédric Kron in der „Clinique La Muette“, „Clinique Trocadéro“ und „Centre Européen de la Chirurgie Plastique“, Paris
- März - Juni 2005: Tertian der Chirurgie in der Abteilung für plastisch-rekonstruktive Chirurgie am Hospital Universitario Pedro Ernesto bei Prof. Claudio Cardoso de Castro in Rio de Janeiro, Brasilien

Juni 2005 - September 2005: Tertian in Gynäkologie an der Universitäts-Frauenklinik  
Homburg/Saar

Oktober 2005: Ablegen des Dritten Teils der Ärztlichen Prüfung

Oktober 2005 – Juni 2007: Assistenzärztin in der Abteilung für Plastisch-Rekonstruktive und  
Ästhetische Chirurgie am Hôpital St. Joseph, Paris, Chefarzt Prof. Dr.  
Alain Bellavoit.

Juni 2007 – April 2008: Assistenzärztin in der Abteilung Plastisch-Rekonstruktive und  
Ästhetische Chirurgie, Handchirurgie im Rotes Kreuz Krankenhaus  
Kassel, Chefarzt Prof. Dr. E. M. Noah.

Seit April 2008: Assistenzärztin in der Abteilung für Plastisch-Rekonstruktive und  
Ästhetische Chirurgie am Hôpital St. Joseph, Paris, Chefarzt  
Prof. Dr. Alain Bellavoit.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.