

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. B. Schick

**Untersuchungen zur Pathogenese des juvenilen Angiofibroms
und die Therapiemöglichkeiten des beta-Blockers Propranolol**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
**der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2014

vorgelegt von: Philipp Alexander Kulas
geb. am: 29.04.1982 in Bonn

1.	Zusammenfassung	1
1.	Summary	3
2.	Einleitung	
2.1	Das juvenile Angiofibrom	
2.1.1	Klinik	5
2.1.2	Klassifikation	7
2.1.3	Diagnose	10
2.1.4	Therapie	11
2.1.5	Histologie	14
2.1.6	Ätiologie	15
2.1.7	β -Catenin und der WNT-Signalweg	17
2.1.8	Weitere genetische Veränderungen	18
2.1.9	Einfluss von Hormonen und Wachstumsfaktoren sowie deren therapeutischer Nutzen	19
2.2	Humane Mesenchymale Stromazellen (hMSC)	26
2.3	Zielsetzung der eigenen Arbeit	28
3.	Material und Methoden	
3.1	Material	
3.1.1	Tumorgewebe	30
3.1.2	Referenzgewebe	31
3.1.3	Zellkultivierung (Primärkulturen)	31
3.1.4	Durchführung der Zellkultivierung	32
3.1.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	32
3.2	Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)	33
3.2.1	Herstellung von Chromosomenpräparaten	34
3.2.2	DNA-Isolierung	36
3.2.3	Markierung genomischer DNA	37
3.2.4	Hybridisierung, Stringenzwaschung und Fluoreszenzfärbung	39
3.3	Aortenring-Assay	45
3.4	Angiogenese ELISA	46
3.5	Immunfluoreszenz	47
3.6	Statistische Auswertung	48

4.	Ergebnisse	
4.1	Mesenchymale Primärkulturen aus juvenilen Angiofibromen (AF)	49
4.2	Vergleich von Primärgewebe und AF-Zellkulturen mittels CGH	49
4.3	Charakterisierung der AF-Zellkulturen mittels Immunfluoreszenz	55
4.4	In vitro Differenzierung der AF-Zellkulturen	57
4.5	CD31-positive AF-Zellkulturen	
4.5.1.	Anzucht	61
4.5.2	Differenzierungsverhalten unter dem Einfluss von Propranolol	62
4.6	Aortenring-Assay	63
4.7	Angiogenese ELISA	66
4.8	Wachstumsverhalten von AF-Zellkulturen unter dem Einfluss von Propranolol	68
5.	Diskussion	
5.1	Material und Methoden	
5.1.1	Ausgangsgewebe und Zellkultur	70
5.1.2	Vergleichende genomische Hybridisierung	71
5.1.3	Immunfluoreszenzfärbung	73
5.2	Ergebnisdiskussion	
5.2.1	Ergebnisse der CGH	75
5.2.2	Ergebnisse der Differenzierungsversuche	82
5.2.3	Der Einfluss von Propranolol auf AF-Zellkulturen	85
5.3	Fazit und Ausblick	89
6.	Literaturverzeichnis	91
7.	Anhang	
7.1	Abkürzungsverzeichnis	107
7.2	Material und Herstellernachweis	
7.2.1	Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterialien	110
7.2.2	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	111
7.2.3	Verwendete Zellkulturmedien	111
7.2.4	Verwendete Antikörper	111
7.2.5	Geräteliste	112
7.3	Tabellen und Abbildungsverzeichnis	112
8.	Danksagung	114

1. Zusammenfassung

Das juvenile Angiofibrom (JA) stellt eine seltene durch in ein fibröses Stroma eingebettete irreguläre Gefäßstrukturen gekennzeichnete, gutartige Neubildung im Bereich der Nasenhaupthöhle bei männlichen Adoleszenten dar. Die Pathogenese und Tumorbilogie des JA ist bisher weitestgehend unbekannt.

Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Etablierung stabiler Zelllinien und die Charakterisierung der vorliegenden chromosomalen Veränderungen von Primärtumor und kultivierten Zellen in frühen und späten Passagen mittels der Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH). Im Weiteren wurde der Einfluss der proangiogenen Wachstumsfaktoren VEGF und FGF auf die Expression des Endothelzellmarkers CD31 und des Fibroblastenmarkers Vimentin mittels simultaner Immunfluoreszenzfärbung in 8 Zelllinien untersucht. Aufgrund der These, dass CD31-negative Fibroblasten selbst proangiogene Faktoren sezernieren und diese Faktoren hämatopoetische Vorläuferzellen zu CD31-positiven Endothelzellen differenzieren lassen, wurden im Überstand von JA-Kulturen das Vorliegen verschiedener proangiogener Wachstumsfaktoren sowie das Potential zur Angiogenese mittels ELISA bzw. Aortenring-Assay untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Propranolol, einem beta-Blocker, der u.a. die Sezernierung von VEGF und bFGF hemmt, auf das Wachstum von zwei JA in Zellkultur quantifiziert.

Die CGH-Untersuchungen zeigten in sieben Primärtumoren sowie in fünf erfolgreich etablierten Zellkulturen repräsentative chromosomale Veränderungen, die sowohl die in der Literatur bekannten Veränderungen bestätigten, als auch neue Konsensusregionen aufzeigten, wie beispielsweise die Region auf 12q13, welche für *ALK1*, einen Rezeptor der TGF-beta Superfamilie, codiert. Die weitere Charakterisierung der etablierten Kulturen durch Immunfluoreszenzfärbung ergab ausschließlich primär CD31-negative Zelllinien. Nach Zugabe der Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF über eine Kultivierungsdauer von 21 Tagen konnten bis zu 10% CD31-positiv Zellen in fünf Kulturen nachgewiesen werden. Da auch die Kontrollen ohne VEGF/bFGF-Zusatz vereinzelt CD31-positiv Zellen aufwiesen (<0,01%), sollte im Weiteren geprüft werden, ob diese Endothelzellen primär methodisch bedingt nicht erfasst wurden oder aus undifferenzierten Progenitorzellen spontan entstanden sind. Die Untersuchung von zwei weiteren Zellkulturen mit einem initialen Anteil von bis zu 2,5% CD31-positiven Zellen ergab, dass ohne Zusatz der Wachstumsfaktoren der Anteil der CD31-positiven Zellen sogar abnimmt, d.h. ein „Hochwachsen“ methodisch nicht detektierter Endothelzellen unwahrscheinlich ist. Ob jedoch die CD31-negativen Fibroblasten proangiogene Faktoren wie VEGF und bFGF

sezernieren und diese Faktoren kontinuierlich hämatopoetische Vorläuferzellen zu CD31-positiven Endothelzellen differenzieren lassen, konnten die in dieser Arbeit angewandten Methoden nicht bestätigen. Da weder eine gesteigerte Angiogenese im Rat Aortic Ring Assay noch im ELISA das Vorliegen verschiedener proangiogener Wachstumsfaktoren aus dem Zellkulturüberstand gezeigt werden konnte, konnten diese Versuchsansätze die Hypothese während der JA Kultivierung sezernierten Differenzierungsfaktoren nicht belegen. Demgegenüber steht jedoch die Beobachtung, dass sich sowohl das Wachstum als auch die Endothelzeldifferenzierung durch die Zugabe von Propranolol gehemmt wurde. Dieses Pharmakon wird bereits erfolgreich in der Therapie einer anderen vaskulären Malformation, dem juvenilen Hämangiom, eingesetzt. Da die Wachstumshemmung jedoch nicht nur endothelzellspezifisch, sondern auch in anderen primären Zellkulturen beobachtet wurde, müssen weiterführende Untersuchungen die hierfür verantwortliche Pathogenese klären.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit aus diesen sehr seltenen Tumoren stabile Zellkulturen etabliert und näher charakterisiert werden. Zur weiteren Aufklärung der Pathogenese des JA ist die Etablierung eines in vivo Modells von Vorteil, da es neben der Aufklärung pathophysiologischer Entstehungsmechanismen auch die Überprüfung pharmakologischer Interventionsmodelle, vor allem im Hinblick auf Propranolol als potentiell Pharmakon zur Therapie des JA, ermöglicht.

1. Summary

The juvenile angiofibroma (JA) represents a rare, by embedded in a fibrous stroma irregular vascular structures marked, benign neoplasm of the nasal cavity in male adolescents. The pathogenesis and tumor biology of JA is so far unknown.

One aim of the present study was to establish stable cell lines and to characterize the present chromosomal alterations of primary tumor tissue and cultured cells in early and late passages by using the method of the comparative genomic hybridization (CGH). Furthermore, the influence of the proangiogenic growth factors VEGF and FGF on the expression of endothelial cell marker CD31 and the fibroblast marker Vimentin was studied by simultaneous immunofluorescent staining in 8 cell lines. Due to the hypothesis that CD31 -negative fibroblasts themselves secrete proangiogenic factors and these factors can differentiate hematopoietic progenitor cells into CD31 -positive endothelial cells, the supernatant of JA-cultures was examined for the presence of different proangiogenic growth factors as well as the potential for angiogenesis by ELISA and aortic ring assay. Moreover, the influence on the growth of two JA cultures by the beta-blocker Propranolol, which is able to inhibit the secretion of VEGF and bFGF, was quantified.

The CGH-studies identified in seven primary tumors and five successfully established cell cultures representative chromosomal changes as described by literature, as well as new consensus regions such as for example the region at 12q13, which encodes for *ALK1*, a receptor of the TGF-beta superfamily. The further characterization of the established cultures by immunofluorescence staining revealed exclusively primary CD31 -negative cell lines. The addition of growth factors bFGF and VEGF during cultivation for 21 days, up to 10% CD31 -positive cells could be detected in five cultures. Because of the fact that the control cultures without the addition of VEGF/bFGF have sporadic CD31 -positive cells (< 0.01%), further investigations should clarify whether these endothelial cells were primarily not detected by methodical limitations or arosed spontaneously from undifferentiated progenitor cells. The analysis of two additional cell cultures with an initial amount of up to 2.5% of CD31 -positive showed that without the addition of growth factors the proportion of CD31 -positive cells was even reduced, i.e. an "outgrow" of methodologically not detected endothelial cells is unlikely. Whether CD31 -negative fibroblasts secrete proangiogenic factors such as VEGF and bFGF and these factors are able to differentiate hematopoietic progenitor cells to CD31 -positive endothelial cells continuously, cannot be confirmed by the methods used in this study. Because of the fact, that neither an increased angiogenesis by the aortic ring Assay nor by ELISA the presence of various proangiogenic growth factors could be shown from the cell culture

supernatant, these experimental approaches could not prove the hypothesis of secreted differentiation growth factors during the cultivation of JA. On the other hand, there is our observation that both the growth and the endothelial cell differentiation were inhibited by the addition of Propranolol. This drug is already being successfully used in the treatment of another vascular malformation, the juvenile hemangioma. Because the growth inhibition was observed not only in endothelial cells but also in other primary cell cultures, further studies have to clarify the pathogenesis behind this observation.

In summary, in this study we have already established and characterized stable cell cultures from these rare tumors. For further investigations clarifying the pathogenesis of JA it would be essential to establish an in vivo model, which would be able to study the pathophysiological development mechanisms as well as the examination of pharmacological intervention models, especially in view of Propranolol as a potential drug for the treatment of JA.

2. Einleitung

2.1 Das juvenile Angiofibrom

2.1.1 Klinik

Das juvenile Angiofibrom (JA) ist ein seltener, gutartiger Tumor, der überwiegend im hinteren Bereich der Nasennebenhöhlen bei männlichen Adoleszenten im Alter zwischen 9 und 19 Jahren entsteht (Lund et al., 2010). In Untersuchungen bezüglich der Inzidenz geben Glad und Mitarbeiter (2007) in Dänemark einen Wert von 0,4 pro eine Million Einwohnern an. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung wird in dieser Studie mit 15 Jahren beziffert. Unter den Neoplasien des Kopf- und Halsbereiches macht das JA lediglich einen Anteil von 0,05 % aus (Lund et al., 2010).

Das juvenile Angiofibrom ist überwiegend einseitig im Bereich der hinteren Nasenhaupthöhle mit enger Lagebeziehung zum Foramen sphenopalatinum am Ansatz des hinteren Endes der mittleren Muschel lokalisiert (Abb. 2.1.a). In frühen Stadien wird darüber hinaus häufig eine Tumorausdehnung in den Nasopharynx und die Fossa pterygopalatina beobachtet. Im Falle eines weiter fortschreitenden Wachstums kann es zu Schädigungen angrenzender Strukturen wie der Schädelbasis, dem Nasopharynx, der Nasennebenhöhlen und der Orbita sowie der Fossa infratemporalis kommen (Schick et Kahle, 2000). Trotz des häufigen intrakraniellen Wachstums ist ein Durchbruch der Dura mater nur in sehr selten Fällen beschrieben (Jafek et al., 1972, Ramos et al., 2011) und dabei auch meistens im Falle eines Rezidivs (Butugan et al., 1995). Ein anteriores Wachstum kann durch einseitiges Ausfüllen der gesamten Nasenhöhle zu einer Septumdeviation führen.

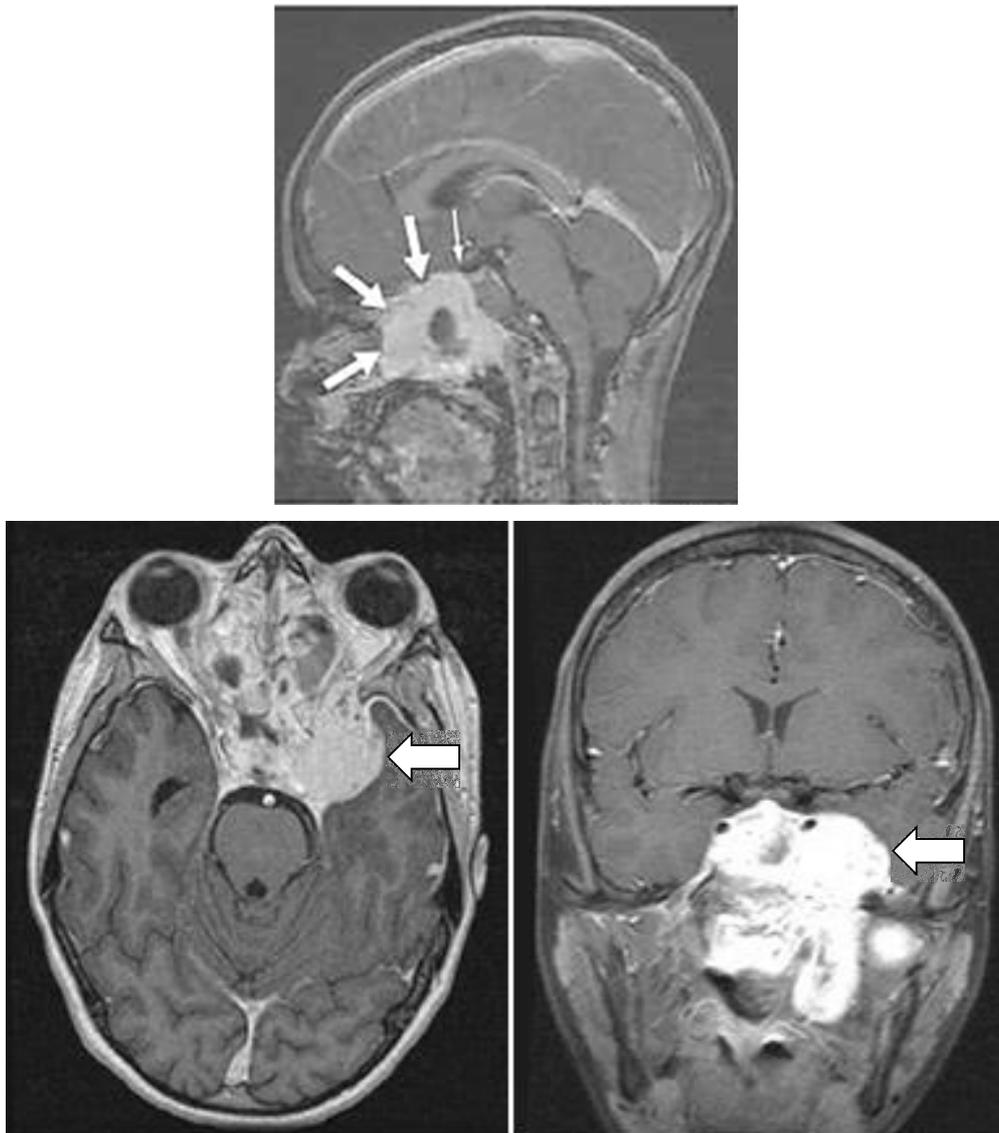


Abb. 2.1.a: Links: axiale MR-Aufnahme eines juvenilen Angiofibroms eines zwölfjährigen Jungen im Bereich der vorderen und mittleren Schädelbasis. Rechts: Die coronare MR Aufnahme zeigt die unmittelbare Nähe des Tumors zum Sinus cavernosus. Pfeile zeigen die Tumorgrenzen (MR-Aufnahmen wurden freundlicherweise durch Prof Reiter zur Verfügung gestellt).

Aus dem Wachstumsverhalten lassen sich die klinischen Symptome ableiten. Eines der ersten Symptome ist in vielen Fällen die nasale Obstruktion (Zito et al., 2001). Darauf folgt ein einseitig rezidivierendes Nasenbluten, das im schlimmsten Fall zu einem hämorrhagischen Schock führen kann und einer sofortigen operativen Intervention bedarf. Durch einen Befall der Nasennebenhöhlen kommt es bei einigen Patienten zu unspezifischen, anhaltenden Kopfschmerzen. Anosmie, Hyposmie, unilaterale Rhinorrhoe, Otagie und Wangendeformitäten sind seltenere Symptome. Bei Befall des Chiasma opticus oder des Nervus opticus kann es

durch Druckschädigung zur Erblindung kommen. Sollten sich große Teile des Tumors nach intrakraniell verlagern, kann es zu einer Hirndrucksymptomatik mit den entsprechenden Symptomen wie Kopfschmerzen, Erbrechen oder der Ausbildung einer Stauungspapille kommen.

Trotz der Tatsache, dass das juvenile Angiofibrom histologisch gesehen eine gutartige Neoplasie darstellt, ist es durch ein lokal aggressiv-destruierendes Wachstum gekennzeichnet (Eivazi et al., 2009). Die in der Literatur beschriebenen Angaben bezüglich der Rezidivraten reichen dabei je nach Autor von 6 % bis hin zu 50 % (Bremer 1986, Jacobsson 1988, Siniluoto 1993, Lloyd 1999, Glad et al., 2007, Nicolai et al., 2010). Liu und Mitarbeiter sahen den Hauptgrund für etwaige Rezidive in einer inkompletten Resektion des Primärtumors (Liu et al., 2002). Herman und Mitarbeiter (1999) untersuchten 44 operativ therapierte Angiofibrome und stellten fest, dass die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs entscheidend vom präoperativen Tumorstadium abhängt. So steht eine Rezidivrate von 39,5 % in Fällen, in denen ein Radowski Stadium 3 vorlag, einer Rate von lediglich 7 % in den Fällen mit einem Stadium von 1 bzw. 2 gegenüber. Sun und Mitarbeiter (2011) beschrieben neben dem Tumorstadium auch das Alter bei Erstdiagnose (< 18 Jahre) sowie eine Tumorgröße von über 4 cm als signifikante Einflussgrößen für das Risiko eines Rezidivs. In Bezug auf das zeitliche Auftreten einer Symptomatik von Residuen zeigten Antoniades und Mitarbeiter (2002), dass sie meist innerhalb eines Jahres postoperativ symptomatisch werden.

2.1.2 Klassifikation

Die Grundlage einer jeden Klassifikation des juvenilen Angiofibroms bildet die radiologische bzw. bildgebende Diagnostik, aufgrund derer zum einen eine Einteilung wie zum anderen auch die Planung der weiteren Therapie bzw. Therapieoptionen erfolgt, wobei sowohl CT- als auch MRT-Verfahren zum Einsatz kommen. Dabei stehen bei diesen radiologischen Untersuchungen die Tumorausdehnung und Lokalisation im Vordergrund, auf deren Grundlage auch die Klassifikation des Tumors erfolgt. Zu diesem Zweck wurden in der Vergangenheit bereits einige Klassifikationsmodelle vorgeschlagen. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten bedient man sich beim juvenilen Angiofibrom nicht der international gängigen TNM-Klassifikation, da dieser Tumor nach heutigem Wissensstand nicht zur Metastasierung neigt. Ein noch heute gebräuchliches System ist das von Chandler und Mitarbeiter (1984), welches in seiner Klassifikation auf der von der *American Joint Committee on Cancer* entwickelten Einteilung für Karzinome des nasopharyngealen Bereichs beruht. Vermehrt finden in der heutigen Zeit jedoch Stadieneinteilungen Anwendung, die ursprünglich auf den Klassifikationen von Fisch (Fisch,

1983) oder Sessions und Mitarbeiter (1981) beruhen, da diese das Wachstumsverhalten von Angiofibromen in Bezug auf ihre Ausdehnung innerhalb des Schädels am stärksten berücksichtigen. Das System von Andrews und Mitarbeitern (1989) ist eine Überarbeitung der Klassifikation von Fisch, ebenso wie Radkowski und Mitarbeiter (1996) das System von Sessions und Mitarbeitern (1981) überarbeiteten und damit an die verbesserten bildgebenden Verfahren angepasst haben. Diese vier in der heutigen Zeit am häufigsten angewandten Klassifikationsmodelle sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Da aber keines der genannten Klassifikationsmodelle eine einheitliche internationale Anwendung findet bzw. sich bis zum heutigen Tage durchsetzen konnte, müssen die auf diesen unterschiedlichen Systemen beruhenden Aussagen bzw. Einteilungen in Bezug auf ihre Vergleichbarkeit und Übertragbarkeit kritisch betrachtet werden. So besteht beispielsweise aufgrund dieser Uneinheitlichkeit ein hohes Verwechslungspotential, sofern nicht angegeben wird, welche Klassifikation der Einteilung zugrunde liegt, da all diesen Systemen ein Zurückgreifen auf eine numerische Einteilung gemein ist.

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

Fisch 1983	Andrews et al. 1989	Sessions et al., 1981	Radkowski et al., 1996
1. Tumor begrenzt auf den Nasopharynx und die Nasenhöhle ohne knöcherne Beteiligung	1. Tumor begrenzt auf den Nasopharynx und die Nasenhöhle. Die Knochendestruktion ist unwesentlich oder auf das F. sphenopalatinum begrenzt	1a. Tumor begrenzt auf die hintere Nasenhöhle und/oder Nasopharynx, keine Ausdehnung auf die Nasennebenhöhlen	1a. Tumor begrenzt auf Nase oder Nasopharynx
2. Tumor infiltriert die Fossa pterygomaxillaris, die Maxilla oder die NNH mit knöcherner Beteiligung	2. Tumor infiltriert die Fossa pterygomaxillaris, die Maxilla oder die NNH mit knöcherner Beteiligung	1b. Neben 1a auch Ausdehnung auf die Nasennebenhöhlen	1b. Ausdehnung in mind. eine NNH
3. Tumor infiltriert die Fossa infratemporalis, die Orbita und die parasellare Region, bleibt aber lateral des Sinus cavernosus	3a. Tumor dringt in die Fossa infratemporalis oder die Orbitaregion ein ohne intrakranielle Beteiligung	2a. Minimale laterale Ausdehnung in Richtung F. sphenopalatinum in die Fossa pterygomaxillaris	2a. Minimale Ausdehnung in die Fossa pterygomaxillaris
4. Tumor mit massivem Wachstum in den Sinus cavernosus, die Chiasma opticus Region oder die Hypophysenregion	3b. Tumor dringt in die Fossa infratemporalis oder die Orbitaregion ein mit intrakranieller Beteiligung	2b. Vollständige Ausfüllung der Fossa pterygomaxillaris, Verschiebung der A. maxillaris, eine Erosion der Orbita ist möglich	2b. Vollständige Ausdehnung in die Fossa pterygomaxillaris mit oder ohne Erosion der Orbita
			2c. Beteiligung der Fossa infratemporalis mit oder ohne Beteiligung der Wange
			3a. Erosion der Schädelbasis, minimal intrakraniell
			3b. Erosion der Schädelbasis, ausgedehnt intrakraniell, mit oder ohne Beteiligung des Sinus cavernosus

2.1.3 Diagnose

Wegweisend für die Diagnose eines juvenilen Angiofibroms sind primär die ersten unspezifischen Symptome, welche eine weitere Diagnostik vonnöten machen. Hierzu zählen eine behinderte Nasenatmung, eine nasale Sprache oder auch eine Epistaxis. Eine endoskopische Darstellung des Tumors ist bereits im frühen Stadium möglich.

Aufgrund der ausgeprägten Vaskularisierung sowie der irregulären Gefäßwandstruktur mit fehlender Kontraktionsfähigkeit sollte in Zeiten moderner bildgebender Verfahren auf eine präoperative Biopsie zur Diagnosesicherung verzichtet werden. Diese wird gänzlich durch computertomographische sowie magnetresonanztomographische Aufnahmen sowie eine Angiographie ersetzt. Dabei ermöglicht die CT die Darstellung tumorbedingter knöcherner Veränderungen sowie, durch eine Kontrastmittelanreicherung, eine wegweisende Tumorausdehnung. Durch die MRT-Aufnahme können ergänzend zur Tumordarstellung demgegenüber auch die durch den Tumor bedingten Schleimhautschwellungen und Abflussbehinderungen in den paranasalen Sinuses gezeigt werden.

Zur weiteren präoperativen Diagnostik sollte die Gefäßversorgung des Tumors angiographisch dargestellt werden. So kann mit Hilfe dieser Untersuchung auch das durch die Blutversorgung entscheidend bestimmte operative Risiko eines massiven Blutverlustes abgeschätzt werden. Des Weiteren ermöglicht es die Durchführung einer präoperativen Embolisation wichtiger intratumoraler arterieller Stromgebiete mittels Partikelembolisation sowie die Planung des eigentlichen operativen Vorgehens (Giavroglou et al., 2007). Abbildung 2.1.b zeigt exemplarisch das Angiogramm eines juvenilen Angiofibroms. In der Kombination ergeben diese diagnostischen Verfahren einen klaren Verdacht auf das Vorliegen eines juvenilen Angiofibroms. Eine endgültige und abschließende Diagnose erfolgt in aller Regel nach Tumorresektion durch die pathologische Untersuchung.



Abb. 2.1.b: Angiographische Darstellung eines JA mit abgebildeter Blutversorgung durch die A. maxillaris (Freundlicherweise durch G. Kahle, Klinikum Fulda zur Verfügung gestellt).

2.1.4 Therapie

Seit 1955 basiert die Therapie des juvenilen Angiofibroms auf der operativen Resektion, wobei hierbei in der heutigen Zeit besonders das endonasale Vorgehen im Vordergrund steht (Nicolai et al., 2012).

Bisher haben sich zwei größere Studien mit der Wirksamkeit und den etwaigen Nebenwirkungen der Radiotherapie befasst. Reddy und Mitarbeiter (Reddy et al., 2001) untersuchten 15 Fälle, in denen entweder eine alleinige Radiotherapie oder die Kombination mit einer vorgeschalteten operativen Entfernung des Tumors durchgeführt wurden. In 85 % der Fälle konnte dabei eine lokale Tumorregression erreicht werden. Am ehesten als Folgen der Radiotherapie trat in einem Fall nach 14 Jahren innerhalb des Bestrahlungsfeldes ein Basalzellkarzinom auf, 3 Patienten entwickelten einen Katarakt und in einem Fall kam es zu neuronalen Störungen. Lee und Mitarbeiter (2001) untersuchten 27 Fälle, in denen die Radiotherapie das Therapieverfahren der ersten Wahl war und beobachteten ebenfalls in 85 % der Fälle eine komplette Tumorregression. Dabei entwickelten jedoch 4 Patienten im Verlauf der nächsten 7 Jahre nach Bestrahlung ein Rezidiv. Als Langzeitkomplikationen beschreiben Lee und Mitarbeiter (2001) ebenfalls die

Ausbildung eines Kataraktes sowie in einem Fall eine knöcherne Wachstumsverminderung. Aufgrund dieser Nebenwirkungen und der über den Untersuchungszeitraum hinausgehenden nicht abzusehenden Langzeitschäden wird von manchen Autoren die Radiotherapie lediglich für inoperable und lebensbedrohliche Tumoren empfohlen (Fagan et al., 1997).

Eine Regression des Tumors kann in Einzelfällen durch eine Chemotherapie erreicht werden (Schick et al., 1996). Aufgrund der bekannten Nebenwirkung einer solchen Therapie wie z. B. Knochenmarkssuppression und den damit verbundenen Konsequenzen, sollte auch diese Option inoperablen Tumoren vorbehalten bleiben (Goepfert et al., 1985).

Als adjuvante bzw. neoadjuvante Therapieoption steht die Hormontherapie zur Verfügung. Sie soll zu einer Reduktion der Tumorgroße und Vaskularisation führen, was eine verbesserte Resektabilität zur Folge hat (Johns, 1980; Zhang et al., 2003). Gates und Mitarbeiter (1992) zeigten unter Flutamidtherapie, einer antiandrogenen Hormontherapie, die beispielsweise bei Prostatakarzinomen zum Einsatz kommt, eine Tumorreduktion von bis zu 44 %. Andere Autoren konnten weder einen Einfluss auf den intraoperativen Blutverlust noch auf die Tumorgroße feststellen (Labra et al., 2004). Aufgrund der momentan niedrigen Fallzahlen bisher durchgeführter Studien kann aber eine endgültige Aussage zum Nutzen dieser Therapieansätze bis dato nicht erfolgen.

Eine häufige und auch gefürchtete intraoperative Komplikation ist der unter Umständen hohe Blutverlust, der in der vaskulären Beschaffenheit des juvenilen Angiofibroms begründet liegt. Daher werden präoperativ beidseits die Stromgebiete der A. carotis externa, der A. carotis interna und die A. vertebralis angiographisch dargestellt, um somit eine bessere Beurteilung und Planung des operativen Vorgehens zu ermöglichen. Während ausgedehnte Tumore zudem über Gefäße wie die A. pharyngea ascendens versorgt werden, beschränkt sich die Versorgung bei kleineren und im Frühstadium befindlichen Tumoren meist auf die A. sphenopalatina oder die A. maxillaris (Schick et al., 2000). Ziel einer Embolisation sind meist die A. pharyngea ascendens und die A. sphenopalatina. Durch eine Embolisation kann der Blutverlust und somit die operationsbedingte Morbidität wesentlich verringert werden (Fagan et al., 1997; Giavrogrou et al., 2007).

Einige wenige Autoren lehnen eine solche präoperative Embolisation jedoch ab. Argumentiert wird mit der Gefahr einer unvollständigen Tumorresektion, da Residualgewebe durch die starke Blutungsneigung besser erkannt und somit entfernt werden könne (Lloyd et al., 1999). Ebenso gehen McCombe und Mitarbeiter (1990) von einer durch die Embolisation bedingten Verkleinerung des Tumorgewebes aus, was ihrer Meinung nach die operative Entfernung erschweren könnte. Durch intraoperativ bereits durchzuführende Schnellschnittuntersuchungen und fortschrittliche radiologische Diagnostik sollte dieses Argument jedoch kritisch hinterfragt

werden, da beide Elemente die Erkennung der Tumorausdehnung unterstützen. Dementsprechend wird die präoperative Embolisation trotz der Tatsache, dass die bisher überwiegend retrospektiven Untersuchungen keine abschließende Aussage gestatten, von der Mehrheit der Autoren empfohlen (Schick et al., 2000; Nicolai et al., 2003). Ferner kann die Durchführung einer Ballontestokklusion der A. carotis interna vor der Tumorentfernung bei sehr ausgedehnten Tumoren sinnvoll sein, um eventuell neurologische Folgen durch eine cerebrale Minderversorgung präoperativ zu erkennen (Zhang et al., 1998).

Die präoperative Eigenblutspende, intraoperative Hämodilution und die Rücktransfusion von durch die Cell Saver-Technik aufbereiteten Eigenblutes können zu einer Vermeidung autologer Bluttransfusionen beitragen (Bell et al., 1992). Eine weitere Möglichkeit zur Vermeidung einer Bluttransfusion ist die präoperative Gabe von rekombinantem Erythropoetin, um bereits im Vorfeld einer Operation einen erhöhten Hämotokrit und somit eine eigene „Erythrozyten-Reserve“ zu schaffen (Goodnough, 1994).

Die Wahl des operativen Zugangsweges hängt von der Lokalisation des Tumors, seiner Ausdehnung, seiner Vaskularisierung und der Möglichkeit einer präoperativen Embolisierung ab. Die am häufigsten gewählten Zugangswege sind zum einen der transnasale Zugang, der Zugang über Midfacial Degloving und die laterale Rhinotomie, wobei der endoskopisch-transnasale Zugang als der atraumatischste angesehen werden kann, bei dem der noch im Wachstum befindliche Knochen der meist jungen Patienten geschont wird (Schick et al., 1997, Mann et al., 2004). Verschiedene Zentren haben belegen können, dass auch mit dieser Methode eine vollständige Resektion möglich ist, wenn der Tumor auf den Nasopharynx, die Nasenhaupthöhle, die Keilbeinhöhle, die Fossa pterygopalatina und die Fossa infratemporalis begrenzt ist (Schick et al., 1999; Nicolai et al., 2011).

Sowohl transnasal als auch nach Midfacial Degloving gelingt eine hervorragende Darstellung von Tumoren im Bereich der Fossa pterygopalatina und der Fossa infratemporalis. Tumoranteile die im Bereich des Sinus cavernosus und der A. carotis interna liegen, lassen sich über diesen Zugangsweg erreichen und häufig entfernen.

De Mello-Filho und Mitarbeiter (2004) favorisierten eine Le Fort 1 Osteotomie. So konnten sie in 19 Fällen, in denen dieser Zugangsweg gewählt wurde, über einen Zeitraum von im Schnitt 9,7 Jahren nicht einen Rezidiv-Fall erfassen bei einer ebenso äußerst geringen Komplikationsrate. Hierbei muss jedoch festgehalten werden, dass keine Angaben über das vorliegende Stadium sondern lediglich über die Ausdehnung der Tumore in der genannten Studie vorliegen.

Der älteste Zugangsweg zur Resektion eines Angiofibroms stellt die laterale Rhinotomie dar. Aufgrund der auftretenden Narbenbildung hat dieser Zugangsweg in der heutigen Zeit jedoch an Bedeutung verloren und kommt immer seltener zur Anwendung (Schick et al., 1999).

Einen mikrochirurgischen Zugang zur Schädelbasis erlaubt der infratemporale Zugang über die Fossa infratemporalis, der für große Tumoren mit Ausdehnung in die Fossa infratemporalis und mit Befall der mittleren Schädelbasis und des lateralen Teils des Sinus cavernosus vorgeschlagen wurde (Andrews J.C., 1999). Da über diesen Zugang die Ursprungsregion eines Angiofibroms nur eingeschränkt erreicht werden kann, ist dieser Zugang bei den positiven Erfahrungen der endonasalen Chirurgie nicht mehr zu empfehlen.

2.1.5 Histologie

Ein typisches histomorphologisches Merkmal des juvenilen Angiofibroms sind seine irregulär mit Endothel ausgekleideten Gefäßspalten, die in ein bindegewebiges Stroma eingebettet sind (Beham et al., 1993) (Abb.2.1.c). Beham und Mitarbeiter (1997) untersuchten diese Stromazellen und beschrieben sie aufgrund ihrer Beschaffenheit und der Expression von Vimentin als fibroblastische Zellen. In welchem Verhältnis Endothelspalten zu Stromazellen stehen, unterscheidet sich von Tumor zu Tumor. Je nach vorherrschendem Gewebe spricht man von einem Bindegewebs-, einem Gefäß- oder einem Mischtyp. Größe und Beschaffenheit der Gefäße sind durch den gesamten Tumor hindurch inhomogen, so dass es unmöglich ist, innerhalb eines Tumors identische Areale zu entdecken (Harrison, 1987; Schick et al. 2007). Trotz ihrer irregulären Anordnung sind all diese Gefäße, unabhängig von ihrer Größe oder Beschaffenheit mit einer durchgehenden Endothelzellschicht bedeckt. Diese Endothelzellen unterscheiden sich dabei in ihren immunphänotypischen Eigenschaften nicht von andernorts vorkommenden Endothelzellen. Beham und Mitarbeiter (2000) zeigten in immunhistochemischen Untersuchungen auch, dass es innerhalb des Tumors sehr viele kleine Gefäße bzw. Kapillaren gibt, denen Perizyten gänzlich oder zumindest teilweise fehlen. Zum anderen bewirken Perizyten eine Reduktion der Proliferation von Endothelzellen und vermindern im gleichen Sinn die Abhängigkeit bzw. den Einfluss von VEGF auf die Zellen. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass in den Endothelspalten in vielen Fällen eine glatte Muskelzellschicht gänzlich fehlt (Beham et al., 2000). Hierdurch fehlt die Möglichkeit zur Kontraktion und damit auch ein entscheidender Faktor der Blutstillung, wodurch sich die starke Blutungsneigung dieses Tumors erklären lässt (Nicolai et al., 2011). Ebenso stellten Wang und Mitarbeiter (1994) eine fehlende sympathische Innervation innerhalb des Tumorgewebes fest, woraus ebenfalls eine fehlende Kontraktionsfähigkeit der Gefäße resultieren kann.

Wendler und Mitarbeiter (2007) konnten in juvenilen Angiofibromen eine sehr hohe Anzahl an Mastzellen und T-Lymphozyten nachweisen, welche in der Summe 30 % der untersuchten

Zellen ausmachten. In vereinzelt Tumorearealen machten diese beiden Zelltypen bis zu 90 % der dort vorkommenden Zellen aus.

Von großem Interesse ist in diesem Zusammenhang nicht nur die Rolle von Mastzellen bei der Regulation von Immunreaktionen sondern vor allem auch ihre Bedeutung für die Neoangiogenese. So produzieren Mastzellen eine Reihe von proangiogenetischen Faktoren wie VEGF und bFGF, aber auch zahlreiche proteolytisch wirksame Enzyme, welche durch ihre Fähigkeit zur Degradation erst den Platz für eine Neovaskularisation schaffen.

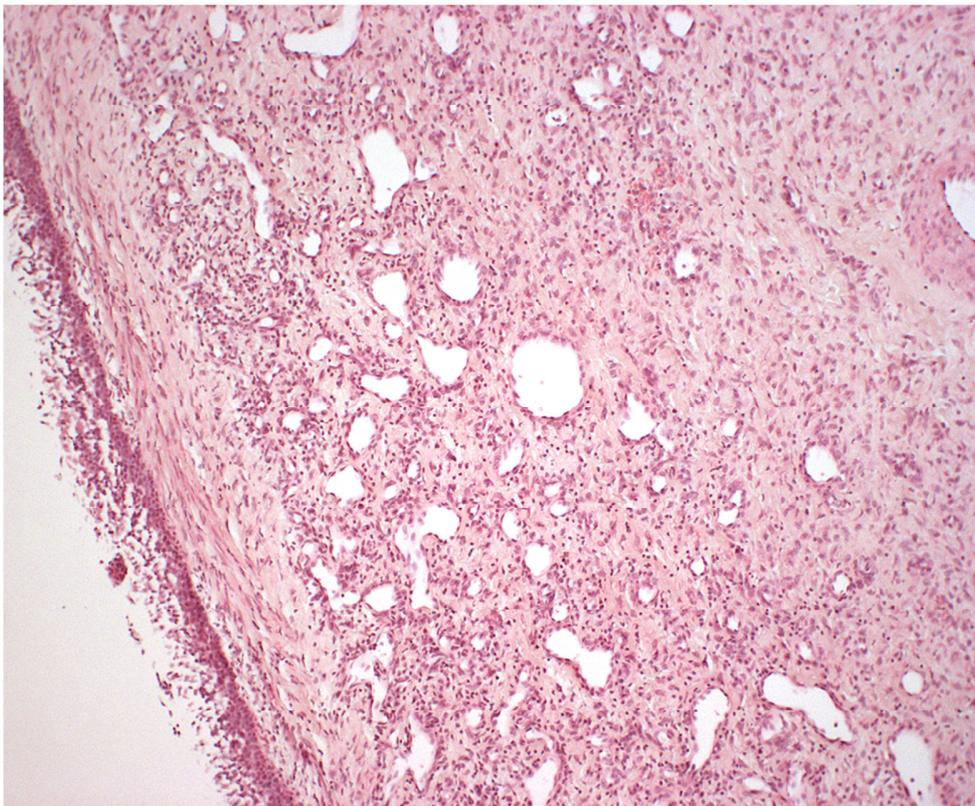


Abb. 2.1.c: Paraffinschnitt eines juvenilen Angiofibroms (Fall AF 896), HE-Färbung,10-fache Vergrößerung.

2.1.6 Ätiologie

Die Unklarheit bezüglich der Entstehung des juvenilen Angiofibroms lässt sich an der Vielzahl unterschiedlichster Theorien festmachen. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts verfolgte man die Theorie, dieser Tumor entstünde aus Periostschichten bzw. embryonalem Knorpelgewebe der Schädelbasis im Nasenrachenabschnitt (Nélaton, 1853; Verneuil, 1861; Tillaux 1878). Brunner und Mitarbeiter beschrieben 1942 erstmals die vaskuläre Komponente ausgehend von endothelial ausgekleideten Spalten. Diese vaskuläre Entstehungstheorie spiegelt sich auch in

der Einordnung als Hämangiom und der Theorie, es handle sich um ektopes, versprengtes Gefäßgewebe wider (Sternberg, 1954; Hubbard, 1958; Schiff, 1959). Osborne (1959) klassifizierte das Angiofibrom als vaskuläre Neoplasie und wertete die Fibrose in der Umgebung der Gefäße als Resultat von Einblutungen. Auch wurde der Einfluss von Hormonen von vielen Seiten diskutiert. Dane und Mitarbeiter (1954) postulierten erstmals einen Androgenüberschuß als Grundlage der Angiofibromentstehung. Aber auch Erklärungsansätze wie z. B. die Einordnung als Hamatom, dessen Ursprung versprengtes Schwellkörpergewebe sei, als Teratom oder als pathologische Gefäßreaktion wurden diskutiert (Maurice M., 1981; Farag, 1987; Liang, 2000).

In jüngster Zeit wurden Erklärungsansätze postuliert, die einen embryologischen Atavismus als Grundlage der Entstehung eines juvenilen Angiofibroms zu Grunde legen. Beham und Mitarbeiter werteten das Angiofibrom dabei als Gefäßmalformation (Beham et al., 2000). Der Verlust der sympathischen Innervation, das Vorliegen irregulärer Muskelzellen und deren irreguläre Anordnungen bestärken die Annahme, dass es sich dabei um eine vaskuläre Fehlbildung handelt. Schick und Mitarbeiter (2002) suchten die Erklärung für diese Fehlbildung in der embryologischen Entwicklung der Kopfgefäße. Grundlage dieser Theorie ist die unvollständige Rückbildung der zwischen dem 22. und 24. Tag entstehenden ersten Pharyngealbogenarterie in Form von zurückbleibenden Plexusresten am Foramen sphenopalatinum. Die erste Pharyngealbogenarterie bildet pränatal eine Verbindung zwischen dem späteren Gebiet der A. maxillaris und der A. carotis interna. Bei der Rückentwicklung dieser Verbindung über die Bildung eines Gefäßplexus werden Bestandteile in die Bildung der A. maxillaris einbezogen (s. Abb. 2.1.d).

Durch diese Annahme konnte erstmals die typische Lokalisation des juvenilen Angiofibroms so wie auch dessen charakteristische Vaskularisation zufriedenstellend erklärt werden. Vielfältige embryonale Marker konnten in der Folge im JA detektiert werden (u.a. Laminin $\alpha 2$, TSHZ1), so dass der embryonale Ursprung des Tumors durch verschiedene molekularpathologische Befunde gestützt wird (Schick et al., 2011).

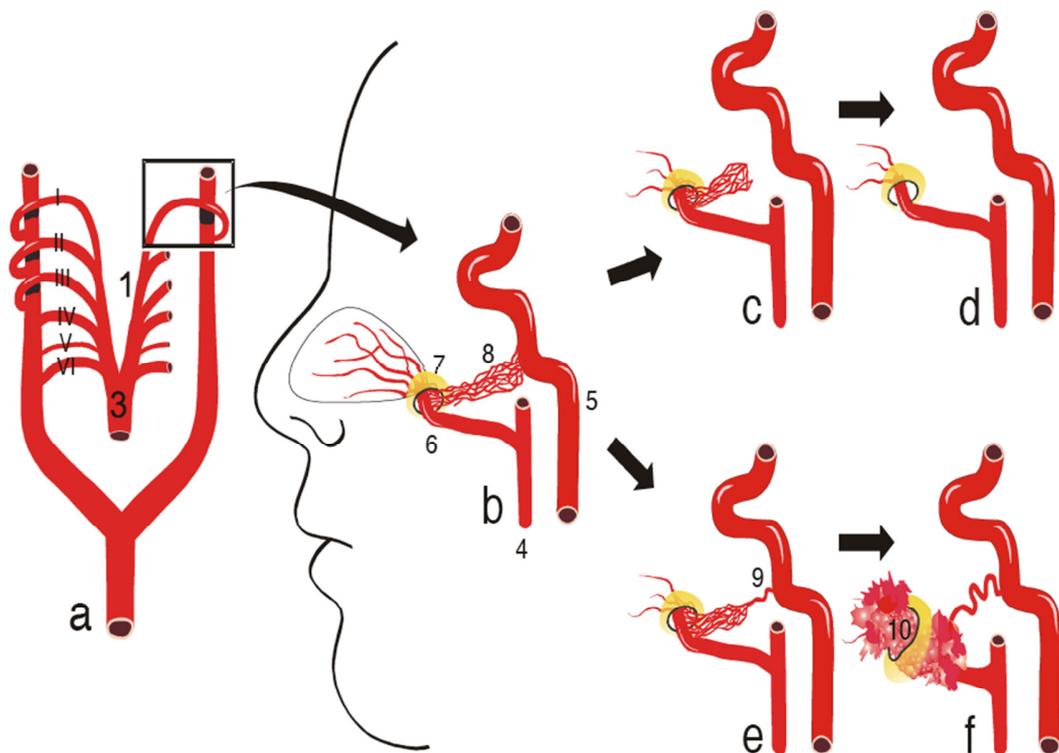


Abb. 2.1.d: Reguläre Entwicklung und Rückbildung der ersten Pharyngealarterie nach Schick und Mitarbeiter (2000): Die Abbildungen a bis d stellen die reguläre Rückbildung der 1. Pharyngealbogenarterie dar, wohingegen die Abbildungen e bis f die Entwicklung eines Angiofibroms aus Plexusresten der 1. Pharyngealbogenarterie verdeutlichen. (1: ventrale Aorta, 3: Aufzweigung der ventralen Aorta, 4: A. carotis externa, 5: A. carotis interna, 6: A. sphenopalatina, 7: Foramen sphenopalatinum, 8: Plexusreste, 9: Plexusverbindung zur A. carotis interna, 10: Angiofibrom)

2.1.7 β -Catenin und der WNT-Signalweg

Ein wichtiger Faktor in der Kontrolle der fetalen Entwicklung im Sinne der Regulation des Zellwachstums sowie verschiedener Differenzierungsprozesse wie auch der Gewebshomöostase stellt der WNT-Signalweg dar (Logan und Nusse, 2004). Veränderungen im Sinne von Mutationen dieses Signalwegs können zu verschiedenen Fehlbildungen sowie unterschiedlichen Krebserkrankungen führen (Clevers, 2006). Einer der Haupteffektoren innerhalb dieses Signalwegs ist das β -Catenin (Fodde et al. 2001, Fodde, 2003). Neben dieser Funktion ist es als Strukturprotein ebenfalls entscheidend für die Zellintegrität als Komponente von „adherens junctions“. Hierbei verbindet es das Adhäsionsprotein E-Cadherin mit α -Catenin und stellt somit eine Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett her (Nagafuchi et al., 1989; Gumbiner et al., 1993). Mutationen von β -Catenin wurden in verschiedensten soliden Tumoren wie

beispielsweise kolorektalen und hepatozellulären Karzinomen, Tumoren der Haut, der Prostata und auch in 75 % aller untersuchten juvenilen Angiofibromen nachgewiesen (Fukuchi et al., 1998; Miyochi et al., 1998; Voeller et al., 1998; Chan et al., 1999, Abraham et al., 2001). Welche Bedeutung diese Veränderungen jedoch in der Pathogenese des juvenilen Angiofibroms haben, muss noch abschliessend geklärt werden.

2.1.8 Weitere genetische Veränderungen

Aufgrund der Tatsache, dass Tumore in vielen Fällen auf der Grundlage genetischer Veränderungen entstehen, macht einen Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe bezogen auf eine solche Veränderung sinnvoll. Dabei zeigten Untersuchungen, welche anfänglich mit Hilfe der CGH durchgeführt wurden, erstmals eine sehr große Anzahl verschiedener chromosomaler Aberrationen in juvenilen Angiofibromen. Schick und Mitarbeiter (2002) konnten in einer ersten Untersuchung in zwei von drei untersuchten Angiofibromen Gewinne des X-Chromosoms und Verluste des Y-Chromosoms nachweisen. In den drei untersuchten Proben konnte gleichsam ein Gewinn der Region 8q12-q22 festgestellt werden. Ferner konnten Gewinne auf 4q, 5p, 6q, 7q, 12q, 13q, 14q, 18q, 21q sowie Verluste von 17, 19p und 22q nachgewiesen werden. In weiterführenden CGH-Untersuchungen von 7 bzw. 29 weiteren Tumorproben konnte die große Anzahl chromosomaler Aberrationen bestätigt werden (Brunner 2003, Schick 2007). Dabei konnten Schick und Mitarbeiter (2007) nachweisen, dass Gewinne am häufigsten im Bereich der Chromosomen 4q, 6, 12 und X sowie Verluste auf den Chromosomen 8, 16, 17, 22 und Y liegen. Viele der hierbei identifizierten Regionen konnten darüber hinaus auch mittels genomischen DNA-Array-Untersuchungen von zwei juvenilen Angiofibromen in ihrer Studie bestätigt werden.

In einer weiteren CGH-Studie an 22 Formalin-fixierten Geweben konnten ebenfalls zahlreiche Gewinne (1p, 9q, 10q, 12q, 16, 17q, 19, 20q, 22q) sowie eine Vielzahl von Veränderungen der Geschlechtschromosomen nachgewiesen werden (Heinrich et al., 2007). Im Gegensatz zu den Befunden von Schick und Mitarbeitern (2007) wurde in dieser Arbeit jedoch nur bei einem Tumor auch ein Verlust auf Chromosom 4 detektiert.

Mit FISH-Analysen an Paraffinschnitten konnten die in der CGH beobachteten Veränderungen der Geschlechtschromosomen bestätigt werden (Schick et al., 2003). Dabei kamen zentromerspezifische Sonden für die Chromosomen X und Y sowie für das auf dem X-Chromosom lokalisierten Androgenrezeptor-Gen zum Einsatz. Es konnte in 6 von 7 Angiofibromen ein Verlust des Y Chromosoms, sowie in 5 von 7 Fällen ein Gewinn des X-Chromosoms beobachtet werden. Die Gewinne des X-Chromosoms gingen gleichsam mit

Zugewinnen des Androgenrezeptorsignals einher. Amplifikationen des Androgenrezeptors wurden nicht nachgewiesen.

In weiteren Untersuchungen konnten Schick und Mitarbeiter (Schick et al., 2011) eine signifikante Hochregulation der beiden Transkripte BORIS (brother of the regulator of imprinted sites) sowie TSHZ1 (teashirt zinc finger homebox 1) mittels *single nucleotide polymorphism (SNP) microarrays* nachweisen. BORIS gehört dabei zu den Cancer-Testis Antigenen (CTA), welche eine Gruppe von Proteinen darstellt, die in einer Vielzahl von soliden Tumoren, nicht jedoch in normalem gesunden Gewebe, vorkommt - der Hoden sowie die Placenta ausgenommen (Klenova et al., 2002). In ersten Untersuchungen konnten verschiedene Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Modellen bereits einen positiven Effekt auf das Tumorstadium im Sinne einer Vaccination erreichen (Loukinov et al., 2006; Mkrtichyan et al., 2008), so dass dieses als Angriffspunkt für eine Immuntherapie gesehen wird (de Necochea Campion et al., 2011). Dem gegenüber spielt das Protein TSHZ1 eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Entwicklungsprozessen und deren Regulation - so unter anderem bei der Entstehung der ersten Pharyngealbogenarterie (Long et al., 2001). Die von Schick und Mitarbeitern (2011) nachgewiesene Amplifikation von TSHZ1 in juvenilen Angiofibromen liefert somit einen weiteren Erklärungsansatz für die Hypothese, dass es sich bei diesem Tumor um eine vaskuläre Malformation der ersten Pharyngealbogenarterie handelt.

2.1.9 Der Einfluss von Hormonen und Wachstumsfaktoren sowie deren therapeutischer Nutzen

Sexualhormone

Aufgrund der Tatsache, dass das juvenile Angiofibrom beinahe ausschließlich bei männlichen Jugendlichen in Beziehung zur Pubertät auftritt, setzte man den Fokus des Forschungsinteresses auf Untersuchungen bezüglich Veränderungen innerhalb der Sexualhormon-Regelkreise. Dabei standen die Androgen-, Progesteron- und Östrogen-Regelkreisläufe im Mittelpunkt der Untersuchungen. Jedoch konnten weder Farag und Mitarbeiter (1987) noch Hagen und Mitarbeiter (1991) bei Untersuchungen der Serumwerte unterschiedlichster Sexualhormone Abweichungen derer von den Standardwerten nachweisen. Auch in einer Untersuchung von 322 Patienten mit der Diagnose eines juvenilen Angiofibroms wurden keinerlei Abweichungen gezeigt, die auf eine Störung der Synthese von Sexualhormonen hindeuten (Acuna, 1981). Dementsprechend rückten viele Autoren ihr Interesse auf die Expression der unterschiedlichen Sexualhormon-Rezeptoren.

Bei Untersuchungen bezüglich des Einsatzes einer präoperativen Östrogentherapie gibt es widersprüchliche Beobachtungen. So konnte sowohl eine Reduktion des intraoperativen Blutverlustes (Küttner, 1977) als auch eine Vergrößerung des Tumors beobachtet werden (Hulthen, 1976). In einzelnen Studien konnte keine Expression von Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden (Johns et al., 1980; Liang et al., 2000). Aufgrund des Fehlens dieser Rezeptoren führte Johns (1980) die Wirkung von therapeutisch gegebenen Östrogenen, welches nach Aussage verschiedener Autoren eine Verkleinerung der Tumormasse bewirkt (Martin et al., 1948; Schiff et al., 1959) auf eine negative Rückkopplung der Östrogen-Testosteron-Regelkreisläufe zurück, woraus eine Verminderung der endogenen Testosteron-Ausschüttung resultierte. Montag und Mitarbeiter (2006) untersuchten die beiden Isoformen α und β des Östrogenrezeptors und kamen dabei zu einem interessanten Befund. So gelang ihnen in keinem der 13 untersuchten Fälle der Nachweis des Östrogenrezeptor- α , jedoch konnten sie in jedem Fall den Östrogenrezeptor- β nachweisen. Aufgrund dieser Tatsache wäre ihrer Meinung nach die direkte Beeinflussung des Tumorwachstums über Östrogen möglich. In diesem Zusammenhang untersuchten Schlauder und Mitarbeiter (2009) fünf juvenile Angiofibrome auf das Vorliegen des Enzyms Aromatase und konnten diese auch nachweisen. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Androgenen in Estrogene also auch von Testosteron in Östrogen. Über diesen Mechanismus könnte in juvenilen Angiofibromen die Konzentration von Östrogen lokal gesteigert und über diesen Mechanismus ein Einfluss auf das Tumorwachstum ausgeübt werden.

In Bezug auf die Auswirkungen von Testosteron auf das Tumorwachstum beschrieben Sterling und Mitarbeiter (2009) die Entstehung eines Rezidivs unter der exogenen Gabe von Testosteron. Der beschriebene Patient entwickelte im Laufe einer Testosteron-Therapie ein Lokalrezidiv eines Tumors, welcher 20 Jahre zuvor mit der Diagnose eines juvenilen Angiofibroms operativ behandelt worden war. Nach Absetzen der Testosterongabe sistierte das Wachstum des Tumors. In der pathologischen Aufarbeitung des operativ entfernten Gewebes bestätigte sich die präoperativ gestellte Verdachtsdiagnose eines juvenilen Angiofibroms.

Zu Untersuchungen bezüglich der Expression des Androgenrezeptors liegen uneinheitliche Ergebnisse vor. So werden Untersuchungen beschrieben, in denen in keinem Fall die Expression dieses Rezeptors nachgewiesen werden konnte (Kumagami et al., 1991). In anderen Studien ist die Rede von bis zu 100% der untersuchten Fälle (Gatalica et al., 1998; Farag et al., 1987; Hagen et al., 1991). So zeigten sowohl Farag und Mitarbeiter (1987) wie auch Hagen und Mitarbeiter (1991) in allen von ihnen untersuchten Fällen den Nachweis des Androgenrezeptors. Hagen und Mitarbeiter (1991) beschrieben die Expression der Rezeptoren als relativ hoch und erklärten damit das klinische Wachstum innerhalb der Pubertät.

Weitere Untersuchungen, die eine hormonelle Grundlage für die Entstehung dieses Tumors voraussetzt, beschäftigten sich mit verschiedenen Ansätzen einer Hormontherapie, welche beispielsweise als neoadjuvante Therapie einzusetzen wäre.

Mehrere Studien befassten sich bereits mit dem Einsatz von Flutamid in der Behandlung des juvenilen Angiofibroms. Flutamid wirkt als partieller nonsteroidaler Androgen-Antagonist und wird beispielsweise in der Therapie des Prostatakarzinoms sowie der benignen Prostatahyperplasie eingesetzt. So konnten in zwei Arbeiten durch die Gabe von Flutamid in jeweils 5 Fällen eine durchschnittliche partielle Tumorreduktion von 7 bzw. 29 % erreicht werden (Gates et al., 1996; Labra et al., 2004). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass sich in diesen Arbeiten sowohl die Therapiedauer als auch die vorliegende Tumorgröße vor der Therapie stark unterschieden und somit diese Divergenz erklären könnte. In einer größer angelegten Studie, in welcher 20 Angiofibrompatienten präoperativ mit Flutamid behandelt wurden, konnte eine durchschnittliche Reduktion des Tumolvolumens um 16,5 % festgestellt werden (Thakar et al., 2011). Dabei fiel auf, dass die maximale Regression bei Patienten erreicht werden konnte, die zum Zeitpunkt der Behandlung bereits postpubertär waren und sich in diesen Fällen eine Volumenverringerung von bis zu 40 % erreichen ließ.

Wachstumsfaktoren

Neben dem Einfluss verschiedener Hormone wird auch eine Imbalance bzw. Fehlregulation verschiedener Wachstumsfaktoren diskutiert. Die Sekretion proangiogenetischer Wachstumsfaktoren stellt eine entscheidende Grundlage für das Wachstumsverhalten und die Bildung von Metastasen vieler Tumoren dar (Gasparini, 2000; Takashi, 1995). Aufgrund des aggressiven Wachstumsverhaltens standen diese Faktoren auch beim juvenilen Angiofibrom früh im Zentrum des Interesses. Dabei wurden VEGF, TGF-beta, bFGF, PDGF-B und IGF-II als erste bezüglich ihres Vorkommens im juvenilen Angiofibrom genauer untersucht. Coutinho-Camillo und Mitarbeiter (2003) zeigten eine Überexpression von Insulin-Like Growth Factor II mRNA in 52 % der von ihnen untersuchten juvenilen Angiofibrome. Dillard und Mitarbeiter (2000) konnten den proangiogenetischen Faktor TGF-beta sowohl im Stroma als auch in den Endothelien von juvenilen Angiofibromen nachweisen. Dabei waren alle der 19 untersuchten juvenilen Angiofibrome positiv für diesen Wachstumsfaktor. Demzufolge stellte für die Autoren eine Blockade des TGF-beta eine Möglichkeit dar, das Tumorwachstum entscheidend einzudämmen. Saylam und Mitarbeiter relativierten diese Ergebnisse jedoch dahingehend, dass sie lediglich in 14 von 27 untersuchten Fällen TGF- β nachweisen konnten (Saylam et al., 2006). In wieweit TGF-beta an der Entstehung des juvenilen Angiofibroms beteiligt ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Des Weiteren konnte in Untersuchungen die Expression von bFGF, einem weiteren wichtigen Faktor der Angiogenese, im Bereich des Endotheliums nachgewiesen werden (Schiff et al., 1992). Eine weitere Untersuchung konnte eine Korrelation zwischen der Gefäßdichte und dem Vorliegen hoher bFGF-Spiegel in Stromazellen juveniler Angiofibrome zeigen (Schuon, 2006).

VEGF

Senger und Mitarbeitern (1983) gelang es erstmals, ein von einem Tumor sezerniertes Protein zu isolieren, welches intradermal injiziert zu einer reversiblen Veränderung der lokalen Gefäßpermeabilität an der Injektionsstelle führte. Dieses Protein bezeichneten sie als „*Vascular Permeability Factor*“ (VPF). 1989 gelang es Ferrera und Mitarbeitern, aus Follikularzellen von bovinen Hypophysenzellen einen Faktor zu gewinnen, der zu einer Proliferation von Endothelzellen führte. Nach der Entschlüsselung der kompletten DNA-Sequenz stellte sich jedoch heraus, dass es sich bei diesen beiden Faktoren um denselben handelte und es setzte sich der Name *vascular endothelial growth factor* (VEGF) durch.

Heute sind aus der VEGF-Familie insgesamt 7 Mitglieder bekannt, die mit VEGF A bis F sowie PlGF bezeichnet werden. Der am besten untersuchte Vertreter stellt dabei das VEGF-A dar, von welchem durch alternatives Spleißen verschiedene Isoformen existieren und dessen Gen auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert ist (Vincenti et al., 1996). Bezeichnet werden diese entsprechend ihrer Anzahl an Aminosäuren als VEGF-A121, 145, 165, 183, 189 und 206, wobei sie grundsätzlich die gleiche Wirkung auf Endothelzellen entfalten, sich aber in ihrer Affinität zur Zelloberfläche unterscheiden (Clark et al., 1998; Neufeld et al., 1999; Simonet et al., 2004).

Gebildet wird VEGF hauptsächlich in Makrophagen, glatten Gefäßmuskelzellen, Myoblasten sowie Fibroblasten (Tischer et al., 1991; Shweiki et al., 1992). Reguliert wird seine Expression durch den Einfluss unterschiedlichster Zytokine und Wachstumsfaktoren, wobei beispielsweise der *Tumor Nekrosis Factor α* sowie der *Fibroblast Growth Factor* die Transkription der mRNA induzieren, während die Zytokine IL-10 und IL-13 die Freisetzung von VEGF hemmen (Neufeld et al., 1999; Deroanne et al., 1997). Neben diesen Regulatoren spielt der Sauerstoffpartialdruck eine entscheidende Rolle bei der Bildung von VEGF. So induziert eine Hypoxie in verschiedenen pathophysiologischen Situationen eine vermehrte Genexpression und geht dadurch mit einer Erhöhung der VEGF Proteinspiegel einher (Shweiki et al., 1992; Marti et al., 1998).

Eine wichtige Funktion von VEGF ist sein Einfluss auf die spezifische Teilung und Migration von Gefäßendothelzellen und gilt daher als hochaffiner Wachstumsfaktor für die Gefäßneubildung, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser Einfluss relativ endothelzellspezifisch ist (Connolly et al., 1989; Ferrara et al., 1997). Aufgrund dieser Wirkung auf Endothelzellen hat VEGF somit

auch einen entscheidenden Anteil an einer effektiven Wundheilung (Brown et al., 1992). Des Weiteren beeinflusst VEGF in erheblichem Maße die lokale Gefäßpermeabilität. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Austritt von Plasmaflüssigkeit in den extravasalen Raum, woraus ein Ödem resultiert. Hierbei ist die permeabilitätssteigernde Wirkung von VEGF um das 50000-fache stärker als die des Histamins (Senger et al., 1990). Dieser Einfluss ist dabei beispielsweise im Rahmen des hypoxischen Lungenödems (Kosmidou et al., 2008) oder des ischämisch induzierten Hirnödems (Schoch et al., 2002) bedeutend.

Zur Signaltransduktion bindet VEGF über Rezeptoren der Tyrosinkinase-Familie, die Fms Like Tyrosine Kinase-1 (Flt-1, VEGFR-1) und den *Kinase Insert Domain Receptor* (VEGFR-2) (Ferrara et al., 2001). Hierbei stellt der VEGFR2 den hauptsächlichen Rezeptor zur Induktion der Angiogenese und Mitogenese von Endothelzellen dar, wobei eine Erhöhung der Permeabilität, Migration und Proliferation im Vordergrund stehen (Zou et al., 2011; siehe Abb. 2.1.e).

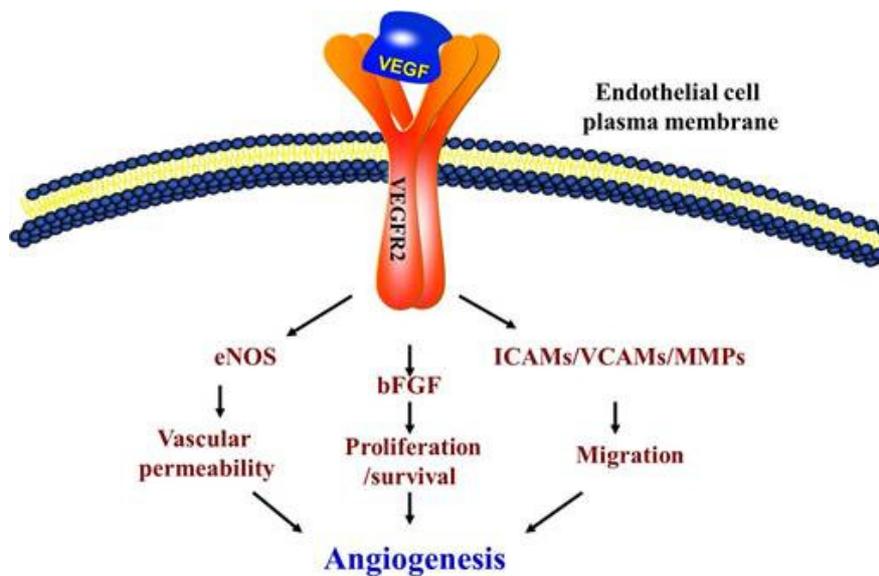


Abb. 2.1.e: Schematische Darstellung des VEGF-Signalwegs. VEGFR2 stellt dabei den hauptsächlichen Rezeptor zur Induktion der Angiogenese und Mitogenese von Endothelzellen dar (aus Zou et al., 2011).

Brieger und Mitarbeiter (2004) konnten bei Untersuchungen von acht Tumoren in 87 % der Fälle sowohl im Stroma wie auch in den Endothelzellen von juvenilen Angiofibromen VEGF nachweisen. Dabei hing die Vaskularisierung und damit auch die Dichte der gemessenen Gefäße entscheidend vom Vorliegen des VEGF ab, so dass Areale mit einer geringen VEGF-Expression gleichsam mit einer geringeren Gefäßdichte einhergingen. Keine Korrelation konnte

dabei zwischen dem Vorliegen bzw. der quantitativen Überexpression von VEGF und der Tumorgroße oder dessen Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden. Die VEGF-Expression kann somit nicht als prognostischer Faktor hinzugezogen werden. Saylam und Mitarbeiter (2006) konnten diese hohe Zahl VEGF-positiver Zellen auch an einer größeren Anzahl von Tumoren bestätigen und zeigten in 24 von 27 (88 %) der untersuchten Fällen eine Expression von VEGF.

Diesen auch für die Tumorangiogenese essentiellen Signalweg in Form einer Inhibition zu beeinflussen stellt nun einen neuen Therapieansatz dar. Da Tumore als Neubildung von Gewebe primär keinen Anschluss an das Gefäßsystem haben, ist es für ihr Wachstum von entscheidender Bedeutung, dass es zu einem Einsproßen von Kapillaren und somit einer Vaskularisierung mit einer verbesserten Nutrition kommt. Diese Initiierung der notwendigen Angiogenese wird als *Angiogenic switch* bezeichnet. Hierauf haben verschiedene proangiogene Zytokine einen entscheidenden Einfluss. Diese werden durch Hypoxie, eine Veränderung des pH-Wertes oder eines verminderten Glucose-Gehaltes der Tumorzellen, aber auch durch andere in der Umgebung vorhandene Zellen vermehrt gebildet und ausgeschüttet. Durch die Beeinflussung von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen kommt es dann zur gesteigerten Expression proangiogener Faktoren wie beispielsweise VEGF. Hierdurch verschiebt sich schließlich das Verhältnis von angiogenen zu antiangiogenen Faktoren zugunsten der Angiogenese.

Um nun diesem Ungleichgewicht entgegenzuwirken, wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Antikörper entwickelt, die gegen VEGF, seine Rezeptoren oder verschiedene intrazelluläre Mediatoren gerichtet sind. Seit 2005 ist der humanisierte murine monoklonale Antikörper Bevacizumab (*Avastin*®, *Hoffman-La Roche, CH*) erhältlich, welcher eine Affinität für alle VEGF-A Rezeptoren besitzt und bereits erfolgreich in Kombination mit weiteren Chemotherapeutika zur Behandlung unterschiedlicher onkologischer Erkrankungen eingesetzt wird. So wurde der Wirkstoff von der *Food and Drug* (FDA) 2004 erstmalig für die Therapie des kolorektalen Karzinoms zugelassen (Kabbinavar et al., 2003; Hurwitz et al., 2004). Ein weiteres Einsatzgebiet von Bevacizumab ist die Therapie des diabetischen Makulaödems (Aravelo et al., 2009).

Neben der spezifischen Blockade von VEGF oder deren Rezeptoren rückte im Jahr 2008 ein weiteres Medikament in den Fokus des Forschungsinteresses. So zeigte Léaute-Labreze erstmals die Wirksamkeit des nichtselektiven β -Blockers Propranolol in der Therapie des juvenilen Hämangioms (Léaute-Labreze et al., 2008). Die Entdeckung der Wirksamkeit erfolgte dabei eher zufällig, als ein Säugling aufgrund eines Hämangioms im Bereich der Nase nach

geltenden Leitlinien mit Cortison behandelt wurde. Im Verlauf der Therapie entwickelte das Kind eine obstruktive hypertrophische Kardiomyopathie und musste daher mit dem unselektiven β -Blocker Propranolol behandelt werden. Bereits am ersten Tag nach Beginn der Therapie konnte eine Veränderung des Hautbefundes in Form einer Farbabblassung beobachtet werden. Diese Besserung hielt auch nach Beendigung der Propranolol-Therapie an und das Hämangiom bildete sich im Verlauf fast vollständig zurück. Im Folgenden wurden weitere Kinder mit verschiedenen Ausprägungen juveniler Hämangiome in einem „*Off Label Use*“ mit Propranolol behandelt und es konnte bei allen bereits nach kurzer Therapiedauer einer Veränderung sowohl der Farbe, wie auch der Textur sowie in der Hälfte der Fälle eine komplette Regression der Befunde innerhalb von 6 Monaten beobachtet werden. Durch welchen Wirkmechanismus Propranolol Einfluss auf das Wachstum von Hämangiomen nimmt ist bis heute nicht abschließend geklärt. Léauté-Labrèze und Mitarbeiter (2008) führten eine durch das Pharmakon hervorgerufene Vasokonstriktion an, welche auch die rasche Farb- und Konsistenzveränderung erklären könnte. Weitere Erklärungen sind die durch den β -Blocker induzierte Apoptose von Endothelzellen oder der Einfluss auf die Genexpression von VEGF (D'Angelo et al., 1997; Sommers et al., 2002; Lamy et al., 2010; Hajighasemi et al., 2010).

Die beobachtete Regression von Hämangiomen nach der Gabe von Propranolol führte dazu, dass sich im Verlauf der letzten Jahre die Strategien in der Behandlung deutlich gewandelt haben. So werden Kinder mit einer solchen Erkrankung zunehmend mit Propranolol behandelt, wobei die bis dahin als Standard geltende Behandlung mit Cortison zunehmend in den Hintergrund tritt. Als allgemeine Nebenwirkungen einer Propranolol Therapie gelten Hypoglykämie, Herzrhythmusstörungen, Hypotension und eine Atemwegsobstruktion (Karow et al., 2007). Bei der Therapie von Hämangiomen wurde bisher über Hypoglykämien sowie Hypotensionen und in einem Fall von einer Atemwegsobstruktion berichtet (Sans et al., 2009; Bonifazi et al., 2010). Als nicht selektiver β -Blocker blockiert Propranolol neben den β 1-Rezeptoren von Herz, Niere und Fettgewebe auch die β 2-Rezeptoren der glatten Muskulatur von Bronchien, Gefäßen und dem Pankreas. Aufgrund des Einflusses von Propranolol auf VEGF und in Anbetracht der Hypothese, das JA stelle verglichen mit einem Hämangiom ebenfalls eine vaskuläre Malformation dar, ist der Einsatz von Propranolol als therapeutische bzw. neoadjuvante Therapieoption in der Agiofibrombehandlung zu diskutieren.

2.2 Humane Mesenchymale Stromazellen (hMSC)

Der Begriff der Stammzelle folgt in der Literatur keiner einheitlichen Definition. Allen Beschreibungen ist jedoch die Tatsache gemein, dass diese Zellen sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung in mehr als eine spezialisierte Zellart besitzen.

Man unterscheidet dabei

1. omnipotente embryonale Stammzellen, die das Potential besitzen, sich in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren,
2. pluripotente embryonale Stammzellen, die sich zu fast allen Zellen der drei Keimblätter differenzieren können und
3. multipotente adulte Stammzellen, welche als undifferenzierte Zellen in bereits differenzierten Geweben vorkommen.

Die adulten Stammzellen dienen dabei der Gewebshomöostase und können sich zwar in viele unterschiedliche Zellarten des Körpers differenzieren, jedoch nicht mehr in alle. Vielmehr sollen sie die unterschiedlichen Zellen eines Gewebes, welche einem vermehrten Zellumsatz unterliegen, ersetzen.

Die bekannteste Gruppe der adulten Stammzellen bilden dabei die hämatopoetischen Stammzellen. Diese primär im Knochenmark vorkommenden Zellen sind der Ausgangspunkt für die zeitlebens andauernde Zellneubildung des Blut- sowie Immunsystems. Eine weitere Zellgruppe der adulten Stammzellen stellen die mesenchymalen Stammzellen dar, welche auch als mesenchymale Stromazellen bezeichnet werden. Der Begriff der mesenchymalen Stammzellen wurde bereits 1968 für Zellen im Knochenmark beschrieben, welche die Fähigkeit besaßen, sich in osteogenes Gewebe zu differenzieren (Friedenstein et al. 1968). Mesenchymale Stammzellen können dabei als multipotent bezeichnet werden, da sie, im Vergleich zu omnipotenten Zellen nicht mehr die Fähigkeit besitzen, sich in alle Gewebe- und Zellarten zu differenzieren. In Abbildung 2.2. sind schematisch verschiedene Differenzierungsmöglichkeiten einer mesenchymalen Stammzelle in den entsprechenden Phänotyp dargestellt.

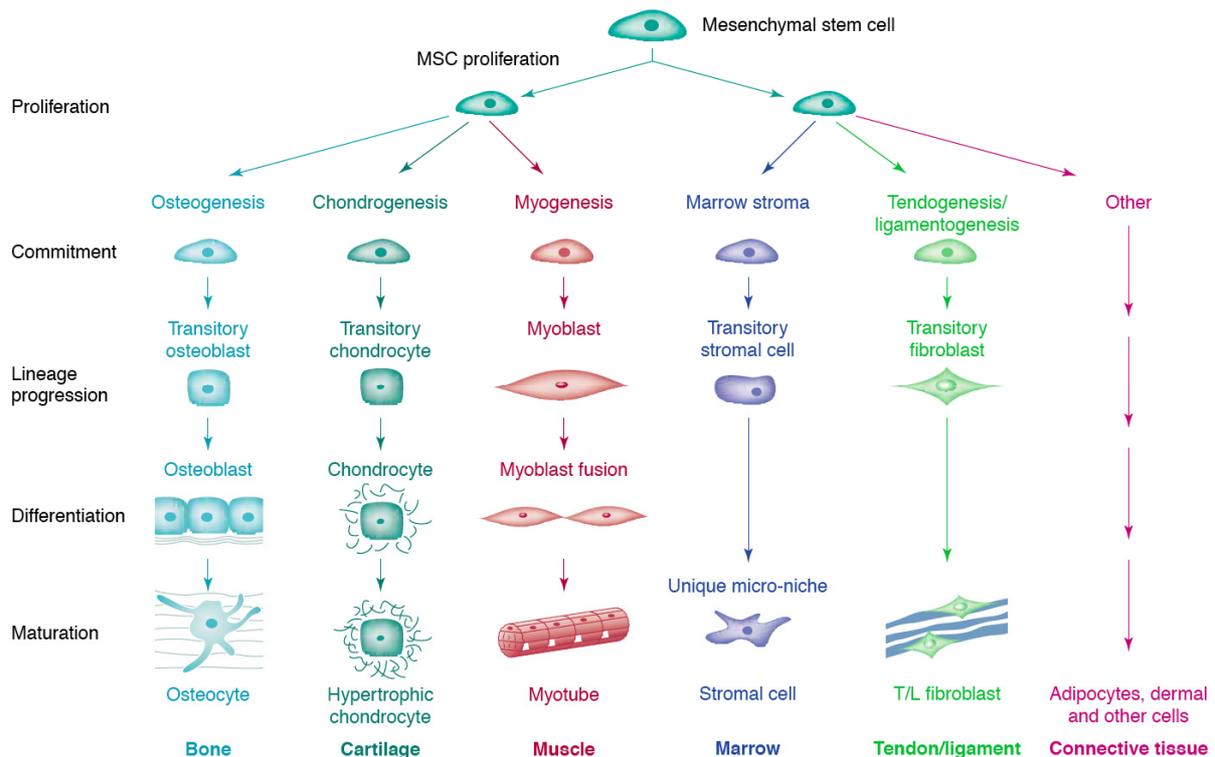


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Differenzierungswege einer mesenchymalen Stammzelle in das entsprechend phänotypische Gewebe. Hierbei sind die am besten untersuchten Wege von links nach rechts dargestellt (nach Caplan et al., 2001).

Ein spezifischer Marker oder eine eindeutige Kombination von Markermustern zur Identifizierung von mesenchymalen Stammzellen ist bis heute nicht bekannt. Laut Konsens müssen zur Charakterisierung als MSC und damit zur Abgrenzung der ebenfalls im Knochenmark befindlichen hämatopoetischen Stammzellen die Zellen zum einen positiv für CD105, CD73 und CD90 sowie negativ für CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR sein. Des Weiteren müssen sie adhären auf Plastik sein und in einer in vitro Zellkultur ein Differenzierungspotential besitzen (Dominici et al., 2006). Dabei lassen sie sich in vitro in Zellen des mesenchymalen Gewebes wie Fettzellen, Knorpel, Knochen, Sehnen, Muskeln und Endothelzellen differenzieren (Pittenger et al., 1999; Janeczek Portalska et al., 2012). Einen Einfluss auf diese Differenzierung haben dabei u. a. das Nährstoffangebot, das Vorhandensein verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine, aber auch die Zelldichte sowie die mechanische Beanspruchung. So konnte gezeigt werden, dass MSC einen Beitrag zur Regeneration von myokardialen Schäden leisten, indem sie in das geschädigte Areal einwandern und sich dann zu glatten Muskel- bzw. Endothelzellen differenzieren, welche die funktionslosen Zellen ersetzen (Silva et al., 2005). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich MSC

unter dem Einfluss von VEGF in Endothelzellen differenzieren lassen (Oswald et al., 2004). Schichor und Mitarbeiter (2006) wiesen zusätzlich eine ausgeprägte Expression des VEGF-2-Rezeptors auf mesenchymale Stammzellen nach. Neben der Bedeutung von VEGF für die Differenzierung von MSC spielt dieses Zytokin ebenfalls eine Rolle für die Migration der Zellen zum eigentlichen Wirkort. So beschrieben Chen und Mitarbeiter (2004) den chemotaktischen Einfluss von VEGF auf die Rekrutierung von MSC während der Knochenheilung.

MSC konnten, wie Eingangsbereich bereits erwähnt, erstmals aus dem Knochenmark isoliert werden, inzwischen gelang ihre Gewinnung jedoch auch aus verschiedenen anderen Gewebeformen wie z.B. der Plazenta (Fukuchi et al., 2004), dem Fettgewebe (Hattori et al., 2004) oder den Zähnen (Morszeck et al., 2005).

Aufgrund dieser Eigenschaften sind mesenchymale Stammzellen im Verlauf der letzten Jahre in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Hierbei ist deren Verwendung im Bereich des Tissue Engineerings besonders hervorzuheben. So wäre es denkbar, aus einer entsprechenden vitalen Zellpopulation unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren unter Zuhilfenahme verschiedener Techniken beispielsweise der Werkstoffwissenschaften Gewebefunktionen zu generieren und diese dann gezielt untersuchen zu können.

2.3 Zielsetzungen der eigenen Arbeit

Aufgrund der Seltenheit des juvenilen Angiofibroms und den damit eingeschränkten Untersuchungsmöglichkeiten, war das erste Ziel der hier vorliegenden Arbeit die Etablierung und Kultivierung von Primärkulturen juveniler Angiofibrome, welche in der Zeit von 2008 bis 2012 in der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes sowie der Universitätskliniken Erlangen-Nürnberg und Marburg-Gießen operativ versorgt wurden. Im Anschluss sollten diese etablierten Zellkulturen in unterschiedlichen Passagen mittels der Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) auf ihre chromosomalen Veränderungen hin untersucht und mit den entsprechenden Primärgeweben verglichen werden. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass für weiterführende Versuche nur Passagen von AF-Kulturen eingesetzt werden, welche bezüglich ihrer chromosomalen Veränderungen eng am Ursprungsgewebe gelegen sind und nicht möglicherweise durch sekundär erworbene Veränderungen aufgrund der der Kultivierungsdauer charakterisiert sind.

Als weiteres Ziel sollte gezeigt werden, ob in den kultivierten Zelllinien Zellen mit Stammzellcharakter vorhanden sind, welche sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF/FGF in Endothelzellen differenzieren lassen. Dadurch sollte die von Pauli und

Mitarbeitern (2008) postulierte Hypothese weiter verfolgt werden, dass es sich bei den im juvenilen Angiofibrom vermehrt gefundenen Endothelzellen nicht um einwachsende Gefäßzellen handelt, welche der Tumor zur Sauerstoffversorgung aus dem umliegenden Gewebe rekrutiert, sondern um *de novo* entstandene Gefäße, die sich durch die Differenzierung von im Tumor vorhanden Mesenchymalen Stammzellen (MSC) und unter dem Einfluss von Differenzierungsfaktoren wie VEGF kontinuierlich neu aus Vorläuferzellen bilden. In Voruntersuchungen konnten in unserer Arbeitsgruppe sowohl die CD34-Expression in Gewebeschnitten, als auch die RNA-Expression verschiedener Stammzellmarker, z.B. Oct4 und BMPR1, mittels qPCR in Zellkulturen juveniler Angiofibrome nachgewiesen werden.

Darüber hinaus sollte geprüft werden, welchen Einfluss der in der Therapie von Hämangiomen bereits erfolgreich eingesetzte β -Blocker Propranolol auf die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Angiofibrom-Primärkulturen hat. Hierzu sollten sowohl quantitative Veränderungen innerhalb des Wachstums der entsprechend behandelten Zellen als auch deren spezifisches Expressionsmuster vor allem in Hinblick auf eine Endothelzelldifferenzierung untersucht werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, in wiefern Propranolol einen Einfluss auf die Sekretion proangiogenetischer Faktoren wie beispielsweise VEGF hat, da hierüber eine entsprechende therapeutische Intervention möglich wäre.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Tumorgewebe

Die in dieser Arbeit verwendeten Tumorgewebe wurden freundlicherweise von den Kliniken für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Erlangen-Nürnberg, des Universitätsklinikums des Saarlandes sowie des Universitätsklinikums Marburg-Gießen zur Verfügung gestellt. Die Patienten bzw. ihre gesetzlichen Vertreter, deren Gewebe für die im Folgenden beschriebenen Versuche verwendet wurden, erklärten sich mit deren wissenschaftlicher Nutzung ausdrücklich einverstanden. Dabei wurden alle Versuche nach den gelten Vorgaben der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes durchgeführt.

Die bereits präoperativ durch bildgebende Verfahren und aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes gestellte Diagnose des juvenilen Angiofibroms wurde postoperativ histologisch durch das Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie der Universität des Saarlandes, durch das pathologische Institut des Universitätsklinikums Erlangen-Nürnberg sowie des Universitätsklinikums Marburg-Gießen bestätigt. Anteile der Tumorgewebe wurden direkt im Anschluss an die operative Entnahme in flüssigem Stickstoff kryokonserviert oder in Paraffin eingebettet. Von weiteren Anteilen der Gewebeproben wurden im Rahmen dieser Arbeit primäre Zellkulturen etabliert (siehe 3.1.3). Die verwendeten Tumorproben sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tab. 3.1: Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben, eingeteilt nach der Stadieneinteilung von Fish (1983) (nk= not known).

Tumor	Alter bei OP	Stadium	Entnahmedatum	Geschlecht
AF 356	13	IV	29.09.2008	männlich
AF 357	18	II	30.09.2008	männlich
AF 680	13	IIIa	23.06.2010	männlich
AF 691	15	Rezidiv	07.06.2010	männlich
AF 895	12	IIIa	18.07.2011	männlich
AF 896	15	I	18.07.2011	männlich
AF 1017	17	nk	18.04.2012	männlich
AF 1041	11	IIIa	04.06.2012	männlich
AF 3076	11	II	17.02.2009	männlich
AF 3109	14	nk	11.07.2007	männlich
AF 3428	19	III	21.05.2008	männlich
AF 3493	13	II Residuum AF 3076	17.02.2009	männlich
AF 3459	18	I	01.10.2008	männlich
AF 3544	13	IIIa	15.09.2009	männlich

3.1.2 Referenzgewebe

Als Referenzgewebe (H3210) diente für die nachfolgenden Versuche Hautgewebe bzw. eine aus diesem Gewebe angelegte Zellkulturlinie einer 64-jährigen Patientin. Dieses Gewebe zeigte aus pathologischer Sicht keine Veränderungen.

Als Referenz-DNA für die CGH-Untersuchungen wurden Blut-Lymphozyten eines gesunden männlichen Spenders herangezogen, welches mittels peripherer Venenpunktion gewonnen worden war.

Für die benötigten Metaphasechromosomen wurden ebenfalls gesunde männliche Spender herangezogen, denen mittels peripherer Venenpunktion die entsprechenden Blutproben entnommen wurden. Alle Spender erklärten sich ausdrücklich mit der Verwendung der entnommenen Gewebe- und Blut-Proben für wissenschaftliche Zwecke einverstanden.

3.1.3 Zellkultivierung (Primärkulturen)

Zur Generierung von primären Fibroblasten-Zelllinien aus juvenilen Angiofibromen wurde Tumormaterial unter sterilen Bedingungen mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit

einem Skalpell zerkleinert. Ca. 1 mm große Stücke wurden in einer Zellkulturschale für ca. 30 min zur besseren Anheftung leicht antrocknen gelassen und vorsichtig mit einem Anzucht-Zellkulturmedium überschichtet. Nach zirka 7-14 Tagen wuchsen aus den Tumorstückchen Zellen aus, welche, sobald sie einen dichten Zellrasen gebildet hatten, zunächst zweifach mit PBS gewaschen und danach mit 1% Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturschale gelöst wurden. Diese Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturschale überführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Zellkulturen AF 356, 357, 680, 691, 895, 896, 1017, 1041 sowie 1180 aus in unserer Klinik operativ versorgten juvenilen Angiofibromen nach oben beschriebenen Protokoll etabliert werden. Darüber hinaus wurden die Zelllinien AF 3076, 3109, 3428, 3493, 3493 und 3544 vom Institut für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Erlangen aus den in 3.1.1 aufgeführten JA-Tumorproben unter den gleichen Bedingungen generiert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Etablierung eines neuen Protokolls zur Generation von Endothel-Fibroblasten-Mischkulturen aus dem juvenilen Angiofibrom wird im Kapitel 4.4 gesondert beschrieben.

3.1.4 Durchführung der Zellkultivierung

Die verwendeten Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierzu wurde ein Stammhaltungsmedium mit den im Anhang aufgeführten Zusätzen verwendet und je nach Fragestellung mit verschiedenen Zusätzen modifiziert. Zur Passagierung wurde bei ausreichend dichtem Bewuchs der einzelnen Zellkulturen das bestehende Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen zweimal vorsichtig mit PBS gespült. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA abgelöst, 2 ml Kulturmedium zugegeben und bei 1000 rpm für 5 min bei RT in einer Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5804R, A-4-44) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das erhaltene Zellpellet in 3 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. Dieses wurde in Abhängigkeit der vorherigen Zelldichte und des individuellen Wachstumsverhaltens im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 in neuen Kulturflaschen mit frischem Medium ausgesät.

3.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für weitere Untersuchungen musste die genaue Zellzahl der lebenden Zellen bestimmt werden. Hierzu wurden Anteile einer zu quantifizierenden Zellsuspension mit 0,4% Trypanblau-Lösung zu gleichen Teilen gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer geben. Trypanblau kann ausschließlich in tote Zellen eindringen, die sich somit von den ungefärbten vitalen Zellen unterscheiden lassen. Aus dem Mittelwert der pro Zählfeld ausgezählten vitalen Zellen multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor ergab sich durch Multiplikation mit dem Faktor 10^4 die Lebendzellzahl pro ml Zellsuspension.

3.2 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)

Erstmals beschrieben wurde die CGH 1992 von Kallioniemi und Mitarbeitern (1992) und stellt eine Weiterentwicklung des von Carter und Mitarbeitern (1992) entwickelten „*reverse chromosome painting*“ dar, welches auf dem Prinzip einer In-situ-Hybridisierung basiert. Mit der CGH ist es möglich, an dem zu untersuchenden Material in einem Untersuchungsschritt alle Chromosomen bzw. Chromosomenregionen im Hinblick auf ihre chromosomalen Veränderungen hin zu untersuchen. So ist es möglich, zum einen Verluste oder Gewinne von kompletten Chromosomen (z. B. Trisomien, Monosomien), aber auch zum anderen die Über- oder Unterrepräsentation einzelner Chromosomenabschnitte zu detektieren. Diese können dann in weiteren Untersuchungen gezielt betrachtet werden, um die Auswirkungen der chromosomalen Veränderungen auch auf RNA- oder Proteinebene zu erfassen und den Tumor somit beispielsweise auf eine vermehrte Proteinexpression hin zu untersuchen.

Bei der Methode der CGH wird genomische Proben-DNA zusammen mit Referenz-DNA eines gesunden Spenders auf normale Metaphasechromosomen hybridisiert. Auf diesen konkurrieren die beiden unterschiedlich markierten DNA-Proben um die entsprechenden homologen Bindungsstellen auf den Chromosomen. Liegen in der zu untersuchenden Tumor-DNA nun Verluste eines bestimmten Gen-Abschnittes beispielsweise in Form einer Deletion vor, bindet überwiegend Referenz-DNA (Abb. 3.2.a).

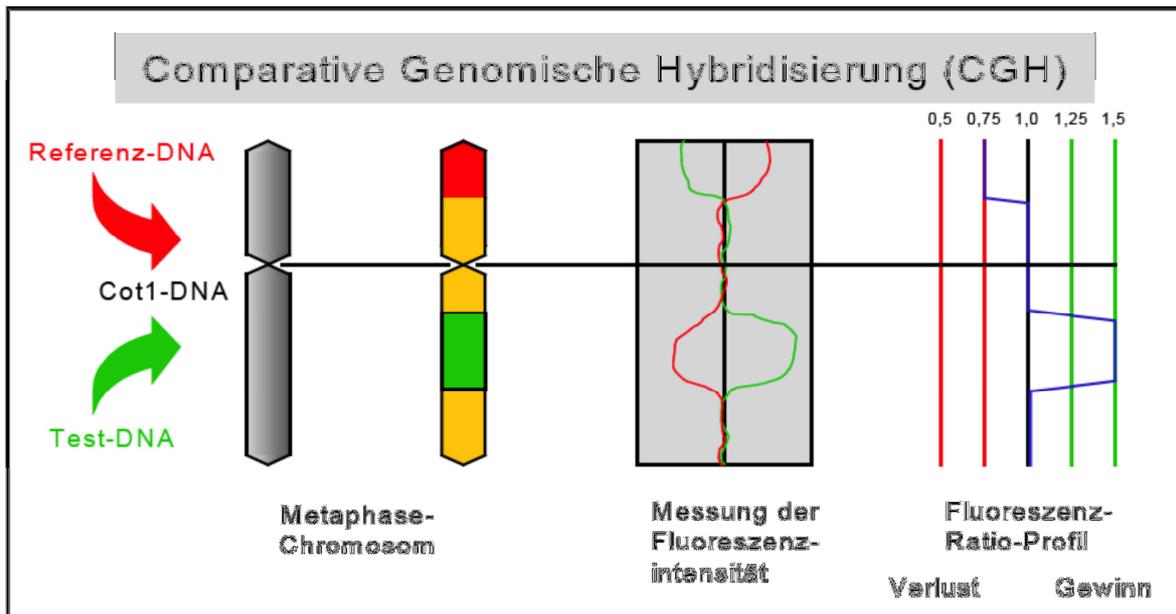


Abb. 3.2.a: Schema der CGH nach Jung, 2001.

Liegt ein Gewinn der Tumor-DNA wie z. B. ein Gewinn des Chromosoms 16 vor, so führt dies analog zu einer vermehrten Bindung der Tumor-DNA. Um die Chromosomen zweifelsfrei zuzuordnen bzw. identifizieren zu können, werden sie mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI gegengefärbt. Für jeden der verwendeten Farbstoffe wird nun zur quantitativen Darstellung der Hybridisierungsergebnisse ein Bild mit einer CCD-Kamera aufgenommen und mit einer speziellen Bildverarbeitungssoftware (ISIS, Fa. Metasystem, Altusheim) ausgewertet. Dabei errechnet das Programm für jede Aufnahme die Signalintensität und stellt die Unterschiede graphisch dar. Das Ergebnis wird in Form eines Ratio-Profiles dargestellt, in welchem DNA-Überrepräsentationen als Ausschläge nach rechts und DNA-Verluste als Ausschläge nach links abgebildet werden.

3.2.1 Herstellung von Chromosomenpräparaten

Blutkultur

Zur Gewinnung von Metaphasen-Präparaten für die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) wurden Lymphozyten-Kurzzeitkulturen nach einem modifizierten Standardprotokoll (Arakaki und Sparkes, 1963) angelegt. Um die T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen, wird ihnen als unspezifisches Antigen Phytohämagglutinin zugesetzt (Nowell, 1960). Alternativ kann mit dem gleichen Effekt PBmax eingesetzt werden. Anschließend werden die Chromosomen in

einen Mitosearrest versetzt, wodurch die Zellen in ihrer Teilungsphase arretiert werden und dadurch eine sehr hohe Anzahl an Metaphasen erreicht wird.

Dafür wurden 800 µl heparinisiertes Vollblut eines gesunden männlichen Spenders mit 8 ml Medium (RPMI, 10% FKS, Penicillin/Streptomycin und 0,4 ml Phytohämagglutinin oder PBmax Komplettmedium) vermischt und für 72 h bei 37°C inkubiert. Nach 70 h wurde ein Mitosearrest durch Zugabe des Spindelgiftes Colcemid®, einer chemisch veränderten Form des Colchizins, in einer Konzentration von 0,1 µg/ml erreicht. Im Anschluss wurden die Zellen bei 800 rpm 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Chromosomenpräparation

Ein wesentlicher Schritt bei der Präparation von Chromosomen ist die Behandlung der Zellen mittels einer hypoosmolaren Lösung und ihre nachfolgende Spreitung.

Der Überstand der o. g. Blutkultur wurde verworfen und die Zellen um eine bessere Ausdehnung und Verteilung (Spreitung) der Metaphasechromosomen zu erreichen, durch Zugabe von 0,0375 M KCl einer hypotonen Behandlung unterzogen. Dabei ist die Hypotoniezeit abhängig von der Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit sowie dem Luftdruck und kann somit in einem Zeitrahmen von 5 bis 9 Minuten variieren. Anschließend wurden die Zellen bei 800 rpm 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, den Zellen zu deren Fixierung vorsichtig eiskaltes Fixans (Methanol: Eisessig (3:1)) zugegeben und die Lösung dabei gut resuspendiert. Um das Ergebnis der Fixierung zu verbessern, wurden die Zellen für einen Zeitraum von mindestens 20 min bei -20°C in diesem Fixativ belassen. Anschließend wurde diese Lösung wiederum für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und erneut eiskaltes Fixativ zugegeben. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das Zellpellet eine weiße Farbe hatte.

Die so entstandene Zellsuspension wurde auf Objektträger getropft, die in -20°C kaltem 50%igen Ethanol aufbewahrt wurden. Um eine bestmögliche Qualität durch eine optimale Spreitung der Chromosomen zu erreichen, wurden die so hergestellten Präparate auf einem feuchten Tuch liegend bei Raumtemperatur sehr langsam getrocknet. Da für die CGH nur qualitativ hochwertigste Präparate Verwendung finden können, wurde die Chromosomenmorphologie jedes einzelnen Objektträgers anschließend im Phasenkontrast kontrolliert und nur diejenigen Objektträger ausgewählt, die eine ausreichend hohe Anzahl an gut gespreiteten Mitosen aufwiesen, keine Zytoplasmareste um die Chromosomen der Metaphasen zeigten und bestens fixiert waren.

3.2.2 DNA-Isolierung

Isolierung genomischer DNA aus Blut

Als Referenz-DNA wurden einem gesunden männlichen Spender ca. 10 ml venöses EDTA-Vollblut entnommen. Dieser Ansatz wurde nach Zugabe von drei Volumen (30 ml) Erythrozyten-Lysis-Puffer für eine Stunde auf Eis gestellt und gelegentlich durch leichtes Bewegen vorsichtig durchmischt. Durch den hypotonen Zustand des Puffers blähen die Erythrozyten, platzen und färben die Lösung dunkel bis schwarz und klar. Anschließend wurden die Lymphozyten 10 min bei 2000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dabei war darauf zu achten, den Überstand möglichst vollständig zu entfernen, da dieser in hohem Maß Hämoglobin enthält und zu einer Verunreinigung der DNA führen kann. Das entstandene Zellpellet wurde mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen und diese Schritte so oft wiederholt, bis das Zellpellet eine weiße Farbe erreicht hatte. Unter Zugabe einer Spatelspitze Proteinase K wurden die noch intakten Lymphozyten in 4,5 ml SE-Puffer mit 0,5 ml 10% SDS-Lösung über Nacht bei 55°C verdaut. Die DNA Extraktions- und Reinigungsschritte erfolgten analog dem Protokoll der DNA-Isolierung aus Gewebe.

Isolierung genomischer DNA aus Gewebe

Die DNA wurden gemäß dem QIAamp Mini Kit Protokoll für Gewebe der Firma Qiagen, Hilden isoliert. Dafür wurden jeweils zirka 25 mg Gewebe mechanisch zerkleinert und mit 180 µl ATL-Buffer sowie 20 µl Proteinase K-Stammlösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und diese Lösung bei 56°C für 90 min inkubiert. Während der Inkubation wurde die Lösung alle 10 min gründlich gemischt, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Danach wurde die Lösung 10 s bei 14.000 rpm zentrifugiert und 200 µl AL-Buffer hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde für 10 min bei 70°C lysiert und im Anschluss mit 200 µl Ethanol auf die QIAamp-Säulen gegeben. In zwei Reinigungsschritten wurde die DNA durch Zugabe von jeweils 500 µl AW1- und AW2-Puffer gewaschen und im Anschluss in 75 µl Aqua dest. eluiert und bei 4°C aufbewahrt.

Isolierung genomischer DNA aus Zellkulturen

Die DNA aus den etablierten Zellkulturen wurde analog dem Protokoll zur DNA Isolierung aus kultivierten Zellen mit dem QIAamp Mini Kit der Firma Qiagen, Hilden durchgeführt und im Anschluss bei 4°C gelagert.

Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die CGH setzt das Vorliegen äquimolarer Mengen von Tumor- und Referenz-DNA sowie ein hohes Maß an Reinheit, sprich Proben ohne das Vorhandensein einer nennbaren Verunreinigung, voraus. Die Spektralphotometrie macht es möglich, sowohl die genaue Konzentration wie auch die Reinheit einer Probe und im Speziellen der darin gelösten DNA zu bestimmen. Hierzu wird die Absorption der zu untersuchenden Probe bei 260 nm und 280 nm gemessen und gegen den Nullwert reinen Aqua dest. abgeglichen. Aus den hieraus resultierenden Werten ist es dann möglich die Konzentration sowie Reinheit einer Probe zu erfassen.

Da das Verhältnis zwischen der Konzentration und der Lichtabsorption linear ist, ergibt sich folgende Gleichung: Konzentration = Absorption x Faktor. Da eine DNA-Lösung mit der optischen Dichte $E=1$ (Extinktion $E=1$ entspricht somit einer Absorption von 90 %) bei 260 nm eine Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufweist, lässt sich aus der Absorption bei 260 nm die Konzentration ausrechnen. Dabei sollte Quotient Q von 260 nm/ 280 nm zwischen 1,8 und 2 liegen.

Zuerst wurde mit 100 μl Aqua dest. ein Nullabgleich des Gerätes durchgeführt. Danach wurden 1 μl der zu untersuchenden DNA-Lösung mit 99 μl Aqua dest. verdünnt und unter Berücksichtigung dieses Verdünnungsverhältnisses und den erhobenen Werten die Konzentration errechnet.

3.2.3 Markierung genomischer DNA

Nick Translation

Zur Durchführung der CGH ist es notwendig, die zu untersuchende Tumor-DNA als auch die verwendete Referenz-DNA über verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe nachzuweisen. In unserem Fall wurde ein Nick-Translation-System verwendet, bei dem die Fluoreszenzfarbstoffe an Haptene binden, welche wiederum indirekt an die DNA gebunden sind. In unserem Versuchsaufbau kamen dabei Digoxigenin und Biotin zum Einsatz.

Das Vitamin Biotin (Biotin-16-dUTP) koppelt dabei über einen variablen Spacer aus 7-16 Kohlenstoffresten an die C4-Position des Pyrimidinrings, wohingegen das Steroidmolekül Digoxigenin (Digoxigenin-11-dUTP) an einen Spacer an der C5-Position des Uridinnukleotids bindet.

Die Methode der Nick-Translation beruht auf der Erzeugung von Einzelstrangbrüchen an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Substrates - sogenannten „Nicks“ - durch die DNase I in Anwesenheit von Mg^{2+} . Dabei werden die freien 3'OH Enden dieser erzeugten Nicks von der DNA-Polymerase I als Primer zur Synthese eines 5'-3' DNA-Stranges, welcher komplementär zum intakten Strang ist, genutzt. Die 5'→3' Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I entfernt dabei gleichzeitig die Nucleotide in Synthese-Richtung. Die durch die Exonuklease-Aktivität abgebauten Nucleotide werden durch die Polymerase-Aktivität mit Hapten- oder Biotin-markierten Nucleotiden ersetzt (Rigby et al., 1977). An diesen Nucleotiden kann dann später der entsprechende Fluoreszenzfarbstoff binden.

Dabei kam ein Biotin- und DIG-Nick-Translation-Mix zur Anwendung, welcher sowohl die markierten und unmarkierten Nucleotide, wie auch alle für den Versuchsaufbau benötigten Enzyme, Ionen- und Pufferlösungen enthält.

Zur Markierung wurde 1,7 µg genomische DNA in einem Endvolumen von 16 µl gelöst und 4 µl Biotin- bzw. DIG-Nick-Translations-Mix dazupipettiert. Dieser Ansatz wurde nach kurzem Zentrifugieren für 90 min bei 15°C im Kühlwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA und 10 min bei 65°C gestoppt, durch Zugabe von 2,1 µl 3 M Natriumacetat und 46 µl 100% Ethanol gefällt und im Anschluss bei 4°C und 14000 rpm für 25 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das somit entstandene Zellpellet für 1 h im Exsikkator getrocknet. Danach wurde die DNA in 10 µl Aqua dest. aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst.

Dot-Blot

Zur Kontrolle des Einbaus von biotin- bzw. digoxigeninmarkierten Nucleotiden in die DNA wurde ein Dot-Blot durchgeführt.

Hierbei wird die zu untersuchende Probe bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 in 10er Schritten in 6xSSC verdünnt. Von jeder der dabei entstandenen Verdünnungskonzentrationen werden 2 µl auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Durch die Behandlung mit einem UV-Strata-Linker wird die Bindung zwischen der DNA und der Nitrocellulose verstärkt und im Anschluss freie unspezifische Bindungsstellen durch die Behandlung mit BSA oder 1% Magermilchpulver in 6xSSC abgesättigt. Die Membran wird dann für 30 min mit Streptavidin-alkalischer Phosphatase zum Biotin-Nachweis bzw. Digoxigenin-alkalischer Phosphatase zum Digoxigenin-Nachweis 1:1000 in TN-Puffer inkubiert. Nachdem die Membran sorgfältig mit Dot-Puffer gewaschen und in eine BCIP- (chromogenes Substrat: 5-Bromo-4-Chloro-

Indolyphosphat) und NBT- (Farbstoffverstärker: Nitroblau-Tetrazoliumsalz) Lösung (5,7 ml Dot-Puffer, 33 µl NBT, 25 µl BCIP) überführt wurde, wird sie im Dunkeln inkubiert. Dabei lässt sich aufgrund des Substratumsatzes durch die alkalische Phosphatase am Präzipitat eines violetten Farbstoffkomplexes die Einbaurate semiquantitativ feststellen und sollte, um die markierte DNA erfolgreich einsetzen zu können, noch bis 1 pg nachweisbar sein.

3.2.4 Hybridisierung, Stringenzwaschung und Fluoreszenzfärbung

Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Die Chromosomenpräparate wurden mit einer RNase-Inkubation vorbehandelt, um dadurch eine unspezifische Bindung bzw. Hybridisierung an noch vorhandene RNA-Fragmente zu verhindern. Um die Chromosomen einer Hybridisierung zugänglicher zu machen, wurden sie durch einen Pepsin-Verdau zusätzlich von noch verbliebenen Protein- und Gewebekomponenten befreit. Durch die anschließende Fixierung wurden die Chromosomen vor einer Denaturierung und einem damit verbundenen Verlust an DNA geschützt (Raap et al., 1986).

Die Präparate wurden mit 100 µl RNase (100µg/ml) bei 37°C für 20 min in 2x SSC inkubiert. Im Anschluss wurden sie zweimal für 5 min in 2x SSC auf dem Schüttler gewaschen und für den Pepsinverdau in einer Küvette mit 100 ml 0,05% Pepsin in 0,01 M HCL für 1,5 min bei 37°C eingestellt.

Im Anschluss wurden sie kurz mit PBS gespült und für 10 min bei RT in 4% Paraformaldehyd/PBS nachfixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS und einer Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90% Ethanol) wurden sie dann für mindestens 30 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Denaturierung der Chromosomen

Um die Hybridisierung der zu untersuchenden Proben-DNA an die Metaphasechromosomen zu ermöglichen, müssen die Doppelstränge in die jeweiligen Einzelstränge zerlegt werden. Dabei ist die Stabilität der jeweiligen Doppelhelix von entscheidender Bedeutung sowohl für die Denaturierung als auch die spätere Hybridisierung. D.h. je stabiler die Bindungen innerhalb der Doppelhelix sind, um so größer ist die für die Denaturierung benötigte Energie. Entscheidend für die Stabilität der Doppelhelix sind Faktoren wie z. B. ihre Assoziation mit verschiedenen Proteinen oder auch ihre Konformation und Länge. Das in dieser Arbeit für die Denaturierung eingesetzte Formamid entspiralisiert dabei die Doppelhelix durch eine Unterbindung von Wasserstoffbrückenbindungen und setzt damit die benötigte Temperatur herab.

Die Präparate wurden bei 72°C für 90 sek mit 100 µl Denaturierungslösung (70% Formamid/ 2xSSC) denaturiert und direkt in eine eiskalte Ethanol-Reihe (70%, 80%, 96%) überführt, um eine Renaturierung der DNA zu verhindern. Im Anschluss wurden die Präparate bei Raumtemperatur mindestens 30 min luftgetrocknet.

Hybridisierung

Um eine unspezifische Bindung der markierten DNA an repetitive Sequenzen zu verhindern, wurde den verwendeten DNA-Proben Cot-DNA in einem 50-100fachen Überschuss hinzugegeben. Diese Cot-DNA blockt dabei in einer Vorreaktion diese Sequenzen ab und verhindert dadurch ein unspezifisches Anlagern der DNA zwischen diesen und eine damit verbundene unspezifische Anfärbung der Chromosomen.

Zur Hybridisierung wurden 9,5 µl Nick-markierte Tumor-DNA (900 ng DNA), 9,5 µl Kontroll-DNA (900 ng), 60 µg humane Cot1-DNA (1 mg/ml) mit 0,1x Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2,5x Vol Ethanol_{absolut} über Nacht bei -20°C oder 30 min bei -80°C gefällt und im Anschluss bei 18000 rpm 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, dekantiert und anschließend im Vakuum getrocknet. Das entstandene Pellet wurde in 3,5 µl Formamid 30 min unter Schütteln resuspendiert. Nach Zugabe von 3,5 µl 20% Dextransulfat/ 4x SSC wurde die DNA erneut 30 min gelöst und anschließend 7 min bei 75°C denaturiert. Zur Bindung von Cot1-DNA an repetitive DNA-Sequenzen erfolgte für 30 min eine Vorhybridisierung bei 37°C.

Bei der Hybridisierung konkurrieren die im Überschuss vorhandenen DNA-Abschnitte der Tumor- und Referenz-DNA um die homologen Sequenzabschnitte der Chromosomen. Aufgrund des niedrigen Reaktionsvolumens ist die Geschwindigkeit der Hybridisierung stark herabgesetzt, so dass ein optimales Ergebnis erst bei Reaktionszeiten von 3 Tagen erreicht wird.

Vor der Hybridisierung wurden die vorbereiteten Objektträger auf einer Heizplatte kurz auf 37°C erwärmt. Der Hybridisierungs-Mix wurde auf die erwärmten Objektträger gegeben, ein Deckglas aufgelegt und mit Fixogum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte dann für 3 Tage bei 37°C in einer feuchten Kammer.

Stringenzwaschung und Detektion

Um die Präzision der Hybridisierung durch Entfernung nicht oder falsch gebundener DNA-Moleküle zu erhöhen, wurden die Präparate gewaschen, wobei dabei die Bedingungen

stringenter gewählt wurden. D.h. es wurden höhere Temperaturen und eine niedrige Konzentration an Kationen für den Waschvorgang gewählt.

Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Präparate dreimal 5 min in 50% Formamid/ 2x SSC, zweimal 5 min in 2x SSC und einmal 5 min in 0,1x SSC bei 45°C gewaschen. Danach wurden die Präparate in 4x SSC/0,1% Triton-X100 5 min bei RT eingestellt.

Der Nachweis der Hybridisierung erfolgt durch die Bindung von sekundär Fluorochromgekoppelten Antikörpern bzw. Enzymen an Digoxigenin bzw. Biotin. Zur Detektion von Digoxigenin wurde ein polyklonaler Anti-Digoxigenin-Antikörper eingesetzt, welcher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin konjugiert. Rhodamin besitzt dabei ein Emissionsmaximum von >580 nm und liegt somit im roten Bereich (Cremer et al., 1995). Die Detektion von Biotin erfolgt durch die Bindung von FITC-konjugiertem Streptavidin (Emmissionsbereich von 515-550 nm), welches eine sehr hohe Affinität zu Biotin aufweist.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern wurden vor der Inkubation diese Bindungsstellen mit BSA blockiert. Hierzu wurden die Objektträger für 30 min bei RT in einer feuchten Kammer mit 100 µl 5% BSA/4x SSC geblockt. Zur Detektion der biotinylierten Tumor-DNA wurde Streptavidin-FITC (Verdünnung 1:80 in 100 µl 5% BSA/4x SSC) und für die DIG-markierte Referenz-DNA anti-DIG-Rhodamin-Antikörper (Verdünnung 1:20 in 100 µl 5% BSA/4x SSC) verwendet. Durch einen weiteren Waschschriff in 4x SSC-Triton x100 (3x 5 min bei 37°C) wurden überschüssige Fluorochrome entfernt. Im Anschluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%-80%-96%) dehydriert. Um bei der späteren Auswertung die Chromosomen identifizieren zu können, wurden sie zusätzlich mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt. Das Emissionsmaximum von DAPI liegt bei 450 nm, wodurch es in der Fluoreszenzaufnahme blau erscheint. DAPI lagert sich in das Chromatingerüst und ruft dadurch in Abhängigkeit vom jeweiligen Kondensationsgrad der einzelnen Chromosomenabschnitte eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität und damit eine Bänderung hervor. Diese hat eine hohe Ähnlichkeit mit der gängigen GTG-Bänderung und macht dadurch eine Identifizierung der einzelnen Chromosomen möglich. Um ein Ausbleichen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, sollte die Auswertung entsprechend im Dunkeln durchgeführt werden.

Auswertung

Die zu analysierenden Metaphasen wurden mit einem Auflichtmikroskop BX61 und einer gekühlten s/w-CCD-Kamera aufgenommen und mit Hilfe der Software ISIS 3.0 ausgewertet. Die Beleuchtung erfolgte mit einer 100 W Quecksilberlampe.

Tab 3.2: Charakteristika der Fluoreszenzfilter

Bezeichnung der Filter	NU (DAPI)	MWIBA (FITC)	MWIG (Rhodamin)
Anregungsfilter	360-370nm	460-490nm	520-550nm
Emissionsfilter	>420nm	515-550nm	>580nm
Strahlenteiler Transmission	400nm	505nm	565nm

FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; DAPI = 4,6-diamino-2-phenylindol

Für jedes der drei eingesetzten Fluorochrome (DAPI-blau/ FITC-grün/ Rhodamin-rot) wurde unter Verwendung eines selektiven Filters getrennt ein Schwarz-Weiß-Bild mit einer CCD-Kamera aufgenommen (Objektiv: Plan Apo 60x; 1,40 Oil). Diese Bilder wurden in Falschfarbendarstellung entsprechend der verwendeten Fluorochrome wie in Abb. 3.2.b gezeigt dargestellt. Hierbei hingen die Belichtungszeiten entscheidend von der Intensität der Fluoreszenzsignale ab und lagen für FITC zwischen 1 und 15 s, für Rhodamin zwischen 2 und 12 s und für DAPI zwischen 0,1 und 0,6 s.

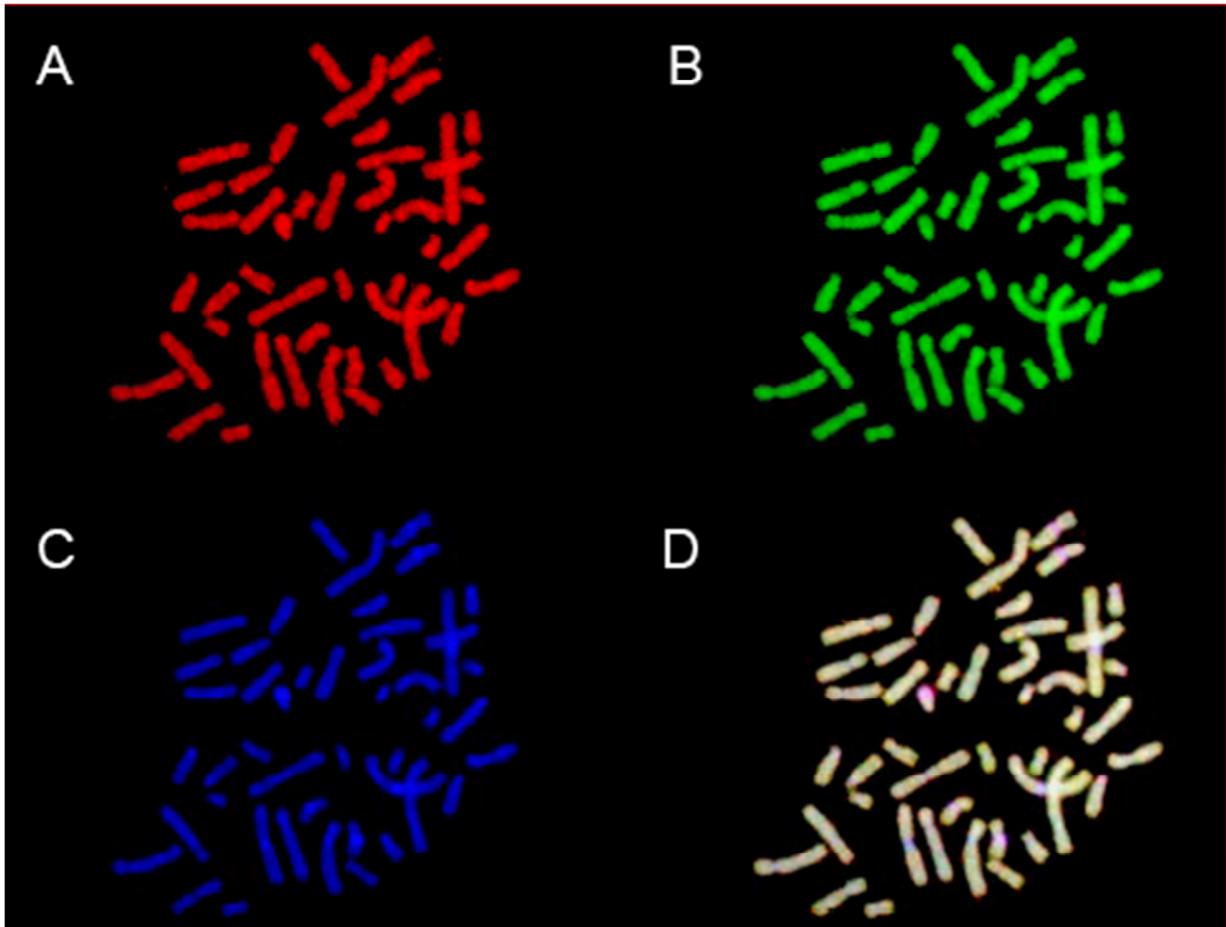


Abb. 3.2.b: Hybridisierte normale Metaphase mit der DNA eines Tumors gegen die DNA eines gesunden Spenders.

(A) Mit Referenz-DNA hybridisierte Metaphase eines gesunden Spenders. Detektion mit Anti-Dig-Rhodamin

(B) Hybridisierung der Tumor-DNA. Detektion mit Streptavidin-FITC

(C) DAPI-Gegenfärbung der Metaphasen-Chromosomen als Grundlage für die Karyotypisierung

(D) Überlagerung der FITC, Rhodamin und DAPI Bilder aus (A) (B) und (C)

Zur besseren Auswertung wurden die Metaphasen softwareseitig begradigt und die Bildschärfe korrigiert. Dabei dienten die inversen Darstellungen der in schwarz/weiß aufgenommenen DAPI-Färbungen, welche bei einer guten Qualität einer GTG-Bänderung entsprechen, zur Karyotypisierung. Chromosomen, welche dabei nicht eindeutig zuzuordnen waren oder sich überlagerten, wurden nicht berücksichtigt.

Um möglichst viele Einzel-Chromosomen zur Auswertung zur Verfügung zu haben, wurden mindestens 12 Metaphasen aufgenommen. Um versuchsbedingten Artefakten wie unterschiedliche Hybridisierungsqualitäten und Signalintensitäten gerecht zu werden, wurde für jede Metaphase das Verhältnis von Grün (FITC) und Rot (Rhodamin) auf 1 gesetzt.

Danach wurden die einzelnen Chromosomen ausgewertet. Dafür wurde entlang der Mittelachse jedes einzelnen Chromosoms für jeden detektierten Bildpunkt (Pixel) ein mittlerer Wert für Rot

und Grün ermittelt und mit Hilfe dessen das Verhältnis (Ratio) von Rot zu Grün bestimmt. So errechnet das Programm nun für jedes Chromosom ein solches Mittelprofil, welches anhand einer Kurve die Verhältnisse von Rot zu Grün entlang der Mittelachse des Chromosoms darstellt. Da die Chromosomen innerhalb einer Präparationscharge unterschiedlich kondensiert vorliegen, muss eine Längenoptimierung der einzelnen Chromosomen vorgenommen werden. Hierbei wird das Zentromer als Fixpunkt benutzt und die p- und q-Arme unabhängig voneinander normiert.

Bei der von uns verwendeten Software ISIS werden als Sicherheitsschranken die zweifache Standardabweichung oder ein Konfidenzintervall von 99% gewählt. Unter Berücksichtigung der entsprechenden Sicherheitsintervalle berechnet das Programm für jeden einzelnen Bildpunkt den Mittelwert aller vorliegenden Werte entlang der Achse des entsprechenden Chromosoms. Dabei entscheidet das gewählte Konfidenzintervall über Spezifität und Sensitivität der Ergebnisse, wobei eine Grenze von 99% weniger sensitiv ist, die erkennbaren Gewinne und Verluste jedoch deutlich spezifischer werden.

Dabei können nicht alle Bereiche eines Chromosoms gleichermaßen in die Auswertung mit einbezogen werden. So variiert der Gehalt an Heterochromatin besonders im Bereich des langen Arms des Y-Chromosoms sowie in den zentromernahen Abschnitten von 1q, 9q und 16q. Da dieser Wert interindividuell sehr verschieden ist, kann er somit zu Schwankungen im Hybridisierungsbereich führen (Kallioniemi et al., 1994)

Durch den sehr hohen GC-Gehalt der Chromosomenabschnitte 1p32pter, 16p und der Chromosomen 19 und 22 müssen diese aufgrund ihrer damit verbundenen Anfälligkeit für Artefakte einer besonders kritischen Begutachtung standhalten (Kallioniemi et al., 1994; Karhu et al., 1997).

Kontrolle der Markierungsreaktion und CGH

Die mittels Nick-Translation markierte Tumor- und Referenz-DNA wurden nur eingesetzt, wenn sie bis 1 pg im Dot Blot nachweisbar waren. Ebenso wurden zum Ausschluss von versuchsbedingten CGH-Hybridisierungsartefakten ein Aliquot der isolierten DNA erneut markiert und hybridisiert und nur im Falle einer Reproduzierbarkeit des Ergebnisses in die Auswertung mit aufgenommen. Des Weiteren wurde als Kontrolle eine Probe eines Kolon-Karzinoms verwendet, dessen bekannte Amplifikation auf 8q sich in den durchgeführten Hybridisierungen bestätigen ließ.

3.3 Aortenring-Assay

Dieses Tierexperiment wurde unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Das Aortenring-Assay gehört in die Gruppe der ex vivo-Modelle zur Untersuchung und Quantifizierung der Angiogenesefähigkeit eines Stoffes. Dabei verbindet das von Nicosia und Ottinetti (1990) etablierte Modell einen in vivo mit einem in vitro Versuchsaufbau. Durch die Verwendung von intakten vaskulären Explantaten ist es möglich, die Bedingungen, unter denen eine Angiogenese in vivo stattfindet, in einem noch genaueren System abzubilden als es mit reinen endothelialen Zellen möglich wäre. Dabei werden die aus den 12-16 Wochen alten Ratten explantierten Aortenringe in eine Matrix aus Matrigel®, welches aus einem Basalmembran-produzierenden Tumor gewonnen wird, eingebettet, wodurch es zu einer stabilen Gefäßbildung kommt (Grant et al., 1997). So ist es möglich, die sich bildenden Gefäßsprossen über den Zeitraum von mehreren Tagen zu untersuchen und mittels verschiedener Auswertungssysteme zu analysieren. Hierdurch kann eine Aussage über das angiogenesehemmende oder -fördernde Potential eines Stoffes oder einer Suspension gegeben werden.

Zur genauen Quantifizierung der im Versuch stattgefundenen Angiogenese können folgende Parameter gemessen werden:

1. Fläche der ausgewachsenen Sprouts
2. Maximale Länge der ausgewachsenen Sprouts

Die folgenden Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. M. Laschke, Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, durchgeführt.

In unserem Fall kam im Speziellen der „*rat aortic ring assay*“ zum Einsatz. Für diesen Assay wurden 3 Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Nach Tötung der Ratten durch eine Überdosis Pentobarbital wurde die thorakale Aorta chirurgisch unter dem Mikroskop entfernt und umgehend in eine Petrischale mit eiskaltem PBS eingebracht, von Blutkoageln gereinigt und unter mikroskopischer Sichtkontrolle von Fettresten und Bindegewebe befreit. Im Anschluss wurden die Aorten in ca. 1 mm breite Ringe geschnitten und nur diejenigen ohne Gefäßabgänge ausgewählt. Bis zur endgültigen Verarbeitung wurden diese Ringe in kaltem PBS aufbewahrt.

Die Aortenringe wurden mit der Öffnung nach oben in 200 µl Matrigel (BD Matrigel™ Matrix, BD Biosciences; Heidelberg, Germany) eingebettet und in einer 48-Well-Schale für 20 min bei 35°C und 5% CO₂ bis zur vollständigen Polymerisation des Gels inkubiert. Auf die eingebetteten Aortenringe wurden nun jeweils 800 µl der zu untersuchenden Lösungen gegeben und für den

weiteren Untersuchungszeitraum von 6 Tagen bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Die Untersuchungslösung wurde nach 3 Tagen gewechselt.

Die Auswertung wurde am 6. Tag durchgeführt. Dazu wurden bei den Aortenringen die maximale Länge (μm) und die Fläche (mm^2) der ausgewachsenen Gefäßsprosse unter einem Durchlicht-Phasenkontrast-Mikroskop mit Hilfe der Software CapImage bestimmt und im Anschluss mittels Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 20 statistisch ausgewertet.

3.4. Angiogenese ELISA

Das Prinzip einer ELISA-Untersuchung basiert auf einer Antigen-Antikörper Bindung. Hierbei wird meist eine Mikrotiterplatte verwendet, die mit spezifischen Antikörpern gegen das nachzuweisende Antigen beschichtet sind. In die einzelnen Wells dieser Platte werden dann die zu untersuchenden Medien pipettiert. Während der nun folgenden Inkubationszeit bindet das zu messende Antigen, sofern es denn vorhanden ist, an den entsprechenden Antikörper. Die überschüssigen, nicht gebundenen Antigene werden im Anschluss durch Waschschriffe entfernt. Als nächstes erfolgt die Bindung mit weiteren, mit Enzymen bzw. Katalysatoren gekoppelten Antikörpern, welche ebenfalls an die immobilisierten Antigene binden. Auch hier werden die überschüssigen Sekundärantikörper durch mehrere Waschschriffe entfernt und schließlich ein zu dem Enzym bzw. Katalysator passendes Substrat zugegeben. Ist Enzym oder Katalysator in einem Well vorhanden, wird dieses Substrat in ein farbiges Produkt umgewandelt, welches dann photometrisch gemessen und anhand seiner Intensität quantifiziert werden kann.

In der von uns durchgeführten Untersuchung wurde ein Human Angiogenesis ELISA der Firma Signosis (EA-1011) verwendet. Dieser ELISA ermöglicht in einem Durchgang die Untersuchung von 8 verschiedenen Angiogenesefaktoren: TNF α , IGF1, VEGF, IL6, bFGF, TGF β , EGF sowie Leptin. Bei den von uns untersuchten Medien handelte es sich um den Überstand der Zellkultur AF895 sowie das verwendete Zellkulturmedium als Kontrolle. Der Versuch wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Alle hierfür verwendeten Lösungen und Ansätze waren im Untersuchungskit enthalten.

Für den Versuch wurden jeweils 100 μl der zu untersuchenden Zellkulturmedien in die einzelnen mit den Antikörpern beschichteten Wells pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden ungebundene Bestandteile durch mehrere Waschschriffe entfernt und 100 μl des Biotin-markierten Sekundärantikörpers hinzugegeben. Diese Lösung wurde nun wiederum 1 Stunde inkubiert und auch hier die nicht gebundenen Bestandteile durch mehrere Waschschriffe entfernt. Nun wurde Streptavidin-Peroxidase hinzugegeben. Nach einer

Inkubationszeit von wiederum 45 Minuten wurde der Überstand entfernt und die Wells erneut mehrfach gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrat und die erneute Inkubation für 30 Minuten. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 50 µl Stopp-Lösung beendet und im Anschluss die Fluoreszenzintensität mittels photometrischer Untersuchung bei 450 nm gemessen.

3.5. Immunfluoreszenz

Bestrahlt man einen fluoreszierenden Stoff mit Licht, so wird ihm dieses Licht als Energie zugeführt und regt diesen an, was im Speziellen heißt, dass Elektronen innerhalb des Stoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Da der energieärmste Zustand der stabilste ist, versucht der Stoff nach der Anregung wieder in diesen stabilen energiearmen Grundzustand zurückzukehren und gibt dabei die aufgenommene Energie in Form von chemischer Energie, Wärme oder elektromechanischer Energie (z. B. Licht) wieder ab. Grundlage der Fluoreszenz ist die Stokessche Regel, welche besagt, dass die Lichtenergie, die auf einen Stoff einwirkt nicht nur als Licht, sondern auch z. B. als Bewegung oder Wärme abgegeben werden kann. Aus diesem Grund ist das abgestrahlte Licht stets energieärmer und damit langwelliger als das anregende Licht. Diese Eigenschaften macht man sich nun bei der Fluoreszenzmikroskopie zunutze, indem man bestimmte Stoffe mit Fluoreszenzfarbstoffen- sogenannten Fluorochromen- markiert. Diese Fluorochrome werden dann mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Dieses Licht wird in der Regel von Quecksilberlampen erzeugt, die Licht mit einem Wellenspektrum von 360 nm bis 700 nm produzieren. Mittels eines Anregungsfilters wird dann das Licht mit der Wellenlänge herausgefiltert, welches das entsprechende Fluorochrom anregt. Dieses emittiert daraufhin ein längerwelliges Licht, welches schließlich das eigentliche Fluoreszenzbild darstellt.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein unkonjugierter Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen im Präparat. Zur Detektion dieser Anlagerung verwendet man als Fluorochrom nun einen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten-Sekundärantikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Durch Anregung des verwendeten Fluorochroms mit UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge werden die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht und können so mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops detektiert werden.

Zur Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung von Zellen wurden diese am Vortag in 6-Well Zellkulturschalen auf Deckgläsern ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen auf

den Deckgläschen 2 mal kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml 4% PFA/PBS für 15 min fixiert. Durch diese Fixierung mit PFA bleibt die Zellarchitektur und Integrität der zu untersuchenden Zellen erhalten. Im Anschluss wurden die Zellen wieder gewaschen und mit je 1 ml 5% BSA/PBS + 0,3% NP40 eine halbe Stunde inkubiert. Dabei blockt BSA unspezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche ab und verhindert dadurch die Bindung der entsprechenden Antikörper an diese. NP40 ist ein hydrophobes Detergens, welches die Lipidbindungen der Zellmembran lysiert und dadurch ein besseres Eindringen der entsprechenden Antikörper in die Zelle ermöglicht. Die Integrität der Membran des Zellkerns bleibt dabei jedoch erhalten. Dann wurde der Puffer abgesaugt und je 50 µl der entsprechenden Primär-Antikörper Verdünnung in 1% BSA/PBS + 0,3% NP40 auf die jeweiligen Deckgläser gegeben. Dieser Komplex wurde für 45 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert und im Anschluss wurden die ungebundenen Antikörper durch 3 Waschschrte mit PBS + 0,3% NP40 entfernt. Zur Detektion des primären Antikörpers wurde nun der sekundäre Antikörper (Cy3 anti-Mouse, Dianova) im Verdünnungsverhältnis 1:400 in BSA/PBS + 0,3% NP40 auf die entsprechenden Deckgläschen pipettiert und dieser Ansatz wiederum für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um überschüssige Sekundärantikörper zu entfernen, wurden die Präparate im Anschluss erneut zweimal mit PBS gespült. Zur Detektion der Zellkerne wurden die Zellen im Anschluss einmal mit Methanol gespült, für 2 min mit einer DAPI-Gegenfärbung gefärbt (1µg/ml DAPI in Methanol), erneut einmal mit Methanol gewaschen und schließlich mit Elvanol auf entsprechenden Objektträgern fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zur Auswertung aufbewahrt.

3.6 Statistische Auswertung

Die im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelten Daten wurden als Mittelwerte \pm der Standardabweichungen (SA) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte hierbei mit Hilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 20 durch den T-Test für verbundene Stichproben.

4 Ergebnisse

4.1 Anzucht mesenchymaler Primärkulturen aus juvenilen Angiofibromen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus neun operativ behandelten Angiofibromen Primärzellkulturen nach dem in Kap. 3.1.3 beschriebenen Protokoll etabliert.

Aufgrund des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens mussten diese vor der weiterführenden Verwendung bis zu unterschiedlichen Passagen kultiviert werden, um eine ausreichend große Menge an Zellen in die entsprechenden Untersuchungen einbeziehen zu können. Dabei wurde jedoch Wert darauf gelegt, eine möglichst frühe Passage in die Untersuchung einzuschließen, um somit die Gefahr einer eventuellen genetischen Veränderung durch die Passagedauer so gering wie möglich zu halten.

4.2 Vergleich des Primärgewebes mit primären AF-Zellkulturen mittels CGH

Aufgrund der äußerst geringen Prävalenz juveniler Angiofibrome und der damit verbundenen Knappheit repräsentativen Materials war ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit, durch die Anzucht und Charakterisierung mehrerer Zellkulturlinien aus verschiedenen Primärgeweben einen ausreichend großen Pool an repräsentativen Tumorzellen für weitere Untersuchungen zu schaffen.

Um festzustellen, inwieweit Zellkulturen des juvenilen Angiofibroms im Hinblick auf die chromosomalen Veränderungen mit den primären Tumorgeweben vergleichbar sind, wurden diese zunächst mittels der vergleichenden genomischen Hybridisierung charakterisiert. Lagen dabei gleichsinnige Veränderungen im Sinne eines Gewinnes oder Verlustes desselben Chromosomenabschnitts in beiden Proben vor, so konnte davon ausgegangen werden, dass die kultivierten Zellen aus genetischer Sicht den primären Tumorzellen entsprechen. Darüber hinaus sollte in diesem Versuch untersucht werden, in welcher Weise sich die untersuchten Zellkulturen durch die zunehmende Kulturzeit genetisch verändern.

In der vorliegenden Arbeit konnten in 5 von 7 verwendeten JA die entsprechenden Zellkulturen und Primärgewebe mit der Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung verglichen werden. In zwei Fällen - AF680 und AF691 - war eine Kultivierung nicht in dem Umfang möglich, der für eine Untersuchung mittels CGH notwendig gewesen wäre, sodass in diesen Fällen lediglich die entsprechenden Ergebnisse der Untersuchungen des Primärgewebes vorliegen. Ein Vergleich war daher nicht möglich.

Im Folgenden ist ein Beispiel für eine mittels CGH karyotypisierte Metaphase eines juvenilen Angiofibroms (Fall AF895, Abb. 4.2.a) dargestellt.

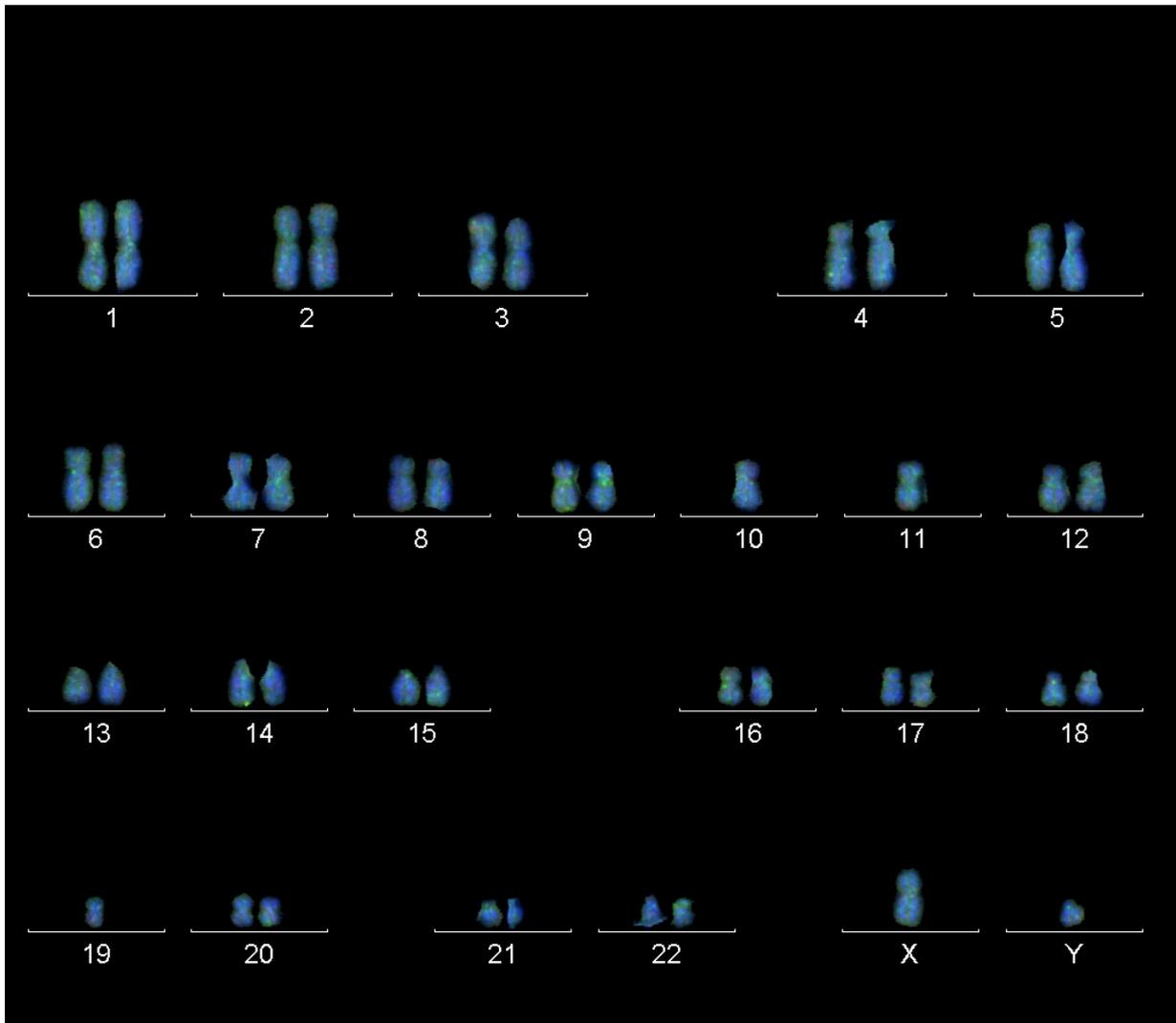


Abb. 4.2.a: Mittels CGH karyotypisierte Metaphase des Falles AF895

In Abbildung 4.2.b ist das entsprechende Ratio Profil dieses Falles abgebildet. Dabei gibt die erste Zahl unterhalb des Chromosoms das Chromosom selbst an und die zweite in Klammern stehende Zahl die Anzahl der in die Auswertung einbezogenen Chromosomen, aus welchen der entsprechende Mittelwert errechnet wurde. Links der Chromosomen sind die Verluste in rot, auf der rechten Seite die Gewinne in grün aufgetragen. Die Länge der entsprechenden Balken entspricht hierbei dem von der Veränderung betroffenen Abschnitt des Chromosoms.

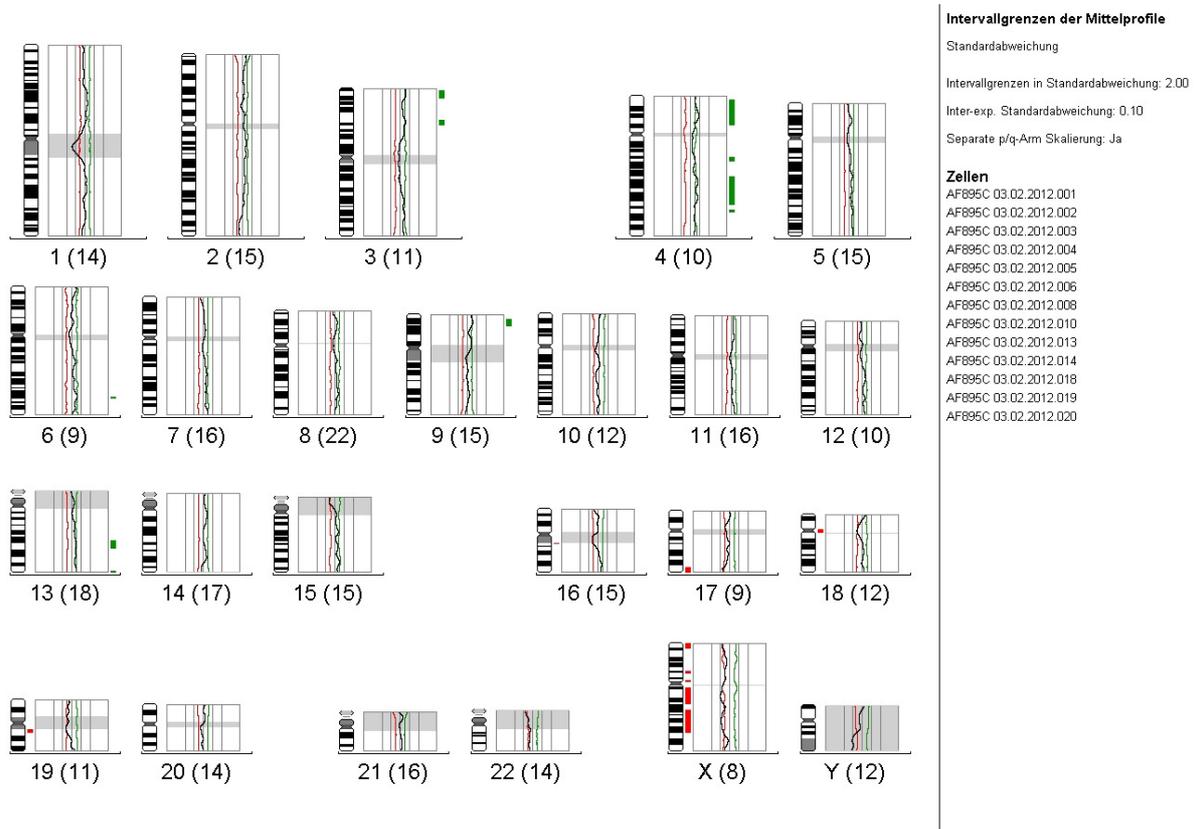


Abb. 4.2.b: Ratio Profil des Falles AF895, Gewinne sind grün, Verluste rot dargestellt

Im folgenden Diagramm (Abb. 4.2.c) sind die entsprechenden Veränderungen aller bisher in unserer Arbeitsgruppe untersuchten Proben abgebildet. Hierbei lassen sich diejenigen Chromosomen bzw. Chromosomenbereiche identifizieren, auf denen gehäuft entsprechende Veränderungen auf DNA-Ebene vorliegen. Diese graphische Darstellung zeigt, dass beispielsweise auf Chromosom 12 typischerweise chromosomale Gewinne und auf Chromosom 19 überwiegend Verluste vorliegen.

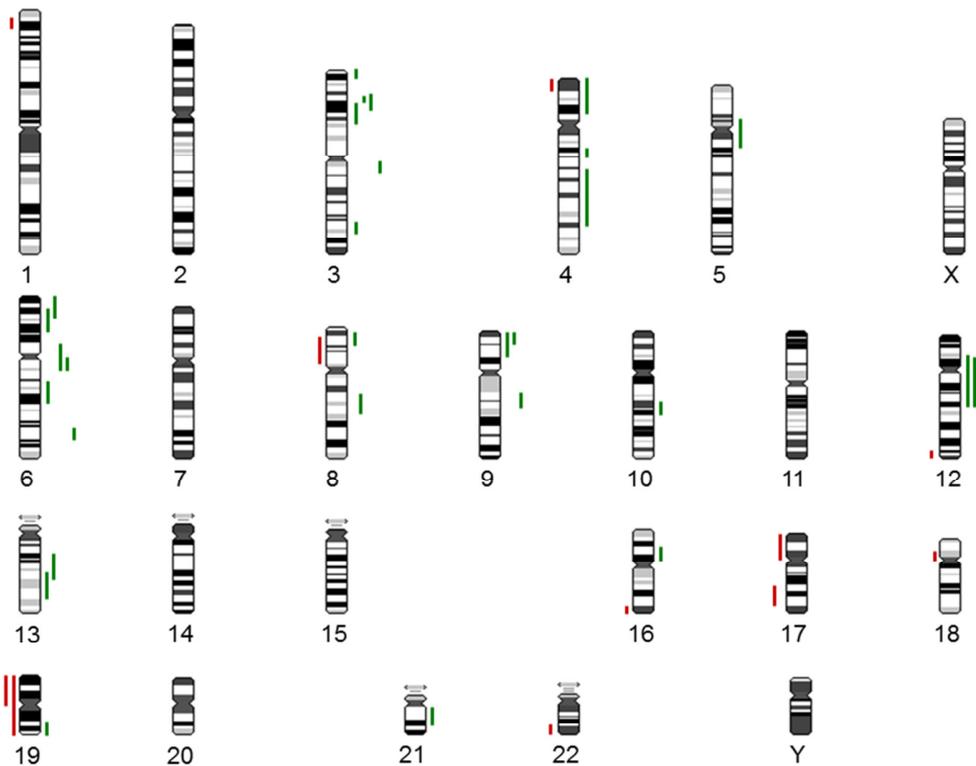


Abb. 4.2.c: Ideogramm der CGH Ergebnisse: n= 6

Fall 356 Gewebe, Fall 357 Gewebe, Fall 896 Gewebe, Fall 895 C Gewebe, Fall 680 Gewebe, Fall 691 Gewebe
Veränderungen der Geschlechtschromosomen wurden nicht berücksichtigt

Die folgende Tabelle 4.2 zeigt zusammengefasst die von uns im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Primärtumore sowie die in den entsprechenden Zellkulturen nachgewiesenen Veränderungen. Diese sind entsprechend der Nomenklatur der ISCN (ISCN, 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Tommerup N (eds); Karger S, Basel 2005) aufgeführt (Shaffer et al., 2005).

Tab. 4.2: CGH-Ergebnisse der untersuchten juvenilen Angiofibrome. A = Alter; ish cgh enh = vermehrtes Vorliegen von chromosomalem Material in der CGH, del = vermindertes Vorliegen von chromosomalem Material in der CGH - Nomenklatur der CGH nach ISCN (2005), übereinstimmende Regionen zwischen Gewebe und Zellkultur

Ergebnisse

wurden fett gekennzeichnet.

Fall	A	Art	CGH-Ergebnisse
AF 356	13	Gewebe	ish cgh enh (6q11-q13, 9p23pter, 12p11-p11.2, 12q11-q15), del (19p, 22q13.2-q13.3, X)
		Zellkultur	ish cgh enh (4q13.3-q21.3, 12p13.1pter, 12q11-q13.1), del (13q32qter, 18q22qter, 20p11.2pter)
AF 357	18	Gewebe	ish cgh enh (3q12-q13.1, 5p11-p13.1, 5q11.1-q12 , 6p11-p12, 6q12, 9q13-q21.3 , 12p11.1-p13.2 , 12q11-q13.1), del (1p36.1-p36.2 , 8p12-p22, 12q24.3qter, 17q22-q24)
		Zellkultur P5	ish cgh enh (5q11.2-q12 , 9q13-q22.1 , 12p12.3pter , 12q12-q13.1), del (1p34.1-p36.1 , 1q41-q43, 18p11.2-p11.3, 20q11.2-q12, 22q13.1qter)
		Zellkultur P10	ish cgh enh (4q21.2-q24, 4q28, 6q16.1-q22.2, 13q13-q21.2), del (1p33-p36.3 , 7p21pter, 8p11.2-p12, 9q34.1qter, 16p, 17p11.1-p11.2, 17q11.1-q21.2, 17q24, 18p11.1-p11.3, 19p, 20q11.1-q12)
		Zellkultur P15	ish cgh enh (2q23-q35, 3p21.3-p24.3, 3q13.3-q26.3, 4q22-q24, 5q14-q23.2, 5q31.3-q34, 6q16.1-q24, 8q13-q23, 10q23.1-q24.3, 11q21-q23.3, 12q14-q23, 13q21.1-q22, Xp11.2-p22.2, Xq21.1qter), del (6p11.1-p12, 7q11.1-q11.2, 16, 17p, 17q11.1-q21.1, 18p, 18q11.1-q12.1, 19, 22, Y)
AF 680	13	Gewebe	ish cgh enh (3p21.3-p22, 6p21.3-p23, 6q16.1-q21, 8q21.1-q21.3, 10q22.1-q22.3, 13q14.1-q21.1, 21q21-q22.1), del (17p, 19)
		Zellkultur	kein ausreichendes Wachstum
AF 691	15	Gewebe	ish cgh enh (6p22.3pter, 8p22-p23.1, 19q13.1-q13.3), del (4p16pter, 16q24qter, Xp21.3-p22.3)
		Zellkultur	kein ausreichendes Wachstum
AF 895	12	Gewebe A	ish cgh enh (12p11.2-p12.3, 12q12-q13.1, 16q21-q22)
		Gewebe B	ish cgh enh (3p25pter, 3p14.1-p21.3, 3q26.1-q26.2, 4p13-p16, 4q21-q21.3, 4q24-q31.3, 6q24, 9p21-p24, 12q14-q21.2, 13q21.3-q31), del (18p11.1-p11.2 , X, Y)
		Zellkultur A	ish cgh enh (12q12), del (7q11.2, 10p14-p15, 17p12pter, 18p11.1-p11.2)
AF 896	15	Gewebe	ish cgh enh (3p22 , 16p11.2-p12), del (4q32, X)
		Zellkultur	ish cgh enh (3p22 , 8q23-q24.1, 13q12.3-q14.1, X), del (16p)
AF 3493	13	Gewebe	ish cgh del (3p25pter , 3q28qter, 4p14-p15.1 , 12p, 19p13.2pter)
		Zellkultur	ish cgh enh (6q24-q26, 19p13.2pter 9), del (3p26pter , 4p13-p15.1)

In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Angiofibrome konnten eine Vielzahl sowohl unterschiedlicher als auch gleich gerichteter genetischer Veränderungen nachgewiesen werden.

Dabei zeigten sich in den untersuchten Zellkulturen und den Primärgeweben insgesamt 75 numerische Veränderungen, wobei 41 DNA-Gewinne sowie 34 DNA-Verluste beobachtet wurden. In der Gruppe der Primärgewebe fanden sich 27 Gewinne und 19 Verluste. In den untersuchten Zellkulturen zeigte sich die folgende Häufigkeitsverteilung: 14 DNA-Gewinne standen 15 DNA-Verlusten gegenüber.

Eine Ausnahme bildete das Gewebe des Tumors AF3493: Hier konnten nur Verluste auf den Chromosomen 3, 4, 12 und 19 detektiert werden. In allen anderen Geweben fanden sich sowohl Gewinne als auch Verluste. Die höchste Zahl an Veränderungen wurde im Gewebe des Tumors AF895 beobachtet. Hier lagen Gewinne auf den Chromosomen 3, 4, 6, 9, 12 und 13 sowie Verluste auf Chromosom 18, X und Y vor. In der parallel dazu untersuchten Zellkultur wurden 4 Veränderungen nachgewiesen, wobei die Chromosomenabschnitte 3p26-pter und 4p13-p15.1 Verluste und 6q24-q26 und 19p13.2-pter Gewinne aufzeigten.

Im Fall AF357 zeigte das entsprechende Nativgewebe zwei Veränderungen. Hier lagen Verluste auf Chromosom 1, 8, 12 und 17 Gewinne auf Chromosom 3, 5, 6, 9 und 12 vor.

Mit Ausnahme der Chromosomen 11, 14 und 15 waren in dieser CGH-Studie alle Chromosomen von mindestens einer genetischen Veränderung betroffen. Am häufigsten fanden sich Veränderungen auf Chromosom 12 (4/7, 57%). Diese wurden in den Tumoren AF356, AF357 und AF895 sowohl im Gewebe als auch in der Zellkultur nachgewiesen, während sie im Fall AF3493 nur im Primärgewebe detektiert wurden. Dabei handelte es sich um Gewinne, welche hauptsächlich in der Region 12q11-qter zu finden waren. Ebenfalls sehr häufig von Veränderungen betroffen war das Chromosom 3 (5/7, 71%). Hier fanden sich Verluste in den Fällen AF3493 sowohl im Gewebe wie auch der Zellkultur im Bereich von 3p25-pter sowie im Gewebe im Bereich von 3q28-qter. Der Fall AF357 zeigte Gewinne im Bereich von 3q12-q13.1. Der Fall AF896 zeigte sowohl im Gewebe wie auch in der Zellkultur eine Amplifikation bei 3p22, im Fall AF680 lag eine solche bei 3p21.3-p22 vor. AF895 zeigte im untersuchten Gewebe Gewinne auf 3p25-pter, 3p14.1-p21.3 und 3q26.1-q26.2.

Vergleicht man das von uns untersuchte Primärgewebe mit den entsprechend kultivierten Zellkulturen, so zeigten sich insgesamt 12 vergleichbare Veränderungen, die sowohl im Gewebe wie auch in der Zellkultur vorlagen. Am häufigsten lagen diese dabei auf Chromosom 12 (4/8, 50%) vor. Des Weiteren waren gleichsinnige Veränderungen auf den Chromosomen 1, 3, 4, 5, 9 und 18 zu finden.

Im Fall AF3493 zeigten sich Verluste bei 3p25-pter bzw. 3p26-pter sowie 4p14-p15.1 bzw. 4p13-p15.1 in Gewebe und Zellkultur. Der Fall AF356 zeigte vergleichbare Amplifikationen im Bereich von 12q11-q15 im Gewebe bzw. 12q11-q13.1 in der untersuchten Zellkultur.

Im Fall AF357 gelang eine Kultivierung bis zur Passage P15. So war es in diesem Fall möglich zu untersuchen, inwieweit sich die Zellen durch eine verlängerte Kultivierungsdauer verändern. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß, dass mit steigender Kultivierungsdauer auch die Anzahl an chromosomalen Veränderungen zunahm (siehe Tab. 4.2). So konnten in diesem Fall in der Passage P5 insgesamt 9 Veränderungen (5 Verluste/ 4 Gewinne) erfasst werden, in der Passage P10 stieg diese Zahl bereits auf 15 (11 Verluste/ 4 Gewinne) und in P15 sogar auf 24 Veränderungen (10 Verluste/ 14 Gewinne). Des Weiteren zeigten in den hohen Passagen andere Chromosomen Veränderungen als noch zu einem früheren Zeitpunkt der Kultivierung. Lagen beispielsweise in der frühen Kultur P5 Verluste im Bereich von 1p34.1-p36.1 vor, fand sich diese Veränderung zwar noch in der Passage P10, jedoch nicht mehr in P15. So gilt festzuhalten, dass mit steigender Kultivierungsdauer auch die Anzahl an chromosomalen Veränderungen zunimmt.

4.3 Charakterisierung der Angiofibrom-Zellkulturen mittels Immunfluoreszenz

Das juvenile Angiofibrom setzt sich neben Zellen des Immunsystems hauptsächlich aus Fibroblasten und Endothelzellen zusammen (Wendler et al., 2007; Pauli et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob sich in den mittels Stückchenkultur angezogenen Zellkulturen diese beiden Zelltypen nachweisen lassen.

Als spezifischer Marker zum Nachweis von Endothelzellen wurde CD31 ausgewählt. Gegen Vimentin gerichtete Immunfluoreszenzfärbungen sollten entsprechend Fibroblastenzellen anfärben.

In diese Untersuchung konnten insgesamt 8 Zellkulturen juveniler Angiofibrome eingeschlossen werden. Dabei handelte es sich um Zelllinien der Fälle AF356, AF357, AF3076, AF3109, AF3428, AF3459, AF3493 und AF3544. Die folgenden Aufnahmen zeigen beispielhaft die entsprechenden Untersuchungsergebnisse der Zellkultur AF3076.

In der folgenden Abbildung 4.3 sind die entsprechenden Immunfluoreszenzfärbungen - markiert mit den spezifischen Antikörpern α -Vimentin sowie α -CD31- dargestellt. Als Negativkontrolle wurde jeweils eine Färbung ohne spezifischen Antikörper durchgeführt.

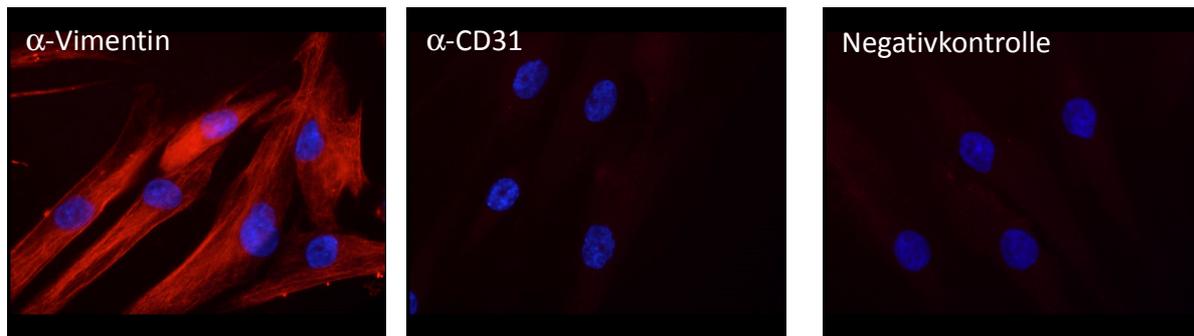


Abb. 4.3: Immunfluoreszenzaufnahmen des Falles AF3076, gefärbt mit den Antikörpern anti-CD31, anti-Vimentin und eine entsprechende Kontrolle ohne Antikörper. Als Sekundärantikörper kam Cy3 und zur unspezifischen Färbung der Zellkerne Dapi zur Anwendung.

In allen Zellen der untersuchten Zellkultur AF3076 ließ sich eine Expression von Vimentin nachweisen. Dem gegenüber konnte kein spezifischer Nachweis einer CD31-Expression erbracht werden (Tabelle 4.3).

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzfärbungen der untersuchten Angiofibrom-Zellkulturen

Fall	α-Vimentin	α-CD31
AF356	positiv	negativ
AF357	positiv	negativ
AF3076	positiv	negativ
AF3109	positiv	negativ
AF3428	positiv	negativ
AF3459	positiv	negativ
AF3493	positiv	negativ
AF3544	positiv	negativ

So lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die im Folgenden verwandten Zellkulturen aufgrund ihres Expressionsmuster als endothelzellefreie, Vimentin-positive Zellkulturen beschrieben werden konnten.

4.4 In vitro Differenzierung juveniler Angiofibrom-Zellkulturen

Ausgehend von der Tatsache, dass es sich bei den verwendeten Zellkulturen juveniler Angiofibrome ausschließlich um endothelzellefreie Zelllinien handelt, galt es nun zu untersuchen, inwieweit sich dies unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren verändert. Dabei wurden als spezifische Wachstum- und Differenzierungsfaktoren VEGF sowie bFGF gewählt. VEGF fördert sowohl die Proliferation von Endothelzellen als auch die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Endothelzellen (Choy et al., 2001; Zachary, 2001). bFGF gilt als wichtiger Regulator der Vasculo- und Angiogenese (Presta et al., 2005) und hat einen synergistischen Effekt auf die Regulation von VEGF (Stavri et al., 1995; Segehezzi et al., 1995). Die endogene Expression beider Wachstumsfaktoren wurde bereits in den Stromazellen des juvenilen Angiofibroms selbst nachgewiesen (Schiff et al., 1992; Brieger et al., 2004).

Im folgenden Versuchsaufbau wurden die Zellkulturen AF3076, AF3459, AF3493 sowie AF3544 und als Kontrollgruppe eine Hautzellkultur einer gesunden Spenderin (H3210) eingeschlossen. Insgesamt wurden drei Gruppen gebildet. Die Zellen der ersten Gruppe wurden mit einem Standardmedium behandelt, welches zusätzlich die Differenzierungsfaktoren 10 ng/ml VEGF sowie 5 ng/ml bFGF enthielt. Die Zellen der zweiten Gruppe wurden zum Vergleich nur mit dem reinen Standardmedium ohne weitere Zusätze kultiviert.

Die unterschiedlichen Kulturansätze wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet. Entsprechende lichtmikroskopische Aufnahmen erfolgten vor jedem Mediumwechsel, welcher alle 2 Tage erfolgte. Des Weiteren wurden die Zellen an den Tagen 0, 7, 14 sowie 21 immunfluoreszenztechnisch mit dem entsprechenden Antikörper α -CD31 gefärbt sowie nochmals zum Zeitpunkt T=0 mit α -Vimentin. Zum Zeitpunkt T=0 zeigte keine der untersuchten Zellkulturen einen positiven Nachweis für CD31, jedoch ausnahmslos für Vimentin, was sich somit mit den unter 4.3 aufgeführten Voruntersuchungen deckte.

Im Anschluss wurden die Zellkulturen analog dem oben beschriebenen Vorgehen mit VEGF/bFGF bzw. dem reinen Standardmedium behandelt. Nach dem Zeitraum von 7 Tagen konnte im Rahmen einer erneuten Immunfluoreszenzfärbung bereits in einem Fall (AF3544) unter dem Einfluss von VEGF eine Expression von CD31 in 1% der untersuchten Zellen beobachtet werden. Die übrigen Zellkulturen exprimierten weiterhin kein CD31. Die von uns als CD31-positiv beschriebenen Zellen konnten dabei sowohl aufgrund ihrer entsprechenden Färbeeigenschaften als auch aufgrund der typischen Morphologie identifiziert werden. Zum Zeitpunkt T=14 gelang der Nachweis von CD31 bereits in drei der untersuchten Fälle (AF3544, AF3459, AF3076). Dabei stieg die Anzahl der positiven Zellen im Fall AF3544 auf ca. 4%. Im Fall AF3459 lag der prozentuale Anteil der CD31-positiven Zellen bei ca. 0,5% und im Fall

AF3076 bei 1%. Ebenso zeigte eine sehr kleine Anzahl an nicht behandelten Zellen (<0,01%) des Falles AF3076 eine positive Färbung für CD31.

Am Tag 21 exprimierten unter der Behandlung mit VEGF alle untersuchten Angiofibromkulturen CD31. Dabei lagen die Werte im Bereich von 2 - 10% der auf einem Objektträger fixierten Zellen. Im Fall AF3544 zeigte sich in ca. 7,5% der untersuchten Zellen eine Expression des Oberflächenmarkers, im Fall AF3493 und AF3076 lag der Wert bei 4% und im Fall AF3459 bei 2%. Es gilt jedoch festzuhalten, dass zum Zeitpunkt T=21 in allen nicht mit VEGF/ bFGF behandelten Kulturen ebenfalls vereinzelt CD31-positive Zellen nachweisbar waren. Dieser Wert lag jedoch in einem Bereich von 1 bis 5 Zellen pro Objektträger und ist daher mit einem Wert von <0,01% der jeweils untersuchten Zellen.

Die als Kontrolle dienende Hautzellkultur exprimierte in keiner der durchgeführten Färbungen über den Zeitraum von 21 Tagen CD31 - weder in der Gruppe ohne Wachstumsfaktoren noch unter dem Zusatz von VEGF/ bFGF.

Im Folgenden sind exemplarisch die zum Zeitpunkt T=21 angefertigten Aufnahmen des Falles AF3459 sowie der Kontrolle H3210 abgebildet.

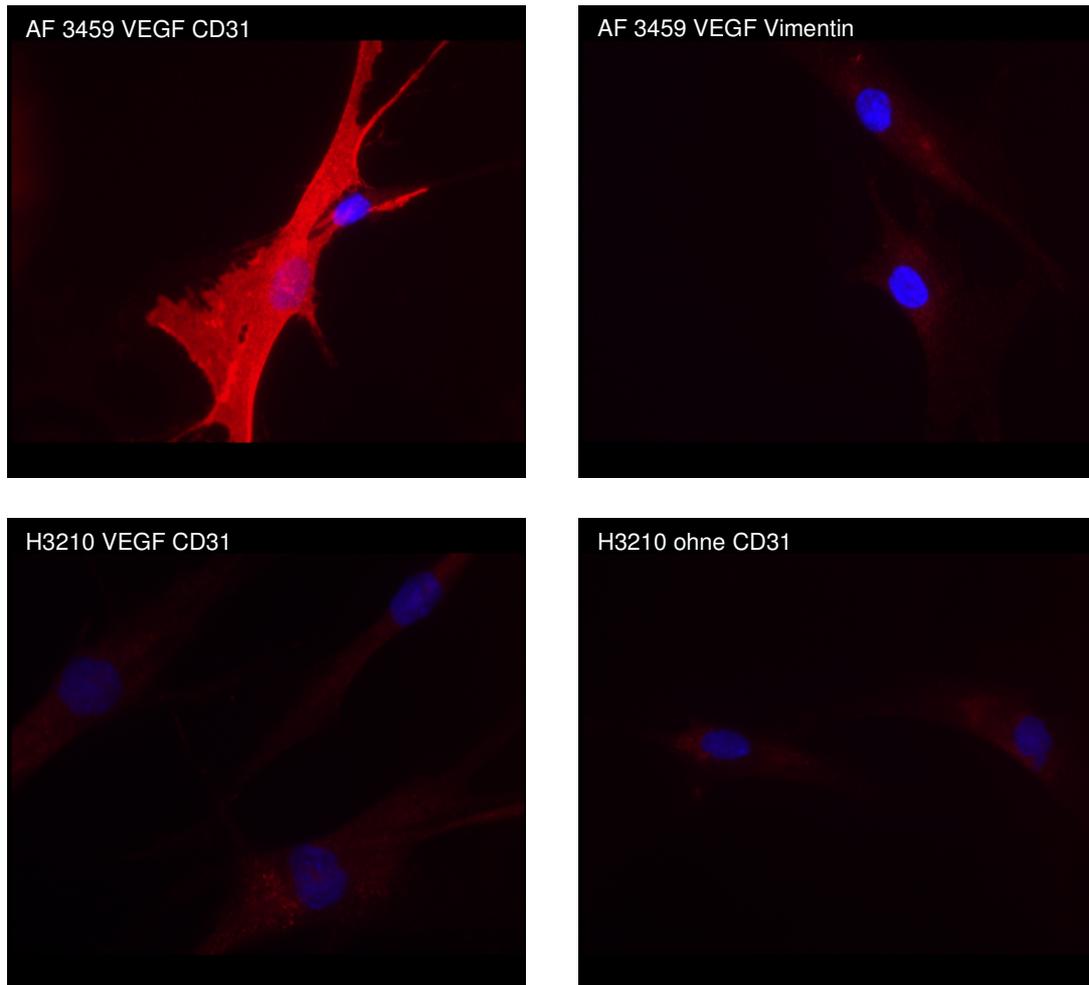


Abb. 4.4: Beispielhafte Färbung einer Angiofibromzellkultur in der oberen Reihe (AF3459) sowie der Kontrollkultur in der unteren Reihe (H3210) zum Zeitpunkt T=21 unter dem Einfluss von VEGF. Antikörpernachweis von-CD31 mit dem Sekundärantikörper Cy3 (rot), Kerngegenfärbung mit DAPI (blau).

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der einzelnen Kulturansätze zusammengefasst. Dabei wurde zusätzlich zu jeder Probe eine Kontrolle ohne Antikörperzugabe durchgeführt. Diese wurde im Folgenden mit „neg“ bezeichnet. Die Spalte „Zusatz“ beschreibt dabei die Zugabe der entsprechenden Wachstumsfaktoren.

Tab. 4.4: Ergebnisse der CD31-Fluoreszenzfärbung verschiedener AF-Kulturen mit und ohne Zusatz von VEGF/bFGF über den Zeitraum von 21 Tagen.

		Immunfluoreszenzfärbung				
Fall	Zusatz	Antikörper	Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 21
AF3544	kein	neg	0	0	0	0
	kein	α -CD31	0	0	0	<0,01%
AF3544	VEGF/bFGF	neg	0	0	0	0
	VEGF/bFGF	α -CD31	0	1%	3-5%	5-10%
AF3493	kein	neg	0	0	0	0
	kein	α -CD31	0	0	0	<0,01%
AF3493	VEGF/bFGF	neg	0	0	0	0
	VEGF/bFGF	α -CD31	0	0	0	3-5%
AF3459	kein	neg	0	0	0	0
	kein	α -CD31	0	0	0	<0,01%
AF3459	VEGF/bFGF	neg	0	0	0	0
	VEGF/bFGF	α -CD31	0	0	0-1%	1-3%
AF3076	kein	neg	0	0	0	0
	kein	α -CD31	0	0	<0,01%	<0,01%
AF3076	VEGF/bFGF	neg	0	0	0	0
	VEGF/bFGF	α -CD31	0	0	1%	3-5%
H3210	kein	neg	0	0	0	0
	kein	α -CD31	0	0	0	0
H3210	VEGF/bFGF	neg	0	0	0	0
	VEGF/bFGF	α -CD31	0	0	0	0

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die verwendeten, primär CD31-negativen Zellkulturen unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren VEGF sowie bFGF im Zeitverlauf sehr wohl CD31 als Endothelzellmarker exprimieren. Jedoch zeigten die einzelnen Zellkulturen auch ohne den Einfluss von Wachstumsfaktoren in einzelnen Fällen eine Expression von CD31. Diese lag jedoch in einem Bereich von <0,01%.

4.5 CD31-positiven AF-Kulturen

4.5.1 Anzucht

Die bisherigen in vitro Differenzierungsversuche warfen die Frage auf, inwieweit eventuell bereits vorhandene CD31-positive Zellen einen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse ausüben. Um dieser Frage nachzugehen, musste das Protokoll zur Anzucht der Angiofibromzellkulturen entsprechend modifiziert werden, da die nach dem in 3.1.3 beschriebenen Protokoll etablierten Zellkulturen keine relevante Anzahl an CD31-positiven Zellen aufwiesen. Zur Austestung unterschiedlicher Isolationsprotokolle wurden frische Proben aus den Tumoren der Fälle AF896, AF1017 sowie AF1041 verwendet.

Für die ersten Vorversuche wurde die Proben des Falles AF896 unter sterilen Bedingungen in ca. 3 x 3 x 3 mm große Stücke geschnitten und über Nacht in Pronase verdaut. Im Anschluss wurden das Gewebe *gedounct* und die herausgelösten Zellen mitsamt den restlich angedauten Stückchenkulturen ausplattiert und in einem speziellem Endothezellmedium (Promocell) kultiviert. Zum direkten Vergleich wurden zwei Proben aus gesundem Tonsillen-Gewebe auf die gleiche Weise behandelt. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass bei vergleichbarer Größe der verwendeten Gewebe im Falle des Tonsillen-Gewebes nach einem Tag 5×10^8 Zellen nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu gelang im äquivalenten AF-Gewebe der Nachweis von lediglich 4×10^6 Zellen, wobei eine sehr große Anzahl an zerstörten Zellen und Fasern verzeichnet wurde. Eine anschließend durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung zeigte jedoch erneut keine CD31-positiven Zellen in der AF-Zellkultur und nur eine einzige positive Zelle in der Tonsillenzellkultur.

Da Pronase im Sinne einer Protease die Zellwände entscheidend schädigen und hierdurch die Anzahl an vitalen Endothelzellen verringern kann, wurde im nächsten Schritt eine Dispase zum Herauslösen der Endothelzellen aus dem Gewebeverband verwendet. Ein weiterer Faktor, der einen Einfluss auf die Vitalität der zu isolierenden Zellen hat, ist das *douncen*. Durch die hohe mechanische Belastung bei diesem Vorgang besteht die Möglichkeit, dass die Zellen platzen und dadurch nicht mehr verwendet werden können. Daher wurde bei der nachfolgenden Isolierung auch auf diesen Arbeitsschritt verzichtet. Demnach wurden die Stücke des verwendeten Tumors AF1017 nach dem Verdau über Nacht nur vorsichtig mit einer sterilen Schere ausgedrückt und die entstandene Zellsuspension mit den restlichen Stückchen auf einem 100µm Nylonfilter mit Medium gewaschen. Im Anschluss wurden die ausgeschwemmten Zellen in Erythrozytenlysispuffer aufgenommen, für 10 min bei 350 G zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen erneut in 4,5 ml sterilem Erythrozytenlysispuffer

aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde die Lyse der roten Blutkörperchen mit 45 ml 0,9% steriler NaCl gestoppt. Im Wechsel wurde die Lösung dann für jeweils 10 min bei 360 G zentrifugiert und dieser Vorgang weitere zwei Mal wiederholt. Danach wurden die Zellen erneut in einem Endothelzellmedium ausplattiert und kultiviert. In den im Anschluss durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen konnte eine relativ große Anzahl an CD31-positiven Zellen nachgewiesen werden. Die bei der Isolierung nicht verwendeten bzw. angedauten und ausgedrückten Stückchen wurden parallel mit dem Standardmedium (Fibroblastenmedium) des Stückchenkulturprotokolls kultiviert.

Analog zu diesem Protokoll wurde mit dem Fall AF1041 verfahren, sodass von beiden AF-Fällen Kulturen für die entsprechende Fragestellung verwendet werden konnten.

4.5.2 Differenzierungsverhalten unter dem Einfluss von Propranolol

Im nächsten Versuchsansatz sollte nun gezeigt werden, ob die in 4.4 auch ohne Zusatz von VEGF/bFGF nachgewiesenen CD31 positiven Zellen, aus differenzierungsfähigen Zellen neu entstanden oder sie möglicherweise den primären Untersuchungen aufgrund ihrer geringen Anzahl entgangen sind und sich erst nach ihrer Expansion in späteren Passagen nachweisen ließen. Hierzu wurden neu etablierte Zellkulturen (siehe Kap. 4.5) verwendet, welche bereits zu Beginn der Untersuchung nachweisbar CD31- positive Zellen enthielten, um anhand dieser die Vermehrungsrate der CD31positiven Zellen unter den Versuchsbedingungen zu bestimmen. Um den Effekt von eventuell endogen produziertem VEGF und bFGF auf die Endothelzellendifferenzierung *in vitro* zu untersuchen, wurde der nicht-selektive β -Blocker Propranolol eingesetzt. Propranolol gilt als Hemmer der endogenen VEGF- und bFGF-Expression und wird bereits erfolgreich in der Therapie juveniler Hämangiome eingesetzt (Leaute-Labreze et al., 2008).

Zur Untersuchung wurden AF-Zellkulturen von 2 Tumoren, welche mit jeweils unterschiedlichen Medien etabliert wurden, in Standardfibroblastenmedium weiter kultiviert und zum einen mit VEGF/bFGF und zum anderen mit Propranolol behandelt. Nach einem Zeitraum von 3 Wochen wurden die Zellen erneut mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die entsprechenden Ergebnisse sind in nachstehender Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tab. 4.5: Ergebnisse der CD31-Immunfluoreszenzfärbung der AF-Zellkulturen AF1017 sowie AF1041 unter dem Einfluss von VEGF/ bFGF und Propranolol. Gefärbt wurden hierbei die Kulturen, die mittels einem Endothelzellmedium bzw. Fibroblastenmedium isoliert wurden.

CD31-Immunfluoreszenzfärbung				
Zellkultur	Isolierungsmedium	Zusatz	Tag 0	Tag 21
AF1017	Fibroblastenmedium	Kein	<0,01%	<0,01%
		Propranolol		Ca. 0,0008%
		VEGF/bFGF		0,15%
AF1017	Endothelzellmedium	Kein	2,5%	0,18%
		Propranolol		Ca. 0,0005%
		VEGF/bFGF		1,15%
AF1041	Fibroblastenmedium	Kein	<0,01%	<0,03%
		Propranolol		<0,0001%
		VEGF/bFGF		0,26%
AF1041	Endothelzellmedium	Kein	0,45%	0,53%
		Propranolol		Ca. 0,0004%
		VEGF/bFGF		0,37%

Die Ergebnisse zeigen, dass In den mittels Endothelzellmedium etablierten Zellkulturen führte das dem Standardkulturmedium im Verlauf der weiteren Kultivierung zugesetzte VEGF/bFGF innerhalb von 21 Tagen nicht zu einer Vermehrung der CD31-positiven Zellen. Im Vergleich dazu kam es in der Gruppe, welche mit dem Fibroblastenmedium etabliert wurde unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren zur einer Zunahme der CD31-positiven Zellen. In allen untersuchten Gruppen führte jedoch der Zusatz von Propranolol nach einem Zeitraum von 3 Wochen zu einer deutlichen Reduktion der CD31-positiven Zellzahl. Hierbei war der Effekt in den beiden Endothelzellmediumgruppen am deutlichsten. Hier ließ sich im Falle AF1017 die Anzahl der CD31-positiven Zellen, welche zum Zeitpunkt T=0 bei 2,5% der untersuchten Zellen eines Objektträgers lag, auf einen Wert von 0,0005% der Zellen reduzieren.

4.6 Aortenring-Assay

Aufgrund der Tatsache, dass sich im vorangehenden Versuch eine deutliche Expression von CD31 unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren VEGF sowie bFGF induzieren ließ, aber auch in den unbehandelten Zellkulturen vereinzelte CD31-positive Zellen vorhanden waren, stellte

sich die Frage, inwieweit die Zellen selbst eventuell bestimmte, die Angiogenese stimulierende Wachstumsfaktoren sezernieren. In bisherigen Untersuchungen konnte bereits nachgewiesen werden, dass der Zusatz von Propranolol in unbehandelten JA-Kulturen zu einer Hemmung der Differenzierung von CD31 positiven Zellen führte, was für eine Hemmung der endogenen VEGF-Sekretion durch dieses Pharmakon sprechen könnte. Aus diesem Grund wurde der Überstand zweier Zellkulturen, welchen außer dem in allen Medien vorhandenen FKS keine weiteren Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden, bei -80 °C asserviert. Hierbei sollte im Anschluss mittels des Aortenring-Assay untersucht werden, ob Propranolol einen Einfluss auf diese Angiogenesefähigkeit hat.

Der Aortenring-Assay wurde mit dem Überstand aus insgesamt 2 AF-Zellkulturen (AF3459, AF3076) sowie einer Kontroll-Haut-Zellkultur (H3210) durchgeführt. Als Kontrolle wurde frisches Medium ohne Zusätze verwendet. Außerdem wurden zwei weitere Ansätze eingesetzt, in denen das nicht mit Zellen in Kontakt gekommene Medium zum einen mit VEGF/bFGF (10ng/ml VEGF bzw. 5ng/ml bFGF) und zum anderen mit Propranolol (5ng/ml) angereichert wurde.

Nach sechs Tagen wurde die Fläche vermessen, über der sich im Verlauf die einzelnen Sprouds gebildet haben. Für jede der untersuchten Angiofibromzelllinien, der Hautzelllinie sowie der Kontrollgruppe wurden jeweils sechs Aortenringe eingebettet und das entsprechende arithmetische Mittel errechnet. In den Ansätzen, bei denen dem Zellkulturmedium VEGF bzw. Propranolol zugesetzt wurde, kamen jeweils 2 Aortenringe zur Verwendung.

Tab. 4.6.a: Aufstellung der Mittelwerte der nach 6 Tagen vermessenen Fläche der ausgewachsenen Sprouds

Aortic ring assay Sproudfläche (Tag 6) (mm ²)						
Ratte	Kontrolle	AF3459	AF3076	H3210	VEGF	Propranolol
1	6,69	4,52	6,17	4,45	12,57	1,72
2	9,16	4,14	1,48	5,14	8,52	3,8
3	10,92	4,03	4,14	2,59		
4	12,17	0,26	7,86	3,48		
5	8,82	3,70	8,55	5,36		
6	9,72	3,96	7,81	3,31		
Mean	9,58	3,44	6,00	4,06	10,55	2,76
SD	1,88	1,58	2,73	1,10	2,86	1,47
SEM	0,77	0,64	1,11	0,45	2,03	1,04

Die Ergebnisse zeigen, dass in den verwendeten Zellkulturüberständen keine die Angiogenese signifikant steigernde Faktoren vorhanden sind. Vielmehr zeigen die Untersuchungen, dass unter dem Einfluss von JA-Zellen das Wachstum der Sprouds in einem erheblichen Maße gehemmt wird. So lag die gemessene Fläche in diesen Versuchsansätzen deutlich unter der Kontroll- und auch der mit VEGF behandelten Vergleichsgruppe. Für die Kontrollgruppe konnte eine mittlere Fläche von 9,58 mm², für die JA-Gruppen jedoch von nur 3,44 mm², 6,00 mm² bzw. 4,06 mm² gemessen werden. In der VEGF-Gruppe lag die Fläche im Bereich der Kontrollgruppe bei 10,55 mm². Die Gruppe, welche mit Propranolol behandelt wurde, zeigte ebenfalls ein deutlich verringertes Wachstum mit 2,76 mm² und lag damit noch unter dem Niveau der JA-Gruppen.

Darüber hinaus wurde am sechsten Tag die Länge der entsprechenden Sprouds in den verschiedenen Ansätzen erfasst.

Tab. 4.6.b: Aufstellung der nach 6 Tagen vermessenen Länge der ausgewachsenen Sprouds

Aortic ring assay Sproudlänge (Tag 6) (µm).						
Ratte	Kontrolle	AF3459	AF3076	H3210	VEGF	Propranolol
1	1273	1019	1252	998	2224	987
2	1412	1198	837	1169	1213	941
3	1871	1001	1124	1044		
4	1528	625	1336	1256		
5	1228	918	1345	1067		
6	1780	1237	1301	773		
Mean	1515,33	999,67	1199,17	1051,17	1718,50	964
SD	264,07	220,49	194,92	165,13	714,88	32,53
SEM	107,81	90,02	79,58	67,42	505,50	23,00

Auch hier zeigten die Ansätze der entsprechenden Zellkulturen keine signifikante Veränderung im Sinne einer Verlängerung der entsprechenden Sprouds. In der Gruppe der JA zeigte sich sogar eine deutlich kürzere Sproudlänge. So lag diese in der Kontrollgruppe im Schnitt bei 1515,33 µm. In der Gruppe der JA konnten Längen von 999,67 µm, 1199,17 µm bzw. 1051,17 µm gemessen werden. In der Gruppe, die mit VEGF behandelt wurde, lagen die Sproudlängen

auch leicht über dem Niveau der Kontrollgruppe bei 1718,50 μm . Unter dem Einfluss von Propranolol zeigte sich auch hier eine deutliche Reduktion auf 964 μm .

So kann als Ergebnis dieser Untersuchung festgehalten werden, dass die untersuchten Zellkulturüberstände keine Faktoren enthalten, die in einem erheblichen Maß die Angiogenese fördern bzw. mittels dieses Versuchsaufbaus nachgewiesen werden können. Des Weiteren wurde unter dem Einfluss von JA-Kulturüberständen sowie Propranolol die Sproutlänge entsprechend reduziert.

4.7 Angiogenese ELISA

Aufgrund der Ergebnisse des Aortenring-Assay, in welchem keine signifikante Steigerung des Angiogenese-Potentials der untersuchten Zellüberstände nachzuweisen war, sondern im Gegenteil eine Hemmung dieses Potentials erfasst wurde, führten wir zur Quantifizierung von eventuell vorhandenen proangiogenetischen Faktoren einen Angiogenese-ELISA durch. Hierbei sollte auch untersucht werden, ob sich die Menge an Wachstumsfaktoren unter dem Einfluss von JA-Zellen im negativen Sinne verändert. Im folgenden Versuchsaufbau untersuchten wir daher die Zellüberstände nicht nur auf das Vorhandensein von VEGF und bFGF, sondern auch auf $\text{TNF}\alpha$, IGF1, IL6, $\text{TGF}\beta$, EGF sowie Leptin. Für diesen Versuch wurden die Zellkulturen über mehrere Tage in Standardmedium mit lediglich 1% (und nicht wie zuvor mit 10%) FKS kultiviert. Untersucht wurden zum einen die drei bzw. sechs Tage alten Mediumüberstände der AF-Zellkultur AF895 im Vergleich zu frischem Zellkulturmedium. Zum anderen untersuchten wir als Nullwert das Standard-Kulturmedium ohne FKS. In einem weiteren Ansatz wurde dem Zellkulturmedium zusätzlich Propranolol in einer Konzentration von 50 μM zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Tab. 4.7: Ergebnisse der Angiogenese ELISA-Untersuchung der Zellkultur AF895

Angiogenese ELISA						
Probe Faktor	Frisches Medium ohne FKS ohne Zellen	Frisches Medium	Medium ZK Tag 3	Medium ZK Tag 6	Medium ZK +Propranolol Tag 3	Medium ZK +Propranolol Tag 6
TNF α	0,138	0,114	0,116	0,135	0,173	0,113
IGF1	0,226	0,232	0,239	0,228	0,254	0,244
VEGF	0,137	0,116	0,112	0,106	0,110	0,107
IL6	0,161	0,141	0,142	0,123	0,128	0,130
bFGF	0,159	0,127	0,122	0,108	0,113	0,122
TGF β	0,162	0,158	0,159	0,140	0,149	0,139
EGF	0,154	0,131	0,138	0,114	0,123	0,116
Leptin	0,163	0,153	0,146	0,123	0,164	0,131

Die Ergebnisse dieser Untersuchung bestätigten jene des Aortic ring assay: In den untersuchten Zellüberständen ließ sich im Vergleich zur durchgeführten Kontrolle mit reinem Zellkulturmedium innerhalb der Nachweisgrenze kein signifikanter Anstieg der entsprechenden Angiogenesefaktoren nachweisen. Weder durch die Zugabe von 1% FKS noch durch den β -Blocker Propranolol konnten diese Werte in signifikanter Weise gesteigert werden. Auch veränderten sich die Werte unter dem Einfluss der Zellen der Zellkultur AF895 in keinem relevanten Ausmaß. Ein Verbrauch bzw. die Sekretion dieser Faktoren durch Zellen konnte somit ausgeschlossen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Werte für IGF1 in allen untersuchten Proben über dem Niveau der anderen Faktoren lagen. Da dies aber in allen Proben einschließlich der Kontrolle mit reinem Zellkulturmedium nachweisbar war, ist davon auszugehen, dass bereits jenes eine hohe Konzentration dieses Faktors enthielt. Auch in diesem Falle veränderte sich die gemessene Menge von IGF1 weder durch das Vorhandensein der Zellkulturen noch durch FKS in einem signifikanten Maße.

4.8 Wachstumsverhalten unter dem Einfluss von Propranolol

Aufgrund des positiven Einflusses von Propranolol auf Hämangiome bei Kindern und auf der Grundlage der Theorie, das juvenile Angiofibrom stelle in ähnlicher Weise wie ein Hämangiom eine vaskuläre Malformation dar, stellte sich nun die Frage, ob dieser nicht-selektive β -Blocker auch einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Angiofibrom-Zellkulturen hat. Während der bereits durchgeführten Versuche konnte bereits eine Wachstumshemmung unter dem Einfluss von Propranolol beobachtet werden. Zur Quantifizierung dieses Sachverhalts wurde der nachfolgende Versuch durchgeführt.

Hierfür wurden die AF-Kulturen AF691 und AF895 sowie ZF07 als Kontrolle verwendet. Nachdem 200.000 Zellen pro Six-Well ausgesät wurden, verglichen wir die Zellzahlen der Gruppen, welche mit Propranolol behandelt wurden, mit jenen, die ohne einen entsprechenden Zusatz kultiviert wurden, über den Verlauf von 12 Tagen zu den Zeitpunkten T=4, T=8 und T=12.

Die Ergebnisse der Untersuchung sind im nachfolgenden Diagramm (Abb. 4.9) aufgetragen.

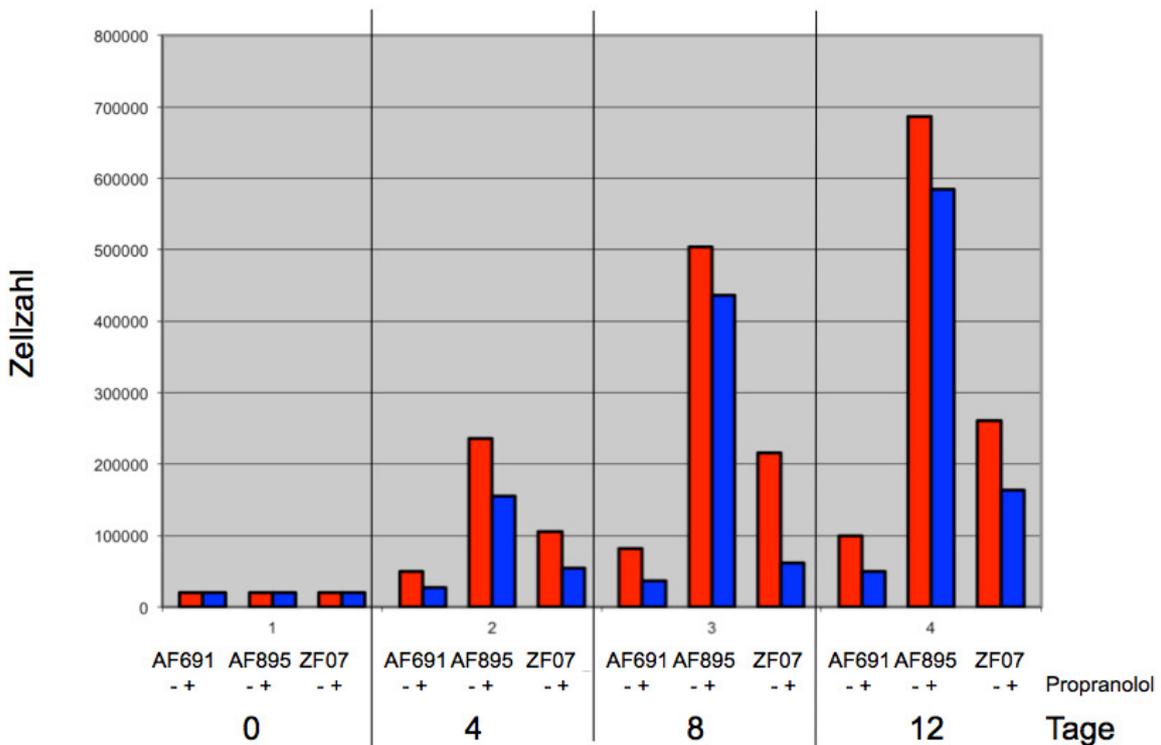


Abb. 4.8: Zellzahlen der Kulturen AF691, AF895 sowie ZF07 unter dem Einfluss von Propranolol nach 0, 4, 8 und 12 Tagen (+ mit Zugabe von Propranolol, - ohne Propranolol)

In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Propranolol einen Einfluss im Sinne einer Wachstumshemmung auf Angiofibrom-Zellkulturen hat. Diese Wachstumshemmung konnte in allen drei untersuchten Zellkulturen nachgewiesen werden. Sie lag hierbei im Niveau von ca. 15% (AF895) bis zu 49% (AF691) nach einem Zeitraum von 12 Tagen. Darüber hinaus zeigte auch die Kontrolle ZF07 über den untersuchten Zeitraum eine deutliche Wachstumshemmung. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass Propranolol einen wachstumshemmenden Einfluss auf Angiofibrom-Zellkulturen hat, dieser jedoch nicht spezifisch für diese Kulturen ist.

5. Diskussion

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Ausgangsgewebe und Zellkultur

Das juvenile Angiofibrom stellt eine benigne Tumorentität dar, von der überwiegend männliche Jugendliche in und um den Zeitraum der Pubertät betroffen sind. Hauptmerkmale sind ein destruierendes Wachstum sowie eine sehr ausgeprägte Vaskularisation, die ein hohes operatives Risiko bedingten. Histologisch ist dieser Tumor durch ein bindegewebiges Stroma, in welches eine Vielzahl irregulärer Gefäßstrukturen eingebettet sind, gekennzeichnet. Aufgrund der äußerst geringen Prävalenz juveniler Angiofibrome sind die Möglichkeiten der Untersuchung einer repräsentativen Anzahl stark eingeschränkt. Die Kultivierung einer primären Zellkultur aus entsprechendem Tumorgewebe ist dabei eine Möglichkeit, die für weiterführende Untersuchungen von entscheidender Bedeutung ist. Neben unserer Arbeitsgruppe in Homburg ist es bisher nur noch unserem Kooperationspartner in Erlangen gelungen, repräsentative Kulturen mit einer ausreichend hohen Zellzahl zu etablieren. So war ein Ziel dieser Arbeit die Etablierung weiterer primärer Zellkulturen, um einen ausreichend großen Pool an Angiofibromkulturen zu schaffen und somit repräsentatives Material für weiterführende Studien zur Verfügung zu stellen. In den nach einem Standardprotokoll im Rahmen dieser Arbeit etablierten neun JA-Kulturen fanden sich jedoch nahezu ausschließlich mesenchymale Zellen und lediglich vereinzelte Endothelzellen vor allem zu einem späteren Zeitpunkt der Kultivierung. Auch in Versuchsansätzen, in denen das verwendete Gewebe zunächst homogenisiert und verdaut wurde, konnte keine quantitative Veränderung der Anzahl CD31-positiver Zellen erzielt werden. Lediglich im Rahmen eines sehr vorsichtigen Verdaus ohne Homogenisierung und mit Hilfe eines speziellen Endothelzell-Mediums konnte über einen kurzen Zeitraum eine geringe Anzahl an Endothelzellen in zwei Mischkulturen mit mesenchymalen Zellen kultiviert werden (siehe Kap. 4.6).

Histologisch gesehen ist das juvenile Angiofibrom ein sehr inhomogen aufgebauter Tumor. So finden sich im Bereich der Tumorkapsel eine Vielzahl an CD31-positiven Gefäßen, die u. a. die hohe Blutungsneigung erklären, wohingegen im „Tumorrinneren“ eher Vimentin-positive mesenchymale Zellen zu finden sind. Aufgrund des zum Zeitpunkt der operativen Versorgung zumeist weit fortgeschrittenen Stadiums und der damit verbundenen Größe ist es in den meisten Fällen nicht möglich, eine en-Bloc-Resektion durchzuführen. So wurde für die Etablierung der Kulturen fragmentiertes Tumorgewebe mit einer maximalen Größe von ca. 3 cm verwendet, welches nur bedingt definierten Tumor-Arealen - wie beispielsweise dem Randbereich oder dem

Tumorinneren - zuzuordnen war. In zukünftigen Untersuchungen sollte daher ein besonderes Augenmerk auf die Lokalisation des verwendeten Gewebes im Tumor gelegt und somit auch Bereiche ausgewählt werden, die zur Kultivierung einer größeren Anzahl an Endothelzellen, reich an Gefäßstrukturen sind. Prinzipiell wäre es denkbar, dass der Tumorbereich, aus dem eine Zellkultur etabliert wird, für den später vorliegenden Zelltyp von entscheidender Bedeutung ist - vor allem in Bezug auf den inhomogenen Aufbau des Tumorgewebes. Entsprechende Untersuchungen, die diese These stützen, stehen zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch aus.

Einen entscheidenden Einfluss auf die etablierten Zellen hat das verwendete Kultivierungsmedium. Im Rahmen des angewandten Standardprotokolls konnten lediglich Vimentin-positive mesenchymale Zellen etabliert werden. Nur vereinzelt ließen sich in diesen Kulturen CD31-positive Endothelzellen nachweisen. Hierbei muss jedoch festgehalten werden, dass mesenchymale Zellen bedeutend anspruchsloser in Bezug auf ihre Kulturbedingungen sind als Endothelzellen und auch die meisten anderen Zelltypen. Das verwendete Kultivierungsmedium, welches für mesenchymale Zellen zudem äußerst gute Bedingungen bietet, förderte diesen Umstand zusätzlich. Das zeigte auch die Tatsache, dass sich unter dem Einfluss eines selektiven Endothelzellmediums die Anzahl an CD31-positiven Zellen deutlich steigern ließ.

Für einen Teil des Versuchs 4.5 wurden Zellkulturen benötigt, welche zum Zeitpunkt T=0 bereits eine höhere Anzahl an CD31-exprimierenden Endothelzellen aufwiesen. Um dies zu erreichen, wurde das Etablierungsprotokoll modifiziert und dementsprechend ein Selektivmedium verwandt. Durch diese Änderungen konnte zwar die Anzahl an CD31-positiven Zellen in den Kulturen deutlich gesteigert werden, eine rein selektive Anzucht von Endothelzellen war jedoch nicht möglich. So konnte auch in diesen Kulturen eine hohe Anzahl an Vimentin-positiven mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden. Sollte für kommende Fragestellungen eine reine Endothelzellkultur benötigt werden, müssten die Zellen im Vorfeld der Kultivierung bzw. experimentellen Verwendung beispielsweise mittels einer *Fluoreszenzaktivierten Zellsortierung* (FACS) oder mit Hilfe von *Magnetic beads* separiert werden. Damit wäre eine spezifische Anzucht möglich und das Risiko einer „Verunreinigung“ durch andere Zellarten könnte minimiert werden.

5.1.2 Vergleichende genomische Hybridisierung

Mittels der vergleichenden genomischen Hybridisierung lassen sich Aussagen über die quantitativen Veränderungen von genomischem Material innerhalb einer Probe treffen. So gibt sie Hinweise auf potentielle Tumorsuppressorgene in Bereichen, die häufig deletiert sind sowie

auf eventuelle Proto-Onkogene in Bereichen mit Gewinnen bzw. Amplifikationen. Strukturelle Veränderungen wie zum Beispiel Translokationen oder Insertionen lassen sich mit dieser Methode jedoch nicht darstellen. Ebenso können sehr kleine quantitative Veränderungen oder gar Punktmutationen nicht erfasst werden. Des Weiteren ist es nicht möglich, Gewinne oder Verluste des Gesamtgenoms im Sinne beispielsweise einer Tri- oder Tetraploidie abzubilden (Kallioniemi et al., 1994). Die Frage nach der Auflösungsgrenze für Gewinne und Verluste muss unterschiedlich beantwortet werden. Vervielfältigungen von DNA-Bereichen können hierbei nur erfasst werden, wenn sie eine Größe von mehr als 5 Mbp besitzen, während eine Auflösung unterhalb von 2 Mbp selbst bei optimalsten Bedingungen nicht möglich ist (Pieper et al., 1995; Forozan et al., 1997). Kleinere Bereiche bis zu einer Größe von 2 Mbp werden nur dann erkannt, wenn die entsprechende Amplifikation mindestens 5-10fach vorliegt und die Metaphase-Chromosomen optimal gespreitet sind. Auflösungsgrenzen von bis zu 1 Mbp werden in jenen Fällen beschrieben, in denen eine sehr gute Hybridisierungsqualität vorliegt und die entsprechende Sequenz mindestens 10fach amplifiziert vorliegt (Forozan et al., 1997). Einzelne Autoren beziffern die Auflösungsgrenze bei entsprechend guter Hybridisierung mit Werten von bis zu 90 kbp (Joos et al., 1993).

Darüber hinaus stellt die CGH eine mögliche klonale Heterogenität nur ungenügend dar, da Veränderungen erst dann abgebildet werden können, wenn sie mit einem Anteil von 35% innerhalb des untersuchten Materials vorliegen (Schröck et al., 1994; Joos et al., 1995).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass bei der Aufarbeitung nicht nur Tumorgewebe, sondern auch benachbartes Bindegewebsstroma verwendet wird. Somit würde auch ein nicht unerheblicher Anteil an Normal-DNA, d. h. nicht pathologische DNA in die Untersuchung eingeschlossen und das Ergebnis der CGH maßgeblich verfälschen (Schröck et al., 1994; Kallioniemi et al., 1994). Ferner muss die zu untersuchende Tumor-DNA in einem gleichen Verhältnis zur Kontroll-DNA vorliegen, um eine gute Hybridisierungsqualität und ein dementsprechend valides Ergebnis zu erzielen. Um dies sicherzustellen, sollte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der verwendeten DNA erfolgen.

Im Rahmen der Interpretation der Ergebnisse einer CGH-Untersuchung müssen verschiedene Chromosomenbereiche einer genauen Begutachtung standhalten. Hierbei sollten die zentromernahen Bereiche der Chromosomen 1, 9 und 16 sowie die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen und auch die Geschlechtschromosomen kritisch beurteilt werden, da es aufgrund der hier auftretenden Polymorphismen zu Artefakten in den Hybridisierungsergebnissen kommen kann (Kallioniemi et al., 1994; Karhu et al., 1997).

Einen weiteren Einfluss auf das Untersuchungsergebnis haben die verwendeten Metaphasechromosomen. Diese unterscheiden sich in ihrer Qualität oft maßgeblich und

genügen nicht in allen Fällen den hohen Ansprüchen, die an die Untersuchungen gestellt werden. Einflüsse, die auf die Qualität der Chromosomen einwirken, sind beispielsweise die umgebende Raumtemperatur sowie die Luftfeuchtigkeit. Durch welche Mechanismen diese letztendlich auf die Spreitung und Trocknung der Chromosomen einwirken, ist bis dato nicht abschließend geklärt (Hliscs et al., 1997). So kann beispielsweise eine Überdenaturierung, aber auch ein ungenügender Verdau Einfluss auf die Hybridisierung der Chromosomen nehmen (Kallioniemi et al., 1994). Aus diesem Grund sollte vor der Durchführung einer CGH-Untersuchung eine Kontrolle der jeweiligen Präparate erfolgen. Diese kann beispielsweise mit einer Test-DNA durchgeführt werden, deren genetische Veränderungen bekannt sind und welche bei einer entsprechenden Qualität der Chromosomen mittels CGH reproduzierbar sind.

5.1.3 Immunfluoreszenzfärbung

Eine zentrale Frage der hier vorliegenden Arbeit war, welchen Einfluss verschiedene Wachstumsfaktoren auf das Expressionsmuster von JA-Zellkulturen haben. Hierfür wurden diese Kulturen primär mittels Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert, um sie dann im zweiten Schritt nach Behandlung mit beispielsweise VEGF und bFGF weiter zu untersuchen.

Die Immunfluoreszenz bietet neben den unterschiedlichen Markern, die zur Bestimmung verschiedener Zellarten zur Verfügung stehen, die Möglichkeit Veränderungen innerhalb der Expression dieser Marker einer Zellpopulation über die Zeit zu quantifizieren. Hierfür ist die Aussaat einer fest definierten Zellmenge und die entsprechend sorgfältige Auszählung der Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten jedoch unabdingbar. Auf diese Weise besteht neben der Bestimmung der Expression eines Oberflächenmarkers auch die Möglichkeit, das Wachstumsverhalten der Zellkulturen unter dem Einfluss verschiedener Faktoren zu analysieren.

Die Immunfluoreszenz stellt durch die Spezifität der verwendeten Antikörper und ihrer hohen Bindungsaffinität ein äußerst sensibles und spezifisches Untersuchungsverfahren zur Detektion verschiedener Expressionsmuster bzw. Antigene dar. So ist die Untersuchung einer Zellsuspension bis auf ein Einzelzellniveau möglich und es können dementsprechend auch kleine Mengen an Zellen, welche das fragliche Antigen exprimieren, detektiert werden. Ein Problem der Immunfluoreszenz zeigt sich jedoch bei sehr großen Zellzahlen. So ist es nur sehr aufwendig möglich schwer möglich Zellzahlen von mehreren Millionen Zellen entsprechend sensitiv auszuzählen. Die Methode der FACS-Analyse bieten einen entscheidenden Vorteil, da hiermit auch große Zellzahlen innerhalb eines kurzen Zeitraums auf die enthaltenen Zellarten untersucht werden können. Einen Rückschluss aus der Intensität der Färbung auf die

entsprechende quantitative Expression des detektierten Proteins lässt dieses Verfahren jedoch nicht zu.

Ein weiterer Vorteil der Immunfluoreszenz ist die Tatsache, dass im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden auf Proteinebene eine Fixierung intakter Zellen möglich ist und nicht erst eine Lysierung der Zellen erfolgen muss. Hierdurch ist es möglich, die Expression eines Proteins einer bestimmten Zelle zuzuordnen und diese auch spezifisch in verschiedenen Phasen ihres Zyklus zu untersuchen.

Neben der Frage nach der quantitativen Expression eines Antigens kann die Immunfluoreszenz auch einen Überblick über das Antigen-Verteilungsmuster innerhalb einer Zelle geben. So kann unter Umständen differenziert werden, ob beispielsweise ein Protein lediglich im Bereich der Zelloberfläche vorhanden ist oder auch im Zellinneren exprimiert wird.

Soll jedoch ein genauer quantitativer Nachweis über die Menge an Zellen, welche ein bestimmtes Protein exprimieren, erfolgen, so ist die FACS besser geeignet. Mittels FACS kann die Frage beantwortet werden, wie viele Zellen innerhalb einer Zellkultur tatsächlich positiv für ein bestimmtes Protein sind, da sie die Möglichkeit bietet, eine vollständige Kultur quantitativ zu untersuchen. Dies wäre ebenfalls durch Immunfluoreszenz möglich, jedoch mit einem weitaus größeren Aufwand verbunden. Ein zusätzlicher Vorteil von FACS ist, dass Zellen in einem nativen, unfixierten Zustand untersucht werden können und nach der Zählung oder Selektion für die weitere Kultivierung zur Verfügung stehen. Bei der Immunfluoreszenz ist dies aufgrund der Fixierung nicht möglich.

Neben der Untersuchung von Zellkulturen ist die Immunfluoreszenz bestens geeignet, Zellen innerhalb eines Gewebeverbandes oder Gewebeschnittes zu detektieren, ohne dabei den Zellverband zerstören zu müssen (Buchwalow et al., 2005). So ist es möglich, in primärem Tumormaterial entsprechende Zellen zu detektieren und ihre Verteilung innerhalb des Gewebes zu untersuchen. Bezogen auf die Frage, ob mesenchymale Stammzellen eine Rolle in der Pathologie des JA spielen, bietet die Immunfluoreszenz die Möglichkeit, Mehrfachfärbungen durchzuführen. Da die Identifikation von hMSC auf einer Kombination verschiedener Marker basiert, ist die gleichzeitige Untersuchung im Sinne einer Mehrfachfärbung ein geeignetes Nachweis-Mittel sowohl an Gewebeschnitten wie auch in etablierten Zellkulturen. So könnte nicht nur nachgewiesen werden, ob sich hMSC in JA finden, sondern ob es auch entsprechende Bereiche gibt, in denen sie gehäuft vorzufinden sind. Als entsprechender Marker zur Identifikation von Endothelzellen in primären Angiofibromkulturen wurde in dieser Arbeit CD31 (PECAM-1) verwendet. CD31 ist ein von Endothelzellen stark exprimiertes Glykoprotein. Darüber hinaus wird es - allerdings nur schwach - auch in Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Plasmazellen, Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert (DeLisser et al.,

1994; Middleton et al., 2005; Teté et al., 2005). Neben CD31 sind noch eine Reihe anderer Zell-Marker bekannt, die mehr oder weniger spezifisch für Endothelzellen sind. Hierzu gehört beispielweise CD34, welches neben Endothelzellen auch vor allem (von hämatopoetischen Progenitorzellen und perivaskulären Fibroblasten exprimiert wird (Fina et al., 1990; Brown et al., 1991), oder der von Willebrand-Faktor (vWF), der sich neben Endothelzellen auch in Megakaryozyten und Thrombozyten nachweisen lässt (Guan et al., 1999). Ein rein für Endothelzellen spezifischer Marker ist bis dato nicht bekannt.

Des Weiteren wurde Vimentin als Markerprotein verwandt. Vimentin stellt ein Element des Zytoskeletts dar und gehört als Typ 3-Intermediärfilament in die Gruppe der Desmine. Exprimiert wird es im Zytoplasma aller Zellen mesenchymalen Ursprungs und gilt als Marker für mesenchymale Tumoren.

5.2 Ergebnisdiskussion

5.2.1 Ergebnisse der CGH

Eine grundlegende Voraussetzung für die weitere Verwendung der etablierten Zellkulturen war, dass diese entsprechend den Primärtumor repräsentieren. Aus diesem Grund wurden sowohl das native Primärgewebe als auch die daraus kultivierten Zellkulturen mittels der Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) zum Nachweis numerischer Veränderungen verglichen. Ziel war es hierbei, die chromosomalen Veränderungen des Tumors in der daraus etablierten Zellkultur zu bestätigen bzw. das Auftreten von Sekundärveränderungen durch eine längere Kultivierungsdauer sowie aufgrund des artifiziellen Systems der Zellkultur aufzuzeigen.

In einem ersten Schritt wurden sieben AF-Zellkulturen mittels CGH mit ihrem Primärtumor verglichen. Hiermit sollte gezeigt werden, inwieweit im Tumor vorhandene genetische Veränderungen auch in den Zellkulturen nachweisbar sind und diese somit für die weitere Verwendung repräsentativ sind. Hierbei konnte in jedem der untersuchten Fälle Veränderungen erfasst werden, die sich sowohl im Gewebe wie auch in der Zellkultur nachweisen ließen.

Die meisten gleichsinnigen Veränderungen zeigte der Fall AF357 in Form von Gewinnen in den Bereichen von Chromosom 5q, 9q, 12p und 12q sowie eines Verlusts im Bereich von 1p. In den anderen untersuchten Gruppen waren diese nicht ganz so deutlich ausgeprägt, jedoch in allen Fällen vergleichbar. Der Fall AF896 zeigte beispielsweise Gewinne im Bereich von 3p22 sowohl im untersuchten Tumorgewebe wie auch in der Zellkultur. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch bei der Untersuchung der übrigen Fälle erhoben werden, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die für unsere Untersuchungen verwendeten Zellkulturen auf

chromosomaler Ebene gesehen sehr gut mit dem Primärtumor verglichen werden können. Lediglich die Fälle AF680 sowie AF691 konnten mittels dieser Methode leider nicht verglichen werden. Hier war es aufgrund einer zu geringen Menge an kultivierbaren Zellen nicht möglich, eine ausreichend große Menge an DNA für eine CGH zu gewinnen. So können die Ergebnisse dieser beiden Kulturen lediglich zur weiteren Charakterisierung des Tumors im Allgemeinen herangezogen werden.

In der hier vorliegenden Untersuchung konnten mit 41 Gewinnen gegenüber 34 Verlusten eine leicht erhöhte Anzahl an Gewinnen nachgewiesen werden. Auch Brunner und Mitarbeiter (2003) zeigten in ihren Untersuchungen von JA eine Verschiebung des Verhältnisses von chromosomalen Gewinnen zu entsprechenden Verlusten zugunsten der Gewinne und werteten dies als bedeutsam für die Tumorbiologie des JA. Wie aber bereits in Kap 5.1.2 beschrieben kann dies dem Umstand geschuldet sein, dass chromosomale Gewinne mittels CGH deutlich besser zu detektieren sind als entsprechende Verluste. Verglichen mit den Untersuchungen von Heinrich und Mitarbeitern (2007), welche 22 Angiofibrome ebenfalls mittels CGH untersuchten, konnten ihre Ergebnisse dahingehend bestätigt werden, dass in den hier vorliegenden Untersuchungen die Verluste im Bereich von 1p,9q sowie 12q in einigen Fällen nachweisbar waren. Die von Heinrich und Mitarbeitern (2007) nachgewiesenen zahlreichen Veränderungen im Bereich der Geschlechtschromosomen konnten hier in diesem Umfang nicht bestätigt werden. Es gilt jedoch anzumerken, dass die Geschlechtschromosomen in der vorliegenden Untersuchung aufgrund der Artefaktanfälligkeit nicht in die Auswertung einbezogen wurden.

Interessanterweise zeigten drei der untersuchten Fälle (AF356 ZK, AF357 ZK+Gew, AF895 ZK) einen Gewinn auf 12p13, der auch in den Arbeiten von Brunner und Mitarbeitern (2003) sowie Schick und Mitarbeitern (2002) in jeweils einem Fall nachgewiesen werden konnte. Dieser Bereich codiert unter anderem für den von-Willebrand-Faktor (vWF, 12p13.2-13-3). Der vWF wird unter anderem von Endothelzellen gebildet und nimmt eine zentrale Stellung im Bereich der zellulären Blutstillung ein. Eine Erhöhung der Plasmakonzentration des vWF wird bei unterschiedlichen Tumoren beschrieben und korreliert in vielen Fällen mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und somit einer entsprechend ungünstigeren Prognose (Zanetta et al., 2000; Ikeda et al., 2002). So wäre es interessant zu klären, ob Patienten mit einem JA ebenso Veränderungen im Sinne einer vWF-Plasmaspiegel-Erhöpfung zeigen und diese mit dem jeweiligen Tumorstadium einhergeht. Dies könnte dann entsprechend als prognostischer Marker herangezogen werden.

Ebenfalls chromosomale Gewinne konnten in der Konsensusregion 12q13-q14 nachgewiesen werden. Diese Region codiert unter anderem für das Onkogen *MDM2*, welches ein wichtiger

Regulator im p53-Signalweg ist. Das Tumorsuppressorgen *p53*, das bei 50% aller humanen Tumoren mutiert vorliegt (Vasquez et al., 2008), verhindert bei einer entsprechenden Hochregulation den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus und ermöglicht auf diesem Weg die „Reparatur“ eines entsprechenden Schadens oder induziert, wenn dieser Schaden nicht zu beheben ist, die Apoptose (Böcker et al., 2001; Bond et al., 2007). Ist der Schaden beseitigt, blockiert *MDM2* das Tumorsuppressorgen *p53* und markiert es für den Abbau in Proteosomen (Freedman et al., 1999). Über diesen Mechanismus kann *MDM2* indirekt auch als Protoonkogen wirken. So konnte eine Amplifikation und damit Überexpression von *MDM2* in ca. 10% von über 8000 verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Toledo et al., 2007). So wäre es denkbar, dass aufgrund einer Amplifikation von *MDM2* in JA die Fähigkeit zur Selbstreparatur eingeschränkt wird und dies die Entstehung oder Expansion dieses Tumors begünstigt. Veränderungen von *p53* selbst konnten Schick und Mitarbeiter (2005) im Sinne von Verlusten in den von Ihnen untersuchten Angiofibromen nachweisen. Veränderungen im Bereich von 17p13.1 konnten jedoch weder in den von Schick und Mitarbeitern (2011) durchgeführten SNP-Arrays noch in den vorliegenden Untersuchungen erfasst werden.

Eine weitere Veränderung, die in mehreren Fällen nachgewiesen werden konnten, betraf ebenfalls die Konsensusregion 12q13-q14 - hier jedoch den Bereich von 12q13. Ähnliche Gewinne im Bereich von 12q konnten ebenfalls von Heinrich und Mitarbeitern (2007) und Schick und Mitarbeitern (2011) nachgewiesen werden. In den Geweben von drei Tumoren (AF356, AF357, AF895) bzw. zusätzlich in den Zellkulturergebnissen von zwei dieser drei Fälle (AF356, AF357) konnten Gewinne auf 12q13 detektiert werden. Dieser Bereich codiert z. B. für die Activin-Receptor-Like Kinase 1 (ALK1). ALKs gehören in die Gruppe der Rezeptoren für Zytokine der TGF- β -Superfamilie und regulieren die Differenzierung, das Wachstum und auch die Migration und Apoptose von Zellen (Massague, 1998). ALK1 wird dabei ausschließlich auf Gefäßen exprimiert und hier deutlich stärker auf Endothelzellen als auf VSMC (*vascular smooth muscle cells*). Untersuchungen an Mäusen konnten zeigen, dass die Expression auf Gefäßen embryonaler bzw. neugeborener Mäuse am höchsten ist. In der adulten Maus lässt sich ALK1 lediglich noch in der Lunge bzw. im Rahmen der Tumorangiogenese oder Wundheilung nachweisen (Seki et al., 2003). Die Funktionen von ALK1 werden in der Literatur widersprüchlich dargestellt. So postulierten Lamouille und Mitarbeiter (2002), dass ALK1 einen negativen Einfluss auf die Proliferation von Endothelzellen hat und somit zu einer Maturierung von de novo entstandenen Gefäßen führt. Demgegenüber zeigten Goumans und Mitarbeiter (2002), dass ALK1-infizierte EC eine deutlich gesteigerte Proliferation entwickelten. So waren diese Zellen in der Lage, eine Zellücke deutlich schneller zu schließen als untransfizierte Zellen. ALK5 führte im Gegensatz dazu zu einer deutlich verlangsamten Proliferation und damit verbundenem

Schluss der Zelloücke. Daher postulierten sie, dass ALK1 die Aktivierungsphase von Endothelzellen und im Gegensatz dazu ALK5 die Resolutionsphase steuert. Diese Gegenspieler-Funktionen dieser beiden Rezeptoren wurden auch von den Arbeitsgruppen Oh und Mitarbeitern (2000) und Seki und Mitarbeitern (2006) untersucht. Beide kamen jedoch im Vergleich zu Goumans und Mitarbeiter (2002) zu gegensätzlichen Ergebnissen. Ihrer Meinung nach reguliert ALK1 die Resolutionsphase, wohingegen ALK5 für die Aktivierungsphase zuständig ist (Oh et al., 2000; Seki et al., 2006). Da sich die Untersuchungsbedingungen der verschiedenen Arbeitsgruppen - vor allem in Bezug auf Kultivierungsbedingungen und verwendete Zelllinien - erheblich voneinander unterscheiden, müssen zukünftige Untersuchungen diese Fragen klären.

Veränderungen des ALK1-Rezeptors wie z. B. Mutationen führen zu erheblichen Störungen der Angiogenese. So sind ALK-Knock-out-Mäuse aufgrund von Fehlbildungen des blutführenden Systems bereits in der Embryonalphase nicht überlebensfähig (Oh et al., 2000). Die Embryonen zeigten hierbei fusionierte Kapillaren sowie geweitete Gefäße in Kombination mit einer erhöhten Expression von proangiogenen Faktoren wie VEGF. Ebenso erfassten Wu und Mitarbeiter (2006) unter dem Einfluss von ALK1 eine gesteigerte Transkription von VEGF. Im Menschen führen Mutationen des ALK1-Gens zu Morbus Osler (hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie, M. Osler-Rendu-Weber), eine autosomal-dominant vererbliche Erkrankung des Gefäßbindegewebes mit einer Inzidenz von 1 zu 5000 Einwohnern (Faughan et al., 2009). Typische Manifestationen dieser Erkrankung sind punktförmige Angiodysplasien in einer Vielzahl von Organsystemen. Diese Gefäßveränderungen manifestieren sich als arteriovenöse Malformationen im Sinne von Fisteln oder Aneurysmen mit einer deutlich erhöhten Blutungsneigung. Hierbei sind die Kopf-Hals-Bereiche die Praedilektionsorte mit einem Schwerpunkt im Bereich der Nasen- sowie Mundschleimhaut. So zeigen diese Patienten in beinahe 80% der Fälle akute sowie rezidivierende Epistaxisschübe, welche aufgrund ihrer Intensität und Frequenz eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität für die betroffenen Patienten bedeuten (Weik et al., 2000).

Betrachtet man nun das histologische Bild des JA, so zeigt sich auch hier eine große Anzahl an Gefäßanomalien, welche bekanntermaßen für die äußerst ausgeprägte Blutungsneigung dieses Tumors verantwortlich sind. Die mittels CGH detektierten chromosomalen Gewinne geben daher Anlass, in zukünftigen Untersuchungen ein Augenmerk auf dem ALK1-Rezeptor und dessen Veränderungen zu richten. Auch wenn Veränderungen dieses Rezeptors nur bedingt einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen, könnte dies einen weiteren Hinweis auf die Ätiologie dieses Tumors geben.

ALK1 stellt einen wichtigen Rezeptor der TGF- β -Superfamilie dar. Die TGF- β -Superfamilie umfasst mehr als 30 Mitglieder und nimmt wie bereits erwähnt eine entscheidende Position in der Regulation des Wachstums und der Differenzierung von Zellen, aber auch in der Regulation von immunologischen Vorgängen bis hin zur Tumorsuppression ein. Es wird darüber hinaus ein Einfluss auf die Tumorgenese des Kolonkarzinoms, des Mammakarzinoms wie auch des Lymphoms postuliert (D'Abroz et al., 1999). Hierbei hat TGF- β durch eine vermehrte mRNA-Expression von VEGF einen entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese (Saadeh et al., 1999). TGF- β selbst wurde bereits von Dillard und Mitarbeiter (2000) in 19 untersuchten Angiofibromen sowohl im Tumorstroma wie auch im Bereich der Endothelzellen nachgewiesen. Eine Veränderung im Sinne eines chromosomalen Gewinnes im Bereich des für TGF- β codierenden Chromosoms im Bereich 19q13.1-q13.3 konnte in der vorliegenden Untersuchung im Gewebe des Falles AF691 nachgewiesen werden. Diese erhöhte Expression könnte somit über den genannten Mechanismus in Kombination mit einer vermehrten Expression von ALK1 zu einer deutlich gesteigerten Angiogenese führen und somit das expansive Wachstum von JA erklären. Eine weitere häufige chromosomale Veränderung, welche in vier der sechs untersuchten JA nachgewiesen werden konnte, waren Gewinne auf 3p22. Diese Veränderung konnte auch von Schick und Mitarbeitern (2011) in der Untersuchung von 14 AF mittels eines 100K SNP DNA Microarrays in insgesamt sieben Fällen nachgewiesen werden. In dieser Region liegt das Gen, welches für das Protein β -Catenin codiert. β -Catenin ist einer der Haupteffektoren innerhalb des WNT-Signalwegs, welcher eine wichtige Rolle im Rahmen der Embryogenese, aber auch unterschiedlicher Tumorerkrankungen spielt und dessen Einfluss auf die Pathologie des JA bereits intensiv diskutiert wurde (Abraham et al., 2001; Fodde et al., 2001; Fodde, 2003). Ebenfalls eine entscheidende Rolle innerhalb dieses WNT-Signalweges und dessen Regulation spielt das Tumorsuppressorprotein APC. In Zusammenhang mit der Pathologie des JA fand es durch die folgende klinische Beobachtung Aufmerksamkeit: Bei Patienten mit einer familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) wurde eine gesteigerten Häufigkeit JA beobachtet, was auf die Bedeutung von APC in der Pathologie des JA hinweisen kann (Giardiello, 1993). Die als Ursache für die FAP identifizierte Mutation im FAP-Gen auf 5q21 konnte in nachfolgenden Untersuchungen jedoch nicht in JA nachgewiesen werden (Abraham et al., 2001; Guertl et al., 2000; Nishisho et al., 1991). Eine neuere Studie, bei der 21 Patienten mit der Diagnose eines JA bezüglich dem Vorliegen einer FAP befragt wurden, zeigte auch keinerlei signifikante Zusammenhänge zwischen den beiden Erkrankungen oder eine familiäre Häufung von JA (Klockars et al., 2010). Analog zu diesen Ergebnissen wurde auch hier keine Veränderung im Bereich von 5q21 gefunden, wobei jedoch festzuhalten ist, dass Mutationen weit unterhalb der

Auflösungsgrenze der CGH liegen und daher in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht erfasst werden konnten.

Der genaue Einfluss von APC in Bezug auf den WNT-Signalweg, besonders im Hinblick auf β -Catenin, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. β -Catenin liegt bei fehlendem Signal im Zytoplasma an das Protein APC sowie an eine Vielzahl anderer Proteine gebunden innerhalb eines Proteinkomplexes vor und wird durch diese abgebaut. Über eine Phosphorylierung durch die Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) kann β -Catenin im Anschluss mit Ubiquitin markiert durch Proteasomen abgebaut werden (Aberle et al., 1997). Su und Mitarbeiter (2008) konnten jedoch nachweisen, dass APC die Dephosphorylierung des β -Catenins verhindert und somit indirekt dessen Abbau unterstützt. Im Falle eines Signals kommt es zu einer verminderten Phosphorylierung des β -Catenins durch die GSK3 β und einem damit verbundenen verringerten Abbau. Über welchen Mechanismus dies reguliert wird, ist bis heute nicht abschließend geklärt. Kommt es nun zu einem erhöhten β -Catenin-Spiegel innerhalb des Zytoplasmas, wird dieses in den Zellkern transportiert, akkumuliert dort und wirkt als Koaktivator für verschiedene Transkriptionsprozesse wie beispielsweise von *Cyclin D1* und *c-Myc*, welche an der Regulation, der Differenzierung, dem Wachstum und der Invasivität von Zellen beteiligt sind (Shtutman et al., 1999; He et al., 1998; van Noort et al., 2002; Komiya et Habas, 2008). Der Einfluss von β -Catenin auf verschiedene Tumore ist in der Literatur vielfältig beschrieben.

Ein maligner Tumor ist grundsätzlich durch verschiedene funktionelle Eigenschaften gekennzeichnet, die ihn essentiell von gesundem Gewebe unterscheiden. Diese Eigenschaften werden als *hallmarks of cancer* bezeichnet (Hanahan et al., 2000). Hierzu gehört beispielsweise eine stark erhöhte Proliferationsrate, die u. a. für das expansive Wachstum eines Tumors verantwortlich ist und auch durch die beiden Proteine *Cyclin D1* sowie *c-Myc* reguliert wird, welche wiederum durch β -Catenin reguliert werden (Shtutman et al., 1999; He et al., 1998). Ebenfalls entscheidend für die Expansion und das „Überleben“ eines Tumors ist eine ausreichende Gefäßversorgung, die den Sauerstoff- und Nährstoffbedarf des Tumors deckt. Dies wird mittels einer beispielsweise durch VEGF vermittelten Neoangiogenese gewährleistet. Hierbei beeinflusst β -Catenin die Transkription von VEGF sowie im Speziellen die Differenzierung von Endothelzellen (Easwaran et al., 2003; Zhang et al., 2001; Skurk et al., 2005). Auch auf die Fähigkeit der Expansion anderer Gewebe nimmt β -Catenin Einfluss, indem es das Gen *MMP7*, eine extrazellulär wirkende Metalloproteinase, aktiviert, über welche die extrazelluläre Matrix modifiziert und abgebaut wird (Brabletz et al., 1999). Neben diesen Effekten wirkt β -Catenin entscheidend anti-apoptotisch, indem es die Gene für Survivin und BCL-W aktiviert und so eine gewisse Resistenz gegenüber einem Apoptose-Signal hervorruft (Zhang et al., 2001; Lapham et al., 2009).

So kann man zusammenfassend festhalten, dass β -Catenin eine entscheidende Rolle in der allgemeinen Tumorprogression einnimmt und seine Funktion in der Ätiologie des juvenilen Angiofibroms von großem Interesse ist. Eine Studie an 22 JA von insgesamt 16 Patienten konnte zeigen, dass 75% der Fälle eine Mutation im Exon 3 des β -Catenin-Gens aufwiesen (Abraham et al., 2001). Diese Mutation geht mit dem Verlust der Bindungsstelle für GSK3 β einher, woraus eine verminderte Phosphorylierung und damit gleichfalls ein Akkumulation von β -Catenin resultiert. Dabei war sie ausschließlich im Tumorgewebe dieser Patienten und nicht in deren gesundem nasopharyngealen Gewebe nachweisbar. Darüber hinaus wurde auch in Rezidivtumoren diese Mutation nachgewiesen. In weiterführenden Untersuchungen konnten Abraham und Mitarbeiter (2001) ebenfalls eine nukleäre Anreicherung des β -Catenin-Proteins in Stromazellen nachweisen. Die bisherigen Daten unterstreichen, dass in weiterführenden Untersuchungen der Einfluss von β -Catenin auf die Pathologie des JA weiter untersucht werden sollte.

Zusammengefasst konnten in den durchgeführten Untersuchungen bereits aus der Literatur bekannte Ergebnisse bestätigt als auch weitere interessante Kandidatenregionen aufgezeigt werden. So wurden in dieser Arbeit auch Ergebnisse bestätigt, welche mittels einer anderen Methode erhoben wurden wie beispielsweise die Daten von Schick und Mitarbeitern (2011), welche 14 JA mittels SNP DNA Microarray untersuchten. So konnten sieben der von Ihnen erfassten chromosomalen Gewinne auch in der hier beschriebenen CGH-Untersuchung abgebildet werden. Diese lagen in den Bereichen 3q26, 8q22, 8q24, 9p21, 10q22, 12q21 sowie 3p22. Die gefundenen Veränderungen der Bereiche von 18q22.2 (*TSHZ1*) sowie 20q13.3 (*BORIS*) konnten jedoch mittels CGH nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Tatsache, dass die Auflösung der von Schick verwendeten Array-Methode weitaus höher ist als die der CGH, sodass mit ihr auch SNP's detektiert werden können, welches mit der CGH nicht möglich ist.

In einem zweiten Teil dieses Versuchs sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Kultivierungsdauer auf die Zellkulturen hat. Es ist bekannt, dass sich im Rahmen der Kultivierung von Zellen diese in der Anzahl an Aberrationen mit steigender Kultivierungsdauer und Passagierung verändern. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, bis zu welchem Zeitpunkt die verwendeten Kulturen noch als repräsentativ gelten können bzw. es sich bei den nachgewiesenen Veränderungen nicht mehr um primäre, sondern unter Umständen um sekundär aufgrund der Kultivierungsbedingungen erworbene Veränderungen handelt. Im Fall AF357 gelang eine Kultivierung über einen längeren Zeitraum bis zu Passage P15, sodass es dadurch möglich war, auch höheren Passagen zu untersuchen und mit dem Primärtumor zu vergleichen. Im Verlauf der Kultivierung zeigte sich, dass die quantitative Anzahl an

chromosomalen Veränderungen über den Zeitraum kontinuierlich anstieg. In diesen höheren Passagen waren sowohl gleichgerichtete als auch eine gewisse Anzahl neuer Veränderungen nachweisbar. Diese Beobachtungen bestätigten somit, dass für für weiterführende Untersuchungen möglichst auf frühe Passagen der JA-Zellkulturen zurückgegriffen und bei der Verwendung höherer Passagen die Ergebnisse kritisch hinterfragt werden sollten.

5.2.2 Ergebnisse der Differenzierungsversuche

Die von Schick und Mitarbeitern (2001) formulierte Hypothese, das JA sei eine vaskuläre Malformation, deren Grundlage in einer unvollständigen Rückbildung der 1. Kiemenbogenarterie zu suchen sei, liefert einen plausiblen Erklärungsansatz für verschiedene Charakteristika dieses Tumors. So ließe sich hiermit erstmals die charakteristische Durchblutung in Kombination mit einem Zufluss aus der A. maxillaris sowie A. carotis interna erklären, ebenso wie die charakteristische Lage im Bereich des Foramen sphenopalatinum. Warum das JA jedoch überwiegend männliche Jugendliche in und um die Pubertät herum betrifft, lässt sich mit dieser Theorie nicht erklären. Unverändert ist unbekannt, welcher Zelltyp als Tumorzelle des JA anzusehen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss proangiogener Wachstumsfaktoren auf die kultivierten Angiofibromzellkulturen untersucht. So wurden die etablierten Zellkulturen zu Beginn der Versuchsreihe mittels Immunfluoreszenzfärbung auf die Expression von CD31 untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Kulturen primär keine Expression dieses Endothelzellmarkers zeigten. Unter dem Einfluss von VEGF ließ sich dann eine Expression von CD31 über den Zeitraum von 3 Wochen induzieren. So liegt der Rückschluss nahe, dass die Expression von CD31 de novo aus der Differenzierung zuvor nicht vollständig ausdifferenzierter Zellen entstanden sein könnte. Einen möglichen Erklärungsansatz hierfür bieten mesenchymale Stammzellen, sogenannte hMSC. Diese Stammzellen besitzen das Potential, sich unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF entsprechend in Endothelzellen zu differenzieren (Oswald et al., 2004). Der Nachweis entsprechender hMSC gestaltet sich aufgrund der Tatsache, dass bis heute kein eindeutiger Marker bekannt ist, schwer. Vielmehr erfolgt der Nachweis über die Kombination verschiedener Markermuster, wie beispielsweise CD73, CD90 und CD105 bzw. über das Fehlen der Expression von CD14, CD35 und CD45 sowie die Adhärenz auf Plastik und eine entsprechende Differenzierungsfähigkeit (Dominici et al., 2006). Untersuchungen im Hinblick auf eine solche Markerkombination mit der Frage, ob es sich bei den untersuchten Zellen um hMSC handelt, waren im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich. Hierfür könnten beispielsweise die Methode der FACS-Untersuchungen

herangezogen werden, welche es ermöglicht, eine Zellsuspension gleichzeitig auf mehrere vorliegende Marker hin zu untersuchen.

Neben der Expression von CD31 in der mit VEGF/ bFGF behandelten Zellpopulation, zeigten auch vereinzelte Zellen in der unbehandelten Gruppe ebenfalls eine CD31-Expression über den Zeitraum der Kultivierung. Dieser Umstand lässt sich durch verschiedene Ansätze erklären. Zum einen bestünde trotz der Voruntersuchungen die Möglichkeit, dass in den Kulturen bereits vereinzelt Endothelzellen vorhanden waren, welche durch die Immunfluoreszenzfärbung nicht erfasst werden konnten und so erst in den späteren Passagen nach ihrer Expansion aufgrund der höheren Anzahl nachweisbar waren. Dieser Umstand könnte nur durch eine vorherige Separation der Zellen mittels FACS, wie in Kap. 5.1.1 beschrieben, sicher ausgeschlossen werden. Diese technische Möglichkeit stand bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchungen nicht zur Verfügung. Eine zweite Erklärung wäre, dass die JA-Zellen selbst in einem bestimmten Maße VEGF oder andere Faktoren sezernieren, sodass hierdurch eine Differenzierung möglich ist. Zwei Untersuchungen konnten bisher eine erhöhte Expression von VEGF in JA-Gewebe nachweisen (Brieger et al., 2004; Saylam et al., 2006). Aus diesem Grund wurden die Überstände verschiedener Zellkulturen mittels Aortenring-Assay auf ihre Angiogenesefähigkeit hin untersucht. Mit diesem Assay ist es möglich zu untersuchen, ob innerhalb einer Substanz Stoffe vorhanden sind, die eine Angiogenese induzieren können. Als *organ cultur assay* trägt es dem Umstand Rechnung, dass die Angiogenese bzw. Neoangiogenese *in vivo* nicht ausschließlich von Endothelzellen ausgeht, sondern auch von den sie umgebenden Zellen. So schlägt dieser Test eine Brücke zwischen einer *in vivo* und *in vitro* Untersuchung (Blacher et al., 2001). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass das verwendete Material - in diesem Fall die explantierte Aorta einer Ratte - keiner möglichen Veränderung durch beispielsweise Passagierung unterworfen ist (Auerbach et al., 2003). Des Weiteren lässt sich mittels dieses Tests auch die hemmende Wirkung eines Stoffes auf die Angiogenese bestimmen. Eine genaue Identifizierung der Stoffe, ihrer Zusammensetzung oder Quantität ist hiermit jedoch nicht möglich. In der Untersuchung zeigte sich in den Überständen von Angiofibromzellkulturen im Vergleich zu unverwendetem Zellmedium jedoch keine signifikante Steigerung der Angiogenesefähigkeit. Hierbei veränderte sich weder die Länge noch die Quantität der zu messenden Sprouts im positiven Sinne. Es muss daher festgehalten werden, dass mittels dieses Tests kein gesteigertes Angiogenese-Potential - bedingt durch beispielsweise die Sekretion proangiogenetischer Faktoren in das umgebende Medium - nachzuweisen war. Es zeigte sich im Gegenteil in den JA-Zellkulturen eine deutliche Senkung der Angiogenesefähigkeit. So lag sowohl die Sproudlänge als auch die Sproudfäche der Zellüberstände deutlich unter dem Niveau des nicht verwendeten Zellmediums. Eine mögliche

Erklärung wäre, dass die für die Aussprossung neuer Gefäße notwendigen Wachstumsfaktoren durch die Kultivierung bereits so weit verbraucht wurden, dass kein gesteigertes Wachstum mehr möglich war. Demgegenüber zeigte das mit VEGF/ bFGF angereicherte Medium eine Aussprossung, welche über dem Niveau der Kontrolle lag.

Eine weitere Erklärung für die ausbleibende Wachstumssteigerung wäre der Umstand, dass durch die Aufbewahrung der Medien bei -80 °C vor der endgültigen Verwendung diese einen Schaden nahmen, welche ihre Funktion deutlich einschränkte. Aus diesem Grund sollte in zukünftigen Untersuchungen das Medium möglichst zeitnah ohne eine weitere Konservierung zur Anwendung kommen.

Darüber hinaus wäre es auch denkbar, dass die Zellen im Rahmen der Kultivierung Stoffe sezernieren, welche an sich eine Wachstumshemmung bewirken. Hierfür kämen Stoffwechselprodukte oder auch allgemein Abfallprodukte apoptotischer Zellen in Betracht. So sollten in zukünftigen Untersuchungen neben proangiogenetischen auch antiangiogenetische Faktoren in die Analysen einbezogen werden.

Zur genaueren Bestimmung verschiedener Angiogenese-Faktoren führten wir einen ELISA durch. Diese Untersuchung ermöglicht es, die Mengen verschiedenster Faktoren, die einen Einfluss auf die Angiogenese nehmen können, quantitativ zu bestimmen. So wurden die Zellüberstände nicht nur auf das Vorliegen von VEGF, sondern auch auf IGF1, TNF α , IL6 und weitere hin untersucht. Im Gegensatz zum *aortic ring assay* wurden die hierfür verwendeten Zellüberstände sofort der entsprechenden Untersuchung zugeführt und nicht erst bei -80 °C aufbewahrt. So sollte der Gefahr eines Schadens und dadurch bedingten Funktionsverlusts vorgebeugt werden. Trotz dieser Maßnahme bestätigte diese Untersuchung die durch den *aortic ring assay* erhobenen Befund und zeigte keinen signifikanten Anstieg der untersuchten proangiogenen Faktoren. Überraschenderweise konnte auch unter dem Einfluss von 1% FKS kein Anstieg der untersuchten Faktoren erreicht werden. Auch hier sollte die Frage gestellt werden, ob dieses Verfahren sensitiv genug ist, auch kleinste Mengen bzw. deren Veränderungen zu detektieren, oder ob sich die fraglich sezernierte Menge in einem derart geringen Umfang bewegt, dass ein Nachweis mit den hier gewählten Untersuchungsmethoden nicht möglich ist.

Da VEGF als ein entscheidender Faktor in der Angiogenese gilt und eine entsprechende Differenzierung innerhalb von JA-Zellkulturen hin zu Endothelzellen im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage nach dem Einfluss von VEGF auf die Pathogenese des JA. Die Bedeutung von Wachstumsfaktoren innerhalb der Tumorbilogie ist bereits ausreichend bekannt. So werden diese Faktoren von Tumoren sezerniert, um die Kapillareinsprossung sowie deren Proliferation zu induzieren, um

auf diesem Weg eine ausreichende Durchblutung und Nutrition zu ermöglichen. Das Vorliegen von VEGF in den untersuchten Angiofibromen könnte dementsprechend auch auf das expansive Wachstum der Tumore zurückzuführen sein.

Brieger und Mitarbeiter (2004) zeigten, dass in jenen Bereichen des Tumorstromas, die eine vermehrte Expression von VEGF zeigten, auch eine erhöhte Gefäßdichte vorhanden war. Dies erklärt auch die Tatsache, dass ein Großteil der operativ versorgten JA vor einer Operation einer Embolisation zugeführt wird, um den perioperativen Blutverlust zu senken. Durch diese Embolisation kommt es zu einer lokalen Hypoxie, welche durch einen verminderten pO_2 als entscheidender Trigger einer erhöhten VEGF-mRNA-Expression fungieren könnte. So wäre in der Zukunft zu klären, ob entsprechend erhöhte VEGF-Werte auch in vitalem Tumorgewebe zu finden sind. Für eine solche Untersuchung wäre jedoch nicht embolisiertes Gewebe oder eine entsprechende Probe vor einer solchen erforderlich. Aufgrund der erhöhten Blutungsneigung dieses Tumors bei ausgedehnten Befunden ist jedoch ein solches Vorgehen obsolet.

5.2.3 Der Einfluss von Propranolol auf AF-Zellkulturen

Aufgrund der bereits oben erläuterten Theorie einer vaskulären Malformation, stellt sich die Frage nach eventuellen Parallelen zu anderen benignen vaskulären Tumoren. Hämangiome sind als schnell wachsende, histologisch gutartige Tumore des vaskulären Endothels einzuordnen und stellen mit einer Prävalenz von 10-12% die Gruppe der häufigsten gutartigen Tumore im Kindesalter dar (Burrows et al., 1998; Fishman et al., 1993). Hierbei muss jedoch zwischen dem Begriff der vaskulären Malformation und dem infantilen Hämangiom unterschieden werden. Vaskuläre Malformationen sind durch eine angeborene Entwicklungsstörung innerhalb der Embryonalentwicklung bedingt. Daher besteht diese Malformation von Geburt an, wächst entsprechend des körperlichen Wachstums beständig mit und wird in vielen Fällen zu einem späteren Zeitpunkt - wie beispielsweise der Pubertät oder Schwangerschaft - symptomatisch. Des Weiteren zeigen vaskuläre Malformationen im Gegensatz zu Hämangiomen keine Proliferation von Endothelzellen, was durch den fehlenden Einbau von H-Thymidin begründet ist (Mulliken et al., 1982). Die Entdeckung der Wirksamkeit des nicht-kardioselektiven β -2-Blockers Propranolol bei diesen Tumoren legte die Grundlage für neue Therapiekonzepte (Léaute-Labreze et al., 2008; Xiao et al., 2013). Propranolol findet Verwendung in der Therapie verschiedenster kardiovaskulärer Erkrankungen wie der arteriellen Hypertension oder der koronaren Herzkrankheit, aber auch bei nicht kardiologischen Erkrankungen wie beispielsweise der Migräne (Frishman, 2008). Die therapeutische Wirksamkeit führten Léaute-Labreze und Mitarbeiter (2008) auf eine durch Propranolol

verursachte Vasokonstriktion, eine Herabregulation der Expression von VEGF sowie auf eine Triggerung der Apoptose in kapillären Endothelzellen zurück. Lamy und Mitarbeiter (2010) konnten demgegenüber in einer Untersuchung zeigen, dass Propranolol die Proliferation von HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) Zellen, welche einen entscheidenden Faktor in der Angiogenese darstellen, sowie direkt den VEGFR-2-Rezeptor und den damit verbundenen Signalweg beeinflusst. Ein weiterer Mechanismus der Beeinflussung von VEGF durch Propranolol stellt die Hemmung von Noradrenalin dar. Noradrenalin bewirkt als Stresshormon beispielsweise in Ovarialkarzinomen eine vermehrte Expression von VEGF und Matrix-Metalloproteasen (MMP), welche eine allgemeine Rolle bei Tumorprozessen spielen (Sood et al., 2006; Lutgendorf et al., 2002; Lutgendorf et al., 2003). Yang und Mitarbeiter (2006) wiesen sowohl eine vermehrte Expression von β 2-Rezeptoren in Nasopharynx-Karzinom-Zellen wie auch eine durch Noradrenalin bedingte Expression von MMP-2, MMP-3 und VEGF nach. Über eine Blockade dieser Rezeptoren könnte Propranolol nun einen Effekt auf Tumorzellen und die Expression verschiedener proangiogenetischer Faktoren haben. So zeigten Hajighasemi und Mitarbeiter (2010) in einer Untersuchung von PBMC-Zellkulturen (*peripheral blood mononuclear cell*) eine Senkung der VEGF-Sekretion unter der Behandlung mit Propranolol. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob Propranolol einen Einfluss auf die Sekretion von VEGF innerhalb der hier vorliegenden JA-Zellkulturen hat. Dabei stand die spezielle Frage im Vordergrund, welchen Einfluss Propranolol auf das Expressionsverhalten, besonders im Hinblick auf CD31, sowie das allgemeine Wachstumsverhalten hat. So wurden für die Untersuchung zwei Zellkulturen verwendet (AF1017, AF1041), die bereits zu Beginn der Untersuchung eine größere Anzahl an CD31-positiven Zellen aufwiesen. Dies wurde durch die Verwendung eines Endothelzellmediums bei der primären Kultivierung sowie eines im Rahmen dieser Arbeit neu etablierten Isolationsprotokolls erreicht. Hierdurch konnte der Anteil an CD31-positiven Zellen gegenüber denjenigen Kulturen, welche lediglich mit einem Standardzellmedium kultiviert wurden, deutlich gesteigert werden. In diesem Versuchsaufbau konnten die Ergebnisse der Voruntersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass sich die Anzahl an CD31-positiven Zellen unter dem Einfluss von VEGF deutlich steigern lässt, bestätigt werden. So konnte auch in diesem Versuchsaufbau unter dem Einfluss von VEGF/ bFGF eine deutliche Steigerung der Endothelzell-Zahl in der Gruppe der nach Standardprotokoll etablierten Kulturen nachgewiesen werden. In den Kulturen mit einem initial erhöhten Anteil an CD31 verringerte sich die Anzahl dieser Zellen im Verlauf der Kultivierung sowohl unter dem Einfluss von VEGF/ bFGF als auch ohne Wachstumsfaktoren deutlich. In den durchgeführten Voruntersuchungen wiesen auch Kulturen, die primär als endothelzellular beschrieben wurden, nach dem Zeitraum von 21 Tagen eine geringe Anzahl an CD31-positiven Zellen auf. Es stellte sich dabei die Frage, ob diese

Zellen eventuell. zum Zeitpunkt $T=0$ bereits in den Kulturen vorhanden waren und durch die Immunfluoreszenz jedoch nicht erfasst wurden. Es wäre denkbar, dass diese Zellen im Verlauf der Kultivierung hochwuchsen und nach einem Zeitraum von 21 Tagen vermehrt nachzuweisen waren. Ausgehend von dieser Hypothese würde dies jedoch bedeuten, dass die Anzahl an bereits zu Beginn der Kultivierung vorhandenen CD31-positiven Zellen weiter steigen müsste. Dies war in den hier untersuchten Kulturen jedoch nicht der Fall. So zeigte die Kultur AF1017 mit einer primären Endothelzellzahl von 2,5% der untersuchten Zellen nach der Kultivierung lediglich noch einen Wert von 0,18%. In der Kultur AF1041 lag dieser Wert mit 0,53% zwar leicht über dem Ausgangswert von 0,45%, jedoch weit unter dem zu erwartenden Niveau. So ist es sehr unwahrscheinlich, dass diese Zellen der primären Charakterisierung entgangen sind, sondern vielmehr wohl eher *de novo* entstanden sind. Auch hier wäre es zur endgültigen Klärung dieser Frage sinnvoll, entsprechende Versuche mit selektierten Kulturen zu wiederholen.

Des Weiteren konnte in diesem Versuch beobachtet werden, dass auch unter dem Einfluss von VEGF/ bFGF die Anzahl der Endothelzellen über den Zeitraum deutlich unter das Ausgangsniveau sank. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre die These, dass für die Differenzierung der Endothelzellen nicht VEGF, sondern bFGF verantwortlich ist. In dem für die Endothelzellkultivierung verwendeten Endothelzellmedium der Firma Promocell ist kein VEGF, sondern lediglich bFGF enthalten. So wäre eine weitere Steigerung des Effekts durch eine zusätzliche endogene Gabe von bFGF sehr unwahrscheinlich.

Betrachtet man nun die Gruppen, in denen den Kulturen anstatt VEGF Propranolol zugegeben wurde, sieht man hier eine weitere Senkung der Anzahl CD31-positiver Zellen. Dies gilt sowohl für die Gruppen mit einer primär bereits erhöhten Anzahl als auch für die Standardgruppen. Zusammenfassend ist daher festzuhalten, dass Propranolol in der Lage ist, entweder die Endothelzelldifferenzierung oder aber das Endothelzellwachstum innerhalb einer JA-Kultur entsprechend zu hemmen. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand ist der Gedanke, dass Propranolol die endogene VEGF-Sekretion in einem solchen Umfang hemmt, sodass dies auch einen Einfluss auf die Differenzierung nehmen kann. Dies sollte mit dem in Kapitel 5.2.2 bereits besprochenen ELISA nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich aber unter dem Einfluss von Propranolol keine signifikanten Veränderungen. Jedoch muss auch hier die Frage gestellt werden, ob das Nachweisverfahren für solch geringe quantitative Veränderungen sensitiv genug ist. Eine zweite mögliche Erklärung für den beobachteten Sachverhalt wäre der Umstand, dass Propranolol - wie von Lamy (2012) in anderen Kulturen nachgewiesen - den VEGFR2-Rezeptor und nicht die Sekretion von VEGF beeinflusst. Sollte die Beeinflussung über diesen Mechanismus erfolgen, könnte hiermit auch die fehlende Veränderung der VEGF-Spiegel erklärt

werden. Yi und Mitarbeiter (2012) konnten in Untersuchungen von Endothelzellen aus Hämangiomen zeigen, dass Propranolol eine dosisabhängige Apoptose in diesen Zellen auslösen kann. Dieser Effekt wird ihrer Meinung nach zum einen über eine Suppression der VEGF-Sekretion, zum anderen aber auch durch eine Hochregulation der Apoptose fördernden Gene für p53 gesteuert.

Ausgehend von diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, wie sich das quantitative Wachstum der JA-Zellkulturen unter dem Einfluss von Propranolol verhält. Aus diesem Grund wurden definierte Wachstumskurven über den Zeitraum von 12 Tagen erstellt. Hierbei wurden 2 JA-Kulturen und zur Kontrolle ein Hautkultur mitgeführt. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sich das quantitative Wachstum aller Kulturen durch den Einfluss von Propranolol hemmen lässt. Diese Hemmung muss jedoch als unspezifisch bezeichnet werden, da auch die Zellen der Kontrollgruppe ein vermindertes Wachstum zeigten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die beschriebene Zytotoxizität von Propranolol. Diese wird von verschiedenen Autoren in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer und der verwendeten Zellart unterschiedlich angegeben. So zeigte Kastelova und Mitarbeiter (2003) eine zytotoxische Wirkung auf menschliche Adenokarzinomzellen sowie Alveolarmakrophagen bei Konzentrationen zwischen 0,001 bis 1mM. Diese Spannbreite ist dabei auf die unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Zellenarten auf Propranolol zurückzuführen. In einer weiteren Untersuchung zeigten Hajighasemi und Mitarbeiter (2009 und 2010) eine Zytotoxizität auf PBMC-Zellen ab einer Konzentration von 0,17 bzw. 0,2 mM. Als weiteren auf die Zytotoxizität Einfluss nehmenden Faktor beschrieben sie die Inkubationszeit. Diese erhöht mit steigender Kultivierungsdauer auch die Toxizität. Des Weiteren stellten sie fest, dass gesunde, nicht pathologische Zellen eine weitaus höhere Sensitivität bezogen auf eine schädigende Wirkung von Propranolol zeigen als Tumorzellen.

Die hier im Rahmen der Untersuchungen verwendete Konzentration von Propranolol lag in allen Fällen bei 50µm und somit deutlich unter der von Hajighasemi und Mitarbeitern (2009 und 2010) beschriebenen toxischen Grenze. Demgegenüber untersuchten sie die Kulturen jedoch lediglich über einen Zeitraum von 48h, der wiederum deutlich unter dem hier beobachteten Zeitrahmen von 21 Tagen lag. So könnte die hemmende bzw. toxische Wirkung des Propranolol im vorliegenden Falle über die Kultivierungsdauer zustande gekommen sein. Entsprechende Untersuchungen, die einen längeren Zeitraum beobachten, bzw. Untersuchungen mit unterschiedlicher Konzentration in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer von JA-Zellkulturen stehen bislang noch aus. So kann zum jetzigen Zeitpunkt auch noch keine abschließende Aussage über das toxische Potential von Propranolol in Bezug auf JA-Zellen getroffen werden.

Grundsätzlich gilt jedoch festzuhalten, dass Propranolol einer der pharmakologischen Stoffe ist, dessen Wirkung auf JA weitergehend untersucht werden sollte und dessen Verwendung im Sinne einer neoadjuvanten Therapie vorstellbar ist.

Ausgehend von den hier vorliegenden Ergebnissen - vor allem in Bezug auf den Einfluss von VEGF auf die JA-Zellkulturen - ist neben dem Wirkstoff Propranolol der Einsatz anderer Pharmaka, welche einen Einfluss auf VEGF selbst oder seine Rezeptoren nehmen und dementsprechend als anti-angiogene Substanzen wirksam sind, denkbar. Hierbei wäre als ein mögliches Medikament der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin®) vorstellbar, der gezielt gegen das menschliche VEGF-A gerichtet ist und die Bindung an den VEGFR-2-Rezeptor verhindert (Ferrera et al., 2005). Über diesen Mechanismus konnte in Studien sowohl die Gefäßdichte als auch der VEGF-Spiegel innerhalb von arterio-venösen Malformationen signifikant gesenkt werden (Walker et al., 2012). Die Intension einer anti-angiogenen Therapie ist es, die für den Tumor unabdingbare Gefäßversorgung zu stören und somit eine Regression zu erreichen. Im Falle des JA wäre ein weiterer positiver Effekt dieses Behandlungsansatzes, dass hierdurch die hohe Blutungsneigung im Rahmen der operativen Versorgung verringert werden könnte. In der Tumorthherapie ist Bevacizumab bereits für die Behandlung von insgesamt fünf verschiedenen Tumoren, im Einzelnen dem kolorektalen Karzinom, dem Bronchialkarzinom, dem Mamma- und Ovarialkarzinom sowie dem Nierenzellkarzinom, zugelassen (Fachinformation Avastin®).

5.3 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten neun mesenchymale JA- Zellkulturen mit bzw. ohne Anteile von Endothelzellen etabliert und charakterisiert werden. Ferner wurde zum ersten Mal mittels der Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung gezeigt, dass die in dieser Arbeit etablierten Zellkulturen repräsentativ für ihre Primärtumore sind und somit geeignet sind, für weiterführende Untersuchungen an diesen seltenen juvenilen Tumoren herangezogen werden können. Darüberhinaus konnte der Einfluss proangiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF auf das Wachstum und besonders die Differenzierung von JA-Zellkulturen gezeigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden dass primär CD31- native Zellkulturen unter dem Einfluss dieser Wachstumsfaktoren einen deutlichen Anstieg der Expression dieses untersuchten Markers zeigten. Weiterführende Untersuchungen auf Grundlage dieser Beobachtungen könnten einen Beitrag leisten, die Molekularpathologie des Tumors besser zu verstehen und somit die Ursprungszelle des juvenilen Angiofibroms zu identifizieren. So wäre es

beispielsweise möglich, dass die Entstehung des JAs auf die Differenzierung nativer Progenitorzellen mit Stammzellcharakter unter dem Einfluss von pro-Angiogenen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF und FGF zurückzuführen ist. Diese würde ebenso die Hypothese von Pauli und Mitarbeitern (2008) stützen nach der Endothelzellen aus undifferenzierten Vorläuferzellen neu entstehen und eine Erklärung für die äußerst gute Vaskularisierung dieser Neoplasie liefern. Die Ergebnisse zeigten jedoch auch, dass es für zukünftige Untersuchungen von entscheidender Bedeutung ist, Zelltyp-spezifische JA-Kulturen zu etablieren, um mit definierten Zelltypen arbeiten zu können. Interessant wäre, den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren gezielt auf Endothelzellen bzw. deren Progenitorzellen zu untersuchen und somit weitere Hinweise in der Aufklärung der Ätiologie dieses seltenen Tumors zu geben.

Die vorliegenden Untersuchungen haben darüberhinaus gezeigt, dass der nicht-selektive β -Blocker Propranolol in der Lage ist, die Differenzierung und das Wachstum von JA-Zellkulturen entscheidend zu beeinflussen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um detailliertere Informationen über das therapeutische Potential, aber auch die toxischen Wirkungen einer solchen medikamentösen Therapie in dieser Tumorentität zu erhalten.

Ein weitreichender und zukunftssträchtiger Ansatz würde die Etablierung eines in vivo-Modells - beispielsweise in der Maus – darstellen. Hierdurch wäre es möglich, zum einen weiterführende Therapien, wie beispielsweise eine pharmakologische Intervention zu testen, und zum anderen einen weitreichenderen tieferen Einblick in die Pathogenese dieser wenngleich gutartigen, für die Betroffenen jedoch mit einem sehr hohen Leidensdruck vergesellschafteten Neubildung zu erlangen.

6 Literaturverzeichnis

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997): Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway.
EMBO J 16(13): 3797-804.

Abraham SC, Montgomery EA, Giardiello FM, Wu TT (2001): Frequent beta-catenin mutations in juvenile nasopharyngeal angiofibromas.
Am J Pathol 158: 1073-1078.

Acuna, R (1981): Juvenile nasopharyngeal fibroma.
Ann Otol 90: 420-422.

Antoniades K, Antoniades D, Antoniades V (2002): Juvenile angiofibroma: report of a case with intraoral presentation.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 94: 228–232.

Arakaki DT, Sparkes RS (1963): Microtechnique for Culturing Leukocytes from Whole Blood.
Cytogenetics 85: 57-60.

Arevalo JF, Sanchez JG, Wu L, Maia M, Alezzandrini AA, Brito M, Bonafonte S, Lujan S, Diaz-Llopis M, Restrepo N, Rodriguez FJ, Udaondo-Mirete P (2009): Primary intravitreal bevacizumab for diffuse diabetic macular edema: the Pan-American Collaborative Retina Study Group at 24 months.
Ophthalmology 116:1488-97.

Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N (2003): Angiogenesis assays: a critical overview.
Clin Chem 49(1): 32-40.

Fisch U (1993): The infratemporal fossa approach for nasopharyngeal tumors.
Laryngoscope 93: 36.

Beham A, Fletcher CD, Kainz J, Schmid C, Humer U (1993): Nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistochemical study of 32 cases.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 423(4): 281-5.

Beham A, Kainz J, Stammberger H, Auböck L, Beham-Schmid C (1997): Immunohistochemical and electron-microscopical characterization of stromal cells in nasopharyngeal angiofibromas.
Eur Arch Otorhinolaryngol 254: 196-199.

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.

Bell K, Stott K, Sinclair CJ, Walker WS, Gillon JA (1992): Contolled trial of intra-operative autologous transfusion in cardiothoracic surgery measuring effect on transfusion in cadiothoracic surgery measuring effect on transfusion requirements and clinical outcome.
Transfus Med 2: 295-300.

Blacher S, Devy L, Burbridge MF, Roland G, Tucker G, Noël A, Foidart JM (2001): Improved quantification of angiogenesis in the rat aortic ring assay.
Angiogenesis 4(2):133-42.

Böcker W, Denk H, Heitz PU (2001): Pathologie.
Urban & Fischer, 2. Auflage; S.180-181.

- Bond GL, Levine AJ (2007): A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. *Oncogene* 26(9): 1317-23.
- Bonifazi E, Acquafredda A, Milano A, Montagna O, Laforgia N. (2010): Severe hypoglycemia during successful treatment of diffuse hemangiomas with propranolol. *Pediatr Dermatol* 27(2): 195-6.
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T (1999): beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155: 1033-1038.
- Bremer JW, HB Neel, LW DeSanto, GC Jones (1986): Angiofibroma: treatment trends in 150 patients during 40 years. *Laryngoscope* 96: 1321-1329.
- 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.
- Brown J, Greaves M, Molgaard H (1991): The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol* 3: 175-184.
- Brown L, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L (1992): Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 176: 1375-1379.
- Brunner H (1942): Nasopharyngeal angiofibroma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 51: 29-65.
- Brunner C, Urbschat S, Jung V, Paetorius M, Plinkert PK, Schick B (2003) Chromosomale Veränderungen beim juvenilen Angiofibrom. *HNO* 51: 981-985.
- Buchwalow IB, Minin EA, Boecker W (2005); A multicolor fluorescence immunostaining technique for simultaneous antigen targeting. *Acta Histochem* 107(2): 143-148.
- Burrows PE, Laor T, Paltiel H, Robertson RL (1988): Diagnostic imaging in the evaluation of vascular birthmarks. *Dermatol Clin* 16(3): 455-488.
- Butugan O, Sennes LU, de Almeida ER, Miniti A (1995): Intracranial Juvenile Angiofibroma With Dural and Cavernous Sinus Invasion. *Rev Bras Otorrinolaringol* 61(5): 400-412.
- Caplan AI, Bruder SP (2001): Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7(6): 259-264.

- Carlos R, Thompson LD, Netto AC, Pimenta LG, Correia-Silva Jde F, Gomes CC, Gomez RS (2008): Epstein-Barr virus and human herpes virus-8 are not associated with juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Head Neck Pathol 2(3): 145-149.
- Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E.A (1999): Common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin.
Nat Genet 21(4): 410-413.
- Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, Kuo YR, Yang KD, Huang HC, Wang FS (2004): Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats.
J Orthop Res 22: 526-534.
- Choy JC, Granville DJ, Hunt DWC, McManus BM (2001): Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis.
J Mol Cardiol 33: 1673-1690.
- Clark DE, Smith SK, Licence D, Evans AI, Charnock-Jones DS (1998): Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in human placenta throughout gestation.
J Endocrinol 159: 459-467.
- Claussen U, Mazur A, Rubtsov N (1994): Chromosomes are highly elastic and can be stretched.
Cytogenet Cell Genet 66: 120-125.
- Clevers H (2006): Wnt/beta-catenin signaling in development and disease.
Cell 127(3): 469-480.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley B, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989): Tumor Vascular Permeability Factor Stimulates Endothelial Cell Growth and Angiogenesis.
J Clin Invest 84: 1470-1478.
- Coutinho-Camillo CM, Brentani MM, Butugan O, Torloni H, Nagai MA (2003): Relaxation of imprinting of IGFII gene in juvenile nasopharyngeal angiofibromas.
Diagn Mol Pathol 12: 57-62.
- Cremer T, Jauch A, Ried T, Schrock E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR (1995): Fluoreszenz- insitu-Hybridisierung (FISH).
Deutsches Ärzteblatt 92: 1039-1047.
- D'Abronz FH, Swearingen B, Klibanski A, Alexander JM (1999): Mutational Analysis of Activin/Transforming Growth Factor β Type I and II Receptor Kinases in Human Pituitary Tumors.
The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84: 1716-1521.
- D'Angelo G, Lee H, Weiner RI (1997): cAMP-dependent protein kinase inhibits the mitogenic action of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in capillary endothelial cells by blocking Raf activation.
J Cell Biochem 67: 353-366.
- Dane WH (1954): Juvenile nasopharyngeal fibroma in state of regression.
Ann Otol Rhinol Laryngol 63: 997-1014.
- DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM (1997): Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis.
Am J Pathol 151(3): 671-677.

Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM (1997): Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine upregulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Research* 57: 5590-5597.

Dillard DG, Cohen C, Muller S, (2000): Immunolocalization of activated transforming growth factor beta1 in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg* 126: 723-725.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8(4): 315-317.

Eivazi B, Ardelean M, Bäuml W, Berlien HP, Cremer H, Elluru R, Koltai P, Olofsson J, Richter G, Schick B, Werner JA (2009): Update on hemangiomas and vascular malformations of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266(2): 187-197.

Fagan JJ, Snyderman CH, Carrau RL, Janecka IP (1997): Nasopharyngeal Angiofibromas: Selecting A Surgical Approach. *Head and Neck* 19(5): 391-399.

Farag MM, Ghanimah SE, Ragaie A, Saleem TH (1987): Hormone receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Laryngoscope* 97: 208-211.

Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, Spears J, Brown DH, Buscarini E, Chesnutt MS, Cottin V, Ganguly A, Gossage JR, Gutmacher AE, Hyland RH, Kennedy SJ, Korzenik J, Mager JJ, Ozanne AP, Piccirillo JF, Picus D, Plauchu H, Porteous ME, Pyeritz RE, Ross DA, Sabba C, Swanson K, Terry P, Wallace MC, Westermann CJ, White RI, Young LH, Zarrabeitia R (2009): International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J Med Genet* 48: 73-87.

Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W (2005): Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 328 -335.

Ferrara N, Henzel WJ (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161(2): 851-858.

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25.

Ferrara N, Gerber HP (2001): The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 106: 148-156.

Fina L, Molgaard H, Robertson D (1990): Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75: 2417-2426.

Fishman SJ, Mulliken JB (1993): Hemangiomas and vascular malformations of infancy and childhood. *Pediatr Clin North Am* 40(6): 1177-1200.

Fodde R, Smits R, Clevers H (2001): APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1(1): 55-67.

Fodde R (2003): The multiple functions of tumour suppressors: it's all in APC.
Nature Cell Biology 5: 190-192.

Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP (1997): Genome screening by comparative genomic hybridization.
Trends Genet 13: 405-409.

Freedman DA, Wu L, Levine AJ (1999): Functions of the MDM2 oncoprotein.
Cell Mol Life Sci 55(1): 96-107.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.
Transplantation 6: 230-247.

Frishman WH (2008): Fifty years of beta-adrenergic blockade: a golden era in clinical medicine and molecular pharmacology.
Am J Med 121(11): 933-934.

Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S (1998): Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium.
Cancer Res 58(16): 3526-3528.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K (2004): Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential.
Stem Cells 22: 649-658.

Gasparini G (2000): Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer.
Oncologist 5: 37-44.

Gatalica Z (1998): Immunohistochemical analysis of steroid hormone receptors in nasopharyngeal angiofibromas.
Cancer Lett 127: 89-93.

Gates GA, Rice DH, Koopmann CG, Schuller DE (1992): Flutamide-induced regression of angiofibroma.
Laryngoscope 102: 641-644.

Ge ZZ, Chen HM, Gao YJ, Liu WZ, Xu CH, Tan HH, Chen HY, Wei W, Fang JY, Xiao SD (2011): Efficacy of thalidomide for refractory gastrointestinal bleeding from vascular malformation.
Gastroenterology 141(5): 1629-1637.

Geisthoff UW, Schneider G, Fischinger J, Plinkert PK (2002): Hereditäre hämorrhagische Teleangiectasie (Morbus Osler). Eine interdisziplinäre Herausforderung.
HNO 50: 114-128.

Giavroglou C, Constantinidis J, Triaridis S, Daniilidis J, Dimitriadis A (2007): Angiographic evaluation and embolization of juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
HNO 55(1): 36-41.

Glad H, Vainer B, Buchwald C, Petersen BL, Theilgaard SA, Bonvin P, Lajer C, Jakobsen J (2007): Juvenile nasopharyngeal angiofibromas in Denmark 1981-2003: diagnosis, incidence, and treatment.
Acta Otolaryngol 127(3): 292-299.

Goepfert H, Cangir A, Lee Y (1985): Chemotherapie for aggressive juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 111: 285-289.

- Goldberg MA, Schneider TJ (1994): Similarities between the oxygensensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry* 269: 4355–4361.
- Goodnough LT (1994): Clinical application of recombinant erythropoietin in the perioperative period (Review). *Hematol Oncol Clin Nortz Am* 8: 1011-1020.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P (2002): Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J* 21 (7): 1743-53.
- Grant DS, Kleinman HK (1997): Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* 79: 317-333.
- Guan J, Guillot PV, Aird WC (1999): Characterization of the mouse von Willebrand factor promoter. *Blood* 94(10): 3405–3412.
- Guertl B, Beham A, Zechner R, Stammberger H, Hoefler G (2000): Nasopharyngeal angiofibroma: an APC-gene-associated tumor? *Hum Pathol* 31(11): 1411-1413.
- Gumbiner BM, McCrea PD (1993): Catenins as mediators of the cytoplasmic functions of cadherins. *J Cell Sci Suppl* 17:155-158.
- Hagen R, Schweikert HU, Schwab B, Romalo G (1991): Hormone dependence of juvenile nasopharyngeal fibroma. *Laryngorhinootologie* 70(6): 279-283.
- Hajighasemi F, Mirshafiey A (2009): In vitro Sensitivity of Leukemia Cells to Propranolol. *J Clin Med Res* 1: 144-149.
- Hajighasemi F, Mirshafiey A (2010): Propranolol effect on proliferation and vascular endothelial growth factor secretion in human immunocompetent cells. *Journal of Clinical Immunology and Immunopathology Research* 2(2): 22-27.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Harrison DF (1987): The natural history, pathogenesis and treatment of juvenile angiofibroma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 936-942.
- Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M (2004): Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 178: 2-12.
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LR, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998): Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-1512.
- 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.

- Herman P, Lot G, Chapot R (1999): Long-term follow-up of juvenile nasopharyngeal angiofibromas: analysis of recurrence. *Laryngoscope* 109: 140–147.
- Hliscs, R, Mühling P, Claussens U (1997): The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76: 167-171.
- Hubbard EM (1958): Nasopharyngeal angiofibromas. *AMA Arch Path* 65: 192-204.
- Hurwitz H et al. (2004): Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335–2342.
- Ikeda M, Furukawa H, Imamura H, Shimizu J, Ishida H, Masutani S, Tatsuta M, Kawasaki T, Satomi T (2002): Surgery for gastric cancer increases plasma levels of vascular endothelial growth factor and von Willebrand factor. *Gastric Cancer* 5: 137-141.
- Jafek BW, Krekorian EA, Kirsch WM, Wood RP (1979): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: management of intracranial extension. *Head Neck Surg* 2(2): 119-128.
- Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, de Boer J (2012): Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 7(10): e46842.
- Ji Y, Li K, Xiao X, Zheng S, Xu T, Chen S (2012): Effects of propranolol on the proliferation and apoptosis of hemangioma-derived endothelial cells. *J Pediatr Surg* 47(12): 2216-2223.
- Johns ME (1980): Estrogen receptors in nasopharyngeal angiofibromas. *Laryngoscope* 90: 628.
- Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P (1993): Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* 90: 584-589.
- Joos S, Bergerheim USR., Pan Y, Matsuyama H, Bentz M, du Manoir S, Lichter P (1995): Mapping of chromosomal gains and losses in prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chrom Cancer* 14: 267-276.
- Kabbinavar F et al (2003): Phase II randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/ leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 60–65.
- Kallioniemi A, Kallioniemi O, Rutovitz D, Sudar D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization: a new method based on isolated DNA to determine gains and losses of DNA sequences anywhere in the genome in a single hybridization. *Am J Hum Genetics* 51: A23, 80.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821.

- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 231-243.
- Karhu R, Kahkonen M, Kuukasjarvi T, Pennanen S, Tirkkonen M, Kallioniemi O (1997): Quality control of CGH: impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. *Cytometry* 28: 198-205.
- Karow T, Lang-Roth R (2007): *Pharmakologie und Toxikologie*. 15. Aufl., S.81-85.
- Kastelova A, Dimova S, Nemery B (2003). Propranolol cytotoxicity in rat and human lung in vitro. *Methods Find Exp. Clin Pharmacol* 25: 509-515.
- Klenova EM, Morse HC, Ohlsson R, Lobanenkova VV (2002): The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 12(5): 399-414.
- Klockars T, Renkonen S, Leivo I, Hagström J, Mäkitie AA (2010): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: no evidence for inheritance or association with familial adenomatous polyposis. *Fam Cancer* 9(3): 401-3.
- Komiya Y, Habas R (2008): Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4(2): 68-75.
- Kosmidou I, Karpaliotis D, Kirtane AJ, Barron HV, Gibson CM (2008): Vascular endothelial growth factors in pulmonary edema: an update. *Journal of Thrombosis & Thrombolysis* 25(3): 259-64.
- Kumagami H (1991): Testosterone and estradiol in juvenile nasopharyngeal angiofibroma tissue. *Acta Otolaryngol* 111: 569-573.
- Labra A, Chavolla-Magana R, Lopez-Ugalde A, Alanis-Calderon J, Huerta-Delgado (2004): Flutamide as a preoperative treatment in juvenile angiofibroma (JA) with intracranial invasion: report of 7 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg* 130(4): 466-469.
- Lamouille S, C. Mallet et al. (2002): Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100 (13): 4495-4501.
- Lamy S, Lachambre MP, Lord-Dufour S, Béliveau R (2010): Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 53(5-6): 200-208.
- Lamvik J, Hella H, Liabakk NB, Halaas O (2001): Nonlabeled secondary antibodies augment/maintain the binding of primary, specific antibodies to cell membrane antigens. *Cytometry* 45(3): 187-193.
- Lapham A, Adams JE, Paterson A, Lee M, Brimmell M, Packham G (2009): The Bcl-w promoter is activated by beta-catenin/TCF4 in human colorectal carcinoma cells. *Gene* 432: 112-117.
- Leaute-Labreze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, Boralevi F, Thambo JB, Taieb A (2008): Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 358 (24): 2649–2651.

- Lee JT, Chen P, Safa A, et al (2002): The role of radiation in the treatment of advanced juvenile angiofibroma.
Laryngoscope 112: 1213-1220.
- Liang J, Yi Z, Liang P (2000) : The nature of juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Otolaryngol Head Neck Surg 123: 475-481.
- Liu L, Wang R, Heung D, et al (2002): Analysis of intraoperative bleeding and recurrence of juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Clin Otolaryngol 27: 536–540.
- Lloyd G, Howard D, Phelps P, Cheesman A (1999): Juvenile angiofibroma: the lessons of 20 years of modern imaging.
J Laryngol Otol 113(2): 127-134.
- Logan CY, Nusse R (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease.
Annu Rev Cell Dev Biol 20: 781-810.
- Long Q, Park BK, Ekker M (2002): Expression and regulation of mouse Mtsh1 during limb and branchial arch development.
Dev Dyn 222: 308-312.
- Loukinov D, Ghochikyan A, Mkrtichyan M, Ichim TE, Lobanenkov VV, Cribbs DH, Agadjanyan MG (2006): Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant.
J Cell Biochem 98: 1037-1043.
- Lund VJ, Stammberger H, Nicolai P et al (2010): European position paper on endoscopic management of tumours of the nose, paranasal sinuses and skull base.
Rhinology Supplement no. 22, pp. 1–143.
- Lutgendorf SK, Cole S, Costanzo E, Bradley S, Coffin J, Jabbari S, Rainwater K, Ritchie JM, Yang M, Sood AK (2003): Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines.
Clin Cancer Res 9(12): 4514-4521.
- Lutgendorf SK, Johnsen EL, Cooper B, Anderson B, Sorosky JI, Buller RE, Sood AK (2002): Vascular endothelial growth factor and social support in patients with ovarian carcinoma.
Cancer 95(4): 808-815.
- Mann WJ, Jecker P, Amedee RG (2004): Juvenile angiofibromas: changing surgical concept over the last 20 years.
Laryngoscope 114(2): 291-293.
- Marti HH, Risau W (1998): Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 15809-15814.
- Martin H, Ehrlich H, Abels J (1948): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Ann surg 127: 513-536.
- Massague J (1998): TGF-beta signal transduction.
Annu Rev Biochem 67: 753-791.
- Maurice M, Milad M (1981): Pathogenesis of juvenile nasopharyngeal fibroma.
J Laryngol Otol 95: 1121-1126.

McCombe A, Lund VJ, Howard DJ (1990): Recurrence in juvenile angiofibroma. *Rhinology* 28(2): 97–102.

Mello-Filho FV, De Freitas LCC, Santos ACD, et al (2004): Resection of juvenile angiofibroma using the Le Fort 1 approach. *Am J Otolaryngol* 25: 157–161.

Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Mansat M, Mansat P et al. (2005): A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol* 206: 260–268.

Mkrtichyan M, Ghochikyan A, Loukinov D, Davtyan H, Ichim TE, Cribbs DH, Lobanenkov VV, Agadjanyan MG (2008): DNA, but not protein vaccine based on mutated BORIS antigen significantly inhibits tumor growth and prolongs survival of mice. *Gene Ther* 15: 61-64.

Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C, Hoffmann KH (2005): Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 24:155-165.

Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Nakamura Y (1998): Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res* 58(12): 2524-2527.

Mulliken JB, Glowacki J (1982): Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast Reconstr Surg* 69(3): 412-422.

Nagafuchi A, Takeichi M (1989): Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: a 94 kDa protein functionally associated with a specific region of the cytoplasmic domain of E-cadherin. *Cell Regul* 1(1): 37-44.

Nagai MA, Butugan O, Logullo A, Brentani MM (1996): Expression of growth factors, proto-oncogenes, and p53 in nasopharyngeal angiofibromas. *Laryngoscope* 106 (2): 190–195.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13: 9-22.

Nicolai P, Berlucchi M, Tomenzoli D, Cappiello J, Trimarchi M, Maroldi R, Battaglia G, Antonelli AR (2003): Endoscopic surgery for juvenile angiofibroma: when and how. *Laryngoscope* 113(5): 775-782.

Nicolai P, Villaret AB, Farina D, Nadeau S, Yakirevitch A, Berlucchi M, Galtelli C (2010): Endoscopic surgery for juvenile angiofibroma: a critical review of indications after 46 cases. *Am J Rhinol Allergy* 24(2): e67-72.

Nicosia RF, Ottinetti A (1990): Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 63: 115-12.

Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P (1991): Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 253 (5020): 665–669.

Nowell PC (1960): Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 20: 462-466.

Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E (2000): Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 97: 2626–2631.

Osborn DA (1959) : The so-called juvenile angio-fibroma of the naso-pharynx. *J Laryngol Otol* 73: 295-316.

Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C (2004): Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22: 377–384.

Parums DV, Cordell JL, Micklem K (1990): JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue section. *J Clin Pathol* 43: 752-757.

Pauli J, Gundelach R, Vanelli-Rees A, Rees G, Campbell C, Dubey S, Perry C (2008): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: an immunohistochemical characterisation of the stromal cell. *Pathology* 40: 396-400.

Pieper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D (1995): Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 10- 26.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

Presta, M., et al. (2005): Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2): p. 159-78.

Raap AK, Marijnen JG, Vrolijk J, van der Ploeg M (1986): Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures. *Cytometry* 7: 235-242.

Ramos HF, Takahashi MT, Ramos BF, Gomes Mde Q, Sennes LU (2011): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma with intradural extension. *Braz J Otorhinolaryngol* 77(5): 677.

Reddy KA, Mendenhall WM, Amdur RJ, et al (2001): Long-term results of radiation therapy for juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Am J Otolaryngol* 22: 172–175.

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113: 237-251.

Riggs S, Orlandi RR (2010): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma recurrence associated with exogenous testosterone therapy. *Head Neck* 32(6): 812-815.

Risau W (1990): Angiogenic growth factors.
Prog Growth Factor Res. 2(1): 71-79.

Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Dudziak ME, Greenwald JA, Luchs JS, Spector JA, Ueno H, Gittes GK, Longaker MT (1999): Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts.
Am J Physiol 277(4 Pt 1):C628-637.

Sans V, Dumas de la Roque E, Berge J, et al. (2009): Propranolol for severe infantile hemangiomas: Follow-up report.
Pediatrics 124: 423-431.

Saylam G, Yucel OT, Sungur A, Onerci M (2006): Proliferation, angiogenesis and hormonal markers in juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Int J Pediatr Otorhinolaryngol 70(2): 227-234.

Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, Schnell O, Grau S, Miebach S, Aboody K, Padovan C, Straube A, Tonn JC, Goldbrunner R (2006) :Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC).
Exp Neurol 199: 301-310.

Schick B, Kind M, Draf W, Weber R, Lackmann GM (1997): Extranasopharyngeal angiofibroma in a 15-month-old child.
Int J Pediatr Otorhinolaryngol 42(2): 135-140.

Schick B, el Rahman el Tahan A, Brors D, Kahle G, Draf W (1999): Experiences with endonasal surgery in angiofibroma.
Rhinology 37(2): 80-85.

Schick B, Kahle G, Hässler R, Draf W (1996): Chemotherapy of juvenile angiofibroma-an alternative?
HNO 44(3): 148-152.

Schick B, Kahle G (2000): Radiological findings in angiofibroma.
Acta Radiologica 41: 585-593.

Schick B, Plinkert PK, Prescher A (2002): Die vaskuläre Komponente: Gedanken zur Entstehung des Angiofibroms.
Laryngo Rhino Otol 81: 280-284.

Schick B, Brunner C, Praetorius M, Plinkert PK, Urbschat S (2002): First evidence of genetic imbalances in angiofibromas.
Laryngoscope 112: 397-401.

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: 479-487.

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 Rep10: 1251-1255.

Schick B, Wemmert S, Willnecker V, Dlugaiczyk J, Nicolai P, Siwiec H, Thiel CT, Rauch A, Wendler O (2011): Genome-wide copy number profiling using a 100K SNP array reveals novel disease-related genes BORIS and TSHZ1 in juvenile angiofibroma.
Int J Oncol 39(5): 1143-1151.

- Schick B, Veldung B, Wemmert S et al. (2005): p53 and Her-2/neu in juvenile angiofibromas. *Oncology Reports* 13(3): 453–457.
- Schiff M (1959): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. A theory of pathogenesis. *Laryngoscope* 69: 981-1016.
- Schiff M, Gonzalez AM, Ong M, Baird A (1992): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma contain an angiogenic growth factor: basic FGF. *Laryngoscope* 102: 940-945.
- Schlauder SM, Knapp C, Steffensen TS, Bui MM (2009): Aromatase may play a critical role in the pathogenesis of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Fetal Pediatr Pathol* 28(5): 232-238.
- Schoch HJ, Fischer S, Marti HH (2002): Hypoxia-induced VEGF expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* 125: 2549-2557.
- Schröck E, Thiel G, Lozanova T, du Manoir S, Meffert MC, Jauch A, Speicher MR, Nuürnberg P, Vogel S, Jänisch W, Donis-Keller H, Ried T, Witkowski R, Cremer T (1994): Comparative genomic hybridization of human malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol* 144: 1203-1218.
- Seghezzi G, et al. (1998): Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* 141(7): p. 1659-1673.
- Seki T, Yun J, Oh Sp (2003): Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterIALIZATION and vascular remodeling. *Circ Res* 93 (7): 682-689.
- Seki T, Hong KH, Oh SP (2006): Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest* 86(2): 116-129.
- Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J and Dvorak HF (1990): Purification and NH2-Terminal Amino Acid Sequence of Guinea Pig Tumor-secreted Vascular Permeability Factor. *Cancer Research* 50: 1774-1778.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983): Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. *Science* 219: 983-985.
- Sessions RB, Bryan RN, Naclerio RM, Alford BR (1981): Radiographic staging of juvenile angiofibroma. *Head Neck Surg* 3: 279.
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999): The cyclin D1 gene is target of the b-Catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5522-5527.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992): Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-45.

Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC (2005): Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 111: 150–156.

Simon MC (2004): Vascular Morphogenesis and the Formation of Vascular Networks. *Development Cell* 6: 479-482.

Skurk C, Maatz H, Rocnik E, Bialik A, Force T, Walsh K (2005): Glycogen-Synthase Kinase3beta/beta-catenin axis promotes angiogenesis through activation of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circ Res* 96(3): 308-318.

Sommers Smith SK, Smith DM (2002): Beta blockade induces apoptosis in cultured capillary endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38: 298-304.

Sood AK, Bhatta R, Kamat AA, Landen CN, Han L, Thaker PH, Li Y, Gershenson DM, Lutgendorf S, Cole SW (2006): Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 12(2): 369-375.

Stavri GT, et al. (1995): Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 92(1): p. 11-14.

Sternberg SS (1954): Pathology of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. A lesion of adolescent males. *Cancer* 7: 15-28.

Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, et al. (1995): Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55: 3964-3968.

Tete' S, Mastrangelo F, Grimaldi S, Costanzo G, Salini L, Speranza L, et al. (2005): Immunohistochemical evaluation of CD31 in human cystic radicular lesions and in keratocysts. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18: 39-45.

Thakar A, Gupta G, Bhalla S, Jain V, Sharma SC, Sharma R, Bahadur S, Deka RC (2011): Adjuvant therapy with flutamide for presurgical volume reduction in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Head Neck* 33(12): 1747-1753.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991): The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor – Multiple Protein Forms Are Encoded Through Alternative Exon Splicing. *J Biol Chem* 266(18): 11947-54.

van Noort M, van der Zee R, Meeldijk J, Destree O, Clevers H (2002): Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 277(20): 17901-5.

Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL (2008): The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 7(12): 979-987.

- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G (1996): Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3.
Circulation 93: 1493-1495.
- Voeller HJ, Truica CI, Gelmann EP (1998): Beta-catenin mutations in human prostate cancer.
Cancer Res 58(12): 2520-2523.
- Walker EJ, Su H, Shen F, Degos V, Jun K, Young WL (2012): Bevacizumab attenuates VEGF-induced angiogenesis and vascular malformations in the adult mouse brain.
Stroke 43(7): 1925-1930.
- Wang HW, Su WY, Wang JY (1994): Noradrenergic innervation of juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
Eur Arch Otorhinolaryngol 251(2): 123-126.
- Weik C, Johanns W, Janssen J, Greiner L (2000): Leber und hereditäre hämorrhagische Teleangiectasie (Morbus Osler).
Z Gastroenterol [38], Seite 31.
- Wendler O, Schäfer R, Schick B (2007): Mast cells and T-lymphocytes in juvenile angiofibromas.
Eur Arch Otorhinolaryngol 264: 769-775.
- Xiao Q, Li Q, Zhang B, Yu W (2013): Propranolol therapy of infantile hemangiomas: efficacy, adverse effects, and recurrence.
Pediatr Surg Int 29(6): 575-581.
- Yang EV, Sood AK, Chen M, Li Y, Eubank TD, Marsh CB, Jewell S, Flavahan NA, Morrison C, Yeh PE, Lemeshow S, Glaser R (2006): Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells.
Cancer Res 66(21): 10357-64.
- Zachary I (2001): Signalling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor.
Am J Physiol Cell Physiol 280: C1375-C1386.
- Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, Shamamian P, Mignatti P (2000): Expression of von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis.
Int J Cancer 85: 281-288.
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM (2001): Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer.
Cancer Res 61: 8664-8667.
- Zhang M, Garvis W, Linder T, Fisch U (1998): Update on the Infratemporal Fossa Approaches to Nasopharyngeal Angiofibroma.
Laryngoscope 108: 1717-1723.
- Zhang PJ, Weber R, Liang HH, Pasha TL, LiVolski VA (2003): Growth factors and receptors in juvenile nasopharyngeal angiofibroma and nasal polyps.
Arch Pathol Lab Med 127(11): 1480-1484.
- Zhang X, Gaspard JP, Chung DC (2001): Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia.
Cancer Res 61: 6050-6054.
- Zito J, Fitzpatrick P, Amedee R (2001): Juvenile nasopharyngeal angiofibroma.
J La State Med Soc 153(8): 395-398.

Zou L, Lai H, Zhou Q, Xiao F (2011): Lasting controversy on Ranibizumab and Bevacizumab. *Theranostics* 1: 395-402.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Arterie
Abb.	Abbildung
AF	Angiofibrom
AK	Antikörper
APC	Adenomatous-polyposis-coli
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
bio-11-dUTP	mit Biotin über eine Kohlenstoffkette verknüpftes Desoxyuridintriphosphatmolekül
BMPR1	<i>Bone morphogenetic protein receptor, type 1</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BORIS	<i>brother of the regulator of imprinted sites</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
ch	Schweiz
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridisation</i>
cm	Zentimeter
CT	Computer-Tomographie
CTA	<i>Cancer-Testis Antigen</i>
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
dig-11-dUTP	mit Digoxygenin über eine Kohlenstoffkette verknüpftes Desoxyuridintriphosphatmolekül
DNA	Desoxyribunukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
evt.	eventuell
F	Foramen
FAP	familiärer adenomatöser Polyposis coli

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FLT-1	<i>Fms Like Tyrosine Kinase-1</i>
GSK3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
GTG-Bänderung	Giemsa Trypsin -Bänderung
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
hMSC	Humane Mesenchymale Stammzellen
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
JA	juveniles Angiofibrom
KCl	Kaliumchlorid
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
m	mol
mm	Milimeter
mind.	mindestens
ml	Mililiter
MR	Magnet-Resonanz
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MSC	mesenchymale Stammzellen
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsals
neg.	negativ
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NNH	Nasennebenhöhlen
NP40	octylphenoxypolyethoxyethanol 40
Oct4	<i>Octamer binding transcription factor 4</i>
OP	Operation
p	kurzer Arm des Chromosom
P	Passage
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF-b	<i>Platelet-derived growth factor subunit B</i>
PIGF	<i>Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein</i>
q	langer Arm des Chromosom
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
T	Tag
TCF	<i>T-Cell factor</i>
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNM	TNM Classification of Malignant Tumours
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TSHZ1	<i>teashirt zinc finger homebox 1</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
Vol	Volumen
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i>
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

7.2 Material und Herstellernachweis

7.2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits, Verbrauchsmaterialien

Amphotericin B	PAA, Piscataway, USA
anti-DIG-Rhodamin	Roche Diagnostics, Mannheim
BCIP (Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat)	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-Nick-Translation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Bovine Serum Albumin BSA	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Colcemid	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Cot1-DNA, human	Roche Diagnostics, Mannheim
DAPI (Vectashield® with DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DIG-Nick-Translation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Digoxigenin-alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
DMEM/F-12+Glutamax	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Endothelzellmedium C-22120	Promocell, Heidelberg
FGF (2099 7 B/CF)	R+D Systems, Wiesbaden
Fixogum	Marabu, Tamm
FKS (FBS)	GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Gentamycin	Pan-Biotech, Aidenbach
Hydrocortison	Sigma, Taufkirchen
Insulin	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamine	Pan-Biotech, Aidenbach
Nonidet P40 Substitute	Sigma, Taufkirchen
Pbmax	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS-Puffer unsteril (pH7,2-7,4)	Apotheke der Universität des Saarlandes, Homburg
Dulbecco`s-PBS steril	PAA, Piscataway, USA
Penicillin/ Streptomycin	PAA, Piscataway, USA
Pepsin	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Propranolol (Dociton®)	Mibe, Brehna
QIAmp DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden
RNase H	Roche Diagnostics, Mannheim
Sodium Pyruvat Solution	PAA, Piscataway, USA
Streptavidin-alkalische Phosphatase	Vector, Burlingame, USA
Streptavidin-FITC	Vector, Burlingame, USA
Trypsin-EDTA	PAA, Piscataway, USA
VEGF (298-VE)	R+D Systems, Wiesbaden

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

7.2.2 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

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

20x SSC	3M NaCl 0,3 M NaCitrat (pH 7,0)
Erythrozyten-Lysis-Puffer	155mM NH ₄ Cl 10mM KHCO ₃ 0,1mM Na EDTA (pH 7,4)
SE-Puffer	75mM NaCl 25mM EDTA (pH8,0)

7.2.3 Verwendete Zellkulturmedien

Medium zur Anzucht und Stammhaltung (Standardmedium/Fibroblastenmedium)	DMEM/F-12 with Glutamax 10% FKS 2% Penecillin/Streptomycin 2% L-Glutamin 5ng/ml EGF 5µg/ml Insulin 1µg/ml Hydrocortison
Differenzierungsmedium	DMEM/F-12 with Glutamax 10% FKS 2% Penecillin/Streptomycin 2% L-Glutamin 10ng/ml VEGF 5ng/ml FGF

7.2.4 Verwendete Antikörper

anti-Vimentin M0823 (1:100)	DAKO, Hamburg,
anti-CD31 M0725 (1:100)	DAKO, Hamburg,
CY3 115-166-071 (goat anti mouse) (1:400)	Dianova, Hamburg,
FITC A-11001 (goat anti mouse) (1:20)	Dianova, Hamburg

7.2.5 Geräteliste

Mikroskop BX 61		Olympus Optical, Hamburg
Objektiv	Plan Apo 60 X; 1,40 Oil	Olympus Optical, Hamburg
Quecksilberlampe	BH2-RFL-T3 (100W, 19V)	Olympus Optical, Hamburg
CCD-Kamera	CH 250 (Kamera)	Photometrics, Tucson, USA
	CE 200 A (externe Kühlung)	Photometrics, Tucson, USA
Software	ISIS 2.5	Metasystems , Altlußheim
Zentrifugen	5804R	Eppendorf, Hamburg
	Z233MK	Hermle, Wehingen

7.3 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.a: Links: axial MR Aufnahme eines juvenilen Angiofibroms eines zwölfjährigen Jungen	6
Abb. 2.1.b: Angiographische Darstellung eines juvenilen Angiofibroms mit abgebildeter Blutversorgung durch die A. maxillaris	11
Abb. 2.1.c: Histologischer Paraffinschnitt eines juvenilen Angiofibroms (AF 896)	15
Abb. 2.1.d: Reguläre Entwicklung und Rückbildung der ersten Pharyngealarterie (nach Schick et al., 2000).....	17
Abb. 2.1.e: Schematische Darstellung des VEGF-Signalwegs	23
Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Differenzierungsweges einer mesenchymalen Stammzelle (nach Caplan et al., 2001)	27
Abb. 3.2.a: Schema der CGH (nach Jung et.al., 2001)	34
Abb. 3.2.b.: Hybridisierte normale Metaphase mit der DNA eines Tumors gegen die DNA eines gesunden Spenders	43
Abb. 4.2.a: Mittels CGH karyotypisierte Metaphase des Falles AF895	50
Abb. 4.2.b: Ratio Profil des Falles AF895	51
Abb. 4.2.c: Ideogramm der CGH Ergebnisse	52
Abb. 4.3: Immunfluoreszenzaufnahmen des Falles AF3076.....	56
Abb. 4.4: Beispielhafte Färbung einer Angiofibromzellkultur sowie der Kontrollkultur zum Zeitpunkt T=21 unter dem Einfluss von VEGF.....	59

Abb. 4.8: Zellzahlen der Kulturen AF691, AF895 sowie ZF07 unter dem Einfluss von Propranolol nach 0, 4, 8 und 12 Tagen 68

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Überblick über die Klassifikationssysteme für Angiofibrome in Anlehnung an Schick und Kahle (Schick et Kahle, 2000) 9

Tab. 3.1: Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben, eingeteilt nach der Stadieneinteilung von Fish 31

Tab 3.2: Charakteristika der Fluoreszenzfilter 42

Tab. 4.2: CGH-Ergebnisse der untersuchten juvenilen Angiofibrome
Nomenklatur der CGH nach ISCN (2005) 53

Tab. 4.3: Zusammenfassung der Immunfluoreszenzfärbungen der untersuchten Angiofibrom-Zellkulturen 56

Tab. 4.4: Ergebnisse der CD31-Fluoreszenzfärbung verschiedener AF-Kulturen mit und ohne Zusatz von VEGF/bFGF über den Zeitraum von 21 Tagen 60

Tab. 4.5: Ergebnisse der CD31- Immunfluoreszenzfärbung der AF-Zellkulturen AF1017 sowie AF1041 unter dem Einfluss von VEGF/ bFGF und Propranolol 63

Tab. 4.6.a: Aufstellung der Mittelwerte der nach 6 Tagen vermessenen Fläche der ausgewachsenen Sprouts (in mm²) 64

Tab. 4.6.b: Aufstellung der nach 6 Tagen vermessenen Länge der ausgewachsenen Sprouts (in µm) 65

Tab. 4.7: Ergebnisse der Angiogenese ELISA-Untersuchung der 6 untersuchten Mediengruppen der Zellkultur AF895 67

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schick für die Überlassung des Promotionsthemas sowie sein stets offenes Ohr zur Klärung sämtlicher Probleme und Fragen. Seine motivierende Art und seine Begeisterung für die Medizin und unsere Patienten hat entscheidend die Gestaltung meiner weiteren beruflichen Laufbahn geprägt.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Frau Dr. Vivienne Willnecker und Frau Dr. Silke Wemmert, für ihre unermüdliche Unterstützung in allen Themen des täglichen Laboralltags sowie ihre Geduld bei sämtlichen Korrekturhilfen. Ebenso danke ich den beiden guten Seelen des Labors, Frau Ulrike Bechtel und Frau Monika Hoffmann. Nur mit ihrer Hilfe und Beistand konnte diese Arbeit entstehen. Ich danke Frau PD Dr. rer. nat. Steffi Urbschat, Klinik für Neurochirurgie, für die Unterstützung im Rahmen der Durchführung und Auswertung der CGH-Untersuchungen. Herrn PD Dr. Matthias W. Laschke sowie dem Institut für experimentelle Chirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes gilt mein Dank für die Unterstützung in der Durchführung und Auswertung des Aortenring-Assay. Ich danke ebenfalls Herrn Dipl.-Ing. Dietmar Hecker für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten. Besonders danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf meinem langen Weg immer unterstützend und motivierend begleitet haben. Hierbei gilt besonderer Dank meinen Eltern, die mich stets in die richtige Richtung geführt haben und dabei so unendlich viel Geduld aufgebracht haben.