

Amplifikationen von β - Catenin in juvenilen Angiofibromen

S. Berndt, S. Wemmert, V. Willnecker , B. Schick

Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität des Saarlandes in 66421 Homburg / Saar

Einleitung

Das juvenile Angiofibrom (JA) ist ein gutartiger, fibrovaskulärer Tumor, der nahezu ausschließlich bei männlichen Jugendlichen auftritt. Histomorphologisch zeigt sich ein bindegewebiges Stroma, das von Gefäßspalten mit irregulären Gefäßwandstrukturen durchzogen ist (Abbildung 1). Eine erhöhte β -Catenin-Expression konnte durch den Nachweis von Mutationen im β -Catenin-Gen in bis zu 75% der untersuchten Angiofibrome erklärt werden [1]. Die β -Catenin-Überexpression bei fehlender Mutation ist jedoch bis jetzt nicht zu erklären. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine bislang nur bei Magenkarzinomen [2] gezeigte Amplifikation von β -Catenin im juvenilen Angiofibrom vorliegt.

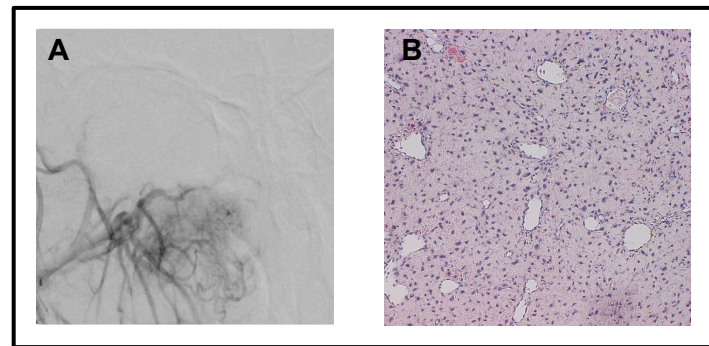


Abb.1: (A) Angiographie eines Patienten mit JA. (B) HE Färbung eines JA (Fall 895).

Material & Methoden

Mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) wurden Paraffingewebeschnitte und/oder primäre Zellkulturen von acht Angiofibromen (sieben Patienten) auf numerische Veränderungen von β -Catenin (*CTNNB1*, Chromosomenarm 3p22.1) simultan mit einer zentromerspezifischen Sonde für Chromosom 3 untersucht. Parallel dazu wurden Mutationsanalysen der GSK3 β Bindungsstelle in Exon3 von β -Catenin mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung der genomischen DNA mit dem Primerpaar durchgeführt:

bCat308for: 5'-ATGGAACCAGACAGAAAAGC-3'

bCat476rev: 5'-ATCCCTGTTCCCACTCATAC-3'

Die Sequenzierreaktionen wurden von der Fa. GATC-Biotech, Konstanz ausgeführt.

Ergebnisse

In allen 5 untersuchten Primärkulturen konnten mittels FISH chromosomale Gewinne, in 3 Tumoren zusätzlich Amplifikationen von β -Catenin aufgezeigt werden (Abbildung 2). Darüber hinaus konnten an formalinfixierten Paraffingewebeschnitten von 8 Angiofibromen Gewinne und/oder Amplifikationen von β -Catenin in einzelnen Zellkernen nachgewiesen werden. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit unseren Mutationsanalysen des β -Catenin-Gens (Tabelle 1, Abbildung 3) ergab, dass in Tumoren sowohl Gewinne bzw. Amplifikationen des β -Catenin-Gens zusätzlich zu Mutationen vorliegen als auch bei nicht Vorliegen von Mutationen zu beobachten sind.

Tabelle 1: Veränderungen von β -Catenin

Patient	Mutation	Amplifikation (FISH)
46	nein	ja (FFPE)
680	ja	ja (FFPE)
680 NG	nein	n. d.
691	ja	ja (FFPE)
3493	ja	ja (Zellkultur)
3544	ja	ja (Zellkultur)
895	ja	ja (FFPE)
896	nein	ja (Zellkultur+FFPE)

NG: Normalgewebe; FFPE: Paraffingewebeschnitte; n.d. nicht durchgeführt

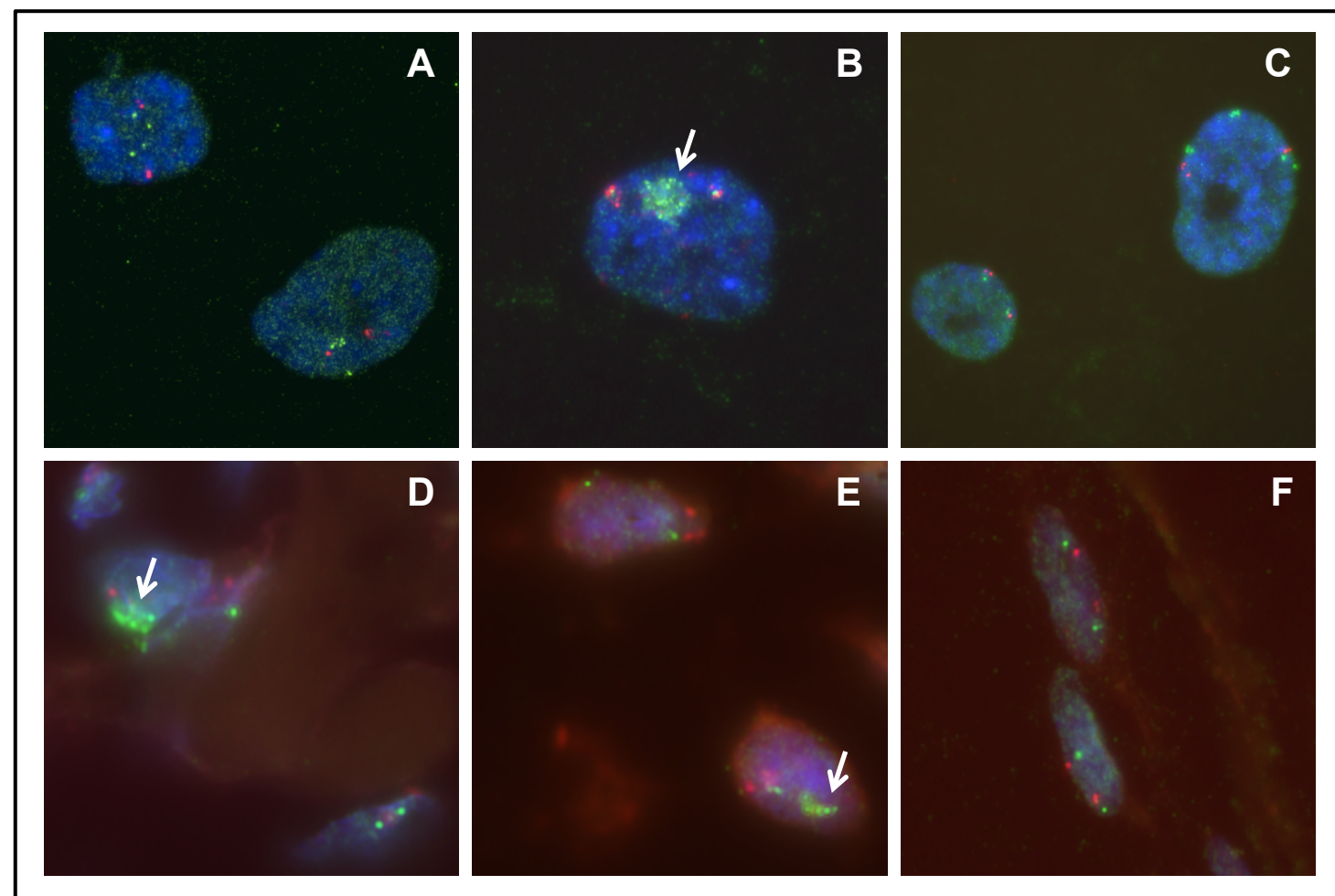


Abb. 2: FISH an Zellkulturpräparaten (A-C) und FFPE-Gewebeschnitten (D-F) von juvenilen Angiofibromen mit spezifischen Sonden für β -Catenin (RP11-61H16+ RP11-760M8, grün) und der Zentromerregion von Chromosom 3 (CEP3; Fa. Abbott Molecular; rot), Gegenfärbung mit DAPI (blau), Vergrößerung 100x. Sowohl in Zellkultur als auch in FFPE waren Zellkerne mit bis zu 6 Signalen sowie mit einer Amplifikation von β -Catenin (A-E; grün, Pfeile). (F) Zellkerne mit normaler diploider Signalverteilung.

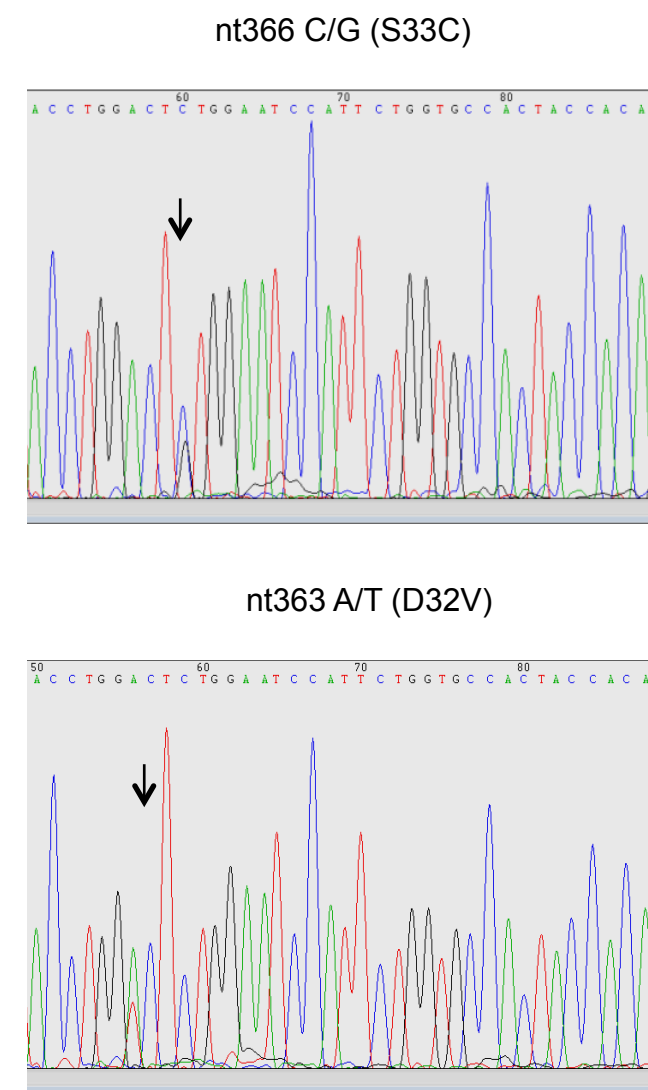


Abb. 3. β - Catenin Mutationen in JA. Die beiden Chromatogramme zeigen exemplarisch die Sequenzen der nachgewiesenen Mutationen der GSK3 β -Bindungsstelle des β -Catenin-Gens (*CTNNB1*). Die Nukleotidveränderungen resultieren in Aminosäure-Substitutionen wie im Chromatogramm aufgeführt. Veränderte Nukleotide wurden mit Pfeilen markiert.

Schlussfolgerung

Die in unserer Arbeit nachgewiesenen Gewinne und Amplifikationen des β -Catenin-Gens stellen eine weitere Erklärung für die Überexpression von β -Catenin in juvenilen Angiofibromen dar.