

Aus dem Institut für Neuropathologie und Prionforschung

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Jochen Herms

Über das tumorigene Potential eines konstitutiv aktivierten Wnt-
Signalwegs im Riechepithel der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Nils Wolfgang Engel

aus

Lübeck

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ulrich Schüller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Böck

Prof. Dr. Andreas Jung

Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2018

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht unter:

*Canonical Wnt signaling drives tumor-like lesions from Sox2-positive precursors of
the murine olfactory epithelium*

Nils W. Engel, Julia E. Neumann, Julia Ahlfeld, Annika K. Wefers, Daniel J. Merk,
Jasmin Ohli und Ulrich Schüller

PLoS One, November 2016

Volume 11, Issue 11, p. e0166690

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27902722>)

Eidesstattliche Versicherung

Engel, Nils Wolfgang

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Über das tumorigene Potential eines konstitutiv aktivierten Wnt-Signalwegs im
Riechepithel der Maus“

Selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre im Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, 23. November 2018

Ort, Datum

Nils Engel

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Das Riechepithel, Neurogenese und Neuroregeneration innerhalb dieser Struktur sowie die physiologische Bedeutung des Wnt-Signalwegs für diese Vorgänge</i>	1
1.2. <i>Der Wnt-Signalweg und Mechanismen seiner onkogenen Dysregulation</i>	7
1.3. <i>Über die häufige Koinzidenz einer physiologischen und onkogenen Bedeutung des Wnt-Signalwegs in ein und derselben Gewebsstruktur</i>	11
1.4. <i>Sinonasale Tumoren des Menschen unter Fokussierung auf einen riechepithelialen Ursprung oder eine pathogenetische Wnt-Assoziation</i>	12
1.5. <i>Zielsetzung dieser Arbeit</i>	14
2. Material und Methoden	15
2.1. <i>Transgene Mäuse</i>	15
2.2. <i>Genotypisierung</i>	18
2.3. <i>Patienten und Gewebeproben</i>	20
2.4. <i>Gewebegewinnung, Fixation und H&E-Färbungen</i>	22
2.5. <i>Immunohistochemie (IHC)</i>	23
2.6. <i>Statistische Auswertung</i>	25
3. Ergebnisse	25
3.1. <i>Die wesentlichen Zelltypen des reifen Riechepithels gehen hauptsächlich aus Sox2-positiven Vorläuferzellen hervor</i>	25
3.2. <i>Die konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs an E14,5 führt zur Entstehung von Tumor-artigen Läsionen innerhalb des Riechepithels der Maus</i>	29
3.3. <i>Eine postnatal induzierte, aberrante Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Riechepithel der Maus bedingt eine altersabhängige Entstehung riechepithelialer Polypen</i>	35
3.4. <i>Die riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen der Maus ähneln histomorphologisch und immunohistochemisch humanen Olfaktoriusneuroblastomen</i>	39
4. Diskussion	43
5. Zusammenfassung	48
6. Literaturverzeichnis	49
7. Danksagungen	61

1. Einleitung

1.1. *Das Riechepithel, Neurogenese und Neuroregeneration innerhalb dieser Struktur sowie die physiologische Bedeutung des Wnt-Signalwegs für diese Vorgänge*

Das humane Riechepithel befindet sich in einem ca. 5 cm² großen, verdickten und hellbräunlich pigmentierten Schleimhautbezirk am Dach der Nasenhaupthöhle, der anatomischen Regio olfactoria (Abbildung 1A). Als neuroepitheliale Struktur ist das Riechepithel dem peripheren Nervensystem zuzurechnen und beinhaltet mit den bipolaren Riechzellen primäre Sinneszellen (Abbildung 1B), die gleichsam das „erste Neuron“ der Riechbahn darstellen. Die nach basal ziehenden Axone dieser Riechzellen durchtreten in Form der Riechfäden (Fila olfactoria) die Siebplatte (Lamina cribrosa, Abbildung 1A) des Siebbeins (Os ethmoidale) zum Riechkolben (Bulbus olfactorius), wo sie auf das „zweite Neuron“ der Riechbahn umgeschaltet werden. In ihrer Gesamtheit bilden diese speziell-viszerosensiblen Nervenfasern den I. Hirnnerven, den Nervus olfactorius [4].

Histomorphologisch ist das humane Riechepithel ein bis zu 60 µm dickes, mehrreihig prismatisches Epithel. Weitere wesentliche Zelltypen des Riechepithels sind neben den Riechsinneszellen sogenannte sustentakuläre Stützzellen, deren Nuklei im apikalen Bereich des Epithels lokalisiert sind, sowie basal an der Basallamina liegende pluripotente Basalzellen mit Stammzellcharakter. Weitere hervorzuhebende Strukturen sind freie Nervenendigungen des Nervus trigeminus sowie die subepithelial gelegenen, tubulös verzweigten Bowman-Spüldrüsen (Glandulae olfactoria), deren Ausführungsgänge an der Oberfläche des Epithels münden und eine seröse Schleimschicht bilden [1].

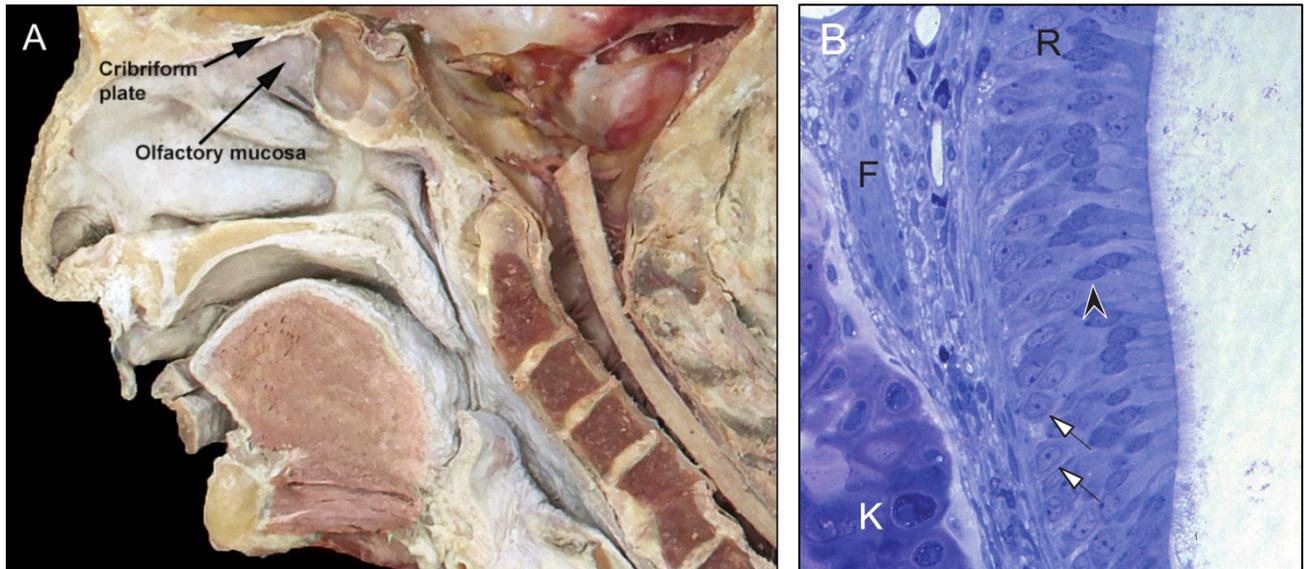


Abbildung 1: Die Lage des humanen Riechepithels am Dach der Nasenhaupthöhle und der histologische Aufbau des humanen Riechepithels. Panel A verdeutlicht der Lage des humanen Riechepithels (Olfactory mucosa) am Dach der Nasenhaupthöhle in einem Bezirk unterhalb der Lamina cribrosa (Cribriform plate). Das Formalin-fixierte Präparat wurde sagittal nahezu in der Medianebene angeschnitten. Gehirn sowie Septum nasi sind entfernt. Panel B zeigt den histologischen Aufbau des humanen Riechepithels eines 4 Monate alten Menschen Menschen (Toluidinblau/Azur II, 450-fache Vergrößerung). Die Pfeile deuten auf die Kerne der Riechsinneszellen. Ein Pfeilkopf markiert den Kern einer Stützzelle. F, Filum olfactorium (Bündel von Axonen der Riechsinneszellen). K, Knorpeliges Nasenskelett. Quelle der Originalabbildung in Panel A: Anatomyczar, englischsprachiger Beitrag auf www.wikipedia.org zum Thema „olfactory nerve“; Verwendung unter der „Creative Commons Attributions-Share Alike 4.0 International“-Lizenz. Panel B ist eine Originalabbildung aus [1]; Verwendung mit freundlicher Genehmigung der Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München.

Das Riechepithel ist einzigartig in seiner Eigenschaft, lebenslang nahezu Spezies-unabhängig eine robuste Neurogenese zu unterhalten und verfügt im Verletzungsfalle über ein außerordentliches Potenzial zur Neuroregeneration [5-8]. Dieses Potential nimmt altersabhängig ab – ist aber selbst beim Menschen bis ins Senilium nachweisbar [9, 10]. Das im Alter oftmals drastisch beeinträchtigte Riechvermögen ist dementsprechend nur multifaktoriell zu erklären [11, 12]. Ein nennenswertes Auftreten

adulter Neurogenese wurde im weit geringeren Ausmaß lediglich noch für die Hirnregionen der subgranulären Zone des hippocampalen Gyrus dentatus sowie die subventrikuläre Zone der Seitenventrikel beschrieben [13, 14]. Schädigungen im Bereich des ZNS führen im Gegensatz zu solchen des Riechepithels jedoch regulär zur Ausbildung einer Glia-Narbe mit persistierenden neurologischen Funktionsverlusten [15], wohingegen solche des Riechepithels, je nach Ausmaß, neuroregenerativ-funktionserhaltend repariert werden können.

Aufgrund dieses Alleinstellungsmerkmals sind die komplexen Regulationsvorgänge, die der riechepithelialen Neurogenese unterliegen, Gegenstand intensiver biomedizinischer Forschung. Hiermit ist die Hoffnung verknüpft, dass ein Verständnis dieser Prozesse das Feld der regenerativen Medizin nachhaltig revolutionieren könnte, indem es neue Therapieansätze zur Unterstützung der Neurogeneration, z. B. für Patienten mit traumatischem spinalen Querschnittssyndrom oder nach apoplektischem Insult, mit sich brächte.

Erst kürzlich wurde die kritische Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die riechepitheliale Entwicklung und die Neurogenese innerhalb dieser Struktur herausgestellt [16, 17]. Grundsätzlich unterscheidet man innerhalb des Riechepithels zwei Zellpopulationen mit Stammzeleigenschaften, deren jeweilige Stellung noch nicht abschließend geklärt ist. Innerhalb der sogenannten Basalzellen entsprechen Tumor Protein p63 (TP63) exprimierende "horizontale" Basalzellen, welche unmittelbar der Basallamina aufliegen, a. e. einem relative „stillen“ Reserve-Stammzellpool, der erst im Falle eines erhöhten Zellumsatzes, beispielweise nach Verletzungen, aktiviert wird. Unmittelbar apikal gelegene, TP63-negative, „globuläre“ Basalzellen zeigen eine deutlich höhere Zellteilungsrate und sind vermutlich wesentlich an der Aufrechterhaltung des physiologischen Zellumsatzes des Riechepithels beteiligt [18]. Aus ihrer asymmetrischen Teilungsaktivität gehen sich

schnell teilende Vorläuferzellen hervor, die einen neuronalen oder nicht-neuronalen Zelldifferenzierungsweg einschlagen können, um letztlich die terminal differenzierten Riechsinneszellen (neuronal) bzw. Stützzellen (nicht-neuronal) des Riechepithels auszubilden. Die terminal differenzierten Stützzellen sind ihrerseits ebenfalls zur Selbsterneuerung fähig [19]. Als Ausdruck dieser Eigenschaft exprimieren sowohl die beiden Basalzellpopulationen als auch die Stützzellen den Transkriptionsfaktor Sox2, dem eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung von Selbsterneuerung und Pluripotenz embryonaler und neuronaler Stammzellen zukommt [20].

Bereits seit längerem ist bekannt, dass die Festlegung einer riechepithelialen Vorläuferzelle auf den neuronalen Differenzierungsweg und die Abfolge der einzelnen Differenzierungsstadien über die sequenzielle Expressionskaskade sog. bHLH (basic-helix-loop-helix) Transkriptionsfaktoren in der Reihenfolge „Mash1 > Neurogenin1 > NeuroD1“ koordiniert wird [21-23]. An den Übergängen der einzelnen Differenzierungsstadien kommt es zu Überlappungen: Eine Sox2/Mash1-koexprimierende Zelle entspräche demnach einer teilungsaktiven ersten Generation von „transit-amplifying progenitors“ mit erstmals neuronaler Festlegung, wohingegen eine NeuroD1-exprimierende Zelle als postmitotische INP (intermediate-neuronal-progenitor)-Zelle die unmittelbare Vorstufe zur reifen Riechsinneszelle markiert. Letztere kann beispielsweise über die Expression von OMP (olfactory marker protein) identifiziert werden [23]. Erkenntnisse über die Signale, welche die Auswahl des Differenzierungsweges und die Kinetik der Differenzierung steuern, blieben indes lange Zeit rar.

Wang et al. stellten 2011 erstmals die Bedeutung des Wnt-Signalwegs für den neuronalen Differenzierungsweg heraus [16] (vgl. Abbildung 2). Mit Hilfe von *in vitro*-Experimenten konnten sie zeigen, dass die Aktivierung des Wnt-Signalwegs für die Selbsterneuerung Sox2-positiver riechepithelialer Stammzellen und die Expansion von

aus diesen hervorgehenden neuronalen Vorläuferzellen von Bedeutung ist. Darüber hinaus fanden sie eine bevorzugte Stimulation der riechepithelialen Neurogenese auf Kosten der nicht-neuronalen Differenzierung unter Wnt-Stimulation (vgl. Abbildung 2). Nach Methimazol-abhängiger Schädigung des Riechepithels *in vivo* gehen nachgeschaltete Regenerationsvorgänge mit einer ausgeprägten Aktivierung des Wnt-Signalwegs einher. Die gezielte pharmakologische Inhibition des Wnt-Signalwegs vermag es hingegen, die riechepitheliale Regenerationskapazität deutlich zu deprimieren. Die Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Proliferation basaler Vorläuferzellen und die Neurogenese innerhalb des Riechepithels wurde in einer nachfolgenden Arbeit unabhängig durch *Chen et al.* 2014 bestätigt und hierbei erstmals auch *in vivo* nachgewiesen [17]. Zusätzlich legen die Autoren den Schluss nahe, dass eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs innerhalb des Riechepithels die terminale Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen zu reifen Riechsinneszellen gezielt verzögert und somit die Expansion eines Pools an unreifen neuronalen Vorläuferzellen fördert. Zusammenfassend scheint dem Wnt-Signalweg für die Neurogenese und Neuroregeneration innerhalb des Riechepithels eine entschiedene Bedeutung beizukommen.

Der nicht-neuronale-Differenzierungsweg im Riechepithel scheint in erster Linie über eine Suppression der Mash1-Expression durch eine Aktivierung des Notch-Signalwegs eingeleitet zu werden [24-26]. Konsequenterweise exprimieren reife Stützzellen den Transkriptionsfaktor HES1, welcher ein „Downstream-Effektor“ des Notch-Signalwegs ist.

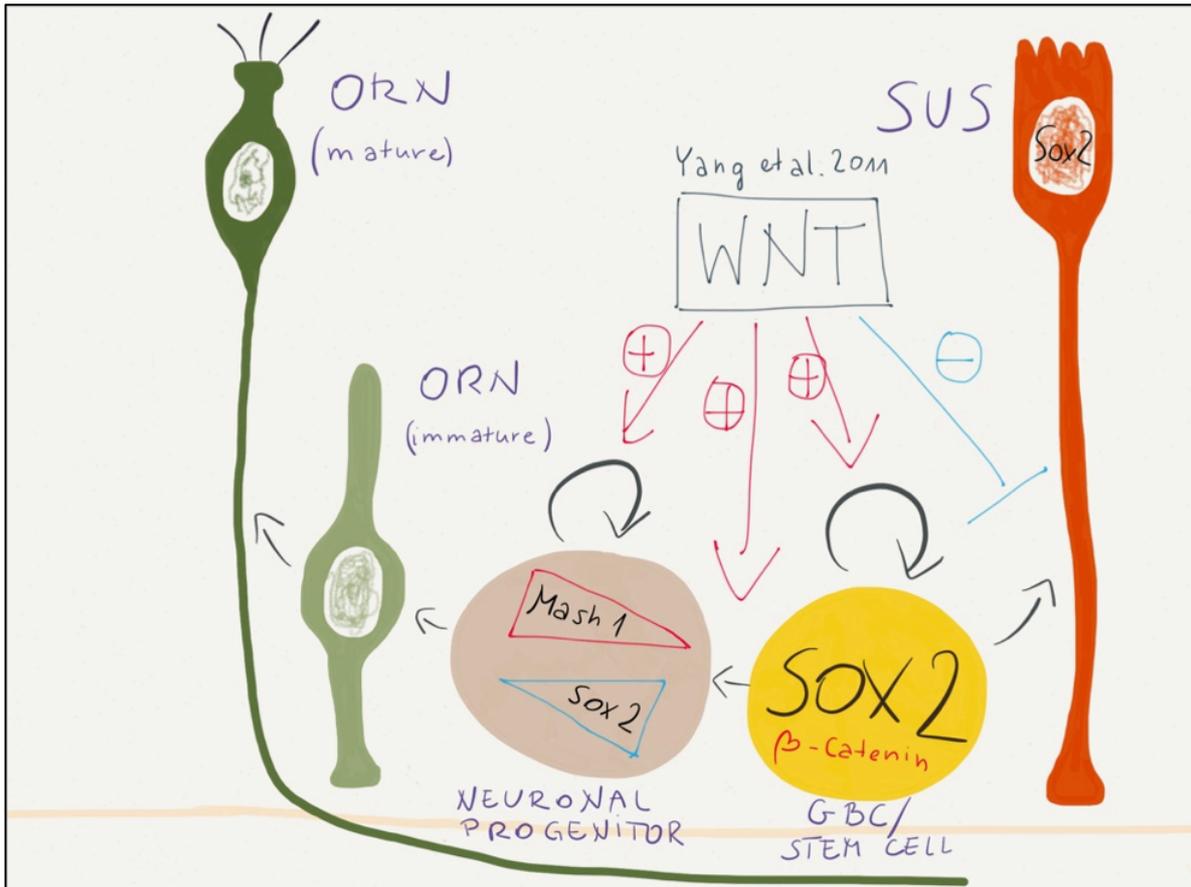


Abbildung 2: Die physiologische Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die zelluläre Differenzierung des Riechepithels. Das Wnt-Signal im Riechepithel fördert die Selbsterneuerung Sox2-positiver Stammzellen (GBC = globuläre Basalzelle) des Riechepithels, begünstigt die Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen (neuronal progenitor) und fördert die Expansion der genannten Zellpopulationen (rote Pfeile mit „+“-Zeichen). Gleichzeitig hemmt der Wnt-Signalweg den nicht-neuronalen Differenzierungsweg zur Stützzelle (SUS = Sustentakuläre Stützzelle; blauer Pfeil mit „-“-Zeichen). Die hemmende Wirkung des Wnt-Signalwegs auf die terminale neuronale Differenzierung ist nicht gezeigt. Die für die neuronale Differenzierung erforderliche, sequenzielle und teils überlappende Expression der bHLH-Transkriptionsfaktoren ist für Mash1 in einer frühen neuronalen Vorläuferzelle angedeutet. Diese ist im Begriffe, ihre Sox2-Expression zu verlieren. Reife Stützzellen exprimieren ebenfalls Sox2. ORN = Olfaktorische Riechsinneszelle; immature ORN = unreife Riechsinneszelle; mature ORN = reife Riechsinneszelle.

1.2. **Der Wnt-Signalweg und Mechanismen seiner onkogenen Dysregulation**

Der Wnt-Signalweg ist ein hochkonservierter Signaltransduktionsweg, der zunächst für seine Rolle in der Tumorentstehung entdeckt und charakterisiert wurde, bevor auch seine essentielle Bedeutung in der Embryogenese [27] für eine Vielzahl von Prozessen wie der Formung der anterior-posterioren Körperachse [28], der Gastrulation [29] sowie der Entwicklung des Nervensystems (Details im nachfolgendem Abschnitt) beschrieben wurde. Dieser historische Dualismus spiegelt sich in der Namensgebung des „Wnt“-Signalwegs wieder, wobei es sich bei „Wnt“ um eine Hybridbezeichnung aus „Wingless-related integration site“ handelt [30]. *Nusse* und *Varmus* zeigten, dass die Integration eines bestimmten Retrovirus an eine spezifische Stelle im Mausgenom durch die Aktivierung der Transkription des nachgeschalteten Gens (fortan als *int1*-Gen bezeichnet) zur Brustkrebsentstehung in der Maus führen kann [31]. Das *Wingless (Wg)*-Gen war bereits zuvor durch *Nüsslein-Vollhard* und *Wieschaus* und als Teil einer Gruppe von Segment-Polaritätsgenen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* charakterisiert worden [32], dessen Knock-out bezeichnender Weise zu einem Verlust der Flügel führt [33]. Spätere Arbeiten zeigten, dass beide Phänotypen auf Alterationen in ein und demselben homologen Gen in zwei unterschiedlichen Spezies zurückzuführen waren [34], welches als Prototyp einer Gruppe von ähnlichen Genen fortan im Sinne der obigen Hybridbezeichnung als *Wnt1* firmierte, dessen Genprodukt als Ligand zum Namensgeber des zugehörigen Signaltransduktionsweges werden sollte.

In der Betrachtung des Wnt-Signalwegs muss man heute korrekterweise zwischen drei verschiedenen Wnt-assoziierten Signalwegen differenzieren: dem kanonischen Wnt-Signalweg (auch Wnt/ Beta-Catenin-Signalweg), dem nicht-kanonischen planaren Zellpolaritäts-Signalweg sowie dem nicht-kanonischen Wnt/ Calcium Signalweg [35].

Sowohl was das Verständnis der molekularen Mechanismen als auch des biologischen Kontextes betrifft, ist der kanonische Wnt-Signalweg mit Abstand am besten verstanden [36].

Mutationen im Wnt-Signalweg wurden in einer Vielzahl von neoplastischen Erkrankungen in hoher Frequenz detektiert, was die Bedeutung seiner Dysregulation in der Tumorigenese unterstreicht. Zumeist sind Mutationen beschrieben, die zu einer Aktivitätssteigerung des kanonischen Wnt/ Beta-Catenin-Signalwegs beitragen [37], aber auch Aberrationen in den nicht-kanonischen Signalwegen wurden in Tumoren charakterisiert. Beispielsweise wurde der planare Zellpolaritäts-Signalweg mit Tumormetastasierung in Verbindung gebracht [36].

Im kanonischen Wnt/ Beta-Catenin-Signalweg (Abbildung 3) binden Wnt-Liganden einen heterodimeren Rezeptorkomplex, welcher aus einem 7-Transmembran-Frizzled-Rezeptor-Protein sowie einem LRP5/6-Protein besteht [38]. Die Schlüsselrolle der Signaltransduktion im kanonischen Wnt-Signalweg wird durch den zyttoplasmatischen Destruktionskomplex, bestehend aus den Tumorsuppressorproteinen Axin1, APC und WTX sowie den konstitutiv aktiven Serin-Threonin-Kinasen CK1-alpha/delta und GSK3-alpha/beta, in der Regulation der Stabilität des Beta-Catenin-Proteins übernommen [38]. In Abwesenheit eines Wnt-Liganden (Abbildung 3A) wird Axin1-gebundenes Beta-Catenin an N-terminalen Seronin/Threonin-Aminosäuren durch CK1 und GSK3 phosphoryliert. Das durch die Phosphorylierung entstandene Motiv wird von dem F-box/WD repeat-Protein Beta-TrCP als Bestandteil eines E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes erkannt, worüber die Ubiquitinylierung und nachgeschaltete proteasomale Degradation des Beta-Catenin eingeleitet wird [38, 39]. Die Bindung eines Wnt-Liganden an den heterodimeren Frizzled/LRP-Rezeptorkomplex hingegen (Abbildung 3B) induziert eine Konformationsänderung des Komplexes mit anschließender Phosphorylierung von LRP6 mit konsekutiver LRP6-Axin1-Bindung [38]. Die Bindung

zwischen LRP6 und Axin1 wird durch die Interaktion von Frizzled mit Dishevelled erleichtert [40]. In der Folge unterbleibt eine Ubiquitylierung des Beta-Catenin was zur Sättigung des Destruktionskomplexes mit bereits phosphoryliertem Beta-Catenin führt [41]. Neu-synthetisiertes Beta-Catenin ist solchermaßen „stabilisiert“, akkumuliert im Zytoplasma und wandert in den Zellkern, wo es in Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie die Expression von Zielgenen des Wnt-Signalwegs, wie z.B. *MYC* (c-Myc) oder *CCND1* (Cyclin-D1), ermöglicht [38, 42], was u.a. im Zellzyklus den Übergang aus der G1 in die S-Phase mit resultierender Zellproliferation ermöglicht [43, 44].

Die potentesten Driver-Mutationen des Wnt-Signalwegs in neoplastischen Erkrankungen bewirken eine pathologische konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs unabhängig vom physiologischen Wnt-Liganden mit Stabilisierung und Akkumulation des Beta-Catenin, indem sie den Mechanismus der Beta-Catenin-Degradation auf verschiedenen Ebenen blockieren. *APC* (Adenomatous Polyposis of the Colon)-„Loss-of-function“-Keimbahnmutationen sind die genetische Grundlage des hereditären FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis)-Syndroms [45] und gelegentlich des Turcot-Syndroms, einhergehend mit der frühzeitigen und massenhaften Entstehung von kolorektalen Adenomen mit Übergang in kolorektale Karzinome und einer Prädisposition für die Ausbildung von Medulloblastomen [46]. *APC*-Mutationen sind zudem die häufigsten somatischen Mutationen des kolorektalen Karzinoms [47] und nach dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz hier in den meisten Fällen der Ausgangspunkt der malignen Transformation [48]. „Gain-of-function“-Mutationen im *CTNNB1* (Beta-Catenin)-Gen führen zu einem Verlust der für die Degradation essentiellen Phosphorylierungsstellen durch Verlust der kritischen Serin/Threonin-Aminosäuren durch Punktmutationen oder durch Deletion von Exon 3 und wurden in diversen Neoplasien einschließlich der Wnt-Subgruppe des Medulloblastoms

detektiert [49-53]. Ultimativ sind die genannten Mutationen von *APC* und *CTNNB1* sowie „Loss-of-function“-Mutationen im *AXIN1*-Gen für sich alleingegenommen suffizient, um ohne weitere Alterationen die Entstehung von intestinalen und hepatischen Neoplasien im Mausmodell zu begründen [54-56], was die onkogene Potenz von Alterationen auf dieser Ebene des Wnt-Signalwegs eindrücklich unterstreicht.

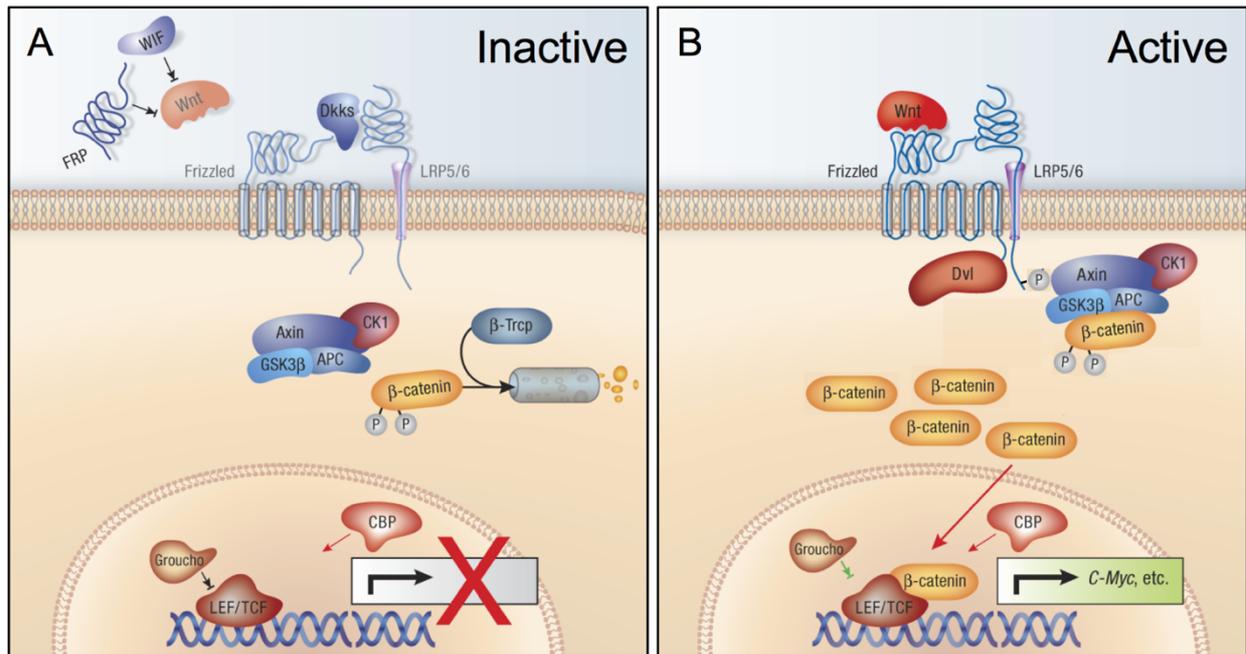


Abbildung 3: Der kanonische Wnt-Signalweg (Wnt/Beta-Catenin-Signalweg). (A) Axin, APC, WTX (nicht gezeigt), GSK3 und CK1 bilden den Destruxionskomplex, in welchem über die Kinase-Domänen von CK1 und GSK3 in Abwesenheit einer Wnt-Signals (inaktiver Signalweg) eine Phosphorylierung von Beta-Catenin an kritischen Seronin/Threonin-Aminosäuren bewirken. Die Erkennung der Phosphorylierung durch Beta-TrCP leitet die Ubiquitylierung und proteasomale Degradation des Beta-Catenin ein. (B) Im Falle der Aktivierung des Signalwegs durch eine Wnt-Liganden, der an die extrazellulären Domänen des heterodimeren Frizzled-LRP5/6-Rezeptorkomplexes bindet, resultiert eine Konformationsänderung mit konsekutiver Phosphorylierung von LRP5/6, welche eine Bindung zwischen LRP5/6 und Axin erlaubt. Diese wird durch die Interaktion von Frizzled und Dishevelled (Dvl) erleichtert. Die Ubiquitylierung des Beta-Catenin unterbleibt; neu-synthetisiertes Beta-Catenin akkumuliert und wandert in den Zellkern, wo es die Expression von TCF/LEF-abhängigen Zielgenen des Wnt-Signalwegs ermöglicht. Die dargestellte Abbildung ist eine Adaptation einer Originalabbildung aus [2]; Adaption & Verwendung mit freundlicher Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd..

1.3. *Über die häufige Koinzidenz einer physiologischen und onkogenen Bedeutung des Wnt-Signalwegs in ein und derselben Gewebsstruktur*

Wie oben erläutert, spielt neben der physiologischen Rolle des Wnt-Signalwegs für die Regulation zellulärer Wachstums- und Differenzierungsprozesse im gesamten Körper die pathologische Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs für die Entstehung einer Vielzahl von humanen Neoplasien eine entscheidende Rolle [51, 57-66]. Interessanter Weise entfaltet eine Dysregulation des Wnt-Signalwegs oftmals in ausgerechnet derjenigen Gewebsstruktur ein transformatives Potential der Tumorentstehung, in welcher der Wnt-Signalweg auch schon eine bedeutende physiologische Funktion innehat. Dieser Sachverhalt kann in exemplarischer Weise für die Rolle des Wnt-Signalwegs in der Gewebshomöostase der normalen Darmmukosa [67, 68] und der Entstehung des kolorektalen Karzinoms geltend gemacht werden [48, 51, 54].

Im zentralen Nervensystems spielt der Wnt-Signalweg eine entscheidende physiologische Rolle in der Entwicklung von Pros- und Metencephalon [69-72]. Eine strikte Kontrolle der zeitlichen und räumlichen Aktivierung bzw. Inaktivierung sowie der Intensität des Wnt-Signals sind hierbei für die korrekte Ausbildung und Integration der neuronalen Strukturen unerlässlich. Eine pathologische konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs führt in der Embryonalentwicklung zu einer massiven Expansion neuronaler Vorläuferzellen des Großhirns, was mit einer Erweiterung der Seitenventrikel und einer flächenmäßigen Ausdehnung des Neocortex einhergeht [70, 71]. Gleichzeitig ist aber die terminale neuronale Ausdifferenzierung gestört [71]. Ein pathologisches gesteigertes Wnt-Signal in pre-cerebellären Nuklei der unteren rhombischen Lippe führt zur Entstehung von Medulloblastomen der molekularen Wnt-Subgruppe [62].

Das Verhältnis zwischen der essentiellen Bedeutung eines physiologischen Wnt-Signals für die Entwicklung des ZNS und der kausalen Bedeutung einer überschießenden Wnt-Aktivierung in der Entstehung von Medulloblastomen lässt sich im Weiteren sogar auf eine ganze Reihe von Signaltransduktionswegen (z.B. Sonic Hedgehog (Shh)-, Notch- und Ephrin-Signalweg) in ihrer Rolle für die physiologische ZNS-Entwicklung und ihrer Bedeutung in der Pathogenese pädiatrischer Hirntumoren im Falle der Dysregulation übertragen [73].

In Anbracht dieser Parallelität zwischen der physiologischen Aktivierung des Wnt-Signalwegs im nativen Gewebe, aber dessen pathologischer Überaktivierung in dem aus diesem Gewebe hervorgehenden Tumor, ließe sich nach der Übertragbarkeit dieses Sachverhalts auf die Struktur des Riechepithels fragen, wo der Wnt-Signalweg - wie bereits vorangehend dargelegt – ebenfalls eine essentielle physiologische Funktion innehat. Mithin wäre ein Wnt-abhängiger Tumor zu postulieren, der seinen Ausgang von neuronalen Vorläuferzellen des Riechepithel nähme. Die Existenz einer solchen Tumorentität ist zu Anbeginn dieser Arbeit nicht bekannt.

1.4. Sinonasale Tumoren des Menschen unter Fokussierung auf einen riechepithelialen Ursprung oder eine pathogenetische Wnt-Assoziation

Ein Kandidat für einen vermutlich vom Riechepithel ausgehenden Tumor wäre das Olfaktoriusneuroblastom (ONB). Auch wenn ein zellulärer Ursprung dieser Tumorentität im Riechepithel formell nie gezeigt wurde, sprechen seine häufige Lokalisation am Dach der Nasenhaupthöhle [74], seine neuroektodermale Differenzierung sowie die tumorzelluläre Expression von Mash1 [75] für diese Annahme. Das ONB ist eine sehr seltene sinonasale Neoplasie, deren Inzidenz auf etwa 1:2,5 Mio. taxiert wird und insgesamt nur 2-3 % aller sinonasalen Tumore

ausmacht [76]. Das ONB kann in der Kindheit sowie im Erwachsenenalter auftreten [77] zeigt jedoch einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 40. – 60. Lebensjahr [78].

Aufgrund der Seltenheit dieses Tumors sind Erkenntnisse über dessen molekulare Entstehungsmechanismen äußerst begrenzt. Einige Studien beschäftigten sich mit der Charakterisierung von zytogenetischen Alterationen von ONBs. Diese berichten über teils komplexe chromosomale Alterationen - ihre Aussagekraft ist aufgrund der jeweils geringen Größe der untersuchten Kohorten jedoch als gering einzustufen [79-81]. *Sorensen et al.* postulierten 1996 das rekurrente Vorliegen der EWS/FLI-Translokation in ONBs (4 von 6 untersuchten Fällen) [82], welches ein charakteristisches Merkmal von Ewing-Sarkomen darstellt [83]. Dieses Ergebnis konnte jedoch in mehrfachen nachfolgenden Arbeiten nicht bestätigt werden [84, 85]. Zwei einzelne Fälle von ONBs wurden jeweils unabhängig voneinander einer genomweiten Sequenzierung zugeführt, wobei übereinstimmend SNV („single nucleotide variant“)-Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* berichtet wurden [86, 87]. Eine Folgearbeit hob für einen dieser Fälle zusätzlich eine *CDKN2C*-„loss-of-function“-Mutation hervor und betonte die chromosomale Instabilität des ONB-Falls gegenüber 6 anderen, in dieser Arbeit ebenfalls analysierten, Tumoren [88]. Systematische Studien zur Analyse genetischer oder chromosomaler Alterationen anhand von größeren ONB-Kohorten fehlten jedoch vor Beginn dieser Arbeit. Dementsprechend konnte bis dato keine entscheidende rekurrente molekulare „Driver“-Alteration für die Entstehung von ONBs herausgearbeitet werden, so dass folgerichtig auch ein gentechnisch verändertes ONB-Modellsystem bis heute nicht zur Verfügung steht.

Eine nicht speziell vom Riechepithel ausgehende sinonasale Tumorentität, für welche die aberrante Aktivierung des Wnt-Signalwegs jedoch bereits gezeigt werden konnte, ist das sinonasale Hämangioperiztom (sHPC). Die Eigenständigkeit des sHPC in Abgrenzung zu solitären fibrösen Tumoren (SFT) des Sinonasaltraktes und dem

meningealen Hämangioperiztom (mHPC) konnte hierbei erst in den letzten Jahren herausgearbeitet werden [89]. Das sHPC ist ein semi-maligner Tumor mesenchymaler Differenzierung, der für weniger als 0,5 % aller sinonasalen Tumoren verantwortlich zeichnet [76]. Als wahrscheinliche Ursprungszelle dieses sub-epithelial wachsenden Tumors wird eine perivaskuläre Zelle mit myoider Differenzierung (Perizyt) angenommen [90].

Auf molekularer Ebene drückt sich die Eigenständigkeit des sHPCs im Fehlen des *NAB2-STAT6*-Fusionstranskriptes aus, welches für SFTs und mHPCs charakteristisch ist [89]. *Lasota et al.* sowie *Haller et al.* konnten erst kürzlich unabhängig voneinander die Akkumulation von nukleärem Beta-Catenin (insgesamt n=18/18 Fälle) in sHPCs zeigen, der potentiell funktionell relevante Mutationen im Exon 3 des *CTNNB1*-Gens zugrunde liegen (insgesamt n=17/18 Fälle) [91, 92]. Diese Untersuchungen legen in der Zusammenschau den Erwerb einer *CTNNB1*-Mutation als Schlüsselalteration der sHPC-Entstehung nahe. Ein entsprechendes Modellsystem fehlt jedoch bislang ebenfalls.

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob eine pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs innerhalb des Riechepithels zur Entstehung von riechepithelialen Tumoren beitragen kann. Zu diesem Zwecke wurde ein induzierbares *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+}*-Mausmodell konstruiert, welches die Einbringung eines Beta-Catenin (*Ctnnb1*) Allels mit deletiertem Exon 3 in Sox2-exprimierende Vorläuferzellen des murinen Riechepithels ermöglicht. Auf diese Weise wird eine konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in der entsprechenden Zellpopulation erreicht. Die in der Folge entstehenden, riechepithelialen Veränderungen werden auf

den Ebenen der Histomorphologie und Immunohistochemie analysiert werden. Es wird schlussendlich noch die Frage adressiert, inwieweit diese murinen Veränderungen Ähnlichkeiten mit den oben genannten humanen sinonasalen Neoplasien aufweisen.

2. Material und Methoden

2.1. Transgene Mäuse

Die Sox2-creER^{T2}-Maus

Die Sox2-creER^{T2}-Maus [93] trägt ein creER^{T2}-Knockin-Fusionsgen anstelle der nativen Sequenz innerhalb des offenen Leserasters des Sox2-Gens. Sie ermöglicht die Expression des Fusionsgenproduktes in Zellen, die natürlicherweise Sox2 exprimieren. Das Fusionsprotein besteht aus der Cre-Rekombinase gekoppelt an einen genetisch-modifizierten humanen Östrogenrezeptor, welcher eine in physiologischen Konzentrationen irrelevante Affinität zum natürlichen Liganden 17-Beta-Estradiol mit jedoch hoher Affinität für Tamoxifen aufweist. Die Cre-Rekombinase erlaubt die Exzision (theoretisch auch Inversion) von gentechnisch durch loxP-DNA-Sequenzen gekennzeichneten Genabschnitten. Abhängig vom Transgen-Konstrukt der zur Verpaarung ausgewählten Mauslinie ermöglicht das System eine Gewebespezifische (hier spezifisch für Sox2-exprimierende Zellen), Steuerung der Aktivität selektiver Gene [94] (sowohl Gen-Knock-outs als auch -Knock-ins möglich). Durch die Bindung der Cre-Rekombinase an den Östrogenrezeptor wird die Überführung der Cre-Rekombinase in den Zellkern und somit die Rekombination erst durch die Exposition gegenüber und die anschließende Bindung von Tamoxifen ermöglicht, womit neben der räumlichen auch eine zeitliche Steuerbarkeit der Rekombination gegeben ist (über den Zeitpunkt der Tamoxifen-Applikation).

Die *B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J}* (*tdTomato*)-Maus

Bei der *B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm9(CAG-tdTomato)Hze/J}* (*tdTomato*)-Maus [95] handelt es sich um eine sogenannte Cre-Reporter-Linie, welche innerhalb des *Gt(ROSA)26Sor*-Lokus ein Transgenkonstrukt bestehend aus einem starken CAG-Promotor [96] mit nachgeschalteter kodierender Sequenz einer Variante eines rot-fluoreszierenden Proteins (*tdTomato*) [97] aufweist. Diesem Konstrukt ist eine von loxP-Sequenzen umrahmte Stopp-Kassette vorgeschaltet, so dass eine Expression des *tdTomato*-Proteins erst durch eine Cre-abhängige Rekombination mit Exzision der Stopp-Kassette ermöglicht wird (schematische Darstellung des Transgenkonstruktes in Abbildung 4). Die Gewebe-Spezifität der Expression hängt von Promotor des Tamoxifen-abhängigen-Cre-Konstruktes einer entsprechend als Paarungspartner auszuwählenden Mauslinie ab. Durch eine entsprechende Verpaarung erhält man methodisch ein Beispiel für ein sogenanntes „genetic inducible fate-mapping (GFIM)“-System, in welchem das induzierbare Cre/loxP-System zur Markierung einer definierten Zellpopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt durch irreversible Aktivierung der Expression eines Cre-responsiven Reporter-Transgens genutzt wird [98]. Neben der ursprünglich markierten Zellpopulation werden auch alle Tochterzellen dieser Population über den Zeitverlauf markiert, so dass ein Werkzeug zur Adressierung entwicklungsbiologischer Fragestellungen, wie z. B. zur Frage nach dem zellulären Ursprung einer späteren Gewebsstruktur oder nach der Identität von Vorläuferzellen einer späteren Zellpopulation, entsteht [98].

Die *Ctnnb1(ex3)^{F1/FL}*-Maus

Die *Ctnnb1(ex3)^{F1/FL}*-Maus [55] weist eine modifizierte Sequenz des *Ctnnb1*-(Beta-Catenin)-Gens auf, in welcher die Sequenz von Exon 3 (ex3) durch loxP-Sequenzen flankiert wird (schematische Darstellung des Transgenkonstruktes in Abbildung 4). Eine Cre-abhängige Rekombination führt somit zur Exzision der Sequenz von Exon 3, woraus die Expression eines Exon 3-deletierten Beta-Catenin-Proteins resultiert, was nach dem bereits ausgeführten Mechanismus (siehe oben) durch den Verlust kritischer Phosphorylierungsstellen eine Stabilisierung des Beta-Catenin mit resultierend konstitutiver Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs bedingt. Gewebe-Spezifität und zeitliche Steuerung der Modellinduktion sind abermals von den Konditionen des Cre-Transgens der zur Verpaarung ausgewählten Mauslinie abhängig.

Die Modellinduktion

Die *in vivo* Induktion des *tdTomato*- oder des defektiven *Ctnnb1(ex3)*-Allels in Sox2-positiven Zellen wurde Modell-bedingt durch die intraperitoneale Injektion von Tamoxifen (Sigma-Aldrich) der jeweiligen Mäuse erreicht. Den trächtigen Weibchen (hervorgegangen aus Verpaarungen von *Sox2-creER^{T2}*- mit *tdTomato*-Tieren bzw. *Sox2-creER^{T2}*- mit *Ctnnb1(ex3)^{F1/FL}*-Tieren; Verpaarungsschema siehe Abbildung 4) wurde am Tag 14,5 der Embryonalentwicklung (E14,5) jeweils einmalig 1 mg Tamoxifen (50 mg/kg Körpergewicht in Maisöl; Sigma-Aldrich) injiziert. Der Tag des Auffindens eines Vaginalpfropfes wurde hierbei näherungsweise als Tag E0,5 der Schwangerschaft angenommen (wahrer Wert E0 oder E1 mit angenommen gleicher Wahrscheinlichkeit). Im Fall der postnatalen Modellinduktion wurde den Mäusen entweder am Tag 7, 14 oder 21 nach der Geburt (P7, P14 oder P21) einmalig Tamoxifen in gleicher Weise injiziert. Die injizierten Mäuse wurden darauffolgend jeweils unter Beachtung von Zeichen der Tumorentwicklung oder Gedeihstörungen

mindestens einmal täglich observiert. Zusammen mit gleichaltrigen Geschwistern desselben Wurfs, die nicht über das *Cre*-Allel verfügten, wurden die „effektiven“ Mutanten mit *Cre*-Allel und entsprechend stattgehabter Rekombination nach dem Auftreten sicherer Symptome getötet und wie untenstehend beschrieben aufgearbeitet. Aufzucht, Haltung und Tötung der Tiere erfolgten im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) und der Tierschutz-Versuchstierverordnung.

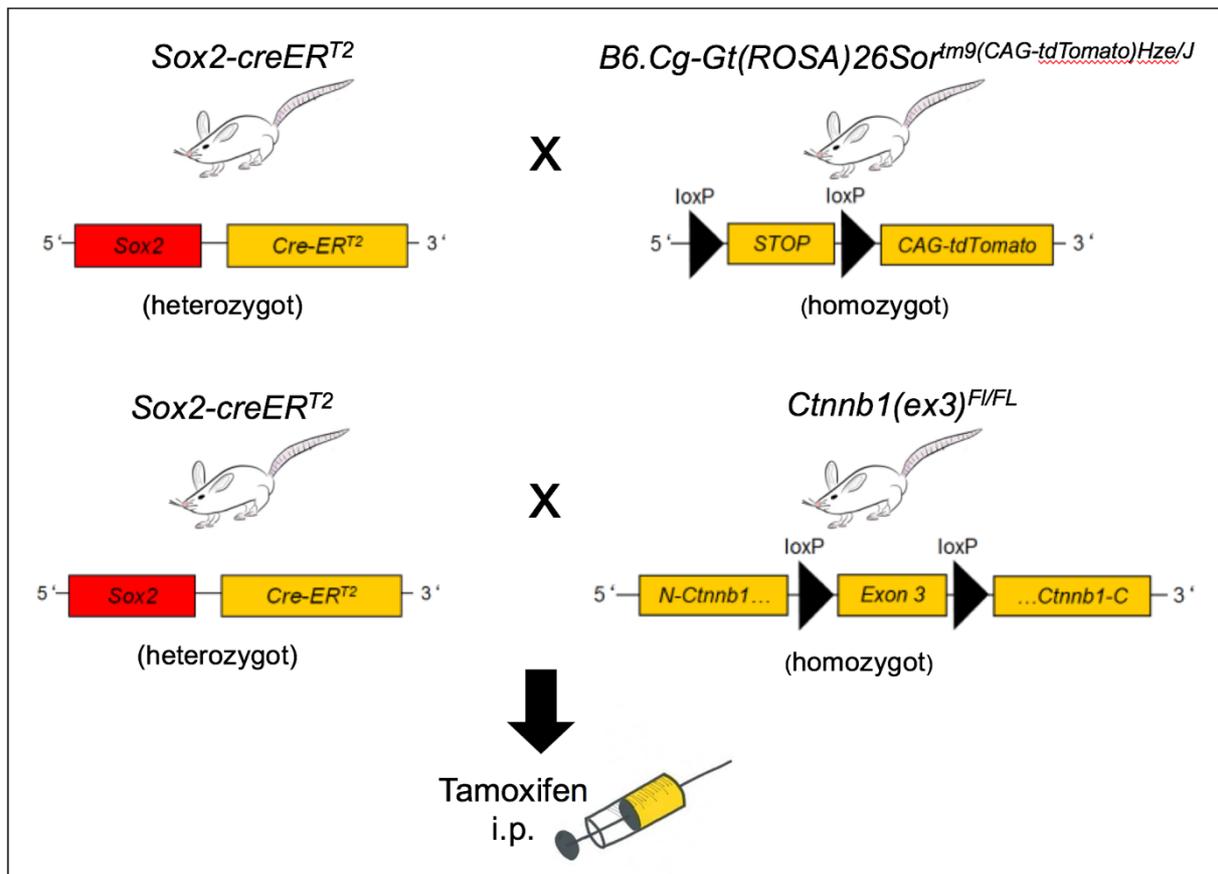


Abbildung 4: Verpaarungsschema und schematische Darstellung der Transgenkonstrukte der verwendeten Mauslinien.

2.2. Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mauslinien erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) anhand genomischer DNA, welche aus Schwanzspitzen oder bei älteren Tieren aus

Ohrbiopsien der Mäuse isoliert wurde. Zwecks DNA-Isolation erfolgte ein Verdau des Gewebes mit 500 µl eines Lysepuffers (200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 µg/ml Proteinase K in ddH₂O) über zumindest 2 Stunden Inkubationszeit bei 56 °C auf dem Thermomixer. Nach Zentrifugation des Ansatzes bei 16000 g für 5 min. wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt. Durch Schütteln wurde ein Ausfallen der genomischen DNA erreicht, welche nach erneuter Zentrifugation bei 16000 g über 5 min. als Pellet vom Überstand getrennt und in TE-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 1 mM EDTA in ddH₂O) gelöst und gelagert werden konnte. Die zur Genotypisierung der einzelnen Mauslinien verwendeten Primer entsprechen zum Nachweis des Ctnnb1(ex3)-Allels den zuvor publizierten Sequenzen [55]. Die Primer zum Nachweis des Sox2-creERT²- und tdTomato-Allels wurden entsprechend den Empfehlungen von "The Jackson Laboratory" (www.jax.org) designt. Die einzelnen Primer-Sequenzen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Primer-Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
Ctnnb1(ex3)FI/FI Fw	CGTGGACAATGGCTACTCAA
Ctnnb1(ex3)FI/FI Rv	TGTCCAACCTCCATCAGGTCA
Sox2-Fw	AGGCTGAGTCGGGTCAATTA
Sox2-Rv	CATCCAAGCTAGGCAGGTT
tdTomato Mu-Fw	GGCATTAAAGCAGCGTATCC
tdTomato Mu-Rv	CTGTTCCCTGTACGGCATGG
tdTomato WT-Fw	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA
tdTomato WT-Rv	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC

Tabelle 1: Primerpaare für die Genotypisierung.

Die Bedingungen der der Genotypisierungs-PCR sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	
Vorinkubation	95	120	
Denaturierung	95	30	35 Zyklen
Primer-Hybridisierung	60	30	
Elongation	72	60	
Stopp	4	∞	

Tabelle 2: Bedingungen der Genotypisierungs-PCR

2.3. Patienten und Gewebeproben

Im Rahmen der chirurgischen Tumorresektion gewonnene, eingefrorene und Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Tumorproben von insgesamt n=27 Patienten mit Olfaktoriusneuroblastom (ONB) standen dieser Studie zur Verfügung. Der Einschluss erfolgte allein nach Verfügbarkeit der Proben und unterlag keiner bewussten Selektion. Das Patientenkollektiv umfasste 14 männliche, 9 weibliche sowie einen Patienten mit nicht zur Verfügung stehender Geschlechts-Information. Die Patienten wurden an den Universitätskliniken München (LMU), Hamburg, Düsseldorf, Dresden, Berlin, Münster, Würzburg sowie Basel (Schweiz) behandelt. Das mediane Alter der Patienten lag bei 58,5 Jahren (Alterspanne: 32-82 Jahre). Unter Zugrundelegung des Kadish-Staging-Systems [99] waren 6 der verfügbaren Olfaktoriusneuroblastome zum Zeitpunkt der operativen Versorgung Tumoren im Stadium A mit einer auf die Nasenhaupthöhle beschränkten Ausbreitung. Ein Tumor befand sich im Stadium B mit Ausdehnung bis einschließlich der Nasennebenhöhlen. 16 der Tumoren befanden sich im Stadium C mit Ausdehnung jenseits der zuvor genannten Strukturen. Für einen Tumor lag keine Staging-Information vor. Detaillierte Informationen sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Die jeweilige Tumordiagnose des Vorliegens eines Olfaktorius-Neuroblastoms wurde durch lichtmikroskopische Standard-Evaluation von Hämatoxylin & Eosin (H&E) gefärbten Schnitten sowie unter

Berücksichtigung immunohistochemischer (IHC) Färbungen auf geeignete diagnostische Marker erreicht. Die Diagnosestellung der Fälle wurde von zumindest zwei Pathologen/Neuropathologen unabhängig voneinander auf Grundlage der aktuellen WHO-Klassifikation für Tumoren der Kopf- und Halsregion [76] bestätigt. Eine Graduierung der Aggressivität der Tumoren anhand histomorphologischer Kriterien erfolgte entsprechend des Hyams-Grading-Systems [100] durch einen erfahrenen Pathologen.

Fall ID (n=27)	Geschlecht	Alter (Jahre)	Manifestation	Hyams-Differenzierungsgrad	Kadish-Stadium
1	f	56	Primärtumor	II	C
2	m	44	Primärtumor	II	A
3	f	34	Primärtumor	II	C
4	f	39	Primärtumor	III	A
5	f	76	Lokalrezidiv	II	B
6	m	59	Primärtumor	II	A
7	f	73	Primärtumor	II	C
8	f	45	Primärtumor	n. a.	C
9	m	65	Lokalrezidiv	n. a.	A
10	m	82	Primärtumor	III	A
11	n. a.	78	Lokalrezidiv	II	C
13	m	32	Primärtumor	III	C
14	f	42	Primärtumor	II	C
15	m	58	Metastase	II	C
16	m	67	Lokalrezidiv	I	C
17	f	39	Primärtumor	III	C
19	m	66	Primärtumor	I	A
20	m	45	Primärtumor	III	C
21	m	63	Lokalrezidiv	II	C
22	m	38	Lokalrezidiv	n. a.	n. a.
23	m	59	Primärtumor	IV	C
25	m	81	Lokalrezidiv	II	C
26	f	77	Primärtumor	I	C
27	m	58	Primärtumor	IV	C

Tabelle 3: Übersicht über die humanen ONB-Fälle. Die Tabelle veranschaulicht für jeden ONB-Fall Informationen, wie sie aus der diagnostischen Aufarbeitung hervorgehen. f steht für "female" = weiblich. m steht für männlich. n.a. steht für "information not available" = Information nicht verfügbar. IHC steht für Immunohistochemie, wie sie im Rahmen dieser Studie zur Anwendung kam.

2.4. Gewebegewinnung, Fixation und H&E-Färbungen

Die getöteten Tiere, die zur weiteren histologischen Aufarbeitung bestimmt waren, wurden umgehend präpariert und disseziert. Die Schädelbasis der Tiere wurde in 4% Paraformaldehyd in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS; 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, pH 7,4) über Nacht fixiert, in 10%-iger EDTA-Lösung (pH 7,4) entkalkt und in Paraffin eingebettet. Für jedes dieser Tiere wurden Gehirn, Herz, Lunge, die Organe des Verdauungstraktes sowie die Nieren gesondert präpariert und separat nach Fixation in 4% Paraformaldehyd in PBS über Nacht in Paraffin eingebettet. Die gewonnen Paraffin-Blöcke der Schädelbasis wurden in frontaler Orientierung soweit angeschnitten, bis eine Schnittebene mit Anschnitt der Ethmoturbinalia I-V erreicht wurde. Auf dieser Anschnittstiefe wurden Schnitte (Dicke 4 μm) gewonnen und auf Superfrost Plus Objektträger (Fisher) aufgebracht. Alle Paraffinschnitte wurden im Vorwege weiterer Schritte in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert.

H&E-Färbungen dieser Schnitte und alle weiteren H&E-Färbungen wurden nach Standardprotokollen angefertigt. Für alle anderen gewonnenen Organe wurden repräsentative H&E-Färbungen nach Anschnitt in einer jeweils geeigneten Orientierung und Schnitttiefe angefertigt. Lichtmikroskopisch wurden die Organsysteme der Mutanten auf histomorphologische Veränderungen im Vergleich zu denjenigen der Kontrolltiere analysiert. Sofern Alterationen detektiert werden konnten, wurden weitere IHC-Färbungen zur genaueren Evaluation wie untenstehend beschrieben angefertigt.

2.5. Immunohistochemie (IHC)

Zum Zwecke der IHC-Färbung mittels DAB (3,3'Diaminobenzidin)-gestützter Visualisierung wurden ausgewählte Schnitte von in Paraffin eingebettetem Gewebe entparaffiniert und rehydriert und entweder nach Herstellerangaben unter Verwendung einer BenchMark GX-Färbemaschine (Ventana) und dem iView DAB Detection Kit (Ventana) teil-automatisiert gefärbt oder aber manuell in nachfolgend dargelegter Weise aufgearbeitet. Im Falle der manuellen Färbung erfolgte nach Rehydratation der Schnitte eine Hitze-induzierte Antigen-Demaskierung über mehrmaliges Kochen in 10 mM Natrium-Citrat-Puffer (pH 6). Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden alle Schnitte in 5 % H₂O₂ in Methanol inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Es folgten eine Inkubation in I-Block Blockingreagenz (Invitrogen) für 30 min. sowie die anschließende Inkubation mit einer adäquaten Verdünnung des jeweiligen primären, auf das Ziel-Antigen gerichteten Antikörpers bei 4 °C über Nacht. Abweichend hiervon wurde der verwendete Mash1-Antikörper in Blocking-Puffer verdünnt auf die Schnitte aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert [101]. Eine Auflistung der verwendeten primären Antikörper sowie der jeweiligen Verdünnung ist Tabelle 4 zu entnehmen. Eine Visualisierung des detektierten Antigens erfolgte mit dem EnVision System-HRP (DAB)-Kit (Dako) nach Herstellerangaben. Bei allen chromogenen Färbungen wurde eine nukleäre Gegenfärbung mittels Hämatoxylin durchgeführt. Fotografien der erhaltenen Färbungen wurden digital mittels eines Olympus BX50-Mikroskops unter Verwendung des "Color view Soft imaging"-Kamera-Systems aufgenommen. Um Immuno-Fluoreszenz-Doppelfärbungen zu erhalten, wurden ausgewählte Schnitte zweimal mit 0.1%iger Triton X-100-Lösung in PBS gewaschen und anschließend für 30 min. in I-Block Blockingreagenz (Invitrogen) bei Raumtemperatur inkubiert. Die primären, Antigen-gerichteten Antikörper (Auflistung nebst Verdünnungen in Tabelle 4) wurden in

Blocking-Puffer verdünnt auf die Schnitte aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden darauffolgend erneut zweimal in 0,1%iger Triton X-100-Lösung in PBS gewaschen und anschließend für weitere 60 min. mit einer 1:500-Verdünnung von Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern (Ziege-anti-Kaninchen Alexa546; Ziege-anti-Maus Alexa488, Invitrogen) in Blocking-Puffer inkubiert. Die Schnitte wurden erneut zweimal in 0,1%iger Triton X-100-Lösung in PBS gewaschen, mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) gegengefärbt und mit "Fluorescent Mounting Medium" (DAKO) eingedeckt. Die Fotografien dieser Immuno-Fluoreszenz-Färbungen wurden an einem Zeiss LSM 780 Laser-Scanning-Mikroskop unter Verwendung der ZEN 2012 Imaging Software aufgenommen. „Whole-Mount“-Fotografien der Mägen wurden an einem Leica DFC3000 G-Mikroskop unter Nutzung der Leica Application Suite Software aufgenommen.

Antikörper-Zielantigen	Hersteller	Katalog-Nr.	Verdünnung
RFP	Antibodies Online	AA234	1:200
Sox2	Abcam	AB79351	1:200
Ki67	Abcam	AB16667	1:200
Beta-Catenin	BD Pharmigen	610153	1:1000
Mash1	BD Bioscience	556604	1:25
Chromogranin A	Abcam	AB15160	1:300
CD56	Ventana, Roche	7602625	unverdünnt
S100	DAKO	Z0311	1:2000
SMA	DAKO	M0851	1:1000
Tuj1	BABCO	MMS435P	1:100

Tabelle 4: Im Rahmen der IHC-Färbungen zum Einsatz gebrachte primäre Antikörper mit Angabe der jeweilig eingesetzten Verdünnung.

2.6. Statistische Auswertung

Überlebensdaten, Gewicht und Größe der Mäuse wurden unter Verwendung der Prism5 Software (GraphPad) analysiert. Das Überleben der Mäuse wurde mittels Kaplan-Meier-Überlebenskurven dargestellt und der Log-Rank-Test wurde genutzt, um die Überlebensraten einer Stichprobe effektiver Mutanten mit einer Kontroll-Stichprobe zu vergleichen. Bei einem definierten Signifikanzniveau von 5% wurde ein unterschiedliches Überleben der beiden Gruppen im Falle eines p-Wertes $< 0,05$ angenommen. Zwecks Analyse der Verteilung von Gewicht bzw. Größe zwischen den zwei Gruppen „Mutanten“ und „Kontrollmäuse“ wurde der unpaarige T-Test angewendet, um die Mittelwerte der beiden Gruppen mit angenommener Gauß'scher Normalverteilung und angenommen gleicher Varianzen zu vergleichen. Alle entsprechenden Histogramme bilden den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) über Fehlerbalken grafisch ab.

3. Ergebnisse

3.1. Die wesentlichen Zelltypen des reifen Riechepithels gehen hauptsächlich aus Sox2-positiven Vorläuferzellen hervor

Wie oben dargelegt, setzt sich das reife Riechepithel aus neuronalen und nicht-neuronalen Zellen zusammen. Da zunächst unklar blieb, welche dieser Zellen in Folge pathologischer Wnt-Aktivierung ein tumorigenes Potential entfalten würden, stellte sich initial die Frage nach einer Cre-Driver-Mauslinie, die eine möglichst breite Induktion einer pathologischen Aktivierung des Wnt-Signalwegs in möglichst allen Zelltypen des Riechepithels erlauben würde. Wie oben bereits erörtert, exprimieren sowohl die sustentakulären Stützzellen als auch basale Stammzellpopulationen des Riechepithels den Transkriptionsfaktor Sox2 [102]. Um die Eignung einer Cre-Driver-

Maus für dieses Vorhaben zu testen, welche die Cre-Rekombinase in Abhängigkeit eines Sox2-Promotors exprimiert, wurde zunächst die Sox2-Expression in Wildtyp-Mausembryonen am Embryonaltag E14,5 untersucht. Die Entwicklungsstufe E14,5 schien aus verschiedenen Gründen der geeignetste Zeitpunkt für diese Untersuchung und die späteren, Cre-Driver-basierten „Fate-Mapping“-Studien im Riechepithel zu sein: Zum einen ist bekannt, dass die grundlegende, für die verbleibende Lebenszeit persistierende Zytoarchitektur des Riechepithels erstmals zwischen Embryonaltag E13,5 und E15,5 erreicht wird [21]. Zum anderen war ein ausgeprägter Effekt einer aberranten Wnt-Aktivierung bei möglichst frühzeitiger Modellinduktion zu erwarten. Wie aus der Literatur erwartet, zeigten die Mausembryonen im Alter von E14,5 eine deutliche Sox2-Expression (Abbildung 5A) in mitotisch aktiven apikalen und basalen Vorläuferzellen einschließlich eines anzunehmenden Stammzellpools [23].

Als nächstes war zu klären, in welcher Weise die Tochterzellen dieser Sox2-positiven Zellen zur zellulären Zusammensetzung des Riechepithels beitragen. Zu diesem Zwecke wurden *Sox2-creER^{T2}*-Mäuse mit einer *tdTomato*-Reporter-Mauslinie verpaart (vgl. Abbildung 4), deren Nachkommen nach Cre-Rekombinase-abhängiger Rekombination ein rot-fluoreszierendes Protein (red fluorescent protein, RFP) in Sox2-positiven Zellen und deren Nachfahren exprimieren. Die Expression der Cre-Rekombinase und somit das Rekombinationsereignis wurde durch einmalige intraperitoneale Injektion der schwangeren Mäuse am Tag E14,5 der Embryonalentwicklung erreicht; die Mäuse wurden am Tag der Geburt (P0) getötet und aufgearbeitet. Während immunohistochemische Untersuchungen auf RFP auf Schnitten des Riechepithels von Kontrollmäusen keine Reaktivität zeigten (vgl. 5B und J), offenbarten die „effektiven“ Mutanten eine homogene Anfärbung der gesamten riechepithelialen Struktur für diesen Marker. Hieraus ließ sich der Schluss ziehen, dass nahezu alle Zellen des Riechepithels am Tag P0 aus embryonalen Sox2-positiven

Vorläuferzellen hervorgehen (Abbildung 5C im Vergleich zur Kontrolle 5B). Detailliertere Untersuchungen mittels Doppel-Immunofluoreszenz-Färbungen zeigten, dass diese Tochterzellen Sox2-positiver Vorläuferzellen alle wesentlichen Zelltypen des postnatalen Riechepithels einschließen: Sox2/RFP-positive basale Stammzellen (Pfeile, Abbildung 5D-F), Sox2/RFP-positive sustentakuläre Stützzellen an der apikalen Seite des Riechepithels (5D-F, abgegrenzt durch gestrichelte Linie) und Tuj-1/RFP-positive Zellen, die der neuronalen Zelllinie angehören (5G-I). Sogar innerhalb des reifen Riechepithels am Postnataltag P28 konnte in diesem „Fate-Mapping“-Modell eine homogene und spezifische RFP-Färbung der gesamten Struktur beobachtet werden (Abbildung 5; Kontrolle in 5J). Dies deutet daraufhin, dass auch derjenige Stammzellpool, der für die postnatale Expansion und Regeneration im Riechepithel verantwortlich zeichnet, quasi vollständig auf Sox2-positive Vorläuferzellen zurückgehen muss, die bereits am Tag E14,5 der Embryonalentwicklung vorhanden sind.

Aus dem Gezeigten kann also geschlossen werden, dass keine wesentliche Zellpopulation jenseits von bereits an E14,5 vorhanden Sox2-positiven Vorläuferzellen zur zellulären Zusammensetzung des reifen Riechepithels beitragen kann. Demnach kann die verwendete *Sox2-creER^{T2}*-Maus als geeignetes Modell für alle Zelltypen miteinbeziehende, globale Genfunktionsanalysen im murinen Riechepithel betrachtet werden, während der Tag E14,5 der Embryonalentwicklung als geeigneter Zeitpunkt betrachtet werden darf, um durch Modellinduktion an diesem Zeitpunkt einen maximal ausgeprägten Phänotyp an postnatalen Stadien der Mausentwicklung hervorzurufen. Da das spät-embryonal etablierte Muster der Sox2-Expression im Riechepithel in postnatalen Entwicklungsstadien erhalten bleibt [102], war davon auszugehen, dass auch die postnatale Induktion des Modellsystems im Riechepithel

Rekombinationsereignisse in den entsprechenden Sox2-positiven Zellen auslösen würde, obwohl dies hier formal nicht gezeigt wurde.

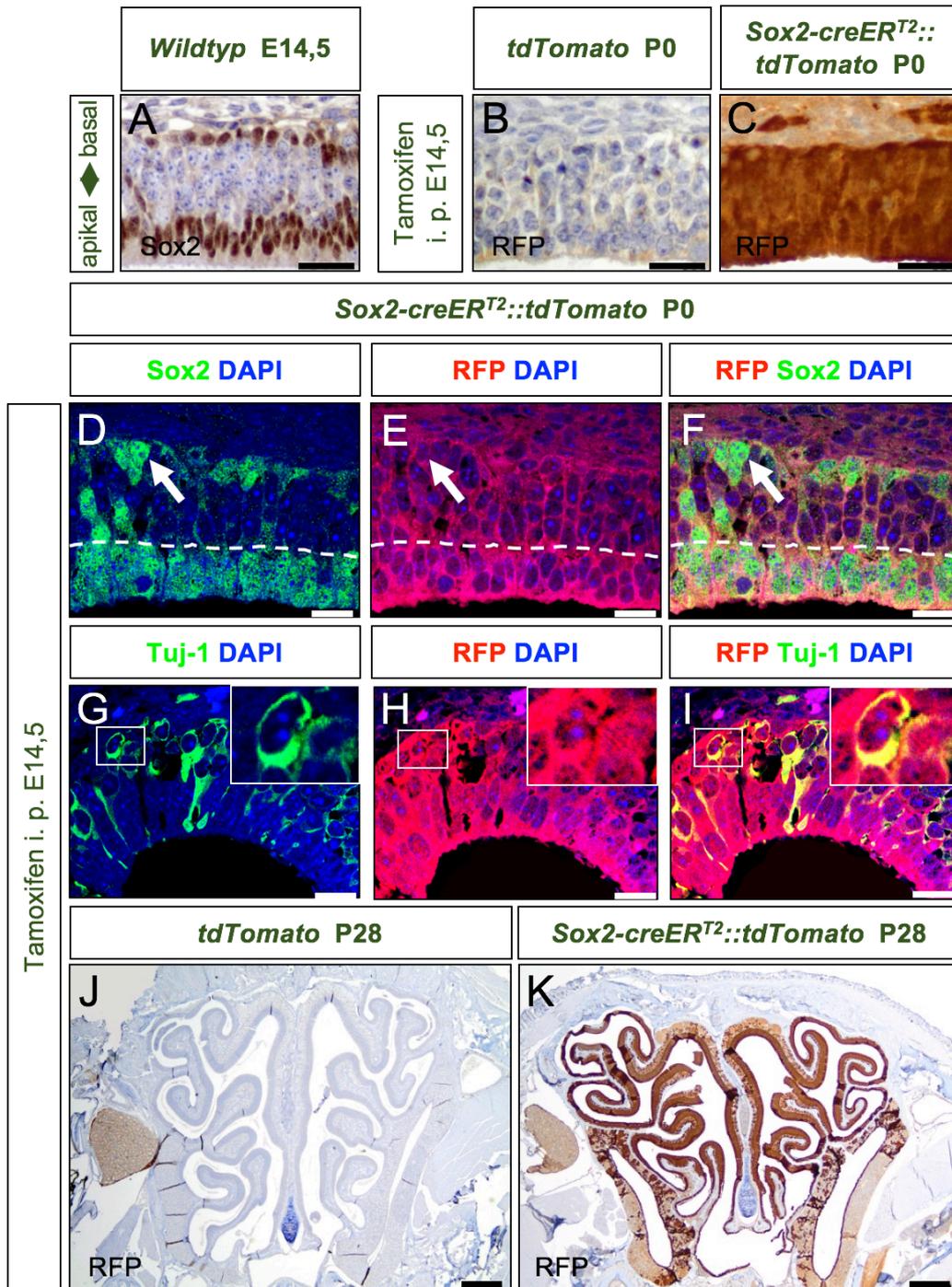


Abbildung 5: Die Sox2-CreER^{T2} Mauslinie eignet sich für Genfunktionsanalysen im Riechepithel. Am Tag 14,5 der Embryonalentwicklung (E14,5) ist Sox2 bereits in in basalen und apikalen Vorläuferzellen des Riechepithels exprimiert (A). Die Modellinduktion mittels einmaliger Tamoxifen Applikation an E14,5 in einer Sox2-creER^{T2}::tdTomato Reporterlinie demonstriert, dass quasi die gesamte riechepitheliale Zellpopulation am Tag der Geburt (P0) aus Sox2-positiven Vorläuferzellen an E14,5 hervorgeht (D; spezifischer RFP Nachweis verglichen mit Kontrolle in C).

Diese Zellpopulation umfasst Sox2-positive Stammzellen am basalen Pol des Riechepithels (Pfeile, D-F), nicht-neuronale apikale Sox2-positive sustentakuläre Zellen (durch gestrichelte Linie abgegrenzte Zellschicht, D-F) sowie Tuj-1-exprimierende neuronale Zellen des Riechepithels (exemplarische Zelle in Ausschnitt hervorgehoben, G-I). Auch am Postnataltag P28 lassen sich keine wesentlichen riechepithelialen Zellpopulationen nachweisen, die nicht aus Sox2-positiven embryonalen Vorläuferzellen hervorgegangen wären (K; spezifischer RFP Nachweis verglichen mit Kontrolle in J). Skalierungsbalken entsprechen 500 µm in J-K, 25 µm in A-C und 10 µm in D-I. Die Abbildung entspricht in Teilen einer eigenen Originalabbildung in [3]; Adaptation und Verwendung unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“-Lizenz.

3.2. Die konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs an E14,5 führt zur Entstehung von Tumor-artigen Läsionen innerhalb des Riechepithels der Maus

Um eine konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs im Riechepithel zur modellieren, wie sie in einer Vielzahl von humanen Neoplasien gefunden wird, erfolgte die Verpaarung von *Sox2-creER^{T2}*-Mäusen mit *Ctnnb1(ex3)^{F1/F1}*-Mäusen und die konsekutive intraperitonealer Injektion der schwangeren Mäuse am Tag E14,5 der Embryonalentwicklung zwecks Modellinduktion (vgl. Abbildung 4). Der Nachwuchs dieser Verpaarungen exprimiert eine Exon3-deletierte Version des Beta-Catenin-Proteins, wodurch dessen phosphorylierungsabhängige Degradation ausgehebelt wird [55]. Solchermaßen wurde eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Sox2-exprimierenden Zellen an E14,5 sowie deren Tochterzellen an späteren Entwicklungsstufen im gesamten Körper der Maus erzielt. Diese *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{F1/+}*-Mäuse bildeten ausgeprägte Gedeihstörungen bis zum Postnataltag P21 aus, zeigten im Vergleich zu altersgleichen Kontrolltieren desselben Wurfes ohne Cre-Allel signifikante Defizite in der Körpergröße sowie im Körpergewicht (Abbildung 6A-D) und fielen in der Beobachtung gegenüber den Kontrolltieren durch Schwäche und Ataxie auf. Schlussendlich wiesen alle an E14,5 induzierten

„effektiven“ Mutanten 3-4 Wochen nach der Geburt schwere Symptome im o.g. Sinne auf und mussten aus ethischen Gründen getötet werden (Abbildung 6E).

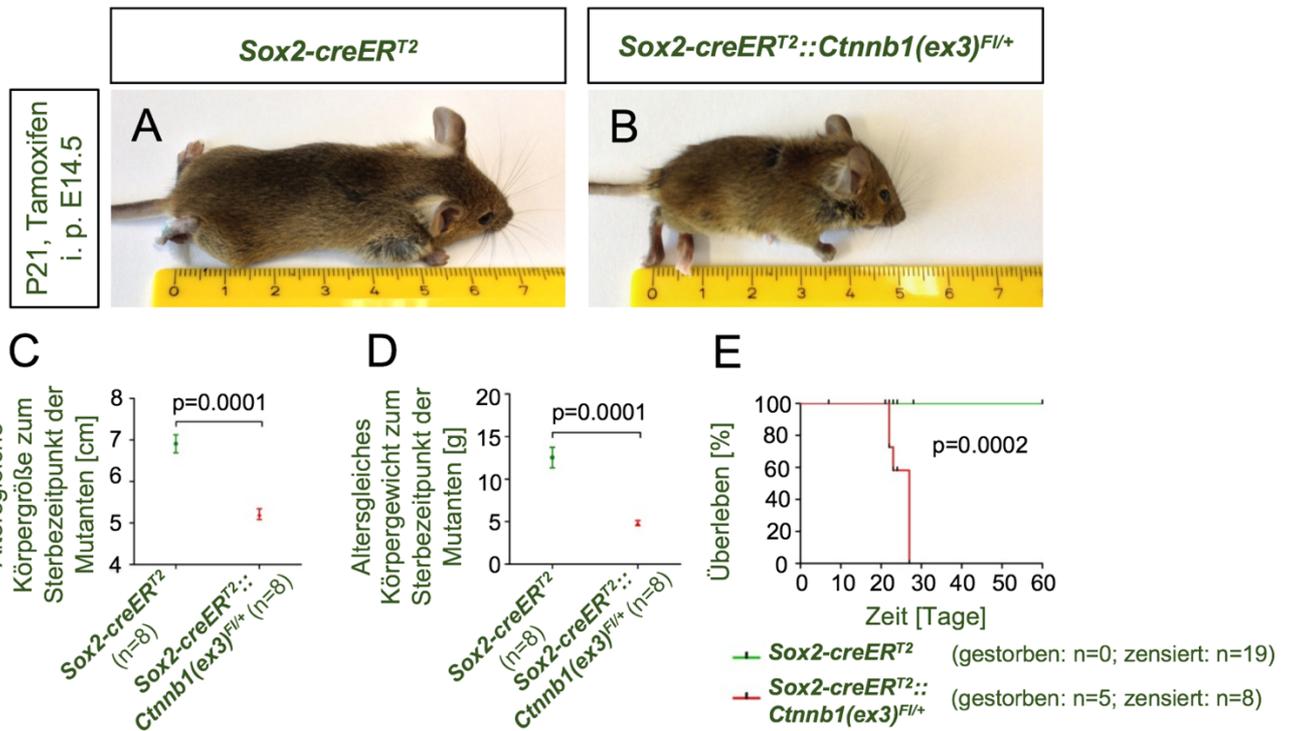


Abbildung 6: Embryonal induzierte *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{F/+} Mäuse entwickeln Gedeihstörungen und zeigen im Vergleich zu Kontrolltieren ein vorzeitiges Ableben.* An E14,5 Tamoxifen-induzierte *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{F/+} Mäuse entwickeln Gedeihstörungen im Vergleich zu altersgleichen Kontrolltieren (B vs. A), zeigen signifikante Defizite in Körpergewicht (C) und Körpergröße (D) und mussten bei schwerer Symptomatik ausnahmslos zwischen P21-28 getötet werden (E). Die Abbildung entspricht im Wesentlichen einer Originalabbildung aus einer eigenen Veröffentlichung [3]; Verwendung unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“-Lizenz.*

Eine orientierende histopathologische Untersuchung der Hauptorgansysteme dieser Mäuse einschließlich Gehirn, Herz, Lunge, Niere und Gastrointestinaltrakt offenbarte den Befund ungewöhnlich kleiner Mägen mit hyperplastischen, das Magenlumen einengender Läsionen in Bereichen des Vormagens sowie auch der Drüsenanteile des Organs (Abbildung 7). Diese Läsionen könnten mutmaßlich gut eine Malnutrition und

Malabsorption bedingen, was eine plausible Erklärung für den Phänotyp und das resultierend absehbar verfrühte Ableben der Mäuse liefern würde.

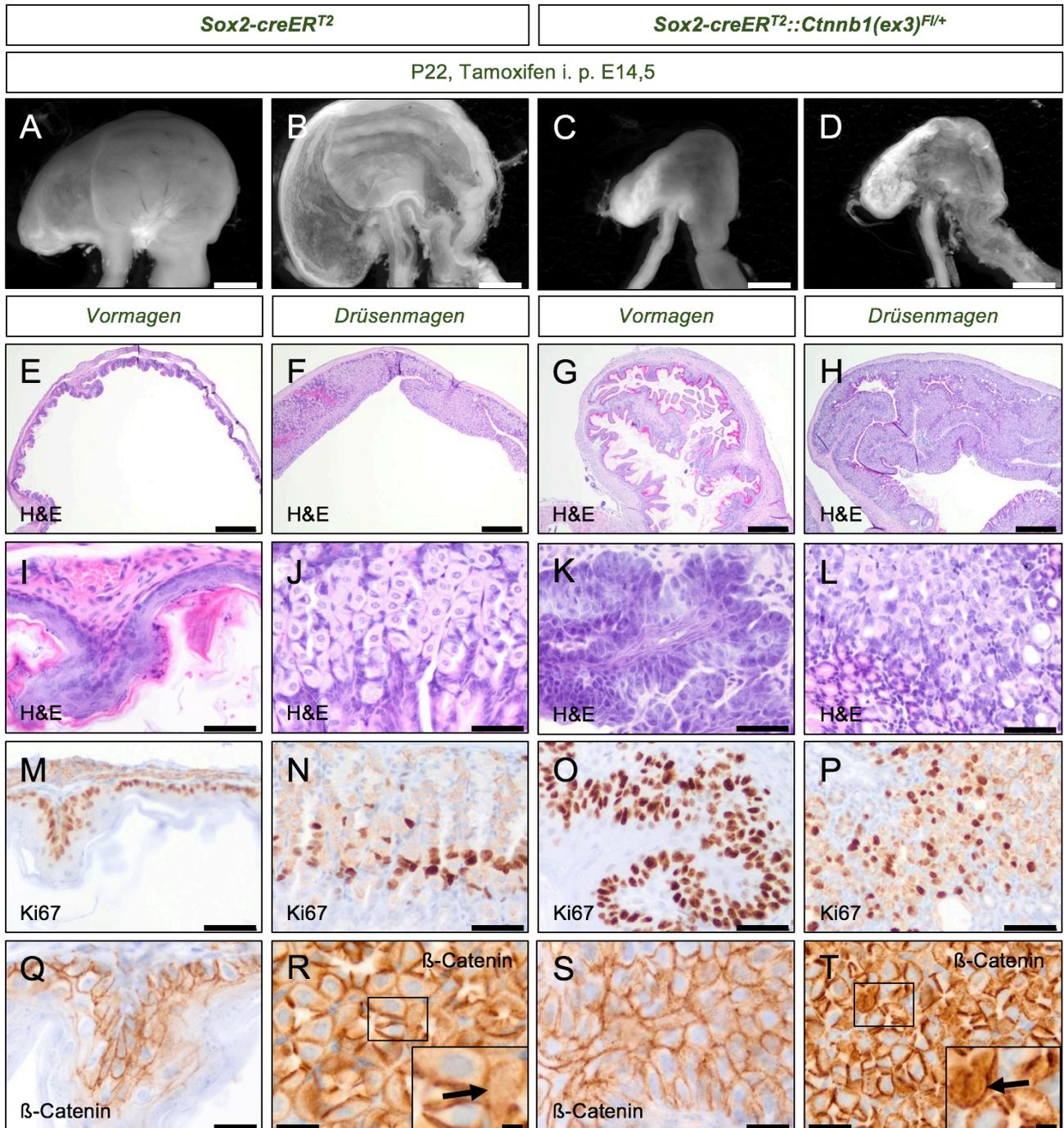


Abbildung 7: Die embryonal induzierten effektiven Mutanten weisen zum Todeszeitpunkt verkleinerte Mägen mit hyperplastischen Läsionen in glandulären in und nicht-glandulären Anteilen des Organs auf. An E14.5 Tamoxifen-induzierte *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+}* Mäuse weisen zum Todeszeitpunkt im Vergleich zu Kontrolltieren verkleinerte Mägen auf (ganzes Organ in C vs. A; aufgeschnittenes Organ in D vs. B).

Die Mägen der Mutanten zeigen Lumen-einengende hyperplastische Läsionen im Vormagen (G vs. E) und in glandulären Anteilen des Magens (H vs. F). Die epithelialen Zellen des Vormagens zeigen ein endophytisches Wachstumsmuster (K vs. I) mit gesteigerter Proliferation in der Ki67-Färbung (O vs. M) im Vergleich zum nativen Vormagen-Epithel. Die glandulären Läsionen zeigen eine alterierte Gewebsarchitektur und Zellmorphologie verglichen mit den nativen glandulären Magenabschnitten (L vs. J) und die β -Catenin-Färbeintensität in diesen Läsionen scheint erhöht (T vs. R; Zelle mit nukleärer β -Catenin-Expression in Ausschnittsvergrößerung hervorgehoben). Die Ki67-Expression in den glandulären Läsionen verglichen mit den nativen Magendrüsen (P vs. N) sowie die β -Catenin-Expression in den Vormagen-Läsionen verglichen mit dem nativen Vormagen-Epithel erscheinen vergleichbar. Skalierungsbalken entsprechen 2 mm in A-D, 500 μ m in E-H, 50 μ m in I-P, 20 μ m in Q-T und 10 μ m in den Ausschnittsvergrößerungen. Die Abbildung entspricht im Wesentlichen einer Originalabbildung aus einer eigenen Veröffentlichung [3]; Verwendung unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“-Lizenz.

Die Zytoarchitektur des Riechepithels dieser Mäuse zeigte sich völlig zerstört und durch Tumor-artiges Gewebe ersetzt, wobei diese Veränderungen verstärkt die oberen Anteile der Nasenhöhle zu betreffen schienen (Abbildung 8H-I; Kontrolle in Abbildung 8A-B). Diese murinen riechepithelialen Läsionen zeigten ein malignes Wachstumsmuster mit Zeichen der Infiltration und Durchbrechung von Knochen-Laminae (Abbildung 8J) sowie Rosettenbildung als Differenzierungsmerkmal (Abbildung 8K) im Unterschied zum nativen Mausriechepithel (Abbildung 8C). Die Menge an Ki-67-positiven Zellen dieser riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen schien jedoch im visuellen Vergleich zum nativen Riechepithel nicht wesentlich verändert zu sein (Abbildung 8L vs. 8D). Immunohistochemische Färbungen erlaubten die Detektion von Sox2, Mash1, einem frühen Marker der neuronalen Linien-Festlegung im Riechepithel (vgl. oben) sowie den Nachweis einer nukleären Akkumulation von Beta-Catenin, ein Korrelat einer Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs, im nativen Mausriechepithel der Altersstufe P21 (Abbildung 8E-G). Diese

Marker waren in den murinen Tumor-artigen Läsionen gleichfalls nachweisbar, schienen jedoch hier in ihrer Expression Nester angefärbter Zellen von einem umgebenden, nicht-angefärbten Stroma-Zell-Kompartiment zu trennen (Abbildung 8M-O).

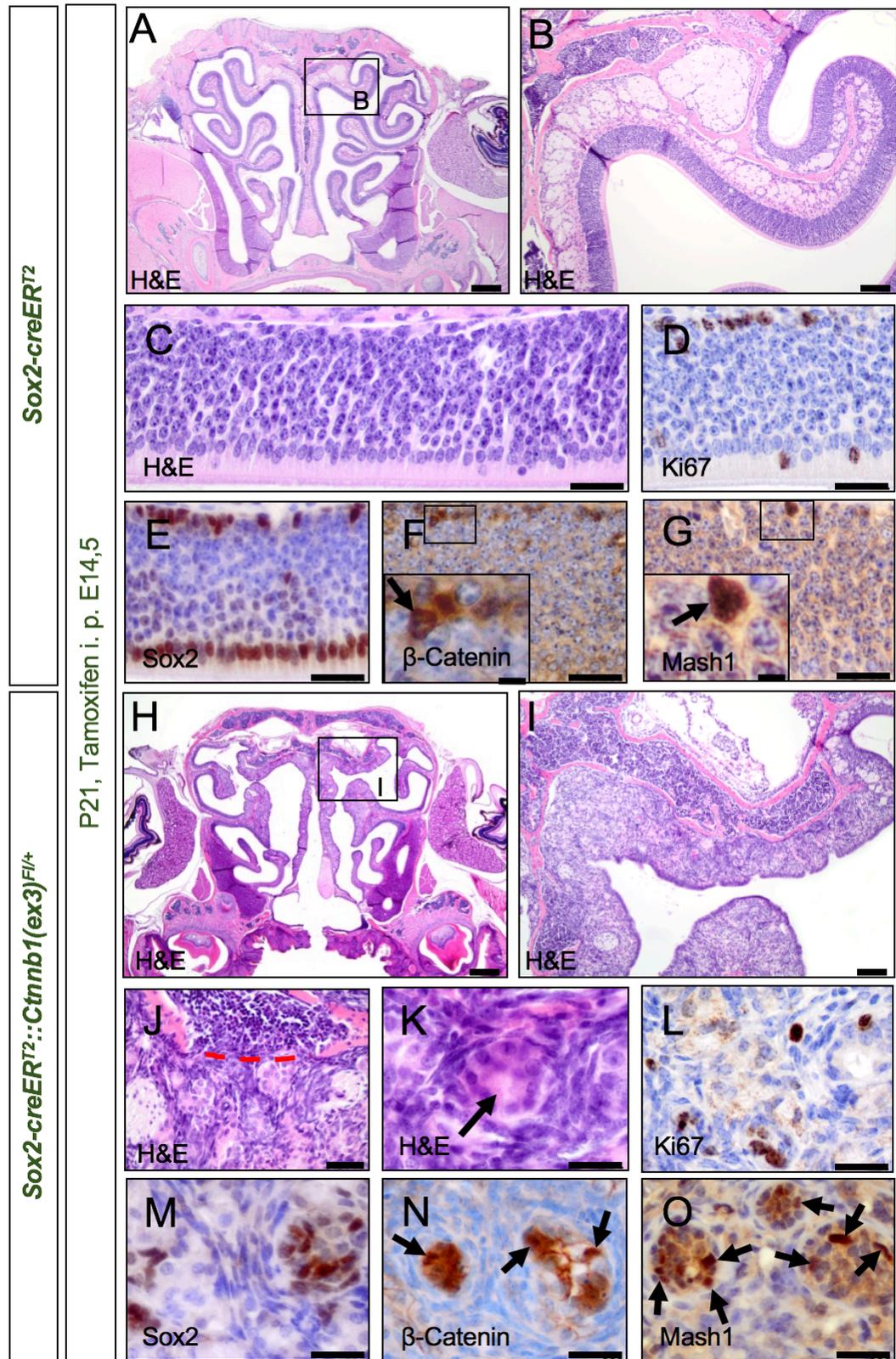


Abbildung 8: Die embryonale konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+} Mäusen führt zur Entstehung von Tumor-artigen Läsionen des Riechepithels.

Die Applikation von Tamoxifen in $Sox2\text{-creER}^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+}$ Mäusen an E14.5 bedingt die aberrante Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Sox2-positiven Zellen des murinen Riechepithels und führt zur Entstehung Tumor-artiger innerhalb dieser Struktur. In der H&E-Färbung der exemplarischen Altersstufe P21 ist die native Struktur des Riechepithels vollständig zerstört. Die Veränderungen betreffen betont das Dach der Nasenhöhle (A, Kontroll-Riechepithel; B, Vergrößerung des Ausschnitts in A; H, Tumor-artige Läsionen der induzierten Mutanten; I, Vergrößerung des Ausschnitts in H). Die riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen zeigen ein invasives Wachstumsmuster mit Unterbrechung der Knochengrenze (C, die überschrittene Knochengrenze ist virtuell durch die rot-gestrichelte Linie angedeutet). Rosettenformationen stellen sich dar (C, Kontroll-Riechepithel; K, durch Pfeil markierte Rosettenstruktur in induzierten Mutanten). Die Anzahl an Ki67-positiven Zellen in den riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen ist vergleichbar mit dem nativen Riechepithel (D, Kontroll-Riechepithel; L, Tumor-artige Läsion der induzierten Mutanten). Färbungen auf Sox2, β -Catenin und Mash1 grenzen Zellnester von einem nicht angefärbten Stromazellkompartiment ab (E, F, G, Kontrolltiere; M, N, O, Färbungen in induzierten Mutanten). Skalierungsbalken entsprechen 500 μm in A und H, 100 μm in B und I, 25 μm in C-G und J-O und 5 μm in den Ausschnittsvergrößerungen. Die Abbildung entspricht im Wesentlichen einer Originalabbildung aus einer eigenen Veröffentlichung [3]; Verwendung unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“-Lizenz.

Zusammenfassend führte die embryonale Induktion einer aberranten Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Riechepithel der Maus zur Entstehung Tumor-artiger Läsionen mit angedeuteter Nest-Stroma-Zytoarchitektur.

3.3 Eine postnatal induzierte, aberrante Aktivierung des Wnt-Signalwegs im Riechepithel der Maus bedingt eine altersabhängige Entstehung riechepithelialer Polypen

In einem nächsten Schritt sollte geprüft werden, inwieweit solche riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen der Maus reproduziert werden können, wenn die aberrante Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs im Riechepithel der Maus erst in

postnatalen Entwicklungsstadien induziert wird. Zu diesem Zwecke erfolgte die einmalige intraperitoneale Injektion von *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+}*-Mäusen sowie *Sox2-creER^{T2}*-Kontrollmäusen mit Tamoxifen am 7., 14. oder 21. Lebenstag nach der Geburt (P7, P14 oder P21). Analog zu den embryonal induzierten Mutanten entwickelten auch die postnatal induzierten „effektiven“ Mutanten ausgeprägte Gedeihstörungen im kurzen Abstand zum Injektionszeitpunkt und zeigten schwere, die Tötung der Tiere rechtfertigende Symptome innerhalb von 2 Wochen nach der Induktion (Abbildung 9).

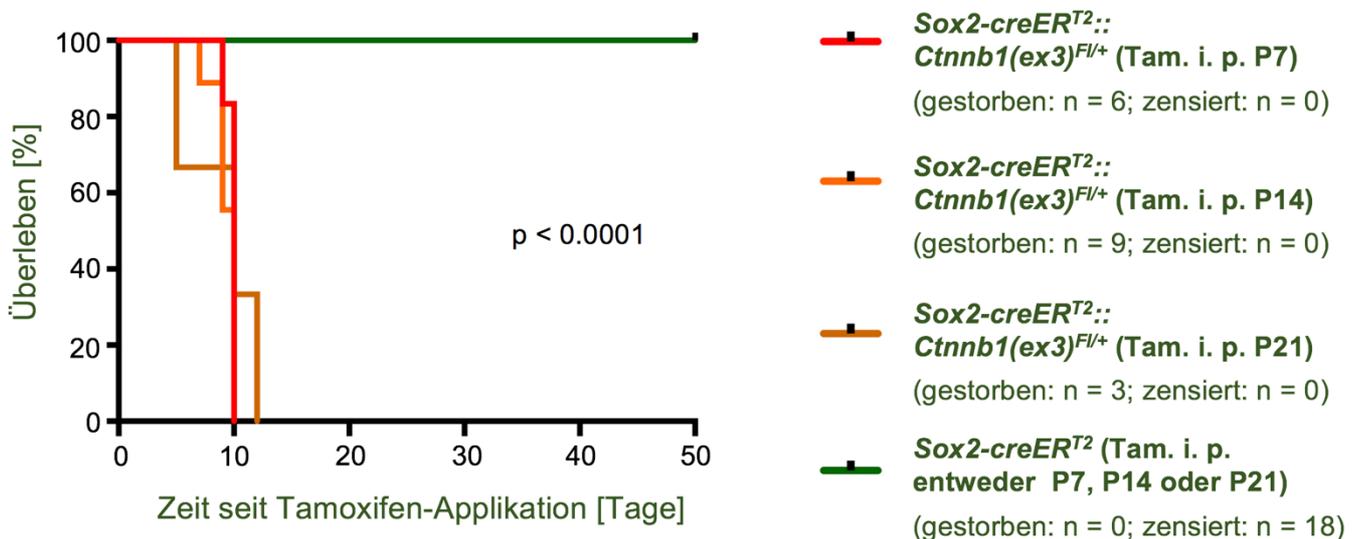


Abbildung 9: Überleben ab Tamoxifen-Applikation der postnatal an P7, P14 oder P21 behandelten *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+}* Mäuse im Vergleich zu einer gepoolten Kontrollgruppe aus entsprechend behandelten Kontrolltieren.

Verglichen mit den embryonal induzierten Mutanten schien die riechepitheliale Zytoarchitektur der postnatal induzierten Mutanten im Wesentlichen intakt zu sein. Das Riechepithel der am Postnataltag P7 und P14 induzierten Mutanten wies jedoch epitheliale Polypen auf, die stellenweise aus dem normalen Epithelverband in die Nasenhöhle hineinreichten (Riechepithelialer Polyp in einer repräsentativen an P7

induzierten Mutante in Abbildung 10C-D verglichen mit einer nativen Kontrolle in Abbildung 10A-B; Riechepitheliale Polypen in einer repräsentativen an P14 induzierten Mutante in Abbildung 10G-H verglichen mit einer nativen Kontrolle in Abbildung 10E-F). Immunohistochemische Färbungen dieser Polypen auf Reaktivität für die Marker Ki-67, Sox2, Beta-Catenin und Mash1 zeigten vergleichbare Verteilungsmuster der Expression zum nativen Riechepithel der Kontrollmäuse, so dass weder auf eine bedeutend gestörte zelluläre Differenzierung noch auf eine visuell deutlich gesteigerte Proliferation in diesen Polypen gegenüber dem nativen Riechepithel geschlossen werden konnte (Abbildung 10I-P). Die basal-apikale Polarität des nativen Riechepithels schien zudem auch in diesen riechepithelialen Polypen erhalten geblieben zu sein. Das zuvor bei embryonaler Induktion des Modells beobachtete invasive Wachstum der Tumor-artigen Läsionen des Riechepithels war hier nicht auszumachen.

Im Falle einer Modellinduktion am Postnataltag P21 zeigte sich das Riechepithel der Mutanten auf histomorphologischer und immunohistochemischer Ebene ununterscheidbar von demjenigen der Kontrolltiere (Abbildung 10Q-T) und riechepitheliale Polypen ließen sich nicht mehr abgrenzen.

Zusammengenommen tat sich das Bild eines altersabhängigen tumorigenen Potentials eines aberrant aktivierten Wnt-Signals im Riechepithel der Maus auf, welches postnatal noch bis zu einem gewissen Alter das Wachstum von nicht-invasiven riechepithelialen Polypen verursacht, wohingegen eine bereits embryonale pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs in einen Tumor-artigen Läsionstyp mit Anhalt auf invasives Wachstum als Kennzeichen der Malignität mündet.

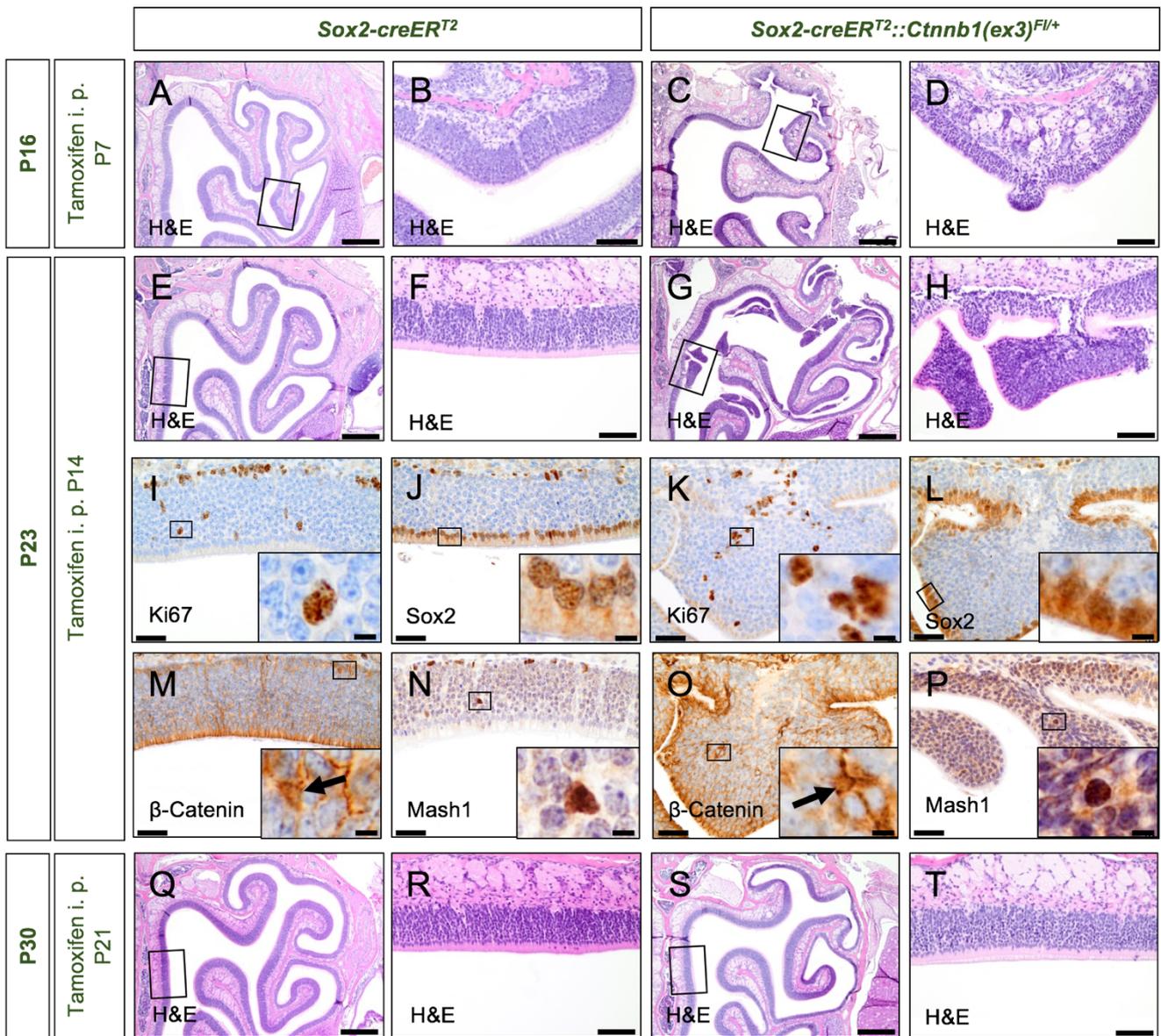


Abbildung 10: Ein postnatal aktiviertes Wnt-Signal in *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+}* Mäusen führt zur Entstehung von riechepithelialen Polypen. Eine Tamoxifen-Applikation in *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+}* Mäusen an den postnatalen Tagen 7 (P7) oder 14 (P14) führt zur Entstehung riechepithelialer Polypen (A, E, Kontroll-Riechepithel; B, F, Ausschnittsvergrößerungen aus A, E demonstrieren regelrechtes Riechepithel; C, riechepithelialer Polyp in an P7 induzierten Mutanten; D, Ausschnittsvergrößerung aus C; G, multiple riechepitheliale Polypen in an P14 induzierten Mutanten in verschiedenen Anschnittsebenen getroffen; H, Ausschnittsvergrößerung aus G).. Am Postnaltag 21 (P21) Tamoxifen-induzierte Mutanten weisen diese riechepithelialen Veränderungen nicht mehr auf (I, Kontroll-Riechepithel; J, Ausschnittsvergrößerung aus I; K, regelrechtes Riechepithel in an P21 induzierten Mutanten; L, Ausschnittsvergrößerung aus K).

Die IHC-Färbemuster für Ki67, Sox2, β -Catenin und Mash1 von exemplarischen Polypen in an P14 induzierten Mutanten sind vergleichbar mit denjenigen des nativen Kontroll-Riechepithels, was auf eine überwiegend normale Zelldifferenzierung und eine erhaltene epitheliale Polarität in den Polypen hindeutet (M, N, Q, R, IHC-Färbungen des Kontroll-Riechepithels; O, P, S, T, entsprechende IHC-Färbungen eines entsprechenden riechepithelialen Polypen; Ausschnittsvergrößerungen in M-P bzw. Abbildungen R und T heben exemplarisch angefärbte Zellen fuer den jeweiligen Marker hervor). Skalierungsbalken entsprechen 500 μm in A, C, E, G, I und K, 100 μm in B, D, F, H, J und L, 50 μm in M-T und 10 μm in den Ausschnittsvergrößerungen. Die Abbildung entspricht im Wesentlichen einer Originalabbildung aus einer eigenen Veröffentlichung [3]; Verwendung unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“-Lizenz.

3.4 Die riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen der Maus ähneln histomorphologisch und immunohistochemisch humanen Olfaktoriusneuroblastomen

Die embryonale Induktion einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Sox2-positiven Zellen des murinen Riechepithels führte zur Entstehung Tumor-artigen Läsionen mit Zeichen des infiltrativen Wachstums. In einem nächsten Schritt stellte sich die Frage, inwieweit diese Maus-Läsionen einer humanen, wahrscheinlich ebenfalls vom Riechepithel ausgehenden Tumorentität, dem humanen Olfaktoriusneuroblastom (hONB), ähneln würden. Zur vergleichenden Analyse stand FFPE-Material in hinreichender Qualität und Menge von 27 humanen ONBs zur Verfügung. Anhand von H&E-Färbungen dieser Fälle erfolgte ein histomorphologischer Vergleich zu dem zuvor eingeführten, embryonal induzierten Mausmodell. Vergleichbar mit dem Mausmodell werden hONB in der Literatur als typischerweise niedriggradige maligne Tumoren mit niedriger Proliferationsrate beschrieben [103], welche regulär eine Zytoarchitektur mit in Nestern angeordneten Tumorzellen präsentieren, die von einem Stroma-Zell-Kompartiment umgeben werden. hONBs sind invasiv wachsend und bilden als nahezu pathognomonisches

Differenzierungsmerkmal Homer-Wright-Pseudorosetten aus, die in 30 bis 50 Prozent aller Fälle nachweisbar sein sollen [104]. Ein Nest-Stroma-Wachstumsmuster, Zeichen der Infiltration sowie Rosettenformation ließen sich auch am hiesigen hONB-Studienkollektiv verifizieren (vgl. H&E-Färbung eines typischen hONB-Falls in Abbildung 11A-C) und ähnelten zusammengenommen stark der zuvor beschriebenen Histomorphologie der Tumor-artigen Läsionen des Maus-Riechepithels (vgl. Abbildung 8 I-K).

In der humanpathologischen Routinediagnostik werden eine Reihe von immunohistochemischen Markern eingesetzt, um die Diagnose eines hONB zu erhärten und eine Abgrenzung gegenüber anderen Differentialdiagnosen zu ermöglichen. So sollten hONBs eine Reaktivität für die neuroendokrinen Marker CD56 und Chromogranin A aufweisen [103], was sich gleichermaßen am hiesigen hONB-Kollektiv und in den murinen riechepithelialen Läsionen nachweisen ließ (Abbildung 11F, I verglichen mit 11E, H) - nicht jedoch im nativen Mausriechepithel (Abbildung 11D, G). Die Expression von S100 ist bedeutsam, um hONB vom neuroendokrinen Karzinom abgrenzen zu können [78, 103] und war sowohl in hONBs als auch in den Mausläsionen nachweisbar - nicht jedoch im nativen Mausriechepithel (Abbildung 11K, L vs. 11J).

Auf der anderen Seite war die nukleäre Akkumulation von Beta-Catenin als immunhistochemisches Korrelat einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs, welches den zugrundeliegenden Mechanismus des hier beschriebenen Mausmodells darstellt, in keinem der 27 (0/27) dieser Studie zur Verfügung stehenden hONBs detektierbar (Repräsentatives Färberesultat in Abbildung 11R). Gemäß der physiologischen Bedeutung des Wnt-Signals im Riechepithel und seiner pathomechanistischen Rolle in dem hier beschriebenen Mausmodell findet sich eine nukleäre Akkumulation von Beta-Catenin jedoch sowohl im nativen Mausriechepithel (Abbildung 11P) als auch in

den murinen riechepithelialen Läsionen (Abbildung 11Q). Da es solchermaßen keinen immunohistochemischen Anhalt dafür gab, dass die konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs die pathogene Basis der Entstehung von hONBs darstellt, konnten die hier beschriebenen riechepithelialen Läsionen der Maus kein valides Modellsystem für das hONB repräsentieren.

Sinonasale Hämangioperizytome (sHPCs) eint hingegen das Vorliegen rekurrenter Beta-Catenin-Mutationen mit den hier beschriebenen Mausläsionen [91, 92]. Der histologische Phänotyp dieser Tumoren scheint jedoch stark von demjenigen der zuvor beschriebenen Tumor-artigen riechepithelialen Läsionen der Maus abzuweichen. Ein veritables sHPC-Modell sollte eine gefäßendotheliale Differenzierung in Anbetracht des vermutlich von Perizyten ausgehenden Tumors aufweisen. Dem widersprach das neuroendokrine Differenzierungsprofil der hier beschriebenen Modellläsionen (vgl. Abbildung 8O und Abbildung 11E, H). Zudem wurde eine starke und diffuse zytoplasmatische Reaktivität für glattmuskuläres Aktin (smooth-muscle-actin, SMA) als ein konsistentes Merkmal von humanen sHPCs charakterisiert [76, 89], welche nicht als Merkmal der hier beschriebenen Mausläsionen gelten konnte (Abbildung 10N; lediglich Reaktivität vaskulärer Strukturen ähnlich derjenigen von hONBs in Abbildung 11O – nicht der Tumorzellen selbst; Abbildung 11 M; das native Mausriechepithel ist negativ). Letztlich konnte keine bekannte Tumorentität der Humanpathologie den Wnt-abhängigen riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen des hier beschriebenen Mausmodells als überzeugende Entsprechung zugeordnet werden.

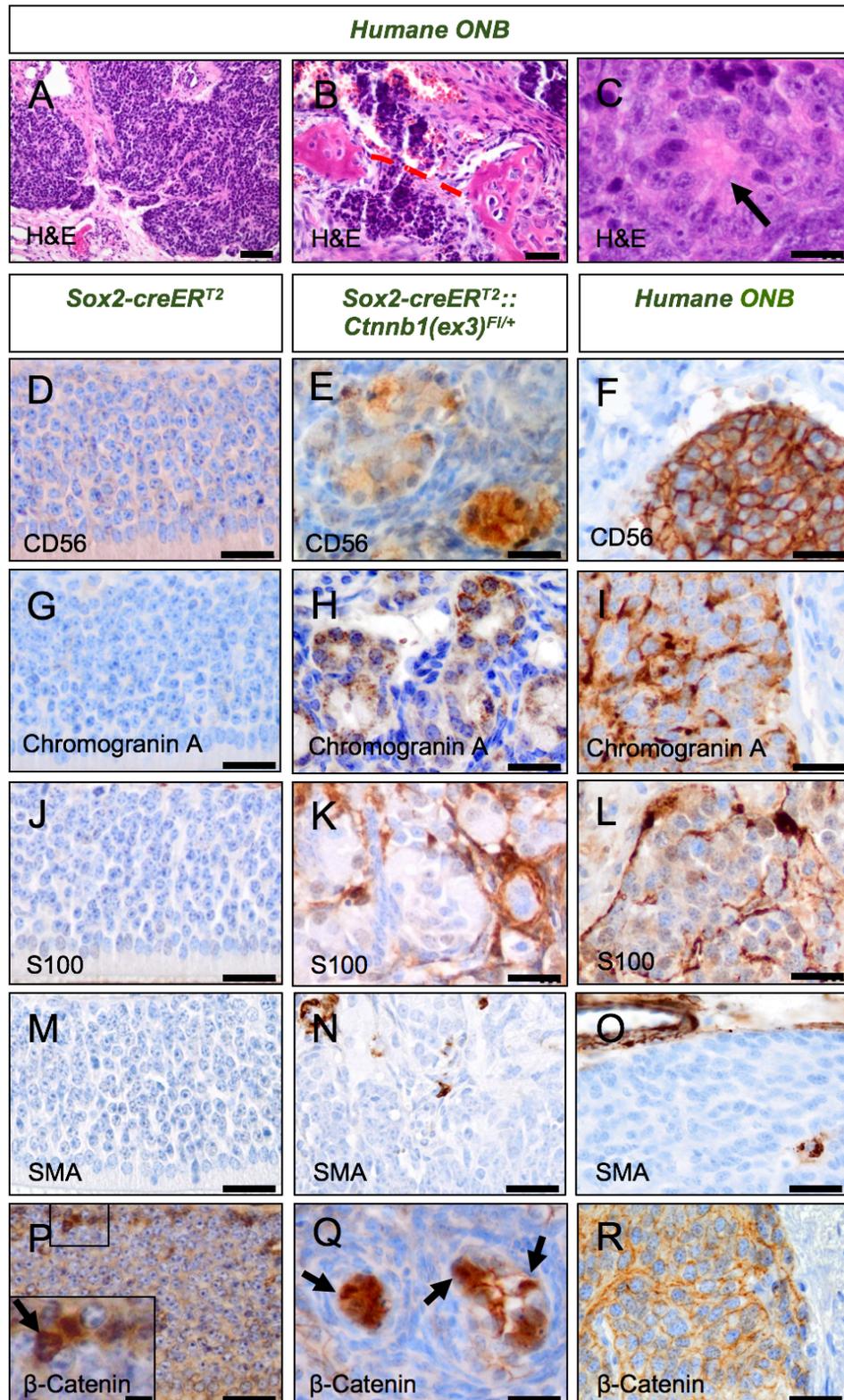


Abbildung 11: Immunohistochemische Färbungen der riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen suggerieren Ähnlichkeiten zu humanen Olfaktoriusneuroblastomen (hONB) aber unterscheiden diese von sinonasalen Hämangioperizytopmen (sHPC). Vergleichbar mit den murinen riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen zeigen Tumorzellen humaner ONB regulär ein Wachstum in Zellnestern (A), Anzeichen auf ein invasives Wachstum mit Unterbrechung von Knochenlaminae (B, die überschrittene Knochengrenze ist virtuell durch die rot-gestrichelte Linie angedeutet)

sowie Homer-Wright-Pseudorosetten (C, Pfeil markiert Pseudorosette). CD56, Chromogranin A und S100 sind kritische immunohistochemische Marker für die Diagnosestellung eines ONB (F, I, L) und können in gleicher Weise in den murinen Tumor-artigen Läsionen demonstriert werden (E, H, K), finden sich jedoch nicht im nativen Kontroll-Riechepithel (D, G, J). Eine regelhaft diffuse Reaktivität auf SMA ist für sinonasale Hämangioperizytome typisch, aber ist nicht in hONB (O), den murinen Tumor-artigen Läsionen (N) oder dem nativen Maus-Riechepithel (M) detektierbar. Eine nukleäre Akkumulation von Beta-Catenin kann im nativen Maus-Riechepithel und in den murinen Tumor-artigen Läsionen, aber nicht in den hONB nachgewiesen werden (P, Q, R). Ausschnittsvergrößerungen und Pfeile heben jeweilig positiv-gefärbte Zellen für den jeweiligen Marker hervor. Skalierungsbalken entsprechen 100 µm in A, 50 µm in B und 25 µm in C-R. Die Abbildung entspricht in Teilen einer eigenen Originalabbildung in [3]; Adaptation und Verwendung unter der „Creative Commons Attribution 4.0 International“-Lizenz.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Mausmodell, in welchem aus der konstitutiven Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Sox2-positiven Vorläuferzellen an Embryonaltag E14,5 die Entstehung von Tumor-artigen riechepithelialen Läsionen mit invasiven Wachstum als Zeichen maligner Transformation resultiert. Darüber hinaus führt die Induktion des Modells an früh-postnatalen Entwicklungsstadien der Maus zur Entstehung von riechepithelialen Polypen ohne dezidierte Zeichen des malignen Wachstums.

In der Zusammenschau leiten diese Ergebnisse zu der Annahme eines altersabhängigen tumorigenen Potentials eines pathologisch aktivierten Wnt-Signalwegs im murinen Riechepithel, welches mit zunehmendem Alter abzunehmen scheint und sich in etwa mit Beendigung der 3. Lebenswoche der Maus gänzlich erschöpft. Diese Resultate sind nicht unerwartet, wenn man sich den Zeitverlauf der physiologischen Entwicklung des Riechepithels vor Augen führt: Massive riechepitheliale Zellproliferation ist ein Kennzeichen der embryonalen und früh-

postnatalen Entwicklung des olfaktorischen Epithels [105], so dass man in diesen Stadien ein generell permissives Mikromilieu für Proliferation erwarten darf. Ab etwa Tag 30 der Mausentwicklung verlangsamt sich dieser Modus der zellulären Expansion in einen Modus der Erhaltung und Regeneration [105] mit nur noch niedrigem Zellumsatz, was einem zur der Annahme eines prohibitiven Mikromilieus im Hinblick auf Proliferationsprozesse führt.

Interessanterweise zeigen auch die embryonal an E14,5 induzierten riechepithelialen Tumor-artigen Läsionen der Maus keine wesentlich gesteigerte Proliferation verglichen mit dem altersgleichen nativen Riechepithel. Dieser Sachverhalt spricht nicht notwendigerweise gegen den malignen Charakter dieser Läsionen, da beispielsweise auch humane Olfaktoriusneuroblastome für ihre charakteristisch niedrige Proliferationsrate bekannt sind [104]. Rein mechanistisch wären zwei theoretische Erklärungsansätze denkbar, um die punktuell beobachtet niedrige Proliferationsrate zu erklären. Zum einem ist eine wohl regulierte Balance zwischen Proliferation und Apoptose – dem regulierten Zelltod – von entscheidender Bedeutung für die embryonale und auch postnatale Entwicklung des Riechepithels [106, 107] – ein Gleichgewicht, welches auch in anderen Strukturen des Nervensystems beobachtet werden kann. Der aktivierte kanonische Wnt-Signalweg besitzt seinerseits die Fähigkeit, Apoptose zu blockieren, wie in mesenchymalen Zellen demonstriert werden konnte [108, 109]. Es ist daher plausibel, dass sein aberrantes Wnt-Signal im murinen Riechepithel den physiologischen Zellumsatz nicht primär durch eine Steigerung der Proliferation, sondern über eine Blockade der Apoptose stört, was in gleicher Weise zur Ausbildung hyperplastischer Läsionen beitragen könnte. Für neuronale Vorläuferzellen der Prosencephalons wurde allerdings gezeigt, dass eine Stabilisierung des Beta-Catenin-Proteins im Gegenteil in eine gesteigerte Apoptose mündet [70], während jedoch gleichsam die Proliferationsrate transient innerhalb der

Embryonalentwicklung als Resultat einer Differenzierungsblockade zu reiferen Zellen und einer prolongierten Aufrechterhaltung des Stadiums „neuronal Vorläuferzelle“ gesteigert wird [70, 71], was zusammengenommen in eine dramatische Expansion des Großhirncortex in entsprechend genetisch manipulierten Mäusen mündet. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Mechanismus auch Gültigkeit für neuronale Vorläuferzellen des murinen Riechepithels besitzt. Mithin wäre eine transiente Steigerung der Proliferationsrate in riechepithelialen neuronalen Vorläuferzellen infolge der Induktion eines aberranten Wnt-Signals in dem hier beschriebenen Mausmodell zu postulieren. Zum Zeitpunkt der Analyse von symptomatischen *Sox2-creER^{T2}::Ctnnb1(ex3)^{F/+}* Tieren auf riechepitheliale Alterationen im Alter von etwa 3 Wochen nach der Geburt wäre diese Phase der embryonal transient gesteigerten Proliferation bereits verpasst worden; es verbliebe lediglich das Resultat hyperplastischer Tumor-artiger Läsionen mit normaler Proliferationsrate. Sollte diese Hypothese zutreffen, wäre die bisherige Interpretation eines tumorigenen Potentials einer pathologischen Wnt-Aktivierung im murinen Riechepithel geschwächt und müsste stattdessen der alternativen Perspektive eines embryonalen Entwicklungsdefektes Raum bieten.

Auf der Suche nach Entsprechungen der hier gezeigten morphologischen Veränderungen des Mausmodells in der Humanpathologie erinnern die postnatal induzierten riechepithelialen Polypen zunächst an die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz in der Entstehung des Wnt-abhängigen kolorektalen Karzinoms [110, 111]. Entsprechungen einer solchen Pathogenese im Riechepithel sind jedoch bis dato nicht beschrieben. Sinonasale Polypen (Polyposis nasi) sind eine häufige Erkrankung des Menschen, aber werden pathogenetisch als gutartige Ausbildung hyperplastischer Läsionen in Assoziation mit chronischer Inflammation aufgefasst [112, 113]. Es handelt sich keineswegs um durch somatische Mutationen getriebene Vorläuferläsionen als

Zwischenstufe einer weiteren malignen Transformation. Ebenso haben sinonasale Polypen des Menschen vermutlich einen anderen zellulären Ursprung und gehen wahrscheinlich nicht vom Riechepithel aus [114]. Eine Hochregulation von Genen des Wnt-Signalwegs in der Polyposis nasi des Menschen wurde jedoch beschrieben [115]. Ein maligner Tumor des Menschen, dessen zellulärer Ursprung im Riechepithel angenommen wird [75], ist das Olfaktoriusneuroblastom (ONB). Tatsächlich weisen die embryonal induzierten, Tumor-artigen Läsionen des Mausmodells gewisse Ähnlichkeiten mit hONBs auf der Ebene der Histopathologie auf (Differenzierungsmerkmal Rosettenbildung, Reaktivität für S100, neuroendokrine Marker CD56 und Chromogranin A, s.o.). Nichtsdestominder besteht anhand einer Kohorte von n=27 hONBs immunohistochemisch kein Anhalt, dass der aberranten Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs eine Rolle in der Pathogenese dieser Tumorentität beizumessen ist, so dass das hier beschriebene Modell kein valides Modell für den Großteil aller hONBs darstellen kann. Zwei neuere Veröffentlichungen, welche nach Abschluss des experimentellen Teils der hier vorliegenden Studie publiziert wurden, demonstrieren allerdings anhand systematischer „Next-Generation-Sequencing“ (NGS)-basierter Analysen pathogene *CTNNB1*-Mutationen in Exon 3 und 8 in 2 von 41 (Gay *et al.* 2017 [116]) bzw. 1 von 18 (Lazo de la Vega *et al.* 2017 [117]) analysierten hONB-Tumoren, so dass eine pathogene Bedeutung eines alterierten Wnt-Signalwegs in humanen Olfaktoriusneuroblastomen nicht völlig verworfen werden kann. Grundsätzlich konnten die benannten Studien von Gay *et al.* [116] und Lazo de la Vega *et al.* [117] trotz ihres systematischen Ansatzes insgesamt keine überzeugend rekurrenten Mutationen in hONBs aufzeigen, so dass in der Annahme einer grundsätzlich homogenen ONB-Entität, wie es von der WHO-Klassifikation der Kopf- und Halstumoren [76] vorgeschlagen wird, mutmaßlich überwiegend „Passenger-Mutationen“ und weniger „Driver-Mutationen“ der originären ONB-Entstehung

identifiziert worden sind. Der Schlüssel der ONB-Pathogenese mag daher weniger auf genetischer Ebene als eher auf der Ebene rekurrenter chromosomaler Alterationen zu suchen sein. So berichteten *Lazo de la Vega et al.* [117] hoch rekurrente Hinzugewinne jeweilig einer Kopie der Chromosomen 5, 7, 11 und 20 sowie Verluste der Chromosomen 1, 3, 8 und 12 in bis zu 89% (16 von 18) der analysierten Fälle von hONBs. *FGFR3*-Amplifikationen fanden sich in immerhin 28% (5 von 18) der analysierten Tumoren [117].

Relativierend zur Feststellung einer fehlenden Bedeutung eines alterierten Wnt-Signalwegs in der Entstehung von hONBs gilt es festzustellen, dass im Rahmen der Untersuchungen dieser Studie lediglich auf adulte Fälle von humanen Olfaktoriusneuroblastomen zurückgegriffen werden konnte. Da jedoch ebenso pädiatrische Olfaktoriusneuroblastome beschrieben worden sind [77], kann nicht ausgeschlossen werden, dass dem Wnt-Signalweg eine Bedeutung in der Entstehung von ONBs dieser Altersgruppe beizumessen ist. Dies würde überdies gut zu dem altersabhängigen tumorigenen Potential der aberranten Wnt-Aktivierung im murinen Riechepithel passen.

Wie eingangs dargelegt, scheinen sinonasale Hämangioperizytome (sHPCs) in ihrer Entstehung durch eine aberrante Aktivierung des Wnt-Signalwegs getrieben zu sein [91, 92], womit diese humane Tumorentität zumindest pathogenetisch den hier beschriebenen Tumor-artigen Läsionen der Maus entsprechen könnte. Diese Tumoren sollten jedoch nicht spezifisch von riechepithelialen Zellen ausgehen und in der Tat lässt sich histomorphologisch keine Ähnlichkeit zu den Tumor-artigen Mausläsionen feststellen (murine Läsionen mit neuroendokriner Differenzierung und fehlender Reaktivität für SMA, s.o.).

Der limitierten Lebensspanne des vorgestellten Mausmodells geschuldet, konnten im Rahmen dieser Arbeit nur relative kleine Tumor-artige Läsionen des Riechepithels

untersucht werden - selbst, wenn die Modellinduktion embryonal erfolgte. Nichtsdestotrotz zeigt diese Arbeit klar auf, dass eine strikte Kontrolle des Wnt-Signalwegs im Rahmen der riechepithelialen Entwicklung unerlässlich ist, um eine physiologische Ausbildung dieser Struktur sicherzustellen. Die Bedeutung eines aberranten Wnt-Signals in der vielfältigen Landschaft der humanen sinonasalen Neoplasien bleibt ein Untersuchungsgegenstand zukünftiger Studien. Ebenso bleibt es weiterhin unklar, inwieweit Sox2-positive Vorläuferzellen des Riechepithels tatsächlich als Ursprungszellen solcher Tumoren fungieren können.

5. Zusammenfassung

Dem kanonischen Wnt-Signalweg kommt eine entscheidende Bedeutung in der riechepithelialen Neurogenese zu, wo er die Proliferation und Expansion neuronaler Vorläuferzellen ausgehend von riechepithelialen Stammzellen fördert. Eine pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs stellt eine Schlüsselalteration in der Tumorigenese verschiedener humaner Neoplasien dar. Das Olfaktoriusneuroblastom (ONB) ist ein Malignom, welches vermutlich von Zellen des Riechepithels ausgeht – über die molekulare Pathogenese dieses Tumors ist jedoch bislang wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit untersucht das tumorigene Potential eines aberrant aktivierten Wnt-Signalwegs im Riechepithel der Maus. Zu diesem Zwecke stand ein Sox2-*creERT2::Ctnnb1(ex3)^{Fl/+}*-Mausmodell zu Verfügung, welches eine konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs in Sox2-positiven Zellen des Riechepithels an verschiedenen Altersstufe erlaubt. Es kann gezeigt werden, dass eine embryonale Induktion dieses Modells an Tag 14,5 der Embryonalentwicklung zur Entstehung von Tumor-artigen Läsionen führt, welche invasives Wachstum als Kennzeichen von Malignität aufweisen. Ein früh-postnatale Induktion des Modells führt

zur Entstehung riechepithelialer Polypen ohne malignen Charakter, wohingegen eine späte Induktion am Postnataltag 21 keine offensichtlichen morphologischen Alterationen des murinen Riechepithels mehr hervorruft. Diese Ergebnisse suggerieren zusammenfassend ein altersabhängiges tumorigenes Potential einer aberranten Aktivierung des Wnt-Signalwegs im murinen Riechepithel. Humane Olfaktoriustumore ähneln histomorphologisch und immunohistochemisch den beschriebenen Wnt-abhängigen, Tumor-artigen riechepithelialen Läsionen im Mausmodell, bieten jedoch keinen überzeugenden Anhalt auf eine Bedeutung einer pathologischen Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs für ihre Pathogenese. In welchem Maße eine pathologische Aktivierung des Wnt-Signalwegs für die Entstehung humaner Neoplasien des Nasen-Rachenraums eine entscheidende Rolle spielt und im Besonderen eine neoplastische Transformation im Riechepithel des Menschen bewirken kann, muss in zukünftigen Forschungsprojekten weiter evaluiert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Welsch, U.K., W.; Deller, T., *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 4. ed. 2014, München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH. 711.
2. Luo, J., et al., *Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications?* Lab Invest, 2007. 87(2): p. 97-103.
3. Engel, N.W., et al., *Canonical Wnt Signaling Drives Tumor-Like Lesions from Sox2-Positive Precursors of the Murine Olfactory Epithelium*. PLoS One, 2016. 11(11): p. e0166690.

4. Trepel, M., *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. 5. ed. 2011, München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
5. Schwob, J.E., *Neural regeneration and the peripheral olfactory system*. *Anat Rec*, 2002. 269(1): p. 33-49.
6. Kondo, K., et al., *Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death*. *J Comp Neurol*, 2010. 518(11): p. 1962-75.
7. Loseva, E., T.F. Yuan, and S. Karnup, *Neurogliogenesis in the mature olfactory system: a possible protective role against infection and toxic dust*. *Brain Res Rev*, 2009. 59(2): p. 374-87.
8. Graziadei, P.P. and G.A. Graziadei, *Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons*. *J Neurocytol*, 1979. 8(1): p. 1-18.
9. Holbrook, E.H., et al., *Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue*. *Laryngoscope*, 2011. 121(8): p. 1687-701.
10. Brann, J.H. and S. Firestein, *A lifetime of neurogenesis in the olfactory system*. *Frontiers in Neuroscience*, 2014. 8.
11. Mobley, A.S., et al., *Aging in the olfactory system*. *Trends Neurosci*, 2014. 37(2): p. 77-84.
12. Doty, R.L. and V. Kamath, *The Influences of Age on Olfaction: A Review*. *Frontiers in Psychology*, 2014. 5.
13. Kuhn, H., H. Dickinson-Anson, and F. Gage, *Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation*. *The Journal of Neuroscience*, 1996. 16(6): p. 2027-2033.

14. Alvarez-Buylla, A. and J.M. García-Verdugo, *Neurogenesis in Adult Subventricular Zone*. The Journal of Neuroscience, 2002. 22(3): p. 629-634.
15. Burda, Joshua E. and Michael V. Sofroniew, *Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease*. Neuron, 2014. 81(2): p. 229-248.
16. Wang, Y.Z., et al., *Canonical Wnt signaling promotes the proliferation and neurogenesis of peripheral olfactory stem cells during postnatal development and adult regeneration*. J Cell Sci, 2011. 124(Pt 9): p. 1553-63.
17. Chen, M., et al., *Wnt-responsive Lgr5(+) globose basal cells function as multipotent olfactory epithelium progenitor cells*. J Neurosci, 2014. 34(24): p. 8268-76.
18. Fletcher, Russell B., et al., *p63 Regulates Olfactory Stem Cell Self-Renewal and Differentiation*. Neuron. 72(5): p. 748-759.
19. Weiler, E. and A.I. Farbman, *Supporting cell proliferation in the olfactory epithelium decreases postnatally*. Glia, 1998. 22(4): p. 315-28.
20. Zhang, S. and W. Cui, *Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation*. World J Stem Cells, 2014. 6(3): p. 305-11.
21. Cau, E., et al., *Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors*. Development, 1997. 124(8): p. 1611-21.
22. Cau, E., S. Casarosa, and F. Guillemot, *Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage*. Development, 2002. 129(8): p. 1871-80.
23. Beites, C.L., et al., *Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium*. Exp Cell Res, 2005. 306(2): p. 309-16.
24. Cau, E., et al., *Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium*. Development, 2000. 127(11): p. 2323-32.

25. Rodriguez, S., et al., *Notch2 is required for maintaining sustentacular cell function in the adult mouse main olfactory epithelium*. Dev Biol, 2008. 314(1): p. 40-58.
26. Krolewski, R.C., et al., *Ascl1 (Mash1) knockout perturbs differentiation of nonneuronal cells in olfactory epithelium*. PLoS One, 2012. 7(12): p. e51737.
27. Klaus, A. and W. Birchmeier, *Wnt signalling and its impact on development and cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. 8(5): p. 387-98.
28. Barrow, J.R., et al., *Ectodermal Wnt3/beta-catenin signaling is required for the establishment and maintenance of the apical ectodermal ridge*. Genes Dev, 2003. 17(3): p. 394-409.
29. Yamaguchi, T.P., et al., *A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo*. Development, 1999. 126(6): p. 1211-1223.
30. Nusse, R. and H. Varmus, *Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed*. Embo j, 2012. 31(12): p. 2670-84.
31. Nusse, R., et al., *Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15*. Nature, 1984. 307(5947): p. 131-6.
32. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature, 1980. 287(5785): p. 795-801.
33. Sharma, R.P. and V.L. Chopra, *Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in Drosophila melanogaster*. Dev Biol, 1976. 48(2): p. 461-5.
34. Rijsewijk, F., et al., *The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless*. Cell, 1987. 50(4): p. 649-57.

35. Komiya, Y. and R. Habas, *Wnt signal transduction pathways*. *Organogenesis*, 2008. 4(2): p. 68-75.
36. Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros, *Wnt signaling in cancer*. *Oncogene*, 2016.
37. Anastas, J.N. and R.T. Moon, *WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2013. 13(1): p. 11-26.
38. Clevers, H. and R. Nusse, *Wnt/beta-catenin signaling and disease*. *Cell*, 2012. 149(6): p. 1192-205.
39. Aberle, H., et al., *beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway*. *Embo j*, 1997. 16(13): p. 3797-804.
40. Chen, W., et al., *Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4*. *Science*, 2003. 301(5638): p. 1391-4.
41. Li, V.S., et al., *Wnt signaling through inhibition of beta-catenin degradation in an intact Axin1 complex*. *Cell*, 2012. 149(6): p. 1245-56.
42. Behrens, J., et al., *Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1*. *Nature*, 1996. 382(6592): p. 638-42.
43. He, T.C., et al., *Identification of c-MYC as a target of the APC pathway*. *Science*, 1998. 281(5382): p. 1509-12.
44. Tetsu, O. and F. McCormick, *Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells*. *Nature*, 1999. 398(6726): p. 422-6.
45. Soravia, C., et al., *Genotype-Phenotype Correlations in Attenuated Adenomatous Polyposis Coli*. *The American Journal of Human Genetics*, 1998. 62(6): p. 1290-1301.
46. Attard, T.M., et al., *Brain tumors in individuals with familial adenomatous polyposis*. *Cancer*, 2007. 109(4): p. 761-766.

47. Network, C.G.A., *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer*. *Nature*, 2012. 487(7407): p. 330-337.
48. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. *Cell*, 1990. 61(5): p. 759-67.
49. Provost, E., et al., *Functional correlates of mutations in beta-catenin exon 3 phosphorylation sites*. *J Biol Chem*, 2003. 278(34): p. 31781-9.
50. Iwao, K., et al., *Activation of the beta-catenin gene by interstitial deletions involving exon 3 in primary colorectal carcinomas without adenomatous polyposis coli mutations*. *Cancer Res*, 1998. 58(5): p. 1021-6.
51. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. *Science*, 1997. 275(5307): p. 1787-90.
52. Rubinfeld, B., et al., *Stabilization of β -Catenin by Genetic Defects in Melanoma Cell Lines*. *Science*, 1997. 275(5307): p. 1790-1792.
53. Polakis, P., *Wnt signaling and cancer*. *Genes Dev*, 2000. 14(15): p. 1837-51.
54. Moser, A.R., H.C. Pitot, and W.F. Dove, *A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse*. *Science*, 1990. 247(4940): p. 322-4.
55. Harada, N., et al., *Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene*. *EMBO J*, 1999. 18(21): p. 5931-42.
56. Feng, G.J., et al., *Conditional disruption of Axin1 leads to development of liver tumors in mice*. *Gastroenterology*, 2012. 143(6): p. 1650-9.
57. Palacios, J. and C. Gamallo, *Mutations in the beta-catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas*. *Cancer Res*, 1998. 58(7): p. 1344-7.
58. Fukuchi, T., et al., *Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium*. *Cancer Res*, 1998. 58(16): p. 3526-8.

59. Park, W.S., et al., *Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer*. *Cancer Res*, 1999. 59(17): p. 4257-60.
60. Sunaga, N., et al., *Constitutive activation of the Wnt signaling pathway by CTNNB1 (beta-catenin) mutations in a subset of human lung adenocarcinoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2001. 30(3): p. 316-21.
61. Breuhahn, K., T. Longerich, and P. Schirmacher, *Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma*. *Oncogene*, 2006. 25(27): p. 3787-800.
62. Gibson, P., et al., *Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins*. *Nature*, 2010. 468(7327): p. 1095-9.
63. Huff, V., *Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene*. *Nat Rev Cancer*, 2011. 11(2): p. 111-21.
64. Lopez-Terrada, D., et al., *Histologic subtypes of hepatoblastoma are characterized by differential canonical Wnt and Notch pathway activation in DLK+ precursors*. *Hum Pathol*, 2009. 40(6): p. 783-94.
65. Kurihara, T., et al., *Immunohistochemical and sequencing analyses of the Wnt signaling components in Japanese anaplastic thyroid cancers*. *Thyroid*, 2004. 14(12): p. 1020-9.
66. Goschzik, T., et al., *Genomic Alterations of Adamantinomatous and Papillary Craniopharyngioma*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2017.
67. Korinek, V., et al., *Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4*. *Nat Genet*, 1998. 19(4): p. 379-83.
68. Kuhnert, F., et al., *Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(1): p. 266-71.

69. Selvadurai, H.J. and J.O. Mason, *Wnt/beta-catenin signalling is active in a highly dynamic pattern during development of the mouse cerebellum*. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23012.
70. Chenn, A. and C.A. Walsh, *Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors*. Science, 2002. 297(5580): p. 365-9.
71. Poschl, J., et al., *Constitutive activation of beta-catenin in neural progenitors results in disrupted proliferation and migration of neurons within the central nervous system*. Dev Biol, 2013. 374(2): p. 319-32.
72. Lorenz, A., et al., *Severe alterations of cerebellar cortical development after constitutive activation of Wnt signaling in granule neuron precursors*. Mol Cell Biol, 2011. 31(16): p. 3326-38.
73. Swartling, F.J., et al., *Signals that regulate the oncogenic fate of neural stem cells and progenitors*. Exp Neurol, 2014. 260: p. 56-68.
74. Thompson, L.D., *Olfactory neuroblastoma*. Head Neck Pathol, 2009. 3(3): p. 252-9.
75. Carney, M.E., et al., *Expression of the human Achaete-scute 1 gene in olfactory neuroblastoma (esthesioneuroblastoma)*. J Neurooncol, 1995. 26(1): p. 35-43.
76. Barnes, L., et al., *Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours*. World Health Organization Classification of Tumours. 2005, Lyon: IARC Press.
77. El Kababri, M., et al., *Esthesioneuroblastoma in children and adolescent: experience on 11 cases with literature review*. J Pediatr Hematol Oncol, 2014. 36(2): p. 91-5.
78. Ow, T.J., et al., *Esthesioneuroblastoma*. Neurosurg Clin N Am, 2013. 24(1): p. 51-65.

79. Riazimand, S.H., et al., *Analysis of cytogenetic aberrations in esthesioneuroblastomas by comparative genomic hybridization*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2002. 136(1): p. 53-7.
80. Bockmuhl, U., et al., *CGH pattern of esthesioneuroblastoma and their metastases*. *Brain Pathol*, 2004. 14(2): p. 158-63.
81. Guled, M., et al., *Array comparative genomic hybridization analysis of olfactory neuroblastoma*. *Mod Pathol*, 2008. 21(6): p. 770-8.
82. Sorensen, P.H., et al., *Olfactory neuroblastoma is a peripheral primitive neuroectodermal tumor related to Ewing sarcoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(3): p. 1038-43.
83. Delattre, O., et al., *Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours*. *Nature*, 1992. 359(6391): p. 162-5.
84. Argani, P., et al., *Olfactory neuroblastoma is not related to the Ewing family of tumors: absence of EWS/FLI1 gene fusion and MIC2 expression*. *Am J Surg Pathol*, 1998. 22(4): p. 391-8.
85. Kumar, S., et al., *Absence of EWS/FLI1 fusion in olfactory neuroblastomas indicates these tumors do not belong to the Ewing's sarcoma family*. *Hum Pathol*, 1999. 30(11): p. 1356-60.
86. Weiss, G.J., et al., *Paired tumor and normal whole genome sequencing of metastatic olfactory neuroblastoma*. *PLoS One*, 2012. 7(5): p. e37029.
87. Cha, S., et al., *Abstract 4191: Whole exome sequencing of a case of olfactory neuroblastoma*. *Cancer Research*, 2014. 74(19 Supplement): p. 4191.
88. Cha, S., et al., *Clinical application of genomic profiling to find druggable targets for adolescent and young adult (AYA) cancer patients with metastasis*. *BMC Cancer*, 2016. 16(1): p. 170.

89. Agaimy, A., et al., *Phenotypical and molecular distinctness of sinonasal haemangiopericytoma compared to solitary fibrous tumour of the sinonasal tract*. *Histopathology*, 2014. 65(5): p. 667-73.
90. Compagno, J. and V.J. Hyams, *Hemangiopericytoma-like intranasal tumors. A clinicopathologic study of 23 cases*. *Am J Clin Pathol*, 1976. 66(4): p. 672-83.
91. Lasota, J., et al., *Nuclear expression and gain-of-function beta-catenin mutation in glomangiopericytoma (sinonasal-type hemangiopericytoma): insight into pathogenesis and a diagnostic marker*. *Mod Pathol*, 2015. 28(5): p. 715-20.
92. Haller, F., et al., *Recurrent mutations within the amino-terminal region of beta-catenin are probable key molecular driver events in sinonasal hemangiopericytoma*. *Am J Pathol*, 2015. 185(2): p. 563-71.
93. Arnold, K., et al., *Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice*. *Cell Stem Cell*, 2011. 9(4): p. 317-29.
94. Feil, S., N. Valtcheva, and R. Feil, *Inducible Cre mice*. *Methods Mol Biol*, 2009. 530: p. 343-63.
95. Madisen, L., et al., *A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain*. *Nat Neurosci*, 2010. 13(1): p. 133-40.
96. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki, *Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector*. *Gene*, 1991. 108(2): p. 193-9.
97. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. *Nat Biotechnol*, 2004. 22(12): p. 1567-72.

98. Feil, S., et al., *Genetic inducible fate mapping in adult mice using tamoxifen-dependent Cre recombinases*. *Methods Mol Biol*, 2014. 1194: p. 113-39.
99. Kadish, S., M. Goodman, and C.C. Wang, *Olfactory neuroblastoma. A clinical analysis of 17 cases*. *Cancer*, 1976. 37(3): p. 1571-6.
100. Hyams, V., *Olfactory neuroblastoma (Case6)*, in *Special tumors of the head and neck*, H.V. Batsakis JG, Morales AR,, Editor. 1982, ASCP Press: Chicago. p. 24-29.
101. Ralston, J., L. Chiriboga, and D. Nonaka, *MASH1: a useful marker in differentiating pulmonary small cell carcinoma from Merkel cell carcinoma*. *Mod Pathol*, 2008. 21(11): p. 1357-62.
102. Guo, Z., et al., *Expression of pax6 and sox2 in adult olfactory epithelium*. *J Comp Neurol*, 2010. 518(21): p. 4395-418.
103. Faragalla, H. and I. Weinreb, *Olfactory neuroblastoma: a review and update*. *Adv Anat Pathol*, 2009. 16(5): p. 322-31.
104. Bak, M. and R.O. Wein, *Esthesioneuroblastoma: a contemporary review of diagnosis and management*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2012. 26(6): p. 1185-207.
105. Murdoch, B. and A.J. Roskams, *Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology*. *J Mol Histol*, 2007. 38(6): p. 581-99.
106. Voyron, S., et al., *Apoptosis in the development of the mouse olfactory epithelium*. *Brain Res Dev Brain Res*, 1999. 115(1): p. 49-55.
107. Cowan, C.M. and A.J. Roskams, *Apoptosis in the mature and developing olfactory neuroepithelium*. *Microsc Res Tech*, 2002. 58(3): p. 204-15.
108. Chen, S., et al., *WNT-1 Signaling Inhibits Apoptosis by Activating β -Catenin/T Cell Factor–Mediated Transcription*. *The Journal of Cell Biology*, 2001. 152(1): p. 87-96.

109. Longo, K.A., et al., *Wnt Signaling Protects 3T3-L1 Preadipocytes from Apoptosis through Induction of Insulin-like Growth Factors*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(41): p. 38239-38244.
110. Leslie, A., et al., *The colorectal adenoma-carcinoma sequence*. *Br J Surg*, 2002. 89(7): p. 845-60.
111. Walther, A., et al., *Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(7): p. 489-499.
112. Hulse, K.E., et al., *Pathogenesis of nasal polyposis*. *Clin Exp Allergy*, 2015. 45(2): p. 328-46.
113. Knör, M., et al., *Human Papillomavirus (HPV) Prevalence in Nasal and Antrochoanal Polyps and Association with Clinical Data*. *PLoS ONE*, 2015. 10(10): p. e0141722.
114. Bhutta, M.F., et al., *Nasal polyps do not contain olfactory structures*. *Rhinology*, 2011. 49(2): p. 185-9.
115. Tian, P., et al., *A global analysis of tandem 3'UTRs in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps*. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e48997.
116. Gay, L.M., et al., *Comprehensive Genomic Profiling of Esthesioneuroblastoma Reveals Additional Treatment Options*. *Oncologist*, 2017. 22(7): p. 834-842.
117. Lazo de la Vega, L., et al., *Comprehensive Molecular Profiling of Olfactory Neuroblastoma Identifies Potentially Targetable FGFR3 Amplifications*. *Mol Cancer Res*, 2017.

7. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Schüller, der mir die Chance und die Ressourcen bot, dieses interessante Thema zu bearbeiten. Dankend hervorheben möchte ich die herausragende Betreuung, die allseits kritische und konstruktive Kritik, die motivierenden Diskussionen sowie das mir allseits entgegengebrachte Vertrauen und den nicht selbstverständlichen, mir eröffneten wissenschaftlichen Freiraum, ohne welchen diese Arbeit nicht denkbar gewesen wäre. Für den kritischen wissenschaftlichen Input und die methodische Unterstützung gebührt mein Dank der gesamten ehemaligen Münchener „Arbeitsgruppe Schüller“, hervorhebend insbesondere Frau Dr. med. Julia E. Neumann, Frau Dr. rer. nat. Julia Ahlfeld, Frau Annika K. Wefers, Herrn Dr. rer. nat. Daniel J. Merk und Frau Jasmin Ohli.

Weiterhin möchte ich Frau Silvia Occhionero, Frau Marie-Christin Burmester, Frau Veronika Kaltenbrunn sowie Herrn Michael Schmidt für Ihre ausgezeichnete technische Unterstützung danken.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med Jörg Felsberg und Herrn Prof. Dr. med. Guido Reifenberger, Herrn PD Dr. med. Arend Koch, Herrn Prof. Dr. med. Glatzel, Herrn Prof. Dr. med. Werner Paulus, Frau Dr. med. Camelia Monoranu, Herrn Prof. Dr. med. Stephan Frank sowie Herrn Dr. med. Matthias Meinhardt für die freundliche Bereitstellung von FFPE-Material und klinischen Informationen der humanen Olfaktoriusneuroblastome.

Dank für die materielle und insbesondere immaterielle Förderung dieser Arbeit gebührt dem „FöFoLe“ (Förderung für Forschung und Lehre)-Programm der LMU München und für die materielle Unterstützung der Stiftung Deutsche Krebshilfe.

Ohne meine Frau Andrea wäre diese Arbeit sicherlich angefangen, aber nicht unbedingt abgeschlossen worden. Ich danke Dir von Herzen für Deine Anteilnahme, Deinen Zuspruch und Deine wertvolle Unterstützung sowie Deine Geduld und Dein Verständnis in jenen vielen Momenten, in denen meine Aufmerksamkeit dem Promotionsvorhaben gewidmet war, aber eigentlich Du sie verdient gehabt hättest.