
1	ZUSAMMENFASSUNG	1
	ABSTRACT	3
2	EINLEITUNG	5
2.1	EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK	5
2.2	GENGRUPPEN	8
2.2.1	TUMORSUPPRESSORGENE	8
2.2.2	ONKOGENE	9
2.2.3	MUTATORGENE	10
2.3	PLEOMORPHES ADENOM	12
2.3.1	DEFINITION DES PLEOMORPHEN ADENOMS	12
2.3.2	KLINISCHE EIGENSCHAFTEN	12
2.3.3	PATHOHISTOLOGIE	14
2.3.4	IMMUNHISTOCHEMIE	18
2.3.5	ÄTIOLOGIE UND KLINIK	18
2.3.6	DIAGNOSTIK	20
2.3.7	THERAPIE	21
2.3.8	CHROMOSOMALE UND MOLEKULARE VERÄNDERUNGEN DER PLEOMORPHEN ADENOME	22
2.4	UNTERSUCHTE CHROMOSOMEN MIT MÖGLICHEN KANDIDATENGENEN	28
2.4.1	CHROMOSOM X	29
2.4.2	CHROMOSOM 17 UND DIE KANDIDATENGENE P53 UND HER2NEU	31
2.4.3	CHROMOSOMALE REGION 16P	33
2.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	335
3	MATERIAL	36
3.1	GEWEBEPROBEN	36
3.1.1	TUMORGEWEBE	36
3.1.2	REFERENZGEWEBE	37
3.2	SONDEN	37
3.3	GERÄTE UND SOFTWARE	38
4	METHODEN	39
4.1	HERSTELLUNG VON SILANISIERTEN OBJEKTTRÄGERN	39
4.2	HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN	39
4.3	FIXIERUNG DER GEFRIERSCHNITTE	40
4.4	HE-FÄRBUNG	41
4.5	FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	44
4.5.1	EINFÜHRUNG IN DIE FISH - TECHNIK	44

4.5.1.1	THEORIE	44
4.5.1.2	DENATURIERUNG UND HYBRIDISIERUNG	47
4.5.1.3	STRINGENZWASCHUNG	49
4.5.1.4	DETEKTION	50
4.6	FISH AN LYMPHOZYTENPRÄPARATEN	50
4.6.1	BLUTKULTUR	50
4.6.2	CHROMOSOMENPRÄPARATION	51
4.6.3	VORBEREITUNG DER LYMPHOZYTENPRÄPARATE	53
4.6.4	DENATURIERUNG UND HYBRIDISIERUNG	54
4.7	FISH AN PAROTISGEWEBESCHNITTEN	55
4.7.1	VORBEHANDLUNG DER GEWEBESCHNITTE	55
4.7.2	DENATURIERUNG UND HYBRIDISIERUNG	57
4.7.3	STRINGENZWASCHUNG UND DAPI-FÄRBUNG	57
4.8	BILDAUFNAHME UND AUSWERTUNG	58
4.8.1	AUSWERTUNG DER FISH-UNTERSUCHUNG	60
4.8.2	BILDAUFNAHMEN	61
5	ERGEBNISSE	62
5.1	KONTROLLEN DER SONDENSPEZIFITÄT UND HYBRIDISIERUNGSEFFIZIENZ	63
5.2	FISH RESULTATE CHROMOSOM X	68
5.2.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE CHROMOSOM X	71
5.3	FISH RESULTATE DES CHROMOSOMENARMS 16P	74
5.3.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES CHROMOSOMENARMS 16P	77
5.4	FISH RESULTATE DES CHROMOSOMS 17 UND HER-2/NEU	80
5.4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE VON CHROMOSOM 17 UND HER-2/NEU	85
5.5	FISH RESULTATE DES CHROMOSOMS 17 UND P53	88
5.6	ZUSAMMENFASSUNG DER FISH- RESULTATE	93
5.7	VERGLEICH DER FISH- RESULTATE MIT CGH-VORUNTERSUCHUNGEN	95
6	DISKUSSION	99
6.1	METHODENDISKUSSION	99
6.1.1	GEWEBESCHNITTE	99
6.1.2	FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	101
6.1.3	PROTEOLYTISCHER VERDAU	102
6.1.4	SONDEN	103
6.1.5	HYBRIDISIERUNG/DENATURIERUNG UND STRINGENZWASCHUNG	105
6.1.6	AUFNAHME UND AUSWERTUNG	106
6.2	ERGEBNISDISKUSSION	108
6.2.1	DELETIONEN DES X-CHROMOSOMS	111
6.2.2	DELETIONEN DES CHROMOSOMENABSCHNITTES 16P	116
6.2.3	DELETION DES HER-2/NEU LOKUS AUF CHROMOSOM 17Q12-Q21.32	119
6.2.4	DELETION VON P53 AUF CHROMOSOM 17P13.1	121
6.3	AUSBLICK	124
7	LITERATURVERZEICHNIS	126

8	<u>ANHANG</u>	<u>145</u>
8.1	LÖSUNGEN UND PUFFER	145
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	147
8.4	TABELLENVERZEICHNIS	149
8.5	GENEHMIGUNG ZUR WISSENSCHAFTLICHEN VERWERTUNG DER TUMOR- PROBEN	150
9	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>155</u>
10	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>158</u>

Abkürzungen

#	Chromosom Nummer
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ABL	Abelson Maus Leukämie
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	Androgenrezeptor
ARF	auxin response factor
BAX	Bcl2-associated X protein
BCR	breakpoint cluster region
BPGF	bone and prostate-derived growth factor
BRCA	breast cancer gene
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CDK4	cyclin dependant kinase 4
CCD	charge coupled device
CEP	chromosome enumeration probe
CGH	Vergleichende genomische Hybridisierung
CISS	chromosomale In-situ-Suppression
CLF	cytokine-like factor
cm ³	Kubikzentimeter
CMV	Cytomegalievirus
c-mos	v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPA	Karzinom im pleomorphen Adenom

CT	Computertomographie
CTCF	CCCTC-binding factor (zinc finger protein)
Cy3	Carbocyanin 3
DAPI	4-6-Diamidino-2-Phenylindol
deion	deionisiert
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dmin	double minutes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FHIT	fragile histidine triad gene
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FNP	Feinnadelpunktion
G	Guanin
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GSTP1	glutathione S-transferase pi
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGA2	high mobility group AT-hook 2
HMGIC	high-mobility group protein gene
HMG1Y	high-mobility group protein isoform I and Y
HNB1	hereditary neuroblastoma predisposition gene
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer

H ₂ O _{dd}	bidestiliertes Wasser
HPCX	hereditary prostate cancer, X-linked
I.E.	internationale Einheiten
IGF	insulin-like growth factor
ISH	In-situ-Hybridisierung
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LIFR	leukemia inhibitory factor receptors
log	Logarithmus
LOH	loss of heterozygosity
LSI	locus-specific indicator probes
M	Molar
MDM2	transformed mouse 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein
mg	Miligramm
min	Minute
ml	Mililiter
MLH	mismatch repair gene (Mutatorgen)
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH	Melanocyte stimulating hormone
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
n	Basenpaarlänge
Na ⁺	Natrium
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaPO ₄	Natriumphosphat
NBF	neutral buffered formalin
NF	Neurofibromatosegen
NFI	nuclear factor family member
ng	Nanogramm
OT	Objektträger

p	kurzer Arm des Chromosoms
PA	Pleomorphes Adenom
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIG2	proliferation-inducing gene 2
PLAG1	pleomorphic adenoma gene-like 1
PLAGL2	pleomorphic adenoma gene-like 2
PTEN	phosphatase and tensin homolog
q	langer Arm des Chromosoms
RAS	rat sarcoma gene
rap1	repressor activator protein
Rb	Retinoblastomprotein
rb	Retinoblastomgen
RNA	Ribonucleinsäure
Rnase	Ribunuklease
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEN16	cell senescence gene
SSI	Starch Synthetase I
SOC -1	suppressor of overexpression of CO1
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymidin
TCEA1	transcription elongation factor A (SII) 1
T _m	Schmelztemperatur
TSC2	tuberous sclerosis gene 2
UBE2I	ubiquitin-conjugating enzyme E2I
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.a.	unter anderem
W	Watt

WHO	World Health Organisation
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
XIC	X chromosome inactivation center
XIST	inactive X specific transcripts
XPF	xeroderma pigmentosum complementation group F

1 Zusammenfassung

Das pleomorphe Adenom stellt die häufigste benigne Raumforderung der Speicheldrüsen dar und weist zu 80% eine Lokalisation in der Glandula parotis auf. Mikroskopisch ist es durch ein buntes Bild epithelialer und mesenchymaler Anteile gekennzeichnet, wobei der epitheliale Anteil für das Proliferationsverhalten verantwortlich gemacht wird. Es bestehen vielfältige genetische Aberrationen innerhalb dieser Tumorentität, die offenbar in Zusammenhang mit der Tumorentstehung und -progression stehen.

Voruntersuchungen zur genetischen Charakterisierung von Speicheldrüsentumoren des Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg konzentrierten sich auf die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) von Parotistumoren. Hierbei konnten Areale häufiger Gengewinne und -verluste detektiert werden. Die Lokalisation der detektierten genetischen Veränderungen grenzen ätiologische Genloci ein, welche in weiteren molekularzytogenetischen Untersuchungen charakterisiert werden können.

In der vorliegenden Studie wurden Kryostatschnitte von pleomorphen Adenomen mit der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Die Methode der FISH bietet die Möglichkeit, genetische Veränderungen einzelner Chromosomen und Chromosomenabschnitte bis hin zur Ebene einzelner Gene darzustellen. Zur weiteren genetischen Charakterisierung von 21 pleomorphen Adenomen wurden eine telomernahe Sonde auf dem Chromosomenarm 16p, eine zentromernahe Sonde auf Chromosom X, eine Alpha-Satelliten-Sonde auf Chromosom 17 sowie genspezifische Sonden für Her-2/neu bzw. p53 simultan hybridisiert. Im Anschluss an die FISH wurden die Präparate auf Gewinne und Verluste der angewendeten Sonden analysiert und statistisch ausgewertet.

Die mit Hilfe der CGH bei pleomorphen Adenomen häufig gefundenen Verluste von Chromosom 17 und dem Chromosomenarm 16p konnten mit der FISH-Untersuchung am Gewebeschnitt bestätigt werden. Ferner wurden p53- Verluste in den Tumoren festgestellt. Daneben ließ sich mit Her-2/neu ein von bisherigen Studien

abweichendes Resultat darlegen. Statt eines vielfach beschriebenen Genzugewinns wiesen alle von uns untersuchten Fälle ein Verlust des Her-2/neu-Gens auf. Nicht übereinstimmende Resultate im Vergleich zu unseren CGH-Analysen zeigten sich bei den Ergebnissen des X-Chromosoms. Die in der CGH detektierten Gewinne wurden nicht bestätigt. Vielmehr konnten mit der Zentromersonde häufige Verluste von Chromosom X detektiert werden.

Verluste chromosomaler Regionen scheinen ein regelmäßiges Phänomen bei der Entstehung und Progression von pleomorphen Adenomen zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen in diesem Zusammenhang auf wichtige Kandidatengene auf den Chromosomen X und 17, als auch auf dem Chromosomenarm 16p hin. Der bestätigte spezifische Verlust des Tumorsuppressorgens p53 gibt ebenfalls erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss von p53 auf die Entstehung pleomorpher Adenome. Welche Rolle der Verlust eines Protoonkogens wie Her-2/neu in diesem Zusammenhang spielen kann, erscheint bislang unklar. Möglicherweise steht hier nicht der Verlust von Her2-neu im direkten Zusammenhang mit der Tumorentwicklung sondern andere, bislang nicht identifizierte Kandidatengene aus der unmittelbaren Nachbarschaft, welche gemeinsam mit dem hier untersuchten Locus auf 17q12-q21.32 in pleomorphen Adenomen deletiert vorliegen.

Um eine gesicherte Aussage treffen zu können, ob die von uns detektierten genetischen Aberrationen charakteristische Veränderungen in pleomorphen Adenomen darstellen, die zu ihrer Entstehung beitragen oder einen Hinweis auf die Tumorprogression geben, müssen zunächst noch weitere molekularzytogenetische Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl in unterschiedlichen Tumorstadien folgen. Desweiteren sollten diese Daten mittels RNA- und Proteinexpressionsstudien bestätigt werden. Dies ermöglicht eine Überprüfung, ob die gefundenen Verluste auch auf Proteinebene einen Einfluss auf die Tumorgenese nehmen können.

Abstract

The pleomorphic adenoma represents the most frequent benign space-occupying lesion of the salivary glands and in 80% of the cases it is located in the parotid gland. Microscopically it is characterized by a multicolor picture of epithelial and mesenchymal portions whereby the epithelial portion is made responsible for the proliferation attitude. Various genetic aberrations exist within this tumor entity which obviously stand in causal relationship with the tumor formation and tumor progression.

Preliminary investigations of the otorhinolaryngologic clinic of the university hospital Homburg/Saar refer to genetic characterisation of tumors of the salivary gland concentrated on the comparative genomic hybridization (CGH) of tumors in the parotid gland. With this method areas of frequent gains and losses of the chromosome set could be detected. The localization of these genetic changes limits gen loci which can be characterized in further molecular genetic investigations.

In the present study cryostat cuts of pleomorphic adenomas were examined with the method of the fluorescence in situ hybridization (FISH). FISH offers the possibility of representing genetic changes of single chromosomes and chromosome sections up to the level of individual genes.

For the further genetic characterisation of 21 pleomorphic adenomas a telomere probe on the short arm of chromosome 16, a centromere probe on chromosome X, an alpha satellite probe on chromosome 17 as well as gene specific probes for Her-2/neu and p53 were simultaneously hybridized. Following the FISH the preparations were analyzed on gains and losses of the applied probes and evaluated statistically.

The losses of chromosome 17 and the short arm of chromosome 16 frequently found with the help of the CGH could be confirmed with the FISH investigations at the tissue sections. Furthermore p53 losses were determined in the tumors. In addition it was possible to identify a deviation from the results of past studies with Her-2/neu. Instead of an often described gene amplification, all cases we examined showed a loss of the Her-2/neu gene. Compared with the CGH analysis the results found for

the X chromosome did not match. The detected gains in the CGH were not confirmed. Instead frequent losses of the chromosome X were detected with the help of the centromere probe.

Losses of chromosomal regions seem to be a regular phenomenon in the development and progression of pleomorphic adenomas. In this context, the results of this study refer to important candidate genes on the chromosome X and 17 as well as on the short chromosome arm 16p. Likewise the confirmed specific loss of the tumoursuppressorgene p53 provides first information on a possible influence of p53 on the formation of pleomorphic adenomas. So far it is unclear which role the loss of a protooncogene such as Her-2/neu can play in this context. The loss of Her-2/neu might possibly not be directly connected with the development of the tumor, but with other so far not identified candidate genes in the direct neighbourhood which are deleted together with the studied locus on 17q12-q21.32 in pleomorphic adenomas.

In order to be able to make a secured statement on whether the genetic aberrations detected by us represent characteristic changes in pleomorphic adenomas, which contribute to their development or give a reference to the tumor progression, further molecular-cytogenetic investigations with a larger case number must follow. Furthermore these data should be confirmed by means of RNA- and proteinexpression studies. In this way it will be possible to verify whether the found losses also have an influence on the tumorigenesis on protein level.

2 Einleitung

2.1 Einführung in die Thematik

Der Einfluss genetischer Veränderungen auf die Tumorgenese ist seit über hundert Jahren Thema wissenschaftlicher Untersuchungen. Bereits 1890 beschrieb von Hansemann abnorme Mitosen in Tumorzellen (von Hansemann et al., 1890). Ein Vierteljahrhundert später postulierte Boveri 1914 Neoplasien seien Folge genetischer Veränderungen einer Ursprungszelle (Boveri, 1914). Erst in den fünfziger Jahren konnte diese Hypothese mittels erster karyotypischer Studien bestätigt werden. Nach Einführung neuer Techniken in der Chromosomenanalyse konnte die Anzahl menschlicher Chromosomen sicher mit 46 ermittelt (Tjio & Levan, 1956) und bald die ersten konstitutionellen und krankheitsassoziierten Aneuploidien zytogenetisch beschrieben werden (Lejeune, 1959). Es zeigte sich, dass maligne Zellen durch numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen charakterisiert sind und vermutlich eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und -entwicklung spielen (Mitelman et al., 1997). Einen Meilenstein erreichte die Tumorzytogenetik 1960 mit der Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie durch Nowell und Hungerford (Nowell & Hungerford, 1960; Rubin, 1992). Diese Erstbeschreibung einer einheitlichen Chromosomenaberration innerhalb eines menschlichen Tumors erwies sich 1973 als reziproke Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 (Rowell, 1973). Einen weiteren Durchbruch erlangte die Tumorzytogenetik mit der Einführung der Chromosomenbänderung durch Caspersson und Zech (Caspersson et al., 1970). Hiermit konnten mit Hilfe des selektiven Fluoreszenzfarbstoffes Quinacrin erstmals alle 22 Autosomenpaare und die zwei Geschlechtschromosomen des Menschen anhand von spezifischen Bandenmustern unterschieden werden. Durch die Weiterentwicklung der Bänderungstechniken, mit deren Hilfe auch kleinere Deletionen und Translokationen sichtbar wurden, konnten mannigfaltige chromosomale Aberrationen in Neoplasien wie beispielsweise dem Burkitt-

Lymphom nachgewiesen werden (Mitelman, 1991; Bullerdiek et al., 1988). Die konventionelle Zytogenetik war jedoch abhängig von frischen, teilungsfähigen Tumorzellen, Metaphasepräparaten sowie der Qualität der Chromosomenbanden. Ein Fortschritt der Tumorzytogenetik war durch Probleme bei dem Ansetzen von Zellkulturen, einem Überwachsen von Tumorzellen durch Fibroblasten sowie unscharfe Chromosomenarchitektur behindert (Mark et al., 1996). Selbst unter optimalen Bedingungen war die Karyotypisierung vieler Tumore zu komplex und subtile Chromosomenaberrationen schwer zu detektieren. Diese Einschränkungen der konventionellen Zytogenetik konnten mit der Einführung der molekularen Zytogenetik teilweise übergangen werden. Einen deutlichen Fortschritt wurde mit der Einführung der In-situ-Hybridisierung erreicht (John et al., 1969; Gall & Pardue, 1969). Das Prinzip der Methode beruht auf der Hybridisierung von Sonden markierter DNA oder RNA mit komplementärer DNA in Metaphasechromosomen, Interphasezellen und auch an Gewebeschnitten. Hierfür können sowohl zentromerspezifische als auch genspezifische Sonden verwendet werden, um numerische bzw. strukturelle chromosomale Aberrationen wie Deletionen, Amplifikationen, Duplikationen und Translokationen zu detektieren (Price, 1993; Halling et al., 2007).

Anfangs wurden lediglich radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendet, die jedoch bald zu Gunsten nicht radioaktiver Sonden wie z.B. biotin- und digoxigeninmarkierter Sonden in den Hintergrund traten. Eine wesentliche Neuerung brachte die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit fluorochrommarkierten Sequenzen, welche neben einer wesentlich besseren räumlichen Auflösung auch ein schnelleres Vorgehen ermöglichte (Trask et al., 1988; Pinkel et al., 1986a,b). Bei der Chromosomen-in-situ-Suppressions- (CISS-) Hybridisierung konnte weiterhin durch Blockierung unspezifischer DNA-Sequenzen mittels Vorhybridisierung der markierten DNA-Sonden unspezifische Signale (repetitive Sequenzen) unterdrückt werden (Lichter et al., 1988). Weitere Modifikationen der In-situ-Hybridisierung stellten die Multicolor-FISH (M-FISH) (Speicher et al., 1996) und die combined binary ratio-labeling FISH (COBRA-FISH) dar (Wiegant et al., 2000). Beide Methoden erlaubten durch die Kombination von vier bzw. fünf Fluorochromen die

Darstellung aller 24 Chromosomen in unterschiedlichen Farben (Tanke et al., 1999). Alternativ hierzu entwickelte Schröck 1996 die so genannte Spektral Karyotyping (SKY)-Technik, wobei die Chromosomen lediglich mit drei Fluorochromen markiert und anhand der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten unterschieden werden können (Schröck et al., 1996). Der neueste Fortschritt der In-situ-Hybridisierung stellt die Metallographic-in-situ-Hybridisierung dar. Diese Methode nutzt Sonden oder Antikörper mit einer metallselektiven Bindungsstelle, wobei zum Beispiel Markierungen mit Gold eine höhere Sensitivität zu besitzen scheinen, als konventionelle Enzymchromogene (Powell et al., 2007).

Ein ähnliches Prinzip wie der In-situ-Hybridisierung liegt der Komparativen genomischen Hybridisierung (CGH), entwickelt von Kallioniemi und du Manoir 1992, zugrunde. Hierbei werden auf molekularzytogenetischer Ebene numerische Ungleichgewichte des Tumorgenoms im Verhältnis zum normalen Genom untersucht, mit Hilfe einer speziellen Bildbearbeitungssoftware ausgewertet und dargestellt. Somit kann in einem einzigen Versuch das gesamte menschliche Genom auf DNA-Zugewinne und DNA-Verluste hin untersucht werden. Auch Aneuploidien oder Alleldeletionen, die auf beteiligte Tumorsuppressorgene deuten, können detektiert werden (Kallioniemi et al., 1992).

Über Jahre hinweg entwickelte sich die Tumorzytogenetik von mikroskopischen Befunden über einfache Färbetechniken zu modernen molekulargenetischen Methoden, die die Identifizierung auch einzelner Gene erlauben. Weitere zukunftsweisende Techniken werden zunehmend die Molekulargenetik mit der Zytogenetik vernetzen. Alle Methoden werden die These, dass die Tumorentstehung Folge genetischer und epigenetischer Veränderungen ist, welche Onkogene aktivieren, Tumorsuppressorgene inaktivieren, und dass genetische Veränderungen innerhalb eines Tumors sowohl auf chromosomaler als auch auf molekularer Ebene stattfinden, weiter differenzieren. Hierbei darf allerdings nie außer Acht gelassen werden, dass die vielen neuen Methoden der molekularen Zytogenetik auch weiterhin die klassische Zytogenetik einbeziehen sollten, um die Sensitivität der Detektion genetischer Aberrationen zu erhöhen und zu verifizieren sowie um eine Übersicht

über alle bzw. neue chromosomale Veränderungen zu erhalten. Alle tumorzytogenetischen Untersuchungen setzen sich zum Ziel, die Ursache für Neoplasien zu erkennen, die Diagnosestellung zu verbessern, sowie Wege verbesserter Therapieoptionen zu eröffnen.

2.2 Gengruppen

2.2.1 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene zeichnen sich durch ihre direkt hemmende Funktion auf das Zellwachstum aus. Sie sind fast ausschließlich Regulatorgene des Zellzyklus, wobei ihr Ausfall zu einem unkontrollierten Ablauf des Zellzyklus führt. Einen passiven Einfluss auf das Zellwachstum üben Tumorsuppressorgene über DNA-Reparaturmechanismen aus, in dem sie falsch gepaarte Basen innerhalb des DNA-Stranges erkennen.

Aufgrund der Tatsache das Retinoblastome sowohl sporadisch als auch familiär autosomal-dominant gehäuft auftraten, stellte Knudson bereits 1971 die „Zwei Stufen“-Theorie der Tumorentstehung auf (Knudson, 1971). Diese besagt, dass eine erste Mutation bereits in der Keimzellbahn und somit in allen Körperzellen präsent ist. Dies allein würde aber nur unzureichend eine Tumorgenese erklären, so dass die Hypothese einer notwendigen zweiten somatischen Mutation aufgestellt wurde, welche eine Tumorentstehung fördere.

Für die Entstehung eines Retinoblastoms ist demnach der Verlust beider RB1-Allele notwendig, das heißt das Gen kodiert für ein Protein, nach dessen vollständigem Verlust ein maligner Tumor entsteht. Demnach sind Tumorsuppressorgenmutationen rezessiv gegenüber dem normalen Allel, so dass gemäß Knudson das zweite Wildtyp-Allel ebenfalls inaktiviert werden muss, bevor es zu einer Tumorentstehung kommt. Ein möglicher Mechanismus einer Tumorsuppressorgeninaktivierung ist die molekulare Mutation des einen Allels, während das andere durch strukturelle Aberrationen deletiert ist.

Die „Zwei-Stufen“-Theorie bildet den Grundstein des heutigen Paradigmas der Mehrschrittkanzerogenese und verdeutlicht Grundprinzipien der vererbten Tumorentstehung (Knudson, 1971; 1985). Bewiesen wurde diese frühe Hypothese schließlich erst zwölf Jahre später über Kopplungsanalysen zwischen dem RB-Gen und dem Esterase D-Gen (Cavenee et al., 1983).

Zu den bedeutensten Tumorsuppressorgenen, deren Inaktivierung in zahlreichen menschlichen Tumoren nachgewiesen wurde, zählen die Gene für den Transkriptionsregulator p53, die Zellzyklusproteine RB und p16 sowie für den Signalketteninhibitor PTEN (Stanbridge et al., 1990; Karp et al., 1995).

2.2.2 Onkogene

Protoonkogene spielen im Allgemeinen eine entscheidende Rolle der Wachstumsregulation und sind in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten verteilt. Die Produkte der Protoonkogene fungieren während der Normalentwicklung als Wachstumsfaktoren, als tyrosinspezifische Proteinkinasen und GTPasen in der Signaltransduktion sowie direkt als aktivierende Transkriptionsfaktoren (Goldberg et al., 1991). Zur pathologischen Aktivierung von Onkogenen führt die Mutation nur eines einzigen Allels, meist durch Punktmutation, Rekombination oder Genamplifikation der Protoonkogenesequenzen.

Veränderungen der physiologischen Protoonkogene führen zu tumorrelevanten Onkogenen. Diese Aktivierung kann entweder quantitativ durch Überexpression des unveränderten Produkts als Folge einer Amplifikation oder qualitativ durch Punktmutationen, Rearrangements bzw. Translokationen (Croce et al., 1985) hervorgerufen werden. Im Gegensatz zu den Tumorsuppressorgenen besitzen Onkogene somit eine eher dominante Wirkungsweise.

Onkogene sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Studien und so konnten bereits über hundert verschiedene Gene identifiziert werden. Zu den bekanntesten Protoonkogenen, die in humanen Tumoren aktiviert werden, gehören die RAS- und

MYC-Gene. Sie sind in einer Vielzahl von Tumoren deletiert oder amplifiziert. Die Produkte beider Gene stimulieren direkt oder indirekt die Proliferation.

RAS-Gene liegen in der Regel zu 99% in inaktiver Form vor. Mutationen in diesen Genen führen zu konstitutiv aktivierten RAS-Protein Isoformen. Die Aktivierung hat im Weiteren die Stimulation einer ganzen Anzahl von Effektorproteinen zur Folge. Über diese Proteine werden zytoplasmatische Phosphorylierungskaskaden gesteuert, die eine Modulation der Translation (Polunovsky et al., 2000), eine direkte Veränderung des Zytoskeletts (Moruta et al., 1998) und vor allem gravierende Veränderungen der Genexpression auslösen. Bereits 1989 wurde von Johannes L. Bos in einer umfassenden Studie nachgewiesen, dass in etwa 30% aller humanen Tumore Mutationen in einem der RAS-Gene auftreten (Bos, 1989). Ein mutiertes RAS-Protein, einmal aktiviert, kann nicht mehr deaktiviert werden und stimuliert so unabhängig von externen Signalen permanent die verschiedenen intrazellulären Kinasekaskaden.

Bei der „klassischen“ Translokation des „Philadelphischromosoms“ zeigte sich wieder die Wegweisung der Zytogenetik vor der molekularen Aufklärung. Im Rahmen der häufigen reziproken Translokation t(9;22) bei der chronisch myeloischen Leukämie gelang es schliesslich, ein Hybridgen zu identifizieren, das durch Fusion des *c-ABL*-Protoonkogens von #9 und des *BCR*-Gens auf #22 entsteht und so zum Onkogen wird (Chissoe et al., 1995).

2.2.3 Mutatorgene

Neben Tumorsuppressorgenen und Onkogenen wurde anhand molekulargenetischer Beobachtungen immer deutlicher, dass eine dritte Kategorie von Genen existieren muss, welche einen relevanten Einfluss auf die Tumorgenese ausüben. 1993 fand Albert de la Chapelle, Bert Vogelstein und Mitarbeiter bei Patienten mit hereditären nonpolypösen Kolonkarzinomen (HNPCC) ein Krebsgen, das nicht wie Onkogene oder Tumorsuppressorgene funktioniert, sondern bei Verlust während der Tumorentwicklung zahlreiche Fehler bei der DNA-Verdopplung zulässt. Diese genau

studierte Paarungsfehlreparatur wurde zuerst bei Bakterien, 1985 auch bei Hefen und letztlich auch beim Menschen nachgewiesen. Mutatorgene verhalten sich ähnlich wie Tumorsuppressorgene. So kommt es entsprechend zur Karzinomentwicklung, wenn bei heterozygoten Mutationsträgern das Wildtypallel durch somatische Veränderungen zusätzlich ausgeschaltet wird. Dieses zweite Ereignis vermag sich mittels Deletion, Mutation oder Methylierung des MLH1 Promotors zutragen (Kane et al., 1997, Aaltonen et al., 1993). Der Funktionsverlust des Mismatch-Reparatorsystems verursacht eine Mikrosatelliteninstabilität. Mikrosatelliten sind repetitive DNA-Sequenzen, die über das ganze Genom verteilt sind. Im Bereich dieser sich wiederholenden Sequenzen ist die DNA-Polymerase anfällig für Fehlpaarungen, die in einem Zuviel oder Zuwenig dieser Sequenzen münden. Diese Fehler werden in Tumor-DNA nicht mehr korrigiert und das Auftreten von neuen Allellängen im Tumor verglichen zum Normalgewebe, wird Mikrosatelliteninstabilität (MSI) genannt (Heinimann, 2000).

Das DNA-Reparatorsystem ist abhängig von dem Zusammenspiel zahlreicher Gene der mutS- (*hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*) und mutL- (*hMLH1*, *hMLH3*, *hPMS1*, *hPMS2*) Familie (Chung et al., 2003).

DNA-„mismatch repair“ Beeinträchtigungen führen nicht auf direktem Wege zur malignen Transformation von Neoplasien. Defekte in diesem System steigern vielmehr die Mutationsrate anderer wachstumsregulierender Gene, wie Onkogene und Tumorsuppressorgene. Die meisten Mikrosatellitenregionen sind in dem Genom auf nichtkodierenden Sequenzen sowie Introns lokalisiert, so dass davon auszugehen ist, dass Mutationen in solchen Domänen eher ohne Konsequenzen ablaufen. Trotzdem ist es auch möglich, dass innerhalb der kodierenden Bereiche eines Gens repetitive Sequenzen liegen, wodurch eine Mutation sehr wohl folgenreich sein kann. Zu diesen bisher identifizierten Genen zählen wachstumsregulierende Rezeptoren wie der transforming growth factor-receptor II oder der insulin-like growth factor II-receptor sowie Regulatoren des Zellzyklus (z.B. E2F4), Apoptoseregulatoren (z.B. BAX) und auch Mutatorgene selbst (z.B. *hMSH3* und *hMSH6*).

2.3 Pleomorphes Adenom

2.3.1 Definition des pleomorphen Adenoms

Das pleomorphe Adenom (PA) ist durch seinen vielgestaltigen histologischen Aufbau gekennzeichnet. Zwischen den epithelialen und modifizierten myoepithelialen Zellelementen sind unscharf abgegrenzte Stromaareale mit mukoider, myxoider und chondroider Differenzierung entwickelt. Die epithelialen und myoepithelialen Zellen bilden gangartige, solide oder auch „bienenschwarmartig“ angeordnete Strukturen. In 25% der Adenome liegen Plattenepithelmetaplasien vor. Je nach Stromaanteil lassen sich stromareiche und zellreiche Subtypen unterscheiden.

Eine erste pathohistologische Beschreibung des pleomorphen Adenoms stammt von Billroth aus dem Jahre 1859. Die allgemeine Bezeichnung für diesen häufigsten Speicheldrüsentumor blieb über Jahrzehnte „Mischtumor“. Erst nachdem sich aufgrund neuer histochemischer und immunhistologischer Befunde die Auffassung durchsetzte, dass die so genannten „mesenchymalen“ Matrixanteile vorwiegend auf einer Einwirkung von myoepithelialen Zellelementen beruhten, setzte sich der Terminus pleomorphes Adenom durch (Azzopardi & Smith, 1959; Hübner et al., 1971; Mylius, 1960; Thackray & Lukas, 1974). Der Begriff des pleomorphen Adenoms wurde 1960 von Willis geprägt.

2.3.2 Klinische Eigenschaften

Pleomorphe Adenome sind primär benigne epitheliale Tumore (Seifert et al., 1984) mit einer geringen Prävalenz für das weibliche Geschlecht. Die Inzidenz liegt in Europa bei etwa 1,5 pro 100 000 Einwohner. Die Tumorgroße ist sehr variabel und es zeigt sich, dass ab einer Tumorgroße über 5cm die Rezidivrate stark ansteigt und sich mit Dauer und Größe des Adenoms das Risiko der malignen Entartung erhöht. Bei einer Lokalisation in der Glandula parotis ist am häufigsten der laterale Drüsenlappen im unteren Drüsenpol betroffen.

Makroskopisch lässt sich bei dem pleomorphen Adenom meist eine dünne bindegewebige Pseudokapsel an der Oberfläche nachweisen. Inwieweit dabei eine Penetration in diese Pseudokapsel oder sogar eine Perforation derselben stattgefunden hat, kann oft erst histologisch differenziert werden. Es handelt sich hierbei nur um eine Pseudokapsel, da der Tumor lediglich bei der Größenzunahme intraparotideales Bindegewebe vor sich her schiebt und nicht über eine Kapsel im eigentlichen Sinne verfügt. Die makroskopische Schnittfläche der Tumore zeigt ein buntes Bild mit weißlich-gelben Knoten, Einblutungen, Zysten und knorpelartigen Bezirken, sowie weichen mukösen Gewebsabschnitten.

Bezüglich der Lokalisation entfallen die häufigsten pleomorphen Adenome auf die Glandula parotis (Tabelle 2-1). In einzelnen Fällen konnte ein Mehrfachvorkommen von pleomorphen Adenomen beobachtet werden. Dieses konnte in Form von gleichzeitigem Wachstum in beiden Parotiden (Norlin, 1965; Turnbull & Frazell, 1969; Weimert & Work, 1976; Sataloff et al., 1987) oder in der Glandula parotis und Glandula submandibularis (Yajin et al., 1987) stattfinden. Weiterhin scheint eine familiäre Häufung von pleomorphen Adenomen der Glandula parotis möglich zu sein (Hayter & Robertson, 1990).

Ausgangspunkt der Tumorbildung des pleomorphen Adenoms außerhalb der großen Speicheldrüsen scheint in der Regel das ortsständige Drüsengewebe der kleinen Speicheldrüsen in den Schleimhäuten, aber auch heterotropes Speicheldrüsen-gewebe zu sein. Zusätzlich konnte Lee et al. (2000) den ersten molekularen Beweis liefern, dass luminale sowie nicht luminale Zellen des pleomorphen Adenoms meist von demselben Zellklon abstammen und pleomorphe Adenome monoklonal sind (Noguchi et al., 1996).

Tabelle 2-1: Lokalisation des pleomorphen Adenoms (Speicheldrüsen-Register 1965-1994) nach Seifert (ed). Oralpathologie I: Pathologie der Speicheldrüsen. 1. Auflage 1996, Springer Verlag

Lokalisation	Häufigkeit [%]
Glandula parotis	78,3
Gaumen	5,9
Glandula submandibularis	5,8
Lippe	1,7
Wange	1,4
Glandula sublingualis	0,1
ohne exakte Angaben	6,8

2.3.3 Pathohistologie

Die Vielgestaltigkeit im feingeweblichen Aufbau beruht auf zwei Bauprinzipien: der unterschiedlichen Differenzierung von Epithelzellen und modifizierten Myoepithelzellen sowie der Menge und der Beschaffenheit des Stromas (Seifert et al., 1984; Caselitz, 1987). Der Begriff Stroma ist im eigentlichen Sinne nicht korrekt, da es von den Myoepithelzellen gebildet wird und Teil des epithelialen Tumors ist (Donath & Ußmüller, 2001). Die epithelialen und myoepithelialen Zellkomplexe bilden gangartige oder zystische Formationen und zeigen oft eine netzartige Auflockerung mit einer bienenschwarmartigen Ausbreitung ins Stroma.

Sehr selten sind Infarzierungen in pleomorphen Adenomen mit atypischen Epithelmetaplasien, die zu Verwechslungen mit malignen Tumoren führen können (Layfield et al., 1992; Allen et al., 1994; Gottschalk-Sabag & Glick, 1995). Im Gegensatz zu Karzinomen fehlen jedoch die Kriterien der Malignität wie zelluläre Atypie, invasives Wachstum oder Metastasen.

Es lassen sich in Bezug auf das Mengenverhältnis von Stroma und Epithel stromaarme und stromareiche pleomorphe Adenome unterscheiden (Seifert et al., 1976; Takeuchi et al., 1975). Seifert unterteilt hierbei in 4 Untergruppen (siehe Tabelle 2-2). Während die stromareichen pleomorphen Adenome eher zu Rezidiven

neigen (Goudot et al., 1989), weisen im Gegensatz hierzu die stromaarmen pleomorphen Adenome vermehrt eine maligne Transformation auf (Seifert et al., 1976).

Tabelle 2-2 Darstellung der histologischen Untergruppen mit ihrem entsprechenden Stromanteil nach Seifert et al. (1976b)

Histologische Untergruppe	Stromaanteil [%]
1	30- 50
2	80
3	< 30
4	6

Die Rezidivneigung ist vor allem abhängig von der Tumorgroße, der Lokalisation und bestehender Hypozellularität, aber auch von einer dünnen Kapsel, fokal fehlender Kapsel und Pseudopodien (Stennert et al., 2004).

Die Charakterisierung der primären Parotistumore basiert auf der histologischen Typisierung und der Gradeinteilung. Klassifiziert werden die Adenome der Speicheldrüsen nach der Klassifikation von Speicheldrüsentumoren der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (Seifert & Sobin, 1992).

In der 1972 erschienen WHO-Klassifikation (Thackray & Sobin, 1972) beschränkte sich die Einteilung der Speicheldrüsentumore lediglich auf zwei Hauptgruppen: pleomorphe und monomorphe Adenome. Aus weiteren klinischen Studien und dem Einsatz zusätzlicher Untersuchungsmethoden (Tumormarker, Elektronenmikroskop u.a.) ergaben sich neue Gesichtspunkte zur pathohistologischen Klassifikation der Adenome. Hinzu kam die Beobachtung, dass eine Reihe von sehr seltenen Adenomen einen so typischen morphologischen Aufbau aufweisen, dass eine exakte separate Klassifikation möglich ist (Seifert, 1992b). In der neuen WHO-Klassifikation (Seifert et al., 1991; Seifert, 1992b; Seifert & Sobin, 1992) sind daher histomorphologisch eindeutig charakterisierte Adenome unabhängig von der

Häufigkeit ihres Vorkommens als separate Adenomentitäten definiert worden (Tab. 2-3). In der revidierten WHO-Klassifikation der Speicheldrüsentumore wurde nicht nur eine getrennte Klassifikation seltener, jedoch pathohistologisch klar definierter Tumore vorgenommen, sondern auch zusätzliche Aussagen zu Prognose und Behandlung einbezogen. Diese Nomenklatur wurde von dem *Armed Forces Institute of Pathology* übernommen und bildet auch die Grundlage der Tumorklassifikation des Speicheldrüsenregisters am Institut für Pathologie der Universität Hamburg.

Tabelle 2-3: WHO-Klassifikation der Speicheldrüsentumore (Seifert und Sobin, 1992)

1. Adenome	
1.1	Pleomorphes Adenom
1.2	Myoepitheliom (myoepitheliales Adenom)
1.3	Basalzelladenom
1.4	Warthin-Tumor (Zystadenolymphom)
1.5	Onkozytom (onkozytäres Adenom)
1.6	Kanalikuläres Adenom
1.7	Talgdrüsenadenom
1.8	Duktales Papillom
1.8.1	Invertes duktales Papillom
1.8.2	Intraduktales Papillom
1.8.3	Sialadenoma papilliferum
1.9	Zystadenom
1.9.1	Papilläres Zystadenom
1.9.2	Muzinöses Zystadenom

2. Karzinome	
2.1	Azinuszellkarzinom
2.2	Mukoepidermoidkarzinom
2.3	Adenoid-zystisches Karzinom
2.4	Polymorphes low-grade Adenokarzinom (Terminales Gangadenokarzinom)
2.5	Epithelial-myoepitheliales Karzinom
2.6	Basalzell-Adenokarzinom
2.7	Talgdrüsenkarzinom
2.8	papilläres Zystadenokarzinom
2.9	Muzinöses Adenokarzinom
2.10	Onkozytäres Karzinom
2.11	Speichelgangkarzinom
2.12	Adenokarzinom
2.13	Malignes Myoepitheliom (myoepitheliales Karzinom)
2.14	Karzinom im pleomorphen Adenom (maligner Misch tumor)
2.15	Plattenepithelkarzinom
2.16	Kleinzelliges Karzinom
2.17	Undifferenziertes Karzinom
2.18	Andere Karzinome

2.3.4 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie weisen die lichtungsbegrenzenden Zellen eine Expression für Zytokeratin auf, die außen anliegenden Myoepithelzellen exprimieren sowohl Zytokeratin, Vimentin, GFAP, S-100 und Aktin. In den tubulären Zellverbänden sind verschiedene Hormonrezeptoren (Androgen-, Östrogen- und Progesteronrezeptoren, parathormonartige Proteine) nachweisbar, was als hormonabhängig interpretiert wird (Donath & Ußmüller, 2001).

2.3.5 Ätiologie und Klinik

Über die Entstehung von Speicheldrüsentumoren ist bisher wenig bekannt. Es gibt nur wenige epidemiologische Untersuchungen, die sich mit dem Auffinden von Risikofaktoren beschäftigen. Hinweise auf einen engen Zusammenhang zwischen Exposition und Tumorgenese liefern Studien über die Atombombenopfer von Hiroshima und Nagasaki, die über ein gehäuftes Auftreten von Speicheldrüsentumoren nach Kontakt mit ionisierender Strahlung berichten (Belsky et al., 1975; Saku et al. 1997). Auch die therapeutische Bestrahlung der Kopf- und Halsregion, ob im Kindes- oder Erwachsenenalter, scheint nach einer Latenzzeit zwischen 10 bis 25 Jahren die Gefahr der Entstehung von benignen oder malignen Speicheldrüsentumoren zu erhöhen (Spitz et al., 1984). Des Weiteren zeichnete sich ein vermehrtes Auftreten von Speicheldrüsenkarzinomen bei Arbeitern der gummi- und kautschukverarbeitenden Industrie ab (Donath & Ußmüller, 2001). Als weitere exogene Faktoren werden Blei und Asbest, virale Faktoren, Hormoneinwirkungen und genetische Faktoren diskutiert. Im Rahmen der viralen Faktoren konnte bisher keine Studie eine vermutete CMV- bzw. EBV-Infektion als ätiologische Rolle der PA-Tumorgenese stützen. Keine Beziehungen bestehen bisher zwischen der Tumorneogenese in den Speicheldrüsen und Alkohol, Nikotin, vorausgegangenen Entzündungen, Gangobstruktionen oder traumatischen Schäden. (Tsai et al., 1996; Saku et al., 1997; Donath & Ußmüller, 2001; Laane et al., 2002). Neueste Studien zeigen, dass das Simian Virus 40 (SV 40) vermutlich als Kofaktor in der Entstehung

und Progression von pleomorphen Adenomen fungiert. Das Virus bindet und inaktiviert hierbei die Produkte der Tumorsuppressorgene p53 (Montenarh et al., 1985) und pRb sowie die Koaktivator-Faktoren p300 und p400. Somit stellt das pleomorphe Adenom den siebten SV 40-positiven menschlichen Tumor neben Hirn- und Knochentumoren, malignen pleuralen Mesotheliomen, Schilddrüsenkarzinomen, Hypophysenadenomen und lymphoproliferativen Störungen dar (Martinelli et al., 2002).

Ein weiteres Phänomen der pleomorphen Adenome entdeckte sowohl Mitelman et al. (1985) als auch Bullerdiek et al. (1988). Beiden fiel ein bemerkenswerter geographischer Unterschied in der Frequenz bestimmter Karyotypen pleomorpher Adenome auf. Man nimmt an, dass hierfür verschiedene onkogene Substanzen mit ungleicher geographischer Verteilung als Erklärung dienen könnten. So scheinen pleomorphe Adenome mit normalem Karyotyp vor allem in und in der Nähe von großen Städten vorzukommen. Damit stellt das pleomorphe Adenom neben dem Burkitt Lymphom und dem Meningeom eines der ersten soliden Tumore mit geographischer Karyotypheterogenität dar (Mitelman, 1985; Bullerdiek et al., 1988; Bullerdiek et al., 1989; Bullerdiek et al., 1993).

Benigne Tumore wie das pleomorphe Adenom der Glandula parotis imponieren in der Regel als schmerzlose langsam wachsende Geschwulste mit einer zum Normalgewebe abgrenzenden Kapsel. Palpatorisch sind die Knoten derb und indolent. Weitere Symptome ergeben sich lediglich bei stark fortgeschrittenem Tumorprozess durch Verdrängen und Abdrücken von Strukturen, wie zum Beispiel des Nervus facialis mit Parästhesien im Wangen- und Ohrbereich. Nach zehn bis fünfzehn Jahren können PA maligne entarten. Der klinische Verdacht auf einen malignen Prozess erhärtet sich bei schneller Größenzunahme, Störungen der Funktion des Nervus facialis, Hautbeteiligung sowie einer Lymphadenopathie der Halsregion.

2.3.6 Diagnostik

Die Ultraschalluntersuchung stellt in der bildgebenden Primärdiagnostik von gutartigen Parotistumoren den Goldstandard dar und ist diagnostisch häufig ausreichend zur Therapieplanung (Preuss et al., 2006). Bis zu 84% der Adenome können aufgrund der Merkmale polyzyklische bis ovale Form, deutliche Abgrenzung zum Gewebe und fehlende zystische Areale richtig als PA zugeordnet werden (Bialek et al., 2003). Häufig wird neben der Primärdiagnostik eine Magnetresonanztomographie (MRT) oder eine Computertomographie (CT) durchgeführt. Die diagnostische Wertigkeit dieser kostenintensiven Verfahren ist umstritten, da sie keine höhere Sensitivität und Spezifität aufweisen als die Sonographie. Die Hauptindikation für diese radiologischen Untersuchungsmethoden besteht bei Tumoren, die sich in der Tiefe der Parotislappen oder im Parapharyngealraum (Eisbergtumor) befinden. Eine für den Operateur wichtige Zuordnung zum Innen- oder Außenlappen ist häufig mit dem MRT oder CT nicht möglich. Zur Bildgebung von klinisch bösartigen Befunden werden meist sowohl Ultraschall als auch das MRT eingesetzt. Nach Habermann et al. (2005) erscheint die diffusionsgewichtete echoplanare MRT eine Differenzierung zwischen benignen und malignen Läsionen bei bis zu 95% der Tumoren der Glandula parotis möglich zu machen. Ein MRT ist außerdem bezüglich der Beurteilung der Tumorausdehnung dem CT überlegen. Ein CT ist dann vorzuziehen, wenn eine Kontraindikation für eine MRT besteht oder die Klärung einer möglichen Knocheninfiltration wichtig erscheint. Die Feinnadelpunktion (FNP) zur präoperativen Diagnosesicherung ist eine häufig genutzte, jedoch teilweise auch kritisch angesehene, zusätzliche Diagnostik. Die Qualität der FNP hängt jedoch entscheidend von einem zytologisch versierten Pathologen ab, der in der Regel nur in großen Zentren zur Verfügung steht. Zudem wird die Möglichkeit der Tumorstreuung durch die Punktion von einigen Operateuren negativ bewertet.

Zur Stadieneinteilung eines malignen Tumors zählen in der Regel eine Röntgen-Thorax Untersuchung und Sonographie des Halses sowie des Abdomens.

Intraoperativ kann eine erste histopathologische Beurteilung durch eine Schnellschnittuntersuchung erfolgen. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass die Kombination von FNP und intraoperativem Schnellschnitt eine diagnostische Vorhersage von höherer Sensitivität und Spezifität ermöglicht als eines dieser Verfahren allein.

2.3.7 Therapie

Über die chirurgische Therapie des pleomorphen Adenoms herrscht weiterhin eine große Debatte, welche sich vor allem durch die Rezidivgefahr des pleomorphen Adenoms ergibt. Patey und Thackrey zeigten 1958, dass pleomorphe Adenome - insbesondere zellarme und stromareiche Subtypen - nur eine dünne Kapsel besitzen, die häufig auch unterbrochen ist und somit Tumorzapfen in das umgebende Gewebe hineinragen können (Patey & Thackrey, 1958). Daraufhin entwickelte Hamilton Bailey 1941 die Technik der oberflächlichen, sogenannten lateralen Parotidektomie, welche international als Therapie der Wahl übernommen wurde, um Rezidive zu vermeiden. Hierbei wird der lateral des N. facialis gelegene Drüsenanteil vollständig entfernt.

Der Chirurg Alan Nicholson vertrat hingegen die Ansicht, dass Rezidive sich vielmehr aufgrund von inadäquater Vorgehensweise während der Operation mit Beschädigung des Tumors ereignen, als dass sie vom Tumor selbst ausgehen (Mc Gurk 2004). Er favorisierte die Methode der lokalen Tumordissektion mit großem Operationszugang. Seine Daten zeigten über eine fünfzehnjährige Periode, dass die Rezidivrate dieser Methode mit 2% nicht höher lag, als bei der konventionellen lateralen Parotidektomie und 70% der Patienten mit kleinen Parotisgeschwulsten eine laterale Parotidektomie umgehen konnten.

Heute gilt prinzipiell als oberstes Prinzip der Operation die Tumorkapsel nicht zu verletzen und einen ausreichenden Sicherheitsabstand zum Tumor einzuhalten, um eine Tumorsaart und damit auch ein Rezidiv vorzubeugen. Ist es zu einer Aussaat von Zellkomplexen gekommen, so kann es zum Teil zu einer miliar ähnlichen Aussaat in

die gesamten Gesichts- und Weichteile kommen (Stennert et al., 2001). Als Standardeingriff bei der Behandlung von gutartigen Tumoren im Außenlappen der Ohrspeicheldrüse wird die laterale Parotidektomie angesehen. Alternativ kann auch eine partielle laterale Parotidektomie durchgeführt werden, bei der nur der tumortragende Anteil des oberflächlichen Drüsenlappens reseziert wird. Diese Technik erlaubt eine sichere Entfernung des pleomorphen Adenoms bei geringer postoperativer Morbidität. Eine Enukleation wird heute von den meisten Autoren wegen der Kenntnis, dass Tumorzapfen auch durch Lücken der dünnen Tumorkapsel in das umgebende Gewebe reichen können, als kontraindiziert angesehen. Bei Festhalten einiger Operateure an der Enukleation, wird mindestens eine perikapsuläre Enukleation vorgeschlagen, wobei ein schmaler Saum von Drüsenparenchym um die Kapsel verbleibt, und/oder eine kapselnahe Präparation unter dem Operationsmikroskop vorgenommen wird.

2.3.8 Chromosomale und molekulare Veränderungen der pleomorphen Adenome

Das pleomorphe Adenom ist in Bezug auf genetische Veränderungen der am intensivsten untersuchte benigne Speicheldrüsentumor. Dies liegt in erster Linie daran, dass er mit knapp 50% den häufigsten Tumor aller Speicheldrüsentumore ausmacht. Das Hauptaugenmerk aller Studien richtet sich vor allem auf die Entstehung des pleomorphen Adenoms und die mögliche maligne Transformation. Als universelles Modell für letzteres gilt das Karzinom im pleomorphen Adenom. Denn hier liegen sowohl maligne als auch benigne adenomatöse Tumorkomponenten nebeneinander vor. Weiterhin weisen manche Karzinome eine Übergangszone auf, in welcher die Zellen Merkmale mit Mischformen der benignen als auch der malignen Komponenten aufweisen. Die ersten Chromosomenanalysen zur Erforschung primärer gemischter Speicheldrüsentumore wurden 1973 von Scappaticci et al. durchgeführt. Die hierbei detektierten numerischen und strukturellen Aberrationen konnten aufgrund von ungebänderten Präparaten allerdings nicht genau definiert werden (Scappaticci et al., 1973).

Mark et al. berichtete erstmals 1982 über gebänderte Metaphasepräparate, die wiederholt in pleomorphen Adenome auffielen und meistens strukturelle Aberrationen von 8q12 in Form der Translokation $t(3;8)(p21;q12)$ darstellten. Daneben sind mindestens 13 weitere Translokationspartner bekannt (Mark et al., 1982; Bullerdieck et al., 1987 und 1987b). Die 8q12-Region ist nachweislich in eine Vielzahl komplexer Rearrangements einbezogen, die unter anderem zu dizentrischen Chromosomen führen. Auch Mikrosatelliteninstabilitäten an multiplen Loci sind im Rahmen von LOH 8q mit 36% bis 47% hervorzuheben (Gillenwater et al., 1997; El-Naggar et al., 1997).

Weitere Veränderungen des Chromosoms 8 zeigten sich in der Deletion mit Bruchpunkten zwischen 8q12 und 8q21-q23 sowie LOH der chromosomalen Region 8q24-qter (Sahlin et al., 1995; Jin et al., 2001). Zudem ist die Trisomie des Chromosoms 8 die bekannteste numerische Chromosomenaberration in Speicheldrüsentumoren (Martins et al., 2005).

Damit stellen pleomorphe Adenome, neben den Meningeomen mit einem häufigem Chromosom 22 Verlust, die zweite Art von benignen Tumoren dar, welche eine definierte chromosomale Veränderung aufweisen (Zang & Singer, 1967).

Eine weitere wichtige zytogenetische Subgruppe stellen PA mit unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen des Chromosomenabschnittes 12q13-q15 dar (Bullerdieck et al., 1987; Schoenmakers et al., 1994; Kools et al., 1995; Wanschura et al., 1996). Hierbei wird $t(9;12)(p21;q14-15)$ bereits als Standardtranslokation angesehen, aber auch sporadische Translokationen mit verschiedenen anderen Chromosomen sind bekannt. In seltenen Fällen konnten PA mit *double minutes* (dmin) und Deletion der 12q13-q15 Region ausgemacht werden, wobei sich diese dmin vermutlich aus der Deletion entwickelt haben (Sandros et al., 1989).

Zugewinne sowie Amplifikationen von 12q13.3-q21.1 weisen auf Kandidatengene wie den p53-Modulator MDM2, die Serin/Thyreonin Proteinkinase CDK4 und den Transkriptionsfaktor HMGA2 sowie HMGIC, c-int-1 auf 12q12-q13 oder c-gli auf 12q13-q14.3 hin (Francioso et al., 2002).

Neben dem PA existieren mit dem Lipom, dem myxoiden Liposarkom und dem Leiomyosarkom noch weitere mesenchymale Tumore, die eine Involvierung der

12q13-q15 Region aufweisen. Diese Genexpression kann möglicherweise als Unterscheidungsmerkmal für die epitheliale und mesenchymale Differenzierung herangezogen werden (Röser & Löning, 2001). HMGIC- (high mobility group protein) Rearrangements sind in diesen benignen soliden Tumoren regelmäßig anzutreffen. Die HMGIC-Gene sind als Transkriptionsfaktoren in Mechanismen der Genexpression, Zellproliferationskontrolle und -entwicklung sowie Neoplasietransformation verwickelt (Kurose et al., 2001). Im Unterschied zu pleomorphen Adenomen finden sich bei HMGIC-Rearrangements jedoch stets auch chromosomale Aberrationen an 6p21-p23, die das HMGIIY-Gen einbeziehen. Ein solches Ereignis konnte trotz bekannter Chromosomenanomalien auf 6p21-p23 weder von Rohen et al. noch Williams et al. (Rohen et al., 1999; Williams, 1980) bei PA nachgewiesen werden, so dass diese Region ein weiteres wichtiges Kandidatengen beinhalten muss und pleomorphe Adenome die erste einzige Ausnahme dieses spezifischen Co-Rearrangements bildet. Ein putativer Fusionspartner des HMGIC-Gens in PA wurde von Geurts et al. (1997) mit 3p14.2 und dem auf dieser Region identifizierten FHIT-Gen sowie NFIB gefunden (Stenman, 2005). Inwiefern diese HMGIC/FHIT-Transkription eine Rolle in der Tumorassoziation benigner Tumore spielt, bleibt abzuwarten (Geurts et al., 1997). NFI Proteine sind an der transkriptionellen Regulation einer Vielzahl an viralen und zellulären Gene beteiligt.

Eine gesteigerte MDM2-Expression konnte neben malignen Speicheldrüsentumoren auch in geringem Ausmaß in PA ermittelt werden. MDM2 agiert als Onkogen, dessen Genprodukt, ein Phosphoprotein, den Zellzyklus, die Apoptose sowie die DNA-Reparatur kontrolliert. Zur Regulation der Zellteilung zeigt es eine Interaktion mit anderen Zellregulatoren wie die Tumorsuppressorgene pRb, p53 und die Transkriptionsfaktoren E2F1/DP1, TFIID und TATA-bindende Proteine. p53 induziert die MDM2-Transkription, welche wiederum zu einer Inaktivierung von p53 führt, so dass bei gestörter Feedbackregulation MDM2 im Nukleus akkumuliert und p53 weiter supprimiert und die E2F1-abhängige Apoptose inhibiert. Dieser Mechanismus wird als wichtiger Schritt in der Tumorgenese von Speicheldrüsentumoren interpretiert (Schlott et al., 2001).

Bullerdieck et al. (1993) schlug anhand der häufigen Chromosom 8 und 12 Rearrangements eine Einteilung der pleomorphen Adenome in drei Hauptgruppen vor:

- PA mit normalem Karyotyp
- PA mit Rearrangements auf dem Chromosomenabschnitt 8q12
- PA mit 12q13-q15-Rearrangements.

Verschiedene Studien interpretierten die Rolle von Chromosom 8 und 12 bei der Tumorentwicklung mit der Hypothese, dass mit Veränderungen auf dem langen Arm von Chromosom 8 wohl ein wichtiger früher Schritt in der Tumorgenese des PA gefunden wurde und Zellen von PA mit Allelverlust auf 12q bereits das Potential zur malignen Transformation besitzen. Eine andere Hypothese besagt, dass pleomorphe Adenome stets mit einem normalen Karyotyp ausgestattet sind und chromosomale Veränderungen auf den Chromosomen 8 und 12 bereits auf eine Tumorprogression mit gesteigerter Proliferationsrate hindeuten (Mark et al., 1982; Stenman, 1983). Bullerdieck et al. (1989) indessen postulierte, dass die von ihm aufgestellten Hauptgruppen drei völlig unterschiedliche Entitäten wiedergeben, und sie sich entweder aus einem normalen Karyotyp oder einer der spezifischen strukturellen Veränderungen heraus entwickeln. Interessanterweise wiesen auch Sandros und Mitarbeiter (1989) darauf hin, dass Chromosom 12q Anomalien bisher nie zusammen mit strukturellen 3p oder 8q Rearrangements auftraten (Sandros et al., 1989).

Eine weitere Untergruppe neben 8q12 und 12q13-q15 scheint sich immer mehr in Verbindung mit Deletionen des Chromosoms 3 hervorzuheben. Diese Verluste resultieren meist als Folge reziproker Translokationen, die die Region 3p21 oder seltener 3q21-q27 einbeziehen und sind vermutlich an der Tumorprogression pleomorpher Adenome beteiligt (Sahlin et al., 1994). Diesen oben genannten Bereichen konnten Kandidatengene wie c-erbA-2 auf 3p21-pter und c-raf auf 3p35 zugeordnet werden. Weitere Tumore mit LOH 3p11-p23 wurden bereits in

verschiedenen differenzierten Lungenkarzinomen sowie sporadischen und hereditären Nierenzellkarzinomen ausgemacht.

Weitere Translokationen zeigten sich an den Chromosomen 6, 9 sowie 10 und auch sporadische Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 5 (5p13) mit dem Genlokus für PLAG1 wurden beschrieben (Jin et al., 2001; Roijer et al., 2002; Poetsch et al., 2005; Johns III et al., 1996). Des Weiteren zeigten sich Zugewinne in Regionen auf den Chromosomen 13 und 15 (Takashi et al., 2002; Di Palma et al., 2007) sowie LOH auf 6q, 8q, 9p, 12q und 17p sowohl in den epithelialen als auch den mesenchymalen Komponenten (Poetsch et al., 2005). Hier sind besonders die mit Chromosomenanomalien auf Chromosom 17 einhergehenden biologischen Mechanismen von p53 oder Her-2/neu hervorzuheben, welche in dem nachfolgenden Kapitel näher erläutert werden. Im geringen Ausmaß zeigten sich auch bezüglich des Chromosoms 6 (6p21-p23) strukturelle Veränderungen und mit 9q, 10p, 14q, 16p, 19q, 21q und 22q konnten weitere Chromosomenabnormalitäten nachgewiesen werden (Mark et al., 1996; Johns III et al., 1996). Götte et al. (2005) fanden in ihrer Dual FISH-Analyse an elf pleomorphen Adenomen zusammenfassend eine wiederholte Monosomie der Chromosomen 7, 11, 17 und 18 sowie eine Polysomie der Chromosomen 3, 9 und 17.

Zahlreiche Untersuchungen der zytogenetischen Abnormitäten des Chromosoms 8 führten zu der Detektion des putativen pleomorphen Adenom Gens (PLAG1), welches bisher bezogen auf alle Speicheldrüsentumore fast ausschließlich im pleomorphen Adenom vorgefunden werden konnte. PLAG1 stellt ein weiteres Mitglied der großen Familie der Zinkfingerproteine dar und es werden ihm zahlreiche Funktionen zugeschrieben. Es fungiert über direkte DNA-Bindung als Transkriptionsfaktor, stellt ein Protoonkogen dar, bindet und aktiviert Promotorregionen verschiedener Gene, um deren Expression zu erhöhen (z.B. positive Regulation des *insulin-like growth factor II* (IGF-II), *cytokine-like factor 1* (CLF-1) und BPGF-1). Zudem kann sich PLAG1 im Rahmen der Translokation t(5;8)(13;q12) der Promotorregion seines Translokationspartners, wie des *leukemia inhibitory factor*

receptors (LIFR), bedienen und vermutlich hierdurch über verstärkte Expression der Zielgene zur Tumorgenese beitragen (Voz et al., 2000 a,b und 2004).

Ein weiteres Protoonkogen wurde mit *c-mos* unter anderen von Caubet et al. (1985) korrekterweise auf 8q11 lokalisiert, nachdem einige Jahre zunächst 8q22 als regionale Lokalisation ausgemacht wurde. Aufgrund der Tatsache, dass der Chromosomenabschnitt 8q11 in zahlreichen PA strukturelle oder molekulare Veränderungen aufweist und das *c-mos*-Gen mit genau dieser Bande übereinkommt, wird davon ausgegangen, dass bei einer Beteiligung von *c-mos* ein weiterer wichtiger Beitrag zur malignen Transformation gefunden wurde (Caubet et al., 1985). Die Beteiligung von *c-mos* wird allerdings kontrovers beurteilt, denn andere Studien zeigen keinen Nachweis von *c-mos* (Rommel et al., 1990).

Weitere molekulare Veränderungen mit Aktivierung von *c-myc* und *ras p21* Protoonkogenen sowie *c-mos* und *c-erbB-2* scheinen eine wichtige Rolle in der malignen Transformation von PA zu spielen (Deguchi et al., 1993; Yamamoto et al., 1996). Dabei präsentiert sich regelmäßig ein Zusammenhang zwischen Mutationen auf Chromosom 8q12 mit einer hohen Expression von *p21*. Dies legt die Vermutung nahe, dass Gene auf der 8q12-Bande an der Regulation der *ras*-Genexpression beteiligt sein könnten (Sandros et al., 1989). Weitere Tumore mit gesteigerter *ras*-Genexpression lassen sich in Adenomen des Kolons und der Schilddrüse sowie in prämaligen Läsionen der Blase finden. Somit erscheint eine starke *p21*-Expression nicht nur relevant für die Entwicklung und Progression von malignen Tumoren zu sein, sondern auch im Rahmen der benignen Tumorgenese eine wichtige Rolle einzunehmen.

Etges und Mitarbeiter (2004) konnten aufzeigen, dass sowohl benigne als auch maligne Speicheldrüsentumore Proteine des Retinoblastomsignalwegs exprimieren. Darunter fallen Proteine wie Cyklin D1, *cyclin-dependent kinase* (CDK)-4, das Retinoblastomprotein (*pRb/p105*) und der Transkriptionsfaktor E2F1 (Etges et al., 2004). Entscheidend für die Pathogenese und Progression von Speicheldrüsentumoren einschließlich PA scheint auch das Gen *pRb2/p130* aus der Retinoblastomfamilie auf 16q12.2 zu sein (Russo et al., 2005).

Ein weiterer Zugewinn von einer 3,5Mb Region ist auf 13q34 zu finden. Diese genreiche Region beinhaltet wichtige Kandidatengene wie die GTPase rho guanine nucleotide exchange factor 7 (ARHGEF7), die Transkriptionsfaktoren *SRY-related HMG-box gene 1* (SOX1) und Transkriptionsfaktor Dp-1 (TFDP1), *lysosomal-associated membrane protein 1* (LAMP1), die *Serin/Threonin Kinase G-protein coupled receptor kinase 1* (GRK1), das Zellzyklus bezogene *growth arrest-specific 6* (GAS6) und mit Cullin 4A (CUL4A) ein Gen, welches in Zusammenhang mit dem Ubiquitin-Konjugationssystem steht.

LOH auf 7q zeigte sich ebenfalls wiederholt in PA. Eine genaue Genlokalisierung ist bisher nicht gelungen, aber allein die Tatsache, dass das Vorhandensein einer Vielzahl an Tumorsuppressorgenen auf 7q31.3 bei Prostata-, Mamma- und Kopfhalskarzinomen angenommen wird, legt eine Beteiligung dieser Gene an der Tumorentwicklung und -progression nahe.

2.4 Untersuchte Chromosomen mit möglichen Kandidatengenen

Chromosomale Rearrangements werden oft in menschlichen Tumoren gefunden. Alle Methoden zur Identifizierung von Krankheitsgenen führen zunächst zu Kandidatengenen, die dann weiter getestet werden müssen, ob sie mit der untersuchten Krankheit tatsächlich zusammenhängen. Wenn das Kandidatengen derselben chromosomalen Teilregion zuzuordnen ist wie das Krankheitsgen, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden identisch sind. Derartige positionsabhängige Kandidatengenvorfahren haben sich z.B. bei der Erforschung der Alzheimerkrankheit (betroffenes Gen: apoE), des familiären Melanoms [betroffenes Gen p16; (Serrano et al., 1993; Kamp et al., 1994; Nobori et al., 1994)] und des hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinoms (betroffene Gene: hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2) als sehr wertvoll erwiesen.

In dem folgenden Kapitel werden die in unserer Studie untersuchten Chromosomen X und 17 sowie die chromosomale Region 16p mit ihren möglichen Kandidatengenen näher erläutert.

2.4.1 Chromosom X

Charakteristisch für das X Chromosom sind seine genarmen Regionen. Es setzt sich vor allem aus sich wiederholenden DNA-Segmenten zusammen, welche weder für Proteine kodieren, noch andere Funktionsgene darstellen. Nur 1,7% des gesamten Chromosoms stellt einen Kode für Funktionsproteine dar. Diese Abschnitte sind verglichen mit der üblichen Genlänge der menschlichen Proteine nur sehr kurz. Man schätzt, dass davon ca. 10% der sogenannten Gruppe der „CT“-Gene angehören. „CT“ benennt die Gruppe der Gene, welche für Marker codieren, die man sowohl in Tumorzellen (C = Cancer) als auch im menschlichen Testis (T) findet. Diese CT-Gene des X Chromosoms stellen ca. 90% der CT-Gene des gesamten menschlichen Genoms dar.

Lyon stellte bereits 1961 die Hypothese auf, dass eines der beiden X-Chromosomen in Säugetieren fast ausschließlich inaktiviert vorliegt. Beim Menschen ist die X Chromosominaktivierung zufällig und wird an die nachfolgenden Zellen weiter vererbt, so dass die meisten Frauen Mosaik in ihrer Zellpopulation aufweisen, in denen das mütterliche oder väterliche X Chromosom inaktiv ist (Migeon, 1993). Therman and Patau (1974) führten erstmals das Konzept eines Inaktivierungszentrums auf dem inaktivierten X Chromosom ein (XIC). Einige Jahre später sahen Ballabio und Willard (1992) in dem XIST-Lokus einen wichtigen Regulator innerhalb des XIC mit Beteiligung bei der Chromosom X Inaktivierung. Auch Migeon (1993) konnte nachweisen, dass mit Fehlen einer XIST Transkription in X-Ringchromosomen die Inaktivierung eines der X Chromosomen ausbleibt. Die Rolle des X Chromosoms in der Karzinogenese bleibt weiterhin unklar. Probleme ergeben sich jedoch in jedem Fall, wenn durch Chromosom X-Inaktivierung Mutationen zu einem Wachstumsvorteil dieser Zellen führen. Da das X Chromosom im Gegensatz

zu den Autosomen funktionell zum Großteil als Monosomie vorliegt, bedeutet der Wegfall eines weiblichen Geschlechtschromosoms eine 50%ige Wahrscheinlichkeit, dass durch fehlende Kompensation komplette Genfunktionen ausfallen. Der Verlust eines gesamten X Chromosoms wurde bereits in zahlreichen Tumoren beschrieben. Nondisjunction als Mechanismus scheidet meist aus, da nicht das gesamte Chromosom, sondern nur Teile verloren gehen. Als Beispiel sei hier LOH von DXS538 bei 40% der Ovarialkarzinomen (Osborne & Leech, 1994) und LOH DXS3 und DXS94 bei 25% der Zervixkarzinome (Mitra et al., 1994) genannt.

Bisher sind für das X Chromosom keine definitiven Tumorsuppressorgene bekannt. LOH Studien über Ovarial-, Endometrium-, Cervix- und Mammakarzinome sowie Nierenonkozytome weisen jedoch auf mögliche Tumorsuppressorgene in den chromosomalen Regionen Xp11-p12, Xq12, Xq25-q26 und Xq28 hin (Knuutila et al., 1999). Häufig auftretende Chromosom X-Rearrangements werden in einigen Tumoren beobachtet: Xp11 in Synovialkarzinomen und papillären Nierenzellkarzinomen, Xq13 bei akuten lymphatischen Leukämie, Xq26 in zementoossifizierenden Fibromen und Xq28 bei der prolymphatischen T- Zell Leukämie sowie Xq13 bei der sideroblastischen Anämie (de Leeuw et al., 1994; Sinke et al., 1993; Dewald et al., 1989; Corral, 1989; Sawyer, 1995).

Hwang und Mitarbeiter (2002) zeigten, dass p27Kip1, ein Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor, in vielen Tumoren vermindert exprimiert wird. Im Rahmen der Untersuchungen mit dem Moloney murine Leukämievirus wurde versucht Kandidatenonkogene zu finden, welche mit dem Verlust von p27 kollaborieren. Es fanden sich zahlreiche mutmaßliche Protoonkogene, wobei sich unter anderem mit Xpc11 ein Genloci auf Xq26 fand, welches als Kandidatenonkogen die Expression von p27 vermindert.

Inwiefern LOH des inaktiven X Chromosoms einschließlich LOH des Androgenrezeptor-Lokus auf Xq11-12 mit der Tumorgenese zusammenhängt, konnte Cheng et al. (2004) nicht feststellen. Mehrere Studien zeigten jedoch LOH des Androgenrezeptors in mehreren menschlichen Tumoren und die Daten sprechen für die Lokalisation eines Kandidatengens auf Xq11-q12, dessen Funktion für die

Kontrolle des Zellwachstums wichtig zu sein scheint (Cheng et al., 2004; Cheng et al., 1996; D'Adda et al., 1999).

2.4.2 Chromosom 17 und die Kandidatengene p53 und Her2neu

Chromosom 17 beherbergt bekannte tumorassoziierte Gene, wie z.B. p53 und Her2neu. In den späten Siebzigern wurde p53 erstmals entdeckt (Linzer et al., 1979; de Leo, 1979). p53 auf 17p13.1 codiert ein 53kD nukleäres Phosphoprotein und stellt ein Tumorsuppressorgen dar. Mutationen, die in der Regel in Form von genetischen und epigenetischen Sequenzveränderungen (Transversion, Deletion, Punktmutation, Allelverlust, Desaminierung, Methylierung) des p53-Gens oder Störungen in dessen Proteinfaltung stattfinden, sind entscheidend für die Pathogenese menschlicher Tumore (Park et al., 2003). Hierunter sind vor allem folgende drei Mechanismen von Bedeutung, die über den Funktionsverlust der p53-Proteine zu einer Inaktivierung des p53-Signalwegs führen: Mutation und/oder Deletion des p53-Gens, MDM2 Genamplifikation oder Inaktivierung des ARF Proteins (Raybaud et al., 2003). Bei vielen Mutationen ist p53 nicht mehr in der Lage, an seiner DNA-Konsensusregion zu binden, was zu einem Verlust der Tumorsuppressorfunktion führt. Es entstehen funktionsveränderte oder funktionslose Proteine, die im Nukleus akkumulieren (Ohki et al., 2001). Viele Tumore, wie die des Kolons, des Gehirns, der Blase, Brust und Lunge, weisen LOH von 17p auf und diese Abnormität scheint mit der malignen Potenz eines Tumors einherzugehen. Als Transkriptionsfaktor vieler Gene ist p53 in Apoptoseprogramme, bei dem Altern und bei Reparaturmechanismen verwickelt. p53 reguliert den Zellzyklus vor allem an dem Übergang von G0 zu G1 und ist folglich essentiell für die Zellproliferation. Sobald DNA-Schäden auftreten, sorgt regulär funktionierendes p53 für einen Replikationsstop und leitet bei ausbleibender oder unvollkommener Reparatur die Apoptose der betroffenen Zelle ein. Zellen mit inaktiviertem p53 hingegen entgehen diesem Apoptosezyklus mit geschädigter DNA und geben diese Schäden an ihre Tochterzellen weiter, so dass genetische Mutationen akkumulieren und zu einer Selektion eines neoplastischen Zellklons führen können

(Kärjä et al., 1997). Mutationen können dabei sowohl in somatischen Zellen als auch in Keimzellen stattfinden, wie zum Beispiel bei Patienten mit dem Li-Fraumeni Syndrom, die durch die vererbte Inaktivierung eines p53 Allels mit erhöhtem Maße zur Tumorentwicklung neigen (Stanbridge, 1990; Montenarh, 1995; Ohtaké et al., 2002; Lowe et al., 2004).

Her-2/neu, auch c-erbB-2 genannt, ist auf 17q12-q21.32 lokalisiert und ist an der Kontrolle des Zellwachstums und an der Entwicklung beteiligt (Skálová et al., 2003). Dieses Protoonkogen zählt zu der Familie der c-erb-Onkogene zusammen mit epidermal growth factor Rezeptoren (EGFR (erbB1)), erbB3 und erbB4 (Earp et al., 1995; Hynes, 1996; Ménard et al., 2000). Diese transmembranöse 185-kDA Tyrosinkinase Rezeptoren binden zahlreiche EGF-Liganden, die zu einer Heterodimerisierung, Autophosphorylierung und Rezeptoraktivierung führen (Graus-Porta et al., 1997; Pinkas-Kramarski et al., 1997; Tzahar et al., 1996). Mutationen können zu einer Her-2/neu Amplifikation und somit zu dessen Aktivierung führen. Die Genamplifikation führt zu einer gesteigerten RNA- und Proteinsynthese und verhilft den Zellen dadurch zu einem Wachstumsvorteil (Harari & Yarden, 2000).

Amplifikation und/oder Überexpression von Her-2/neu in menschlichem Tumorgewebe ist verbunden mit einer schlechten Prognose bei Ovarial-, Endometrium-, Mamma- und wahrscheinlich auch Speicheldrüsenkarzinomen (Press et al., 1994) unabhängig von Lokalisation, Tumorgröße, Tumorgrad und Lymphknotenstatus. Her-2/neu spielt vermutlich eine wichtige Rolle in der neoplastischen Transformation und Tumorprogression und scheint auch als nützlicher Marker der malignen Transformation pleomorpher Adenome zu dienen (Skálová et al., 2003).

Molekulargenetische Untersuchungen dieser beiden Gene haben zunächst noch keinen klinischen Nutzen, aber die Kenntnis des biologischen Verhaltens von p53 und Her-2/neu helfen, die molekularen Mechanismen der Tumorentwicklung und -progression zu verstehen.

2.4.3 Chromosomale Region 16p

Bisher kann in der internationalen Literatur nur eine begrenzte Datenlage über den kurzen Arm von Chromosom 16 (16p) und dessen Einfluss auf Krebserkrankungen ausgemacht werden. Die meisten molekulargenetischen Veränderungen in Hinblick auf das Chromosom 16, welche einen Beitrag zur Entstehung von Neoplasien liefern, liegen Mutationen des langen Arms (16q) zugrunde. Genetische Veränderungen, die hingegen den kurzen Arm des Chromosoms 16 betreffen, scheinen meist im Rahmen genetischer Syndrome aufzutreten. Einige Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen mentaler Retardierung sowie Dysmorphien und der Deletion des Chromosomabschnittes 16p. So zum Beispiel gesehen bei Autismus, Retardierung im Rahmen der Alpha- Thalassämie, juveniler neuronaler Ceroid-Lipofuszinose und dem Rubinstein-Taybi Syndrom (Ullmann et al., 2007; Harteveld et al., 2007; Lerner et al., 1994; Bartsch et al., 2006).

In den letzten Jahren herrscht allerdings Einigkeit darüber, dass mit der Region 16p12.3-p13.11 die Lokalisationen neuer putativer Tumorsuppressorgene gefunden wurden. Mehrere Kandidatengene wie TSC2 auf 16p13.3, UBE2I auf 16p13.1, XPF auf 16p13.2-p13.1, PIG7 auf 16p13.1, TNFRSF17 auf 16p13.1, GSTP1 auf 16p13.1 und SSI-1 auf 16p13 zeigen eine Beteiligung in der Zellzyklusregulation und Apoptose (Furuta et al., 2000). Chromosomale Aberrationen, welche 16p13.3 einbeziehen, finden sich bei perivaskulären Epitheloidzelltumoren, pankreasendokrinen Tumoren, bei dem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom und dem hepatozellulären Karzinom. LOH von 16p in anaplastischen Schilddrüsentumoren ist vermutlich verantwortlich für die Transformation eines gut differenzierten Schilddrüsentumors in ein anaplastisches Karzinom (Komoike et al., 1999; Kadota et al., 2000 und 2003). Die hepatozelluläre Karzinogenese wiederum wird unter anderen als Folge der Inaktivierung des JAB-Gens auf 16p13.3 durch genetische und epigenetische Veränderungen gesehen (Koyama et al., 1999). Eine weitere Folge des LOH 16p13.3 findet sich sowohl im hepatozellulären Karzinom als auch in PMBL (primary mediastinal B-Zell Lymphoma) infolge des Verlustes der

SOC-1 Region. Mutationen können in Form von Deletionen oder epigenetischen Veränderungen stattfinden, wie es im Fall von myeloischer Leukämie, dem Mantelzell-Lymphom und dem Myelom präsentiert wird (Melzner et al., 2006). SOC-1 ist ein Tumorsuppressorgen, der bei Funktionsverlust zur Dysregulation des transkriptionsfördernden JAK/ STAT- (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) Signalwegs führt und somit über vielzählige Onkogenkaskaden zur Tumorgenese beiträgt.

Auch Mutationen, welche große Deletionen im TSC2-Gen auf 16p13.3 einschließen, weisen bei Patienten mit tuberösen Sklerose oder Astrozytomen auf dessen Rolle als Tumorsuppressorgen hin (Knuutila et al., 1999, Gutmann et al., 1997). Das TSC2-Genprodukt Tuberin unterdrückt das Zellwachstum und übt eine Funktion als negativer rap1-Regulator aus. Die Beeinträchtigung des rap1-Signalwegs wird im Zusammenhang mit der Gliomentstehung gesehen (Gutmann et al., 1997).

Die maligne Entwicklung der Neuroblastome hingegen basiert möglicherweise auf der Deletion von 16p12-p13 mit dem Genlokus für HNB1. HNB1 verkörpert ein Tumorsuppressorgen und seine Funktion ähnelt der des RB1-Gens, welches unter dem Kapitel Tumorsuppressorgene näher erläutert wurde (Weiss et al., 2000).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Studie ist die weiterführende genetische Charakterisierung pleomorpher Adenome. In der Literatur sind bereits zahlreiche Studien publiziert, welche ihr Hauptaugenmerk auf die bereits bekannten häufigen genetischen Aberrationen auf den chromosomalen Regionen 12q13-q15, 8q12 und 3p21 richten. Voruntersuchungen des Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg/Saar ließen mit Hilfe der CGH Methode jedoch unter anderem auch häufige Verluste auf den Chromosomen X und 17 sowie dem kurzen Arm auf Chromosom 16 erkennen. Auf diesen Ergebnissen basierend sollte im Rahmen dieser Arbeit eine FISH-Analyse an Kryostatschnitten von 21 pleomorphen Adenome durchgeführt werden, um die mittels der CGH-Methode erhaltenen Resultate zu verifizieren und die ermittelten Konsensusregionen molekularzytogenetisch weiter zu charakterisieren. Die FISH-Technik bietet den Vorteil, dass sie über ein Auflösungsvermögen weit über dem anderer zytogenetischer und molekularzytogenetischer Methoden verfügt. Weiterhin können genetische Verluste und Zugewinne bereits im Bereich von 0,5-1 kb detektiert werden und lassen somit die in anderen molekulargenetischen Untersuchungen unerkannten genetischen Veränderungen sichtbar werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten pleomorphe Adenome auf die bislang noch nicht beschriebenen genetischen Veränderungen des Chromosoms X und des Chromosomenabschnittes 16p hin untersucht werden. Ferner sollten im Zuge dieser Arbeit die bereits in anderen Studien über numerische und strukturelle Veränderungen auf Chromosom 17, Her-2/neu (17q12-q21) und p53 (17p13.1) berichteten Veränderungen in der vorliegenden Tumorentität überprüft werden.

3 Material

3.1 Gewebeproben

3.1.1 Tumorgewebe

Das zu untersuchende Gewebematerial stammte von 14 männlichen und 7 weiblichen Patienten, welche sich unter der Verdachtsdiagnose eines Parotistumors einer Operation unterzogen. Alle Gewebeproben stammen von pleomorphen Adenomen, die mittels konventioneller Parotidektomie entnommen wurden. Von der Universitätsklinik der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Homburg wurden uns Teile des Tumorresektats zur Verfügung gestellt.

Das unter klinischen Gesichtspunkten entnommene Resektat wurde im Operationsaal unter sterilen Kautelen zerteilt und unmittelbar in sterile Gefäße mit DMEM-Medium überführt. Die Größe der Proben war abhängig von der entnommenen Tumorgröße unterschiedlich, im Durchschnitt betrug sie etwa $0,5 \text{ cm}^3$. Der Hauptteil des Tumors wurde an das Pathologische Institut der Universitätsklinik Homburg zur histopathologischen Begutachtung weitergeleitet. Diese Diagnose wurde als Diagnose für das molekularzytogenetisch zu untersuchende Gewebe übernommen.

Die Gewebebiopsien wurden unverzüglich bis zur weiteren experimentellen Bearbeitung bei -196°C eingefroren. Hierzu wurden die Proben steril in ein Kunststoffcap überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -196°C gelagert.

Es wurden in die FISH-Untersuchungen nur histologisch gesicherte pleomorphe Adenome aufgenommen, die bei Vorversuchen einen optimalen Pepsinverdau mit Freilegung der Chromosomen ohne DNA-Zerstörung zeigten und die bei Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde auswertbare Ergebnisse lieferten.

3.1.2 Referenzgewebe

Zur Kontrolle der Hybridisierungseffizienz der gewählten Bedingungen und der Hybridisierungsspezifität sowie zur Bestimmung des Cut-offs wurden Lymphozytenpräparate verwendet. Diese stammten aus Blutproben von gesunden männlichen (46, XY) und weiblichen (46, XX) Spendern. Die Lymphozytenpräparate wurden nach dem laborspezifisch adaptierten Protokoll hergestellt (siehe Kap. 4.6). Als weiteres Kontrollgewebe diente gesundes Parotisgewebe, dass während einer Operation an der Glandula parotis einem männlichen Probanden entnommen wurde.

3.2 Sonden

Sonde	Sondenart	Seriennummer	Firma
Chromosom X	zenromerspezifisch	PSAT000X-R	Q-Biogene
Chromosom 16p	telomerspezifisch	PTEL16P-G	Q-Biogene
17-p53	Alphasatellit	PONC1753	Q-Biogene
17p12-Her-2/neu	Alphasatellit	PONC 1712	Q-Biogene

3.3 Geräte und Software

Gerät/Software	Firma	Typ
Mikroskop	Olympus Optical	BX 61
Objektiv	Olympus Optical	Plan Apo 60 X und 100 X; 1,40 Oil
Quecksilberlampe	Olympus Optical	USH-102DNO, EB0067 (100W, 19V)
CCD-Kamera	Metasystem	CH 250 (Kamera), CE 200 A (externe Kühlung)
Software	Metasystems	ISIS 2.5
Photometer	Eppendorf	Ultrospec 3000V

4 Methoden

4.1 Herstellung von silanisierten Objektträgern

Objektträger mit aktivierter 3-Aminopropyltriethoxy-Silan- Oberfläche unterstützen über geladene Gruppen die Bindung des Schnittpräparates. Zur Herstellung wurden gereinigte Objektträger 10 Minuten in 10% Tri-etoxy-silyl-propylamin in Aceton gewaschen. Anschließend wurden sie je 3x in 100% Aceton und Aqua dest. gespült und trocken geschüttelt. Vor dem weiteren Gebrauch mussten die Objektträger bei 50°C über Nacht trocknen.

4.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Für die Durchführung der FISH an pleomorphen Parotistumoren wurden Gefrierschnitte in Serie angefertigt. Ziel war die günstigsten Bedingungen für das Eindringen der Sonden zu schaffen, um eine maximale Signalstärke zu erreichen.

Für die Kryostatschnitte wurden die bei -196°C aufbewahrten nativen Gewebestücke auf der im Kryostatraum eingebauten Schnellkühleinrichtung eingefroren (Kryostat CM3050 S, Leica Microsystems Nussloch GmbH). Das Gewebe wurde hierzu auf einer Halterung mittels Bajonett auf der Schnellkühleinrichtung befestigt. Nach dem Durchfrieren des Gewebeblockes (je nach Größe und Dicke einige Sekunden bis Minuten) wurde der Objektisch von der Schnellkühleinrichtung genommen und an dem Objektknopf des Mikrotoms befestigt.

Nach dem Verriegeln des mit dem eingefrorenen Objekt versehenen Objektisches am Objektknopf des Rotationsmikrotoms, wurde zunächst der Messerblock per Schnellverstellung bis nahe an die Objektspitze herangebracht und durch Links-schwenken des Hebels arretiert. Nun erfolgte das Anschneiden mittels Grobtrieb.

Nach Erreichen einer gleichmäßigen Schnittoberfläche wurde je nach Beschaffenheit des Gewebes die gewünschte Schnittdicke von ca. 6µm eingestellt. Während dieses Vorganges war der Schnittstrecker zum Messer hingeklappt, um eine Stauchung der Kryostatschnitte zu vermeiden. Zur Schnittabnahme wurde der Schnittstrecker zunächst vom Messer abgeklappt und der von Fett- und Schmutzpartikeln gereinigte Objektträger vorsichtig an den Schnitt herangebracht, so dass das Messer nur leicht und sehr kurz berührt wurde. Durch den Temperaturunterschied bedingt, sprang dabei der Schnitt auf einen sialinisierten Objektträger über. Der Schnitt wurde korrekt abgenommen, wenn kein oder nur ein geringfügiger Kondensabdruck des Schnittes am Messer zurückblieb. Für die Durchführung der FISH an pleomorphen Parotistumoren wurden Gefrierschnitte in Serie angefertigt. Zwischen den einzelnen Schnitten einer Serie wurde immer nur ein Leerschnitt durchgeführt, um die Kontinuität der Schnittserie nicht zu beeinträchtigen.

4.3 Fixierung der Gefrierschnitte

Die Fixierung konserviert die Gewebestruktur und begrenzt die Degradierung von Nukleinsäuren. Weiterhin schützt eine Fixierung, bei dem Einbringen der Kryostat-schnitte in Wasser, vor einem Zerreißen der Schnitte durch die Oberflächenspannung mit der Folge schwerwiegender feinstruktureller Zerstörung (Winckler, 1970). Es gibt hierbei eine Gruppe von Fixiermitteln, die die Präparate quervernetzt (z.B. Formaldehyd, Glutaraldehyd) und eine zweite fällt Protein aus (z.B. Ethanol oder Methanol im Verhältnis 3:1 mit Essigsäure). Wir haben uns für die erste Variante entschieden und verwendeten PFA als Fixiermittel. Der Grad der Fixierung ist umgekehrt proportional zur Durchlässigkeit des Gewebes, das heißt ein stark fixiertes Gewebe vermag exzellent konserviert sein, ist aber für Sonden und Nachweisreagentien nur ungenügend permeabel (Winckler et al., 1971).

Durchführung:

Die wie unter 4.2 beschrieben angefertigten Gewebeschnitte wurden 10 Minuten auf Eis in 4%PFA/ PBS fixiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je 5 Minuten bei Raumtemperatur in eine Küvette mit PBS gestellt. Es folgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe für je 5 Minuten in 70%igem, 80%igem und 100%igem Alkohol. Nachdem die Schnitte bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten trockneten wurden sie bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

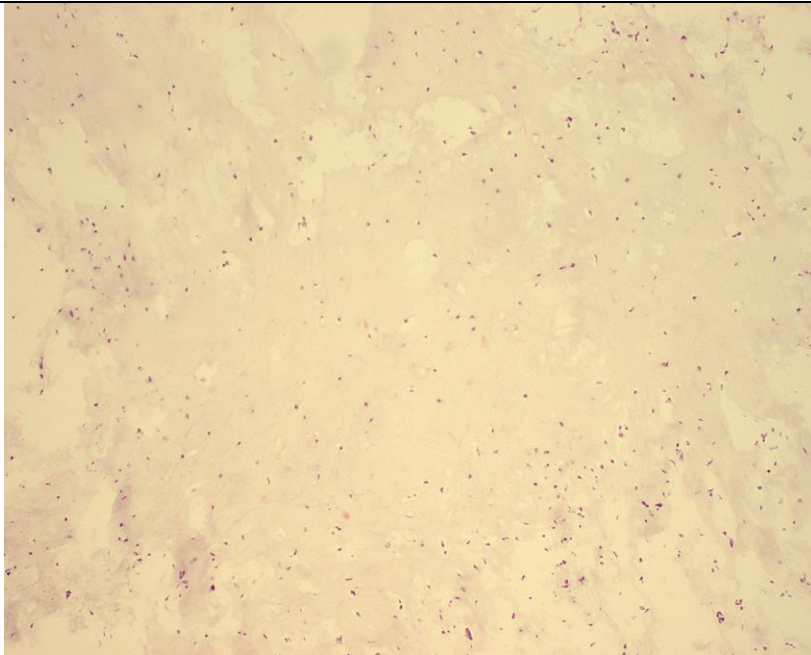
4.4 HE-Färbung

Die meisten Kernfarbstoffe sind positiv geladen und daher basische Farbstoffe, dadurch lagern sie sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA des Zellkerns (Chromatin) an.

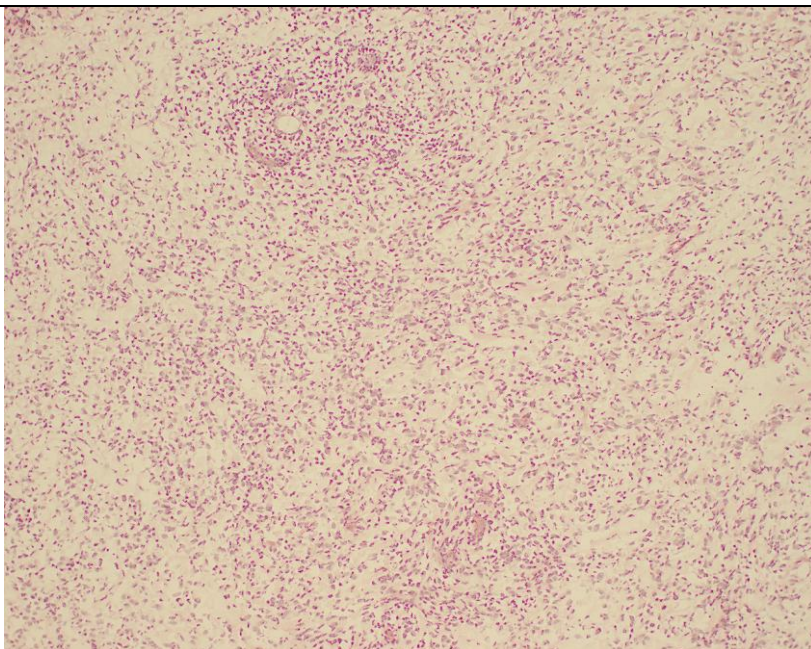
Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, welcher nativ farblos vorliegt und erst durch Dehydrieren (Oxydation) in den Farbstoff Hämatein überführt werden muss. Dies wird entweder durch langes Stehen an der Luft (natürliche Reifung) oder durch chemische Oxydationsmittel (künstliche Reifung) erreicht. Der saure Farbstoff Hämatein hat in saurer Lösung nur eine rötlich-gelbe Farbe ohne färberischen Nutzen, so dass zur Kernfärbung eine Beizung unbedingt erforderlich ist. Bei der hier durchgeführten HE-Färbung benutzen wir Hämalaun, ein Alaun-Hämatoxylin. Hierbei handelt es sich nicht um einen Beizfarbstoff im engeren Sinne, sondern die Schwermetallanteile des Alauns bilden positiv geladene Komplexverbindungen, die Indikatoreigenschaften besitzen. Die Kernfärbung kommt am besten in stark saurem Milieu zustande, indem sich positiv geladenes Hämalaun mit den Phosphorgruppen der Nukleinsäure des Chromatins verbindet. Um die blaue Farbe zu erreichen, muss ein pH-Wert >3 eingestellt werden, was durch Leitungswasser oder eine 0,1%ige NaHCO_3 -Lösung erreicht wird. Dieses Bläuen stabilisiert die Farbe, da sie im Alkalischen schlecht löslich ist und die Haltbarkeit des Präparats begünstigt (Bareck, 1973).

Durchführung:

Der erste und letzte Gefrierschnitt einer Serie von zehn Kryostatschnitten wurde einer HE-Färbung unterzogen. Hierdurch wurde sichergestellt, dass jeder Serienschnitt Tumorgewebe enthält. Dazu wurden die Schnitte 10 Minuten in Hämalaun nach Mayer (Merck 1.09249.05000) angefärbt und anschließend in drei Küvetten mit Leitungswasser gespült. Es folgte eine sofortige Differenzierung mit 70%igem HCl-Alkohol, indem der Ständer mit den OT zwei- bis dreimal in die Lösung eingetaucht wurde, bis die Präparate sich rot verfärbten. Nach einem einmaligen Spülen mit Leitungswasser, wurden die OT für weitere 10 Minuten in kaltem Leitungswasser gebläut und schließlich für 30 Sekunden in 1% Eosin gelblich gestellt und danach dreimal mit Brunnenwasser gespült. Zum Entwässern führte man eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70%igem, 80%igem und 100%igem Alkohol durch. Anschließend wurden die OT in je drei Küvetten mit Xylol gestellt und in dem dritten Behälter bis zum Eindecken belassen. Für das Eindecken wurde auf eine Ecke eines Deckglases (24x 60mm) das Eindeckmittel Entellan (Firma Merck) getropft, blasenfrei auf den OT aufgebracht und auf der Trockenbank unter dem Abzug bei RT trocknen gelassen. Die Abbildungen 4-1 und 4-2 zeigen beispielhaft die HE- Färbung zweier pleomorpher Adenome.



**Abb. 4-1 HE-Färbung eines zellarmen pleomorphen Adenoms. Zellkerne blau gefärbt.
Vergrößerung 10fach.**



**Abb. 4-2 HE-Färbung eines zellreichen pleomorphen Adenoms. Zellkerne blau gefärbt.
Vergrößerung 10fach.**

4.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

4.5.1 Einführung in die FISH - Technik

4.5.1.1 *Theorie*

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) stellt eine molekularzytogenetische Methode der Chromosomenanalyse dar. Im Rahmen dieser Technik können direkt Chromosomen auf dem Objektträger untersucht werden. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden mit definierten Sequenzen unter speziellen Reaktionsbedingungen auf Chromosomen aufgebracht (siehe Kapitel 4.5.1.2ff). Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit einzelsträngiger Nukleinsäuren (DNA oder RNA), sich mit komplementären Basensequenzen unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem doppelsträngigen Abschnitt zusammenzulagern (Hybridisierung). Bei dem einen Strang handelt es sich hierbei um eine markierte DNA-Probe eines bestimmten DNA-Abschnittes und bei dem anderen um die zu untersuchende komplementäre DNA im Genom der Zielzelle. Voraussetzung hierzu sind chromosomal kartierte DNA-Klone, die im Zuge der Kartierung des menschlichen Genoms in "DNA-Bibliotheken" erfasst und kommerziell erhältlich sind. Bei der FISH-Technik wird demnach in einer Probe getestet, ob für eine ausgewählte DNA-Sequenz Veränderungen vorliegen. Zwar nimmt die Zahl der kartierten DNA-Sequenzen, die zur Detektion eingesetzt werden können, ständig zu, jedoch ist es unmöglich, einen Tumor primär auf Alterationen aller bekannten Sequenzen hin zu analysieren.

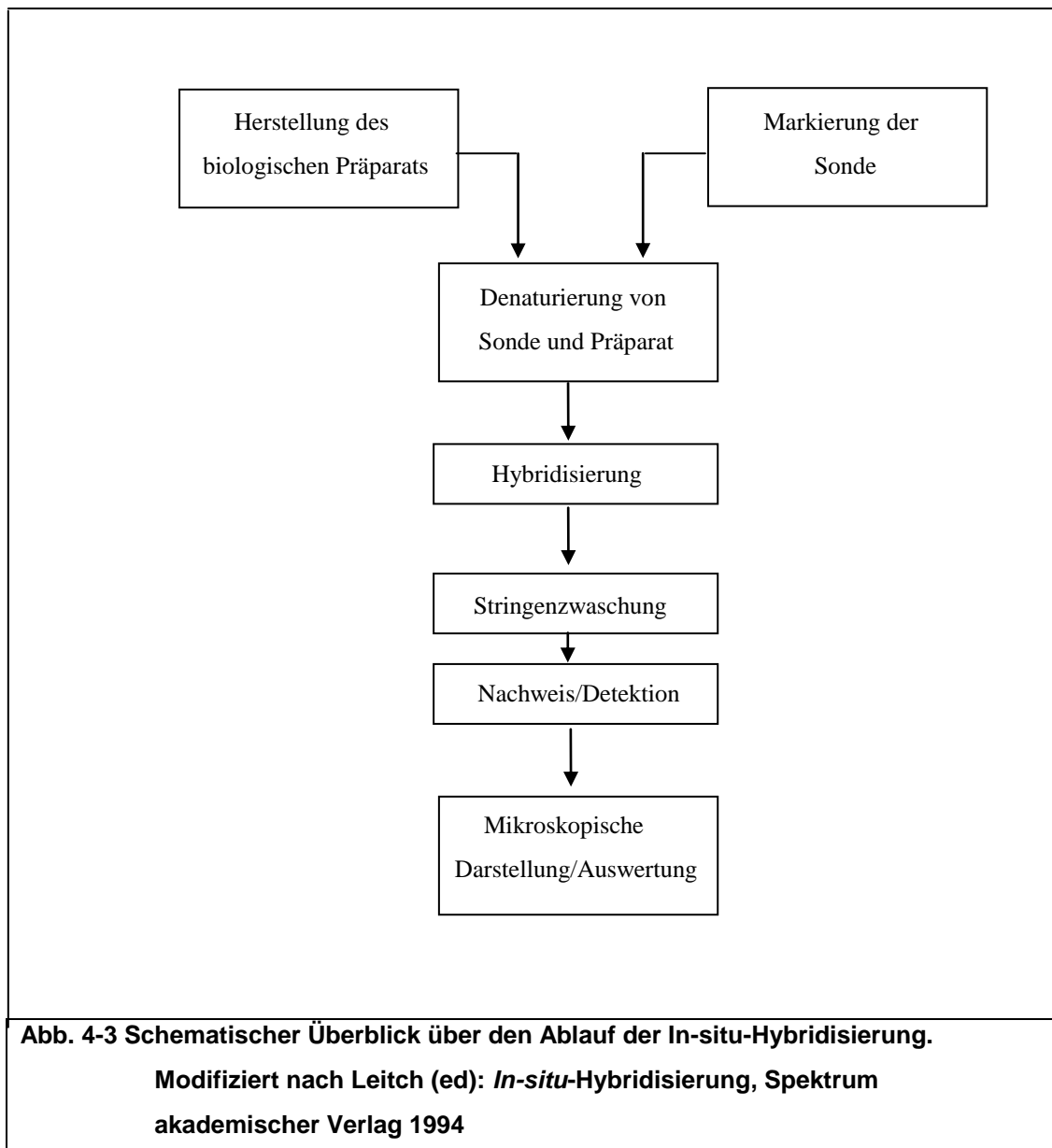
Die Technik der In-situ-Hybridisierung wurde unabhängig voneinander von Pardue und Gall sowie John und Mitarbeitern 1969 entwickelt und diente zunächst der genauen Lokalisationen der Chromosome im Zellkern sowie der Zuordnung repetitiver Sequenzen auf den einzelnen Chromosomen (Pardue & Gall, 1969; John et al., 1969). Die grundlegende Technik der DNA-DNA Hybridisierung, die auch die Basis der FISH darstellt, wurde bereits von Schildkraut, Marmur und Doty 1961

eingeführt. FISH bietet die Möglichkeit, genetische Veränderungen einzelner Chromosome und Chromosomenabschnitte bis auf die Ebene einzelner Gene aufzuzeigen. Die In-situ-Hybridisierung erlaubt die Detektion spezifischer Sequenzen in Chromosomen, in isolierten Zellen oder am Gewebeschnitt (in situ). Diese Methode ist nicht an die Metaphasenchromosome gebunden, sondern kann auch an Interphasezellkernen, in denen die DNA in nicht kondensierter Form vorliegt, durchgeführt werden. Die Detektion von Metastasen wird bereits bei dem Vorhandensein weniger Zellen durch die hohe Sensitivität der FISH-Technik erleichtert (Gray et al., 1994). FISH gehört zu den molekularzytogenetischen Techniken und ist seit Anfang der 80er Jahre etabliert.

In den letzten Jahren etablierte sich die FISH als pathologisches Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen in zytologischen Präparaten. Anstatt sich zytochemischer Färbungen zu bedienen, um morphologische Charakteristika von Neoplasien auszumachen, wird mit Hilfe der FISH-Untersuchung nach Chromosomenveränderungen gesucht, die mit einer Tumordiagnose, klinischen Parametern und der Prognose korrelieren. Die meisten der Studien sprachen hierbei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eine signifikant höhere Sensitivität der Tumorzell-detektion als der konventionellen Zytologie zu (Kipp, 2004; Persons et al., 1996; Sarosdy et al., 2006; Fuller et al., 2002). Trotzdem ist die FISH weiterhin erheblich teurer wie Methoden der klassischen Tumorzytogenetik (Halling & Kipp, 2007).

Die FISH ist eine geeignete Methode, um bestimmte numerische Veränderungen z.B. auf einem Chromosomenarm nachzuweisen und näher einzuengen. Sie überzeugt durch eine schnelle, sensitive, zellzyklusunabhängige Detektion molekularzytogenetischer Abnormitäten in malignen Zellen. Sie ist jedoch ungeeignet, einen Überblick über alle genetischen Veränderungen eines Tumors zu geben. Die Qualität der FISH ist hierbei sehr stark abhängig von der Gewebeaufbereitung, Denaturierung der Sonden- und Ziel-DNA, Hybridisierungsbedingungen und der Hybridisierungszeit sowie der anschließenden Stringenzwaschung.

Einen schematischen Überblick über den Ablauf der In-situ-Hybridisierung liefert Abbildung 4-3.



4.5.1.2 Denaturierung und Hybridisierung

Bei der in den achtziger Jahren eingeführten Technik der FISH erfolgt der Nachweis der bei der Hybridisierung eingesetzten Sonden mittels Fluoreszenzmarkierung. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden mit einer bestimmten Lichtwellenlänge angeregt und emittieren Licht einer anderen, üblicherweise längeren Wellenlänge. Die Anzahl der Zielsequenzen, welche gleichzeitig untersucht werden können, ist abhängig von dem Vorhandensein der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe. Nach der Denaturierung fluoreszenzmarkierter Probesequenzen erfolgt die Zugabe dieser zur genomischen DNA und die Sequenzen hybridisieren mit der jeweils spezifischen Zielsequenz.

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

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

T_m	=	Schmelztemperatur ($^\circ\text{C}$)
(% GC)	=	prozentualer Anteil von Guanin und Cytosin in der SONDENSEQUENZ
M	=	Konzentration monovalenter Kationen (Na^+) in der Hybridisierungslösung (mol^{-1})
n	=	Sondenlänge in Basenpaaren
% FA	=	Formamidkonzentration in Volumenprozent

Aus dieser Gleichung werden die unterschiedlichen Parameter mit direktem Einfluss auf die Denaturierung bzw. Reassoziaton ersichtlich. So kann die Anwesenheit monovalenter Na^+ -Kationen die Stabilität der Doppelstränge erhöhen. Desweiteren

ist der prozentuale Anteil von Guanin und Cytosin relevant, da GC-Paare über drei Wasserstoffbrückenbindungen fester miteinander verbunden sind, als AT-Paare, welche lediglich zwei Wasserbrückenbindungen ausbilden. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Schmelztemperatur von DNA-Doppelsträngen und dem Verhältnis von AT zu GC. Formamid wirkt durch die Hemmung von Wasserstoffbrückenbindungen destabilisierend, so dass die Denaturierung erleichtert wird. Jedes Prozent Formamid im Hybridisierungsmix senkt die T_m um $0,72^\circ\text{C}$. Letztendlich spielen Eigenschaften der DNA selbst eine Rolle bei der Denaturierung. Somit ist die Länge der DNA (Lathe, 1990), ihre Konformation, die Assoziation mit verschiedenen Proteinen (Darzynkiewicz, 1990) sowie die Anzahl fehlerhaft gepaarter Basenpaare und auch die Art des Nukleinsäurehybrids (DNA:DNA-Doppelstrang) von Bedeutung. Die Denaturierungstemperatur wird etwa 30°C über der errechneten Schmelztemperatur gewählt.

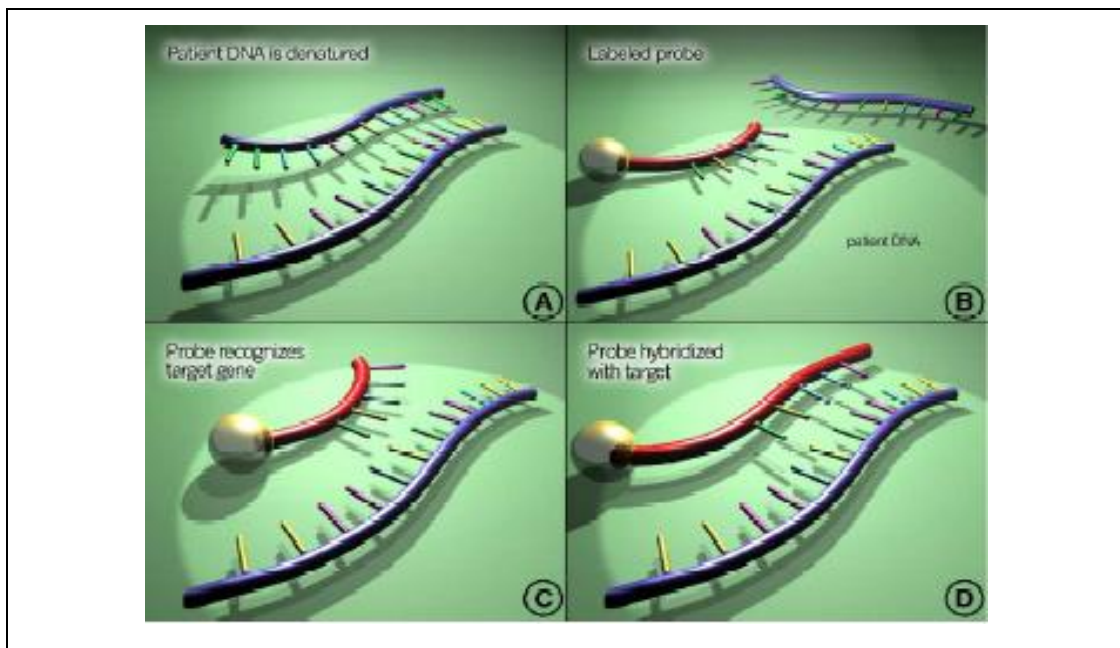


Abb. 4-4 Graphische Darstellung der Denaturierung und Hybridisierung direkt markierter Sonden. Nach Vorbehandlung der Gewebeschnitte, wurde die Ziel-DNA denaturiert (A). Nach Zugabe der direkt markierten Sonde zum Gewebeschnitt (B), erfolgt die Erkennung (C) und Hybridisierung der entsprechenden Zielsequenz (Hicks & Tubbs, 2005)

4.5.1.3 Stringenzwaschung

Die Stringenz, mit der die In-situ-Hybridisierung durchgeführt wird, bestimmt den Prozentsatz korrekt gepaarter Nukleotide im Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz. Er kann mit folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Stringenz (\%)} = 100 - Mf (t_m - t_a)$$

Mf = Fehlerpaarungsfaktor (1 für Sonden über 150 bp, 5 für Sonden unter 20 bp Länge)

t_m = errechnete Schmelztemperatur (°C)

t_a = Temperatur (°C), bei der die In-situ-Hybridisierung bzw. die Waschschrirte durchgeführt werden

Die Stringenz hängt von der Temperatur, der Ionenstärke und der Konzentration helixdestabilisierender Moleküle (z.B. Formamid) in den Hybridisierungs- und Waschlösungen ab. Somit stellt die Stringenz ein Maß für die Präzision der Hybridisierung dar. Nach der Hybridisierung werden Waschungen des Objektträgers vorgenommen, wobei nun die Bedingungen stringenter gewählt werden, um nur ähnliche und dadurch falsch oder nur partiell gebundene DNA-Moleküle zu entfernen. Um diese Sequenzhomologie zu vermindern, werden eine höhere Temperatur und eine niedrigere Kationenkonzentration gewählt. So stoßen sich anionische DNA-Phosphatgruppen gegenseitig ab und nicht spezifisch gepaarte Hybride trennen sich.

4.5.1.4 *Detektion*

In einem letzten Schritt erfolgt die Detektion der mit Reportermolekülen gekennzeichneten Sonden mit einem Fluoreszenzmikroskop. Bei unserer Untersuchung wurden direkt markierte Sonden verwendet, welche unmittelbar mit einem Fluoreszenzfarbstoff, z.B. Cy3, Rhodamin oder FITC, konjugiert sind und keiner gesonderten Detektion bedürfen. Sie können ohne Zwischenschaltung eines weiteren Detektionsschrittes im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise ist eine spätere Amplifikation des Signals jedoch nicht mehr möglich (Swiger 1996). Diese Methode eignet sich besonders für Mehrfachmarkierungen, um auf mehreren Chromosomen gleichzeitig genetische Marker nachzuweisen (z.B. Markierung der einen Sonde mit Rhodamin und der anderen mit Fluorescein).

Im Gegensatz hierzu müssen digoxigenierte oder biotinylierte indirekt markierte Sonden nach der Hybridisierung mit einem Fluorochrom, z.B. Streptavidin-FITC, detektiert werden. Eine Amplifikation des Signals kann durch Zwischenschalten eines biotinylierten anti-Streptavidin-Antikörpers und einer erneuten Streptavidin-FITC-Detektion erfolgen.

4.6 **FISH an Lymphozytenpräparaten**

4.6.1 Blutkultur

Eine Blutkultur wurde nach einer modifizierten Standardmethode (Arakaki & Sparkes, 1963) aus lithiumheparinisierem Vollblut angesetzt. Mit Hilfe der Blutkultur können normale Metaphasen und Interphasekerne gewonnen werden, die der Kontrolle einer spezifischen Hybridisierung (Spezifität, Effizienz) dienen. Das verwendete Komplettmedium (PB-Max Karyotyping Medium, Invitrogen Cooperation MSDS ID 12557) enthält Substanzen, die als unspezifische Antigene

immunkompetente T-Lymphozyten zur Proliferation anregen. Anschließend wurde mit Colcemid (10µg/ml; Fa. Invitrogen) ein Spindelgift hinzugegeben, das die sich in Teilung befindlichen Zellen in der Metaphase belässt. Hierdurch erhöht sich die Zahl der Metaphasen in einer Kultur. Alle Schritte erfordern ein steriles Arbeiten, um eine Verunreinigung der Kultur zu vermeiden.

Durchführung:

Zunächst wurden 8 ml des PB-Max-Kulturmediums zusammen mit 800 µl lithiumheparinisiertem Vollblut (5000IE Lithiumheparin/ml) in eine Kulturflasche pipettiert und vorsichtig vermischt. Diese Blutkulturen wurden 69 Stunden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5%iger CO₂ Begasung inkubiert und einmal am Tag leicht bewegt. Nach exakt 69 Stunden wurde 10µg/ml Colcemid hinzugegeben und die Kultur bei 37°C über zwei Stunden inkubiert, um den Zellzyklus der Lymphozyten in der Metaphase zu stoppen.

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

4.6.2 Chromosomenpräparation

Die Chromosomenpräparation wurde nach dem laborspezifisch adaptierten Protokoll aus peripherem Blut gesunder, männlicher Probanden hergestellt. Der Vorgang der Chromosomenpräparation lässt sich allgemein in drei Arbeitsschritte bestehend aus Hypotoniebehandlung, Fixierung und Spreitung der Chromosomen unterteilen.

Die Hypotoniebehandlung führt zu einer hypoosmolaren Zelldilatation, eine wichtige Voraussetzung für eine gute Chromosomenspreitung.

Die Fixierung dient der Konservierung und Stabilisierung der Chromosomen in weitgehend natürlichem Zustand und schützt vor weiterem Verlust von Nukleinsäuren (Claussen et al., 1994). Wir wählten für diesen Arbeitsschritt Methanol und

Eisessig als präzipitierende Fixiermittel, die zu einer Ausfällung von Proteinen führen. Anschließend folgt mit der Spreitung der Chromosomen ein Vorgang, der von mannigfaltigen Faktoren beeinflusst wird und in weiten Teilen unverstanden bleibt. Vor allem die unterschiedliche Art des Auftropfens und die Trocknungsbedingungen variieren laborspezifisch, scheinen aber neueren Untersuchungen nach kaum Einfluss auf die Chromosomenspreitung zu haben (Hliscs et al., 1997).

Durchführung:

Der Überstand der abzentrifugierten Blutkultur wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abnommen. In drei Schritten wurde tropfenweise eine auf 37°C erwärmte 0,52% KCl-Lösung auf das Pellet aufgetropft und nach jedem Schritt vorsichtig resuspendiert. Dieser Arbeitsschritt dient dem Aufblähen der Lymphozyten. Nach einer Inkubationszeit von 8 bis 9 Minuten und einem Endvolumen zwischen 6 bis 8ml (abhängig von der Luftfeuchtigkeit) wurde das Röhrchen bei 800 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand nochmals abgesaugt.

Zur Fixierung der Chromosomen wurden ein Fixans, bestehend aus Methanol und Eisessig (-20°C), im Verhältnis vier zu eins hergestellt und gut gemischt. Nachdem wie oben beschrieben der Überstand abgesaugt, das Pellet resuspendiert und in die Pasteurpipette aufgenommen wurde, fand erneut in vier Schritten die Zugabe von 0,52% KCl statt (ein Tropfen, fünf Tropfen, eine Pasteurpipette und zwei Pasteurpipetten). Das Resuspendieren mußte hierbei sehr vorsichtig ablaufen, um eine vollständig homogene Suspension zu erhalten. Daraufhin wurde das Pellet bei -20°C für eine Stunde inkubiert und im Anschluss 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgehoben und in jeweils drei Arbeitsschritten zunächst zweimal eine und anschließend zwei Pasteurpipetten Fixans hinzugegeben und stets erneut resuspendiert. Dieser Waschvorgang wiederholte sich dreimal bis das Zellsediment weiß erschien und zwischen jedem dritten Arbeitsschritt wurde jeweils für 10 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet je nach Größe in Fixans aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Zellsuspension wurde aus ca. 40cm Höhe auf Objektträger aufgetropft. Die OT mussten für eine Minute auf einem feuchten Tuch liegen und anschließend bei

Raumtemperatur bis zu 24h trocknen. Anschliessend wurden die Präparate bei +4°C bis zur Hybridisierung aufbewahrt. Um eine DNA-Degradierung vorzubeugen, welche mit einer mangelhaften Hybridisierung einhergehen würde, sollten die Gewebeschnitte nicht länger als 3 Monate gelagert werden (Mezzanotte et al., 1988).

4.6.3 Vorbereitung der Lymphozytenpräparate

Für eine verbesserte Hybridisierung wurden die Lymphozytenpräparate einer Vorbehandlung unterzogen. Hierbei erfolgten alle Waschschrte in einem Horizontalschüttler (Edmund Bühler 7400 Tübingen, SM25), um eine homogene Lösung zu erhalten. Um die unspezifische Hybridisierung an RNA-Fragmenten zu verhindern, wurde das Präparat nach kurzem Eintauchen in 2x SSC bei 37°C 20 Minuten mit RNase (Stammlösung = 10 mg/ml 2x SSC) inkubiert, die mit 2x SSC (pH 7,0) 1:100 verdünnt wurde. Darauf folgte ein Waschschrte (3x5 Minuten) mit 2x SSC (pH 7,0) bei Raumtemperatur. Um das Hybridisierungsergebnis zu verbessern wurden die Lymphozyten in einem 37°C warmen Wasserbad einem Pepsin-Verdau von 2 Minuten unterzogen. Diese Behandlung macht die Zellmembranen der Lymphozyten durchlässiger für die Sonden und somit für die Hybridisierung zugänglicher. Im Anschluss wurden die Präparate bei RT 5 Minuten in 1xPBS (pH 7,0) gewaschen, um das Pepsin zu entfernen. Fixiert wurden die Lymphozyten durch eine zehnminütige Behandlung mit 4% PFA/PBS bei +4°C. Danach wurden sie nochmals 5 Minuten in PBS gewaschen. Schließlich wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%) für je 5 Minuten dehydriert und mindestens 30 Minuten bei RT an einem staubfreien Ort luftgetrocknet.

4.6.4 Denaturierung und Hybridisierung

Pro OT wurden 5µl Hybridisierungsmix aufgetragen, der mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum abgedichtet wurde. Pro OT wurde 5-10µl Hybridisierungsmix auf den OT pipettiert. Dieser setzte sich je nach Versuchsreihe aus 2,5µl Hybridisierungsmix sowie 0,5µl zentromerspezifische Chromosom X-Sonde (PSAT000X-R, Q-Biogene) und 2,0µl telomerspezifische 16p-Sonde (PTEL16P-G, Q-Biogene) zusammen. Beziehungsweise im Falle der Her-2/neu- und 17p- Hybridisierung aus 10µl 17-p53-Sonde (PONC1753, Q-Biogene) oder 10µl 17p12-Her-2-neu-Sonde (PONC 1712, Q-Biogene). Denaturiert wurden Sonden und Präparat gemeinsam, indem sie für 5 Minuten bei 75°C auf eine Heizplatte gestellt wurden. Die Hybridisierung fand über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C statt. Die weitere Behandlung war identisch mit dem Protokoll für die pleomorphen Adenome (siehe Kapitel 4.7) mit der Ausnahme, dass die Stringenzwaschung bei den Lymphozytenpräparaten lediglich 5 statt 10 Minuten betrug.

4.7 FISH an Parotisgewebeschnitten

4.7.1 Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Die Objektträger mit den Kryostatpräparaten wurden zunächst bei RT in eine Küvette mit 2x SSC (pH 7) eingestellt. Für den RNase-Verdau wurde RNase-Stammlösung (10mg/ml) mit 2x SSC in einem Verhältnis von 1:100 gemischt. Anschließend wurde auf jeden OT 100µl RNase-Stammlösung gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Dieser Schritt dient der Entfernung von RNA im Zytoplasma und Zellkern. Durch die RNase Inkubation wird einzelsträngige RNA abgebaut und die später hinzugefügte Sonde hybridisiert somit nicht mit RNA. Es folgte eine dreimalige Waschung in 2x SSC für jeweils 5 Minuten bei RT.

Um die Zellkerne mit der darin befindlichen DNA für die Sonden zugänglicher zu machen, wurde das Parotistumorgewebe in 100ml 0,01 N HCl und 100µl 5%igem Pepsin bei 37°C verdaut. Die Pepsinwirkung beruht unter anderem auf der Befreiung der Nukleinsäure von assoziierten Proteinen. Die Verdauzeiten für die einzelnen pleomorphen Adenome waren sehr unterschiedlich und wurden für jeden Tumor in Vorversuchen bestimmt. Die endgültigen Zeiten, mit denen die besten Ergebnisse erzielt wurden, sind in der Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Die OT wurden im Folgenden bei RT 5 Minuten in PBS (pH 7,0) gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei 4°C mit 4% PFA/PBS fixiert. Dies stabilisiert die Chromosome und beugt einem DNA-Verlust durch Degradierung vor (Raap et al., 1986). Das Pepsin wurde danach durch je einmaliges Spülen mit PBS und Aqua dest. für jeweils 5 Minuten entfernt und 10 Minuten bei 70°C in 2x SSC (pH 7,0) inkubiert. Es folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe in 70igem, 80igem und 100%igem Alkohol für jeweils 5 Minuten und anschließend mussten die OT mindestens 30 Minuten lufttrocknen.

Tabelle 4-1: Verdauzeiten des Parotisgewebes mit 5%igem Pepsin

Fallnummer der Tumorproben	Pepsinverdau
021	7,0 min
025	5,0 min
038	6,0 min
041	4,0 min
056	3,5 min
057	3,5 min
063	3,0 min
072	4,0 min
082	6,0 min
084	3,0 min
097	4,0 min
101	2,5 min
110	2,0 min
115	5,0 min
125	3,0 min
127	4,0 min
136	4,0 min
141	2,0 min
143	5,0 min
154	3,0 min
161	5,0 min
181b	4,0 min
182b (Normalgewebe)	5,0 min

4.7.2 Denaturierung und Hybridisierung

Die Kryostatgewebeschnitte wurden mit Denaturierungsmix (Stammlösung: siehe Anhang) für 2 Minuten bei 80°C auf der Heizplatte denaturiert und danach sofort bei -20°C jeweils für 5 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mindestens für 30 Minuten luftgetrocknet.

Pro OT wurden 5 µl Hybridisierungsmix hergestellt. Der Hybridisierungsmix besaß die gleiche Zusammensetzung wie für die Lymphozytenpräparate (siehe Kapitel 4.6.4). Der Hybridisierungsmix wurde 5 Minuten bei 75°C im Wasserbad denaturiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde der entsprechende Hybridisierungsmix auf den denaturierten Kryostatschnitt pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und mit Fixogum abgedichtet. Sobald das Fixogum getrocknet war, kamen die OT in einer feuchten Kammer in ein 80°C heißes Wasserbad, in dem die Kryostatschnitte gemeinsam mit den Sonden für 10 Minuten denaturiert wurden. Zur Hybridisierung wurden die OT bei 37°C 48 Stunden inkubiert.

4.7.3 Stringenzwaschung und DAPI-Färbung

Im Anschluss wurde das Fixogum mit einer Pinzette entfernt und die Deckgläser durch Schwenken in 2x SSC entfernt. Dieser und alle nun folgenden Waschschrte wurden unter ständigem Schütteln und im Dunkeln durchgeführt, da die Fluoreszenzfarbstoffe der direkt markierten Sonden lichtempfindlich sind und ausbleichen.

Als nächster Schritt folgte die Stringenzwaschung bei 42°C, 3x je 10 Minuten in 50% FA/2x SSC (pH 7,0) und 2x 10 min in 2x SSC (pH 7,0). Nachdem die OT in PBS gespült wurden, wurde sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%igem, 80%igem und 100% EtOH) je 5 Minuten dehydriert. Anschließend wurden die Gefrierschnitte mindestens 30 Minuten im Dunkeln luftgetrocknet und mit DAPI-Antifade (0,1 µl/ml, Vectashield, Vector Laboratories, USA) unter einem Deckglas eingedeckt. Die

Aufbewahrung bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgte im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

4.8 Bildaufnahme und Auswertung

Die Bildaufnahme und Auswertung der FISH-Untersuchung wurden an einem Olympus BX61-Fluoreszenzmikroskop vorgenommen (Abb. 4-6). Eine CCD-Videokamera (Metasystem JAI CV-M300/ Photometrics CH 250) diente gemeinsam mit dem ISIS digital image analysis system (Metasystems GmbH, Altlußheim, Deutschland) zur Dokumentation der einzelnen Untersuchungsbefunde. Bildgebendes Verfahren, computergestützte Aufnahme, Bearbeitung und Auswertung sind bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eng miteinander verknüpft.

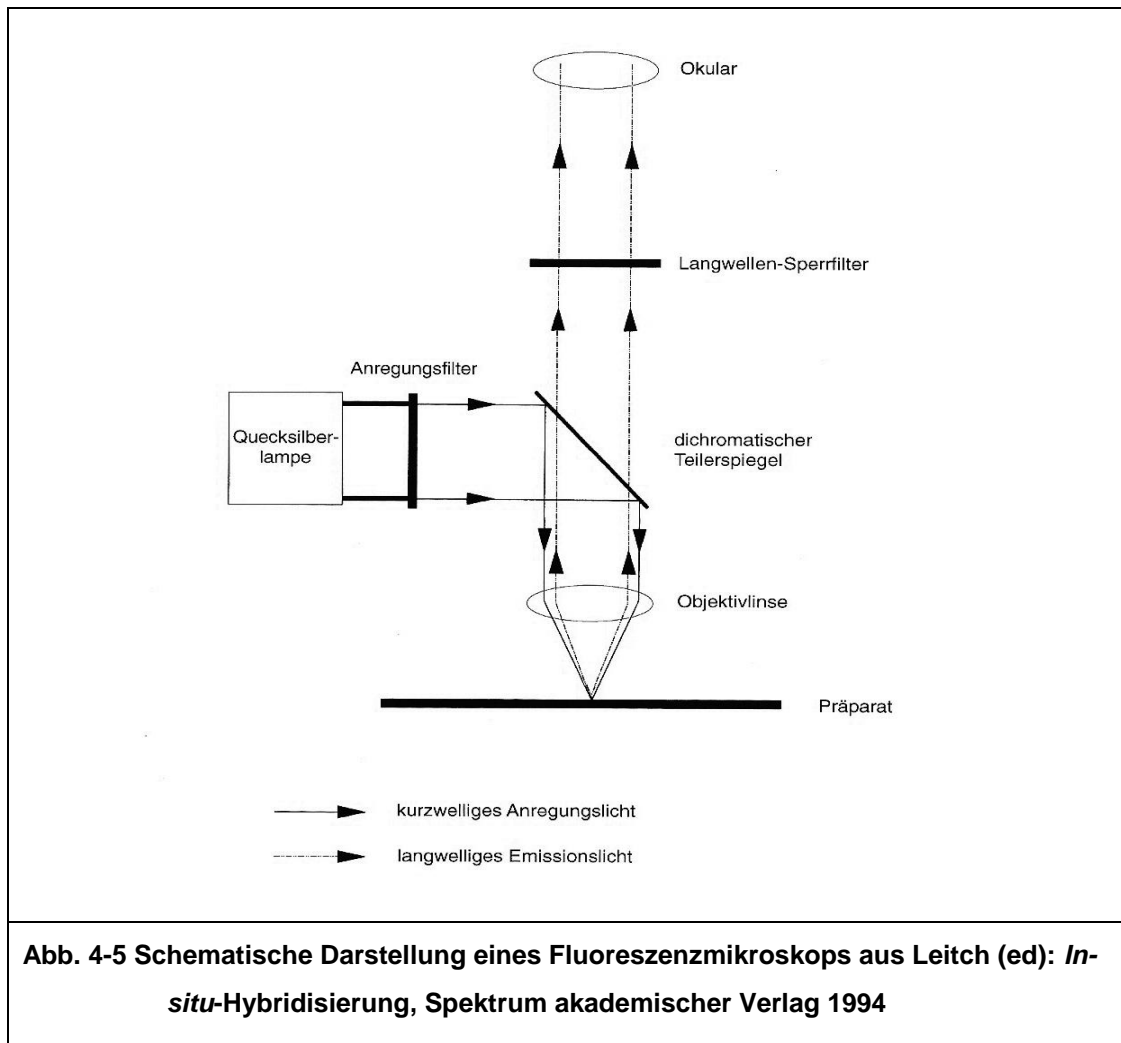
Erster Schritt ist hierbei die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie, indem ein Präparat von oben durch das Objektiv, das gleichzeitig als Kondensor fungiert, beleuchtet wird. Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit Photonen einer bestimmten Wellenlänge. Die hierbei freiwerdende Energie wird teilweise wieder als Licht einer größeren Wellenlänge emittiert und somit sichtbar. Als primäre Lichtquelle dient eine Quecksilberdampflampe mit 100 W, welche Licht von ultraviolett bis infrarot aussendet. Zur Anregung des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes können je nach geeigneter Wellenlänge entweder Schmalbandfilter oder Kurzwellenfilter gewählt werden. In unserer Untersuchung wurden Schmalbandfilter benutzt, bei welchen jeweils nur Licht eines schmalen, definierten Spektrumausschnittes passiert. Ein dichromatischer Teilerspiegel zwischen Anregungs- und Sperrfilter befindet sich im Winkel von 45° zwischen Anregungsfilter und Objekt und reflektiert Erregerlicht von kleiner Wellenlänge auf das Präparat. Der Teilerspiegel ist hierbei gleichzeitig durchlässig für längerwelliges Licht und lässt dieses auf den so genannte Langwellen-Sperrfilter treffen, welcher nur für Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchlässig ist. Das auf diesem Weg detektierte Lichtsignal kann nun über das Okular betrachtet, mit einer Kamera fotografiert oder über eine CCD-Kamera digital visualisiert und

gespeichert werden. Bei dem benutzten Olympus BX61 Mikroskop (Objektiv: Plan Apo 60x; 1,40 Oil) sind die entsprechenden Filterkombinationen (Olympus Optical) für die benutzten Fluorochrome über ein Wechselrad integriert. So ließen sie sich schnell und genau auf das jeweils zu detektierende Fluorochrom anpassen (Tab. 4-2). Da diese Filter genau justiert waren, entfiel eine spätere Verschiebekorrektur der Aufnahmen.

Im Auflicht-Fluoreszenzmikroskop verblassen Fluoreszenzfarbstoffe vor allem bei Verwendung von energiereichem kurzwelligem Licht trotz Antibleichmitteln bereits innerhalb eines kurzen Zeitraumes. So ist es bei Verwendung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen wichtig, zunächst den mit längerwelligem Licht angeregten Farbstoff sichtbar zu machen.

Tabelle 4-2: Fluorochrome mit den dazugehörigen Detektionsfiltersets

Farbstoff	Anregung	Anregungsfilter	Teilerspiegel	Sperrfilter	Farbe
DAPI	ultraviolett	BP 360-370	DM 400	BA 420	blau
FITC	violett	BP 460-490	DM 505	BA 515-550	grün
Rhodamin	grün	BP 520-550	DM 565	BA 580 IF	rot



4.8.1 Auswertung der FISH-Untersuchung

Entsprechend den Kriterien von Hopman und Mitarbeitern (Hopman et al., 1988) wurden nur gut abgrenzbare Kerne mit gut definierten Kernsignalen für die Auswertung herangezogen. Helle und kräftige, distinkte Signale wurden als positiv gewertet, während Hybridisierungssignale mit geringerer Intensität im Vergleich zu den optimalen Kontrollsignalen der Lymphozytenpräparate und solche mit irregulärer, unklarer Fluoreszenzanfärbung verworfen wurden. Aufgetrennte Signale wurden als ein Signal gewertet, sofern diese nicht weiter als eine Signaltbreite voneinander entfernt lagen. In jedem Fall wurde versucht eine Gesamtheit von 200

Kernen auszuwerten. Solche Kriterien sind essentiell um eine maximale Sensitivität und Spezifität in FISH-Untersuchungen zu erreichen (Zhang et al. 1997).

4.8.2 Bildaufnahmen

Von jedem zu untersuchenden Lymphozytenpräparat wurden Zellkerne möglichst ohne Überlagerungen ausgesucht, in welchen die Fluoreszenzsignale gut sichtbar und ohne Aufsplitterungen vorlagen. Auch bei den pleomorphen Adenomen wurden möglichst Gewebeabschnitte gewählt, in denen die Kerne und Signale gut abgrenzbar vorlagen. Diese wurden dann bei entsprechender Vergrößerung (Objektiv: Plan Apo 60x und 100x; 1,40 Oil) mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Hierfür wurde pro untersuchten Gewebeabschnitt jede Fluoreszenzmarkierung separat als monochromes Graustufenbild kodiert. Somit waren jedem untersuchtem Gewebeabschnitt bzw. jeder Metaphase drei Bilder zugehörig. Die Software erlaubt eine für jedes Bild individuelle Integrationszeit. Sie ordnet der Lichtintensität die Funktion der Lichtmenge zu und bildet das Integral dieser Funktion, welches graphisch dargestellt wird. Anhand dieses Integrals kann die richtige Belichtungszeit beurteilt und gegebenenfalls so geändert werden, dass die Aufnahme optimal belichtet wird. Die CCD-Kamera ist mit einem Computer verbunden, in welchem die Bilder in dem Softwareprogramm ISIS (Version 2.5) abgespeichert werden.

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde Gewebe pleomorpher Adenome von insgesamt 22 Patienten untersucht. In diese Untersuchung wurde nur Tumorgewebe aufgenommen, welches im Pathologischen Institut der Universitätsklinik Homburg nach histopathologischer Begutachtung eindeutig als pleomorphes Adenom klassifiziert werden konnte. Da es sich in einem Fall allerdings um ein regressives pleomorphes Adenom mit gegebenenfalls zu hohem unspezifischen Anteil handelte, wurde dieses von einer weiteren Auswertung ausgeschlossen. Weiterhin konnte mit Hilfe der histopathologischen Analyse in allen 21 auswertbaren Fällen mögliche maligne Atypien ausgeschlossen werden. Das durchschnittliche Alter am Tag der Operation betrug 51,7 Jahre mit einer Altersspannweite von 15 bis 75 Jahren. 14 (66,7%) der Patienten waren männlichen und 7 (33,3%) weiblichen Geschlechts, was in diesem Falle einem Verhältnis von 2:1 entspricht.

Zum Nachweis von strukturellen und numerischen Chromosomenveränderungen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden die in der Tumorbank der Universitätsklinik der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Homburg zur Verfügung stehenden pleomorphen Adenome auf Verluste oder Gewinne des Chromosomenabschnitts 16, der Chromosomen 17 und X, sowie der Gene Her-2/neu und p53 analysiert. Hierzu wurden zum einen eine telomernahe Sonde auf 16p und eine zentromernahe Sonde auf Chromosom X und zum anderen eine Alpha-Satelliten-Sonde auf Chromosom 17 und genspezifische Sonden für Her-2/neu bzw. p53 simultan hybridisiert. Einige der Tumore mussten bei unzureichender Materialmenge von einer weiterführenden FISH-Analyse ausgeschlossen werden.

5.1 Kontrollen der Sondenspezifität und Hybridisierungseffizienz

Vor der Durchführung einer FISH-Analyse an Gewebe pleomorpher Adenome fand eine Kontrolle der Sondeneffizienz sowie der Hybridisierungsbedingungen statt. Hierzu wurden die Sonden simultan an Lymphozyten- oder Parotisnormalgewebe hybridisiert, wobei diese optimierten Hybridisierungs- und Stringenzbedingungen auf die anschließend untersuchten Gewebeschnitte der 21 pleomorphen Adenome übertragen wurde. Nach Auswertung von 200 Interphasekernen konnte der Anteil aberranter Kerne bestimmt werden.

Ausgehend von diesem prozentualen Anteil aberranter Zellkerne wurde für jede einzelne Sonde der Mittelwert nach folgendem arithmetischem Mittel zur Abschätzung des Erwartungswertes berechnet:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n X_i$$

\bar{X} = Mittelwert

n = Gesamtzahl der Kontrollproben

Je weiter einzelne Werte von dem errechneten Mittelwert liegen, desto größer wird die Streuung um diesen Mittelwert herum. Um diese Streuung mit in die Berechnungen einzubeziehen wurde die einfache sowie die zweifache Standardabweichung nach folgender Formel bestimmt:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

s = Standardabweichung

\bar{X} = Mittelwert

n = Gesamtzahl der Kontrollproben

Anhand der Bestimmung eines Mittelwertes sowie der Standardabweichung wurde die Signifikanzgrenze festgestellt, ab der Veränderungen als solche gewertet werden.

Hiermit wird bestimmt, inwieweit die Resultate in dem jeweiligen Präparat innerhalb der erwarteten Streuung liegen oder signifikante Aberrationen darstellen. Dabei gibt der Mittelwert zusammen mit der zweifachen Standardabweichung die Diskrepanz von der 100%igen Hybridisierungseffizienz an.

Bei der ersten durchgeführten Versuchskontrolle wurde die FISH an gesunden männlichen und weiblichen Lymphozyten durchgeführt. Bei den männlichen Lymphozyten zeigte sich bezüglich des X Chromosoms eine Normalverteilung, wohingegen der Chromosomenarm 16p einen Verlust von 7,5% verzeichnete. Für das Chromosom 17 und Her-2/neu ergaben sich ein Verlust des Chromosoms 17 in 8,0% und einen Verlust von 1,0% im Falle des Her-2/neu-Gens. Bei den 46, XX Lymphozyten fand sich ein Verlust sowohl des X Chromosoms als auch des kurzen Arms von Chromosom 16 mit 4,5% bzw. 7,0%. Die simultane Hybridisierung des Chromosoms 17 und p53 ergab einen Verlust von 5,0% bzw. 6,5% (Tab. 5-1).

Ein zweites durchgeführtes Kontrollexperiment fand mit Parotisnormalgewebe eines männlichen Patienten statt (Tab. 5-1). Hier zeigte sich in 3,0% der ausgezählten Zellkerne ein Chromosom X-Verlust und in 2,0% der Fälle ein Verlust von 16p. Das Chromosom 17 verzeichnete einen Verlust von 1,5%, während Her-2/neu in 3,0% der Zellkerne deletiert war.

Tabelle 5-1 veranschaulicht das berechnete Intervall, innerhalb welchem der prozentuale Anteil aberranter Interphasekerne noch als Normalverteilung galt. Werte überhalb dieser festgelegten Grenze wurden als signifikante Aberrationen gewertet.

Tabelle 5-1: Statistische Auswertung der Blutlymphozyten und Parotisnormalgewebe mit Berechnung des Mittelwertes der nachgewiesenen Gesamtverluste und der einfachen sowie zweifachen Standardabweichung

Sonden	Signalverluste [%]				
	#X	16p	#17	p53	Her-2/neu
Test 1: XY-Lympho	0	7,5	8,0	k.E.	1,0
Test 2: XX-Lympho	4,5	7,0	5,0	6,5	k.E.
Normalgewebe XY	3,0	2,0	1,5	k.E.	3,0

Sonden	#X	16p	#17	p53	Her-2/neu
Mittelwert	5,00	5,5	4,83	k.E.	2,00
einfache SD	2,29	3,04	3,25	k.E.	1,41
zweifache SD	4,58	6,08	6,50	k.E.	2,82
MW \pm SD	7,29	8,54	8,09	k.E.	3,41
MW \pm 2SD	9,58	11,58	11,34	k.E.	5,41

MW = Mittelwert SD = Standardabweichung # = Chromosom Lympho = Lymphozyt

k.E. = keine Ergebnisse wegen eingeschränkter Haltbarkeit des Materials

Theoretisch kann das Streuintervall auf den Mittelwert einschließlich der einfachen addierten bzw. subtrahierten Standardabweichung festgelegt werden (MW \pm SD, siehe Tab.5-1). Trotz allem wurde die Signifikanzgrenze bei allen Sonden auf 10% angehoben, um auch mögliche Fehler bei der Ergebnisinterpretation sowie die Möglichkeit einer schlechten qualitativen Tumormorphologie einzukalkulieren. Werte oberhalb dieser festgelegten Grenze wurden als signifikante Aberrationen gewertet.

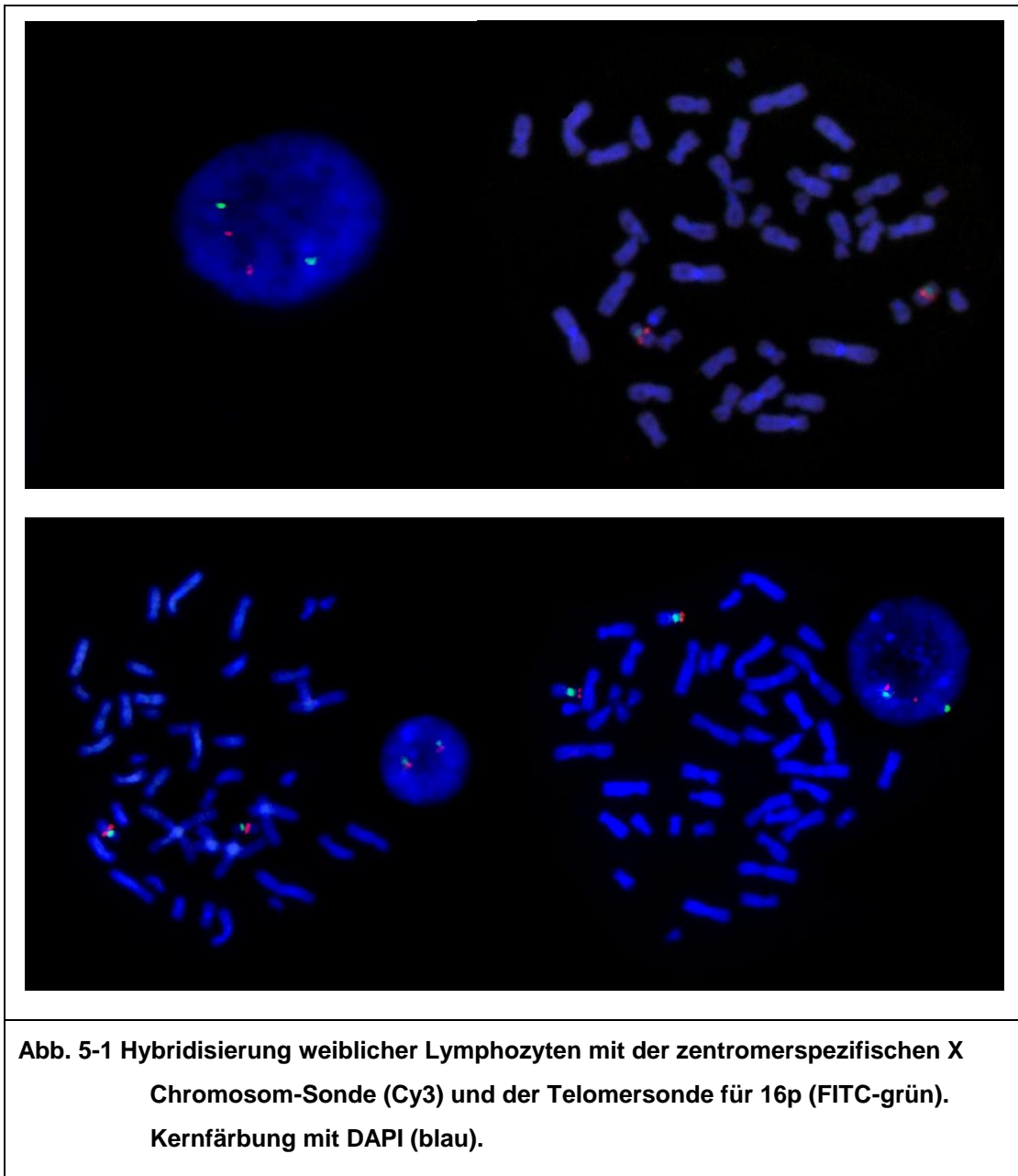


Abbildung 5-1 zeigt exemplarisch Kontrollhybridisierungen an weiblichen Lymphozyten mit normalem Karyotyp. In dem unteren Abschnitt des Bildes erscheint das X-Chromosom und das 16p-Signal kolokalisiert und vermag den Anschein einer Translokation erwecken. Der Vergleich mit den anderen FISH-Analysen zeigte jedoch, dass es sich hierbei um ein Zufallsereignis handelte.

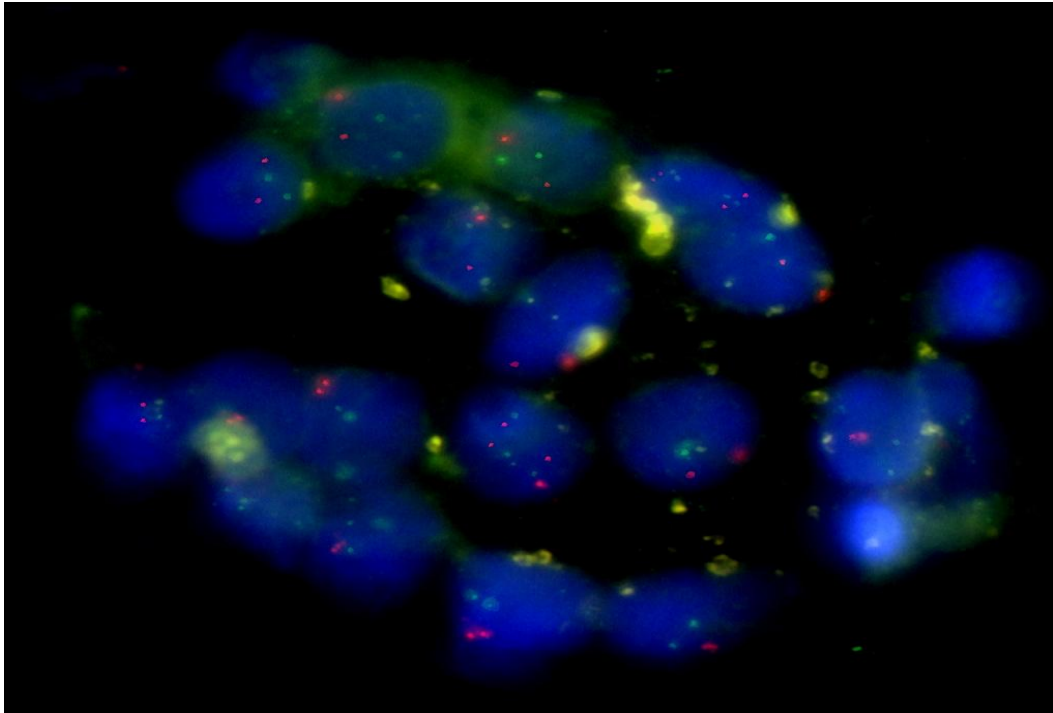


Abb. 5-2 Hybridisierung von Parotisnormalgewebe mit der genspezifischen Her-2/neu-Sonde (Cy3-rot) und der Alpha-Satelitten-Sonde für das Chromosom 17 (FITC-grün). Kernfärbung DAPI (blau).

Abbildung 5-2 zeigt beispielhaft eine Hybridisierung von Parotisnormalgewebe eines männlichen Probanden mit der genspezifischen Her-2/neu-Sonde und der Alpha-Satelliten-Sonde für das Chromosom 17. Vereinzelt Abweichungen von einem normalen Karyotyp entsprechen Fluoreszenzsignalen, die sich außerhalb der Brennebene befinden.

5.2 FISH Resultate Chromosom X

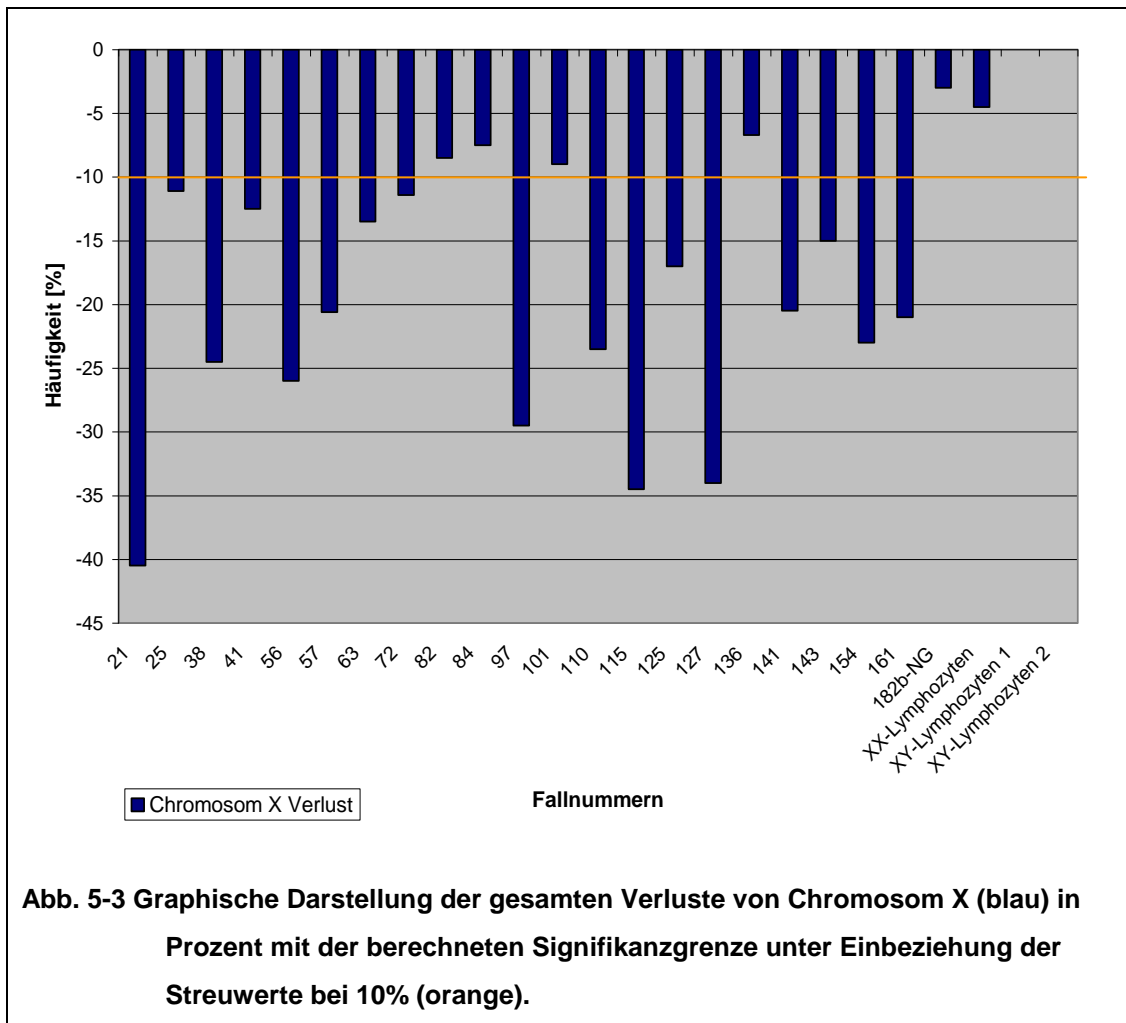
Die Tabelle 5-2 zeigt die Resultate der 21 untersuchten pleomorphen Adenome einschließlich des Parotisnormalgewebes in Bezug auf Gewinne und Verluste des Chromosoms X auf. Die FISH-Analyse wurde mit Hilfe einer zentromerspezifischen X-Chromosomsonde durchgeführt. Von dem untersuchten Gewebe stammten sieben Fälle von weiblichen Patienten und vierzehn von männlichen Patienten.

Teilweise war eine Auswertung von 200 Interphasekernen nicht möglich. Die Signale waren in diesen Fällen in vielen Zellen entweder zu schwach oder zu stark aufgesplittet, so dass die Anzahl der Signale nicht hundertprozentig eruiert werden konnten und solche Zellkerne von der Auszählung ausgeschlossen wurden. So betragen im Rahmen der Hybridisierungssonde X die zählbaren Zellkerne im Fall 25 (153), im Fall 57 (136), im Fall 72 (149) und im Fall 136 (180).

Tabelle 5-2: Prozentuale Veränderungen von Chromosom X mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Operationstag. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze.

Fallnummer	G	Alter	#X-GV [%]	-2 [%]	-1 [%]	NV [%]	+1 [%]	+2[%]
021	W	28 J	40,5	6,5	34,0	59,0	0,5	-
025	M	31 J	11,1	-	11,1	88,2	0,7	-
038	W	72 J	24,5	8,5	16,0	75,5	-	-
041	M	49 J	12,5	-	12,5	85,0	2,5	-
056	M	70 J	26,0	-	26,0	72,0	2,0	-
057	W	40 J	20,6	2,2	18,4	79,4	-	-
063	M	20 J	13,5	-	13,5	85,0	1,5	-
072	M	69 J	11,4	-	11,4	84,6	4,0	-
082	M	62 J	8,0	-	8,0	87,5	4,5	-
084	M	46 J	7,5	-	7,5	89,5	3,0	-
097	W	33 J	29,5	3,5	26,0	70,5	-	-
101	M	38 J	9,0	-	9,0	88,5	2,5	-
110	M	57 J	23,5	-	23,5	74,5	2,0	-
115	W	63 J	34,5	15,0	19,5	65,5	-	-
125	M	77 J	17,0	-	17,0	81,0	2,0	-
127	M	77 J	34,0	-	34,0	65,5	0,5	-
136	M	58 J	6,7	-	6,7	93,3	-	-
141	W	48 J	20,5	2,5	18,0	78,5	1,0	-
143	M	44 J	15,0	-	15,0	83,0	2,0	-
154	M	40 J	23,5	-	23,5	76,0	0,5	-
161	W	76 J	21,0	7,0	14,0	79,0	-	-
Ø			19,5	6,5	17,4	79,1	1,9	-
182b-NG	M	38 J	3,0	-	3,0	97,0	-	-
Lympho (XY)	M	k.A.	-	-	-	100,0	-	-
Lympho (XY)	M	k.A.	-	-	-	100,0	-	-
Lympho (XX)	W	k.A.	4,5	-	4,5	95,0	0,5	-

G= Geschlecht #= Chromsomen GV= Gesamtverlust NV= Normalverteilung M= männlich W= weiblich NG= Normalgewebe J= Jahre Lympho = Lymphozyten Ø = Durchschnittswerte k.A.= keine Angaben



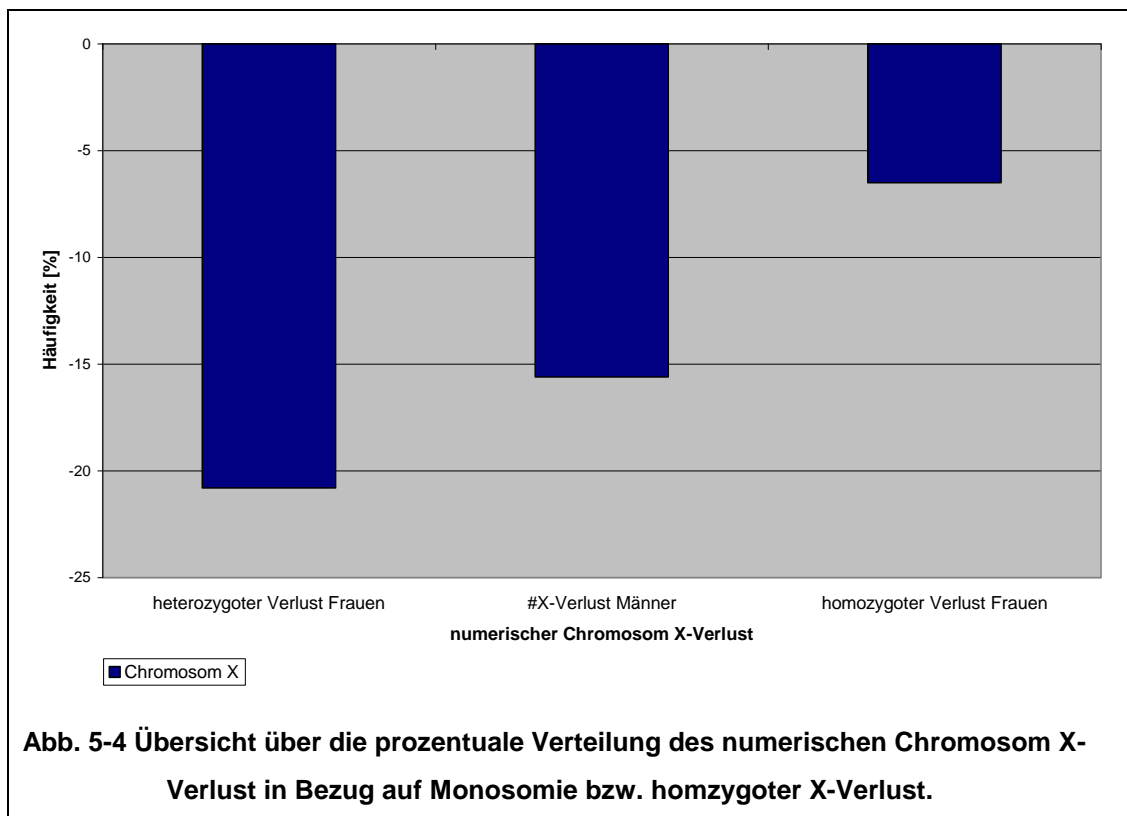
Da keine signifikanten Gewinne nachgewiesen werden konnten, wurden im Folgenden nur die Verluste genauer analysiert. Das Blockdiagramm in Abbildung 5-3 zeigt eine der Tabelle 5-2 entsprechende graphische Darstellung der gesamten Chromosom X Verluste.

5.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse Chromosom X

In allen 21 molekularzytogenetisch untersuchten Fällen zeigte sich ein Chromosom X-Verlust. Jedoch nur 17 von 21 Probanden (81%) konnten hierbei in Hinsicht auf eine eventuelle Streuung oberhalb der Signifikanzgrenze von 10% angesiedelt werden, so dass sich die Fälle 82, 84, 101 und 136 als nicht signifikant erwiesen. Signifikante Gewinne des X Chromosoms konnten nicht nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an Interphasekernen mit Normalverteilung betrug 79,1%.

Der Chromosom X-Verlust betraf durchschnittlich 19,5% (6,7% - 40,5%) der ausgezählten 200 Zellkerne. Ausgeprägte X Chromosom-Verluste kann man anhand von Abb. 5-3 in den Fällen 21 (40,5%), 97 (29,5%), 115 (34,5%) und 127 (34%) erkennen.

Einen Verlust beider X Chromosome zeigten sich mit durchschnittlich 6,5% (2,2% - 15%) bei allen sieben weiblichen Patienten. Die in die Analyse einbezogenen Probanden wiesen mit durchschnittlich 17,4% (11,1% - 34%) den Verlust eines X Chromosoms auf, wobei im Mittel 20,8 % bei den Frauen und 15,6 % bei den Männern auftraten und somit kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Geschlechterverteilung aufgezeigt werden konnte. Das Blockdiagramm in Abbildung 5-4 gibt hierzu einen graphischen Überblick über die prozentuale Verteilung der Monosomie und einem homozygoten Verlust von Chromosom X.



Das Blockdiagramm in Abbildung 5-4 gibt einen graphischen Überblick über die prozentuale Verteilung des homozygoten bzw. des heterozygoten Verlustes des X-Chromosoms bei den Frauen sowie den X-Chromosomverlust bei den männlichen Patienten.

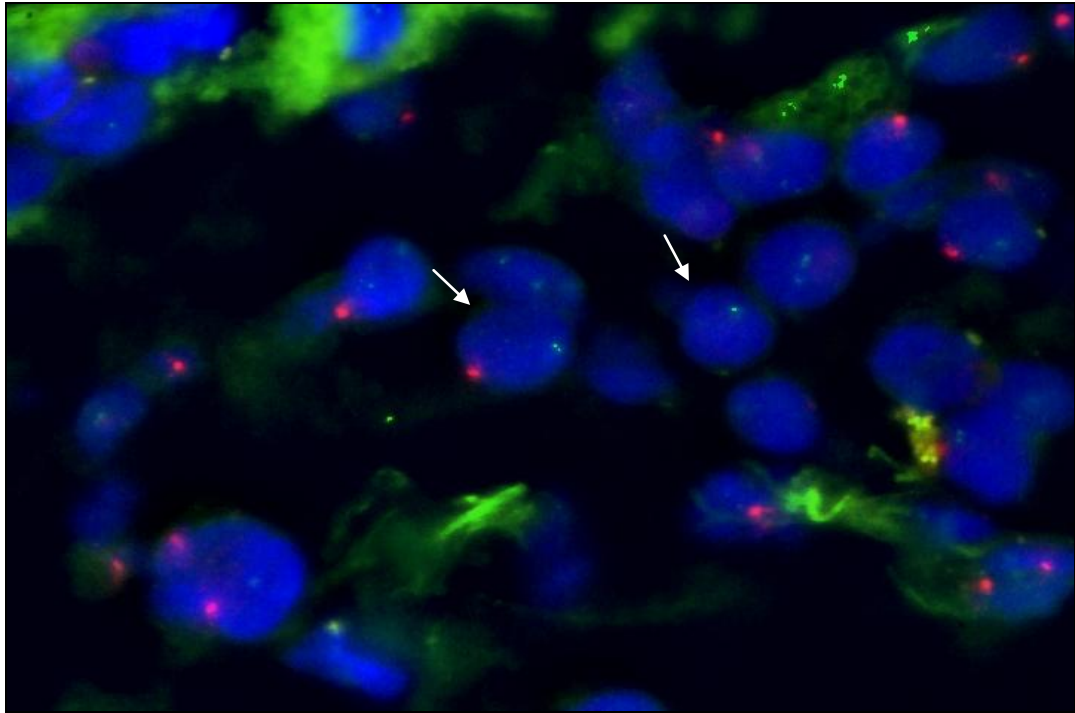


Abb. 5-5 Ausschnitt von Tumorzellen eines pleomorphen Adenoms in der FISH-Analyse einer weiblichen Patientin mit der zentromerspezifischen Sonde für das Chromosom X (Cy3-rot) und der telomerspezifischen Sonde für den Chromosomenabschnitt 16p (FITC-grün). Die Pfeile markieren von einem normalen Karyotyp abweichende Interphasekerne mit deutlichem #X-Verlust. Kernfärbung mit DAPI (blau).

Abbildung 5-5 zeigt ein Beispiel mit ausgeprägtem Chromosom X-Verlust in Interphasekernen eines pleomorphen Adenoms. Mit Hilfe der zentromerspezifischen X-Sonde wird der Verlust eines oder beider roten Hybridisierungssignale, welcher mit einem Chromosom X-Verlust einhergeht, deutlich. Eine Reduktion der Hybridisierungssignale ergibt sich im Rahmen zentromerspezifischer Sonden durch den kompletten Verlust der Zentromerregion oder durch Deletionen, die Teile des Zentromerbereiches eines Chromosoms umfassen. In der Regel ist jedoch von dem Verlust des gesamten Chromosoms auszugehen. Auch die grünen Signale der telomerspezifischen 16p-Sonde zeigen in einem Teil der Zellen eine Abweichung von einem dem normalen Karyotyp entsprechenden zwei Hybridisierungssignalen pro Chromosomenpaar.

5.3 FISH Resultate des Chromosomenarms 16p

Die Tabelle 5-3 zeigt die Resultate der 21 untersuchten pleomorphen Adenome einschließlich des Parotisnormalgewebes in Bezug auf Gewinne und Verluste des Chromosomenarms 16p. Die FISH-Analyse wurde mit einer telomerspezifischen 16p-Sonde durchgeführt.

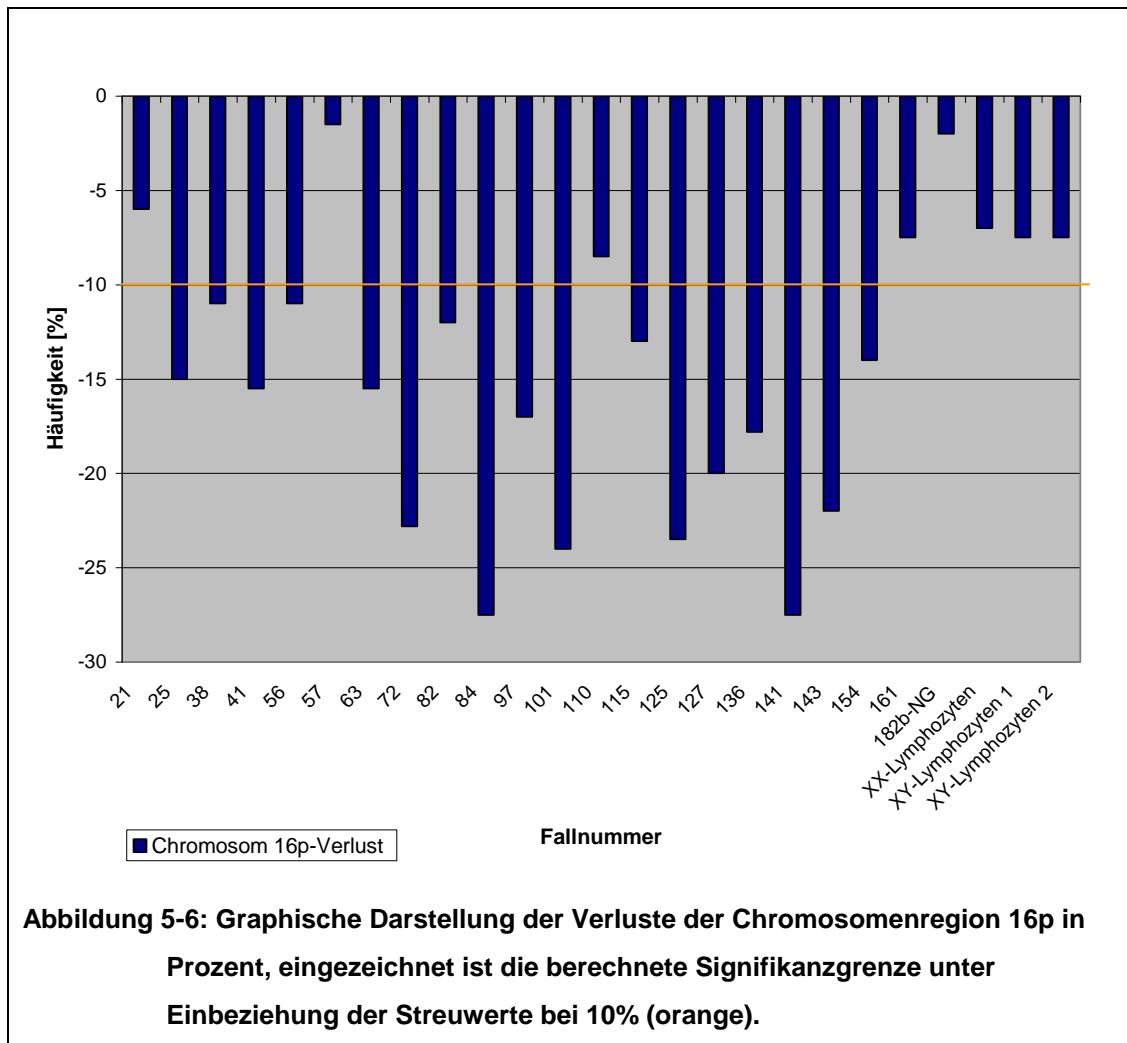
Der prozentuale Anteil an Interphasekernen mit Normalverteilung betrug im Falles des Chromosomenarms 16p 83,3%.

Teilweise war auch hier eine Auswertung von 200 Interphasekernen nicht möglich. Die Signale waren in diesen Fällen in vielen Zellen entweder zu schwach oder zu stark aufgesplittet, so dass die Anzahl der Signale nicht hundertprozentig eruiert werden konnten und solche Zellkerne von der Auszählung ausgeschlossen wurden. So betragen im Rahmen der Hybridisierungssonde 16p die zählbaren Zellkerne im Fall 25 (153), im Fall 57 (136), im Fall 72 (149) und im Fall 136 (180).

Tabelle 5-3: Prozentuale Veränderungen der Chromosomenregion 16p mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Operationstag. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze.

Fallnummer	G	Alter	16p-GV [%]	-2 [%]	-1 [%]	NV[%]	+1[%]	+2 [%]
021	W	28 J	6,0	1,0	5,0	93,0	1,0	-
025	M	31 J	15,1	0,7	14,4	84,9	-	-
038	W	72 J	11,0	-	11,0	88,5	0,5	-
041	M	49 J	15,5	1,0	14,5	84,0	0,5	-
056	M	70 J	11,0	-	11,0	89,0	-	-
057	W	40 J	1,5	-	1,5	98,5	-	-
063	M	20 J	15,5	0,5	15,0	83,5	1,0	-
072	M	69 J	22,8	1,3	21,5	71,8	4,7	0,7
082	M	62 J	12,0	-	12,0	88,0	-	-
084	M	46 J	27,5	1,0	26,5	71,5	1,0	-
097	W	33 J	17,0	1,0	16,0	81,5	1,5	-
101	M	38 J	24,0	2,0	22,0	74,5	1,5	-
110	M	57 J	8,5	-	8,5	90,0	1,5	-
115	W	63 J	13,0	0,5	12,5	86,5	0,5	-
125	M	77 J	23,5	2,0	21,5	75,5	1,0	-
127	M	77 J	20,0	1,0	19,0	80,0	-	-
136	M	58 J	17,8	-	17,8	81,7	0,5	-
141	W	48 J	27,5	3,0	24,5	72,5	-	-
143	M	44 J	22,0	0,5	21,5	77,5	0,5	-
154	M	40 J	14,0	0,5	13,5	85,5	0,5	-
161	W	76 J	7,5	-	7,5	92,0	0,5	-
Ø			15,9	0,8	15,1	83,3	0,8	-
182b-NG	M	38 J	2,0	-	2,0	98,0	-	-
Lympho (XY)	M	k.A.	7,5	0,5	7,0	90,5	2,0	-
Lympho(XY)	M	k.A.	8,5	1,0	7,5	88,5	3,5	0,5
Lympho(XX)	W	k.A.	7,0	-	7,0	92,0	1,0	-

G= Geschlecht GV= Gesamtverlust NV= Normalverteilung M= männlich W= weiblich NG= Normalgewebe J= Jahre
Lympho = Lymphozyten Ø = Durchschnittswerte k.A.= keine Angaben

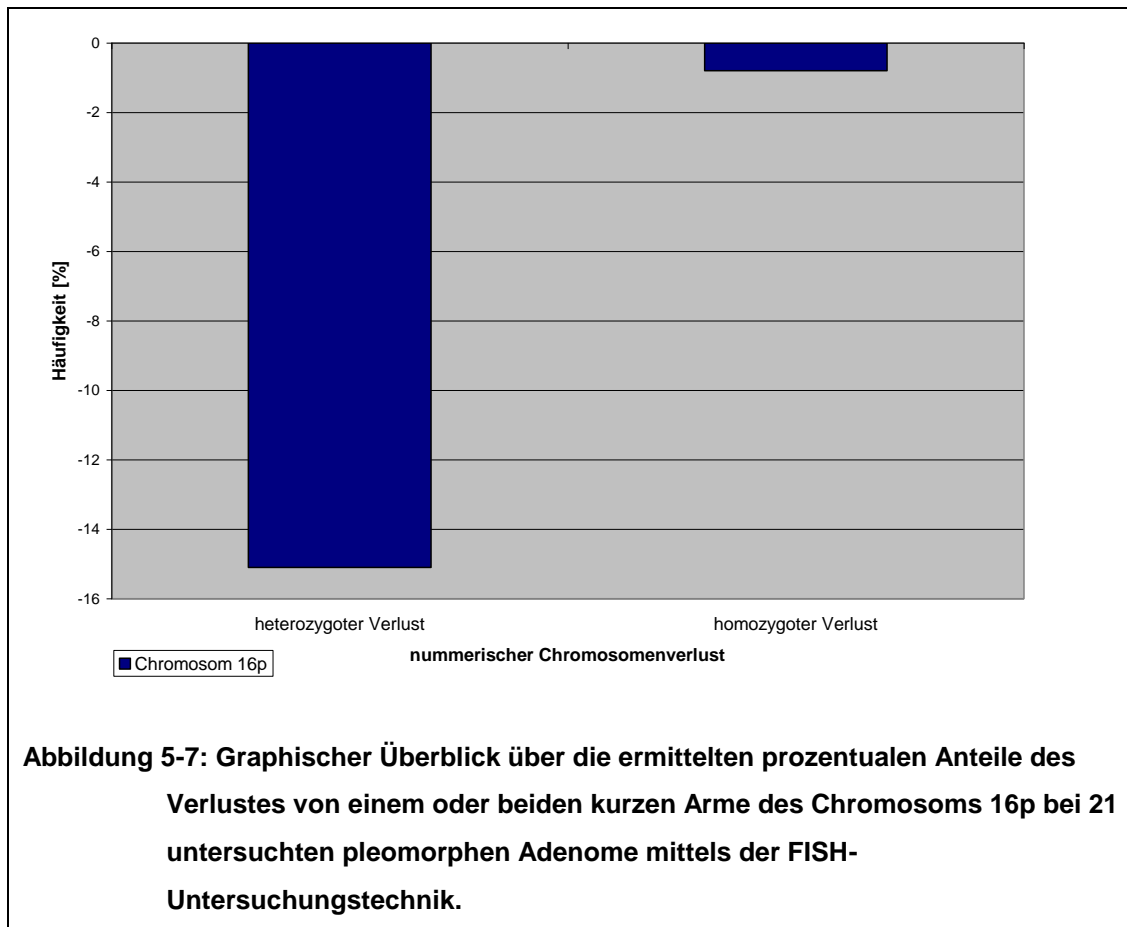


Da keine signifikanten Gewinne nachgewiesen werden konnten, wurden im Folgenden nur die Verluste genauer analysiert. Das Blockdiagramm in Abbildung 5-6 zeigt eine der Tabelle 5-3 entsprechende graphische Darstellung der gesamten Chromosom 16p Verluste.

5.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse des Chromosomenarms 16p

In 17 von den 21 untersuchten Fällen (81%) zeigte sich ein signifikanter Verlust der chromosomalen Region 16p. Signifikante Gewinne konnten nicht nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an Interphasekernen mit Normalverteilung betrug 83,3%. Der Gesamtverlust des kurzen Arms von Chromosom 16 betrug durchschnittlich 15,9% der ausgezählten 200 Kerne. Ausgeprägte 16p-Verluste kann man in den Fällen 72 (22,8%), 84 (27,5%), 125 (23,5%) und 141 (27,5%) anhand von Abb. 5-6 erkennen.

Vier Probanden mit nicht signifikanten Ergebnissen konnten in den Fällen 21, 57, 110 und 161 identifiziert werden. Sie zeigten einen 16p-Verlust unterhalb der in Kapitel 5.1 berechneten Signifikanzgrenze auf. Einen nicht signifikanten Verlust beider 16p-Chromosomenarme zeigte sich mit durchschnittlich 0,8% (0,5% - 3,0%) bei 13 von 21 Patienten. Die in die Auswertung eingeschlossenen 17 Patienten, welche einen einfachen 16p-Verlust aufwiesen, zeigten einen Verlust von durchschnittlich 15,1% (1,5% - 26,5%) auf. Einen signifikanten Unterschied in Hinblick auf eine geschlechtsspezifische Verteilung konnte nicht ermittelt werden.



Das Blockdiagramm in Abbildung 5-7 gibt einen graphischen Überblick über die prozentuale Verteilung der Monosomie und einem homozygoten Verlust des Chromosomenarms 16p.

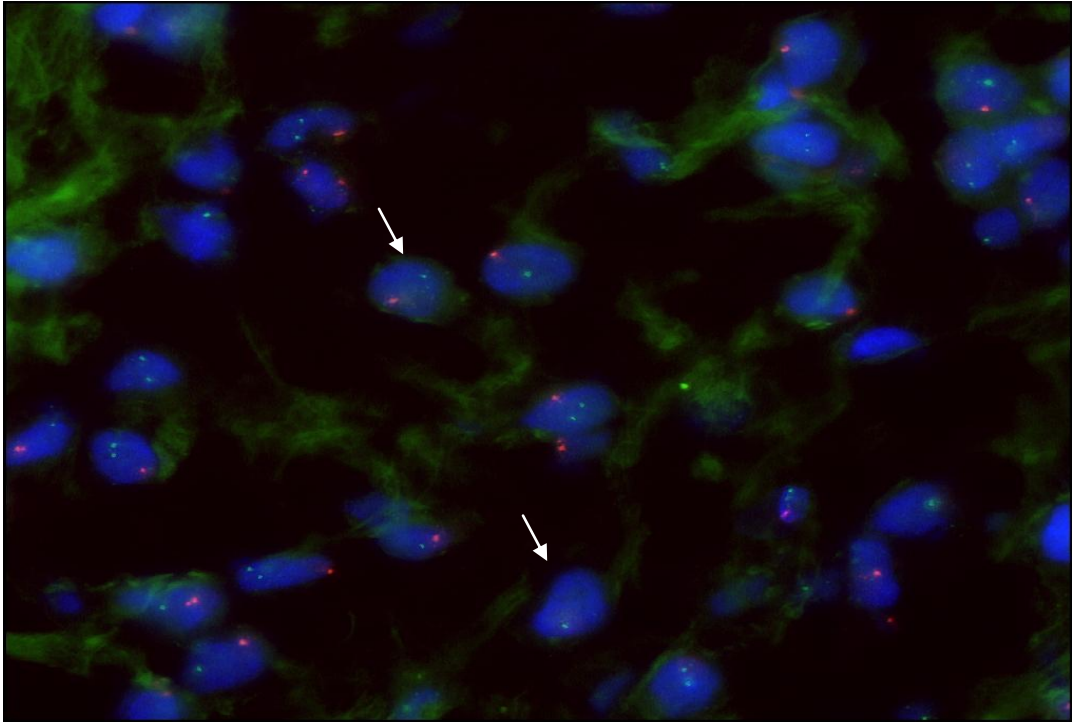


Abbildung 5-8: Ausschnitt eines pleomorphen Adenoms eines männlichen Patienten mit Hilfe der FISH-Analyse. Mit Pfeilen ist der Verlust des Chromosomenabschnitts 16p (FITC-grün) bei stark ausgeprägtem Chromosom X-Verlust (Cy3-rot) angedeutet. Kernfärbung mit DAPI (blau).

In Abbildung 5-8 wird beispielhaft Fall 56 dargestellt, welcher mittels HE-Färbung als zellreiches pleomorphes Adenom charakterisiert wurde. Hier zeigt sich das Fehlen von einem oder beiden Hybridisierungssignalen aufgrund der entsprechenden Verluste eines oder beider der Chromosomen X und des Chromosomenarms 16p.

5.4 FISH Resultate des Chromosoms 17 und Her-2/neu

Die Tabelle 5-4 und 5-5 zeigen die experimentellen Resultate von insgesamt 16 untersuchten pleomorphen Adenome einschließlich des Parotidnormalgewebes und Lymphozyten Cut-offs in Bezug auf Gewinne und Verluste des Chromosom 17 und des Her-2/neu- Gens auf 17q12-q21.32. Die Tabelle 5-5 zeigt ein Vergleich der Gesamtverluste der beiden untersuchten Sonden. Die FISH-Analyse wurde gleichzeitig mit Hilfe einer Alpha-Satelliten-Sonde für Chromosom 17 und einer lokusspezifischen Sonde für das Her-2/neu-Gen durchgeführt. Wir konnten in diesem Teil der Studie wegen der oben erwähnten eingeschränkten Haltbarkeit der Kryostatschnitte insgesamt fünf Patientenfälle weniger bearbeiten. Von dem untersuchten Gewebe stammten 5 (33,3%) Fälle von weiblichen und 11 (66,7%) von männlichen Patienten.

In Bezug auf die Sonden für Chromosom 17 und Her-2/neu fanden sich in drei Fällen keine 200 auszählbare Zellkerne. Die zählbaren Zellkerne betragen im Fall 97 (160), im Fall 110 (150) und im Fall 136 (150).

Tabelle 5-4: Prozentuale Veränderungen des Chromosoms 17 mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Operationstag. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze.

Fallnummer	G	Alter	#17-GV [%]	-2 [%]	-1 [%]	NV [%]	+1 [%]	+2 [%]
038	W	72 J	30,0	0,5	29,5	70,0	-	-
041	M	49 J	31,5	1,5	30,0	68,5	-	-
056	M	70 J	37,5	3,5	34,0	62,5	-	-
057	W	40 J	36,0	-	36,0	64,0	-	-
063	M	20 J	24,0	1,0	23,0	76,0	-	-
097	W	33 J	23,8	-	23,75	76,25	-	-
101	M	38 J	26,0	-	26,0	73,0	1,0	-
110	M	57 J	38,6	-	38,6	60,7	0,7	-
115	W	63 J	23,0	0,5	22,5	76,5	0,5	-
125	M	77 J	23,5	1,0	22,5	76,5	-	-
127	M	77 J	18,0	-	18,0	79,5	2,5	-
136	M	58 J	33,3	2,0	31,3	66,7	-	-
143	M	44 J	37,5	1,5	36,0	60,0	2,0	0,5
154	M	40 J	18,5	1,5	17,0	77,0	3,5	1,0
161	W	76 J	14,0	0,5	13,5	85,0	1,0	-
181b	M	65 J	11,0	0,5	10,5	86,0	3,0	-
Ø			26,6	0,9	25,8	72,4	0,9	-
182b-NG	M	38 J	1,5	-	1,5	98,5	-	-
Lympho(XY)	M	k.A.	8,0	-	8,0	91,0	1,0	-

G= Geschlecht #= Chromosom GV= Gesamtverlust NV= Normalverteilung M= männlich W= weiblich NG= Normalgewebe J= Jahre Lympho = Lymphozyten Ø = Durchschnittswerte k.A.= keine Angaben

Tabelle 5-5: Prozentuale Veränderungen des Gens Her-2/neu auf Chromosom 17 mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Operationstag. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze.

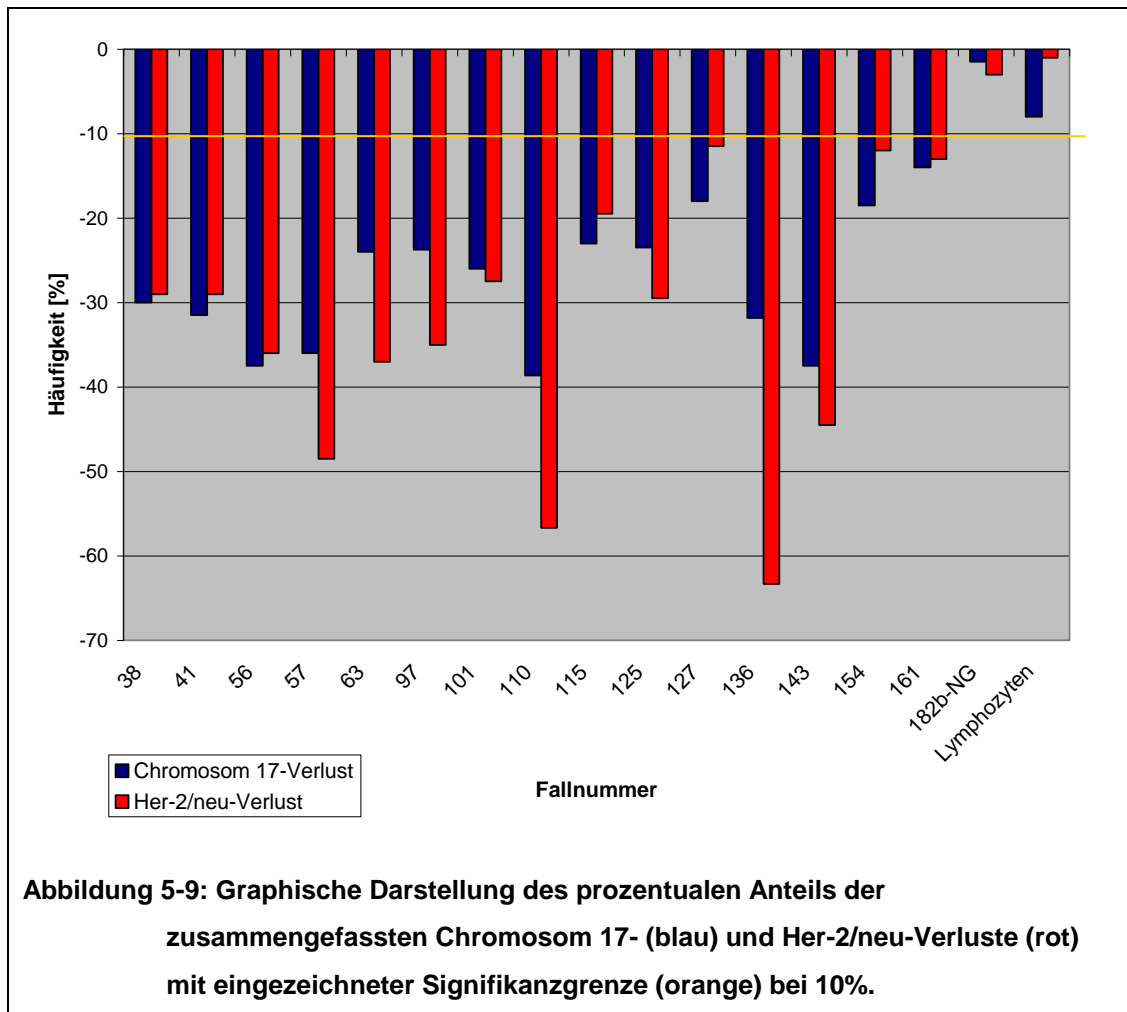
Fallnummer	G	Alter	Her-2/neu- GV [%]	-2 [%]	-1 [%]	NV [%]	+1[%]	+2[%]
038	W	72 J	29,0	12,5	16,5	69,0	2,0	-
041	M	49 J	29,0	8,5	20,5	68,5	2,5	-
056	M	70 J	36,0	10,5	25,5	64,0	-	-
057	W	40 J	48,5	23,5	25,0	50,5	1,0	-
063	M	20 J	37,5	14,5	23,0	62,5	-	-
097	W	33 J	35,0	13,1	21,9	65,0	-	-
101	M	38 J	27,5	11,5	16,0	72,0	0,5	-
110	M	57 J	56,7	26,7	30,0	43,3	-	-
115	W	63 J	19,5	2,0	17,5	80,0	0,5	-
125	M	77 J	29,5	9,5	20,0	70,0	0,5	-
127	M	77 J	11,5	3,0	8,5	88,0	0,5	-
136	M	58 J	63,3	33,3	30,0	36,0	0,7	-
143	M	44 J	44,5	14,0	30,5	53,5	2,0	-
154	M	40 J	12,0	2,0	10,0	85,0	2,0	0,5
161	W	76 J	13,0	4,0	9,0	85,5	2,0	-
181b	W	65 J	14,5	1,5	13,0	85,5	-	-
Ø			31,7	11,9	19,8	67,4	0,9	-
182b-NG	M	38 J	3,0	-	3,0	97,0	-	-
Lympho (XY)	M	k.A.	1,0	-	1,0	98,0	1,0	-

G= Geschlecht GV= Gesamtverlust NV= Normalverteilung M= männlich W= weiblich NG= Normalgewebe J= Jahre
Lympho = Lymphozyten Ø = Durchschnittswerte k.A.= keine Angaben

Tabelle 5-6: Vergleich der zusammengefassten signifikanten Verluste des Chromosoms 17 und des Her-2/neu-Gens mit Angaben des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Tag der Operation.

Fallnummer	G	Alter	#17-GV[%]	Her-2/neu-GV[%]
038	W	72 J	30,0	29,0
041	M	49 J	31,5	29,0
056	M	70 J	37,5	36,0
057	W	40 J	36,0	48,5
063	M	20 J	24,0	37,5
097	W	33 J	23,8	35,0
101	M	38 J	26,0	27,5
110	M	57 J	38,7	56,7
115	W	63 J	23,0	19,5
125	M	77 J	23,5	29,5
127	M	77 J	18,0	11,5
136	M	58 J	31,8	63,3
143	M	44 J	37,5	44,5
154	M	40 J	18,5	12,0
161	W	76 J	14,0	13,0
181b	W	65 J	11,0	14,5
Ø			72,4	67,4
182b-NG	M	38 J	1,5	3,0
Lympho (XY)	M	k.A.	8,0	1,0

G= Geschlecht #= Chromosom GV= Gesamtverlust M= männlich W= weiblich NG= Normalgewebe J= Jahre Lympho = Lymphozyten Ø = Durchschnittswerte k.A.= keine Angaben



Da keine signifikanten Gewinne nachgewiesen werden konnten, wurden im Folgenden nur die Verluste genauer analysiert. Das Blockdiagramm in Abbildung 5-9 zeigt eine der Tabelle 5-6 entsprechende graphische Darstellung der gesamten Chromosom 17 und Her-2/neu Verluste.

5.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse von Chromosom 17 und Her-2/neu

Alle molekularzytogenetisch untersuchten Fälle pleomorpher Adenome zeigten sowohl einen spezifischen Verlust der Zentromerregion von Chromosom 17 als auch einen spezifischen Verlust der Her-2/neu-Region auf Chromosom 17. Durchschnittlich wurde ein Verlust des Chromosoms 17 zu 26,6% (11 - 38,7%) verzeichnet. Dahingegen zeigte sich mit durchschnittlich 31,7% (11,5 - 63,3%) in Bezug auf Her-2/neu in einigen Fällen ein wesentlich höherer Verlust als dies im Fall des gesamten Chromosoms 17 der Fall war. Dieses Ereignis entspricht einer Chromosom 17 zu Her-2/neu Rate von 0,84.

Ausgeprägte Her-2/neu-Verluste kann man anhand von Abbildung 5-9 in den Fällen 57 (48,5%), 110 (56,7%), 136 (63,3%), 136 (63,3%) und 143 (44,5%) erkennen. Der prozentuale Anteil an Interphasekernen mit zwei Hybridisierungssignalen, was einer Normalverteilung des Chromosoms 17 und des Her-2/neu-Gens entspricht, betrug im Falle des Chromosoms 17 durchschnittlich 72,4% und für das Her-2/neu-Gen durchschnittlich 67,4%.

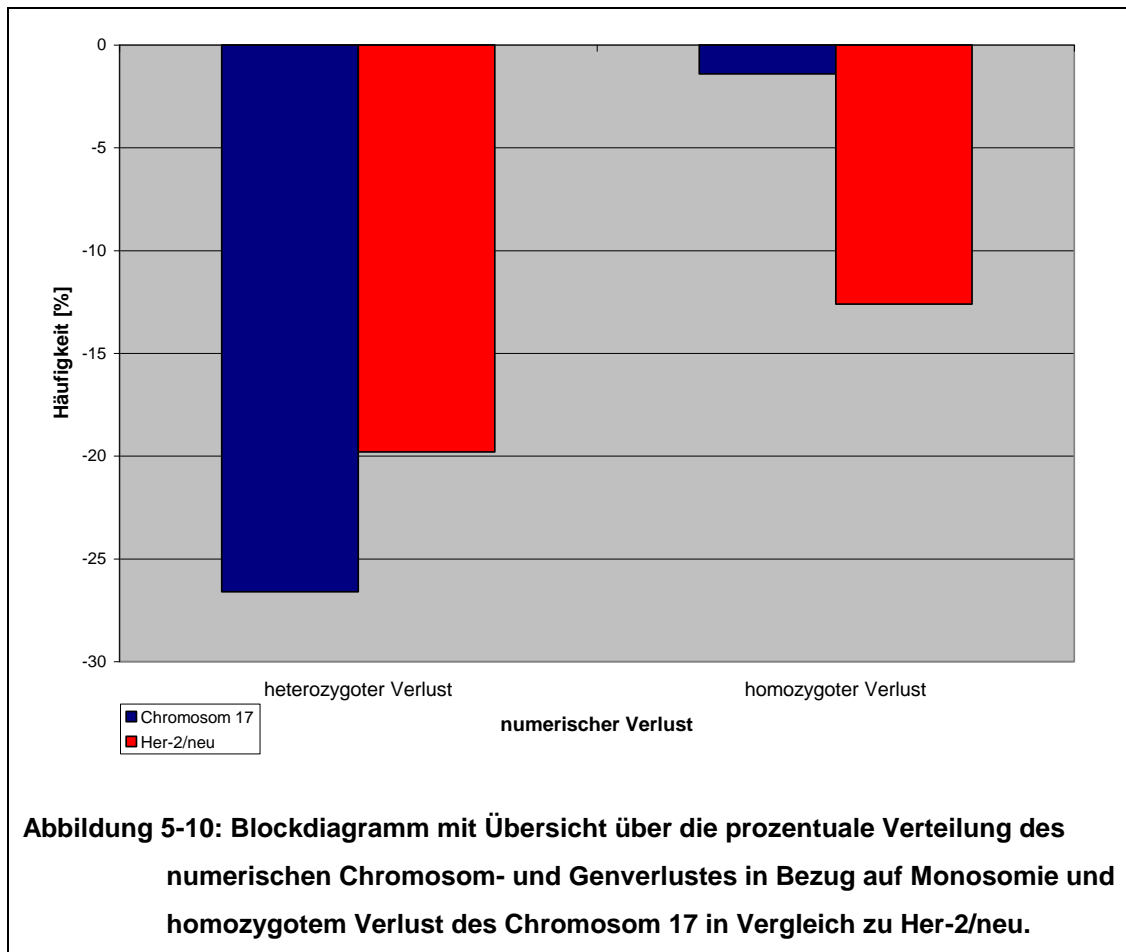


Abbildung 5-10 hingegen zeigt den prozentualen Anteil der Monosomie und homozygoten Deletion in Bezug auf das Chromosom 17 und Her-2/neu-Gen. Das Diagramm weist einen deutlichen Unterschied zwischen Chromosom 17- und Her-2/neu-Verlusten auf. Eine Monosomie 17 zeigt sich durchschnittlich in 25,8% (10,5% - 38,6%) der Fälle, während Verluste eines Her-2/neu-Gens nur zu 19,8% (8,5% - 30,5%) auftreten. In umgekehrter Weise zeigte sich der Verlust beider Her-2/neu-Allele in 11,9% aller analysierten Fälle, wobei aber nur 10 von 15 Probanden zu 0,9% (0,5%-3,5%) einen Verlust beider Chromosom 17-Signale aufweisen.

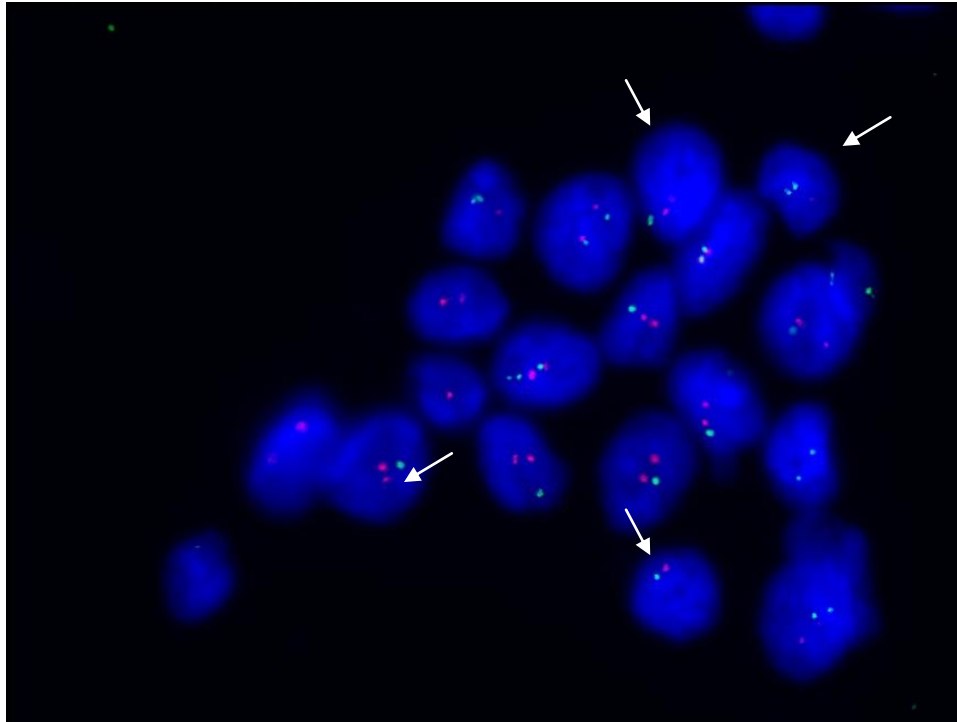


Abbildung 5-11: Tumorzellen eines pleomorphen Adenoms. Erkennbar sind Verluste der #17- (FITC-grün) und genspezifischen Her-2/neu-Sonde (Cy3-rot). Mit Pfeilen markiert zeigt sich hier sowohl eine Monosomie 17 (unterer Kern) als auch ein spezifischer Verlust des Her-2/neu Gens (oberer Kern). Kernfärbung mit DAPI (blau).

Abbildung 5-11 zeigt ein Beispiel für den im Blockdiagramm unter Abbildung 5-10 dargestellten inkohärenten Verlusten von Chromosom 17 und Her-2/neu. Deutlich ist anhand des oberen rechten Pfeils ein Interphasekern mit nur einem roten Hybridisierungssignal bei zwei grünen Chromosom 17-Signalen auszumachen. Der untere rechte Pfeil weist auf einen Zellkern, der als Exempel für den Verlust sowohl eines grünen Hybridisierungssignals als auch eines roten genspezifischen Her-2/neu-Signals dient.

5.5 FISH Resultate des Chromosoms 17 und p53

In diesem Teil der Studie wurde die FISH-Untersuchung wiederum mit einer Alpha-Satelliten-Sonde für das Chromosom 17 durchgeführt, wobei in dieser Analyse eine Kombination mit einer genspezifischen Sonde für p53 stattfand.

Eine FISH-Analyse zum Vergleich zwischen dem Chromosom 17 und p53 gelang aufgrund der eingeschränkten Gewebehaltbarkeit nur in zwei Fällen pleomorpher Adenome sowie in einem Lymphozytenpräparat. Die Tabellen 5-6 bis 5-8 fassen die Ergebnisse der FISH an pleomorphen Adenomen sowie den Lymphozyten Cut-off zusammen. Die Tabelle 5-8 zeigt den Vergleich der Gesamtverluste von Chromosom 17 und p53. Die dazugehörige graphische Darstellung liefert Abbildung 5-12. Ein Vergleich der numerischen Chromosomenaberrationen des Chromosom 17 und p53-Gendeletionen findet sich hingegen in Abbildung 5-13.

Tabelle 5-7: Prozentuale Veränderungen des Chromosoms 17 mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Tag der Operation.

Fallnummer	G	Alter	#17-GV [%]	-2 [%]	-1 [%]	NV [%]	+1[%]	+2 [%]
097	W	33 J	22,5	1,5	21,0	75,5	2,0	-
101	M	38 J	22,0	-	22,0	77,0	1,0	-
Ø	-	-	22,25	0,75	21,5	76,25	1,5	-
Lympho (XY)	M	k.A.	5,0	-	5,0	92,5	2,0	0,5

G= Geschlecht #= Chromosom GV= Gesamtverlust NV= Normalverteilung W= weiblich M= männlich J= Jahre
 Ø = Durchschnittswerte Lympho = Lymphozyten k.A.= keine Angaben

Tabelle 5-8: Prozentuale Veränderungen des Gens p53 auf Chromosom 17 mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Tag der Operation.

Fallnummer	G	Alter	p53-GV [%]	-2 [%]	-1 [%]	NV[%]	+1 [%]	+2 [%]
097	W	33 J	39,0	6,0	33,0	60,5	0,5	-
101	M	38 J	45,0	14,0	31,0	54,5	0,5	-
Ø			42,0	10,0	32,0	57,5	0,5	-
Lympho (XY)	M	k.A.	6,5	-	6,5	90,0	3,5	-

G= Geschlecht GV= Gesamtverlust NV= Normalverteilung W= weiblich M= männlich J= Jahre Ø = Durchschnittswerte Lympho = Lymphozyten k.A.= keine Angaben

Tabelle 5-9: Vergleich der zusammengefassten definitiven Gesamtverluste des Chromosoms 17 und dem p53-Gen mit Angaben des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Tag der Operation.

Fallnummer	Geschlecht	Alter	#17- GV [%]	p53- GV [%]
097	W	33 J	22,5	39,0
101	M	38 J	22,0	45,0
Ø			22,25	42,0
Lympho (XY)	M	k.A.	5,0	6,5

G= Geschlecht #= Chromosom GV= Gesamtverlust NV= Normalverteilung W= weiblich M= männlich J= Jahre Ø = Durchschnittswerte Lympho = Lymphozyten k.A.= keine Angaben

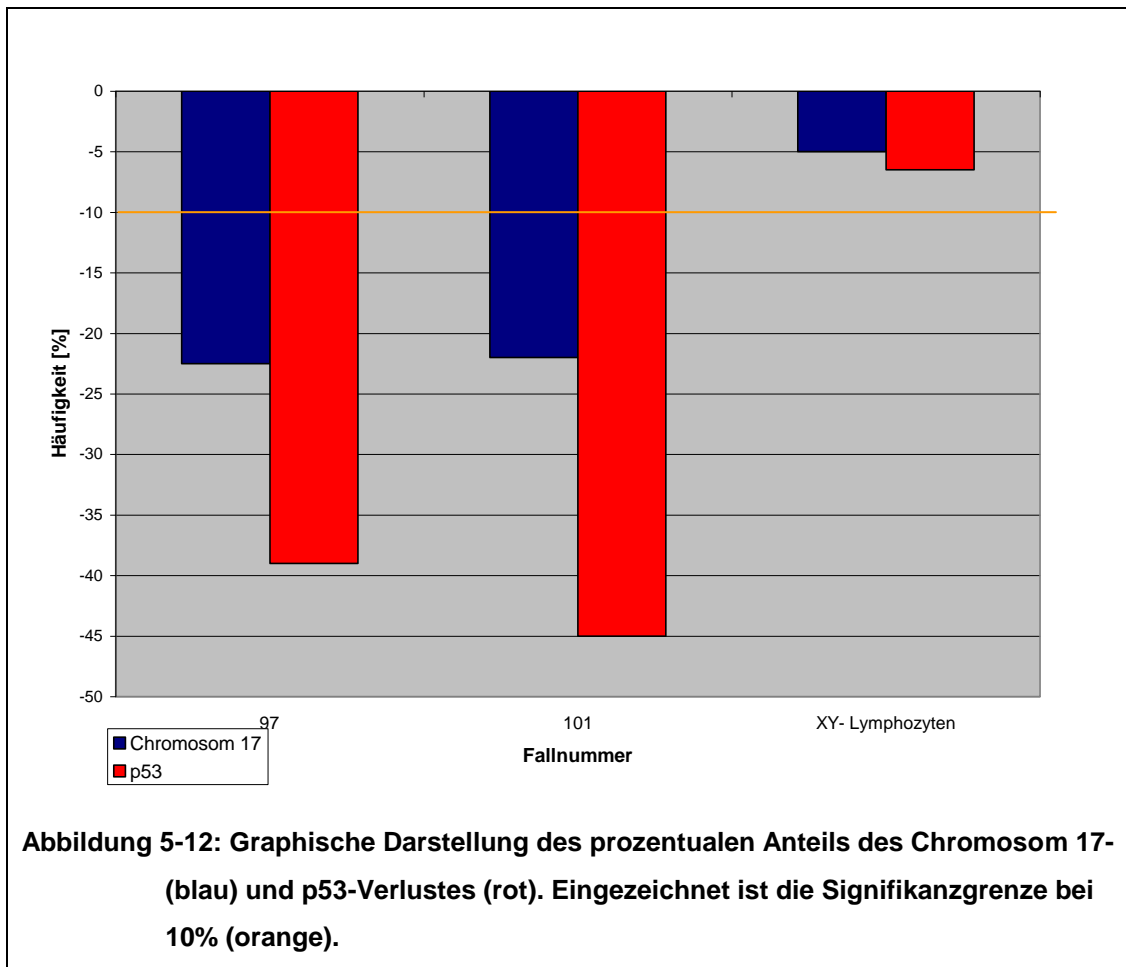
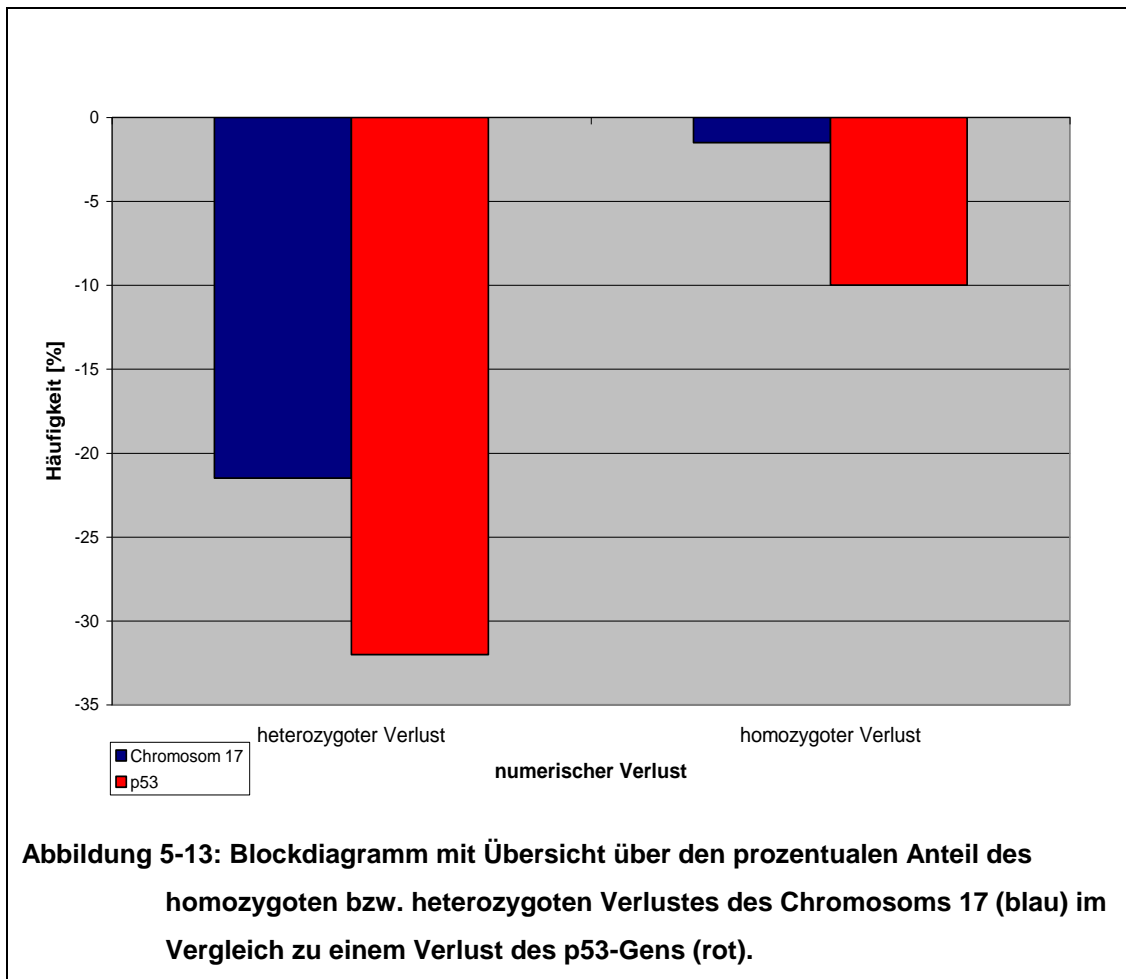


Abbildung 5-12: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils des Chromosom 17- (blau) und p53-Verlustes (rot). Eingezeichnet ist die Signifikanzgrenze bei 10% (orange).

Der Chromosom 17-Verlust war in beiden untersuchten Fällen nahezu identisch mit 22,5% im Fall 97 und 22,0% im Fall 101. Demgegenüber stand ein wesentlich höherer p53-Verlust mit 39% bzw. 45%. Dieses Ereignis entspricht einer Chromosom 17 zu p53-Rate von 0,53.

Einen geschlechtsspezifischen Vergleich ließ sich unter gegebenen Umständen von nur zwei analysierten Probanden nicht aufstellen.



Die Abbildung 5-13 zeigt deutlich die Differenz zwischen dem Verlust von Chromosom 17 und p53. So korreliert die Monosomie 17 nicht mit dem Verlust eines einzelnen p53-Gens, denn dieser übersteigt den Verlust eines einzelnen Chromosoms 17 um 10,5%. Auch der homozygote Verlust von Chromosom 17 liegt weit unter der Anzahl des Verlusts beider p53-Allele.

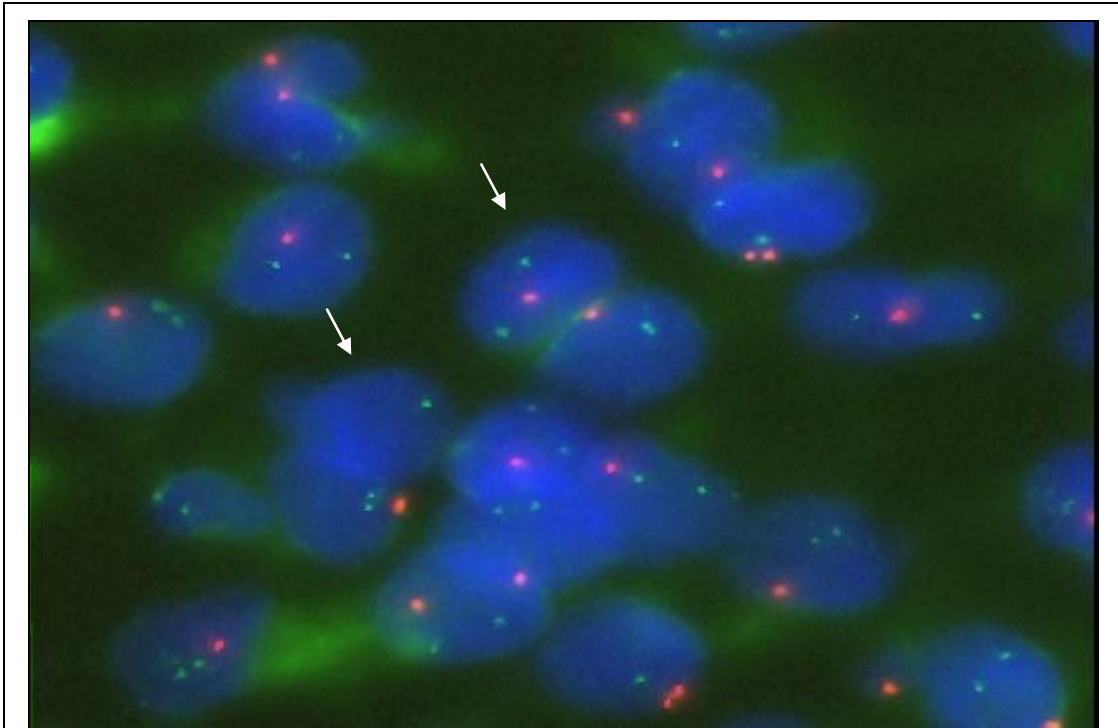


Abbildung 5-14: Beispiel eines pleomorphen Adenoms mit deutlichem p53-Verlust (Cy3-rot). In einigen Interphasekernen lässt sich zudem eine Monosomie 17 ausmachen (FITC-grün). Kernfärbung mit DAPI (blau).

Abbildung 5-14 zeigt ein Beispiel für den im Blockdiagramm unter Abbildung 5-13 dargestellten inkohärenten Verlusten von Chromosom 17 und p53. Deutlich ist anhand des oberen Pfeils ein Interphasekern mit nur einem roten Hybridisierungssignal bei zwei grünen Chromosom 17-Signalen auszumachen. Der untere Pfeil weist auf einen Zellkern, der als Exempel für den Verlust sowohl eines grünen Hybridisierungssignales als auch beider roten genspezifischen Her-2/neu-Signale dient.

5.6 Zusammenfassung der FISH- Resultate

Zusammenfassend kann man erkennen, dass sich genetische Veränderungen in pleomorphen Adenomen bezüglich aller verwendeten Sonden aufzeigen ließen (siehe Tab. 5-10). Häufige Verluste ließen sich vor allem im Bereich der Alpha-Satelliten-Sonde für das Chromosom 17 und die genspezifischen Sonden für Her-2/neu und p53 ausmachen. In allen Fällen konnte mindestens eine signifikante genetische Veränderung detektiert werden. In 1/2 Fällen, die auf fünf in dieser Studie verwendeten DNA-Sonden hin analysiert wurden, zeigten sich Verluste für alle fünf untersuchten Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte. In 9/13 Fällen zeigten sich bei vier verschiedenen verwendeten Sonden ein entsprechender Verlust von allen vier untersuchten Chromosomen bzw. Chromosomabschnitten.

Die Verluste der p53- und Her-2/neu-Gene waren mit einem oder zwei Alpha-Satelliten-Signalen des Chromosoms 17 assoziiert. Häufig fand sich in den analysierten Zellkernen eine Kombination von zwei Chromosom 17 Signalen mit Deletionen eines oder beider p53- oder Her-2/neu-Gene. Signifikante Gewinne oder Genamplifikationen konnte in keinem der untersuchten Fälle beobachtet werden.

Die detektierten numerischen Aberrationen zeigten in unserer Analyse eine Verteilung im gesamten Gewebeschnitt der pleomorphen Adenome und ließen somit keine Tumorheterogenität erkennen.

Tabelle 5-10: Zusammenfassung aller fünf untersuchten Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte mit Angabe des Geschlechts und dem Alter. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze von 10%.

Fallnummer	G	A (J)	Gesamtverlust				
			#X [%]	16p [%]	#17[%]	Her-2/neu[%]	p53[%]
021	W	28	40,5	6,0	-	-	-
025	M	31	11,0	15,1	-	-	-
038	W	72	24,5	11,0	30,0	29,0	-
041	M	49	12,5	15,5	31,5	29,0	-
056	M	70	26,0	11,0	37,5	36,0	-
057	W	40	20,6	1,5	36,0	48,5	-
063	M	20	13,5	15,5	24,0	37,5	-
072	M	69	11,4	22,8	-	-	-
082	M	62	8,0	12,0	-	-	-
084	M	46	7,5	27,5	-	-	-
097	W	33	29,5	17,0	23,8	35,0	39,0
101	M	38	9,0	24,0	26,0	27,5	45,0
110	M	57	23,5	8,5	38,7	56,7	-
115	W	63	34,5	13,0	23,0	19,5	-
125	M	77	17,0	23,5	23,5	29,5	-
127	M	77	34,0	20,0	18,0	11,5	-
136	M	58	6,7	17,8	31,8	63,3	-
141	W	48	20,5	27,5	-	-	-
143	M	44	15,0	22,0	37,5	44,5	-
154	M	40	23,5	14,0	18,5	12,0	-
161	W	76	21,0	7,5	14,0	13,0	-
181b	W	65	-	-	11,0	14,5	-
Ø			19,5	15,8	26,6	31,7	42,0
182b-NG	M	38	3,0	2,0	1,5	3,0	-
Lympho(XY)	M	k.A.	-	7,5	8,0	1,0	6,5
Lympho (XY)	M	k.A.	-	8,5	-	-	-
Lympho (XX)	W	k.A.	4,5	7,0	-	-	-

G= Geschlecht A= Alter J= Jahre #- Chromosom GV= Gesamtverlust NV= Normalverteilung M= männlich
W= weiblich NG= Normalgewebe Lympho = Lymphozyten Ø = Durchschnittswerte k.A.= keine Angaben

5.7 Vergleich der FISH- Resultate mit CGH-Voruntersuchungen

Voruntersuchungen zur genetischen Charakterisierung von Speicheldrüsentumoren des Labors der HNO-Klinik der Universitätsklinik Homburg und von Frau Birgit Sauter konzentrierten sich auf die CGH von Parotistumoren. Hierbei konnten Areale häufiger Gengewinne und -verluste detektiert werden. Die Lokalisationen der detektierten genetischen Veränderungen grenzten ätiologische Genloci ein, welche mit Hilfe der FISH-Analyse weiter charakterisiert wurden.

Die Tabelle 5-11 zeigt die experimentellen Resultate der FISH im Vergleich zu den CGH-Voruntersuchungen, welche von Frau Birgit Sauter im Rahmen ihrer medizinischen Doktorarbeit im Forschungslabor der HNO Klinik der Universitätsklinik Homburg/Saar an insgesamt 21 Fällen durchgeführt wurden.

In 3/21 Fällen zeigte sich mit Hilfe der CGH-Methode nur Deletionen und Translokationen außerhalb der in der FISH-Untersuchung verwendeten DNA-Sonden. In weiteren 3/21 Fällen zeigte sich im Gegensatz zur FISH ein normaler weiblicher Karyotyp. Im Fall 110 war eine molekularzytogenetische CGH-Untersuchung aufgrund mangelhafter Chromosome nicht möglich. In allen 21 untersuchten Fällen zeigte sich nur eine teilweise Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden. So konnte in 6/21 mit Hilfe beider Untersuchungstechniken ein signifikanter 16p-Verlust und in 3/21 Fällen ein Chromosom 17 und Her-2/neu- Verlust nachgewiesen werden. Bezüglich des Chromosoms X konnte in keinem der Fälle eine Übereinstimmung aufgezeigt werden. So konnte in der FISH-Analyse mit Hilfe der zentromerspezifischen X-Sonde in allen untersuchten pleomorphen Adenomen ein Verlust des Chromosoms nachgewiesen werden, während sich in der CGH-Untersuchung ausschließlich Gewinne des Chromosoms X ausmachen ließen. Über den Genabschnitt p53 läßt sich noch keine abschließende Aussage machen, da in den Fällen eines Chromosom 17 Verlustes in der CGH, eine entsprechende FISH-Untersuchung aufgrund der eingeschränkten Haltbarkeit des Gewebes nicht durchgeführt werden konnte.

Tabelle 5-11: Vergleich der FISH- mit den CGH Ergebnissen.

Fall	A (J)	G	FISH- Ergebnisse	CGH- Ergebnisse
021	28	W	- #X , - #16p	-16p -17p +6q14q23 +12q14q21
025	31	M	- #X , - #16p	+X -5q23qter -12q23qter -11q14qter
038	72	W	- #X , - #16p - #17, -Her2neu	+4q11q21
041	49	M	- #X , - #16p - #17 , - Her2neu	+4q12q13 -Y
056	70	M	- #X , - #16p - #17 , - Her2neu	+5q21q22 +13q22q33 -17 -19 -22
057	40	W	- #X , - #16p - #17, - Her2neu	Normalbefund
063	20	M	- #X, - #16p - #17, - Her2neu	+ X - 16p12p13.1 +1p21p22.2 -1q21.2q21.3 -4p16pter -8p23.1pter +8q21.3q22.1 -11q23.3qter -12p13.1pter -14q11.1q12
072	69	M	- #X, - #16p	+Xq -16p11.1-p11.2 -17p -1p32.3p35 +4p -12q23q24.3 -19q13.1q13.2 -20q13.1qter -22q12.1q13.2

Fall	A (J)	G	FISH- Ergebnisse	CGH- Ergebnisse
082	62	M	- #X, - #16p	+X -16p11.2- p13.2 -1p34.1p36.1 -4q22q34 -7q22q31.1 -10q22.2qter -11q23.1q23.3 +12p11p11.2 -15q15q25 -16q +19p -20q11.2q13.2 -22q11.2qter
084	46	M	- #X, - #16p	+Xq11.1q24 -16p -17 -1p36.1pter -10q24.3q25.3 +11p11.1p14 -12q24.1qter -14q24.1q31 -15q25q26.1 -20q12q13.2 -22q11.2q13.2
097	33	W	- #X,-#16p - #17, - Her2neu	-17q12q21.3 -1q31q32.1 -5p15.1pter -6p22.3p24 -8p21.1pter +11q11q13.3 -15q22.3q24 -16q23qter -20q13.1qter -22q11.2q13.1
101	38	M	- #X, - #16p - #17, -Her2neu	+X -16 -17q21.1q24 -1p36.1pter -1q32.1q41 +4p11p15.1 +4q11q13.1 +4q22q28 +4q32qter +5q11.1q22 +6q14q21 -10q24.3q25.3 -14q24.3q32.1 -19 -20 -22q11.1q12.3

Fall	A (J)	G	FISH- Ergebnisse	CGH- Ergebnisse
110	57	M	- #X, - #16p - #17, - Her2neu	Keine CGH - Ergebnisse vorhanden
115	63	W	- #X, - #16p - #17 - Her2neu	-17q22 -3q25.3qter -8p23.1pter +19p
125	77	M	- #X, - #16p - #17, - Her2neu	-16p11.2p13.2 -1p31.1pter -1q12q23 -1q31q32.1 -3p21.3p24.1 -7p14p15.1 -9q21q34.1 -15q15q24 -16q13q23 -18q12.3q22 -19q13.1q13.3 -20q12q13.2 -22
127	77	M	- #X, - #16p - #17, - Her2 neu	+Xp11.2p21.1 +Xq11.1q26 -8p21.1pter -9p -11q24qter -18q12.3q21.3 +19
136	58	M	- #X, - #16p - #17, - Her2neu	-8p22pter -11q24qter -18p11.1p12 -19p
141	48	W	- #X, - #16p	Normalbefund
143	44	M	- #X, - #16p - #17, - Her2neu	+Xq11.1q27
154	40	M	- #X, -16p - #17, - Her2neu	+17q21.1q25 -4p15.1pter -6q25.2qter -7p15.3p21 -9p11p13 -15q11.1q13 +19
161	76	W	- #X, - #16p - #17, - Her2neu	Normalbefund

= Chromosom grau unterlegt = Chromosomverluste unterhalb der Signifikanzgrenze fett markiert = Übereinstimmungen der Ergebnisse CGH und FISH M = männlich W = weiblich A= Alter J = Jahr G= Geschlecht k.A. = keine Angaben
-= Verlust += Gewinn

6 Diskussion

6.1 Methodendiskussion

6.1.1 Gewebeschnitte

In der von uns durchgeführten FISH- Untersuchung wählten wir Kryostatschnitte zum Anfertigen von Gewebeschnitten pleomorpher Adenome. Diese Entscheidung wurde zum einen wegen der schnelleren Herstellung im Gegensatz zu Paraffinschnitten getroffen. Zum anderen entfallen eine Reihe von Fehlerquellen, wie Dislokation leichtlöslicher Substanzen durch organische Lösungsmittel, Enzyminaktivierung unter anderem bei der Entparaffinierung, Hitzedenaturierung und Gewebeschrumpfung (Winckler, 1970).

Sehr dünne Gewebeschnitte bergen die Gefahr, Zellkerne anzuschneiden, so dass nur Teile des Zellkerns in der späteren Auswertung berücksichtigt werden und eine falsche absolute Signalanzahl analysiert wird. Zellkerne haben im Durchschnitt einen Durchmesser von 5µm. Nichtsdestotrotz besteht auch bei Gewebeschnitten von 5µm eine Wahrscheinlichkeit um die 50%, dass Zellkerne angeschnitten werden und mit entsprechendem Verlust von genetischem Material gerechnet werden muss. Auch die von uns gewählte Schnittbreite zwischen 5 und 7µm kann entsprechend der dreidimensionalen Struktur angeschnittene Zellkerne enthalten, welche fälschlicherweise als intakte Zellkerne gewertet wurden. Gerade die Zwei-Farben-FISH mit genspezifischen und zentromerspezifischen Sonden kann hierdurch im Endresultat ein falsches Verhältnis zwischen Gensignalen und Chromosomensignalen bzw. Polysomie/ Aneuploidie und Genamplifikation/-deletion ergeben (Lambros et al., 2007). Andererseits besteht bei der Wahl von dickeren Schnitten das Risiko, dass Zellkerne in mehreren Reihen überlappend vorliegen und infolgedessen für die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop ungeeignet sind. Schnitte >15µm

erfordern hierbei für das Auswerten der Hybridisierungssignale ein konfokales Laserrastermikroskop.

In der vorliegenden Studie wurden von uns Kryostatschnitte von nativem Tumormaterial mit einer Schnittdicke von meist 6µm gewählt. Ein großer Nutzen der Kryostatschnitte ist deren gleichmäßige Schnittdicke von Schnitt zu Schnitt, die allenfalls leichtere Unregelmäßigkeiten innerhalb eines Schnittes aufweisen, die zumeist auf Scharten des Messers zurückzuführen sind. Der Vorteil dieser Art von Gewebezubereitung ist zum einen die relativ einfache Vorgehensweise und zum anderen die Möglichkeit der schnellen Verarbeitung. So kann nach entsprechender Trocknungszeit die FISH-Analyse direkt angeschlossen werden. Wurde auf eine direkte Weiterverarbeitung verzichtet, so mussten die fixierten Gewebeschnitte bei -20°C tiefgefroren werden. Es stellte sich jedoch in unserer Studie heraus, dass diese Art der Aufbewahrung inkompatibel mit der Erhaltung der Architektur und der zytologischen Eigenschaften des Gewebes ist. Es zeigte sich bereits nach sechs bis acht Monaten eine ungenügende Hybridisierungseffizienz der eingesetzten Sonden mit fehlenden Hybridisierungssignalen. Der Versuch die Aufbewahrungsbedingungen zu optimieren und Kryostatschnitte bei -80°C einzufrieren, konnte diese Haltbarkeit nicht positiv beeinflussen.

Die Verwendung von Gewebeschnitten bietet den Vorzug, dass unabhängig von dem Risiko der klonalen Selektion bei Zellkulturen gearbeitet werden kann. Weiterhin liegen die Zellen in ihrem ursprünglichen Gewebeverband vor, so dass die genetischen Aberrationen einer Zelle zusammen mit deren Morphologie und Lokalisation im Zellverband betrachtet werden können (Fuller et al., 2002). Die Herstellung einer engen Beziehung zwischen genetischen Veränderungen und Morphologie sind essentiell, um eine Verbindung zwischen molekularer oder zytogenetischer Veränderungen und Malignität herzustellen. Zusätzlich ließ sich diese Korrelation zwischen Morphologie und genetischen Veränderungen verbessern, in dem wir einen Gewebeschnitt der FISH-Analyse mit dem HE-gefärbten Schnitt desselben Gewebblocks verglichen. Hierdurch bestand die Möglichkeit einen eventuellen Zusammenhang zwischen zellreich/zellarm sowie stromareich/stromaarm und den in jedem spezifischen Fall detektierten genetischen Aberrationen

herzustellen und eine eventuelle Tumorheterogenität zu beurteilen. In unserer Studie konnte keine Korrelation zwischen der Tumorhistologie und den detektierten genetischen Veränderungen aufgezeigt werden (siehe Tabelle im Anhang).

6.1.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die FISH-Technik erlaubt die Identifizierung verschiedenster zytogentischer Veränderungen wie Aneuploidie, Duplikation, Amplifikation, Deletion und Translokation auf der Einzelzellebene. Für diese Untersuchungen stehen drei verschiedene Arten von Hybridisierungssonden zur Verfügung. Die von uns verwendeten chromosomen-spezifischen Sonden für Chromosom X und 17 werden zur Detektion von numerischen Aberrationen verwendet. Dem gegenüber stehen lokusspezifische Sonden für die Erforschung von Deletionen, Duplikationen oder Amplifikationen spezifischer Gene sowie DNA repeat-probes für das Ausmachen von heterochromatischen Regionen. Bei den von uns verwendeten genspezifischen Sonden Her-2/neu oder p53 muss allerdings immer in Erinnerung behalten werden, dass Ereignisse, wie Basenaustausch und Deletionen weniger Basen mit dieser Methode nicht identifiziert werden können.

Ein weiterer Nutzen der Interphase-Zytogenetik ist die Möglichkeit auch archiviertes Material retrospektiv auf Chromosomenaberrationen hin untersuchen zu können. Die Detektionsrate ist zudem wesentlich höher als bei der Verwendung klassischer zytogenetischer Untersuchungen (Babu & Wiktor, 1991). So wurden von uns alle in der Tumorbank der Universitätsklinik Homburg zur Verfügung stehenden pleomorphen Adenome mit ausreichend vorhandenem Tumormaterial in diese Untersuchung einbezogen.

Häufig findet eine FISH-Analyse, wie auch in unserer Studie, an Gewebe, Kernen oder Chromosomen statt, welche auf Objektträger aufgetragen und fixiert werden. Dadurch werden der FISH-Technik in mehrerer Hinsicht Grenzen gesetzt. So vermag sich die Einschätzung der Chromosomenanzahl durch das Übereinanderliegen mehrere Chromosomendomänen als falsch erweisen. Die Beschaffenheit des

Gewebes sowie die teilweise eingeschränkte Möglichkeit der Denaturierung mit dementsprechend beeinträchtigter Hybridisierung erhöht die Unsicherheit, dass das ausgezählte Ergebnis den tatsächlichen chromosomalen Veränderungen entspricht.

Aus diesem Grunde verwendeten wir Parotis-Normalgewebe als Referenzwert der FISH-Analyse, da Lymphozyten nicht direkt vergleichbar mit einem Gewebeschnitt sind. Lymphozyten liegen nicht als Zellverband vor, so dass Fehler durch angeschnittene Zellkerne vernachlässigbar sind. Zudem werden die Zellkerne der Lymphozyten nicht von Bindegewebssepten überlagert, so dass diese sich einer Auswertung nicht entziehen.

Als Referenzwert für die Sondendurchlässigkeit wird meist auf Lymphozyten zurückgegriffen, aber auch hier zeigten sich gewisse Einschränkungen der Ergebnisse. Die Detektion nur eines Signals statt der erwarteten zwei ist in 5% der Interphase-Lymphozyten die Folge von übereinanderliegenden Signalen (Griffin et al., 1991) und die am Mittelwert berechnete notwendige Signifikanzgrenze wird fälschlicherweise zu hoch angelegt. Das Kontrollgewebe in unserer FISH-Analysen lieferte mit Signalverlusten zwischen 1,5-3,0% sehr gute Hybridisierungsergebnisse, so dass technische Probleme wie Fehlhybridisierung und Artefakte durch den Kontrollgewebeschnitt praktisch ausgeschlossen werden konnten.

6.1.3 Proteolytischer Verdau

Das pleomorphe Adenom ist durch seinen vielgestaltigen Aufbau unterschiedlich differenzierter Epithelzellen und modifizierter Myoepithelzellen sowie Menge und Beschaffenheit des Stromas gekennzeichnet. Dies erschwert die genaue Festlegung einer proteolytischen Verdauzeit und erfordert mehrere Versuchsreihen, bis optimale Hybridisierungsergebnisse erzielt werden konnten. Im Durchschnitt lag die Pepsinverdauzeit in unserer Untersuchung mit 4 Minuten etwas unter der von Lambros et al. (2006) empfohlenen Durchschnittszeit von 6 Minuten für Mamma-, Hirn- sowie Speicheldrüsengewebe. Lambros et al. beobachteten, dass eine Verdauzeit unter 4 Minuten in den meisten Geweben zu einem vollständigen Signalverlust führt,

während ein Verdau über 10 Minuten die morphologischen Charakteristika beeinträchtigen und zu undeutlichen Fluoreszenzsignalen führen konnten. Eine optimale Verdauzeit muss allerdings für jedes spezifische Gewebe und dort von Fall zu Fall einzeln festgelegt werden. In unserer Studie lag die durchschnittliche Verdauungszeit für den Erhalt optimaler Hybridisierungsergebnisse bei 4 Minuten.

Ein wichtiger Faktor für das Gelingen der FISH, ist die Freilegung des Gewebes von Zytoplasma und anderen zellulären Strukturen. Diese Einflussgrößen zeigen sich nicht direkt, sondern lassen sich erst in der späteren Detektion zum Beispiel als starke Hintergrundfluoreszenz oder unklare Zellkerngrenzen erkennen und beeinträchtigen die Auswertung. Das Verhältnis der Hintergrundfluoreszenz zu der Signalfluoreszenz ist jedoch von entscheidender Bedeutung für das FISH Ergebnis und kann Ursache von Artefakten sein. Ein inadäquater Pepsinverdau zytologischer Präparate kann dazu führen, dass Zellkerne durch verbleibendes Zytoplasma verdeckt vorliegen und dadurch ein Zugang der Sonden zu ihren Zielregionen im Zellkern verhindert wird (Xiao et al., 1995).

6.1.4 Sonden

In unserer Studie kamen sowohl repetitive als auch lokusspezifische Sonden zum Einsatz. Zu den repetitiven Sonden zählen zum einen die sogenannten Alpha-Satelliten-Sonden, die an oder nahe der Zentromerregion spezifischer Chromosomen binden (Chromosom X- bzw. Chromosom 17-Sonde in dieser Arbeit) und zum anderen solche, die an Telomerregionen (Chromosom 16p- Sonde in dieser Arbeit) binden. Zentromerspezifische Sonden kommen häufig bei der Beurteilung von Aneuploidie in Tumorzellen zur Anwendung, indem der Verlust oder Gewinn ganzer Chromosomen beurteilt wird (Gray & Pinkel, 1992). Es muss jedoch betont werden, dass bei der Verwendung zentromerspezifischer Sonden keine Aussage über strukturelle Veränderungen getroffen werden kann (Persons et al., 1996). Hierzu ist eine Kombination mit anderen nicht zentromerspezifischer Sonden und Metaphasechromosome vonnöten, die die Möglichkeit bieten, strukturelle

Aberrationen mit dem Bruchpunkt nahe der Zentromerregion zu detektieren (Janz et al., 1995). Solche Sonden ergeben in schlecht fixiertem oder suboptimal aufgearbeitetem Gewebe wiederum zum Teil ungünstige Signale, die zentromernahe Signale überlagern können. Dieses Phänomen kann in unserer FISH-Analyse ausgeschlossen werden, da die lokusspezifischen Gensonden Her-2/neu und p53 in ausreichender Entfernung zur Zentromerregion binden.

Der Vorteil solcher Proben ist die enge Nachbarschaft repetitiver Sequenzen innerhalb begrenzter Bereiche in Interphasekernen. Durch die Wahl dieser Sondenart konnten wir nach der Hybridisierung intensive Fluoreszenzsignale erreichen und durch das vereinfachte Auszählen der Signale numerische Chromosomenaberrationen leichter ermitteln (Trask et al., 1988). Eine verminderte Anzahl solcher Interphasesignale einer spezifischen Alpha-Satelliten Sonde kann hierbei als Zentromerverlust dieses Chromosoms interpretiert werden. Diese Sondenart gibt gleichwohl keine Informationen über strukturelle Abnormalitäten, so dass das vermeintlich verloren gegangene Chromosom zu Teilen auf einem anderen Chromosom transloziert sein könnte. Eine über die normalen zwei Allele eines Chromosoms hinausgehende Signalzahl kann den Zugewinn eines gesamten intakten Chromosoms oder den Gewinn eines Chromosoms mit zusätzlichen strukturellen Abweichungen bedeuten (Persons et al., 1993).

Lokusspezifische Sonden (Her-2/neu bzw. p53), welche für die Bindung an spezifische Chromosomenregionen konzipiert sind und eine Region bekannter Aberrationen markieren, erhöhen die Sensitivität und Genauigkeit struktureller Aberrationen der FISH-Technik (Price, 1993). Weiterhin kommt dieser Art von Sonden die Identifizierung von strukturellen chromosomalen Veränderungen wie Translokationen oder Genamplifikationen zugute. Bei dem Ermitteln von Translokationen in Metaphasepräparaten besteht dagegen das Problem, dass diese in der Regel nicht mittig innerhalb der fluoreszenzmarkierten Region auftreten. Translokationen zwischen Metaphasechromosomen lassen sich besser mit Hilfe von „Chromosome painting“, einem Gemisch chromosomspezifischer Sequenzen

detektieren, die mehr oder weniger entlang des gesamten Chromosoms hybridisieren (Pinkel et al., 1986a,b).

6.1.5 Hybridisierung/Denaturierung und Stringenzwaschung

Die FISH-Untersuchung orientierte sich an der langjährigen Erfahrung und dem laborspezifisch erstellten Protokoll der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg/Saar. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist im speziellen abhängig von der Möglichkeit der Ziel-DNA Zugang zu dem Hybridisierungsreagenz zu erhalten und in welchem Ausmaß eine unspezifische Bindung unterdrückt werden kann (Pinkel et al. 1986a,b). Ziel der Zeit- und Temperaturfestlegung während der einzelnen Denaturierungs- und Hybridisierungsschritten ist die Gewebeintegrität und eine maximale Hybridisierungseffizienz zu erhalten. Weiterhin dienen die Vorbehandlungen des Gewebes, das Eindringen der Sonde in den Zellkern zu optimieren und durch das Entfernen des Zytoplasmas, nukleärer Proteine und der RNA die Signalstärke zu intensivieren (Price, 1993).

Die der Hybridisierung anschließenden Waschung dient dem Entfernen unspezifisch hybridisierter Sonden. Eine mangelnde Stringenzwaschung birgt die Gefahr, dass eine hohe Anzahl an unspezifischen Hybridisierungsbindungen auftritt, welche in der Auswertung als Zuviel an Signalen gewertet wird. Dabei macht es in Bezug auf Hintergrundsignale keinen Unterschied, ob hierbei Lösungen mit oder ohne Formamid verwendet werden (Evans et al., 2003). Aus diesem Grunde wurde von uns 50%FA/2x SSC zur Durchführung der Stringenzwaschung verwendet. Unter diesen Bedingungen zeigten sich in unserer Versuchsreihe kaum Hintergrundstörungen und ein gutes Auszählen der Fluoreszenzsignale war möglich.

6.1.6 Aufnahme und Auswertung

Nach erfolgreicher Hybridisierung wurden alle Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und pro Präparat 200 Interphasekerne auf die Anzahl der Hybridisierungssignale hin ausgezählt. Hier zeigte sich durchschnittlich in 75,5% jeder eingesetzten Sonde eine Normalverteilung mit zwei Hybridisierungssignalen pro Zellkern. Eine Streuung um diesen Erwartungswert kann sich jedoch aufgrund von Fehlhybridisierung, Verlust von Chromosomenstrukturen während der Präparation, somatische Chromosomenpaarung oder in wenigen Fällen auch durch Veränderungen des Karyotyps *in vivo* ergeben. Aus diesem Grunde erfolgte, wie in Kapitel 5.1 beschrieben, die Festlegung eines Cut-Offs, um in einem Präparat signifikante Aberrationen von einer reinen Streuung um den tatsächlichen Wert zu unterscheiden.

Wichtig für eine maximale Sensitivität und Spezifität der FISH-Untersuchung ist die Berücksichtigung bestimmter Kriterien bei der Auswertung. Zum einen muss man sich vergewissern, dass die Tumorzellkerne Hybridisierungssignale aufweisen, die von Hintergrundfluoreszenzen unterschieden werden können. Zum anderen werden überverdaute oder mechanisch zerstörte Zellkerne aus der Wertung genommen, um einer Abweichung von dem tatsächlichen genetischen Material entgegenzuwirken. Weiterhin werden von uns nur nicht überlappende Zellkerne mit ähnlichem Durchmesser in die Analyse eingeschlossen, um Tumorzellen gegen andere Zellen abzugrenzen und ein authentisches Ergebnis zu erhalten. Auch Zellen mit mangelndem Pepsinverdau konnten nicht in die Begutachtung eingefasst werden, da durch die vermutlich inkomplette Hybridisierung die FISH-Resultate unzuverlässig wären. Um eine mögliche Tumorerogenität auszumachen, wurden bei der Auszählung mehrere Areale des Gewebeschnittes evaluiert.

Ein gravierendes Problem bei der Auszählung und Aufnahme von Fluoreszenzpräparaten besteht darin, dass Fluorochrome nach langer Belichtung verblassen und diese Präparate nur noch unzuverlässige Fluoreszenzsignale aussenden. Diese Einschränkung ergibt sich auch bei der Archivierung der Ergebnisse, da die Signal-

stärke mit der Zeit nachlässt, und diese Präparate für eine erneute Auswertung nicht mehr verfügbar sind. So müssen dokumentierende Bilder von dem jeweiligen Objekt aufgenommen werden, was wiederum eine hoch auflösende CCD-Kamera erforderlich macht. Für diese Aufnahme muss ein geeigneter Bereich innerhalb des Präparates aufgesucht und optimal eingestellt werden, so dass bereits bei der ersten Aufnahme ein ideales Bild entsteht und eine weitere Belichtung entfällt. Die zeitintensivste Aufgabe im Rahmen der FISH-Technik besteht in dem Auszählen und der Analyse der Fluoreszenzsignale. Der Untersucher benötigt hierzu ein spezifisches Training, um Artefakte in archivierten Präparaten, wie zum Beispiel unspezifische Hybridisierung, Autofluoreszenz und angeschnittene Zellkerne, von der spezifischen Sondenhybridisierung zu unterscheiden (Lambros et al., 2007). Trotz allem variieren die Ergebnisse untersucherabhängig in einer einzukalkulierenden geringen Abweichung.

Signale können zum Teil je nach Kondensations- und Fixierungszustand auch dicht nebeneinander liegen und als ein Signal erscheinen und dadurch ein Missverhältnis zwischen Hybridisierungssignalen und tatsächlichen Chromosomenanzahl hervorrufen. Die Wahrscheinlichkeit dieser Erscheinung erhöht sich mit zunehmender Anzahl, der mit Hilfe der FISH-Technik zu untersuchenden Chromosomen. Zudem kann ein Hybridisierungssignal aufgesplittet vorliegen und den Anschein erwecken, zwei Chromosomen seien hybridisiert worden (Persons et al., 1996, Jacobs et al., 1999, Hammock et al., 2003; Dowsett et al., 2003).

Ein weiterer Nachteil der sich auf das Auflicht-Fluoreszenzmikroskop bezieht, entsteht durch verschwommene Bildbereiche mit unscharfen Strukturabbildungen, wenn diese sich nicht mehr in der Brennebene befinden. Weiterhin beeinträchtigen Hintergrundsignale die Signalauswertung. Die Hybridisierungssignale können jedoch durch Durchfokussieren der verschiedenen Zellebenen scharf eingestellt werden. Die Erforschung neuerer chemischer Reaktionen zur Reduktion dieser störenden Fluoreszenzhintergründe ist in Vorbereitung. Solche chemischen Mechanismen sollen dafür sorgen, dass Fluorochrome nur dann aufleuchten, wenn sie tatsächlich an ihrer komplementären Zielsequenz binden (Hausmann et al., 2004).

Zusammenfassend stellt die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ein einfaches Verfahren dar, welches mit Hilfe von repetitiver Sequenzen, chromosomen- oder lokusspezifischer Sonden die Detektion numerischer oder struktureller Aberrationen in menschlichen Tumoren enorm erhöht. Dabei ist eine wichtige Eigenschaft die Möglichkeit, bereits in geringen Zellmengen genetische Aberrationen zu bestimmen, ohne auf die Mitoserate angewiesen zu sein. Dies ermöglicht die Differenzierung von Tumorrezidiven oder -frühstadien (Gray & Pinkel, 1992), indem spezifische Sonden für bekannte genetische Aberrationen des Tumors zum Einsatz kommen.

6.2 Ergebnisdiskussion

Das pleomorphe Adenom stellt die häufigste benigne Raumforderung der Speicheldrüsen dar und weist zu 80% eine Lokalisation in der Glandula parotis auf. Mikroskopisch ist es durch ein buntes Bild epithelialer und mesenchymaler Anteile gekennzeichnet, wobei der epitheliale Anteil für das Proliferationsverhalten verantwortlich gemacht wird. Es bestehen zahlreiche Versuche die Tumorgenese der pleomorphen Adenome zu erörtern. Bisher ist allerdings weiterhin unklar, ob genetische Ereignisse die Ursache der Tumorentstehung bilden oder Folge der Tumorprogression sind. Chromosomale Analysen ergaben charakteristische Translokationen der Chromosomenbereiche 3p, 8q und 12q. Mehrere Studien schreiben dem pleomorphen Adenom jedoch eine geringe Variation an genetischen Aberrationen mit nicht signifikanten numerischen Chromosomverlusten zu. So mutmaßte El-Naggar, dass benignen Speicheldrüsentumoren Aneuploidien sowie numerische chromosomale Veränderungen fehlen (El-Naggar et al., 1997b).

Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe des Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg und Frau Birgit Sauter konzentrierten sich auf die vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) von Parotistumoren zur genetischen Charakterisierung von Speicheldrüsentumoren mittels CGH konnten in pleomorphen Adenomen Areale häufiger Genomgewinne und -verluste detektiert

werden. So zeigten sich häufige Verluste von Chromosom 17 und dem Chromosomenabschnitt 16p sowie Gewinne des X-Chromosoms. Nach dieser groben Analyse der quantitativen genomischen Veränderungen sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der FISH die Konsensusregionen der Veränderungen bestätigt bzw. näher eingegrenzt werden. Die FISH-Methode wurde für die folgende Studie ausgewählt, da diese Technik für gezielte Sonden über eine beträchtlich höhere Auflösung im Vergleich zur CGH-Methode verfügt. Generell kann eine FISH eine genetische Veränderung bereits in einer geringen Anzahl von betroffenen Zellen detektieren, während die CGH eine Aberration erst bei 40-50% betroffener Tumorzellen ausmacht

Wir führten in unserer Studie eine FISH-Analyse mit Sonden für Chromosom X, dem kurzen Arm von Chromosom 16 sowie Chromosom 17 und die auf Chromosom 17 liegenden spezifischen Genloci für Her-2/neu und p53 durch. Die untersuchten genetischen Veränderungen der pleomorphen Adenome bestätigten teilweise die Voruntersuchungen mit der CGH Methode. So konnte auch in dieser Studie auf Basis der CGH-Voruntersuchungen Konsensusregionen ausgemacht werden, die mit Hilfe der FISH genauer analysiert wurden.

Die häufig gefundenen Verluste von 16p und Chromosom 17 aus der CGH konnten mit der FISH Untersuchung am Gewebeschnitt teilweise bestätigt werden. Die Ergebnisse des Chromosomenabschnittes 16p stimmten hierbei in 37,5% der Fälle überein, die von Her-2/neu in 20% und die von Chromosom 17 nur in 6,7% der Fälle. Über Verluste des p53-Gens lassen sich aufgrund der nicht repräsentativen Fallanzahl keine klaren Aussagen treffen. Wir konnten bezüglich dieses Gens in unserer Studie keine Übereinstimmung der Ergebnisse aufdecken. Während sich in der FISH-Analyse in den Fällen 97 und 101 ein deutlicher Verlust des Gens nachweisen ließ, zeigte sich in den CGH-Untersuchungen in diesen beiden Fällen kein Hinweis auf Verluste des Chromosomenabschnitts 17p. Diese Differenzen erklären sich dadurch, dass die genetischen Veränderungen in den untersuchten Fällen vermutlich in weniger als 40-50% der Zellen auftraten und somit von der CGH nicht erfasst werden konnten (Wemmert et al., 2006). Zum anderen ist jedoch auch der Gedanke der

Heterogenität des Gewebes nicht außer acht zu lassen. Die unterschiedlichen Befunde können sich zusätzlich durch die Analyse eines unterschiedlichen Verhältnisses der beiden Zelltypen ergeben. Dies kann je nach verwendetem Gewebeschnitts innerhalb des Tumors zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Nicht übereinstimmende Resultate im Vergleich zu den CGH-Analysen zeigen sich vor allem bei den Ergebnissen des X Chromosoms. So ließen sich die in der CGH in acht von 22 Fällen (36,4%) detektierten Gewinne nicht bestätigen. Vielmehr konnten mit der Zentromersonde häufige Verluste des Chromosoms X detektiert werden. So zeigte sich in 17 von 21 Fällen (81%) der Verlust des Chromosoms X. Probleme in der Interpretation von CGH's bei den Geschlechtschromosomen sind jedoch seit langem bekannt. Vermutlich werden diese durch den hohen Anteil an repetitiven Sequenzen auf diesen Chromosomen verursacht.

Unter den 21 untersuchten Fällen befanden sich 14 Männer und 7 Frauen. In der von uns durchgeführten Studie konnte die in der Literatur vielfach beschriebene geringe Geschlechtsprävalenz für das weibliche Geschlecht nicht beobachtet werden. Es zeigte sich vielmehr ein Verhältnis von 2:1 für das männliche Geschlecht. Daneben lassen die Hybridisierungsergebnisse der FISH-Analyse keinen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied bezüglich der eingesetzten Sonden erkennen. Allerdings können in Anbetracht der geringen Fallzahl über solche vergleichenden Beobachtungen keine signifikante Aussage getroffen werden. Um einen Rückschluss auf eventuelle geschlechtsspezifische genetische Veränderungen zu ziehen, bedarf es einer größeren Anzahl an Probanden beider Geschlechter.

Weiterhin konnten wir unter den pleomorphen Adenomen keine Untergruppe mit normalem Karyotyp ausmachen, wie es unter anderem von Bullerdiek in 52% der mit Hilfe von G-Bänderung untersuchten 69 pleomorphen Adenomen beschrieben wurde und auch in den CGH-Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg in 3/21 Fällen feststellte. Diese Differenz in den Untersuchungsergebnissen mag Folge zahlreicher Faktoren, wie Fallauswahl und die höhere Sensitivität der FISH im Vergleich zur CGH sein.

Histologisch neigen die stromareichen pleomorphen Adenome eher zu Rezidiven (Goudot et al., 1989), während im Gegensatz hierzu die stromaarmen pleomorphen Adenome vermehrt eine maligne Transformation aufweisen (Seifert et al., 1976). Wir konnten in Anbetracht unserer HE-gefärbten Kryostatschnitte keine histologische Zuordnung zu den gefundenen Chromosomen- und Gendelektionen vornehmen. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen zellreich/stromaarm und zellarm/stromareich und den einzelnen FISH-Resultaten. Dies lässt vermuten, dass stromaarme pleomorphe Adenome mit der Neigung zur malignen Transformation nicht unbedingt einen hohen Anteil genetischer Aberrationen aufweisen müssen, sondern vielmehr spezielle bisher unbekannte Mechanismen der Tumorentartung bei pleomorphen Adenomen bestehen.

6.2.1 Deletionen des X-Chromosoms

Über, das X Chromosom betreffende Chromosomaberrationen in pleomorphen Adenomen, ist bisher nur wenig in der Literatur beschrieben worden. Ergebnisse verschiedener Untersuchungen in Bezug auf das X Chromosom wurden nur als zytogenetische Befunde in die Auswertung aufgenommen, ohne eine mögliche Relevanz in der Tumorgenese zu diskutieren (Jin et al., 2001; Röser et al., 2001). Eine Ursache, dass das X Chromosom nur selten in Untersuchungen erwähnt wird, mag an der Tatsache liegen, dass molekularzytogenetische Untersuchungen wie CGH und molekulargenetische LOH-Studien, nur schlecht oder gar kein Ungleichgewicht der X Chromosomenallele in männlichen Patienten detektieren (Jiang et al., 1998). Dies vermag auch die Unterschiede zwischen den CGH- Daten und den Ergebnissen der FISH- Analyse in unserer Studie erklären. FISH ist spezifischer und nicht anfällig für die Fehler der CGH bei den Geschlechtschromosomen. Probleme in der Interpretation von CGH's bei den Geschlechtschromosomen sind seit langem bekannt. Diese werden vermutlich durch den hohen Anteil an repetitiven Sequenzen

auf diesen Chromosomen verursacht. Aus diesem Grunde schließen viele Arbeitsgruppen die Geschlechtschromosome bei CGH-Untersuchungen von der Auswertung aus.

In unserer Studie zeigte sich mit durchschnittlich 19,5% in 17/21 untersuchten Fällen ein Chromosom X-Verlust. Darunter zeigte sich bei den Männern in 15,6% der Verlust eines X Chromosoms und unter den weiblichen Probanden in 20,8% der Verlust eines X Chromosoms und im Mittel bei den Frauen zu 6,5% der Verlust beider X Chromosomen.

Allelverluste des X Chromosoms, wurden bereits in mehreren Neoplasien beobachtet. Hierzu zählen epitheliale Ovarial-, Zervix- und Mammakarzinome sowie das renale Onkozytom (Mitra et al., 1994; Monroe et al., 1995; Loupart et al., 1995; Persons et al., 1996). Auch in Meningeomen konnte oftmals eine Monosomie des X Chromosoms ausgemacht werden, die häufig eine Assoziation mit dem Verlust von Chromosom 14 aufwies (Sayagués et al., 2002). Auch in der CGH Analyse des Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg zeigte sich in drei Fällen ein Verlust des Chromosoms 14 zusammen mit einer Veränderung des Chromosom X. Um diesen kombinierten Verlust zweier Chromosome eine Rolle in der Tumorentstehung bzw. -progression nachweisen zu können, bedarf es einer gezielten Analyse weiterer pleomorpher Adenome, um eine größere Fallzahl zu erhalten.

Papilläre Nierenzellkarzinome zeigen in 67% der Fälle einen Verlust des X Chromosoms. Veränderungen im Bereich der pseudoautosomalen Region lassen hierbei auf ein oder mehrere Tumorsuppressorgene schließen, die bei einer Deletion beider Genallele möglicherweise für die Tumorprogression verantwortlich gemacht werden können. Im Rahmen neuroendokriner Tumore des Magens äußerten D'Adda und Mitarbeiter (1999) die Vermutung, dass Deletionen des X Chromosoms ein spätes Ereignis in der Tumorprogression darstellen und die Prädominanz solcher Zellklone für ein aggressiveres Tumorverhalten sprechen. LOH großer Bereiche des X Chromosoms scheinen in diesen Tumoren mit der Neigung zu Metastasen

assoziiert zu sein. Auch innerhalb der Ovariakarzinome zeichnet sich ein Zusammenhang zwischen dem Chromosom X Verlust und Metastasen ab. Hier scheint dieser Verlust zudem zu der Progression von gut zu schlecht differenzierten Tumoren beizutragen (Choi et al., 1997). Dies scheint bei pleomorphen Adenomen eher unwahrscheinlich zu sein, da in den histopathologischen Begutachtungen in keinem unserer Fälle ein malignes Verhalten nachgewiesen werden konnte und pleomorphe Adenome in der Regel nicht zur Metastasenbildung neigen.

Methylierungsanalysen von Xq25 zeigten, dass tendenziell eher das inaktive X Chromosom von einer Deletion betroffen ist (Choi et al., 1997). Dieser Befund stimmt mit denen anderer solider Tumore überein und legt die Vermutung nahe, dass diese Region Tumorsuppressorgene beherbergt, die in der Lage zu sein scheinen, sich einer X Chromosom Inaktivierung zu entziehen (Choi et al., 1997).

Mit Hilfe unserer FISH-Analyse kann keine Aussage über den Inaktivitätsstatus des X Chromosoms getroffen werden. Ob potentielle Kandidatengene dadurch zum Tragen kommen, dass sich gewisse Regionen einer Inaktivierung entziehen können, bleibt Gegenstand weiterer molekularzytogenetischer Untersuchungen.

In der Literatur wird dem pleomorphen Adenom eine geringe Prävalenz für das weibliche Geschlecht zugeschrieben (Seifert et al., 1984; Everson et al., 1985). Über solche vergleichende Beobachtungen können wir jedoch in Anbetracht der geringen Fallzahl unserer Studie keine Aussage treffen. Das Wissen um eine Geschlechtsprävalenz wäre allerdings ein interessanter Ansatz für weitere molekularzytogenetische Untersuchungen, welche vor dem Hintergrund, dass sich gewisse Chromosomenregionen einer Inaktivierung zu entziehen vermögen, möglicherweise weitere Aspekte der Tumorgenese speziell beim weiblichen Geschlecht aufdecken könnten. Eine Vermutung, ob dieser Verlust überwiegend das inaktivierte oder das aktive Chromosom X betrifft, kann mit Hilfe von FISH-Untersuchungen nicht bestätigt werden. Eine Aussage über den Inaktivitätsstatus vermag vielmehr mit Hilfe der HUMARA Untersuchung getroffen werden. HUMARA, das menschliche AR-Gen, ist auf dem X Chromosom lokalisiert und beinhaltet ein Segment polymorpher repetitiver CAG-Sequenzen, so dass mit Hilfe

dieses Gens sehr einfach der Methylierungsstatus der X Chromosomen untersucht werden kann (Cheng et al., 1996, Lee et al., 2000).

Edelson und Mitarbeiter (1998) konnte die häufig in Ovarialkarzinomen beschriebenen X Chromosom-Deletionen vor allem auf Genloci im Bereich Xq11.2-q12 eingrenzen. Bisher wurden diesen Regionen relativ wenig Gene zugeordnet. Die Rolle des in diesem Bereich liegenden Androgenrezeptors (AR) als häufigste betroffene Gendeletion bleibt unklar, stellt aber ein mögliches Kandidatengen dar. Nur einige wenige Studien demonstrierten einen Zusammenhang zwischen Androgenrezeptor-Genmutationen und Tumorgenese mit möglichem Wachstumsvorteil von Prostata- und Mammakarzinomen bei Männern (Schoenberg et al., 1994; Tilley et al., 1996; Taplin et al., 1995). Ebenfalls einen Allelverlust im Bereich des Androgenrezeptorlokus weisen Karzinome der Blase auf. Androgene werden in dieser Tumorentität als Promoter im Rahmen der Blasentumorgenese gesehen. Die Verluste waren in allen analysierten Blasenkarzinomen dem aktiven Allel zuzuschreiben und lassen Kandidatengene mit Funktion der Zellwachstumskontrolle vermuten (Cheng et al., 2004).

Mit Hilfe der CGH-Methode konnten in den Untersuchungen des Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg ebenfalls genetische Aberrationen des langen Arms von Chromosom X beobachtet werden, die vor allem die Region Xq11.1q24-27 betrafen. Da diese Region den Androgenrezeptor beinhaltet und schon andere solide Tumore in diesem Bereich genetische Veränderungen aufweisen, könnte der Androgenrezeptor eine Rolle als potentiell Kandidatengen in der Tumorgenese von pleomorphen Adenomen spielen (Cohen et al., 2009; Papadopoulou et al., 2009; Cheng et al., 2004; Indsto et al., 2003; Schoenberg et al., 1994; Tilley et al., 1996; Taplin et al., 1995).

Moriki und Mitarbeiter (2001) konnten in einer Studie in 10 von 10 untersuchten pleomorphen Adenomen keine Expression des Androgenrezeptors nachweisen. Da jedoch Laine (1993) in normalem Parotisgewebe immunhistochemisch Androgenrezeptoren nachweisen konnten, würde diese fehlende Expression für eine Deletion des Androgenrezeptorgens in pleomorphen Adenomen sprechen (Laine et

al., 1993). Dies wiederum stimmt mit den Ergebnissen unserer FISH-Analyse überein, in welchen mit dem Verlust des X Chromosoms auch das Gen für den Androgenrezeptor verloren geht. Aus diesem Grunde könnte der Androgenrezeptor eine Rolle in der Tumorentwicklung und -progression pleomorpher Adenome spielen.

Auch Mark et al. (1986) konnte in seinen Studien über pleomorphe Adenome mit Hilfe von Bänderungstechniken X Chromosom-Monosomien nachweisen, welche vermutlich einen wichtigen Beitrag zur Tumorprogression leisten (Mark et al., 1986). Ein mögliches potentiell Kandidatengen wird hier mit Ha-ras 2 benannt, einem Onkogen der Familie der ras-Onkogene auf Xp11.23. Dieses Onkogen wurde bereits in Zusammenhang mit der Tumorgenese verschiedener solider Tumore, wie das Ösophaguskarzinom, sowie Blasen- und Lebertumore gebracht (Miyamoto et al., 2008; Mo et al., 2007; Buchmann et al., 2008). In den CGH- Voruntersuchungen des Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg konnten ebenfalls genetische Aberrationen des Genlocus Xp11.2p21.1 nachgewiesen werden. Ob der Verlust dieser Region ein wichtiges Ereignis in der Genese pleomorpher Adenome repräsentiert, sollte mit weiteren molekularzytogenetischen Untersuchungen, zum Beispiel mit Hilfe einer genspezifischen Sonde im Rahmen nachfolgender FISH-Analysen, ergänzend differenziert werden.

Einen Zusammenhang zwischen einem Verlust des X Chromosoms und dem Verlust des p53-Gens, wie von Choi et al. (1997) beschrieben, zeigt sich bei uns in dem Fall 97. Hier zeigte sich ein Chromosom X Verlust in 29,5% und eine Deletion des p53-Gens in 39,0%. Anders verhält es sich in dem Fall 101, in welchem zwar mit 45,0% ein eindeutiger Verlust des p53-Gens nachgewiesen werden konnte, jedoch in Bezug auf das X-Chromosom mit 9,0% ein Verlust lediglich unterhalb der Signifikanzgrenze auffällt. Aufgrund der nicht repräsentativen Fallzahl bei entsprechend geringen p53-FISH-Analysen kann jedoch ein Vergleich nur unter einem wegweisenden Aspekt vorgenommen werden. Ob sich im Rahmen eines möglichen zusammenhängenden Verlustes eine Tumorprogression, sowie die

Rezidivneigung wie bei Choi und Mitarbeitern beschrieben ergeben, kann mit unserer Studie nicht geklärt werden.

6.2.2 Deletionen des Chromosomenabschnittes 16p

Es gibt in der Literatur bislang keine Angaben über einen Zusammenhang zwischen Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 16 und pleomorphen Adenomen. Die Ergebnisse von diversen Studien, die molekulargenetische Veränderungen des Chromosom 16p einschlossen, wurden dabei jedoch aufgrund von nicht repräsentativer Fallzahlen lediglich als heterogene zytogenetische Befunde in die Auswertung aufgenommen, weitere Versuche diese in einen Zusammenhang mit der Tumorgenese zu bringen, wurden jedoch unterlassen (Johns III et al., 1996). Auch im Rahmen von Speicheldrüsenkarzinomen konnte der Chromosomenregion 16p bisher kein Stellenwert in der Tumorentwicklung und -progression zugeordnet werden.

In unserer Studie konnte mit durchschnittlich 15,9% bei 17/21 der untersuchten Fälle ein Verlust von 16p ausgemacht werden, wobei im Mittel zu 15,1% der Verlust von nur einem kurzen Chromosomenarm beobachtet werden konnte. Häufige genetische Aberrationen von 16p fanden sich bereits in Plattenepithelkarzinomen der Lunge, Prostatakarzinomen, Mammakarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen und Kolonkarzinomen (Chu et al., 2003; Kadota et al., 2003; Chujo et al., 2002; Alcock et al., 2003; Lu et al., 1998; Jones et al., 2000). Einen 16p-Verlust konnte in Nasenrachenkarzinomen sogar in 100% der untersuchten Halslymphknotenmetastasen nachgewiesen werden, was auf eine Beteiligung an der Entstehung und Progression sowie Metastasierung dieser Tumorentitäten hindeutet (Yan et al., 2005). Weiterhin beobachtete eine Arbeitsgruppe eine Korrelation der 16p-Deletionen mit der Infiltration in das Lymphsystem bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Noguchi et al., 2003) und eine weitere Studie sieht einen Zusammenhang chromosomaler Instabilitäten der Region 16p mit der Entstehung von Leberzellkarzinomen (Herath et al., 2006). Chujo et al. (2002) zeigte mittels CGH-

Untersuchungen genetische Veränderungen des kurzen Arms von Chromosom 16 in 34% der Plattenepithelkarzinome der Lunge. Daraus kann geschlossen werden, dass Regionen dieses Chromosoms Gene beherbergt, die an der Entstehung und/oder der Progression von Tumoren beteiligt sind. Weiterhin konnte in dieser Tumorentität vermehrt Deletionen ab einer Tumorgöße $>3\text{cm}$ festgestellt werden, was im Rahmen der Plattenepithelkarzinome der Lunge auf eine späte Beteiligung dieses Locus schließen lässt.

Papilläre Tumore der Brust zeigen in 63,3% der Fälle LOH im Bereich des Chromosomenabschnitts 16p13. Da diese Mutationen sowohl in benignen als auch in malignen papillären Tumoren nachweisbar waren, scheinen in diesem Bereich Tumorsuppressorgene lokalisiert zu sein, deren Mutation einen frühen Schritt in der Entstehung von papillären Neoplasien der Brust sowie weiteren papillären Tumoren darstellt (Lininger et al., 1998).

Bezüglich der beschriebenen vermehrten Deletionen ab einer Tumorgöße $>3\text{cm}$ konnten wir in unserer Studie keinen Zusammenhang zwischen der Tumorgöße und einem Verlust des Chromosomenabschnitts 16p feststellen. So zeigte sich beispielsweise im Fall 141 mit einer Tumorgöße von 4,5cm zwar ein 27,5%iger Verlust von 16p, aber andere Fälle mit einer Tumorgöße $<3\text{cm}$ zeigten ebenfalls hohe Verluste. So gesehen im Fall 84, in welchem bei einer Tumorgöße von 2,4cm ebenfalls ein 27,5%iger Verlust des kurzen Arms von Chromosom 16 ausgemacht werden konnte.

In der CGH Studie des Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg/Saar konnte ein Verlust des kurzen Arms von Chromosom 16 und hier insbesondere der Bereich 16p12-p13.2 am häufigsten detektiert werden. Dieser Verlust ließ sich mit Hilfe der telomerspezifischen 16p-Sonde mit überlappender Bindungsstelle in eben diesem Bereich in der FISH- Analyse in 17 von 21 Fällen bestätigen. Innerhalb dieser Bindungsstelle liegen mit CBP (cyclic AMP response element binding protein binding protein) ein wichtiger Regulator der Genexpression und mit dem TSC2- Gen ein Regulator des Zellwachstums. Da mit TSC2-Mutationen auch die Unterdrückung des Zellwachstums gestört wird, ist eine

Beteiligung an der Tumorentstehung durch eine verstärkte epitheliale Zellproliferation möglich. Dies ist auch bei der Entstehung pleomorpher Adenome in Erwägung zu ziehen und bedarf weiterer molekulargenetischer Untersuchungen dieses Genlokus.

Weitere Tumore mit TSC2- Mutationen konnte in Astrozytomen und Medulloblastomrezidiven beobachtet werden (Warr et al., 2001; Zakrewska et al., 2004). Auch andere neuronale Tumore wie das Ependymom oder das Neuroblastom zeigen Mutationen dieser Region. 16p12-p13 stellt somit vermutlich eine wichtige Region rekombinanter Ereignisse dar, in der bereits putative Tumorsuppressorgene bei familiären Neuroblastomen identifiziert werden konnten (Zheng et al., 2000; Weiss et al., 2000).

Weitere mögliche genetische Veränderungen wurden in das Chromosom 16 einbeziehende Inversionen und Translokationen gefunden (Landrette et al., 2005; Laâbi et al., 1992). Die häufig beobachtete Inversion $inv(16)(p13; q22)$ führt zu dem CBF β -MYH11 Fusionsgen, welches für das Fusionsprotein CBF β -SMMHC kodiert und mit der Entwicklung der akuten myeloischen Leukämie in Verbindung gebracht wird. Interessanterweise konnte hier ein Zusammenspiel zwischen CBF β -SMMHC und den Onkogenen PLAG1 auf Chromosom 8q12 sowie PLAGL2 auf Chromosom 20q11.21 demonstriert werden, in dem diese als Transkriptionsfaktoren fungieren. PLAG1 konnte bereits in pleomorphen Adenomen vielfältige Funktionen zugeschrieben werden und fungiert auch hier unter anderem als Protoonkogen (Voz et al., 2000a; Voz et al., 2000b; Voz et al., 2004; Enlund et al., 2004; Martins et al., 2005). Über das Chromosom 16 betreffende Inversionen in pleomorphen Adenomen existieren bisher keine Berichte. Es ist aber nicht auszuschließen, dass auch bei pleomorphen Adenomen ein Wechselspiel zwischen einem unbekanntem Fusionsprotein und PLAG1 besteht, welches möglicherweise zur Tumorgenese beiträgt. Solche Translokationen bzw. Inversionen können mit Hilfe der FISH-Methodik jedoch nicht detektiert werden, außer die Bruchpunkte lägen genau im Bereich der Sondenbindungsstelle. Diese und weitere Studien führen zu der

Erkenntnis, dass eine Vielzahl an Genen auf der Chromosomenregion 16p liegen, die einen Beitrag zu der Entwicklung von Tumoren zu leisten vermögen.

Da Deletionen des Chromosomenabschnitts 16p in unserer Untersuchung in 83% der Fälle beobachtet wurden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Mutationen um einen frühen Schritt bei der Entstehung pleomorpher Adenome handelt. Ob der kurze Arm von Chromosom 16 hierbei auch als Progressionsfaktor gesehen werden kann, muss über weitere Studien mit Hilfe von Karzinomen im pleomorphen Adenom untersucht werden. Möglicherweise können hierdurch auch pleomorphe Adenome mit oder ohne Progressionspotential unterschieden werden. Zudem ist ein wichtiger Schritt weiterer Untersuchungen die Kombination der Telomersonde mit einer entsprechenden Zentromersonde, um den Verlust der Telomerregion gegen einen kompletten Chromosomenverlust abzugrenzen (van Dekken & Bau, 1989). Diese Kombination von Sonden wurde in unserer aktuellen Studie aufgrund unzureichenden Tumormaterials nicht berücksichtigt, sollte jedoch in weiteren Untersuchungen an pleomorphen Adenomen der Tumorbank der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Homburg durchgeführt werden. Weiterführende FISH- und Proteinexpressionsanalysen der oben aufgeführten Kandidatengenen müssen deren Relevanz in der Tumorgenese noch zeigen.

6.2.3 Deletion des Her-2/neu Lokus auf Chromosom 17q12-q21.32

Eine Beurteilung genetischer Aberrationen des Her-2/neu-Lokus ist allein schon aufgrund der beträchtlichen Ähnlichkeit mit dem *epidermal growth factor* Rezeptor interessant. Als Tyrosinkinase gehören beide zu der Familie der c-erb-Onkogene und sind an Zellwachstum und Zelldifferenzierung beteiligt und spielen daher auch eine Rolle in der Karzinogenese. Eine Amplifizierung und/oder Proteinüberexpression ist in einer Vielzahl von Tumoren mit einer schlechten Prognose verbunden. Zu diesen Tumoren zählen neben dem Mammakarzinom, Tumore des Magens, der Niere, des Pankreas und der Ovarien. Hier führt eine Her-

2/neu-Überexpression zu einer Verkürzung der G1-Phase des Zellzyklus und einem frühen Eintritt in die S-Phase mit der Folge der Hyperproliferation (Timms et al., 2002).

Amplifizierungen des Her-2/neu Gens, sowie dessen Proteinexpression sind auch Bestandteil mehrerer Studien über Speicheldrüsentumore. Eine erhöhte Anzahl von Genkopien wird vor allem in malignen Tumoren der Speicheldrüsen beobachtet, während das pleomorphe Adenom in der Regel keine Amplifizierung erkennen lässt. So konnte Kahn et al. (1992) nur in einem von 12 pleomorphen Adenomen eine dreifach erhöhte Amplifikation feststellen, die ein aggressiveres biologisches Verhalten vermuten lässt. Auch Müller et al. (1994) konnte nur in drei von 15 pleomorphen Adenomen eine leicht erhöhte Her-2/neu Immunreaktivität nachweisen. Anders verhält es sich mit malignen Tumoren der Speicheldrüsen. Hier konnte in Mukoepidermoidkarzinomen, in Speichelgangskarzinomen der Glandula parotis sowie in Karzinomen im pleomorphen Adenom eine gesteigerte Proteinexpression in 38%, 100% bzw. 21- 47% gezeigt werden (Press et al., 1994; Skálová et al., 2003; Müller et al., 1994). Eine Genamplifikation konnte dabei jedoch nur in geringem Ausmaß nachgewiesen werden. Hieraus schließt man, dass das Her-2/neu-Gen eine wichtige Rolle in der neoplastischen Transformation oder Tumorprogression spielt. Der gesteigerte Proteingehalt scheint hierbei allerdings nicht nur infolge einer Genamplifizierung aufzutreten, sondern die Existenz weiterer Mechanismen wie z.B. eine erhöhte Transkriptionsrate oder das Auftreten von proteinstabilisierenden Mutationen nahe zu legen.

Das auch in dem Karzinom des pleomorphen Adenoms genetische Veränderungen des Her-2/neu Gens detektiert wurden, lässt vermuten, dass ein Nachweis der Proteinexpression von Her-2/neu in pleomorphen Adenomen hilft, maligne Transformationen zu erkennen (Rosa et al., 1996). Diese Vermutung erhärtet sich durch die Tatsache, dass eine Her-2/neu-Proteinexpression in den malignen Anteilen beobachtet werden konnte, während benigne Areale pleomorpher Adenome beständig eine negative Reaktion aufwiesen (Di Palma et al., 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Proteinexpression ein frühes Ereignis in der malignen Transformation pleomorpher Adenome darstellt.

Unsere Studie konnte in keinem der untersuchten Fälle eine Genamplifikation nachweisen. Vielmehr zeigte sich in allen analysierten pleomorphen Adenomen der Verlust eines (20,3%) oder beider Her-2/neu Gene (12,6%). Studien ohne Nachweis einer Her-2/neu Genamplifikation in pleomorphen Adenomen sind bekannt. Es wurde bisher jedoch noch nie über eine Deletion dieses Genlokus berichtet. Auch im Bezug auf andere Tumore konnte bisher nur im Falle von juvenilen Angiofibromen über einen nachweislichen Her-2/neu Genverlust berichtet werden. Schick et al. (2005) zeigte im Rahmen von PCR- und FISH-Untersuchungen einen, unserer Studie ähnlichen Her-2/neu Verlust zwischen 10,5% und 31,5%. Weiterhin fiel in dieser Studie auf, dass der Verlust eines oder beider Gensignale häufig mit einem normalen Karyotyp für Chromosom 17 verbunden war. Auch in unserer Analyse fiel neben einem gesamten Chromosom 17 Verlust, ein höherer spezifischer Her-2/neu-Verlust auf Chromosom 17 auf.

Um eine genauere Aussage über die Beteiligung von Her-2/neu an der Tumorgenese treffen zu können, muss auch die Her-2/neu-Proteinexpression analysiert werden, denn das Onkogenprodukt vermag als genauere Prädiktor dienen, als dies die Anzahl der Genkopien allein vorhersagen könnten (Nakopoulou et al., 1996). Auch weitere molekulargenetische Untersuchungen zur genauen Charakterisierung des Her-2/neu-Verlustes sind notwendig.

6.2.4 Deletion von p53 auf Chromosom 17p13.1

Das Tumorsuppressorgen p53 ist die häufigste Region genetischer Veränderungen in menschlichen Tumoren. Wie bereits unter 2.4.2 beschrieben, verhindert p53 die Vermehrung genetisch geschädigter Zellen. Mit dem Verlust der physiologischen p53 Funktion replizieren erbgutgeschädigte Zellen ihre DNA, so dass genetische Veränderungen im Genom fixiert werden (Kärjä et al., 1997). Auch wenn eine einzige Mutation nicht ausreicht, um eine Transformation von Zellen zu erreichen, prädisponiert der Verlust von p53 zu weiteren Mutationen mit der Folge der

malignen Transformation. Zudem scheint mit p53-Genmutationen ein selektiver Wachstumsvorteil von Tumorzellen einherzugehen (Greenblatt et al., 1994).

Viele, das p53-Gen einbeziehende Mutationen resultieren in einer abnormen Akkumulation von Proteinen im Zellkern, die mit Hilfe der Immunhistochemie detektiert werden können und als indirekter Indikator der p53-Inaktivierung dient. Immunhistochemische Untersuchungen, die die p53-Expression in pleomorphen Adenomen betreffen, liefern kontroverse Resultate. Eine Gruppe von Autoren können eine p53-Expression nachweislich belegen (Kärjä et al., 1997; Ishi & Nakajima, 1994; Deguchi et al., 1993; Soini et al., 1992; Azuma et al., 1992), während eine andere Gruppe eine erhöhte Immunoreaktivität nicht nachweisen konnte (Gallo et al., 1995; Bocklage et al., 1995; Hellquist et al., 1994; Nordkvist et al., 2000). Hierbei muss eine Akkumulation nicht unbedingt auf p53-Mutationen beruhen, sondern könnten auch infolge anderer unbekannter Mechanismen auftreten (Soini et al., 1992). So berichtet Kärjä et al. (1997) über genetische Veränderungen, Proteinkomplexe mit viralen Onkoproteinen und zelluläre Genprodukte wie MDM2, die zu einer p53-Inaktivierung ohne p53 Proteinakkumulation führen können.

Genetische, zytogenetische und FISH-Untersuchungen an benignen und malignen Speicheldrüsentumoren konnten sowohl p53-Mutationen als auch Aberrationen des Chromosom 17 ausmachen. p53 assoziierte genetische Veränderungen zeigten sich häufiger in Speicheldrüsenkarzinomen als in benignen Speicheldrüsentumoren. Wobei sich in letzter Gruppe solche Mutationen vor allem in pleomorphen Adenomen beobachten lassen. Ein Vergleich zwischen numerischen Aberrationen des Chromosoms 17 und p53-Deletionen mit Hilfe der FISH-Methode wurde von Li et al. (1997) durchgeführt. Neben pleomorphen Adenomen wurde hier zusätzlich der Vergleich mit Karzinomen im pleomorphen Adenom (CPA) angestrebt. Daten dieser Studien zeigten mit einer Monosomie 17 von durchschnittlich 30,8% und einem p53-Verlust von 40,5% ähnlich hohe Verluste wie die in unserer Studie analysierten Werte (Li et al., 1997). Yamamoto et al. (1998) konnte in 33% der pleomorphen Adenomanteile innerhalb eines Karzinoms im pleomorphen Adenom einen p53-

Verlust nachweisen. Einen Nachweis von p53-Mutationen in pleomorphen Adenomen ohne entsprechende maligne Transformation konnte hier jedoch nicht gezeigt werden. Ohki et al. (2001) sieht bei 50% der pleomorphen Adenome p53-Genveränderungen, sowohl durch Mutation als auch durch LOH beider Allele. Widersprüchliche Ergebnisse zeigte Johns et al. (1996). Er konnte im Gegensatz zum CPA in keinem der pleomorphen Adenome einen p53-Verlust nachweisen. El-Naggar et al. (2000) gelang ebenfalls ein Nachweis von 17p-Verlusten nur in Karzinomen, nicht aber in den Komponenten des pleomorphen Adenoms. Welche Rolle p53 in der malignen Transformation spielt, kann jedoch nur mit Hilfe von anderen Studien vermutet werden, da in dieser Studie ein spezifischer p53-Verlust nicht untersucht wurde. Es zeigte sich jedoch mit einem LOH im Bereich von 17p12-13 ein entsprechender Verlust des p53-Genlokus, so dass El-Naggar gemeinsam mit anderen Autoren die Meinung vertritt, dass zusätzlich zu den häufigen Mutationen der Chromosome 8 und 12 der Verlust des Chromosomenabschnitts auf 17p eine Gruppe pleomorpher Adenome charakterisiert, die ein Potential zur Karzinomprogression besitzt (El-Naggar et al., 2000; Bullerdiel et al., 1989, 1993; Rommel et al., 1990; Müller et al., 1994; Sahlin et al., 1994).

Obwohl gewisse chromosomale Veränderungen, wie p53-Mutationen, in einigen Studien in pleomorphen Adenomen ohne karzinomatösen Anteil gefunden wurden, bleibt weiterhin unklar, ob die adenomatösen Anteile in Karzinomen im pleomorphen Adenom sich von herkömmlichen pleomorphen Adenomen in ihrem molekularen und zytogenetischen Hintergrund unterscheiden. Das einige Autoren in pleomorphen Adenomen atypische Zellen nachweisen konnten und auch über atypische Merkmale wie Hyperzellularität und Nekrosen Berichte bestehen, kann auf eine fokale Malignität hinweisen. Inwieweit diese atypischen Zellen jedoch präkanzeröses Potential besitzen, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden (Ohtaké et al., 2002; Auclair & Ellis, 1996; Takeda, 1999; Brandwein et al., 1996; Righi et al., 1994).

Bei der von uns durchgeführten FISH-Untersuchung zur Beurteilung von numerischen p53-Aberrationen können wir aufgrund der nicht repräsentativen

Fallzahl in Bezug auf Interpretationsmöglichkeiten und dem Vergleich mit bestehenden Ergebnissen nur richtungsweisende Angaben vornehmen ohne Rückschluss auf eine Rolle von p53 in der malignen Transformation ziehen zu können. Wir konnten in 2/2 Fällen der untersuchten pleomorphen Adenome in durchschnittlich 42% der Zellen p53-Deletionen nachweisen, ob hierbei jedoch genau zwei in Progression befindliche pleomorphe Adenome entdeckt wurden oder ob es sich um ein generelles Ereignis handelt, bleibt unklar. Hierfür müssten weitere pleomorphe Adenome auf p53-Genverluste hin analysiert werden und ein zusätzlicher vergleichender Nachweis der Proteinexpression erbracht werden.

6.3 Ausblick

Pleomorphe Adenome erwiesen sich in vielen Studien als eine Tumorentität mit geringem Anteil an genetischen Aberrationen. CGH-Voruntersuchungen des Labors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Homburg/Saar und Frau Birgit Sauter erbrachten einen Überblick über das Genom von pleomorphen Adenomen mit vielfältigen genetischen Veränderungen. Häufig detektierte genetische Veränderungen konnten mit Hilfe der FISH-Untersuchung weiter untersucht werden, um zum einen Informationen über einzelne Gene zu gewinnen und zum anderen auch eine Aussage über homozygote und heterozygote Verluste zu treffen. Die von uns eingesetzten Sonden zeigten regelmäßige Verluste von ganzen Chromosomen oder Chromosomenarmen (X, 17 und 16p) und Genen (Her-2/neu und p53 auf Chromosom 17). Diese Verluste zeigten sich mit Ausnahme von Her-2/neu im Einzelnen bereits in anderen soliden Tumoren und werden hier als wichtige Ereignisse in der Tumorentstehung und -progression angesehen.

Um eine gesicherte Aussage treffen zu können, ob die von uns detektierten genetischen Aberrationen charakteristische Veränderungen in pleomorphen Adenomen darstellen, die zu ihrer Entstehung beitragen oder einen Hinweis auf die Tumorprogression geben, müssen zunächst noch weitere molekularzytogenetische

Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl in unterschiedlichen Tumorstadien folgen. Des Weiteren sollten diese Daten mittels RNA- und Proteinexpressionsstudien bestätigt werden. Dies ermöglicht eine Überprüfung, ob die gefundenen Verluste auch auf Proteinebene einen Einfluss auf die Tumorgenese nehmen können. Die meisten Fälle zeigten nur einen Genverlust, der aber von dem zweiten Allel kompensiert werden könnte, was darauf schließen ließe, dass das Gen oder Gene dieser Bereiche keinen Einfluss auf die Entstehung und Progression der pleomorphen Adenome haben. Darüber hinaus sollten weitere klinische Daten wie Rezidivverhalten und Überlebenszeit in weiterführende Studien einbezogen und mit den erhobenen zyto- und molekulargenetischen Daten korreliert werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanan L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen G, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816
2. Alcock HE, Stephenson TJ, Royds JA, Hammond DW (2003) Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosome Cancer* 37: 369-380
3. Allen CM, Damm D, Neville B, Rodu B, Page D, Weathers DR (1994) Necrosis in benign salivary gland neoplasms. Not necessarily a sign of malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 78: 455-461
4. Auclair PL, Ellis GL (1996) Atypical features in salivary gland mixed tumours: their relationship to malignant transformation. *Mod Pathol* 9: 952-957
5. Arakaki DT, Sparks RS (1963) Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 2: 57-60
6. Azuma M, Kasaj Y, Tamatani T, Sato M (1992) Involvement of p53 mutation in the development of human salivary gland pleomorphic adenomas. *Cancer Lett.* 65: 61-72
7. Azzopardi JG, Smith OD (1959) Salivary gland tumours and their mucins. *J Pathol Bacteriol* 77: 131-140
8. Babu VR, Wiktor A (1991) A fluorescence in situ hybridisation technique for retrospective cytogenetic analysis. *Cytogenet Cell Genet* 57: 16-17
9. Bailey, H (1941) The treatment of tumours of the parotid gland with special references to total parotidectomy. *Br J Surg* 28:337-346
10. Ballabio A, Willard HF (1992) Mammalian X-Chromosome inactivation and XIST gene. *Curr Opin Genet Dev.* 2: 439-447
11. Bareck HC (ed) *Histologische Technik Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis.* 3. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1973
12. Bartsch O, Rasi S, Delicado A, Dyack S, Neumann LM, Seemanová E, Volleth M, Haaf T, Kalscheuer VM (2006) Evidence for a new contiguous gene syndrome, the chromosome 16p13.3 deletion syndrome alias severe Rubinstein-Taybi syndrome. *Hum Genet* 120: 179-186
13. Belsky JL, Takeichi N, Yamamoto T, Cihak RW, Hirose F, Ezaki H, Inoue S, Blot WJ (1975) Salivary gland neoplasm following atomic radiation: additional cases and reanalysis of combined data in a fixed population, 1957- 1970. *Cancer* 35: 555-559
14. Bialek EJ, Jakubowski W, Karpinska G (2003) Role of ultrasonography and differentiation of pleomorphic adenomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 129: 929-933
15. Billroth T (1859) Beobachtungen über Geschwülste der Speicheldrüsen. *Virchows Arch Pathol Anat* 17: 357-375

16. Bocklage T, Feddersen R (1995) Unusal mesenchymal and mixed tumors of the salivary gland. An immunohistochemical and flow cytometric analysis of three cases. *Arch Pathol Lab Med* 119: 69-74
17. Bos JL (1989) Ras oncogene in human cancer. A review. *Cancer Res* 45: 4687-4689
18. Boveri T (1914) Zur Frage der Entstehung maligner Tumore. Verlag von Gustav Fischer, Jena
19. Brandwein M, Huvos AG, Dardick I, Thomas MJ, Theise ND (1996) Noninvasive and minimally invasive carcinoma ex mixed tumor. A clinicopathological and ploidy study of 12 patients with major salivary tumors of low (or no?) malignant potential. *Pathol Oral Radiol Endod* 81: 655-664
20. Buchmann A, Karcier Z, Schmid B, Strathmann J, Schwarz M (2008) Differential selection for B-raf and Ha-ras mutated liver tumors in mice with high and low susceptibility to hepatocarcinogenesis. *Mutat Res* 638: 66-74
21. Bullerdiek J, Bartnitzke S, Weinberg M, Chilla R, Haubrich J, Schloot W (1987) Rearrangements of the chromosome region 12q13-15 in pleomorphic adenomas of the human salivary gland (PSA). *Cytogenet Cell Genet* 45: 187-190
22. Bullerdiek J, Raabe G, Bertnitzke S, Bösch C, Schloot W (1987b) Structural rearrangements of chromosome 8 involving 8q12 – a primary event in pleomorphic adenomas of the parotid gland. *Genetica* 72: 85-92
23. Bullerdiek J, Chilla R, Haubrich J, Meyer K, Bartnitzke S (1988) A causal relationship between chromosomal rearrangements and the genesis of salivary gland pleomorphic adenomas. *Arch Otolaryngol* 245: 244-249
24. Bullerdiek J, Takla G, Bartnitzke S, Brandt G, Chilla R, Hubrich J (1989) Relationship of cytogenetic subtypes of salivary gland pleomorphic adenomas with patient age and histologic type. *Cancer* 64: 876-880
25. Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J, Thode B, Bartnitzke S (1993) Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 27-31
26. Caselitz J (1987) Das pleomorphe Adenom der Speicheldrüsen. Histogenese, zelluläre Differenzierung, Tumormarker. *Veröff Pathol* 126: 1-253
27. Caspersson T, Zech L, Johansson C (1970) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.* 60: 315-319
28. Caubet JF, Mathieu-Mahul D, Bernheim A, Larsen CJ, Berger R (1985) Human protooncogene c-mos (MIS) maps to 8q11. *EMBO* 4: 2245-2248
29. Cavanee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC; White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanism in retinoblastoma. *Nature* 2: 779-784
30. Cheng L, MacLennan GT, Pan CX, Jones TD, Moore CR, Zhang S, Gu J, Patel NB, Kao C, Gardner TA (2004) Allelic loss of the active X chromosome during bladder carcinogenesis. *Archives of pathology and Laboratory Medicine* 128: 187-190

31. Cheng PC, Gosewehr JA, Kim TM (1996) Potential role of the inactivated X chromosome in ovarian epithelial tumor development. *J Natl Cancer Inst* 88: 510-518
32. Chissoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L, Ma Y, Mc Laury HJ, Pan HQ, Sarhan OH, Toth S, Wang Z, Zhang G, Heisterkamp N, Groffen J, Roe BA (1995) Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 27:67-82
33. Choi C, Cho S, Horikawa I (1997) Loss of heterozygosity at chromosome segment Xq25-26.1 in advanced human ovarian carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 20: 234-242
34. Chu LW, Troncoso P, Johnston DA, Liang JC (2003) Genetic markers useful for distinguishing between organ-confined and locally advanced prostate cancer. *Genes Chromosome Cancer* 36: 303-312
35. Chujo M, Noguchi T, Miura T, Aringa M, Uchida Y, Tagawa Y (2002) Comparative genomic hybridization analysis detected frequent overrepresentation of chromosome 3q in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 38: 23-29
36. Chung DC, Rustgi AK (2003) The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann intern Med* 138: 560-570
37. Claussen U, Mazur A, Rubtsov N (1994) Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenetics and Cell Genetics* 66: 120-125
38. Cohen MB, Roklin OW (2009) Mechanism of prostate cancer cell survival after inhibition of AR expression. *J Cell Biochem* 106: 363-371
39. Corral J, Forster A, Thompson S, Lampert F, Kaneko Y, Slater R (1993) Acute leukemias of different lineages have similar MLL gene fusions encoding related chimeric proteins resulting from chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8538-8542
40. Croce CM, Klein G (1985) Chromosome translocations and human cancer. *Scientific American* 252: 54-60
41. D'Adda T, Candidus S, Denk H, Bordi C, Hofler H (1999) Gastric neuroendocrine neoplasms: tumour clonality and malignancy-associated large X-chromosome deletions. *J Pathol* 189: 394-401
42. Darzynkiewicz Z (1990) Acid induced denaturation of DNA in situ as a probe of chromatin structure. *Methodes Cell Biol* 33: 337-352
43. De la Chapelle A (1993) Disease gene mapping in isolated human populations: the example of Finland. *J Med Genet* 30: 857-865
44. De Leeuw B, Balemans M, Weghuis DO, Seruca R, Janz M, Geraghty MT (1994) Molecular cloning of the synovial sarcoma-specific translocation (X;18)(p11.2;q11.2) breakpoint. *Hum Mol Genet* 3: 745-749
45. De Leo AB, Jay G, Appella E (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2420-2424

46. Deguchi H, Hamano H, Hayashi Y (1993) C-myc, ras p21 and p53 expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. *Acta Pathol Jpn* 43: 413-422
47. Dewald GW, Brecher M, Travis LB, Stupca PJ (1989) Twenty-six patients with hematologic disorders and X chromosome abnormalities. Frequent idic (x)(q13) chromosomes and Xq13 anomalies associated with pathologic ringed sideroblasts. *Cancer Genet Cytogenet* 42: 173-85
48. Di Plama S, Skálová A, Vaníček T, Simpson RH, Stárek I, Leivo I (2005) Non-invasive (intracapsular) carcinoma ex pleomorphic adenoma: recognition of focal carcinoma by Her-2/neu and MIB1 immunohistochemistry. *Histopathology* 46: 144-152
49. Di Palma S, Lambros MB, Savage K, Jones C, Mackay A, Dexter T, Iravani M, Fenwick K, Ashworth A, Reis-Filho JS (2007) Oncocytic change in pleomorphic adenoma: molecular evidence in support of an origin in neoplastic cells. *J Clin Pathol* 60: 492-499
50. Donath K, Ußmüller J (2001) Ätiopathogenese und Histopathologie der Speicheldrüsenkrankungen. *Laryngo- Rhino- Otol* 80 Supplement 1: 1-25
51. Dowsett M, Bartlett J, Ellis IO, Salter J, Hills M, Mallon E, Watters AD, Cook T, Paish C, Wencyk PM, Pinder SE (2003) Correlation between immunohistochemistry (Hercep Test) and fluorescence in situ hybridization (FISH) for Her-2 in 426 breast carcinomas from 37 centers. *J Pathol* 199: 418-423
52. du Manoir S, Kallioniemi OP, Lichter P, Benedetti PA, Carothers AD, Fantes JA, Garcia-Sagredo JM, Gerdes T, Giollant M, Hemrey B, Isola J, Maahr J, Morrison H, Perry P, Stark M, Sudar D, van Vliet LJ, Verwoerd N, Vrolijk J (1995) Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19: 4-9
53. Earp HS, Dawson TL, Li X, Yu H (1995) Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat.* 35: 115-132
54. Edelson MI, Lau CC, Colitti CV, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC (1998) A one centimorgan deletion unit on chromosome Xq12 is commonly lost in borderline and invasive epithelial ovarian tumors. *Oncogene* 15: 197-202
55. El-Naggar AK, Hurr K, Kagan J, Gillenwater A, Callender D, Luna MA, Batsakis J (1997) Genotypic alterations in benign and malignant salivary gland tumors: histogenetic and clinical implications. *Am J Surg Pathol* 21: 691-697
56. El-Naggar AK, Dinh M, Tucker SL, Gillenwater A, Luna MA, Batsakis JG (1997b) Chromosomal and DNA ploidy characterization of salivary gland neoplasms by combined FISH and flow cytometry. *Human Pathology* 28: 881-886
57. El-Naggar AK, Callender D, Coombes MM, Hurr K, Luna MA, Batsakis JG (2000) Molecular genetic alterations in carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a putative progression model? *Genes, Chromosome Cancer* 27: 162-168
58. Enlund F, Persson F, Stenman G (2004) Molecular analyses of the candidate tumor suppressor gene, PLAGL 1, in benign and malignant salivary gland tumors. *Eur J Oral Sci.* 112: 545-547

59. Etges A, Nunes FD, Ribeiro KC, Araujo VC (2004) Immunohistochemical expression of retinoblastoma pathway proteins in normal salivary glands and in salivary gland tumors. *Oral Oncol* 40: 326-331
60. Evans MF, Aliesky HA, Cooper K (2003) Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *BMC Clin Pathol* 3: 2
61. Everson JW, Cawson RA (1985) Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol* 146: 51-58
62. Francioso F, Carinci F, Tosi L, Scapoli L, Pezzetti F, Passerella E, Evangelisti R, Pastore A, Pelucchi S, Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, carinci P, Volinia S (2002) Identification of differentially expressed genes in human salivary gland tumors by DNA microarrays. *Mol Cancer Ther* 1 533-538
63. Fuller CE, Wang H, Zhang W, Fuller GN, Perry A (2002) High-throughput molecular profiling of high-grade astrocytomas: the utility of fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays (TMA-FISH). *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61: 1078-1084
64. Furuta S, Ohira M, Machida T, Hamano S, Nakagawara A (2000) Analysis of loss of heterozygosity at 16p12-p13 (familial neuroblastoma locus) in 470 neuroblastomas including both sporadic and mass screening tumors. *Medical and Pediatric Oncology* 35: 531-533
65. Gall JG, Pardue ML (1969). Formation and detection of RNA:DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 63: 378-383
66. Gallo O, Franchi A, Bianchi S, Boddi V, Gianelli E, Alajmo E (1995) P53 oncoprotein expression in parotid gland carcinoma is associated with clinical outcome. *Cancer* 75: 2037-2044
67. Geurts JM, Schoenmakers EF, Roijer E, Stenman G, Van de Ven WJ (1997) Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer Res* 57: 13-17
68. Gillenwater A, Hurr K, Wolf P, Batsakis JG, Goepfert H, El-Naggar AK (1997) Microsatellite alterations at chromosome 8q loci in pleomorphic adenoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 448-452
69. Goldberg YP, Parker MI, Gevers W (1991) The genetic basic of cancer. *South African Medical Journal* 80: 99-104
70. Götte K, Ganssmann S, Affolter A, Schäder C, Riedel F, Arens N, Finger S, Hörmann K (2005) Dual FISH analysis of benign and malignant tumors of the salivary glands and paranasal sinuses. *Oncology Reports* 14: 1103-1107
71. Gottschalk-Sabag S, Glick T (1995) Necrosis of parotid pleomorphic adenoma following fine needle-aspiration. A case report. *Acta Cytol* 39: 252-254
72. Goudot P, Auriol M, Chomette G, Vaillant JM, Guilbert F (1989) Adenomes pleomorphes des glandes salivaires. Incidence de la composante myxoïde sur la pronostic. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 90: 119-122

73. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 16: 1647-1655
74. Gray JW, Pinkel D (1992) Molecular Cytogenetics in human cancer diagnosis. *Cancer Supplement* 69: 1536-1542
75. Gray JW, Pinkel D, Brown JM (1994) Fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology. *Radiat Res* 137: 275-289
76. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein H, Harris CC (1994) Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 54: 4855-4878
77. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Winston RM, Delhanty JD (1992) Dual fluorescence in situ hybridization for simultaneous detection of X and Y chromosome-specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum Genet* 89: 18-22
78. Gutmann DH, Saporito-Irwin S, DeClue JE, Wienecke R, Guha Abhijit G (1997) Alterations in the rap1 signaling pathway are common in human gliomas. *Oncogene* 15: 1611-1616
79. Habermann CR, Gossrau P, Graessner J, Arndt C, Cramer MC, Reitmeier F, Jaehne M, Adam G (2005) Diffusion-weighted echo-planar MRI: a valuable tool or differentiating primary parotid gland tumors? *Fortschr Röntgenstr* 177: 940-945, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York
80. Halling KC, Kipp BR (2007) Fluorescence in situ hybridisation in diagnostic cytology. *Human Pathology* 38: 1137-1144
81. Hammock L, Lewis M, Phillips C, Cohen C (2003) Strong Her-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Human Pathology* 34: 1043-1047
82. Harari D, Yarden Y (2000) Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19: 6102-6114
83. Harteveld CL, Kriek M, Bijlsma EK, Erjavec Z, Balak D, Phylipsen M, Voskamp A, Capua ED, White SJ, Giordano (2007) Refinement of the genetic cause of ATR-16. *Hum Genet.* 122: 283-292
84. Hausmann M, Cremer C, Linares-Cruz G, Nebe TC, Peters K, Plesch A, Tham J, Vetter M, Werner M (2004) Standardization of FISH-procedures: summary of the second discussion workshop. *Cellular Oncology* 26: 119-124
85. Hayter JP, Robertson JM (1990) Familial occurrence of pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Br J Oral Maxillofac Surg* 28: 333-334
86. Heim S, Mitelman F (1987) *Cancer Cytogenetics*. New York: Alan R. Liss, Inc 1987
87. Heinimann K (2000) Molekulargenetische Diagnostik bei HNPCC (Hereditäres Kolorektales-Karzinom ohne generalisierte Polypose). *Schweizerische Ärztezeitung* 81, 36: 2009-2012
88. Hellquist HB, Karlsson MG, Nilsson C (1994) Salivary duct carcinoma: a highly aggressive salivary gland tumor with overexpression of c-erbB-2. *J Pathol* 172: 35-44

89. Herath N, Leggett BA, MacDonald GA (2006) Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21: 15-21
90. Hicks DG, Longoria G, Pettay J, Grogan T, Tarr S, Tubbs R (2004) In situ hybridization in the pathology laboratory: general principles, automation, and emerging research applications for tissue-based studies of gene expression. *J Mol Histol* 35: 595-601
91. Hliscs R, Mühlig P, Claussen U (1997) The spreading of metaphase is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* 76: 167-171
92. Hopman AH, Ramaekers FC, Raap AK, Beck JL, Devilee P, van der Ploeg M, Vooijs GP (1988) In situ hybridization as a tool to study numerical chromosome aberrations in solid bladder tumors. *Histochemistry* 89: 307-316
93. Hübner G, Klein JH, Kleinsasser O, Schiefer HG (1971) Role of myoepithelial cells in the development of salivary gland tumors. *Cancer* 27: 1255-1261
94. Hwang HC, Martins CP, Bronkhorst Y, Randel E, Berns A, Fero M, Clurman BE (2002) Identification of oncogenes collaborating with p21kip1 loss by insertional mutagenesis and high-throughput insertion site analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11293-11298
95. Hynes NE (1996) ErbB2 activation and signal transduction in normal and malignant mammary cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1: 199-206
96. Indsto JO, Nassif NT, Kefford RF, Mann GJ (2003) Frequent loss of heterozygosity targeting the inactive X chromosome in melanoma. *Clin Cancer Res* 9: 6476-6482
97. Ishii K, Nakajima TT (1994) Evaluation of malignant grade of salivary gland tumours: studies by cytofluorometric, nuclear DNA analysis, histochemistry for nuclear organizer regions and immunohistochemistry for p53. *Pathol Int* 44: 287-296
98. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt S (1999) Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of Her-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol* 17: 1974-1982
99. Jaehne M, Jäkel KT, Röser K, Ußmüller J, Löning T (2001) Pilotstudie zur prognostischen Wertigkeit der Her-2 Genamplifikation und Proliferationsaktivität beim Speicheldrangkarzinom der großen Kopfspeicheldrüsen. *Laryngo-Rhino-Otol* 80: 525-529
100. Janz M, de Leeuw B, Weghuis DO, Werner M, Nolte M, van Kessel AG, Nordheim A, Hipskind RA (1995) Interphase cytogenetic analysis of distinct X-chromosomal translocation breakpoints in synovial sarcoma. *Journal of Pathology* 175: 391-396
101. Jiang F, Richter J, Schrami P, Bubendorf L, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H (1998) Chromosomal imbalances in papillary renal cell carcinoma. Genetic differences between histological subtypes. *American Journal of pathology* 153: 1467-1473
102. Jin C, Martins C, Jin Y, Wiegant J, Wennerberg J, Dictor M, Gisselsson D, Strömbeck B, Fonseca I, Mitelman F, Tanke H, Höglund M, Mertens F (2001) Characterization of chromosome aberrations in salivary gland tumors by FISH, including Multicolor COBRA-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 161-167

103. John H, Birnstein M, Jones K (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 582-587
104. Johns III MM, Westra WH, Califano JA, Eisele D, Koch WM, Sidransky D (1996) Allelotype of salivary gland tumors. *Cancer Research* 56: 1151-1154
105. Jones C, Foschini MP, Chaggar R, Lu YJ, Wells D, Shipley JM, Eusebi V, Lakhani SR (2000) Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast. *Lab Invest.* 80: 831-836
106. Kadota M, Tamaki Y, Sakita I, Komoike Y, Miyazaki M, Ooka M, Masuda N, Fujiwara Y, Ohnishi T, Tomita N, Sekimoto M, Ohue M, Ikeda T, Kobayashi T, Horii A, Monden M (2000) Identification of a 7-cM region of frequent allelic loss on chromosome band 16p13.3 that is specifically associated with anaplastic thyroid carcinoma. *Oncol Report* 7: 529-533
107. Kadota M, Tamaki Y, Sekimoto M, Fujiwara Y, Aritake N, Hasegawa S, Kobayashi T, Ikeda T, Horii A, Monden M (2003) Loss of heterozygosity on chromosome 16p and 18q in anaplastic thyroid carcinoma, *Oncol Rep* 10: 35-38
108. Kahn HJ, Hanna W, Auger M, Andrulis I (1992) Expression and amplification of neu oncogene in pleomorphic adenomas of the salivary gland. *Arch Pathol Lab Med.* 116: 80-83
109. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Rutovitz D, Sudar D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization: a new method based on isolated DNA to determine gains and losses of DNA sequences anywhere in the genome in a single hybridization. *American Journal of Human Genetics* 51: A23, 80
110. Kamp A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone J, Skolnick MH, Cannon-Albright LA (1994) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature genetics* 8:22-26
111. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R (1997) Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57(5): 808-811
112. Kärjä VJ, Syränen KJ, Kurvinen AK, Syrjänen SM (1997) Expression and mutations of p53 in salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med* 26: 217-223
113. Karp JE, Broder S (1995) Molecular foundations of cancer. New targets for intervention, *Nature Medicine* 1: 309-320
114. Kipp BR, Stadheim LM, Halling SA, Pochron NL, Harmsen S, Nagorney DM, Sebo TJ, Therneau TM, Gores GJ, de Groen PC, Baron TH, Levy MJ, Halling KC, Roberts LR (2004) A comparison of routine cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of malignant bile duct strictures. *Am J Gastroenterol.* 99: 1675-1681
115. Knudson AG JR (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 820- 823
116. Knudson AG (1985). Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. *Cancer Research* 45: 1437-1443

117. Knuutilka S, Aalto Y, Autio U, Bjorkvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monnie O, Pere H, Tapper J, Tarkkanen M, Varis A, Wasenius VM, Wolf M, Zhu Y (1999) DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol* 155: 683-694
118. Komoike Y, Tamaki Y, Sakita I, Tomita N, Ohue M, Sekimoto M, Miyazaki M, Kadota M, Masuda N, Ooka M, Ohnishi T, Nakano Y, Kozaki T, Kobayashi T, Matsuura N, Ikeda T, Horii A, Monden M (1999) Comparative genomic hybridization defines frequent loss on 16p in human anaplastic thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 14: 1157-1162
119. Kools PF, Wanschura S, Schoenemakers EF, Geurts JM, Mols R, Kazmierczak B, Bullerdiek J, van den Berghe H, van de Ven WJ (1995) Identification of chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 79: 1-7
120. Koyama M, Nagai H, Bando K, Ito M, Moriyama Y, Emi M (1999) Localization of a target region of allelic loss to a 1-cM interval on chromosome 16p13.13 in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 90: 951-956
121. Kurose K, Mine N, Iida A, Nagai H, Harada H, Araki T, Emi M (2001) Three aberrant splicing variants of HMGIC gene transcribed in uterine leiomyomas. *Genes Cancer & Chromosomes* 30: 212-217
122. Laâbi Y, Gras MP, Carbonnel F, Brouet JC, Berger R, Larsen CJ, Tsapis A (1992) A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *The EMBO Journal* 11: 3897-3904
123. Laane CJ, Murr AH, Mhatre AN, Jones KD, Lalwani AK (2002) Role of Epstein-Barr-Virus and Cytomegalovirus in the etiology of benign parotid tumors. *Head & Neck* 24: 443-450
124. Laine M, Blauer M, Ylikomi T, Tuohimaa P, Aitasalo K, Happonen RP, Tenovuo J (1993) Immunohistochemical demonstration of androgen receptors in human salivary glands. *Arch Oral Biol.* 38: 299-302
125. Lambros BK, Natrajan R, Reis-Filho JS (2007) Chromogenic and fluorescence in situ hybridization in breast cancer. *Human Pathology* 38: 1105-1122
126. Lambros MB, Simpson PT, Jones C, Natrajan R, Westbury C, Steele D, Savage K, Mackay A, Schmitt FC, Ashworth A, Reis-Filho JS (2006) Unlocking pathology archives for molecular genetic studies: a reliable method to generate probes for chromogenic and fluorescence in situ hybridization. *Laboratory Investigation* 86: 398-408
127. Landrette SF, Kuo YH, Hensen K, van Waalwijk van Doorn-Khosrovani SB, Perrat PN, Van de Ven WJ, Delwel R, Castilla LH (2005) Plag1 and Plag2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11. *Blood* 105: 2900-2907
128. Lathe R (1990) Oligonucleotide probes for in situ hybridisation with automated chromosome denaturation. *Techniques* 3: 109-115
129. Layfield LJ, Reznicek M, Lowe M, Bottles K (1992) Spontaneous infarction of a parotid gland pleomorphic adenoma: report of a case with cytologic and radiographic overlap with a primary salivary gland malignancy. *Acta Cytol* 36: 281-286

130. Lee PS, Sabbath-Solitare M, Redondo TC, Ongcapin EH (2000) Molecular evidence that the stromal and epithelial cells in pleomorphic adenomas of salivary gland arise from the same origin: clonal analysis using human androgen receptor gene (HUMARA) assay. *Human pathology* 31: 498-503
131. Leitch AR, Schwarzacker T, Jackson D, Leitch IJ (eds) *In-situ-Hybridisierung*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg ·Berlin· Oxford 1994
132. Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959). Le Mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Annales de Genetic* 1: 41-49
133. Lerner TJ, Boustany RM, MacCormack K, Gleitsman J, Schlumpf K, Breakefield XO, Gusella JF, Haines JL (1994) Linkage disequilibrium between the juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis gene and marker loci on chromosome 16p12.1. *Am J Hum Genet* 54: 88-94
134. Li X, Tsuji T, Wen S, Mimura Y, Sasaki K, Shinozaki F (1997) Detection of numeric abnormalities of chromosome 17 and p53 deletions by fluorescence in situ hybridization in pleomorphic adenomas and carcinomas in pleomorphic adenoma. *Cancer* 79: 2314-2319
135. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Human Genetics* 80: 224-234
136. Lininger RA, Park WS, Man YG, Pham T, MacGrogan G, Zhuang Z, Tavassoli FA (1998) LOH at 16p13 is a novel chromosomal alteration detected in benign and malignant microdissected papillary neoplasms of the breast. *Human Pathology* 29: 1113-1118
137. Linzer D, Levine A (1979) Characterization of a 54k dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52
138. Loupart ML, Adams S, Armour JA, Walker R, Brammar W, Varley J (1995) Loss of heterozygosity on the X chromosome in human breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 13: 229-238
139. Lowe SW, Cepero E, Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432: 307-315
140. Lu YJ, Osin P, Lakhani SR, Di Palma S, Gusterson BA, Shipley JN (1998) Comparative genomic hybridization analysis of lobular carcinoma in situ and atypical lobular hyperplasia and potential roles for gains and loss of genetic material in breast neoplasia. *Cancer Research* 58: 4721-4727
141. Mark HF, Hanna I, Gnepp DR (1996) Cytogenetic analysis of salivary gland type tumors. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 82: 187-192
142. Mark J, Dahlenfors R, Ekedahl C, Stenman G (1982) Chromosomal patterns in a benign human neoplasm, the mixed salivary gland tumor. *Hereditas* 96: 141-148
143. Mark J, Dahlenfors R (1986) Cytogenetical observations in 100 human benign pleomorphic adenomas: specificity of the chromosomal aberrations and their relationship to sites of localized oncogenes. *Anticancer Res.* 6: 299-308

144. Martinelli M, Martini F, Rinaldi E, Caramanico L, Magri E, Grandi E, Carinci F, Pastore A, Tognon M (2002) Simian Virus 40 sequences and expression of the viral large T antigen oncoprotein in human pleomorphic adenomas of parotid glands. *American Journal of Pathology* 161: 1127-1133
145. Martins C, Fonseca I, Roque L, Pereira T, Ribeiro C, Bullerdieck J, Soares J (2005) PLAG1 gene alterations in salivary gland pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a combined study using chromosome banding, in situ hybridization and immunocytochemistry. *Modern Pathology* 18: 1048-1055
146. Mc Gurk M (2004) Benign parotid tumours. *BMJ* 329: 1299-1300
147. Melzner I, Weniger MA, Bucur AJ, Brüderlein S, Dorsch K, Hasel C, Leithäuser F, Ritz O, Dyer MJ, Barth TF, Möller P (2006) Biallelic deletion within 16p13.13 including SOCS-1 in Karpas1106P mediastinal B-cell lymphoma line associated with delayed degradation of JAK2 protein. *Int J Cancer* 118: 1941-1944
148. Ménard S, Tagliabue E, Campiglio M, Pupa SM (2000) Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *J Cell Physiol* 182: 150-162
149. Mezzanotte R, Vanni R, Flore O, Ferrucci L, Sumner AT (1988) Ageing of fixed cytological preparations produced degradation of chromosomal DNA. *Cytogenetics and Cell Genetics* 48: 60-62
150. Migeon BR (1993) The postulated X-inactivation center at Xq27 is most reasonably explained by ascertainment bias: heterozygous expression of recessive mutations is a powerful means of detecting unbalanced X inactivation. *Am J Hum Genet* 52: 431-434
151. Mitelman F, Levan G (1981) Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasm. A survey of 1.872 cases. *Hereditas* 95: 79-139.
152. Mitelman F (1985) Catalogue of chromosome aberrations in cancer, 2nd edition. In: Sandberg AA (ed) *Progress and topics in cytogenetics*. Vol 5. Liss, New York
153. Mitelman F (1994) Catalogue of chromosome aberrations in cancer. 5th edition (Wiley-liss New York)
154. Mitelman F, Mertens F, Johansson B (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genetics* 15: 417-474
155. Mitra AB, Murty VV, Li RG, Pratap M, Luthra UK, Chaganti RS (1994) Allelotype analysis of cervical carcinoma. *Cancer Res* 54: 4481-4487
156. Miyamoto S, Yasui Y, Kim M, Sugie S, Murakami A, Ishigamori-Suzuki R, Tanaka T (2008) A novel rasH2 mouse carcinogenesis model that is highly susceptible to 4-NQO-induced tongue and esophageal carcinogenesis is useful for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis* 29: 418-426
157. Mo L, Zheng X, Huang HY, Shapiro E, Lepor H, Cordon-Cardo C, Sun TT, Wu XR (2007) Hyperactivation of Ha-ras oncogene, but not ink4a/Arf deficiency, triggers bladder tumorigenesis. *J Clin Invest*. 117: 314-325
158. Monroe KR, Yu MC, Kolonel LN, Coetzee GA, Wilkens LR, Ross RK, Henderson BE (1995) Evidence of an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nat Med*. 1: 827-829

159. Montenarh M, Kohler M, Aggeler G, Henning R (1985) Structural prerequisites of simian virus 40 large T antigen for the maintenance of cell transformation. *EMBO J* 4: 2941-2947
160. Montenarh M (1995) Marker genes for cytotoxic exposure: p53. *Stem Cells*. 13 Suppl 1: 136-141
161. Moriki T, Ueta S, Takahashi T, Mitani M, Ichien m (2001) Salivary duct carcinoma: cytologic characteristics and application of androgen receptor immunostaining for diagnosis. *Cancer Cytopathology* 93: 344-350
162. Morio T, Morimitsu Y; Hisaoka M, Makishima K, Hashimoto H (2002) DNA copy number changes in carcinoma in pleomorphic adenoma of the salivary gland: a comparative genomic hybridization study. *Pathology International* 52: 501-507
163. Moruta H and Kohama K (eds.) *G Proteins, cytoskeleton and cancer*. R.G. Landes, Austin, Texas, 1998
164. Müller S, Vigneswaran N, Gansler T, Gramlich T, DeRose PB, Cohen C (1994) C-erbB-2 oncoprotein expression and amplification in pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma: relationship to prognosis. *Mod Pathol*. 7: 628-632
165. Mylius EA (1960) The identification and the role of myoepithelial cell in salivary gland tumours. *Acta Pathol Microbiol Scand [Suppl 139]* 50: 1-159
166. Nakopoulou L, Alexiadou A, Theodoropoulos GE, Lazaris AC, Tzonou A, Keramopoulos A (1996) Prognostic significance of the co-expression of p53 and c-erbB-2 proteins in breast cancer. *J Pathol* 179: 31-38
167. Nakopoulou L, Panayotopoulou EG, Giannopoulou EG, Tsirmpa I, Katsarou S, Mylona E, Alexandrou P, Keramopoulos A (2007) Extra copies of chromosome X and 16 in invasive breast cancer are related to aggressive phenotype and poor prognosis. *Journal of Clinical Pathology* 60: 808-815
168. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) Deletions of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-756
169. Noguchi S, Aihara T, Yoshino K, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H (1996) Demonstration of monoclonal origin of human parotid gland pleomorphic adenoma. *Cancer* 77: 431-435
170. Noguchi T, Kimura Y, Takeno S, Chujo M, Uchida Y, Mueller W, Gabbert HE (2003) Chromosomal imbalance in esophageal squamous cell carcinoma: 3q gain correlates with tumor progression but not prognostic significance. *Oncol Rep* 10: 1393-1400
171. Nordkvist A, Røijer E, Bang G, Gustafsson H, Behrendt M, Ryd W, Thoresen S, Donath K, Stenman G (2000) Expression and mutation pattern in benign and malignant salivary gland tumors. *Int J Oncol* 16: 477-483
172. Norlin R (1965) Bilateral mixed tumor of the parotid initially regarded as pharyngeal neoplasm. *Pract Otorhinolaryngol* 27: 298-301
173. Nowell PC, Hungerford DA (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497

174. Ohki K, Kumamoto R, Ishinohasama M, Suzuki M, Yamaguchi T, Echigo S, Motegi K, Ooya K (2001) Genetic analysis of DNA microsatellite loci in salivary gland tumours: comparison with immunohistochemical detection of hMSH2 and p53. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 30: 538-544
175. Ohtaké S, Cheng J, Ida H, Suzuki M, Ohshiro K, Zhang W, Saku T (2002) Precancerous foci in pleomorphic adenoma of the salivary gland: recognition of focal carcinoma and atypical tumor cells by p53 immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med* 31: 590-597
176. Osborne RJ, Leech V (1994) Polymerase chain reaction allelotyping of human ovarian cancer. *Br J Cancer* 69: 429-438
177. Papadopoulou N, Papakonstanti EA, Kallergi G, Alevizopoulos K, Stournoras C (2009) Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life* 61: 56-61
178. Pardue ML and Gall JG (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Genetica* 64: 600-604
179. Park BH, Vogelstein B (eds.) (2003) Section 7 Tumor-Suppressor Genes aus *Cancer Medicine, Part II Scientific Foundation, Section 1: Cancer Biology* 87- 105
180. Patey DH, Thackray AC (1958): The treatment of parotid tumours in the light of a pathological study of parotidectomy material. *Brit. J. Surg.* 45, 477-487
181. Persons DL, Hartmann LC, Herath JF, Borell TJ, Cliby WA, Keeney GL, Jenkins RB (1993) Interphase molecular cytogenetic analysis of epithelial ovarian carcinomas. *American Journal of Pathology* 142: 733-741
182. Persons DL, Robinson RA, Hsu PH, Seelig SA, Borell TJ, Hartmann LC, Jenkins RB (1996) Chromosome-specific aneusomy in carcinoma of the breast. *Clinical Cancer Research* 2: 883-888
183. Pinkas-Kramarski R, Alroy I, Yarden Y (1997) ErbB receptors and EGF-like ligands: cell lineage determination and oncogenesis through combinatorial signaling. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2: 97-107
184. Pinkel D, Straune T, Gray J (1986 a) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938
185. Pinkel D, Gray J, Trask B, van den Engh G, Fuscoe F, van Dekken H (1986 b) Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nuclei acid probes. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 151-157
186. Poetsch M, Zimmermann A, Wolf E, Kleist B (2005) Loss of Heterozygosity occurs predominantly, but not exclusively, in the epithelial compartment of pleomorphic adenoma. *Neoplasia* 7: 688-695
187. Polunovsky VA, Gingras AC, Sonenberg N, Peterson M, Tan A, Rubins JB, Manivel JC, Bitterman PB (2000) Translational control of the antiapoptotic function of Ras. *J Biol Chem* 275: 24776-24780
188. Powell RD, Pettay JD, Powell WC, Roche PC, Grogan TM, Hainfeld JF, Tubbs RR (2007) Metallographic in situ hybridization. *Human Pathology* 38: 1145-1159
189. Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, El-Naggar AK (1994) Amplifikation and overexpression of

- Her-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Research* 54: 5675-5682
190. Preuss SF, Guntinas-Lichius O (2006) Zur Diagnostik und Behandlung von Parotistumoren. *HNO* 54: 868-874
 191. Price CM (1993) Fluoreszenz in Situ Hybridisation. *Blood Review* 7: 127-134
 192. Raap AK, Marijnen JG, Vrolijk J, van der Ploeg N (1986) Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures. *Cytometry* 7: 235-242
 193. Raybaud H, Odin G, Fafet A; Santini J, Monteil RA (2003) Genetic alterations in oral and head and neck squamous cell carcinomas: analysis of international literature. *Pathol Biol* 51: 176-184
 194. Righi PD, Li YQ, Deutsch M (1994) The role of p53 gene in the malignant transformation of pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Anticancer Res* 14: 2253-2257
 195. Rohen C, Rogalla P, Meyer-Bolte K, Bartnizke S, Chilla R, Bullerdiek J (1999) Pleomorphic Adenoma of the salivary glands: absence of HMG1Y rearrangements. *Cancer Genet Cytogenet* 111: 178-181
 196. Røijer E, Nordkvist A, Ström AK, Ryd W, Behrendt M, Bullerdiek J, Mark J, Stenman G (2002) Translocation, deletion/amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Am J Pathol* 36: 48-52
 197. Rommel B, Bullerdiek J, Bartnizke S, Schloot W (1990) No rearrangement of c-mos in salivary gland pleomorphic adenomas with 8q12 aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* 49: 165-169
 198. Rosa JC, Fonseca I, Félix A, Soares J (1996) Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Histopathology* 28: 247-252
 199. Röser K, Löning T (2001) Phänotyp-Genotyp-Korrelationen in Speicheldrüsentumoren. *Laryngo-Rhino-Otol* 80: 639-641
 200. Rowell JD (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293
 201. Rubin CM (1992) Technical advances in the cytogenetic a of malignant tissues. *Cancer* 69: 1567- 1571
 202. Russo G, Zamparelli A, Howard CM, Minimo C, Bellan C, Carillo G, Califano L, Leoncini L, Giordano A, Claudio PP (2005) Expression of cell cycle-regulated proteins pRB2/p130, p107, E2F4, p27 and pCNA in salivary gland tumors: prognostic and diagnostic implications. *Clinical Cancer Research* 11: 3265-3273
 203. Sahlin P, Mark J, Stenman G (1994) Submicroscopic deletion of 3p sequences in pleomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 10: 256-261
 204. Sahlin P, Mark J, Stenman G (1995) Detection of hidden structural rearrangements by FISH in pleomorphic adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 81-86
 205. Saku T, Hayashi Y, Takahara O, Matsuura H, Tokunaga M, Tokuoka S, Soda M, Mabuchi K, Land CE (1997) Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950 - 1987. *Cancer* 79: 1465-1475

206. Sandros J, Stenman G, Mark J (1989) Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 153-167
207. Sarosdy MF, Kahn PR, Ziffer MD (2006) Use of a multitarget fluorescence in situ hybridization assay to diagnose bladder cancer in patients with hematuria. *J Urol* 176: 44-47
208. Sataloff RT, Price DB, Roberts BR (1987) Bilateral synchronous mixed tumors of the parotid glands. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113: 880-881
209. Sawyer JR, Tryka AF, Bell JM, Boop FA (1995) Nonrandom chromosome breakpoints at Xq26 and 2q33 characterize cemento-ossifying fibromas of the orbit. *Cancer* 76: 1853-1859
210. Sayagués JM, Tabernero MD, Maillo A, Diaz P, Rasillo A, Bortoluci A, Gomez-Moreta J, Santos-Briz A, Morales F, Orfao A (2002) Incidence of numerical chromosome aberrations in meningioma tumors as revealed by fluorescence in situ hybridization using 10 chromosome-specific probes. *Cytometry (Clinical Cytometry)* 50: 153-159
211. Scappaticci S, Lo Curto F, Mira E (1973) Karyotypic variation in benign pleomorphic adenoma of the parotid and in normal salivary glands. *Acta Oto* 76: 221-228
212. Schick B, Veldung B, Wemmert S, Jung V, Montenarh M, Meese E, Urbschat S (2005) p53 and Her-2/neu in juvenile angiofibromas. *Oncol Rep* 13: 453-457
213. Schildkraut CL, Marmur J; Doty P (1961) The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *J Mol Biol* 3: 595-617
214. Schlott T, Nagel H, Laskawi R, Eiffert H, Droese M (2001) Genetic analysis of the human oncoprotein MDM2 in benign and malignant tumors of the salivary gland. *Pathobiology* 69: 67-76
215. Schoenberg MP, Hakimi JM, Wang S, Bova GS, Epstein JI, Fischbeck KH, Isaacs WB, Walsh PC, Barrack ER (1994) Microsatellite mutation (CAG24--> 18) in the androgen receptor gene in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 74-80
216. Schoenmakers EF, Kools PF, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, van den Berghe H, van de Ven WJ (1994) Physical Mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma and myxoid liposarcoma. *Genomics* 20: 210-222
217. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497
218. Seifert G, Donath K (1976) Die Morphologie der Speicheldrüsenenerkrankungen. *Arch Otorhinolaryngol* 213: 111-208
219. Seifert G, Langrock I, Donath K (1976b) Pathomorphologische Subklassifikation der pleomorphen Speicheldrüsenadenome. Analyse von 310 pleomorphen Parotisadenomen. *HNO* 24: 415-426
220. Seifert G, Miehle A, Haubrich J, Chilla R (1984) Speicheldrüsenkrankheiten, Pathologie-Klinik-Therapie-Faszialischirurgie. Thieme, Stuttgart New York

221. Seifert G (1991) WHO Histological typing of salivary gland tumours. 2nd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo
222. Seifert G, Sobin LH (1992) The World Health Organization's histologic classification of salivary gland tumors. A commentary on the second edition. *Cancer* 70: 379-385
223. Seifert G (1992b) Die neue pathohistologische WHO-Klassifikation der Speicheldrüsenadenome. *Pathologe* 13: 322-335
224. Seifert G (ed) *Oralpathologie I: Pathologie der Speicheldrüsen*. 1. Auflage 1996, Springer Verlag
225. Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707
226. Sinke RJ, de Leeuw B, Janssen HA, Weghuis DO, Suijkerbuijk RF, Meloni AM (1993) Localization of X chromosome short arm markers relative to synovial sarcoma- and renal adenocarcinoma- associated translocation breakpoints. *Hum Genet* 92: 305-308
227. Skálová A, Stárek I, Vanecek T, Kucerová V, Plank L, Szépe P, Di Palma S, Leivo I (2003) Expression of Her-2/neu gene and protein in salivary duct carcinomas of parotid gland as revealed by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 42: 348-356
228. Soini Y, Kamel D, Nuorva K, Lane DP, Vähäkangas K, Pääkkö P (1992) Low p53 protein expression in salivary gland tumors compared with lung carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat.* 421: 415-420
229. Speicher MR, Gwyn BS, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12: 368-375
230. Spitz MR, Tilley BC, Batsakis JG, Gibeau JM, Newell GR (1984) Risk factors for major salivary gland carcinoma. *Cancer* 54: 1854-1859
231. Stanbridge EJ (1990) Human tumor suppressor genes. *Annual review of Genetics* 24: 615-657
232. Stenman G, Mark J (1983) Specificity of the involvement of chromosomes 8 and 12 in human mixed salivary-gland tumours. *J Oral Pathol* 12: 446-457
233. Stenman G (2005) Fusion oncogenes and tumor type specificity - insights from salivary gland tumors. *Seminars in Cancer Biology* 15: 224-235
234. Stennert E, Jungehülsing M (2001) Chirurgie der Glandula parotis einschließlich rekonstruktiver Faszialis-Chirurgie: Standard und Qualitätssicherung. *Laryngorhinootologie* 80: 156-197
235. Stennert E, Wittekindt C, Klusmann JP, Arnold G, Guntinas-Lichius O (2004) Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland: a prospective histopathological and immunohistochemical study. *Laryngoscope* 114: 158-163
236. Swiger RR, Tucker JD (1996) Fluorescence in situ hybridization: a brief review. *Environ Mol Mutagen* 27: 245-254
237. Takashi M, Morimitsu H, Kazumi M, Hashimoto H (2002) DNA copy number changes in carcinoma in pleomorphic adenoma of the salivary gland: A comparative genomic hybridization study. *Pathology International* 52: 501-507

238. Takeda Y (1999) An immunohistochemical study of bizarre neoplastic cells in pleomorphic adenomas: its cytological nature and proliferative activity. *Pathol Int* 49: 993-999
239. Takeuchi Y, Sobue M, Yoshidam, Esaki T, Katoh Y (1975) Pleomorphic adenoma of the salivary gland. With special reference to histochemical and electron microscopic studies and biochemical analysis of glycosaminoglycans in vivo and in vitro. *Cancer* 36: 1771-1789
240. Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J (1999) New strategy for multicolour fluorescence in situ hybridization: COBRA-Combined binary ratio labelling. *Eur J Hum Genet* 7:2-11
241. Taplin ME, Bublely GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, Keer HN, Balk SP (1995) Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med* 332: 1393-1398
242. Thackray AC, Sobin LH (1972): *Histological typing of salivary gland tumors*. Geneva: World Health Organization 1972
243. Thackray AC, Lucas RB (1974) *Tumors of the major salivary glands*. Atlas of tumor pathology, ser 2 fasc 10. Armed Forces institute of Pathology, Washington.
244. Therman E, Patau K (1974) Abnormal X chromosomes in man: origin, behavior and effects. *Humangenetik* 25: 1-16
245. Tilley WD, Buchanan G, Hickey TE, Bentel JM (1996) Mutations in the androgen receptor are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin Cancer Res* 2: 277-285
246. Timms JF, White SL, O'Hare MJ, Waterfield MD (2002) Effects of ErbB-2 overexpression on mitogenic signalling and cell cycle progression in human breast luminal epithelial cells. *Oncogene* 26: 6573-6586
247. Tjio JH and Levan A (1956). The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1-6
248. Trask B, van der Engh G, Pinkel D, Mullikin J, Waldman F, van Dekken H, Gray J (1988) Fluorescence in situ hybridisation to interphase cell nuclei in suspension allows flow cytometric analysis of chromosome content and microscopic analysis of nuclear organization. *Hum Genet* 78: 251-259
249. Tsai CC, Chen CL, Hsu HC (1996) Expression of Epstein-Barr-Virus in carcinomas of major salivary glands: a strong association with lymphoepithelioma-like carcinoma. *Human Pathology* 27: 258-262
250. Turnbull ED, Frazell EL (1969) Multiple tumors in the major salivary glands. *Am J Surg* 118: 787-789
251. Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunakaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y (1996) A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/ neuregulin and epidermal growth factor. *Moll. Cell. Biol.* 16: 5276-5287
252. Ullmann R, Turner G, Kirchhoff M, Chen W, Tonge B, Rosenberg C, Field M, Vianna-Morgante AM, Christie L, Krepischi-Santos AC, Banna L, Breteton AV, Hill A, Bisgaard AM; Müller I, Hultschig C, Erdogan F, Wieczorek G, Ropers HH (2007) Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predisposes to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat.* 28: 674-682

253. Van Dekken H, Baumann JG (1989) A new application of in situ hybridization: detection of numerical and structural chromosome aberrations with a combination centromeric-telomeric DNA probe. *Cytogenet Cell Genet* 41: 193-201
254. Von Hanseemann D (1890) Ueber asymmetrische zelltheilung in epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat.* 119: 299-326
255. Voz ML, Agten NS, Van de Ven WJ, Kas K (2000a) PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positiv regulator of IGF- II. *Cancer Research* 60: 106-113
256. Voz ML, Van de Ven WJ, Kas K (2000b) First insights into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Adv Dent Res* 14: 81-83
257. Voz ML, Mathys J, Hensen K, Pendeville H, Van Valckenborgh I, Van Huffel C, Chavez M, Van Damme B, De Moor B, Moreau Y, Van de Ven WJ (2004) Microarray screening for target genes of the proto-oncogene PLAG1. *Oncogene* 23: 179-191
258. Wanschura S, Belge G, Stenman G, Kools P, Dal Cin P, Schoenmakers E, Huysmans C, Van den Berghe H, Bartnizke S, Van de Ven WJ, Bullerdieck J (1996) Mapping of the translocation breakpoints of primary pleomorphic adenomas and lipomas within a common region of chromosome 12. *Cancer Genet Cytogenet* 86: 39-45
259. Warr T, Ward S, Burrows J, Harding B, Wilkins P, Harkness W, Hayward R, Darling J, Thomas D (2001) Identification of extensive genomic loss and gain by comperative genomic hybridization in malignant astrocytoma in children and young adults. *Genes Chromosome & Cancer* 31: 15-22
260. Weimert TA, Work WP (1976) Bilateral synchronous mixed tumors of the parotid gland. *Arch Otolaryngol* 102: 702-705
261. Weiss MJ, Guo C, Shusterman S, Hii G, Mirensky TL, White PS, Hogarty MD, Rebbeck TR, Teare D, Urbanek M, Brodeur GM, Maris JM (2000) Localization of a hereditary neuroblastoma predisposition gene to 16p12-13. *Medical and Pediatric Oncology* 35: 526-530
262. Wemmert S, Romeike B, Ketter R, Steudel WI, Zang KD, Urbschat S (2006) Intratumoral genetic heterogeneity in pilocytic astrocytomas revealed by CGH-analysis of microdissected tumor cells and FISH on tumor tissue sections. *International Journal of Oncology* 28: 353-360
263. Wiegant J, Bezrookove V, Rosenberg C, Tanke HJ, Raap AK, Zhang H, Bittner M, Trent JM, Meltzer P (2000) Differentially painting human chromosome arms with combined binary ratio-labeling fluorescence in situ hybridization. *Genome Res* 10: 861-865
264. Williams C (1980) Bilateral parotid neoplasms. *PlastReconstrSurg* 66: 448-452
265. Willis RA (1960) Pathology of tumours, 3rd edn. Butterworth, London
266. Winckler J (1970) Verwendung gefriergetrockneter Kryostatschnitte für histologische und histochemische Untersuchung. *Histochemie* 24: 168-186
267. Winckler J, Hempel K (1971) Histochemischer und autoradiographischer Katecholaminnachweis an einem Gewebsschnitt. *Histochemie* 25: 130-142

268. Xiao S, Renshaw A, Cibas ES, Hudson TJ, Fletcher JA (1995) Novel fluorescence in situ hybridization approaches in solid tumors. *American Journal of Pathology* 147: 896-904
269. Yajin K, Harada Y, Omura R (1987) Simultaneous pleomorphic adenomas of the right parotid and ipsilateral submandibular glands. *Auris Nasus Larynx* 14: 47-55
270. Yamamoto Y, Kishimoto Y, Virmani AK, Smith A, Vuitch F, Albores- Saavedra J, Gazdar AF (1996) Mutations associated with carcinomas arising from pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Human Pathology* 27: 782-786
271. Yamamoto Y, Kishimoto Y, Wistuba II, Virmani AK, Vuitch F, Gazdar AF, Albores-Saavedra J (1998) DNA analysis at p53 locus in carcinomas arising from pleomorphic adenomas of salivary glands: comparison of molecular study and p53 immunostaining. *Pathol Int.* 48: 265-272
272. Yan W, Song L, Wei W, Li A, Liu J, Fang Y (2005) Chromosomal abnormalities associated with neck nodal metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biology* 26: 306-312
273. Zakrzewska M, Rieske P, Debiec-Rychter M, Zakrzewski K, Polis L, Fiks T, Liberski PP (2004) Molecular abnormalities in pediatric embryonal brain tumors-analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 1,5,9,10,11,16,17 and 22. *Clin Neuropathol.* 23: 209-217
274. Zang KD, Singer H (1967) Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216: 84-85
275. Zhang FF, Arber DA, Wilson TG, Kawachi MH, Slovak ML (1997) Toward the validation of aneusomy detection by fluorescence in situ hybridization in bladder cancer. Comparative analysis with cytology, cytogenetics, and clinical features predicts recurrence and defines clinical testing limitations. *Clinical Cancer Research* 3: 2317-2328
276. Zheng PP, Pang JC, Hui AB, Ng HK (2000) Comparative genomic hybridization detects loss of chromosome 22 and 16 as the most common recurrent genetic alterations in primary ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 122: 18-25

8 Anhang

8.1 Lösungen und Puffer

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

HCL- Alkohol

1l 70% Ethanol
10ml 25% HCL

Pepsin 5%

100ml 0,01 N HCl
100µl 5% Pepsin

4% PFA in PBS (pH 7,4)

4g Paraformaldehyd
100ml PBS

Denaturierungsmix (0,5ml):

350 µl Formamid _{deion.}
50 µl Natriumphosphatpuffer (0,5 M Stammlösung)
50 µl 20x SSC steril
50 µl H₂O_{dd} steril

Eindeckmedium:

0,15 µg DAPI in 1 ml Antifade (0,1 µl/ml, Vectashield, Vector Laboratories, USA)

Hybridisierungsmix der Firma Q-Biogene:

50% Formamid

2xSSC

Pro OT wurde 5µl Hybridisierungsmix (0,5 µl zentromerspezifische Chromosom X-Sonde (PSAT000X-R, Q-Biogene), 2,0 µl telomerspezifische 16p-Sonde (PTEL16P-G, Q-Biogene) und 2,5 µl Hybridisierungsmix bzw. 10µl 17-p53-Sonde (PONC1753, Q-Biogene) bzw. 10µl 17p12-Her-2/neu-Sonde (PONC 1712, Q-Biogene)) hergestellt

10xPBS (pH 7,0)Lösung A:16,02g Na₂HPO₄ x 2H₂O

+ 73,84g NaCl

in 900ml Aqua dest. lösen

Lösung B:2,76 NaH₂PO₄ x 2H₂O

+ 16,56g NaCl

in 200ml Aqua dest. lösen

pH-Wert der Lösung A mit Lösung B auf pH 7,0 einstellen und vor Gebrauch 1:10 verdünnen

RNase – Stammlösung10mg Rnase/ml H₂O_{dd}**20xSSC (pH 7,0):**

3,0 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

vor Gebrauch 1:20 verdünnen

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4-1 HE-Färbung eines zellarmen pleomorphen Adenoms. Zellkerne blau gefärbt. Vergrößerung 10fach.....	43
Abb. 4-2 HE-Färbung eines zellreichen pleomorphen Adenoms. Zellkerne blau gefärbt. Vergrößerung 10fach.....	43
Abb. 4-3 Schematischer Überblick über den Ablauf der <i>In situ</i> Hybridisierung. Modifiziert nach Leitch (ed): <i>In situ</i> Hybridisierung, Spektrum akademischer Verlag 1994.....	Error! Bookmark not defined.46
Abb. 4-4 Graphische Darstellung der Denaturierung und Hybridisierung direkt markierter Sonden.....	Error! Bookmark not defined.48
Abb. 4-5 Schematische Darstellung eines Fluoreszenzmikroskops aus Leitch (ed): <i>In situ</i> Hybridisierung. Spektrum akademischerVerlag 1994.	60
Abb. 5-1 Hybridisierung weiblicher Lymphozyten mit der zentromerspezifischen X Chromosom-Sonde (Cy3) und der Telomersonde für 16p (FITC-grün). Kernfärbung mit DAPI (blau).	66
Abb. 5-2 Hybridisierung von Parotisnormalgewebe mit der genspezifischen Her-2/neu- Sonde (Cy3-rot) und der Alpha-Satelitten-Sonde für das Chromosom 17 (FITC- grün). Kernfärbung DAPI (blau).....	67
Abb. 5-3 Graphische Darstellung der gesamten Verluste von Chromosom X (blau) in Prozent mit der berechneten Signifikanzgrenze unter Einbeziehung der Streuwerte bei 10% (orange).	70
Abb. 5-4 Übersicht über die prozentuale Verteilung des numerischen Chromosom X- Verlust in Bezug auf Monosomie bzw. homzygoter X-Verlust.....	72
Abb. 5-5 Ausschnitt von Tumorzellen eines pleomorphen Adenoms in der FISH- Analyse einer weiblichen Patientin mit der zentromerspezifischen Sonde für das Chromosom X (Cy3-rot) und der telomerspezifischen Sonde für den Chromosomenabschnitt 16p (FITC-grün). Die Pfeile markieren von einem normalen Karyotyp abweichende Interphasekerne mit deutlichem #X-Verlust. Kernfärbung mit DAPI (blau).	73
Abbildung 5-6: Graphische Darstellung der Verluste der Chromosomenregion 16p in Prozent, eingezeichnet ist die berechnete Signifikanzgrenze unter Einbeziehung der Streuwerte bei 10% (orange).....	76
Abbildung 5-7: Graphischer Überblick über die ermittelten prozentualen Anteile des Verlustes von einem oder beiden kurzen Arme des Chromosoms 16p bei 21 untersuchten pleomorphen Adenome mittels der FISH-Untersuchungstechnik..	78

- Abbildung 5-8: Ausschnitt eines pleomorphen Adenoms eines männlichen Patienten mit Hilfe der FISH-Analyse. Mit Pfeilen ist der Verlust des Chromosomenabschnitts 16p (FITC-grün) bei stark ausgeprägtem Chromosom X-Verlust (Cy3-rot) angedeutet. Kernfärbung mit DAPI (blau)..... 79
- Abbildung 5-9: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils der zusammengefassten Chromosom 17- (blau) und Her-2/neu-Verluste (rot) mit eingezeichneter Signifikanzgrenze (orange) bei 10%. 84
- Abbildung 5-10: Blockdiagramm mit Übersicht über die prozentuale Verteilung des numerischen Chromosom- und Genverlustes in Bezug auf Monosomie und homozygotem Verlust des Chromosom 17 in Vergleich zu Her-2/neu. 86
- Abbildung 5-11: Tumorzellen eines pleomorphen Adenoms. Erkennbar sind Verluste der #17- (FITC-grün) und genspezifischen Her-2/neu-Sonde (Cy3-rot). Mit Pfeilen markiert zeigt sich hier sowohl eine Monosomie 17 (unterer Kern) als auch ein spezifischer Verlust des Her-2/neu Gens (oberer Kern). Kernfärbung mit DAPI (blau)..... 87
- Abbildung 5-12: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils des Chromosom 17- (blau) und p53-Verlustes (rot). Eingezeichnet ist die Signifikanzgrenze bei 10% (orange). 90
- Abbildung 5-13: Blockdiagramm mit Übersicht über den prozentualen Anteil des homozygoten bzw. heterozygoten Verlustes des Chromosoms 17 (blau) im Vergleich zu einem Verlust des p53-Gens (rot). 91
- Abbildung 5-14: Beispiel eines pleomorphen Adenoms mit deutlichem p53-Verlust (Cy3-rot). In einigen Interphasekernen lässt sich zudem eine Monosomie 17 ausmachen (FITC-grün). Kernfärbung mit DAPI (blau)..... 92

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Lokalisation des pleomorphen Adenoms (Speicheldrüsen-Register 1965-1994) nach Seifert (ed). Oralpathologie I: Pathologie der Speicheldrüsen. 1. Auflage 1996, Springer Verlag	15
Tabelle 2-2: Darstellung der histologischen Untergruppen mit ihrem entsprechenden Stromaanteil nach Seifer et al. (1976b).....	16
Tabelle 2-3: WHO-Klassifikation der Speicheldrüsentumore (Seifert und Sobin, 1991)	18
Tabelle 4-1: Verdauzeiten des Parotisgewebes mit 5%igem Pepsin.....	56
Tabelle 4-2: Fluorochrome mit den dazugehörigen Detektionsfiltersets	59
Tabelle 5-1: Statistische Auswertung der Blutlymphozyten und Parotisnormalgewebe mit Berechnung des Mittelwertes der nachgewiesenen Gesamtverluste und der einfachen sowie zweifachen Standardabweichung	65
Tabelle 5-2: Prozentuale Veränderungen von Chromosom X mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Operationstag. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze.	69
Tabelle 5-3: Prozentuale Veränderungen der Chromosomenregion 16p mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Operationstag. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze.	75
Tabelle 5-4: Prozentuale Veränderungen des Chromosoms 17 mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Operationstag. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze.	81
Tabelle 5-5: Prozentuale Veränderungen des Gens Her-2/neu auf #17 mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Operationstag. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze.	82
Tabelle 5-6: Vergleich der zusammengefassten signifikanten Verluste des Chromosoms 17 und des Her-2/neu-Gens mit Angaben des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Tag der Operation.....	83
Tabelle 5-7: Prozentuale Veränderungen des Chromosoms 17 mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Tag der Operation.	88
Tabelle 5-8: Prozentuale Veränderungen des Gens p53 auf #17 mit Angabe des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Tag der Operation.	89
Tabelle 5-9: Vergleich der zusammengefassten definitiven Gesamtverluste des Chromosoms 17 und dem p53-Gen mit Angaben des Geschlechts und dem Alter der Patienten am Tag der Operation.....	89

Tabelle 5-10: Zusammenfassung aller fünf untersuchten Chromosomen bzw. Chromosomenabschnitte mit Angabe des Geschlechts und dem Alter. Grau hinterlegte Ergebnisse liegen unterhalb der Signifikanzgrenze von 10%.....	94
Tabelle 5-11: Vergleich der FISH- mit den CGH Ergebnissen.....	96

8.5 Genehmigung zur wissenschaftlichen Verwertung der Tumorproben

Die in dieser Dissertationsschrift verwendeten Tumorproben wurden mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. R. M. Bohle, Direktor des Instituts für allgemeine und spezielle Pathologie, zur wissenschaftlichen Verwertung zugelassen.

Tabellen

Fall	A	G	Histologie	FISH - Ergebnisse	CGH - Ergebnisse
021	28	W	Verbände myoepithelialer Zellen; chondroides und herdförmig myxomatöses Stroma Tumorgöße: 3cm	- #X (40,5%), - #16p (6%)	-16p, -17p
025	31	M	Zahlreiche myoepitheliale Zellen und myxomatöse Grundsubstanz; bindegewebige Pseudokapsel, stellenweise durchbrochen Tumorgöße: 3cm	- #X (11,1%), - #16p (15%)	+X
038	72	W	Reichlich chondroide Matrix und schmalsträngige Epithelformationen Tumorgöße: 1,5cm	- #X (24,5%), - #16p (11%) - #17 (30%), - Her2neu (29%)	Keine Veränderungen bezüglich #X, #17 und #16
041	49	M	Überwiegend myxoides Stroma mit unterschiedlich grossen epithelialen Zellverbänden, z.T. strangförmig, netzförmig; zarte Kapsel Tumorgöße: 1,5cm	- #X (12,5%), - #16p (15,5%) - #17 (31,5%), - Her2neu (29%)	Keine Veränderungen bezüglich #X, #17 und #16
056	70	M	Sehr zellreich, Stromaanteil 30% nach Seifert, Stränge epidemoider Zellen, wenig Basalzellen, Onkozyten, Kalkdrüsenzellen; Tumorepithelzellen ähneln Epithelzellen; 30% myxoider Anteile im reichlich PAS positiven Zytoplasma Tumorgöße: 1,8cm	- #X (26%), - #16p (11%) - #17 (37,5%), - Her2neu (36%)	-17

057	40	W	Heterogenes Zellbild: z.T. solide epitheliale Zellverbände, z.T. spindelzellige Areale, daneben myxoide Komponente, bindegewebige Pseudokapsel mit fraglicher Infiltration aber kein Durchbruch Tumgröße: 2cm	- #X (20,6%), - #16p (1,5%) - #17 (36%), - Her2neu (48,5%)	Normalbefund
063	20	M	Höher myxomatöser Anteil, zellreich, z.T. ange deutete chondroide Differenzierung, vollständig bekapselt Tumgröße: 1,5cm	- #X (13,5%), - #16p (15,5%) - #17 (24%), - Her2neu (37,5%)	+X, -16p12p13.1
072	69	M	Tumomatix erheblich myxoid, z.T. chondroid, breite z.T. miteinander kommunizierende epitheliale Verbände, z.T. drüsige epitheliale Verbände, z.T. drüsige epitheliale Zellabschnitte, dicke bindegewebige Kapsel Tumgröße: 3,2cm	- #X (11,4%), - #16p (22,8%)	+Xq, -16p11.1p11.2 -17p
082	62	M	Mesenchymal und ausgedehnte myxoide Stromaverquellung, daneben epitheliale Komponente, z.T. chondroide Komponente, bindegewebige Pseudokapsel Tumgröße: 3cm	- #X (8,5%), - #16p (12,0%)	+X -16p11.2p13.2
084	46	M	Stromareich (70% myxoide), Stränge epidermoider Zellen Tumgröße: 2,4cm	- #X (7,5%), - #16p (27,5%)	+Xq11.1q24, -16p -17

097	29	W	Zellreich, myoepitheliale schmale Stränge, reichlich myxomatöse Grundsubstanz z.T. von bindegewebiger Pseudokapsel umgeben	- #X (29,5%), -#16p (17%) - #17 (23,75%), - Her2neu (35%)	-16q23qter -17q12q21.3
101	34	M	Hoher Stromanteil, reichlich myxoide und herdförmig chondroide Grundsubstanz, sehr zellreich (myoepithelial) Tumorgöße: 2,2cm	- #X (9,0%), - #16p (24,0%) - #17 (26%), -Her2neu (27,5%)	+X, -16 -17q21.1q24
110	34	M	Stromareich, Stroms z.T. chondroid, epitheliale und myoepitheliale Zellen Tumorgöße: 6cm	- #X (23,5%), - #16p (8,5%) - #17 (38,7%), - Her2neu (56,7%)	Keine CGH-Ergebnisse vorhanden
115	45	W	Basophile Matrix, eosinophile Interzellularsubstanz Tumorgöße: 1,5cm	- #X (34,5%), - #16p (13%) - #17 (23%), - Her2neu (19,5%)	-17q22
125	75	M	Mukoide Matrix, teils solide, teils strangförmige Zellen eingestreut, z.T. von zarten Bindegewebekapsel umgeben Tumorgöße: 5cm	- #X (17%), - #16p (23,5%) - #17 (23,5%), - Her2neu (29,5%)	-16p11.2p13.2
127	74	M	Reichlich myxoides Stroma, sternförmige mesenchymale Zellen, z.T. Knorpelgewebe, Anteile einer bindegewebigen Kapsel Tumorgöße: 2cm	- #X (34%), - #16p (20%) - #17 (18%), - Her2 neu (11,5%)	+Xp11.2p21.1 +Xq11.1q26
136	55	M	Reichlich myxoides Stroma, dazwischen fokal gelegene epitheliale Zellen, keine erkennbare Kapsel	- #X (6,7%), - #16p (17,8%) - #17 (31,8%), - Her2neu (63,3 %)	Keine Veränderungen bezüglich #X, #17 und #16

141	48	W	Tumorgröße: 1cm Myxoides Stroma dazwischen mesenchymale Zellelemente Tumorgröße: 4,5cm	- #X (20,5%), - #16p (27,5%)	Normalbefund
143	42	M	Solide strangförmige Architektur der Tumorzellverbände, amorphes feingranuläres basophiles Material mit eingelagerten Zellen und Zellgruppen, bindegewebige Pseudokapsel Tumorgröße: 1cm	- #X (15%), - #16p (22%) - #17 (37,5%), - Her2neu (44,5%)	+Xq11.1q27
154	39	M	z.T. chondroide Metaplasie mit dazwischengelagerten Zellen Tumorgröße: 0,7cm	- #X (23,5%), -16p (14%) - #17 (18,5%), - Her2neu (12%)	+17q21.1q25
161	75	W	Epitheliale teils spindelförmige Zellen, herdförmig myxoid verquollenes Stroma, teils herdförmig regressive Veränderungen, zahlreiche myoepitheliale Komponente, randständig bindegewebige Pseudokapsel Tumorgröße: 2,1cm	- #X (21%), - #16p (7,5%) - #17 (14%), - Her2neu (13%)	Normalbefund

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Meinelt
Vorname: Heike
Geburtsdatum: 08.07.1979
Geburtsort: Darmstadt
Familienstand: ledig

Chronologie:

Schulbildung

1985-1989 Carl Ulrich Schule Weiterstadt
1989-1998 Edith- Stein- Schule, Darmstadt
Abschluss: Abitur

Berufsausbildung

1998-2001 Ausbildung zur Krankenschwester: Staatsexamen
Kreiskrankenhaus Groß- Gerau

Studium

ab 2001 Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
2003 Physikum in Medizin
2004/ 2005 Auslandsemester an der University of Oslo, Norwegen

-
- ab 2005 Doktorarbeit am Institut der HNO in Zusammenarbeit mit
 der Neurochirurgie
- 2006 praktisches Jahr
 Chirurgie, Universitätsklinikum Homburg/Saar
 Pädiatrie, Universitätsklinikum Homburg/Saar
 Innere Medizin in Sursee, Schweiz
- 2008 Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 08/2008 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II des Klinikums
 Aschaffenburg

Publikationen, die im Zusammenhang mit der Dissertation entstanden sindVeröffentlichte Tagungsbeiträge:

Meinelt, Heike; Urbschat, Steffi; Bechtel, Ulrike; Verse, Thomas; Brunner, Christian
(2006) Fluoreszenz In situ Hybridisierung am Gewebeschnitt bei pleomorphen
Adenomen. *77. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-
Nasen- Ohren- Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Mannheim*

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Homburg/Saar durchgeführt.

Ich möchte mich bei allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben bedanken:

Herrn Prof. Dr. Schick für die Fortsetzung der Betreuung dieser Arbeit, die konstruktiven Korrekturvorschläge und die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bloching für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung aller Materialien und Laborkapazitäten.

Frau PD Dr. Steffi Urbschat für die Anregungen zur Durchführung der genomischen Charakterisierung von Pleomorphen Adenomen und die Hilfestellungen bei der Fehlerbehebung technischer Probleme sowie für die Korrektur der Arbeit.

Frau Dr. Silke Wemmert für die Hilfe bei der Bildbearbeitung, die Unterstützung und die hilfreichen Kommentare bei der Korrekturarbeit.

Frau Dr. Vivienne Willnecker für die Übernahme der Korrekturarbeit sowie den hohen Zeitaufwand des Korrekturlesens und die ständige Bereitschaft auch telefonisch Fragen zu beantworten.

Herrn Dr. Christian Brunner für die Korrektur dieser Arbeit und die Hilfe bei der Erstellung der Posterpräsentation in Mannheim.

Frau Ulrike Bechtel für die Einarbeitung in die FISH-Methodik und die fotografische Dokumentation sowie für ihre Geduld bei der Beantwortung von Fragen und der Bewältigung auftretender Probleme.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.

Birgit Sauter für die gemeinsame Zeit und Aufmunterungen während der experimentellen Phase der Doktorarbeit.