

---

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

**VERGLEICHENDE GENOMISCHE  
HYBRIDISIERUNG AN  
PLEOMORPHEN ADENOMEN UND  
WARTHIN-TUMOREN**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

**2010**

vorgelegt von:  
Birgit Sauter  
geboren am 26.01.1980 in Schwäbisch Hall

<b><u>1</u></b>	<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b><u>2</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>11</u></b>
<b>2.1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>13</b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b>3.1</b>	<b>EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>GENGRUPPEN</b>	<b>16</b>
3.2.1	TUMORSUPPRESSORGENE	16
3.2.2	PROTOONKOGENE UND ONKOGENE	17
3.2.3	MUTATORGENE	18
<b>3.3</b>	<b>TUMORZYZOGENETISCHE TECHNIKEN</b>	<b>19</b>
<b>3.4.</b>	<b>SPEICHELDRÜSENTUMORE</b>	<b>22</b>
3.4.1	WHO-KLASSIFIKATION	22
3.4.2	ÄTIOLOGIE DER SPEICHELDRÜSENTUMORE	23
3.4.3	HÄUFIGKEIT DER SPEICHELDRÜSENADENOME	25
<b>3.5</b>	<b>PLEOMORPHE ADENOME</b>	<b>26</b>
3.5.1	AUFTRETEN, LOKALISATION	26
3.5.2	KLINISCHE UND STATISTISCHE DATEN	26
3.5.3	HISTOPATHOLOGIE	29
3.5.4	STAND DER FORSCHUNG: CHROMOSOMALE UND MOLEKULARE VERÄNDERUNGEN	30
3.5.5	CGH AN PLEOMORPHEN ADENOMEN	34
3.5.6	CGH AN KARZINOMEN AUS PLEOMORPHEN ADENOMEN	34
<b>3.6</b>	<b>WARTHIN-TUMORE (ZYSTADENOLYMPHOME)</b>	<b>36</b>
3.6.1	HÄUFIGKEIT, AUFTRETEN, LOKALISATION	36
3.6.2	KLINISCHE UND STATISTISCHE DATEN	36
3.6.3	HISTOPATHOLOGIE	38
3.6.4	STAND DER FORSCHUNG: CHROMOSOMALE UND MOLEKULARE VERÄNDERUNGEN	38
3.6.5	CGH AN WARTHIN-TUMOREN	40
<b>3.7</b>	<b>ZIELSETZUNG DER EIGENEN ARBEIT</b>	<b>41</b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>MATERIAL</u></b>	<b><u>42</u></b>
<b>4.1</b>	<b>GEWEBEPROBEN</b>	<b>42</b>
4.1.1	TUMORGEWEBE	42
4.1.2	REFERENZGEWEBE	42
<b><u>5</u></b>	<b><u>METHODEN</u></b>	<b><u>43</u></b>
<b>5.1</b>	<b>PRÄPARATION VON METAPHASECHROMOSOMEN</b>	<b>43</b>
5.1.1	BLUTKULTUR	43
5.1.2	CHROMOSOMENPRÄPARATION	44
<b>5.2</b>	<b>DNA-ISOLATION</b>	<b>45</b>
5.2.1	DNA-ISOLATION AUS TUMORGEWEBE	45
5.2.2	DNA-ISOLATION AUS BLUT	47

5.2.3	NUKLEINSÄUREQUANTIFIZIERUNG UND REINHEITSBESTIMMUNG	47
<b>5.3</b>	<b>DNA-MARKIERUNG</b>	<b>48</b>
5.3.1	NICK-TRANSLATION	49
5.3.2	DOT-BLOT	51
<b>5.4</b>	<b>VERGLEICHENDE GENOMISCHE HYBRIDISIERUNG (CGH)</b>	<b>53</b>
5.4.1	HYBRIDISIERUNG, STRINGENZWASCHUNG UND FLUORESZENZFÄRBUNG	55
5.4.2	DENATURIERUNG DER CHROMOSOMEN	56
5.4.3	VORBEREITUNG DER DNA	57
5.4.4	HYBRIDISIERUNG	58
5.4.5	STRINGENZWASCHUNGEN	59
5.4.6	FLUORESZENZMARKIERUNG	59
5.4.7	MIKROSKOPIE	61
5.4.8	BILDAUFNAHMEN	61
5.4.9	BILDVERARBEITUNG UND AUSWERTUNG	62
5.5.0	KONTROLLE	65
<b>6</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>66</b>
<b>6.1.</b>	<b>EINZELERGEBNISSE DER BEIDEN TUMORENTITÄTEN</b>	<b>66</b>
6.1.1	CHROMOSOMALE VERÄNDERUNGEN BEI PLEOMORPHEN ADENOMEN	66
6.1.2	CHROMOSOMALE VERÄNDERUNGEN BEI WARTHIN-TUMOREN	70
6.1.3	GEWINNE BEI PLEOMORPHEN ADENOMEN	74
6.1.4	GEWINNE BEI WARTHIN-TUMOREN	75
6.1.5	VERLUSTE BEI PLEOMORPHEN ADENOMEN	75
6.1.6	VERLUSTE BEI WARTHIN-TUMOREN	76
<b>6.2</b>	<b>VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER BEIDEN TUMORGRUPPEN</b>	<b>77</b>
6.2.1	ÜBEREINSTIMMUNGEN BESTIMMTER KONSENSUSREGIONEN BEIDER GRUPPEN	78
6.2.2	UNTERSCHIEDE BESTIMMTER KONSENSUSREGIONEN BEIDER TUMORGRUPPEN	79
<b>6.3</b>	<b>VERGLEICH DER CGH- UND FISH-ERGEBNISSE BEI PA</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>84</b>
<b>7.1</b>	<b>MATERIALDISKUSSION</b>	<b>84</b>
<b>7.2</b>	<b>METHODENDISKUSSION</b>	<b>85</b>
7.2.1	CGH-AUSWERTUNG	85
<b>7.3</b>	<b>ERGEBNISDISKUSSION</b>	<b>87</b>
7.3.1	VERÄNDERUNGEN AUF CHROMOSOM 3	89
7.3.2	VERLUSTE VON 8P UND MÖGLICHE KONSENSUSREGIONEN	90
7.3.3	VERLUSTE VON 9P UND MÖGLICHE KONSENSUSREGIONEN	92
7.3.4	VERÄNDERUNGEN AUF 12Q UND UNTERSCHIEDE ZU DEN VORERGEBNISSEN	94
7.3.5	GEWINNE AUF CHROMOSOM 13	95
7.3.6	VERLUSTE VON 16P UND MÖGLICHE KONSENSUSREGIONEN	96
7.3.7	VERLUSTE VON 16Q UND MÖGLICHE KONSENSUSREGIONEN	100
7.3.8	VERÄNDERUNGEN AUF CHROMOSOM 17	100
7.3.9	VERÄNDERUNGEN AUF CHROMOSOM 19	103
7.4.0	VERLUSTE VON 22Q UND MÖGLICHE KONSENSUSREGIONEN	103
7.4.1	VERÄNDERUNGEN AUF CHROMOSOM X	105
7.4.2	WEITERE CHROMOSOMALE VERÄNDERUNGEN	106

<b><u>8</u></b>	<b><u>AUSBLICK</u></b>	<b><u>108</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>109</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>123</u></b>
<b>10.1</b>	<b>LÖSUNGEN UND PUFFER</b>	<b>123</b>
<b>10.2</b>	<b>GERÄTE UND SOFTWARE</b>	<b>125</b>
<b>10.3</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>126</b>
<b>10.4</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>126</b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>PUBLIKATIONEN</u></b>	<b><u>127</u></b>
<b>11.1</b>	<b>POSTERPUBLIKATION UND POSTERVORTRAG</b>	<b>127</b>
<b><u>12</u></b>	<b><u>DANKSAGUNGEN</u></b>	<b><u>128</u></b>
<b><u>13</u></b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>129</u></b>

### 1 Abkürzungen

#	Chromosom
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Alter
A	Adenosin
ABL	Abelson Maus Leukämie
Abb.	Abbildung
ACC	Adenoid-zystisches Karzinom
amp	Amplifikation
AP	Alkalische Phosphatase
BA	Langwellen-Sperrfilter
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat
BCR	breakpoint cluster region
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2/ Harakiri-Gen
BLV	Bovine leukose virus
BMP	Bone morphogenetic protein
BP	Anregungsfilter
BPGF1	B-cell growth factor
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
ca.	zirka
Ca	Karzinom
CBFB	core binding factor beta
CCD	charge coupled device
CDK	Cyklin- dependent kinase
CDKN2A	Cyklin- dependent kinase inhibitor 2a

## Abkürzungen

---

c-erbB-2	Her-2/neu- ovarian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
CFLP	Clearance fragment length polymorphism
CGH	vergleichende genomische Hybridisierung
CHCHD7	coiled- coil- helix-coiled-coil-helix domain containing protein 7
CISS	chromosomale in situ-Suppression
CLF1	cytokine like growth factor
CMV	Cytomegalie- Virus
CNA's	copy number abnormalities
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CT	Computertomographie
CTNNB1	catenin cadherin associated protein beta 1
CXPA	Karzinom im pleomorphen Adenom
DAPI	4-6-Diamidino-2-Phenylindol
DG	Deckglas
dim	diminished fluorescence ratio intensity
DLC1	deleted in liver cancer 1
DM	dichromatischer Teilerspiegel
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
dmin	double minutes
DNA, DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
DUSP4/MKP4	dual- specificity phosphatase 4
EBV	Epstein-Barr-Virus
E. coli	Escherichia coli-Bakterium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
enh	enhanced fluorescence ratio intensity
fg	Femtogramm
FA	Formamid
FCS	fetal calf serum
FHIT	fragile histidine triad gene

## Abkürzungen

---

FISH	Fluoreszenz in situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FEZ/LZT1	FEZ-family zink finger 2
FPN	Feinnadelpunktion
G	Guanin
G.	Geschlecht
GFAP	Glial fibrillary acidic proteine
Gl.	Glandula
GLI	Glioma associated oncogene homolog (zink-finger proteine)
GSTP1	Glutathione-S- Transferase P1
GTG	G-bands by trypsin using Giemsa
h	Stunde
H +	Wasserstoff
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HMGA	High mobility group at hook 2
HMGIC	High mobility group proteine gene
HMGIIY	High mobility group isoform I and Y
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HLA- DK	Human leucocyte antigen DK
H2Odd	bidestiliertes Wasser
hsr	homogeneously staining regions
ICAM- 1	intercellular adhesion molecule 1
I.E.	internationale Einheiten
Ig (A,E)	Immunglobulin (A,E)
IGF	Insulin-like growth factor
insb.	insbesondere
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
ISH	In situ-Hybridisierung
J	Joule
J.	Jahre
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

## Abkürzungen

---

Kl.	Klasse
KLF5	Kruppel-like factor 5
KLF12	Kruppel-like factor 12
l	Liter
LIFR	leukaemia inhibitory factor receptor
Li.	Logarithmus
LOH	loss of heterozygosity
M	Molar
m	männlich
MAML2	Mastermind-like 2
Mbp	Megabasenpaare
MDM2	mouse double minutes 2, p53 binding protein
MEC	Mukoepidermoidkarzinom
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	multiple tumor suppressor
MTUS	mitochondrial tumor suppressor gene 1
MYH11	Myosin, heavy chain 11
MYO18b	Myosin XVIIIb
n	Basenpaarlänge
nm	Nanometer
N.	Nervus
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NF2	Neurofibromin 2-Gen
NFIP	nuclear protein involved in transcriptional regulation
NKX3A	Homeobox 3A, NK
NORs	nuclear organizing regions
OT	Objektträger
PA	pleomorphes Adenom
PBS	phosphate buffer saline



## Abkürzungen

---

PCM1	pericentriolar material 1
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PRTLS	platelet-derived growth factor beta-like tumorsuppressorgene
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PKD1	polycystic kidney disease 1
PLAG	pleomorphic adenoma gene-like 1
PTEN	phosphate and tensin homolog
rev ish	reverse in situ hybridization
Rb	Retinoblastomprotein
rb	Retinoblastomgen
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT- PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	sodium duodecylsulfate
SFRP1	secreted frizzeld-related protein 1
SSC	sodium saline citrat
T	Thymidin
4T	4xSSC/0,1% Triton
t	Translokation
TCEA1	transcription elongation factor A1
Tm	Schmelztemperatur
TNFRSF17	tumor necrosis factor receptor- superfamily, member 17
TORC	transducer of regulated cAMP response element binding protein
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyant
TSC2	Tuberöse Sklerose Gen 2
TS-Gen, TSG	Tumorsuppressorgen
TU12B1-TY	5' nucleotidase domain-containing protein 3

## Abkürzungen

---

u.a.	unter anderem
UBE2I	ubiquitin-conjugating enzyme E2I
ü.N.	über Nacht
UV	Volt
V.a.	Verdacht auf
v.a.	vor allem
VCAM- 1	vascular cell adhesion molecule
VOL	100 Volumenprozent
W	Watt
w	weiblich
WAMTP1	Warthin and Mucoepidermoidtumor-translation partner Gene 1
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WIF	WNT- inhibitory factor
WT	Warthin-Tumor
x	mal
XPF	Xeroderma pigmentosum complementation group F

## 2 Zusammenfassung

### 2.1 Zusammenfassung

Pleomorphe Adenome sind mit zirka 67% die häufigsten benignen Speicheldrüsentumore. In über 80% der Fälle sind sie in der Glandula parotis lokalisiert. Ihre Besonderheit liegt in ihrer Tendenz zu rezidivieren und in ca. 3-5% der Fälle maligne zu entarten. Sie weisen eine Reihe unterschiedlicher histologischer Muster auf und enthalten adenomatöse, plasmazystische und myxochondroide Anteile. Die zweitgrößte Gruppe unter den benignen Parotistumoren stellen mit ca. 22% die Warthin-Tumoren dar. Hierbei handelt es sich um gut begrenzte bekapselte Tumore, die eine epitheliale und lymphoide Gewebskomponente enthalten.

Wir untersuchten 31 pleomorphe Adenome sowie 30 Warthin-Tumore mit der Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung auf tumorspezifische genetische Veränderungen. Hierbei wurde mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Tumor-DNA und Normal-DNA simultan auf humane Metaphasechromosome hybridisiert. Signifikante Unterschiede im Bindungsverhältnis wurden über eine Bildverarbeitungssoftware dargestellt, um auf molekularzytogenetischer Ebene numerische chromosomale Aberrationen des Tumorgenoms im Verhältnis zum normalen Genom zu identifizieren. Anhand dieser unterschiedlichen relativen Bindungsverhältnisse konnten Gewinne und Verluste im jeweiligen Tumorgenom detektiert werden.

27 der untersuchten 31 pleomorphen Adenome zeigten 158 chromosomale Aberrationen (48 Gewinne und 110 Verluste). Die häufigsten chromosomalen Verluste bei den pleomorphen Adenomen waren auf dem kurzen Arm von Chromosom 16p (26%) lokalisiert, speziell auf 16p11.2-p13.2 (23%) bzw. 16p11.2 (26%). Mit 23% wurden Verluste auf 22q ebenfalls recht häufig beobachtet. Eine weitere Konsensusregion wurde im Bereich 22q11.2-q12.3 identifiziert, die bei 7 Tumoren (23%) eine Deletion zeigte. Auch Verluste auf 9p kamen mit 23% häufig vor, eine spezielle Region ließ sich hier jedoch nicht eingrenzen. Das Chromosom 17

zeigte in 16% Verluste, in 2 Fällen betrafen diese das gesamte Chromosom, in 2 Fällen 17p und in 4 weiteren Fällen 17q. Auch hier ließ sich keine spezielle Region eingrenzen. Weitere Verluste wurden im Bereich 1q (20%), 8p (16%), 15q (13%), 18q (16%) und 20q (23%) detektiert. Auf Chromosom 4 wurden Gewinne in 26% der Tumore beobachtet, davon 19% auf 4q. Häufige Gewinne betrafen auch das X-Chromosom (32%). Auf Chromosom 19 waren komplette Gewinne häufiger als Verluste und wurden in 5 Fällen (16%) nachgewiesen. Auch isolierte Gewinne von 19p werden gehäuft beobachtet (10%). Somit konnten bei insgesamt 26% der untersuchten Fälle Gewinne im Bereich 19p detektiert werden.

Mittels CGH wurden 150 chromosomale Aberrationen (56 Gewinne und 94 Verluste) bei den untersuchten 30 Warthin-Tumoren beobachtet. Es wurden am häufigsten Verluste der Region 8p23.1-pter (30%) detektiert. Auf Chromosomabschnitt 9p wurden ebenfalls Verluste (27%) beobachtet, die in 20% 9p23-pter betrafen. Auch auf dem chromosomalen Abschnitt 22p wurden in 20% der untersuchten Tumore Verluste beobachtet, 17% betrafen die Region 22q11.1-q12.2, 20% die Banden 22q12.2-q12.3. Verluste kamen seltener auch im Bereich 4q (17%) und 15q (17%) vor.

Die vorgelegte Promotionsschrift hat sowohl in pleomorphen Adenomen als auch in Warthin-Tumoren vielfältige chromosomale Aberrationen detektieren können. Bei einem deutlichen Überwiegen von Verlusten konnten auf 4 Chromosomen Konsensusregionen identifiziert werden: 16p11.2-13.2 sowie 22q11.2-q12.3 bei den pleomorphen Adenomen und 8p23.1-pter sowie 9p23-pter bei den Warthin-Tumoren. Auf den erhobenen Daten können zukünftig weitere zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen aufbauen, um die in dieser Arbeit identifizierten genetisch veränderten Regionen zu bestätigen und näher zu charakterisieren.

### 2.2 Abstract

Pleomorphic adenomas account for approximately 67% of all benign salivary tumors. More than 80% of these neoplasms are located in the parotid gland. Their characteristics are their tendency to recidivate and to degenerate into malignomas in 3-5%. They show a lot of different histological patterns and contain adenomatous, plasmacytic and myxochondroide parts. The second common group of benign tumors of the parotid gland are Warthin tumors. They are well defined encapsulated tumors that contain epithelial and lymphoide tissue components.

We examined 31 pleomorphic adenomas and 30 Warthin tumors by using the molecularzytogenetic method of comparative genomic hybridization.

For that purpose we simultaneously hybridized tumor DNA and normal DNA marked with different fluorescence dyes on human metaphase chromosomes. Significant changes in the binding rate were detected by image processing software which analyses numeric chromosomal aberrations of the tumor genome in relation to the normal genome.

27 of the 31 examined pleomorphic adenomas showed 158 chromosomal aberrations (48 gains and 110 losses). The most common losses in pleomorphic adenomas were located on the short arm of chromosome 16 (26%), especially on 16p11.2-p13.2 (23%) and on 16p11.2 (26%). Moreover frequent losses on 22q (23%) were detectable. A consensus region was found on 22q11.2-q12.3, where 7 tumors (23%) showed a deletion. Losses on 9p were seen frequently as well (23%) without any consensus region. Chromosome 17 showed losses in 16% of all cases, 2 cases had a loss of the whole chromosome, two cases of 17p and four cases of 17q. A consensus region could not be found here either. More losses were detected in the regions 1q (20%), 8p (16%) 15 q (13%), 18q (16%) and 20q (23%). On chromosome 4 we detected gains in 26% of all tumors with 19% on 4q. Common gains were also seen on chromosome X (32%). On chromosome 19 gains were more common than losses and were identified in 5 cases (16%). Isolated gains of 19p were also seen frequently (10%). Moreover we detected gains on 19p in 26% of the cases.

In the 30 examined Warthin tumors, 150 chromosomal aberrations (56 gains and 94 losses) were identified. The most common losses were detected in the region 8p23.1-pter. On 9p losses were seen in 27% of all cases, thereby 20% on 9p23-pter. We also detected losses in the chromosomal region of 22p (20%), 17% on 22q11.1-q12.2 and 20% on 22q12.2-12.3. Less frequent losses were seen on 4q (17%) and 15q (17%).

In this study we could detect various chromosomal aberrations in pleomorphic adenomas and Warthin tumors. Among a predominance of losses we were able to identify four consensus regions: 16p11.2-13.2 and 22q11.2-12.3 in pleomorphic adenomas and 8p23.1-pter and 9p23-pter in Warthin tumors.

On the basis of these data's cytogenetic and molecular biologic studies can follow, to verify and to further characterize the identified genetically aberrant regions.

### 3 Einleitung

#### 3.1 Einführung in die Thematik

Tumore sind nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt und deshalb Thema jahrzehntelanger Forschungsarbeiten. Trotzdem ist bisher über die Tumorentstehung und Tumorprogression noch wenig bekannt. Bedeutend werden hierbei unter anderem genetische Veränderungen angesehen, die im Zusammenwirken Auswirkungen auf die Differenzierung, die Proliferation und den Zelltod haben.

Bereits 1890 beschrieb Hansemann abnorme Mitosen in Tumorzellen (Hansemann, 1890). Im Jahre 1914 stellte Boveri anhand lichtmikroskopischer Befunde die Hypothese auf, dass ein Tumor durch chromosomale Veränderungen einer einzigen Zelle entstehe (Boveri, 1914). Erst ein halbes Jahrhundert später konnten Boveris Vermutungen durch neue Erkenntnisse in der klassischen Zytogenetik und der molekularen Genetik bestätigt werden.

Die ersten Schritte zur Untersuchung von genetischen Veränderungen wurden mithilfe der Zytogenetik durchgeführt. Durch Chromosomenpräparationen konnten Tjio und Levan 1956 die Zahl der menschlichen Chromosomen exakt auf 46 bestimmen (Tjio und Levan, 1956). Das hatte die Entdeckung von ersten konstitutionellen und krankheitsassoziierten Aneuploidien zur Folge (Lejeune et al., 1959). So konnte im Jahre 1959 zum ersten Mal einem definierten Krankheitsbild, nämlich dem Down-Syndrom, eine konstitutionelle Anomalie, die Trisomie 21, zugeordnet werden. Nachfolgend wurden erst numerische und später auch charakteristische strukturelle Veränderungen beschrieben, welche mit bestimmten neoplastischen Erkrankungen assoziiert sind. Eine Übersicht findet sich bei Mitelman (Mitelman et al., 1997). Die erste Chromosomenanomalie in neoplastischem Gewebe war die Deletion des Chromosoms 22 (Nowell und Hungerford, 1960). Sie wurde 1973 als reziproke Translokation zwischen 9 und 22 identifiziert und bildet ein

proliferationsaktivierendes Fusionsgen, welches die Entstehung der chronisch myeloischen Leukämie bedingt (Rowley, 1973). Die zweite Beobachtung und die erste an soliden Tumoren war ein Verlust des Chromosoms 22 bei Meningeomen (Zang und Singer, 1967).

Weitere Hinweise auf die genetische Ursache von Tumoren waren das klonale Wachstum der Krebszellen mit der Weitergabe der Fehlfunktion von der Mutterzelle auf die Tochterzelle sowie der Nachweis chromosomaler Veränderungen nach exogen induziertem Tumorwachstum. Auch der Transfer menschlicher Tumor-DNA in Zellkulturen, die hierdurch in-vitro Malignitätskriterien erlangten, diente als Beleg der genetischen Tumorgenese. Parallel zu den zytogenetischen Fortschritten entwickelte sich die molekulare Genetik ab den siebziger Jahren rasant und ermöglichte die Isolierung von krankheitsrelevanten Genen. Hierbei zeigte sich, dass vor allem solche Gene in Tumoren verändert waren, die für Proteine kodieren, welche die Zellproliferation und deren Kontrolle beeinflussen.

Hierbei werden insbesondere die Gene unterschieden, die für protektive Proteine des Zellzyklus kodieren (Tumorsuppressorgene) und solche, die ein onkogenes Potential besitzen (Onkogene).

### **3.2 Gengruppen**

#### **3.2.1 Tumorsuppressorgene**

Als Tumorsuppressorgene (TS-Gene), früher Antionkogene genannt, bezeichnet man Gene, welche für Proteine kodieren, die den Zellzyklus kontrollieren und dadurch die Wahrscheinlichkeit senken, dass eine Zelle zur Tumorzelle mutieren kann. Gene, die für Proteine kodieren, welche die Apoptose induzieren können, werden ebenfalls zu den TS-Genen gezählt.

Kinzler und Vogelstein unterschieden die Tumorsuppressorgene anhand ihrer Funktion in „gatekeepers“ und „caretakers“. „Gatekeeper“ regulieren den Zellzyklus und damit die Proliferation, „caretaker“ erhalten die genomische Integrität (Kinzler



und Vogelstein, 1997). Eine Mutation oder Deletion dieser Gene erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung.

Der häufigste Mechanismus zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist der Verlust der Heterozygotie (LOH) durch molekulare Mutation des einen Allels und strukturelle Aberration, nämlich die Deletion, des anderen Allels.

Die „two-hit“-Theorie bei Retinoblastomen legte den Grundstein für das heutige Verständnis in der Mehrschrittkanzerogenese zur Tumorentstehung. Nach Knudson (Knudson, 1971) muss bei den hereditären Retinoblastomen eine Mutation in der Keimzelle vorliegen und erst das Auftreten einer zusätzlichen Mutation in den somatischen Zellen führt dann zur Tumorentstehung. Bei den nicht-hereditären Retinoblastomen hingegen treten beide Mutationen in den somatischen Zellen auf. Cavenee und Mitarbeiter (1983) bestätigten die frühe Theorie Knudsons durch Kopplungsanalysen zwischen dem RB-Gen und dem Esterase D-Gen (Cavenee et al., 1983). Die Theorie von Knudson scheint nicht auszureichen, um die Tumorentstehung und Aufgaben der TS-Gene ausreichend erklären zu können. Paige fasste Ausnahmen der „two-hit“ Theorie zusammen, welche in der Mehrschrittkanzerogenese, Haploinsuffizienz, Mutatorgenen, dual-function-TS-Genen, dominant-negativen Isoformen und genetischen Modifikatoren zu sehen sind (Paige, 2003).

Zu den bislang bedeutendsten TS-Genen, deren Inaktivierung in zahlreichen menschlichen Neoplasien nachgewiesen wurde, zählen die Gene für die Zellzyklusproteine p16 und das RB-Protein, der Transkriptionsregulator p53 und der Signalketteninhibitor PTEN (Stanbridge, 1990; Karp und Broder, 1995)

### 3.2.2 Protoonkogene und Onkogene

Onkogene fördern den Übergang vom normalen Wachstumsverhalten der Zelle zu ungebremstem Tumorwachstum. Sie entstehen durch Mutationen von Gensequenzen, die für das normale Zellwachstum, die Zellteilung und –differenzierung eine Rolle spielen. Meist reicht die Mutation eines einzigen Allels durch Punktmutation, Rekombination oder Genamplifikation zur Aktivierung aus.

Die so genannten Protoonkogene sind Vorstufen und werden durch Kanzerogene in die tumorerzeugende Form verwandelt. Potentielle Protoonkogene sind alle Zellteilungskontrollgene. Die Einteilung erfolgt in Wachstumsfaktoren, in deren Rezeptoren, in G-Proteine (z.B. von *ras*-Protoonkogenen kodiert), in Nichtrezeptor-Proteinkinasen (z.B. Tyrosinkinasen), in nukleäre Transkriptionsfaktoren, tumorspezifische Chromosomenaberrationen oder Onkogene aus Viren wie *tax*, das Onkogen von HTLV1 und 2.

Protoonkogene sind normale Gene, die in jeder Zelle vorkommen und für Proteine kodieren, die Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle kontrollieren und steuern. Mutiert ein solches Gen, kommt es meistens zu einem Funktionsverlust, die Zellteilung wird nicht mehr gefördert und die Apoptose eingeleitet. Jedoch kann durch Mutationen des Protoonkogens die Zellteilung auch gefördert werden, was zum Tumorwachstum führt. Diese Aktivierung zu einem falschen Zeitpunkt oder in einer falschen Zelle kann entweder quantitativ durch Überexpression des unveränderten Produkts als Folge einer Amplifikation oder qualitativ durch Punktmutationen, Rearrangements bzw. Translokationen hervorgerufen werden (Croce und Klein, 1985).

Im Gegensatz zu den TS-Genen besitzen Onkogene somit eine primär dominante Wirkungsweise. Ein bekanntes Onkogen ist das durch reziproke Translokation entstandene Hybridgen des Philadelphia-Chromosoms, welches durch Fusion des *c-ABL*-Protoonkogens von Chromosom 9 und des *BCR*-Gens auf Chromosom 22 zum Onkogen wird (Chissoe et al., 1995).

### 3.2.3 Mutatorgene

Neben den beiden großen Gruppen der Tumorsuppressorgene und Onkogene gibt es offenbar eine dritte Gruppe: die Mutatorgene. Zu ihnen gehören zahlreiche Gene der *mutS* (*hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*), und *mutL*-Familie (*hMLH1*, *hMLH3*, *hMPS1* und *hMPS2*). Diese Gene spielen eine Rolle im Schutz der allgemeinen Integrität der genetischen Funktionen und bewirken bei Mutationen multiple zytogenetische Veränderungen in Form von bizarren, aberranten Karyotypen der Tumorzellen. Der Funktionsverlust des so genannten Mismatch-Repair-Systems verursacht eine Mikro-

satelliteninstabilität. Mikrosatelliten sind über das gesamte Genom verteilte repetitive DNA-Sequenzen, welche eine hohe Anfälligkeit für Fehlpaarungen der DNA-Polymerase besitzen. Es kommt zu Fehlern und dadurch entstehenden unterschiedlichen Allellängen von Tumor- und Normalgewebe, was man als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet (Heinimann, 2000). Dadurch kommt es zur Steigerung der Mutationsrate anderer wachstumsregulierender Gene wie Onkogene oder TS-Gene mit hieraus resultierender möglicher Tumorentstehung.

### 3.3 Tumorzytogenetische Techniken

Die klassische Tumorzytogenetik erfuhr einen deutlichen Fortschritt durch die Einführung der In-situ-Hybridisierung (Gall und Pardue, 1969; John et al., 1969). Die In-situ-Hybridisierung (ISH) ist eine Technik, bei der sich „markierte“ RNA- oder artifiziell in die Einzelstränge aufgetrennte DNA-Sequenzen direkt im biologischen Material (In-situ) mit einer komplementären Basensequenz zu einem doppelsträngigen Abschnitt zusammenlagern, welcher dann über verschiedene Mechanismen detektiert werden kann.

Später wurden statt der bei den ersten Verfahren eingesetzten radioaktiven Markierung auch nichtradioaktive Methoden entwickelt, die entweder auf den elektronenmikroskopischen Nachweis von Markermolekülen angewiesen sind oder enzymatisch farbige Präzipitate erzeugen. Dazu zählen z.B. Biotin und Digoxigenin. Der Durchbruch im Hinblick auf die praktische Durchführung und das Auflösungsvermögen wurde durch den Einsatz einer direkten (Bauman et al., 1980; Wiegant et al., 1991) bzw. indirekten (Pinkel et al., 1986) Fluoreszenzmarkierung geschaffen.

Diese Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermöglicht, spezifische fluoreszenzmarkierte DNA-Sequenzen an Metaphasechromosomen, Interphasezellen und auch an Gewebeschnitten hybridisieren (Lutz et al., 1992). Die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nimmt mittlerweile einen großen Stellenwert in der Forschung und klinischen Diagnostik ein.

Zur Signalunterdrückung repetitiver Sequenzen wurde die „chromosomale-in-situ-suppression“- (CISS)-Hybridisierung eingeführt, bei der diese Sequenzen mittels einer

unmarkierten Vorhybridisierung abgeblockt werden (Lichter et al., 1988). Später wurde die Technik des „chromosome-painting“ entwickelt. Bei dieser werden mit Hilfe von Klonen aus DNA-Banken ganze Chromosomen markiert oder Markerchromosomen nach PCR-Amplifikation auf Metaphasechromosomen rückhybridisiert (Lichter et al., 1988; Martin et al., 1998). Weitere Modifikationen der In-situ-Hybridisierung stellen die Multicolor-FISH (M-FISH) und die combined binary ratio-labeling FISH (COBRA-FISH) dar. Beide Methoden erlauben durch die Kombination von fünf bzw. vier Fluorochromen die Darstellung aller 24 Chromosomen in unterschiedlichen Farben (Speicher und Ward, 1996; Tanke et al., 1999). Alternativ hierzu entwickelte Schröck et al. 1996 die so genannte Spektral Karyotyping (SKY)-Technik, wobei die Chromosomen lediglich mit drei Fluorochromen markiert und anhand der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten unterschieden werden (Schroek et al., 1996). Der neueste Fortschritt der ISH stellt die Metallographic-in-situ-Hybridisierung dar. Diese Methode nutzt Sonden oder Antikörper mit einer metallselektiven Bindungsstelle. 1992 entwickelten Kallioniemi und du Manoir die sogenannte vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) (Kallioniemi et al., 1992a; Kallioniemi et al., 1992b; du Manoir et al., 1993; Kallioniemi et al., 1993; Kallioniemi et al., 1994). Diese Methode verwendet eine Mischung aus Tumor-DNA und der DNA gesunder Zellen in einer kompetitiven FISH auf humanen Metaphasechromosomen. Mit Hilfe bildverarbeitender Software lassen sich dann die Chromosomenabschnitte detektieren, in denen das erwartete äquivalente Verhältnis von Tumor-DNA zu Normal-DNA abweicht.

Mit Hilfe der CGH können sowohl chromosomale Gewinne als auch chromosomale Verluste nachgewiesen werden, die auf für die Tumorgenese wichtige Onkogene oder Tumorsuppressorgene hinweisen können.

Diese Gewinne sind zum Beispiel Amplifikationen, die als Insertionen innerhalb normaler Chromosomen auftreten und „homogen gefärbte Regionen“ (homogeneously staining regions, hsr) genannt werden. Oft treten Kopien von DNA-Sequenzen auch in Form von double minutes (dmin), kleinen extrachromosomalen DNA-Ringen, auf.

Die Methode der CGH diene in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Tumorproben. Diese waren benigne Parotistumore und hier insbesondere pleomorphe Adenome und Warthin-Tumore. Auf diese Entitäten von Parotistumoren soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### 3.4. Speicheldrüsentumore

#### 3.4.1 WHO-Klassifikation

In der neuen WHO-Klassifikation erfolgt die Einteilung differenzierter nach histomorphologischen Kriterien und unabhängig von der Häufigkeit des Vorkommens der verschiedenen Tumoren. (Seifert et al., 1990; Seifert und Sobin, 1992). Die pathohistologische Klassifikation der WHO beruht auf dem Grundprinzip, die zelluläre Differenzierung und das Bauprinzip eines Tumors mit der normalen Gewebsstruktur zu vergleichen (Seifert und Sobin, 1991).

Im geweblichen Aufbau werden folgende Formen zur Subklassifikation unterschieden: solid, trabekulär, papillär, tubulär (kanalikulär), zystisch, azinär, muzinös. Nach zellulärer Differenzierung, analog dem histologischen Aufbau der Speicheldrüsen, lassen sich in den Speicheldrüsentumoren drei zelluläre Grundmuster unterscheiden: azinäre Zellen, modifizierte myoepitheliale Zellen und unterschiedlich differenzierte duktales Zellen. Diese unterschiedlichen Zellen lassen sich ihrerseits wiederum unterschiedlichen Tumorarten zuordnen (Seifert et al., 1996). Eine Übersicht ist in *Tabelle 3.1* dargestellt.

**Tabelle 3.1: Einteilung der Speicheldrüsentumore**

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
- Invertes duktales Papillom
- Intraduktales Papillom
- Sialadenoma papilliferum
1.9 Zystadenom
- Papilläres Zystadenom
- Muzinöses Zystadenom

**Tabelle 3.1 Fortsetzung: Einteilung der Speicheldrüsentumore**

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
3. Nichtepitheliale Tumoren
4. Maligne Lymphome
6. Unklassifizierbare Tumoren
7. Tumorähnliche Läsionen 7.1 Sialadenose 7.2 Onkozytose 7.3 Nekrotisierende Sialometaplasie (Speicheldrüseninfarkt) 7.4 Benigne lymphoepitheliale Läsion 7.5 Speicheldrüsenzysten 7.6 Chronische sklerosierende Sialadenitis der Submandibularis (Küttner-Tumor) 7.7 Zystische lymphoide Hyperplasie bei AIDS

### 3.4.2 Ätiologie der Speicheldrüsentumore

Für die Entstehung von Speicheldrüsentumoren gibt es bisher nur wenig gesicherte Faktoren. Daten liegen vor allem in Bezug auf Speicheldrüsenkarzinome, weniger jedoch zu benignen Tumoren vor.

In einer Studie von Kotwall et al. von 1992 wurde bei Rauchern ein achtfach höheres Risiko für das Entstehen eines Warthin-Tumors beschrieben (Kotwall, 1992). Auch Lamelas et al. sahen einen Zusammenhang zwischen steigendem Nikotinkonsum und erhöhter Inzidenz von Warthin-Tumoren, vor allem bei Frauen (Lamelas et al., 1987), was sie mit der stetigen Zunahme an weiblichen Rauchern in Verbindung setzten.

Bestrahlungen im Kopf-Halsbereich erhöhen das Risiko für die Entstehung eines Speicheldrüsentumors. So wurden bei Kindern, die aufgrund einer gutartigen Erkrankung wie Taubheit, lymphoider Hyperplasie des Nasopharynx, Ohreninfektionen oder Tinea capitis in der Kopf-Halsregion mit Röntgenstrahlen bestrahlt wurden, später vermehrt Speicheldrüsentumore festgestellt (Saenger et al., 1960; Hazen et al., 1966; Shore et al., 1976; Spitz et al., 1984). Das Risiko für die Entwicklung eines Speicheldrüsentumors steht in direkter Relation zur Strahlendosis und ist um ein vielfaches erhöht gegenüber einer nichtbestrahlten Kontrollgruppe. Ebenso wurde in Kohortenstudien von Belski et al., Saku et al., Takeichi et al., welche das Auftreten von Speicheldrüsentumoren bei Überlebenden der Atombomben von Hiroshima und Nagasaki untersuchten, eine signifikante Häufung von bestimmten benignen und malignen Tumoren festgestellt. Bei Belski et al. und Takeichi et al. traten vor allem benigne und maligne Mischtumoren auf (Belsky et al., 1975; Takeichi et al., 1983). Saku beschrieb ein erhöhtes Auftreten von Warthin-Tumoren gegenüber der restlichen Bevölkerung (Saku et al., 1997). Die Tumorzinidenz war abhängig von der Höhe der Strahleneinwirkung.

Eine virusassoziierte Tumorentstehung von Warthin-Tumoren (Santucci et al., 1993) und anaplastischen Parotiskarzinomen (Saemundsen et al., 1982) bei einer EBV-Infektion bei Inuits wird diskutiert. Tsai et al. untersuchten verschiedene Speicheldrüsentumore und konnten bei allen Fällen von Lymphoepitheliom-ähnlichen Karzinomen Epstein-Barr-Viren nachweisen. Die übrigen untersuchten benignen und malignen Tumoren waren negativ (Tsai et al., 1996). Laane et al. konnten bei pleomorphen Adenomen und Warthin-Tumoren ebenfalls kein EBV oder CMV nachweisen (Laane et al., 2002)



### 3.4.3 Häufigkeit der Speicheldrüsenadenome

Die beschriebenen Häufigkeiten variieren in der Literatur stark. Die hier aufgeführten Zahlen beziehen sich auf Angaben des Hamburger Speicheldrüsenregisters, welches von 1965 bis 1994 alle Speicheldrüsentumore nach WHO-Kriterien einteilte und bis dahin insgesamt 3797 Adenome untersuchte (Seifert et al., 1996). Diese Untersuchungen laufen bis heute weiter.

80% der Speicheldrüsentumore sind benigne. Der häufigste benigne Speicheldrüsentumor ist das pleomorphe Adenom mit ca. 67,5%. An zweiter Stelle folgt der Warthin-Tumor mit 22,2%. Basalzelladenome machen mit 3,9% die drittgrößte Gruppe aus. Die übrigen Formen sind relativ selten. So entfallen auf Zystadenome 1,6%, auf Onkozytome 1%, auf Myoepitheliome 0,6% und auf die duktales Papillome 0,3%. Die kanalikulären Adenome machen, ebenso wie die Talgdrüsenadenome, nur 0,2% aus.

### 3.5 Pleomorphe Adenome

#### 3.5.1 Auftreten, Lokalisation

Pleomorphe Adenome (PA), früher benigne Mischtumore genannt, treten bevorzugt im 4.-6. Lebensjahrzehnt auf. Das weibliche Geschlecht überwiegt mit 59%. Sie machen ungefähr 3% der Kopf- und Halstumore und ca. 0,6% aller Tumore aus. Die häufigste Lokalisation ist mit 78,3% die Glandula parotis. 5,8% der pleomorphen Adenome entfallen auf die Gl. submandibularis, nur 0,1% auf die Gl. sublingualis. 9% sind in den kleinen Speicheldrüsen des Gaumens (5,9%), der Lippe (1,7%) und der Wange (1,4%) lokalisiert. Die übrigen verteilen sich ohne nähere Angaben auf die Region der Mundhöhle (Hamburger Speicheldrüsenregister 1975-1991) (Seifert et al., 1996). Auch hierbei variieren die Zahlen. Im Bereich der Parotis sind die pleomorphen Adenome vor allem im lateralen Drüsenanteil und bevorzugt im unteren Drüsenpol lokalisiert.

#### 3.5.2 Klinische und statistische Daten

Eine erste pathohistologische Beschreibung des pleomorphen Adenoms stammt von Billroth aus dem Jahre 1859 (Billroth, 1859). Die allgemeine Bezeichnung für diesen häufigsten Speicheldrüsentumor blieb über Jahrzehnte „Mischtumor“. Der Begriff pleomorphes Adenom wurde 1960 von Willis geprägt und in der Zwischenzeit von fast allen Autoren übernommen (Willis, 1960). Viele Jahrzehnte lang wurden die pleomorphen Adenome aufgrund der hohen Rezidivraten als semimaligne Tumoren eingeordnet (Caselitz, 1987). Mittlerweile haben große Untersuchungsgruppen und Studien jedoch gezeigt, dass es sich primär um benigne epitheliale Tumoren handelt (Seifert et al., 1984).

Pleomorphe Adenome präsentieren sich meistens als schmerzlose, verschiebliche Schwellungen. Schnelle Größenprogredienz oder eine Dysfunktion des N. facialis sprechen hingegen eher für ein malignes Geschehen.

Die präoperative Diagnostik beinhaltet in erster Linie eine Ultraschalluntersuchung. Diese stellt bei den bildgebenden Untersuchungen derzeit den Goldstandard dar. Weitere mögliche Untersuchungen sind die MRT und die CT. Diese besitzen eine geringere Sensitivität und Spezifität als die Sonographie, haben aber besondere Bedeutung bei Tumoren der Ohrspeicheldrüsen mit Ausbreitung in den Parapharyngealraum.

Eine Feinnadelpunktion wird von einzelnen Autoren als wertvoll angesehen und mit einer hohen Spezifität und Sensitivität aufweist beschrieben. Da aber bei Parotistumoren grundsätzlich die operative Behandlung angestrebt wird (unabhängig von der histopathologischen Einordnung), hat die Feinnadelpunktion keine generelle Verbreitung gefunden.

Über die Therapie des pleomorphen Adenoms ist in der Vergangenheit aufgrund der hohen Rezidivrate intensiv diskutiert worden. Heute ist die Standardoperation bei Tumoren im Außenlappen die laterale Parotidektomie. Alternativ dazu kann eine partielle laterale Parotidektomie durchgeführt werden. Bei dieser wird nur der tumortragende Anteil des oberflächlichen Drüsenlappens reseziert. Diese Methode erlaubt eine sichere Entfernung des Tumors bei geringer postoperativer Morbidität.

Die früher durchgeführte Enukleation gilt mittlerweile als kontraindiziert. Der Grund dafür ist der Aufbau der Kapsel mit Tumorzapfen, die die dünne Kapsel durchbrechen. Werden diese nicht entfernt, kommt es zu Rezidiven. Aktuelle Konzepte bevorzugen die Methode der extrakapsulären Dissektion und propagieren eine perikapsuläre Präparation mit Erhaltung eines schmalen Saums von Drüsenparenchym.

Typische Komplikationen der genannten Verfahren sind Sensibilitätsstörungen im Wangen- und Ohrbereich, Speichelfisteln, Funktionsstörungen des N. facialis, ein kosmetischer Defekt der Wangenregion und das Frey-Syndrom, eine gustatorische Hyperhidrose. Diese Komplikationen konnten durch die minimalinvasiven Operationsmethoden in Form der extrakapsulären Dissektion deutlich reduziert werden.

Die Rezidivrate ist vor allem abhängig von der Operationstechnik (Lam et al., 1990). So kommt es bei Enukleationen zu einer Rezidivrate von über 10%. Dies wird durch iatrogene „Impfmetastasen“ erklärt (Batsakis, 1986). Bei subtotaler Parotidektomie wurden weniger als 5% Rezidive beobachtet, bei totaler Parotidektomie 0-3%.

Makroskopisch zeigen pleomorphe Adenome in der Regel eine dünne bindegewebige Pseudokapsel. Die Schnittfläche weist ein buntes Bild mit weißlich-gelben Knoten, Zysten, Einblutungen, und knorpeligen Strukturen neben weichen mukösen Gewebsabschnitten auf. Die Zysten finden sich in 5% der PA (Toida et al., 1992) und können über die Hälfte der Tumormasse ausmachen. Verkalkungen und Verknöcherungen sind selten.

Vereinzelt wurde auch ein Mehrfachvorkommen von PA beschrieben. Zum einen wurden synchrone bilaterale PA der Parotis beschrieben (Norlin, 1965; Turnbull und Frazell, 1969; Weimert und Work, 1976; Sataloff et al., 1987), zum anderen eine simultane Entstehung in Parotis und Submandibularis (Yajin et al., 1987). Gelegentlich wurde auch über ein familiäres Vorkommen berichtet (Hayter und Robertson, 1990).

In ca. 3-5% der Fälle können PA maligne entarten. Man nennt diese Tumore dann Karzinome im pleomorphen Adenom (CXPA) oder maligne Mischtumore. Sie sind dadurch charakterisiert, dass in einem PA eine neue epitheliale Neoplasie auftritt, welche die Malignitätskriterien erfüllt. Die Unterscheidung zwischen bereits entarteten CXPA und PA ist nicht einfach und deshalb Thema vieler Studien.

Zusätzlich ist eine Syntropie mit anderen Tumoren beschrieben worden. Hierzu gehören die Onkozytome (Trejo et al., 1972), Basalzelladenome (Turnball und Frazell, 1969), Warthin-Tumore (Toida et al., 1990; Lefor und Ord, 1993); Azinuszellkarzinome (Williams, 1980); Mukoepidermoidkarzinome (Pontilena und Rankow, 1979) sowie die adenoid-zystische Karzinome (Kwitten et al., 1966).

Eine sehr seltene Untergruppe machen metastasierende pleomorphe Adenome aus. Die Zuordnung zu dieser Gruppe erfordert die exakte Definition und Klassifikation des Primärtumors sowie den Nachweis gleichartiger benignen Strukturen in der Metastase wie im Primärtumor und einen entsprechenden klinischen Verlauf ohne die Kriterien für malignes Wachstum. (Youngs und Scheuer, 1974; Heckmayr und Seifert, 1977; el-Naggar et al., 1988; Collina et al., 1989; Cresson et al., 1990; Wenig et al., 1992). Der Primärtumor ist meist in der Parotis lokalisiert, seltener in der Submandibularis. Bei der Mehrzahl der Fälle traten vor der Metastasierung lokale Rezidive des Primärtumors auf.

### 3.5.3 Histopathologie

Pleomorphe Adenome sind Tumore, die einen vielgestaltigen Aufbau zeigen. Sie bestehen aus epithelialen und modifizierten myoepithelialen Zellen. Dazwischen sind häufig unscharf abgegrenzte Stromaanteile mit myxoider, mukoider oder chondroider Differenzierung. Die Vielfalt des geweblichen Aufbaus beruht zum einen auf der unterschiedlichen Differenzierung von Epithelzellen und modifizierten Myoepithelzellen, zum anderen auf Menge und Beschaffenheit des Stromas (Seifert et al., 1984; Seifert et al., 1996).

In pleomorphen Adenomen können auch Nekrosen auftreten (Layfield et al., 1992; Allen et al., 1994), was die Unterscheidung zu einem malignen Tumor erschweren kann. Nekrosen finden sich meist im Zentrum, umgeben von intaktem Tumorgewebe. Es fehlen hier, im Gegensatz zu Tumornekrosen, die Kriterien für Malignität.

Typisch für die pleomorphen Adenome ist eine dicke bindegewebige Pseudokapsel, die den Tumor umgibt und das Tumorgewebe vom Drüsenparenchym trennt. Das Tumorgewebe kann in die Kapsel einbrechen (Kapselinfiltration), oder die Kapsel durchdringen (Kapselperforation) und ins umliegende Gewebe einwachsen. Dabei können im Adenomgewebe satellitenförmige Ausläufer des Tumors gebildet werden, die nur durch feine Gewebsbrücken mit dem Tumor in Verbindung stehen oder sich diskontinuierlich lymphatisch ausbreiten. Auch diskontinuierliche Kapseln kommen häufiger vor (Lam et al., 1990). Ein echtes multifokales Wachstum ist hingegen selten.

Je nach Stromaanteil unterscheidet man zwischen stromareichen und zellreichen Subtypen (Takeuchi et al., 1975; Seifert et al., 1976). Die zellarmen, stromareichen pleomorphen Adenome neigen vermehrt zu Rezidiven, vor allem Erstrezidiven, und kommen häufiger in jüngeren Altersgruppen (21-40J.) vor (Weiss et al., 1994). Die Neigung zu Rezidiven liegt vermutlich an der höheren Vulnerabilität der stromareichen Tumoren, weshalb es intraoperativ häufig zu so genannten Impfmastasen kommt. Grund dafür sind wahrscheinlich iatrogene Kapselläsionen, inkomplette Kapseln (Pseudokapseln) sowie bei  $\frac{1}{4}$ -  $\frac{1}{3}$  die Ausbildung von Pseudopodien. Auch

Satellitenknötchen können vorkommen (Stennert et al., 2001). Die meisten Rezidive sind multinodulär und treten auch im umliegenden Gewebe des Primärtumors auf (Stennert et al., 2003). Stromaarme Tumoren neigen hingegen eher zu einer malignen Transformation (Seifert und Donath, 1976)

Rezidive verändern häufig ihre Histostruktur von stromareich zu stromaarm, oder umgekehrt und auch ihre zelluläre Differenzierung. So ist die Zuordnung zum Primärtumor oft schwierig (Donath und Ußmüller, 2001).

### 3.5.4 Stand der Forschung: Chromosomale und molekulare Veränderungen

Das pleomorphe Adenom ist aufgrund seiner Häufigkeit und der Möglichkeit, maligne zu entarten, der am Besten untersuchte Speicheldrüsentumor. Es wurden diverse zytogenetische Studien durchgeführt, um Erklärungen für die Tumorentstehung bzw. die mögliche maligne Transformation zu finden. Grund für die zahlreichen Studien ist auch die Tatsache, dass in Karzinomen aus pleomorphen Adenomen maligne entartete Stromaanteile neben benignen Anteilen nachgewiesen wurden. Außerdem besitzen manche Karzinome eine Übergangszone, in welcher die Zellen sowohl Mischformen der benignen als auch der malignen Komponenten aufweisen.

#### *Translokationen auf Chromosom 8 und Chromosom 12 und erste zytogenetische Untersuchungen*

Die ersten Studien an pleomorphen Adenomen waren zytogenetische Untersuchungen. Mark und Mitarbeiter berichteten erstmals 1980 über zytogenetische Veränderungen an Chromosomen pleomorpher Adenome. (Mark et al., 1980). Später folgten von dieser und anderen Arbeitsgruppen zahlreiche weitere zytogenetische Studien. Diese wiesen häufig strukturelle Aberrationen von 8q12 in Form der Translokation  $t(3;8)(p21;q12)$  auf. Daneben sind mindestens 13 weitere Translokationspartner bekannt (Mark et al., 1982; Mark et al., 1983; Bullerdiek et al., 1987; Bullerdiek et al., 1988)

Mark und Mitarbeiter teilten die pleomorphen Adenome anhand der Veränderungen in 4 Gruppen ein, welche das Chromosom 8, in der Regel die Translokation des

Segments unterhalb von 8q12; das Chromosom 12, i.d.R. die Translokation unterhalb des Segments 12q13-15 und das Chromosom 3 betrafen sowie eine kleine Gruppe mit unterschiedlichen Veränderungen. Fast 50% der Fälle zeigten ein Rearrangement am langen Arm von Chromosom 8 (Mark und Dahlenfors, 1986).

Zwischen dem Karyotyp und dem Subtyp der pleomorphen Adenome bestehen laut Bullerdiek et al. Korrelationen (Bullerdiek et al., 1989; Bullerdiek et al., 1993). Das 8q12 Rearrangement findet sich in 58% der PA des Subtyps 1, das 12q14-15 Rearrangement in 70% der pleomorphen Adenome des Subtyps 2 (Seifert et al., 1976). Bullerdiek und Mitarbeiter teilten die pleomorphen Adenome, ähnlich wie zuvor Mark und Mitarbeiter, anhand des häufigen #8 und #12 Rearrangements in nur drei Hauptgruppen ein: PA mit normalem Karyotyp, PA mit Rearrangements auf 8q12 und als dritte Hauptgruppe PA mit #12q13-15-Rearrangements (Bullerdiek et al., 1987; Bullerdiek et al., 1993; Schoenmakers et al., 1994; Kools et al., 1995; Wanschura et al., 1996). Die häufigste bis dahin gefundene Translokation im Bereich der chromosomalen Aberration 12q13-15 ist  $t(9;12)(p21;q14-15)$ , aber auch sporadische Translokationen mit verschiedenen anderen Chromosomen sind bekannt. In seltenen Fällen konnten PA mit double minutes (dmin) und einer Deletion der 12q13-15 Region detektiert werden (Sandros et al., 1990).

### *Loss of heterozygoty-Studien:*

Die Region 8q12 ist nachweislich in eine Menge komplexer Rearrangements involviert, die unter anderem zu dizentrischen Chromosomen führen. Auch Mikrosatelliteninstabilitäten an multiplen Loci sind im Rahmen von LOH-Studien an 8q mit 36% bis 47% nachgewiesen worden (el-Naggar et al., 1997; Gillenwater et al., 1997). Weitere Veränderungen des #8 zeigten sich in der Deletion mit Bruchpunkten zwischen 8q12 und 8q21-23 sowie LOH der chromosomalen Region 8q24-qter (Sahlin et al., 1995; Jin et al., 2001). Zudem ist die Trisomie des #8 die bekannteste numerische Chromosomenaberration in Speicheldrüsentumoren (Martins et al., 2005).

Damit stellen pleomorphe Adenome neben den Meningeomen mit häufigem #22 - Verlust die zweite Art von benignen Tumoren dar, welche eine charakteristische

chromosomale Veränderung tragen. Auch bei Chromosom 12q kommt es häufig zum LOH. Johns et al. beschrieben in 35% der untersuchten Fälle einen solchen Verlust (Johns et al., 1996).

### *Protoonkogen PLAG1*

Ein viel erforschtes Gen ist PLAG1, das putative pleomorphe Adenom Gen, dem eine wichtige Bedeutung in der Entstehung von pleomorphen Adenomen zugeordnet wird. Es befindet sich in der häufig an Translokationen beteiligten Region #8q12 und kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor. Es ist außerdem ein Protoonkogen, welches an Promotorregionen verschiedener Gene bindet und diese aktiviert, um deren Expression zu erhöhen (z.B. positive Regulation des Insulin-like growth factor II (IGF-II) (Voz et al., 2000), Cytokine-like factor 1 (CLF-1) und BPGF-1 (Voz et al., 2004).

Die Gen-Fusionierung (so genanntes „Promotor-Swapping“) wurde als eine Ursache für eine fehlregulierte Expression von PLAG 1 berichtet (Kas et al., 1997; Voz et al., 1998; Astrom et al., 1999). Überexpressionen von PLAG1 können ebenso durch kryptische intrachromosomale 8q Rearrangements entstehen, die neue Fusionsprodukte wie CHCHD7-PLAG1 oder TCEA1-PLAG1 bilden (Asp et al., 2006). Durch die häufigste bisher gefundene Translokation t(3;8)(p21;q12) kommt es zum Austausch der Promotorregionen von PLAG1 und CTNNB1, das Gen für  $\beta$ -Catenin auf #3p21, und dadurch zur PLAG1-Aktivierung und verminderter Expression von CTNNB1. Zudem kann PLAG1 im Rahmen der Translokation t(5;8)(p13;q12) durch die Promotorregion seines Translokationspartners LIFR, des leukemia inhibitory factor receptors, über verstärkte Expression der Zielgene zur Tumorgenese beitragen (Voz et al., 1998; Voz et al., 2000; Voz et al., 2004). Außer bei pleomorphen Adenomen wurden PLAG1-Überexpressionen auch in mesenchymalen Tumoren wie z.B. uterinen Leiomyomen und Leiomyosarkomen gefunden (Astrom et al., 1999). PLAG1 „Promotor-swapping“ ist außerdem ein zentrales onkogenes Geschehen bei Lipoblastomen (Hibbard et al., 2000).



### *Transkriptionsfaktor HMGA2*

Ein bedeutendes Gen auf #12q13-15 und mögliches Zielgen bei Translokationen ist HMGA2 (früher HMGIC genannt), welches für eine Gruppe der high mobility-Proteine kodiert (Schoenmakers et al., 1995). Die HMGIC-Gene sind als Transkriptionsfaktoren an Vorgängen der Genexpression, Zellproliferationskontrolle und Zellentwicklung sowie der neoplastischen Transformation beteiligt (Kurose et al., 2001). Diese Gene wurden bereits mit Lipomen, uterinen Leiomyomen, pulmonalen chondroidalen Hamartomen, Endometrium-Polypen, aggressiven Angiomyxomen und Hamartomen sowie Fibroadenomen der Brust assoziiert (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995; Kazmierczak et al., 1996; Staats et al., 1996; Tallini et al., 2000). Die Partnergene sind FHIT (fragile histidine triad gene) in t(3;12)(p14.2; q145) und NFIP (nuclear protein involved in transcriptional regulation) in ins(9;12)(p23;q12q15). Die Genfusion führt zu einer Lösung der DNA-Bindungsstellen und zu möglichen Instabilisierung der mRNA, was zu einer Fehlregulierung der HMGA2-Expression führt.

Queimado und Mitarbeiter identifizierten einen Antagonisten des Wnt-Pathways, das WIF1-Gen, als neuen Fusionspartner von HMGA2. Dieses ist ein putatives Tumorsuppressorgen. Es gibt Hinweise auf synergistische Effekte zwischen der Up-Regulation von HMGA2 und der Down-Regulation von WIF1. Eine Down-Regulation sowie ein Rearrangement von WIF1 wurden bei pleomorphen Adenomen sowie CXPA festgestellt, jedoch bei keiner anderen Entität von Speicheldrüsentumoren. Es wird diskutiert, dass die Down-Regulation von WIF1 eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von PA spielen (Queimado et al., 2007).

### *Onkogen MDM2*

MDM2, ein Phosphoprotein, ist ein Onkogen, dessen Genprodukt den Zellzyklus, die Apoptose sowie die DNA-Reparatur kontrolliert. Zur Regulation der Zellteilung zeigt es eine Interaktion mit anderen Zellregulatoren wie den Tumorsuppressorgen pRb, p53 und den 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. Dadurch wird 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). Eine gesteigerte MDM2-Expression konnte neben malignen Speicheldrüsentumoren auch in geringem Ausmaß in PA ermittelt werden.

Die Bedeutung von Amplifikationen und die Überexpression von HMGIC und MDM2 wird bei der malignen Transformation von PA diskutiert (Roijs et al., 2002).

### 3.5.5 CGH an pleomorphen Adenomen

Obwohl bereits zahlreiche Studien an pleomorphen Adenomen durchgeführt wurden, liegen nur wenige CGH-Untersuchungen an pleomorphen Adenomen vor. Die erste stammt von Toida et al. aus dem Jahre 2001. Diese Autoren untersuchten 2 pleomorphe Adenome, ein adenoid-zystisches Adenom und ein Basalzelladenokarzinom mittels comparativer genomischer Hybridisierung (Toida et al., 2001).

Eine weitere Studie stammt von Giefing und Mitarbeitern (Giefing et al., 2008), welche mittels CGH 14 pleomorphe Adenome und 15 Warthin Tumore untersuchten. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tumorgruppen beobachtet. Bei 12/29 Tumoren fiel ein Verlust von 12q24.2 im Bereich des harakiri-Gens (BCL2), einem Tumorsuppressorgen, auf. In 11/29 Fällen bestand Verlust auf 17p13.1, wo das TP53-Gen lokalisiert ist (TSG). Außerdem besteht eine häufige Amplifizierung von 13q22.1-22.2 (13/29), wo die KLF5 und KLF12-Gene lokalisiert sind. KLF 5 reguliert die Expression von Survivin, einem Onkogen, das bei den meisten menschlichen Tumoren exprimiert wird.

### 3.5.6 CGH an Karzinomen aus pleomorphen Adenomen

Morio et al führten im Jahre 2002 CGH-Untersuchungen an 7 CXPA durch, und fanden sowohl in den adenomatösen als auch karzinomatösen Anteilen multiple numerische Veränderungen. Bei den adenomatösen Anteilen waren diese jedoch seltener. In beiden Komponenten traten überwiegend Gewinne auf. In den karzinomatösen Anteilen waren diese vor allem auf 6q lokalisiert (4 Fälle), wohingegen sie sich bei den adenomatösen Gewebsanteilen vor allem auf 13q und

15q befanden (3 Fälle). In 5 Fällen wurden identische Veränderungen im adenomatösen und karzinomatösen Anteil der CXPA gefunden. In den adenomatösen Anteilen wurden u.a. Verluste von 1p und 16p12-22, 19p (2x), und 22q berichtet (Morio et al., 2002).

Eine weitere CGH-Untersuchung stammt von Rao et al. Diese Autoren untersuchten den Primärtumor und die renale Metastase eines CXPA mittels Zytogenetik und CGH. Veränderungen der CGH des Primärtumors waren: +3q26, +8q23-24, +12q14-15, +X, für den Primärtumor und +1p32-36,3, +2q37, +8q23-24, -9qter-q21, -11, +12q13-15, -15, -Xpter-q21, für die renale Metastase (Rao et al., 1998).

### 3.6 Warthin-Tumore (Zystadenolymphome)

#### 3.6.1 Häufigkeit, Auftreten, Lokalisation

Mit einem Anteil von über 20% sind Warthin-Tumore nach den pleomorphen Adenomen die zweithäufigste Adenomform und machen insgesamt 5% aller Speicheldrüsentumore aus. Sie kommen überwiegend beim männlichen Geschlecht vor (Männer:Frauen = 3:1).

Der Altersgipfel liegt in der 6.-7. Lebensdekade und somit später als beim PA. Die häufigste Lokalisation ist der untere Parotispol im Bereich eines paraglandulären Lymphknotens. Eine Lokalisation außerhalb der Parotis wird in 5-8% angegeben. Die kleinen intraoralen Speicheldrüsen sind häufiger als die Gl. submandibularis betroffen (Seifert et al., 1996). Außerhalb der Mundhöhle ist ein Vorkommen im Oro- und Nasopharynx (Kristensen et al., 1989; Griffiths und Dekker, 1991), den Tonsillen (Fahmy, 1973), der Nasenschleimhaut und Kieferhöhle sowie im Larynx beschrieben worden (Seifert, 1966; Kristensen et al., 1989).

#### 3.6.2 Klinische und statistische Daten

Bereits 1910 beschrieben Albrecht und Arzt diesen Tumor, bevor der amerikanische Pathologe Alfred Scott Warthin (1929) die erste exakte histologische Beschreibung dieses papillären Zystadenoms gab (Albrecht und Arzt, 1910; Warthin, 1929). Der Terminus „papilläres Zystadenolymphom“ wurde später, um Missverständnisse zu malignen Lymphomen zu vermeiden, durch den Terminus Warthin-Tumor ersetzt.

Warthin-Tumore (WT) sind gut begrenzte bekapselte Tumore mit einer graugelben zystischen Schnittfläche.

Als Ursache für die Entstehung wird Nikotinabusus diskutiert (Lamelas et al., 1987). Yoo et al. beschrieben eine Zunahme der Inzidenz bei Frauen bei einer Frau: Mann-Ratio von 3,8 im Jahre 1952 und nur 1,6 im Jahre 1992, was sie ebenfalls im Zusammenhang mit steigendem Nikotinabusus beim weiblichen Geschlecht sahen (Yoo et al., 1994). Weiterhin wird das Auftreten von Warthin-Tumoren nach EBV-Infektionen diskutiert (Santucci et al., 1993).

Die Tumore präsentieren sich meist durch ein schmerzfreies, langsames Wachstum, und können teilweise unbemerkt schon über Jahre bestehen. Makroskopisch besteht eine Möglichkeit der Verwechslung mit lateralen Halszysten oder Lymphknotentuberkulose (Seifert et al., 1992). Kleinere Tumoren können hingegen klinisch als regionäre Lymphknoten imponieren.

Die präoperative Diagnostik entspricht der der pleomorphen Adenome. Sonographisch zeigen sich charakteristischerweise scharf begrenzte runde oder ovale echoarme Tumoren mit zystischen Komponenten.

Wie bei den pleomorphen Adenomen ist auch hier die Therapieempfehlung nicht einheitlich. Aus mehreren Gründen werden radikalere Methoden favorisiert. Die laterale oder subtotale Parotidektomie wird wegen der Tendenz des Tumors zum multilokulären Wachstum vorgenommen. Eine beidseitige laterale Parotidektomie wird teilweise wegen des nicht seltenen bilateralen Wachstums dieser Tumore diskutiert. Andere Autoren propagieren hingegen eine extrakapsuläre Dissektion bei typischem Sitz im kaudalen Parotispol, da die lokale Rezidivrate sehr niedrig ist (Gehrking et al., 2007).

In je nach Literatur 4-13,4% der Fälle treten Warthin-Tumoren bilateral auf (Lefor und Ord, 1993; Leverstein et al., 1997; Seven et al., 1999). In 4-12% der Fälle wurde ein multilokuläres Auftreten beschrieben (Gaillard et al., 1981; Lamelas et al., 1987; Loenneken, 1989; Vigliani, 1990). Mehrfachtumoren können sowohl innerhalb als auch außerhalb der Parotis lokalisiert sein (Snyderman et al., 1986; Nishikawa et al., 1989). Maligne Transformationen sind selten (1%) (Evans und Cruickshank, 1970).

Mikroskopisch kleine WT werden häufig erst als Zufallsbefund in der histologischen Untersuchung von Operationspräparaten festgestellt.

Es wurde auch eine Syntropie mit anderen Tumoren beschrieben. So kann es zu einem gleichzeitigen Auftreten von WT und pleomorphen Adenomen (Astacio, 1974; Lefor und Ord, 1993), Basalzelladenomen (Schilling et al., 1989), Onkozytomen (Goodwin, 1980) und verschiedenen differenzierten Karzinomen kommen (Assor, 1974; Gadiant und Kalfayan, 1975; Lumerman et al., 1975; Seifert et al., 1977; Seifert et al., 1980; Chomette et al., 1989; Lefor und Ord, 1993). Park und Mitarbeiter stellen die Hypothese auf, dass die länger andauernde Antigenstimulation durch den Warthin-Tumor im lymphoiden Gewebe die Entstehung eines malignen B-Zell-

Lymphoms begünstigen könnte (Park et al., 2000). Im Hamburger Speicheldrüsenregister waren 3% aller Warthin-Tumoren mit anderen Tumoren assoziiert, interessant ist hier eine häufige Bestrahlung der Kopf-Halsregion in der Vorgeschichte (Seifert et al., 1984).

### 3.6.3 Histopathologie

Je nach Menge der epithelialen und lymphoiden Gewebekomponente und der epithelialen Differenzierung lassen sich 4 Subtypen unterscheiden (Seifert et al., 1980): Bei Subtyp 1 beträgt die Relation von Epithel zu Stroma 1:1 (77%), Subtyp 2 ist eine stromaarme Variante (13,5%), Subtyp 3 (2%) enthält reichlich lymphoides Stroma. Der Subtyp 4 (7,5%) wird auch als metaplastischer Tumor bezeichnet (Seifert et al., 1980). Synonyme sind „infarzierter“ und „infizierter“ WT (Eveson und Cawson, 1989). Bei 20% der letztgenannten Tumoren werden in der Anamnese Bestrahlungen angegeben, in anderen Fällen Infektionen. Selten sind Tumornekrosen nach vorausgegangenen Feinnadelaspirationen beschrieben worden (Di Palma et al., 1999).

Das lymphoide Stroma entspricht in seiner Architektur und zellulären Zusammensetzung einem Lymphknoten (Cossmann et al., 1977; Hsu et al., 1981; Howard et al., 1982). Die Reaktionen des lymphoiden Stromas entsprechen ebenfalls denjenigen eines Lymphknotens. Hierzu gehören Granulome, die aus Riesenzellen vom Fremdkörpertyp, Makrophagen, Schaumzellen und Histiozyten bestehen und Cholesterin oder Schleimpartikel enthalten (Seifert et al., 1980).

### 3.6.4 Stand der Forschung: chromosomale und molekulare Veränderungen

#### *Zytogenetische Untersuchungen, Translokationen*

Im Gegensatz zu den pleomorphen Adenomen wurden bisher nur wenige Warthin-Tumoren zytogenetisch untersucht. Bullerdiel und Mitarbeiter waren 1988 die Ersten, die einen Fall eines WT zytogenetisch untersuchten. Von 22 untersuchten Metaphasen zeigten 13 eine reziproke Translokation zwischen den #11 und 19, t(11;19)(q21;p13.1). Die restlichen neun Metaphasen hatten einen normalen Karyotyp

(Bullerdiek et al., 1988). Diese Translokation wurde bis dahin nur in Verbindung mit akuten Leukämien beschrieben (Hayashi et al., 1988), der Bruchpunkt war dort jedoch ein anderer und klinisch gab es keinen Hinweis für eine Koinzidenz beider Erkrankungen.

Auch Mark und Mitarbeiter beschrieben einen Zellklon mit dem Karyotyp 46,XY,del(7)(p12p14-15), t(11;19)(q21;p12-13). Die 11;19 Translokation war mit dem ersten beschriebenen Fall identisch (Mark et al., 1989). In einer weiteren Untersuchung dieser Arbeitsgruppe an 8 WT zeigte keiner die oben beschriebene Translokation. In 2 Tumoren wurde ein polyklonales Evolutionsmuster gefunden (Mark et al., 1990).

1994 untersuchten Nordkvist et al. 13 weitere WT mittels konventioneller Zytogenetik und FISH. Ein Fall zeigte einen abnormen Zellklon. Dieser war pseudodiploid und charakterisiert durch 3 verschiedene reziproke Translokationen und eine Deletion. Kleine abnormale vorherrschende Zellklone wurden in 3 weiteren Fällen gesehen. Es zeigte sich eine Vielfalt an numerischen und/oder strukturellen Aberrationen. 2 Fälle zeigten eine Tetraploidie. Keiner der Fälle wies die Translokation t(11;19) auf (Nordkvist et al., 1994).

Martins et al. führten 1997 eine zytogenetische Studie an 7 neuen Fälle von Warthin-Tumoren durch und nahmen auch die 5 bereits veröffentlichten Fälle von 1995 in ihre Publikation auf (Martins et al., 1995). 7 Tumore (58%) zeigten klonale numerische und/ oder strukturelle Veränderungen. In 3 Fällen lag eine numerische Aberration mit dem Verlust von #Y (2 Fälle) und X (1 Fall). Die 4 weiteren aberranten Fälle präsentierten folgende strukturelle Veränderungen: eine komplexe Translokation t(11;19;16)(q21;p12;p13.3); reziproke Translokationen t(6;8)(p23;q22) und t(6;15)(p21;q15) sowie Veränderungen auf 1p22, 3p26, 11p13. In einem Fall traten gleichzeitig klonale numerische Veränderungen (+7; -Y) und das strukturelle Rearrangement t(6;8) auf (Martins et al., 1997).

### *MECT1-MAML2 Fusionstranskript*

Auch Mukoepidermoidkarzinome (MEC) wiesen in diversen Studien die Translokation t(11;19)(q21-22;p13) auf. Warthin-Tumore und MEC haben jedoch eine unterschiedliche Histomorphologie sowie Histogenese. Enlund et al. beschrieben 2004 eine positionelle Klonierung von t(11;19) und zeigten, dass die Translokation bei beiden Tumoren in der Fusionierung von WAMTP1 (Warthin- und Mukoepidermoid-Tumor Translocation Partner Gene 1) mit dem Notch-Aktivator MAML2 (Mastermind-like 2) resultiert. Durch die Fusion kommt es zum Austausch der Exone 1 beider Gene und dadurch zu veränderten Notch-Signalwegen, wodurch Notch-Targetgene aktiviert werden. Ein Tumor mit der o.g. Translokation zeigte einen Bruchpunkt am Intron 1 des MAML2 und die Expression eines WAMTP1 MAML2 Fusionstranskripts, wohingegen 2 Tumore, welche die Translokation nicht besaßen, diesen nicht aufwiesen (Enlund et al., 2004). Das MECT1-Protein, auch TORC1 oder WAMTP1 genannt, wurde von Conkright und Mitarbeitern als Bindungsprotein für den CREB (cAMP responsive element binding protein) Transkriptionsfaktor charakterisiert. (Conkright et al., 2003). Durch die beschriebene Translokation entsteht ein Fusionsprotein, welches die N-terminale CREB-Bindungsdomäne des CREB-Regulators METC1 und die C-terminale, die Transkription aktivierende Domäne des Notch-Co-Aktivators MAML2 beinhaltet. Dadurch entsteht ein Onkogen, welches über CREB die konstante Aktivierung des cAMP-Signalweges induziert (Wu et al., 2005). Zur Frage, ob das WAMTP1-MAML2 Genprodukt eine Rolle in der Entstehung von Warthin-Tumoren spielt, liegen zahlreiche Studien vor (Martins et al., 2004; Okabe et al., 2006; Tirado et al., 2007). Nur Tirado et al. konnten dieses Gen bei WT nachweisen.

### 3.6.5 CGH an Warthin-Tumoren

An Warthin-Tumoren wurde bislang nur eine CGH-Studie von Giefing und Mitarbeitern an 15 WT und 14 PA (Giefing et al., 2008) durchgeführt, auf die bereits im Kapitel 2.5.6 bei den pleomorphen Adenomen eingegangen wurde.

Die häufigsten Veränderungen wurden in den Bereichen 12q24.2; 17p13.1 und 13q22.1-22.2 detektiert.



### **3.7 Zielsetzung der eigenen Arbeit**

Wir untersuchten 31 pleomorphe Adenome und 30 Warthin-Tumoren mit der Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH). Ziel der vorliegenden Arbeit war, bei diesen Tumoren genetische Veränderungen in Form von Verlusten und Gewinnen nachzuweisen und über deren Lokalisation Hinweise auf bisher unbekannte tumorrelevante Gene zu erhalten.

Die ausgesuchte Methode eignet sich in besonderer Weise, weil sie einen guten Überblick über numerische Veränderungen im gesamten Tumorgewebe liefert und so interessante Genregionen eingegrenzt werden können. Die potentiellen Konsensusregionen für mögliche Tumorsuppressorgene oder Onkogene können daraufhin in weiterführenden Untersuchungen bestätigt oder verworfen werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war darüber hinaus der Vergleich mit den verfügbaren Ergebnissen von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen mit Sonden für die Bereiche 16p, Chromosom 17 und Chromosom X von den gleichen Tumorgeweben, um die in der CGH gefundenen Ergebnisse zu überprüfen.

## **4 Material**

### **4.1 Gewebeproben**

#### **4.1.1 Tumorgewebe**

Das von uns untersuchte Gewebematerial stammte von Patienten, welche unter der Verdachtsdiagnose eines Parotistumors in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde an den Universitätskliniken des Saarlandes operiert worden waren. Repräsentative Gewebeteile des Tumorsektats werden in der Tumorbank der Klinik in flüssigem Stickstoff gelagert, um zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden zu können. Die Tumoren wurden dazu unter sterilen Bedingungen im Operationssaal zerteilt, ein repräsentativer zentraler Tumoranteil entnommen und in ein steriles Gefäß mit DME-Medium gegeben. Direkt nach der Operation wurden die Tumoren in  $-72^{\circ}\text{C}$  kaltem flüssigem Stickstoff schockgefroren, wo sie bis zur DNA-Isolierung aufbewahrt wurden. Die Größe der Proben war abhängig von der Größe des Tumors. Sie betrug im Durchschnitt ungefähr  $0,5\text{ cm}^3$ .

Die Tumoren wurden dem Institut für Pathologie an den Universitätskliniken des Saarlandes zur histopathologischen Untersuchung und präzisen Diagnose weitergeleitet.

Im Rahmen der Promotionsschrift wurden ausschließlich pleomorphe Adenome und Warthin-Tumore untersucht.

#### **4.1.2 Referenzgewebe**

Metaphasechromosomen:

Für die Metaphasespreitungen verwendeten wir mittels üblicher Venenpunktion entnommene Blutproben von gesunden männlichen Spendern (46;XY).

Referenz-DNA:

Für die Gewinnung der genomischen Referenz-DNA dienten periphere Blutlymphozyten eines gesunden männlichen Spenders (46;XY), welche ebenfalls mittels üblicher Venenpunktion entnommen wurden.

## 5 Methoden

### 5.1 Präparation von Metaphasechromosomen

#### 5.1.1 Blutkultur

Für die Chromosomenpräparationen aus Lymphozyten verwendeten wir Lithium-Heparin-Blut. Aus diesem wurde, nach einer modifizierten Standardmethode (Arakaki und Sparkes, 1963), eine Vollblutkultur angesetzt, um normale Metaphasen zu gewinnen. Dafür wird üblicherweise Phytohämagglutinin als unspezifisches Antigen, welches immunkompetente T-Lymphozyten zur Proliferation anregt, zugesetzt (Nowell, 1960). Wir verwendeten stattdessen PB-Max (Difco), was dieselbe Aufgabe erfüllt. Danach wurden die Chromosomen mit Colcemid behandelt. Colcemid ist ein Spindelgift, das die proliferierenden Zellen bei ihrer Teilung in der Metaphase arretiert, wodurch sich die Anzahl von Metaphasen in der Kultur stark erhöht.

*Durchführung:*

Bei den folgenden Schritten ist auf steriles Arbeiten zu achten.

8 ml Venenblut wurden unter sterilen Bedingungen mit 0,8 ml Heparin (Li-Heparin, 5000 I.E./ml) in ein Reagenzglas gegeben und leicht geschüttelt. 0,8 ml dieses Heparinblutes wurde mit 8 ml PB-Max-Medium in einem Kulturgefäß vorsichtig gemischt. Bei 37 °C, 90% Luftfeuchte und 5%iger CO<sub>2</sub> Begasung, wurde diese Blutkultur 69 Stunden im Brutschrank inkubiert und einmal täglich leicht bewegt.

Das Gefäß wurde hierbei nicht vollständig geschlossen, um einen Gasaustausch zu ermöglichen. Nach genau 69 Stunden wurden der Blutkultur 200 µl Colcemid zugegeben, leicht bewegt und exakt weitere 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Blutansatz wurde anschließend in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und 10 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert.

### 5.1.2 Chromosomenpräparation

Die wesentlichen Schritte der Chromosomenpräparation sind die Hypotoniebehandlung mittels hypoosmolarer Zelldilatation, die Fixierung und schließlich die Spreitung der Chromosomen.

Die Fixierung dient der Strukturfestigung der Zellmembran und der elastischen Chromosomen und beugt einem Verlust an Nukleinsäuren vor (Claussen et al., 1994).

#### *Durchführung:*

Der Überstand der abzentrifugierten Blutkultur wurde mit einer Pipette vorsichtig abgehoben, resuspendiert und dann für 10 min bei 800 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet resuspendiert und aufgezogen. Um die Zellen zu blähen wurde unter ständiger Resuspension anschließend tropfenweise KCL hinzugegeben, bis zu einem Endvolumen von 6-8 ml. Danach wurden die Röhrchen in die Zentrifuge gestellt und nach 8 und 9 Minuten für jeweils 10 Minuten bei 800 rpm zentrifugiert. Danach wurden tropfenweise 10 ml des -20 °C kalten Fixans (Methanol/Eisessig im Verhältnis 3:1) zugegeben und sehr vorsichtig resuspendiert, um eine vollständig homogene Suspension zu erhalten. Es erfolgte eine Fixierung bei -20 °C über eine Stunde. Nach der Fixierung wurde nochmals 10 min bei 800 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgehoben und mit Fixans resuspendiert. Diese letzten drei Schritte wurden weitere drei Mal wiederholt, bis das Zellsediment annähernd weiß erschien. Bei dem letzten Schritt wurden 1-2 ml Fixans zugegeben, um die richtige Konzentration zum Auftropfen auf die Objektträger (OT) zu erreichen. In dieser Form ist es möglich, die Suspension -20 °C zu lagern.

Von dieser Zellsuspension wurde, jeweils aus ca. 40 cm Höhe, ein Tropfen auf gereinigte „Superfrost“-Objektträger aufgetropft. Anschließend verblieben die OT noch für kurze Zeit auf einem feuchten Tuch, um dann aufrecht bei RT zu trocknen. Die einzelnen Präparate wurden nun unter dem Umkehrmikroskop überprüft und nach einem Tag Lagerung bei +4 °C zur Hybridisierung verwendet und max. drei Monate aufbewahrt.

### **5.2 DNA-Isolation**

Für die DNA-Gewinnung wendeten wir eine Modifikation des Originalprotokolls von Gross-Bellard an (Gross- Bellard et al., 1973; Blin und Stafford, 1976).

Die DNA-Abschnitte bestehen nach der Isolation aus ca. 100- 150 kb. In der späteren Nick-Translation werden sie in kleinere definierte Fragmente geschnitten. Da die DNA aus zwei verschiedenen Gewebearten (zum einen aus kompakten Gewebeverbänden und zum anderen aus einer Suspension) erfolgte, wurden zwei geringfügig unterschiedliche Techniken angewandt.

#### **5.2.1 DNA-Isolation aus Tumorgewebe**

Das nach der Operation in flüssigem Stickstoff gelagerte Gewebe wurde unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell vorsichtig zerkleinert. Jeweils 300-500 mg des so vorbereiteten Tumormaterials wurde zusammen mit 5,0 ml SE-Puffer pH 8,0 in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach leichtem Schwenken wurden 0,5 ml SDS (10%) zugegeben und das Gefäß leicht bewegt.

Ab diesem Schritt wurden Tumorgewebe und Blut in einem enzymatischen Verdauungsprozeß gleich behandelt. Ziel dieses Prozesses ist die Denaturierung der extra- und intrazellulären Proteine, um die DNA der Extraktion zugänglich zu machen und sie in reiner Form zu erhalten.

Der Gewebesuspension wurde jeweils Proteinase K in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben, vorsichtig geschüttelt und bei 55 °C im Wasserbad unter kontinuierlicher, leichter Bewegung zunächst über Nacht inkubiert. Der Probe wurde

weiterhin einmal täglich Proteinase K zugesetzt, bis diese vollständig verdaut war. Sie wurde als völlig verdaut angesehen, wenn die Suspension homogen erschien und makroskopisch keine sichtbaren Zellverbände mehr vorhanden waren. Die Blutproben waren in der Regel bereits nach einem, höchstens zwei Tagen verdaut, während die Tumorproben oft etwa drei, teilweise auch vier Tage benötigten.

Im Folgenden wurden 1,65 ml einer gesättigten 6M NaCl-Lösung dazu pipettiert und leicht geschüttelt. Danach wurde 1 Volumen Chloroform zugesetzt, wodurch zwei Phasen entstanden. Das geschlossene Falcongefäß mit den zwei Phasen wurde auf dem Überkopfschüttler für ein bis zwei Stunden mit ca. 10 rpm rotiert, bevor es bei 4000 rpm für 20 min bei +4 °C abzentrifugiert wurde. Auf diese Weise wurden die denaturierten Proteine in einer eigenen Zwischenphase ausgeschüttelt und die DNA befand sich in der obersten, klar viskösen Phase. Diese wurde mit einer schräg abgeschnittenen Pipettenspitze, was einer Denaturierung der DNA vorbeugen sollte, langsam aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zu der DNA-haltigen Lösung wurde im Folgenden langsam 1 Volumen 100%-iges Isopropanol mit einer Temperatur von -20 °C zugegeben und vorsichtig, unter leichtem Schwenken gemischt, was zu einem Ausfällen der DNA in einen langen, weißlich sichtbaren Faden führte. Anschließend wurde die DNA in 0,5- 1 ml Ethanol (70%) von -20 °C überführt und ü.N. bei -20 °C aufbewahrt. Dieser Schritt dient der Reinigung der DNA, wobei Salze aus den vorhergehenden Extraktionsschritten, RNA-Reste und weitere Verunreinigungen entfernt werden. Dann wurde die DNA mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Ethanol gefischt und in ein neues, steriles Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde daraufhin im Exsikkator mindestens 30 Minuten getrocknet, solange bis das Ethanol vollständig entfernt war. Das so entstandene DNA-Pellet wurde bei 4 °C ü.N. in 10 µl sterilem TE-Puffer pH 8,0 gelöst. Die DNA konnte so bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert werden.

War nach der Zugabe von Isopropanol jedoch keine Ausfällung sichtbar, wurde die DNA nochmals 20 min bei 4000 upm zentrifugiert und der entstandene Überstand entfernt. Danach wurden 400 µl TE-Puffer pH 7,0 zugefügt und die DNA eine Stunde bei 4 °C oder 20 min bei 65 °C gelöst. Im Anschluss daran wurden 4 µl 3M NaAc pH 7,0 und 800 µl 100% Ethanol bei einer Temperatur von -20 °C zugefügt, woraufhin

die DNA ausfiel. Auch hier fand eine Aufreinigung in 70% Ethanol bei -20 °C ü.N. statt.

Die weiteren Schritte erfolgten wie oben bereits beschrieben.

### 5.2.2 DNA-Isolation aus Blut

Die von uns verwendete Referenz-DNA wurde aus Blutlymphozythen eines gesunden männlichen Spenders isoliert. Peripheres Blut wurde über Venenpunktion in Standard-EDTA-Monovetten gewonnen. Hiervon wurden 10 ml in ein Falcon Blue Cap überführt und 30 ml Lysispuffer zugegeben. Nach 60 Minuten auf Eis sollte das Gemisch klar und dunkel erscheinen. Es wurde dann für 10 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Das Falcon-Röhrchen sollte nun für einige Minuten umgekehrt auf ein Zellstoffpapier gestellt werden, um möglichst viel des hämoglobinhaltigen Überstandes von dem weißlichen Zellpellet zu entfernen. Dieser Schritt trägt, wie in Vorversuchen festgestellt werden konnte, zu einer deutlich geringeren Verunreinigung der DNA bei. Hierzu dient auch der nächste Waschschrift in PBS, wobei das Pellet in 40 ml PBS vorsichtig resuspendiert und wiederum für 10 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet nun in 4,5 ml SE-Puffer resuspendiert. Zu der so gewonnenen Zellsuspension wurde 0,5 ml SDS zupipettiert und leicht geschüttelt.

Ab diesem Schritt wurden die Blutproben- wie unter Punkt 4.2.1 beschrieben- entsprechend den Tumorproben behandelt.

### 5.2.3 Nukleinsäurequantifizierung und Reinheitsbestimmung

Für die CGH-Untersuchung ist es wichtig, dass Tumor-DNA und Referenz-DNA in äquimolaren Mengen und ohne Verunreinigungen eingesetzt werden. Durch eine Messung mittels Spektralphotometrie ist es möglich, die genaue DNA-Konzentration und ihre Reinheit in der vorliegenden Lösung zu bestimmen. Hierbei wird die Absorption der zu untersuchenden DNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen und gegen den Nullwert reinen Wassers abgeglichen. Aus den erhaltenen Werten lässt sich die Konzentration und Reinheit der Probe bestimmen.

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

### *Durchführung:*

Es wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  der vorliegenden DNA-Lösung in 99  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  verdünnt und in eine Mikroküvette pipettiert. Der Nullabgleich wurde mit 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  aus der gleichen Charge durchgeführt. Unter Berücksichtigung dieser Verdünnung wurde auf Grund der gewonnenen Werte die Konzentration bestimmt.

### **5.3 DNA-Markierung**

Für die Durchführung der CGH ist eine Fluoreszenzmarkierung sowohl der Tumoral- als auch der Referenz-DNA notwendig. Diese erfolgt indirekt über eine Bindung von Haptenen an die DNA, an welche später die Fluoreszenzfarbstoffe binden können. Wir verwendeten dafür Biotin und Digoxigenin.

Biotin ist ein kleines wasserlösliches Vitamin (B7), welches als Cofaktor verschiedener Enzyme wirkt. Als Marker an ein Nukleotid gebunden, wird es schon lange in der nicht-radioaktiven In-situ-Hybridisierung verwendet (Langer et al., 1981). Hierfür koppelt es über einen variablen Spacer aus 7-16 Kohlenstoffresten an die C4-Position des Pyrimidinringes. Wir verwendeten Biotin-16-dUTP.

Digoxigenin hingegen ist ein Steroidmolekül, welches aus der Pflanze *Digitalis purpurea* gewonnen wird. Auch dieses bindet als Marker an einen Spacer an der C5 Position des Uridinnukleotids. Wir verwendeten Digoxigenin-11-dUTP.

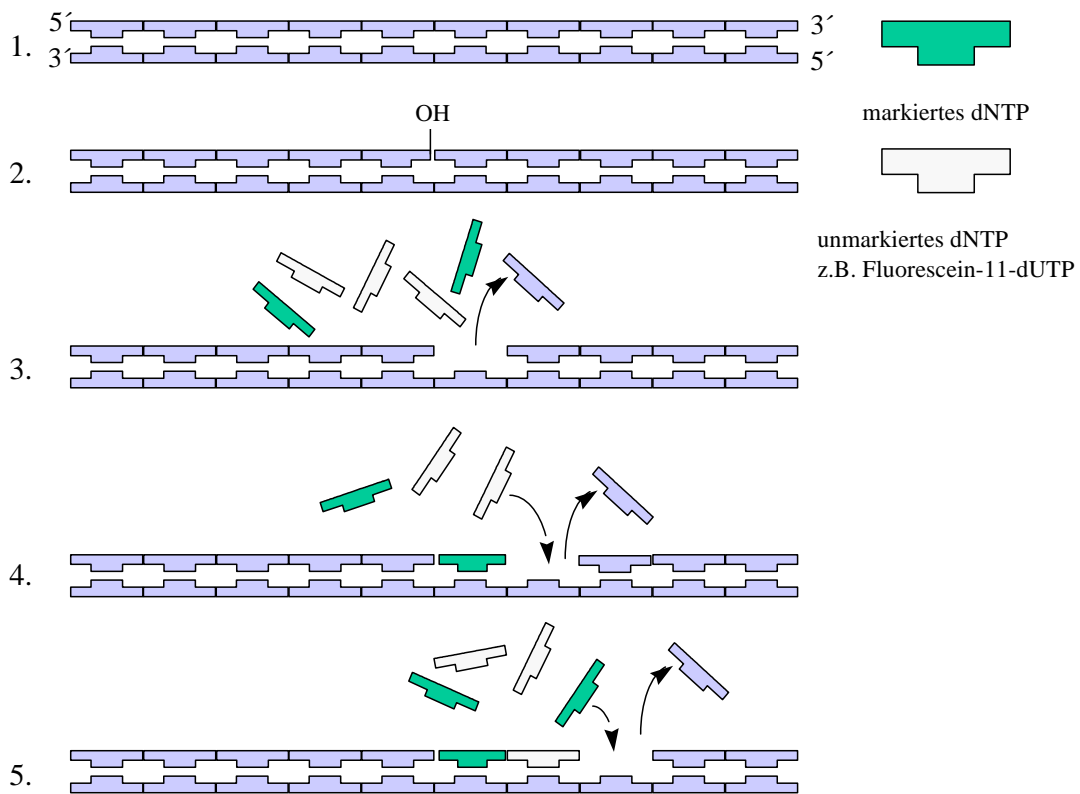


### 5.3.1 Nick-Translation

Tumor- und Normal-DNA werden mit Hilfe der Nick-Translation markiert (*Abbildung 5.1*). Dabei werden mit dem Hapten Biotin bzw. Digoxigenin markierte Nukleotide in die DNA eingebaut. Die Methode der Nick-Translation beruht darauf, dass DNase I bei sehr niedriger Enzymkonzentration bei vorliegendem  $Mg^{2+}$  an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Substrats Einzelstrangsnitte, sog. „nicks“, erzeugt.

*E. coli* DNA-Polymerase I benutzt die 3' OH-Enden dieser „nicks“ als Primer für die 5'-3'-DNA Synthese, komplementär zum intakten Strang. Die 5'-3'-Exonuclease Aktivität der DNA-Polymerase I entfernt dabei gleichzeitig die Nukleotide in Syntheserichtung. Die durch die Exonuclease-Aktivität abgebauten Nukleotide werden durch die Polymerase-Aktivität mit Hapten- oder Fluorochrom-markierten Nukleotiden ersetzt (Rigby et al., 1977).

Die Anzahl der Einzelstrangbrüche ist entscheidend für die Fragmentlänge und Markierung. Sind in der DNA zuwenig „nicks“ enthalten, werden die Fragmente zu lang und nicht ausreichend markiert. Bei zu vielen Brüchen geraten die Fragmente hingegen zu kurz.



**Abbildung 5.1: Nick-Translationsschema, zitiert aus Brunner, 2000**

1. Auf die doppelsträngige DNA wirken zwei Enzyme ein (DNase I, und DNA-Polymerase) mit deren Hilfe markierte und unmarkierte Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) eingefügt werden können.
2. DNase I führt einen Einzelstrangbruch (Nick) ein, so dass eine 3'-OH-Gruppe freigelegt wird.
3. Die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I entfernt 3' vom Nick gelegene Nucleotide.
4. Die DNA-Polymeraseaktivität katalysiert am 3'-OH-Ende des Nicks den Einbau neuer dNTPs.
5. Durch die gemeinsame Wirkung von Exonuclease- und Polymeraseaktivität der DNA-Polymerase I entsteht in 5'→3'-Richtung ein neuer DNA-Strang. Durch die zugefügten, markierten dNTPs sind die neuen Komplementärstränge gekennzeichnet, d.h. sie können die Fluoreszenzfarbstoffe binden.

Für die CGH-Experimente wurden die Tumor-DNA mit Biotin und die Kontroll-DNA mit Digoxigenin markiert.

Als Reaktionsansatz für die Nick-Translation wurden jeweils ein Biotin-Nick-translationsmix und ein Dig-Nick-Translationsmix benutzt, welche bereits Enzyme, Ionen-, und Pufferlösungen sowie markierte und unmarkierte Nukleotide enthielten.

### *Durchführung:*

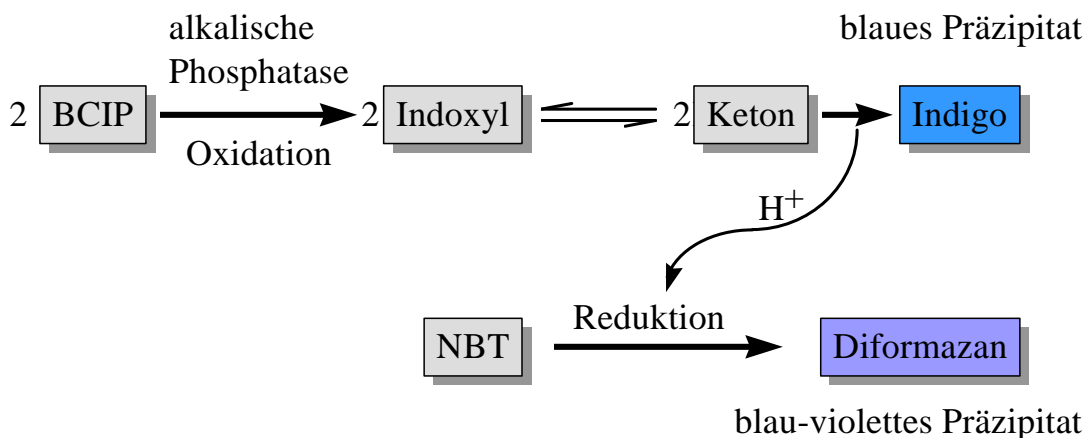
Zur Markierung der Tumor- und Referenz-DNA wurde 1 µg der jeweiligen DNA mit 4 µl Biotin- (Roche, Mannheim) bzw. Dig-Nick-Translationsmix (Roche, Mannheim) zusammenpipettiert und das Restvolumen in Abhängigkeit vom Volumen der Tumor-DNA mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 20 µl aufgefüllt. Dieses Volumen war wiederum abhängig von der spektrometrisch gemessenen DNA-Konzentration. Der Reaktionsansatz wurde kurz zentrifugiert und dann 90 min bei 15 °C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktion mit 1 µl 0,5M EDTA pH 8,0 gestoppt und es erfolgte eine Inkubation für 10 min bei 65 °C. Die DNA präzipitierte nun durch Zugabe von 2,1 µl einer 3M Natriumacetatlösung und 46 µl Ethanol (100%). Die so gefällte DNA wurde bei 4 °C und 14000 rpm für 25 Minuten abzentrifugiert und anschließend für mindestens 30 Minuten im Exsikkator getrocknet. Das so entstandene DNA-Pellet wurde in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ü.N. bei 4 °C gelöst.

### 5.3.2 Dot-Blot

Mit der Methode des Dot-Blots können die durch die Nick-Translation eingebauten Nukleotidsequenzen qualitativ und semiquantitativ nachgewiesen werden.

Dazu werden die markierten DNA-Fragmente in einer Verdünnungsreihe von 1:10 auf die Nitrozellulosemembran aufgetropft. Begonnen wird mit einer Ausgangskonzentration von 5 ng/µl, dieses wird in 6 Verdünnungsstufen weiter verdünnt, so dass in der letzten Probe noch 50 fg/µl DNA gelöst sind. Das verwendete Blocking Reagenz blockt unspezifische Bindungen ab.

Die Inkubation mit einem Konjugat aus Streptavidin- alkalische Phosphatase (Biotin-Nachweis) und Antidigoxygenin-alkalische Phosphatase (Digoxigenin-Nachweis) dient der Bindung an die entsprechenden Nukleotide. Bei Zugabe des chromogenen Substrats BCIP (5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) entsteht ein blaues Präzipitat, welches den Farbreaktionsverstärker NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz) reduziert. Unter Abspaltung von H<sup>+</sup>-Gruppen dimerisiert dieses zu dem blauen Farbstoff Indigo. Durch Wasserstoffionen kommt es zu einer Reduktion des Farbstoffverstärkers NBT zu Diformazan (violett). Beide Farbstoffe fallen somit in dem Dot Blot aus und färben diesen (*Abbildung 5.2*). Die Intensität des blauen Farbkomplexes ist direkt proportional zu der Menge, und somit der Einbaurate, der markierten Nukleotide.



**Abbildung 5.2: DOT-BLOT Farbreaktion, zitiert aus Brunner, 2000**

### *Durchführung*

Zuerst wurde eine Verdünnungsreihe der Biotin- bzw. Digoxigenin-Nick-translatierten DNA erstellt, indem sechs Tropfen von je 19 µl 6xSSC auf Parafilm aufgetropft wurden und in den ersten Tropfen 1 µl der Probe dazu pipettiert wurde. Nach Resuspension mit der Eppendorfpipette überführte man davon je 2 µl in den nächsten Tropfen usw. Je 1 µl jeder Konzentrationsstufe wurden punktförmig auf ein Stück Nitrozellulose übertragen. Danach wurde die Membran per Auto-Cross-Link mit 1,2 J UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde der Streifen in einer Petrischale

mit Puffer II für 30 min bei 37 °C inkubiert und der Streifen für 2x2 min in Puffer I gewaschen. Danach wurden 3 µl Streptavidin-AP-Konjugat bei der Tumor-DNA bzw. Anti-Digoxigenin-AP (Roche, Mannheim) bei der Normal-DNA in 3 ml Puffer I zugegeben und bei RT 30 min leicht geschüttelt. Es folgten nochmals zwei Waschschriffe in Puffer I, bevor in Puffer III für 10 min der pH eingestellt wurde. Für die Farbreaktion wurde die Nitrozellulosemembran für 30 min im Dunkeln in einer Lösung aus 5,7 ml Puffer III, 45 µl NBT-Stammlösung und 33 µl BCIP-Stammlösung leicht geschwenkt. Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von Ethanol (70%). Danach wurden die Membranen im Dunkeln getrocknet.

Anhand der sichtbaren Farbreaktionen ließ sich die markierte DNA nachweisen. Es wurden nur DNA-Fragmente für die CGH verwendet, deren Markierung bis in den Bereich von 1-10 pg noch nachweisbar war; d.h. es mussten mindestens drei 1:10 Verdünnungsstufen („Dots“) sichtbar sein.

### **5.4 Vergleichende genomische Hybridisierung (CGH)**

Die vergleichende genomische Hybridisierung ist eine molekularzytogenetische Methode, welche auf dem Prinzip der In-situ-Hybridisierung beruht. Dieses wurde im Jahre 1992 von Kallioniemi entwickelt (Kallioniemi et al., 1992a; Kallioniemi et al., 1992b; du Manoir et al., 1993; Kallioniemi et al., 1994). Durch dieses Verfahren wird ein Nachweis von quantitativen Veränderungen im gesamten Tumorgenom ermöglicht.

Man hybridisiert hierzu äquivalente Mengen einer Tumor- sowie Referenz-DNA auf Metaphasechromosomen eines gesunden Spenders. Dort konkurrieren die beiden DNA-Formen um homologe chromosomale Bindungsstellen.

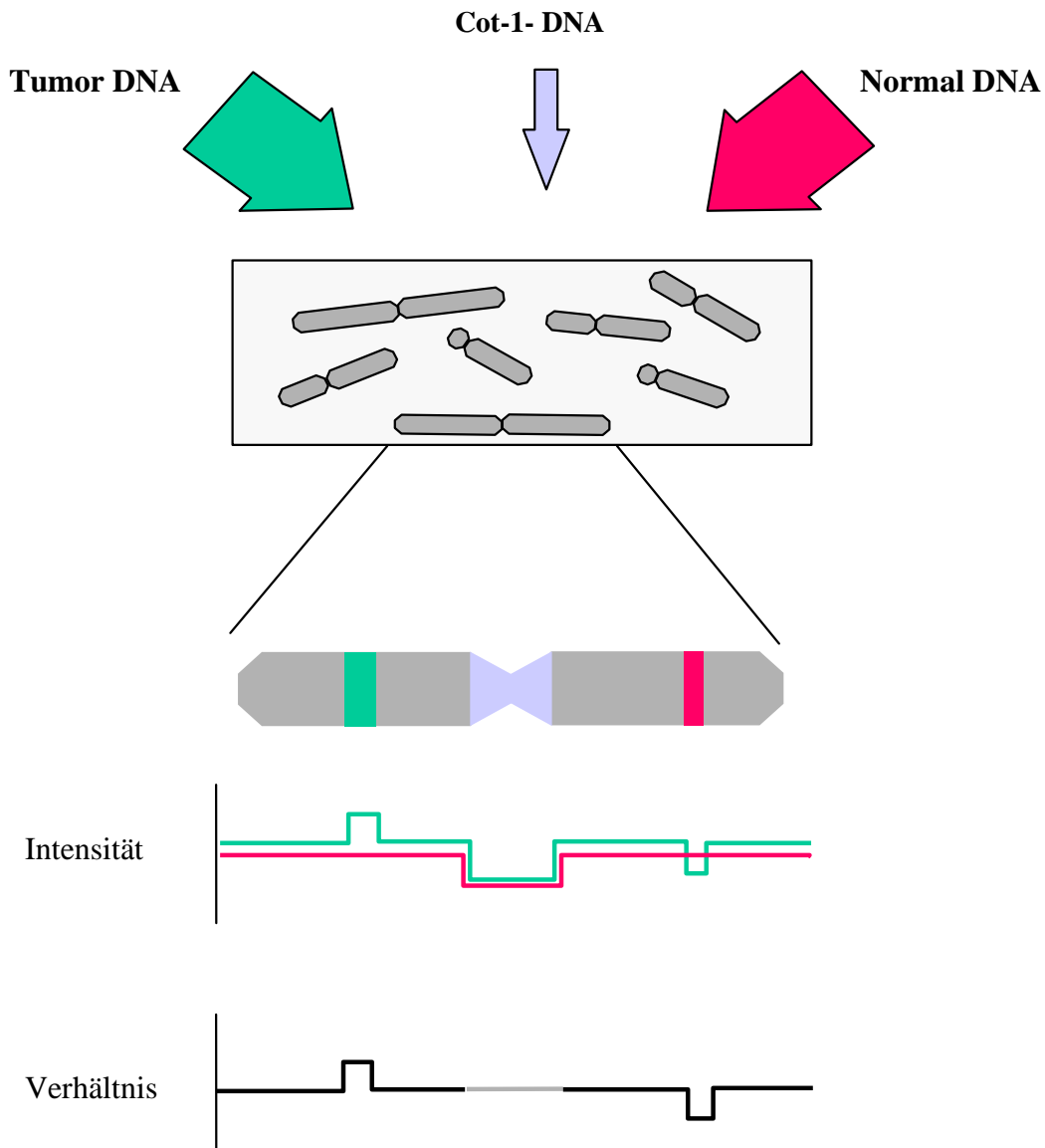
Zeigt der Tumor DNA-Verluste (Deletionen, Monosomien), überwiegt die Sequenz in der vollständig vorhandenen Referenz-DNA und diese bindet vermehrt an die konkurrierenden homologen chromosomalen Bindungsstellen. Bestehen beim Tumorgenom DNA-Gewinne (Amplifikationen, Trisomien, Double minutes), so wird diese vermehrt gebunden. Durch Markierung mit unterschiedlichen Fluorochromen lassen

sich die quantitativen Hybridisierungsunterschiede unter Nutzung selektiver Filter sichtbar machen.

Im Gegensatz zu der FISH oder zum chromosome-painting erfolgt die Auswertung der Hybridisierungsergebnisse nicht rein visuell. Die Chromosomen werden mit einer CCD-Kamera aufgenommen und als Graustufenbild kodiert. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgt seriell für jedes Chromosom einzeln. Zusätzlich zu den beiden Fluoreszenzfarbstoffen werden die Chromosomen noch mit einem dritten Farbstoff inkubiert, um die Identifizierung zu ermöglichen. Es werden deshalb drei Aufnahmen gemacht.

Die Bilder werden digital gespeichert und mit einer speziellen Bildverarbeitungssoftware (ISIS Metasystems, Altusheim) digital ausgewertet. Das geschieht über Berechnungen der Signalintensitäten. Veränderungen dieses Verhältnisses auf einem Chromosom werden als Graphen dargestellt. Überschreitungen und Unterschreitungen des errechneten Signifikanzniveaus werden als Gewinne oder Verluste an genetischem Material gewertet.

Das Prinzip der CGH ist in der *Abbildung 5.3* auf der folgenden Seite schematisiert dargestellt:



**Abbildung 5.3: Prinzip der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH), zitiert aus Brunner, 2000**

#### 5.4.1 Hybridisierung, Stringenzwaschung und Fluoreszenzfärbung

##### *Vorbehandlung der Chromosomenpräparate:*

Um eine Verbesserung der Hybridisierung zu erreichen, wurden die Chromosomenpräparate einer Vorbehandlung unterzogen. Durch Inkubation mit RNase wird die unspezifische Hybridisierung an RNA-Fragmente verhindert. Die Einwirkung von Pepsin/HCl auf die Präparation macht die Chromosomen zugänglicher für die

Hybridisierung, da sie von verbliebenen Protein- und Geweberesten zusätzlich befreit werden. Die Fixierung stabilisiert die Chromosomen vor der Denaturierung und beugt somit einem chromosomalen DNA-Verlust durch die Denaturierung vor (Raap et al., 1986).

### *Durchführung:*

Nach kurzem Waschen in 2xSSC wurde auf dem Objektträger (OT) ein Verdau mit RNase ausgeführt, indem 99 µl 2xSSC mit 1 µl RNase-Stammlösung (entsprechend 10 mg/ml 2xSSC) auf das Hybridisierungsfeld aufgetropft und ein Deckglas (DG) auflegt wurden. Der OT wurde nun für 20 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert, bevor er, nach Entfernung des DG, für nun 3x5 min auf dem Schüttler in 2xSSC gewaschen wurde. Für den Pepsinverdau wurde der OT genau 1,5 min in eine Küvette mit 100 ml einer 37 °C warmen 0,01M HCl-Lösung sowie mit 100 µl Pepsin 5% in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gestellt. Nach dem Einstellen in PBS für 5 min bei RT folgte die Fixierung in 4% PFA/PBS für 10 min bei +4 °C. Danach wurde der OT nochmals für 5 min bei RT in PBS gewaschen, bevor er in einer Ethanolreihe (70%-80%-96%) je 5 min dehydriert wurde. Vor einer weiteren Bearbeitung trocknete der OT bei RT für mindestens 30 min an einem staubfreien Ort.

### 5.4.2 Denaturierung der Chromosomen

Die Doppelstrang-DNA wird durch Hitzedenaturierung in komplementäre Einzelstränge überführt. Bei der Hybridisierung bindet die einzelsträngige genomische DNA an die ebenfalls einzelsträngige chromosomale DNA. Die Stabilität der Doppelstränge ist entscheidend für die Denaturierung und Hybridisierung und ist durch die Schmelztemperatur  $T_m$  festgelegt. Je stabiler die Doppelhelix, umso höher ist die Schmelztemperatur, das heißt, umso höher ist die zur Denaturierung benötigte Energie. Berechnen lässt sich  $T_m$  mit der folgenden Gleichung (Leitch et al., 1994):

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



Formamid (FA) hemmt die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und wirkt auf diese Weise destabilisierend. So entspiralisiert Formamid DNA-Doppelstränge und jedes Prozent Formamid im Hybridisierungsmix senkt die  $T_m$  um 0,72 °C. Letztlich spielen Eigenschaften der DNA selbst ebenfalls eine Rolle bei der Denaturierung. So 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 üblicherweise so gewählt, dass sie 30 °C über der errechneten Schmelztemperatur liegt.

### *Durchführung:*

Den Chromosomenpräparaten wurde 100 µl Denaturierungsmix aufpipettiert und blasenfrei mit einem DG belegt. Diese wurden auf eine 72 °C heiße Heizplatte gelegt und nach genau 1,5 min wurde das DG abgeschlagen und das Präparat in einer eisgekühlten Ethanolreihe (70%-80%-96%) für jeweils 5 min dehydriert. Anschließend trockneten die OT für mindestens 30 min bei RT.

### 5.4.3 Vorbereitung der DNA

Die DNA für die vergleichende genomische Hybridisierung setzt sich wie beschrieben aus der Tumor-DNA, der Kontroll-DNA und kommerzieller Cot-1 DNA zusammen. Während die beiden ersten in gleichen Mengen vorliegen müssen, wird die Cot-1 DNA im Überschuss zugegeben, da sie zuverlässig repetitive Sequenzen abblocken soll. Auf diese Weise wird eine unspezifische Hybridisierung der markierten Proben an repetitive Sequenzen verhindert. Eine zu hohe Menge an Cot-1 DNA kann jedoch die Hybridisierung beeinträchtigen (Lichter et al., 1988).

### *Durchführung:*

Die, wie unter Punkt 4.3 beschrieben, markierte genomische DNA wurde mit der Cot-1 DNA zusammenpipettiert. Es wurden 9 µl biotinylierte Test-DNA (1 µg/µl), 9 µl digoxygenierte Referenz-DNA (1µg/µl) und 60µl Cot 1-DNA (1ng/µl) sowie

10 µl ssssDNA (1:10 Boehringer, Ingelheim) und 8,8 µl 3M Natriumacetat pH 5,5 zusammen gegeben und die DNA mit 220 µl Ethanol (96%) ü.N. bei -20 °C gefällt. Nun wurde das DNA-Gemisch bei 4 °C und 14000 rpm für 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 200 µl Ethanol (70%) bei -20°C gewaschen und wiederum bei 4 °C und 14000 rpm für nun 15 min abzentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet für mindestens 30 min im Exsikkator getrocknet. Auf das Pellet wurden erst 5 µl deionisiertes Formamid gegeben und dies für 45 min geschüttelt, um dann zusätzlich 5 µl Hyb-Mix zuzupipettieren und wiederum 45 min zu schütteln. Die im Hyb-Mix gelösten DNA-Proben wurden für 5 min bei 75 °C im Wasserbad denaturiert. Zum Preannealing wurden die Proben im direkten Anschluss nochmals für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

### 5.4.4 Hybridisierung

Bei der Hybridisierung der genomischen DNA an die chromosomale DNA geht man davon aus, dass alle im Überschuss vorhandenen genomischen Sequenzabschnitte um die homologe Sequenzfolge der Chromosomen konkurrieren. Die Hybridisierung stellt die Umkehrung der Denaturierung dar. So wurde die genomische DNA bereits im Hybridisierungsmedium denaturiert und dieses dient direkt als Hybridisierungslösung. Das darin gelöste Dextransulfat verdreifacht die Hybridisierungsgeschwindigkeit, welche durch das geringe Reaktionsvolumen stark herabgesetzt ist (Wahl et al., 1979). Die Hybridisierungszeit ist jedoch immer noch relativ lange; so erzielten wir die besten Ergebnisse bei einer Hybridisierung von drei Tagen. Die Hybridisierungstemperatur wird im Allgemeinen etwa 20 °C unter der  $T_m$  angesetzt.

#### *Durchführung:*

Der DNA-Hyb-Mix (10 µl) wurde auf den getrockneten OT in das markierte Hybridisierungsfeld pipettiert und mit einem DG abgedeckt. Das DG wurde nun mit Fixogum vollständig verklebt, sodass ein dichter Abschluss gegeben war. Der OT wurde in eine feuchte Kammer gelegt und für drei Tage bei 37 °C hybridisiert.

### 5.4.5 Stringenzwaschungen

Die Stringenz stellt ein Maß für die Präzision der Hybridisierung dar. Nach der Hybridisierung werden Waschungen des OT vorgenommen, wobei die Bedingungen stringenter gewählt werden, um falsch oder nur partiell gebundene DNA-Moleküle zu entfernen. Hierzu werden eine höhere Temperatur und eine niedrigere Kationenkonzentration gewählt. Dadurch stoßen sich anionische DNA-Phosphatgruppen gegenseitig ab und nicht spezifisch gepaarte Hybride trennen sich.

#### *Durchführung:*

Zunächst wurde der Fixogum-Kleber vorsichtig vom OT entfernt und das DG abgehoben. Die hybridisierten Chromosomenpräparate wurden dann dreimal bei 45 °C für je 5 min in eine Küvette mit einer Lösung aus 50% FA/2xSSC gestellt, anschließend zweimal für 5 min in 2xSSC, ebenfalls bei 45 °C. Danach wurden die OT's für 5 min bei RT in 0,1xSSC gestellt, im Anschluss daran noch einmal für 10 min bei RT in 4T (4xSSC/0,1% Triton)- Lösung.

### 5.4.6 Fluoreszenzmarkierung

Die mit Digoxigenin und Biotin markierten DNAs werden nun mit fluoreszenzmarkierten, spezifisch bindenden Molekülen inkubiert. Digoxigenin wird immunologisch mit einem polyklonalen Anti-Digoxigenin-Antikörper (F<sub>ab</sub>-Fragment) detektiert. Dieser ist konjugiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin (TRITC), der ein Emissionsmaximum bei 600 nm (rot) besitzt (Cremer et al., 1995). Die Auflösung dieses so genannten Anti-Dig-Rhodamin Systems entspricht etwa dem des Biotin-Streptavidin Systems bei höherer Spezifität (Furuta et al., 1990; Morris et al., 1990).

Das Glykoprotein Streptavidin aus dem Bakterium *Streptococcus avidinii* besitzt eine sehr hohe Affinität zu dem Reportermolekül Biotin, an das es bindet. Zur Detektion wurde mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiertes Streptavidin verwendet. FITC emittiert Licht maximal bei 515 nm (grün). Um die Spezifität der Markierung

zu erhöhen, werden unspezifische Bindungsloci vor der Inkubation mit BSA blockiert.

Zur Identifizierung und Zuordnung der Chromosomen bei der späteren Auswertung werden diese zusätzlich mit einem dritten Farbstoff behandelt. Der Farbstoff DAPI interkaliert in das Chromatingerüst und ruft so über eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität der unterschiedlich kondensierten Chromosomenabschnitte eine typische Bänderung hervor. Diese ähnelt der üblichen GTG-Bänderung und ermöglicht auf diese Weise eine Identifizierung der Chromosomen. DAPI hat ein Emissionsmaximum bei 450 nm und erscheint im Fluoreszenzmikroskop blau. Der ganze Vorgang der Fluoreszenzmarkierung muss weitestgehend im Dunkeln durchgeführt werden, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

### *Durchführung:*

Nach der letzten Stringenzwaschung wurde auf den OT 100 µl 0,5% Blocking Reagenz aufpipettiert, ein Deckglas aufgelegt und für 20 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Darauf erfolgte eine kurze Waschung mit 4T bei 37 °C. Anschließend wurde eine Mischung von 2 µl Streptavidin- FITC in 100 µl 0,5% Blocking-Reagenz auf den OT aufgebracht und für 45 min bei 37 °C in der feuchten Kammer aufbewahrt. Um überschüssiges Streptavidin-FITC zu entfernen, folgten drei Waschschritte bei 37 °C für jeweils 5 min in 4xSSC mit 0,1% Triton (4T). Daraufhin wurde Anti-Dig-Rhodamin (Roche, Mannheim) im Verhältnis 1/35 mit 100 µl Blocking gemischt und auf den OT aufgebracht und dann wiederum in 45 min bei 37 °C der feuchten Kammer inkubiert. Die anschließende Waschung erfolgte dreimal mit jeweils 5 min bei 37 °C in 4T und die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%-80%-96%) bei RT. Der luftgetrocknete OT wurde im Folgenden gleichzeitig eingedeckt und für 10 Minuten mit DAPI gefärbt (DAPI 1:2000 pro ml Vectashield). Danach erfolgte ein weiterer Waschschritt in 70%-80%-100% für jeweils 5 Minuten. Die Präparate wurden bis zur mikroskopischen Auswertung und darüber hinaus trocken bei 4 °C in einer lichtundurchlässigen Box aufbewahrt.

### 5.4.7 Mikroskopie

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 Quecksilberverdampfungsampe mit 100 W, welche Licht von ultraviolett bis infrarot aussendet. Dieses Licht wird durch einen entsprechenden Anregungsfilter im Mikroskop über das Objektiv auf das Präparat fokussiert. Der Filter wird so gewählt, dass die geeignete Wellenlänge den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff anregt. Hierbei wurden Schmalbandfilter benutzt, bei welchen jeweils nur Licht eines schmalen, definierten Spektrumausschnittes passiert. Dieses Anregungslicht wird im Folgenden im Winkel von 45° über einen dichromatischen Teilerspiegel, der kurzwelliges Licht reflektiert, auf das Präparat gelenkt. Der Teilerspiegel lässt das längerwellige, emittierte Fluoreszenzlicht auf dem Rückweg passieren und auf den so genannten Langwellen-Sperrfilter treffen, welcher nur für Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge durchlässig ist (*Tabelle 5.1*). 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.

**Tabelle 5.1: Fluorochrome mit den zugehörigen Detektionsfiltersets**

<i>FARBSTOFF</i>	<i>ANREGUNG</i>	<i>ANREGUNGSFILTER</i>	<i>TEILERSPIEGEL</i>	<i>SPERRFILTER</i>	<i>FARBE</i>
<i>DAPI</i>	<i>ultraviolett</i>	<i>BP 360-370</i>	<i>DM 400</i>	<i>BA 420</i>	<i>blau</i>
<i>FITC</i>	<i>violett</i>	<i>BP 460-490</i>	<i>DM 505</i>	<i>BA 515-550</i>	<i>grün</i>
<i>Rhodamin</i>	<i>grün</i>	<i>BP 520-550</i>	<i>DM 565</i>	<i>BA 580 IF</i>	<i>rot</i>

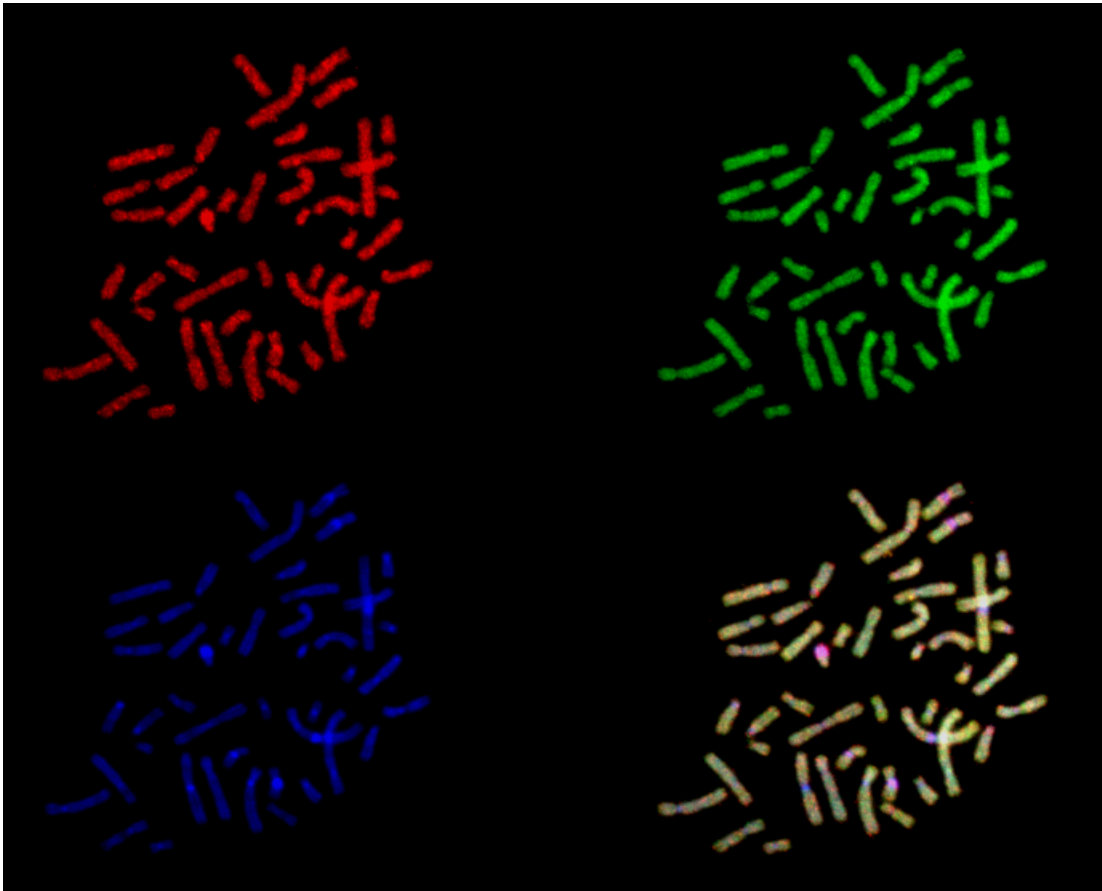
### 5.4.8 Bildaufnahmen

Von jedem zu untersuchenden Präparat wurden 10 bis 15 Metaphasen ausgesucht, bei denen die Chromosomen gut gespreitet und sich möglichst ohne Überlagerungen darstellten. Diese wurden dann bei entsprechender Vergrößerung (Objektiv: Plan Apo 60x; 1,40 Oil) mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Es wurde hierfür pro Meta-

phase jede Fluoreszenzmarkierung separat als monochromes Graustufenbild kodiert. Somit waren 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.

### 5.4.9 Bildverarbeitung und Auswertung

Die auf diese Weise gewonnenen Fluoreszenzaufnahmen können nun mit dem Softwareprogramm bearbeitet und ausgewertet werden. Die gespeicherten Graustufenwerte werden in Anlehnung an die ursprünglichen Fluorochrome als Falschfarbenbilder in rot, grün und blau dargestellt. Zusätzlich wird ein viertes Farbbild errechnet, welches die drei Farben übereinander projiziert darstellt. Somit definiert jedes Bild einen spezifischen Informationsgehalt. Das DAPI-Bild dient der Chromosomenidentifikation, das FITC-Bild repräsentiert den Tumor und das TRITC-Bild stellt die Referenz-DNA dar. Alle Bilder sind mit dem Computer einzeln und übereinander projiziert darstellbar (*Abbildung 5.4*).



**Abbildung 5.4: Falschfarbenkodierte Darstellung der drei verschiedenen Fluorochrome einer Metaphase und eines Summationsbildes der einzelnen Farbbilder.**

Es werden so viele Metaphasen aufgenommen, dass mindestens 20 Kopien jedes Chromosoms ausgewertet werden können. Nach der Aufnahme werden der Kontrast eingestellt, die Chromosomen getrennt und in einem Karyogramm zugeordnet. Die Intensität der einzelnen Fluoreszenzbilder lässt sich durch automatische Angleichung der oberen und unteren Schwelle regulieren. Zum Zuordnen der Chromosomen werden diese in der inversen Darstellung des DAPI-Bildes dargestellt. Nach der Zuordnung werden die Chromosomen begradigt und die Zentromere gesetzt. Chromosomen, die nicht eindeutig zugeordnet werden können, werden gelöscht. Es ist bei der Auswertung ohne Belang, ob alle Chromosomen einer Metaphase zugeordnet werden können oder nicht. Wichtig ist, dass von jedem Chromosom eine

ausreichende Anzahl zu Verfügung steht, damit eine statistische Auswertung erfolgen kann.

Das Programm zur Auswerten verwendete Programm ISIS (Metasystems, Altusheim) berechnet zunächst für jede Metaphase ein durchschnittliches Verhältnis von Grün (FITC) zu Rot (Rhodamin). Dieses Verhältnis wird für jede Metaphase neu berechnet, da es lokal auf dem Objektträger zu unterschiedlicher Intensität der Hybridisierung kommen kann. Dieses Verhältnis wird für jede zu analysierende Metaphase auf 1 gesetzt.

Für die Analyse jedes einzelnen Chromosoms wird entlang der Mittelachse über die gesamte Breite des Chromosoms für jeden aufgenommenen Pixel ein mittlerer Wert für Rot und Grün ermittelt und das Verhältnis von Rot zu Grün bestimmt. Diese Analyse ergibt für jedes Chromosom eine Kurve, welche die Verteilung von Rot zu Grün entlang der Chromosomenachse darstellt. Eine Längennormierung der einzelnen Chromosomen wird ebenfalls durchgeführt, da innerhalb einer Metaphasen-Präparation Chromosomen unterschiedlicher Kondensationsgrade vorliegen können. Das Zentromer wird hierbei als Fixpunkt benutzt und die p- und q-Arme getrennt voneinander normiert.

Nun werden für jeden Pixel die Profile aller gleichen Chromosomen gemittelt und der Mittelwert neben dem Ideogramm des betreffenden Chromosoms dargestellt. Zusätzlich wird entlang des Chromosoms für jeden untersuchten Pixel eine statistische Berechnung durchgeführt und die dreifache Standardabweichung bzw. das Konfidenzintervall von 99% als Sicherheitsgrenze grafisch dargestellt. Die Grenzen werden zur Beurteilung der Mittelprofile herangezogen. Eine Abweichung vom Mittelwert 1 wird erst dann als signifikant gewertet, wenn sie die Sicherheitsgrenze erreicht oder überschreitet.



### 5.5.0 Kontrolle

In Versuchsreihen mit mehreren Objektträgern wurde ein OT als Kontrolle mit-hybridisiert. Hierbei wurde die Tumor-DNA durch entsprechend markierte Normal-DNA aus gesundem Parotisdgewebe ersetzt. In diesem Fall dürfen sich bei der Detektion des Kontrollobjektträges keinerlei Veränderungen aufzeigen. Als interne Versuchskontrolle diente uns in mehreren Fällen die Konstellation zwischen dem Geschlecht der DNA und demjenigen der Zielchromosomen. Als Referenz-DNA wurde in allen Fällen männliche Spender-DNA (46;XY) verwendet.

## 6 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 31 pleomorphe Adenome und 30 Warthin-Tumore mit der Methode der CGH untersucht. Hier war das Verhältnis von Männern zu Frauen bei den untersuchten PA ungefähr 2:1 (20:11). Der Altersgipfel lag bei 48 Jahren. Bei den Warthin-Tumoren war das Verhältnis von Männern zu Frauen 3:2 (18:12). Der Altersgipfel lag hier bei 59 Jahren. Ein erneutes Auftreten eines Tumors kam in unserem Kollektiv nur bei einem Patienten mit einem Warthin-Tumor vor (Fall Nr. 045 und 058a, b). Dieser entwickelte 3 Monate nach der Operation einen zweiten Tumor, von dem wir 2 Proben untersuchten (058a, b). Diese zeigten, wie in *Tabelle 6.1* dargestellt, ein heterogenes Muster und unterschieden sich in den Ergebnissen vom Primärtumor. Ob dieser Tumor jedoch ein Rezidiv an derselben Stelle wie ursprünglich der Primärtumor oder ein zweiter, unabhängiger Tumor war, lässt sich anhand der vorliegenden Informationen nicht feststellen. Ein Fall der pleomorphen Adenome, Nr. 110, ließ sich aufgrund unzureichender Hybridisierung nicht auswerten.

### 6.1. Einzelergebnisse der beiden Tumorentitäten

#### 6.1.1 Chromosomale Veränderungen bei pleomorphen Adenomen

Vier Patienten mit klinischem Verdacht auf ein pleomorphes Adenom hatten in der CGH einen Normalbefund (46, XX bzw. 46, XY). Alle anderen Tumore (N=27) zeigten komplexe Veränderungen, die in *Tabelle 6.1* nach der Nomenklatur der ISCN dargestellt sind (Mitelman, 1991).

Die Tabelle bietet einen Überblick über die in der CGH gefundenen Veränderungen bei pleomorphen Adenomen, das Alter des jeweiligen Patienten und dessen Geschlecht. Die Nummer entspricht der Sortierung in unserer Tumorbank.

**Tabelle 6.1: CGH- Ergebnisse pleomorphe Adenome (N= 31)**

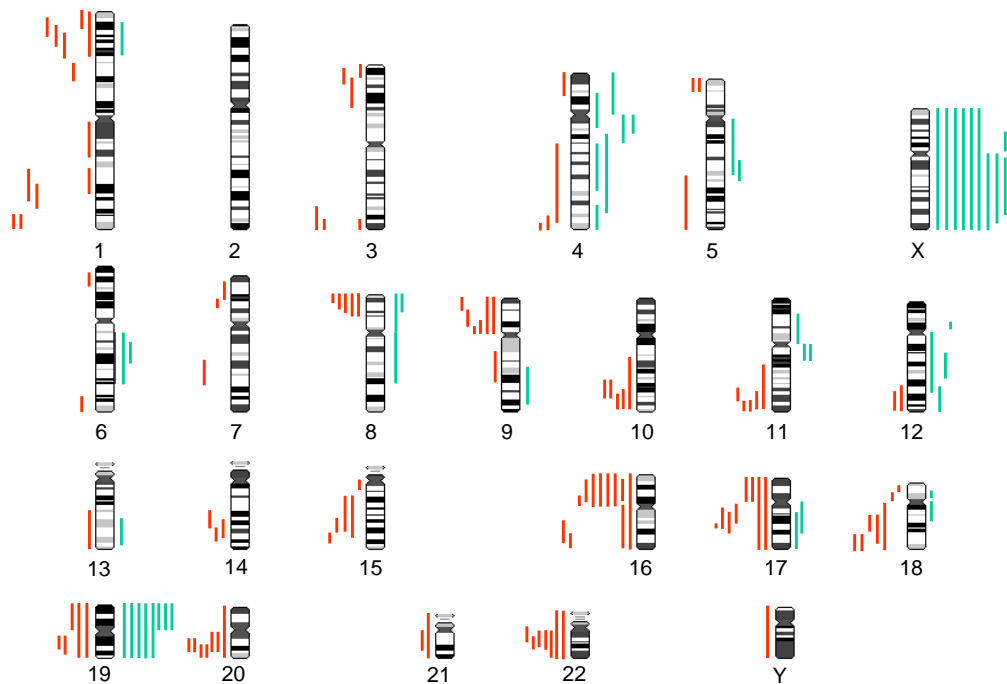
(A= Alter, G= Geschlecht, W= weiblich, M= männlich; rev ish enh= vermehrtes Vorliegen von chromosomalem Material in der CGH, rev ish dim= vermindertes Vorliegen von chromosomalem Material in der CGH)

Fall	A.	G.	CGH Ergebnisse
021	28	w	rev ish enh (6q14-q23, 12q14-q21), dim (16p, 17p)
025	31	m	rev ish enh (X); dim (5q23qter, 12q23qter, 11q14qter)
037	32	w	dim (18q11.2)
038	66	w	rev ish enh (4q11-q21)
041	43	m	rev ish enh (4q12-q13); dim (Y)
050	36	m	rev ish enh (4q21-q32, 8p, 8q11-q22, 12q11-q23, 18p11.2, 18q11-q12, X); dim (16p)
053	41	m	46, XY
054	28	w	dim (9p22pter, 10q25.3qter, 18q22qter)
056	64	m	rev ish enh (5q21-q22, 13q22-q33); dim (17, 19, 22)
057	34	w	46, XX
070	44	m	dim (10q25.1qter)
072	69	m	rev ish enh (4p, Xq); dim (1p32.3-p35, 12q23-q24.3, 16p11.1-p11.2, 17p, 19q13.1-q13.2, 20q13.1qter, 22q12.1-q13.2)
082	62	m	rev ish enh (12p11p-11.2; 19p, X); dim (1p34.1-p36.1, 4q22-q34, 7q22-q31.1, 10q22.2qter, 11q23.1-q23.3, 15q15-q25, 16p11.2-q13.2, 16q, 20q11.2-q13.2, 22q11.2qter)
084	46	m	rev ish enh (11p11.1-p14; Xq11.1-q24); dim (1p36.1pter, 10q24.3-q25.3, 12q24.1qter, 14q24.1q31, 15q25-q26.1, 16p, 17, 20q12-q13.2, 22q11.2-q13.2)
097	29	w	rev ish enh (11q11-q13.3); dim (1q31-q32.1, 5p15.1pter, 6p22.3-p24, 8p21.1pter, 15q22.3-q24, 16q23qter, 17q12q--21.3, 20q13.1qter, 22q11.2-q13.1)
101	34	m	rev ish enh (4p11p-15.1, 4q11-q13.1, 4q22-q28, 4q32qter, 5q11.1-q22, 6q14- q21, X); dim (1p36.1pter, 1q32.1-q41, 10q24.3-q25.3, 14q24.-q32.1, 16, 17q21.1-q24, 19, 20, 22q11.1-q12.3)
103	72	m	rev ish enh (X); dim (3p24.1-q25, 11q23.3qter, 16p, 17q12-q22, 20q11.2-q13.2)
110	53	m	Nicht auswertbar

**Tabelle 6.1: Fortsetzung: CGH- Ergebnisse pleomorphe Adenome (N= 31)**

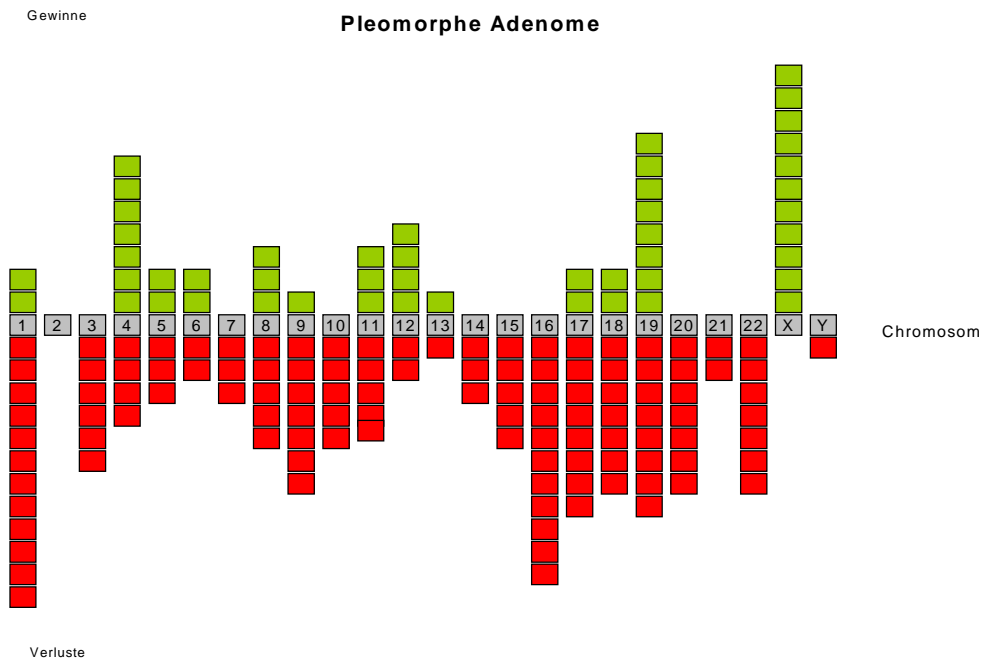
115	45	w	rev ish enh (19p); dim (3q25.3qter, 8p23.1pter, 17q22)
125	75	m	dim (1p31.1pter, 1q12-q23, 1q31-q32.1, 3p21.3-p24.1, 7p14-p15.1, 9q21-q34.1, 15q15-q24, 16p11.2-p13.2, 16q13-q23, 18q12.3-q22, 19q13.1q-13.3, 20q12-q13.2, 22)
127	73	m	rev ish enh (19, Xp11.2-p21.1, Xq11.1-q26); dim (8p21.1pter, 9p, 11q24qter, 18q12.3-q21.3)
136	58	m	dim (8p22pter, 11q24qter, 18p11.1-p12, 19p)
141	48	w	46, XX
143	42	m	rev ish enh (Xq11.1-q27)
154	39	m	rev ish enh (17q21.1q25, 19); dim (4p15.1pter, 6q25.2qter, 7p15.3p21, 9p11p13, 15q11.1q13)
155	56	m	rev ish enh (1p32.3-p36.1, 9q22.2-q34.1, 11q11-q13.3, 17q11.1-q23, 19) dim (1q43qter, 3p24.3pter, 3q28qter, 4q34qter, 5p15.2pter, 8p21.3pter, 9p, 13q21.3qter, 18q, 21)
160	32	w	rev ish enh (19)
161	75	w	46, XX
182	37	m	rev ish enh (19, X); dim (1q43qter, 4q35qter, 9p11-p12, 9p13-p22, 18q22qter, 21q11-q22.1)
187	45	w	rev ish enh (8p21.3pter); dim (1p22.3-p31.3, 3q28qter)
189	41	m	rev ish enh (19p); dim (14q22-q24.2)

In *Abbildung 6.1* sind in Form einer Übersicht alle gefundenen Veränderungen der untersuchten pleomorphen Adenome dargestellt. Chromosomale Gewinne sind auf der rechten Seite und chromosomale Verluste auf der linken Seite des jeweiligen Chromosoms dargestellt. Lagen bei einem Tumor mehrere Veränderungen auf demselben Chromosom vor, die sowohl den p- als auch den q-Arm betrafen, so wurden diese, obwohl in der Tabelle getrennt, hier als ein Balken dargestellt (betrifft Fall 050 an #8 und Fall 101 an #4). So kann man anhand der Graphik erkennen, welche chromosomalen Abschnitte im Gesamttumorkollektiv häufig und welche eher selten betroffen sind.



**Abbildung 6.1: Ideogramm der chromosomalen Aberrationen in 31 pleomorphen Adenomen, die mittels CGH-Analyse detektiert wurden (rote Balken links: Verluste, grüne Balken rechts: Gewinne)**

Die nachfolgende *Abbildung 6.2* gibt einen Überblick über die relative Häufigkeit von Gewinnen und Verlusten bei den untersuchten pleomorphen Adenomen.



**Abbildung 6.2: Relative Häufigkeit von Gewinnen (grün) und Verlusten (rot) bei 31 untersuchten PA mit der Methode der CGH. Jedes Kästchen steht hierbei für eine detektierte chromosomale Veränderung**

Bei den 31 untersuchten pleomorphen Adenomen waren bis auf das Chromosom 2 alle Chromosomen mit mindestens 2 bis maximal 13 Veränderungen betroffen. Insgesamt konnten wir 155 Veränderungen nachweisen, davon 46 Gewinne und 109 Verluste.

### 6.1.2 Chromosomale Veränderungen bei Warthin-Tumoren

Die bei den 30 untersuchten Warthin-Tumoren gefundenen Veränderungen sind in *Tabelle 6.2* aufgelistet. Von den insgesamt 149 quantitativen Veränderungen waren 94 Verluste und 55 Gewinne festzustellen. Drei der 27 analysierten Neubildungen zeigten keine chromosomale Aberration.

**Tabelle 6.2: CGH- Ergebnisse Warthin-Tumoren (N= 30)**

A= Alter, G= Geschlecht, W= weiblich, M= männlich; rev ish enh= vermehrtes Vorliegen von chromosomalem Material in der CGH, rev ish dim= vermindertes Vorliegen von chromosomalem Material in der CGH)

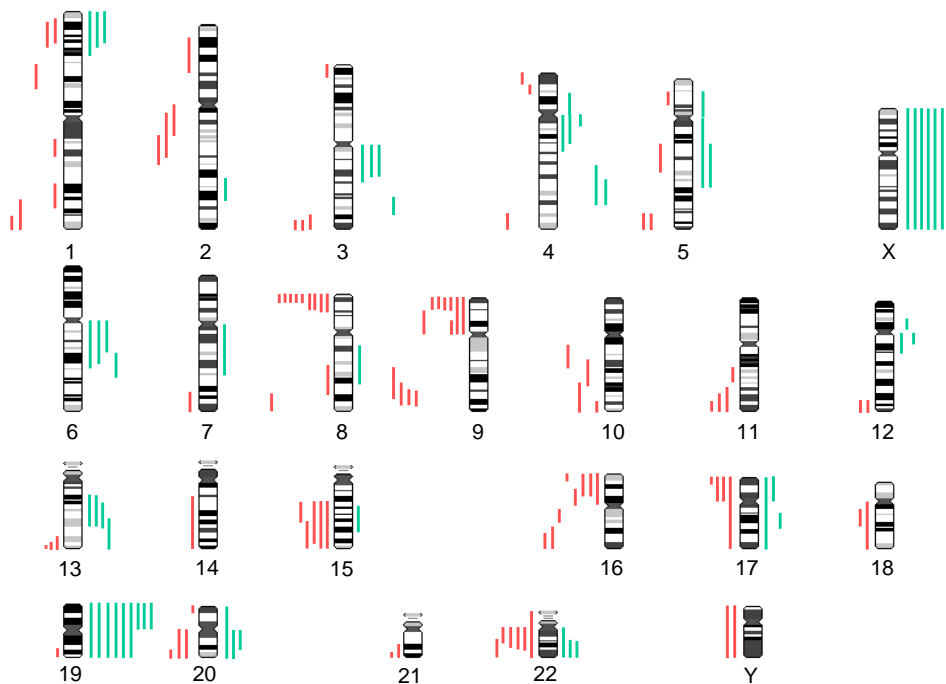
Fall	A	G	CGH Ergebnisse
033	75	w	rev ish enh (3q11-q21, 4q28-q31, 6q11-q16, 12q11-q13); dim (22q11-q12)
036	56	w	rev ish enh (3q11q-13.3, 4q26-q31.3, 8q13-q22, 13q14-q22)
043	58	w	46, XX
045	58	m	rev ish enh (5q14-q23, 6q21-q22)
048	50	m	rev ish enh (13q22qter)
055	53	m	46, XY
058a	58	m	rev ish enh (Xq); dim (Y)
058b	58	m	dim (4p15.1-p15.3)
064	50	m	dim (8q24.1qter, Y)
067	57	m	dim (5p14)
075	96	w	rev ish enh (4q11-q13.1, 12q11-q12); dim (1p33-p36.1, 16p11.1-p12)
078	61	w	rev ish enh (2q32.1-q33, 3q25.3-q26.3, 4p11-p14, 4q11-q21.3); dim (15q21.1-q22.3, 16p13.1pter, 22q11.1-q13.1)
088	62	m	rev ish enh (5p11-p14, 5q11-q23.3, 6q11-q22.1, X); dim (3p24.3pter, 5q34qter, 7q33qter, 8p23.1pter, 9q32q-34.1, 11q23.1qter, 12q24.2qter, 13q32qter, 15q21.1qter, 16p12pter, 16q23qter, 17, 18q, 19q13.3qter, 20q, 21q22.1qter, 22q12.2qter)
099	45	w	rev ish enh (3q11.2-q13.3, 4q11-q22, 6q12-q21, 13q14.3-q22); dim (8p23.1pter, 9q32-q34.1, 10q26.1qter, 11q23.3qter, 12q24.2qter, 14q21qter, 15q23qter, 16q22qter, 17p, 20q13.2qter, 22q11.1-q13.2)
100	64	m	rev ish enh (19p, X); dim (1p34.1-p36.2, 1q21.2-q23, 1q32.1-q41, 2p16-p23, 8p21.3pter, 8q21.3-q23, 9q22.1-q33, 10q22.1-q24.1, 11q14.1-q22.1, 15q21.1-q25, 16p11.2-p13.1, 18q12.1-q21.3, 20q, 22)
107	61	w	rev ish enh (7q11.1-q31.2, 10q21.2-q22.2, 13q14.1-q22); dim (1q41qter, 8p22pter, 16p)
108	80	w	rev ish enh (17q21.2-q22, 19); dim (5q34qter, 9p23pter, 13q34qter)

**Tabelle 6.2: Fortsetzung: CGH- Ergebnisse Warthin-Tumoren (N= 30)**

<b>126</b>	57	m	rev ish enh (X); dim (3q27qter, 4p16pter, 8p22pter, 9q31-q34.1, 16p12pter, 17p13pter, 21q22.3qter)
<b>133</b>	46	m	rev ish enh (19, X); dim (8p23.1pter, 9p23pter, 11q24qter)
<b>138</b>	63	m	rev ish enh (12p11-p12.1); dim (2q11.1-q14.3, 3q28qter, 8p21.3pter, 15q21.3qter, 22q11.1q12.3)
<b>140</b>	56	m	rev ish enh (19)
<b>149</b>	39	m	rev ish enh (19p, X); dim (2q12-q23, 8p23.1pter)
<b>153</b>	61	w	rev ish enh (15q21.2q24, 17, 19, 20q, 22q12.3qter); dim (2q21.1-q24.2, 8p23.1pter, 9p)
<b>157</b>	71	w	rev ish enh (1p33pter, 17p11pter, 19, 20q11.1-q13.1, 22q X); dim (9p22pter, 13q33qter, 20p13pter)
<b>158</b>	56	w	rev ish enh (1p32.3pter, 19p, 22q12.2qter); dim (3q28qter, 4q33qter, 5q14-q21, 9p11-p13, 9p23pter)
<b>159</b>	66	m	rev ish enh (1p34.1pter, 19, 20); dim (1q43qter, 9p)
<b>164</b>	56	m	dim (9p11-p21)
<b>190</b>	51	m	dim (1p22.1-p31.1, 10q24.3qter)
<b>193</b>	42	m	46, XY
<b>196</b>	64	w	dim (17p)

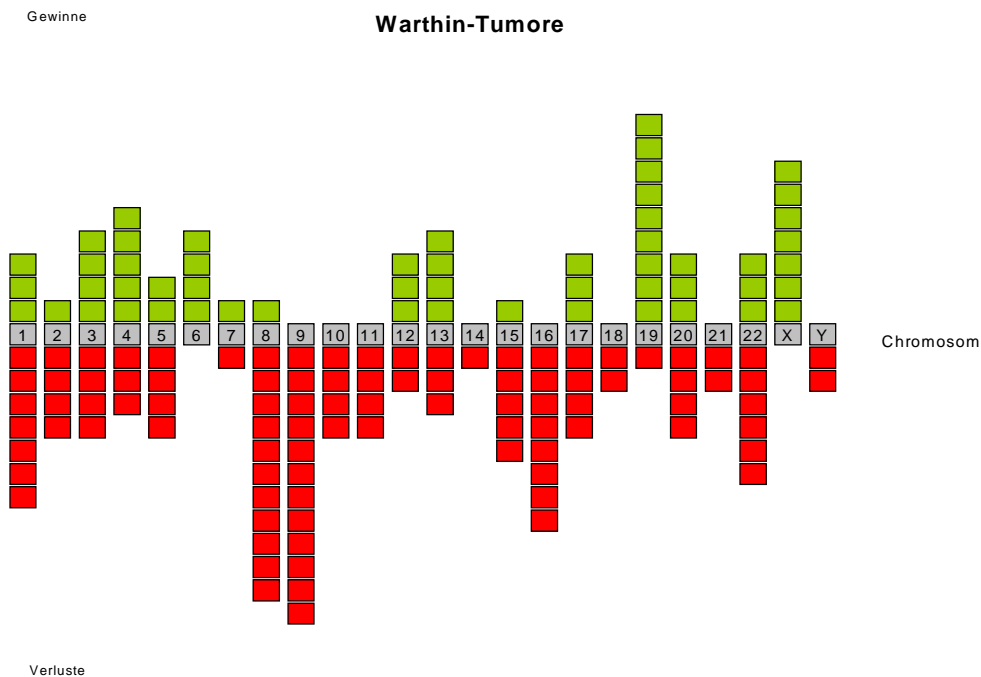


Eine Gesamtübersicht der bei Warthin-Tumoren mittels CGH-Untersuchung gefundenen chromosomalen Gewinne und Verluste gibt die Ideogramm-Darstellung in *Abbildung 6.3*. Auch hier sind die Veränderungen, die den p- und den q-Abschnitt des Chromosoms betreffen, nur als eine Veränderung dargestellt (betrifft Fall 078 an #4 und Fall 088 an #5).



**Abbildung 6.3: Ideogramm Warthin-Tumore rote Balken links: Verluste, grüne Balken rechts: Gewinne**

Die nachfolgende Graphik (*Abbildung 6.4*) zeigt wie bereits bei den pleomorphen Adenomen einen Überblick über die relative Häufigkeit von Gewinnen und Verlusten auf den jeweiligen Chromosomen. Alle Chromosomen wiesen mindestens 2 und höchstens 12 Veränderungen auf.



**Abbildung 6.4: Relative Häufigkeit der Gewinne (grün) und Verluste (rot) auf den einzelnen Chromosomen bei 30 untersuchten WT mit der Methode der CGH. (Jedes Kästchen steht hierbei für eine detektierte chromosomale Veränderung)**

### 6.1.3 Gewinne bei pleomorphen Adenomen

Gehäufte Gewinne wurden im Bereich des X-Chromosoms beobachtet. Das Chromosom X zeigte in unserer Untersuchung 6 komplette und 5 inkomplette Gewinne, die in *Tabelle 6.1* dargestellt sind. Ein Tumor wies Gewinne auf beiden Armen auf, insgesamt kamen bei 10 Tumoren (32%) Gewinne vor. Alle von uns untersuchten Fälle mit Gewinnen oder Verlusten auf einem Geschlechtschromosom wurden genauestens geprüft und mit dem Geschlecht der Referenz- und Chromosomen-DNA verglichen.

Auf #19 sind komplette Gewinne häufiger als Verluste, nämlich in 5 Fällen (16%). Auch isolierte Gewinne von 19p werden gehäuft beobachtet (3/31; 10%). Somit konnten in insgesamt 26% (8/31) Gewinne im Bereich 19p detektiert werden. In der vorliegenden Studie konnten außerdem in 7/31 (23%) der untersuchten Tumore

Gewinne auf Chromosom 4 nachgewiesen werden, davon betraf ein Tumor sowohl Anteile des kurzen als auch des langen Armes und wurde deshalb nur einmal gewertet. Es betrafen nur zwei Gewinne die Genregion 4p (6%), wohingegen auf der Region 4q sechs Gewinne (19%) detektiert werden konnten. Auf 17q kamen hingegen nur 2 Gewinne vor. Gewinne betrafen somit vor allem die Chromosomen 4, 19 und X.

### 6.1.4 Gewinne bei Warthin-Tumoren

Auch bei dieser Tumorart konnten, wenngleich seltener als bei den pleomorphen Adenomen, Gewinne auf #X (7 Fälle) nachgewiesen werden, davon war in 6 Fällen das komplette Chromosom X betroffen. Auffällig viele komplette Gewinne wies auch das #19 auf (6/30 Fälle, 20%). Zudem zeigten sich hier auch isoliert 3 Gewinne auf 19p, welches somit in insgesamt 30% verändert war. Ein kompletter Gewinn trat bei einem Fall bei #17 und #20 auf. Inkomplette Gewinne fielen insbesondere bei #4 (5/30, 17%) auf, wovon alle auf 4q lagen. Auch im Bereich der Genregionen 3q und 13q kam es in je 4 Fällen zu inkompletten Gewinnen (13%). Je 3 Gewinne betrafen die chromosomalen Regionen 20q und 22q (10%).

### 6.1.5 Verluste bei pleomorphen Adenomen

Die Region mit den meisten Verlusten liegt bei den pleomorphen Adenomen auf 16p. Auf dieser liegen in 8/31 Fällen entweder komplette oder teilweise Verluste vor, insgesamt sind 8 Tumore (26%) von partiellen 16p-Verlusten betroffen. In 7/31 Fällen (23%) ist die Region von 16p11.2p13.2 verändert, die Region 16p11.2 sogar in 8/31 Fällen (26%). Mit 23% (7/31 Fällen) recht häufig von einem Verlust betroffen ist auch 22q, bei allen 7 Tumoren liegen Veränderungen im Bereich 22q12.1q12.3 vor. Die Region 22q11.2q12.3 ist hingegen bei 6/31 Fällen verändert (19%). Am Chromosom 8 ist vor allem die Region 8p23.1pter mit 5/31 Fällen (16%) relativ häufig betroffen. Auch Verluste auf 9p kamen mit 6 Fällen mehrfach vor, insgesamt waren 5 Tumore betroffen (16%), einer davon mit 2 Veränderungen. Eine

spezielle Region lässt sich dort jedoch nicht abgrenzen. Auf 20p lagen in 7/31 Fällen Verluste vor, die alle die Region 20p13.1 betrafen (23%).

Das Chromosom 17 weist 10/31 (32%) weniger homogene, jedoch vielseitige Veränderungen auf, davon 4 Verluste auf 17p und 6 auf 17q.

Komplette Chromosomenverluste sind selten. Jedoch kommt es auf #16 in einem Fall zu Verlusten, auf #17 in zwei Fällen. Am #Y ist ebenfalls in einem Fall ein Verlust nachzuweisen. Genauso von kompletten Verlusten betroffen ist das Chromosom 20 sowie die beiden akrozentrischen Chromosomen 21 und 22 bei #20 und #21 in je einem und bei #22 in zwei Fällen. Auch bei #19 kommen in zwei der untersuchten Fälle komplette Verluste vor.

### 6.1.6 Verluste bei Warthin-Tumoren

Häufig veränderte Regionen der Warthin-Tumore liegen auf Chromosom 8p. In 9/30 Fällen (30%) kam es dort zu Verlusten im Bereich der Banden 8p23.1pter. Auf 9p kam es ebenfalls in 8 Fällen zu Verlusten, in 6 Fällen gezielt auf 9p23pter. Insgesamt waren 23% der Tumore betroffen, einer davon wies 2 Veränderungen auf 9p auf.

In 5 Fällen kam es zu Verlusten auf #15. Wie auch bei den pleomorphen Adenomen traten Verluste auf 16p auf (5 Fälle, 17%).

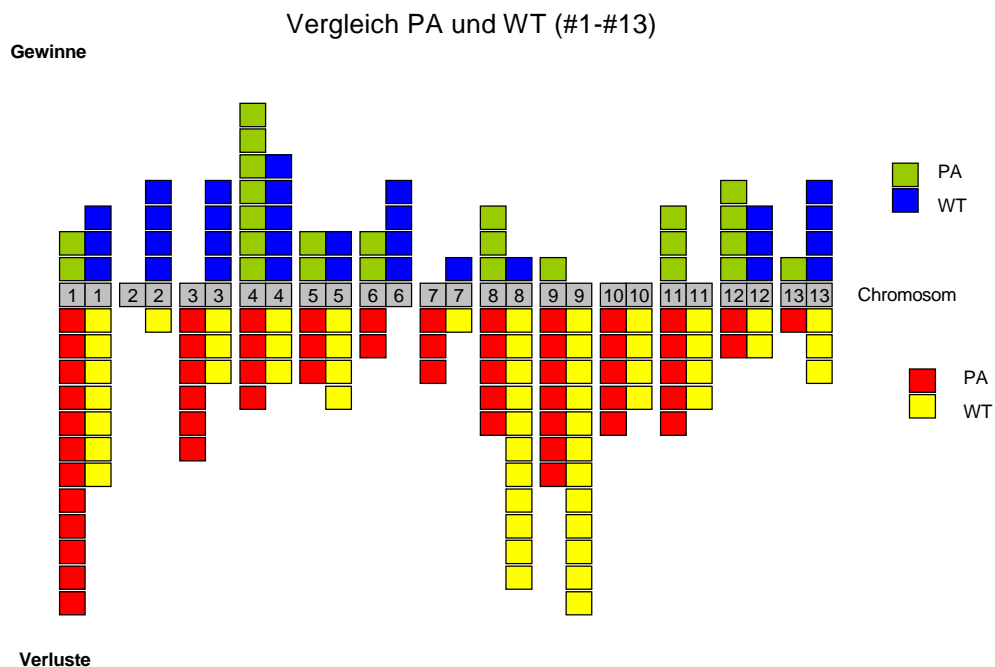
Auch auf #22 kam es in 6/30 Fällen (20%) zu Verlusten auf dem p-Arm, 5 Fälle (17%) betrafen die Region 22q11.1q12.2, bei allen waren die Banden 22q12.2q12.3. beteiligt. Ein Fall zeigte einen Verlust des gesamten #22. Die Region 17p zeigte in 4/30 Fällen Verluste, davon betraf einer das komplette Chromosom 17. Zwei komplette Verluste betrafen das Y-Chromosom.

Die Regionen 1q, 9q, 10q und 11q wiesen jeweils 4 Verluste in unterschiedlichen Regionen auf. Eine Konsensusregion konnte hier nicht ausgemacht werden.

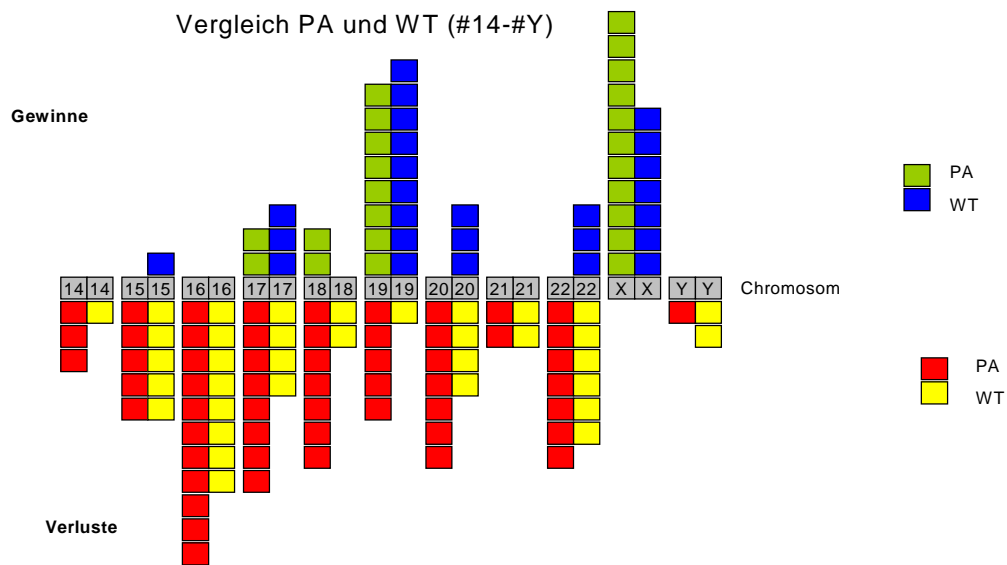
## 6.2 Vergleich der Ergebnisse der beiden Tumorgruppen

Die beiden nachfolgenden *Abbildungen* 6.5 und 6.6 geben einen Überblick über die relative Häufigkeit der einzelnen von Gewinnen und Verlusten betroffenen Chromosomen im Vergleich beider Tumorgruppen.

Veränderungen, die sowohl den kurzen als auch den langen Arm betrafen, wurden nur als eine Veränderung eingezeichnet.



**Abbildung 6.5: Vergleich der relativen Häufigkeit von Veränderungen bei PA und WT, #1-#13; grün: Gewinne PA, blau: Gewinne WT, rot: Verluste PA, gelb: Verluste WT**



**Abbildung 6.6: Vergleich der relativen Häufigkeit von Veränderungen bei PA und WT #14 bis #Y, grün: Gewinne PA, blau: Gewinne WT, rot: Verluste PA, gelb: Verluste WT**

### 6.2.1 Übereinstimmungen bestimmter Konsensusregionen beider Gruppen

#### *Gewinne:*

Auffallend ist die Übereinstimmung der Gewinne auf den Chromosomen X und 19. Bei den pleomorphen Adenomen waren es insgesamt 5 komplette Gewinne von #19 (16%) und insgesamt 8 Gewinne auf 19p (26%), bei den Warthin-Tumoren konnten sogar 6 komplette Gewinne von #19 (20%) und 9 Gewinne von 19p (30%) detektiert werden. Das Chromosom X wies jeweils in 6 Fällen komplette Gewinne auf sowie in 4 Fällen bei den PA und einem Fall bei den WT inkomplette Gewinne im Bereich Xq. Gewinne auf #4 konnten bei beiden Tumoren nachgewiesen werden, 7 bei den PA und 5 bei den WT, jedoch waren sie in beiden Fällen keiner übereinstimmenden Region zuzuordnen.

### *Verluste*

Bei beiden Tumorentitäten fällt auf, dass Verluste weitaus häufiger sind als Gewinne. Bei den pleomorphen Adenomen war vor allem die Region 16p in 8/31 Fällen (26%) von Verlusten betroffen. Veränderungen in dieser Region konnten auch bei den Warthin-Tumoren detektiert werden, jedoch waren diese mit 5/30 Fällen (17%) seltener. Auch Veränderungen im Bereich der bei den PA gefundenen möglichen Konsensusregion 16p11.2-p13.2 sind bei den untersuchten Warthin-Tumoren mit nur einem Verlust in der Genregion 16p11.2-p13.1, zwei Verlusten auf 16p12pter bzw. ebenfalls 2 Fällen mit Verlusten auf 16p11.2 weniger oft nachzuweisen.

Bei den Warthin-Tumoren ist das Chromosom 8, speziell 8p23.1-pter (30%, 9/30 Fälle) häufig verändert. Diese Veränderungen an 8p23.1-pter traten bei den PA mit 5/31 Fällen (16%) ebenfalls auf. Auch das Chromosom 22 wies bei beiden Tumoren häufig Verluste auf. Bei den WT kam es hier in 6 Fällen zu Verlusten von 22q12.2-q12.3 (20%), bei den PA waren es 7 Fälle, die im Bereich 22q12.1-q12.3 Verluste aufwiesen. Die mögliche Konsensusregion der PA stimmt also mit der der WT überein.

Bei beiden Tumorgruppen kamen Verluste auf 15p vor, bei den WT in 5/30 Fällen (17%), bei den PA in 5/31 Fällen (16%). Verluste im Bereich 17p kamen bei den PA und den WT in je 4 Fällen vor, von denen alle die Region 17p13 betrafen. Bei beiden Gruppen kam es zu kompletten Verlusten von #17, bei den PA in zwei Fällen, bei den WT in einem Fall. Beide Tumorgruppen beinhalteten Fälle mit dem Verlust des Y-Chromosoms. Bei den PA war es ein Fall, bei den WT zwei.

Beide Tumore wiesen diffuse Verluste am Chromosom 1 auf (WT 7/31; PA 12/31), die jedoch keiner übereinstimmenden Region zugeordnet werden können.

### 6.2.2 Unterschiede bestimmter Konsensusregionen beider Tumorgruppen

#### *Gewinne:*

Unterschiede treten vor allem bei den Gewinnen auf. So sind nur bei den WT je mindestens 2 Gewinne der Chromosomen 3, 11, 18, 20 und 22 und einer auf #9 nachzuweisen, wohingegen es bei den PA auf diesen Chromosomen nur zu Verlusten

kam. Bei den PA war der einzige Gewinn, der bei keinem der WT vorkam, auf dem #7 lokalisiert.

### *Verluste:*

Während bei den Warthin-Tumoren in 8 Fällen (23%) Verluste auf 9p detektiert werden konnten, in 6 Fällen gezielt auf 9p23pter als mögliche Konsensusregion, kamen bei den PA Veränderungen in dieser Region nur bei 3 Tumoren vor. Übereinstimmungen an Verlusten gab es jedoch im Bereich der Region 9p12 in je 4 Fällen (je 13%) bei beiden Tumoren.

Auffällig ist auch, dass bei den PA insgesamt 5 Verluste auf dem #19 detektiert werden konnten, wohingegen bei den WT nur ein Verlust von 19q festgestellt wurde. Bei den WT hingegen kamen zudem Veränderungen am Chromosom 2 vor (4 Verluste und 1 Gewinn), wohingegen bei den PA keine einzige Veränderung am #2 festgestellt werden konnte. Auch kamen nur bei den WT Gewinne auf 3p vor (4/30), bei den PA wurden dort nur Verluste nachgewiesen.

Auch 20p lagen in 7/31 Fällen bei den PA Verluste vor, die alle die Region 10p13.3 betrafen. Bei den WT war diese Region nur in 2 Fällen verändert, Verluste auf 20p kamen dort insgesamt nur in 3 Fällen vor.

### **6.3 Vergleich der CGH- und FISH-Ergebnisse bei PA**

Die von uns durchgeführte CGH-Untersuchung an pleomorphen Adenomen dient vor allem zur Eingrenzung möglicher Konsensusregionen für Tumorsuppressorgene oder Onkogene bei dieser speziellen Tumorentität. Die hier vorgelegten Befunde lassen die weitere Analyse der häufig veränderten Bereiche auf 16p, speziell auf 16p11.1-11.2, 8p, 9p (9p11p13), #X und #17 bei pleomorphen Adenomen sinnvoll erscheinen. Dazu wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Heike Meinelt in unserer Arbeitsgemeinschaft Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen an pleomorphen Adenomen durchgeführt. Aufgrund des häufigen Vorkommens an Verlusten auf 16p, Gewinnen an #X und Veränderungen auf #17 in der CGH wurden gezielt Sonden für diese Bereiche gewählt.



Die FISH-Analysen wurden mit Hilfe einer zentromerspezifischen X-Chromosomen-sonde sowie einer telomerspezifischen 16p-Sonde durchgeführt. Verluste des Chromosoms 17 und des Her-2/neu-Gens wurden mit Hilfe einer zentromerspezifischen Chromosom 17-Sonde analysiert, welche mit einer lokusspezifischen Sonde für das Her-2/neu-Gen kombiniert wurde. Es wurden in dieser Studie 21 pleomorphe Adenome untersucht, die mit den Ergebnissen unserer CGH-Untersuchung verglichen werden können.

Die nachfolgende Tabelle bietet einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der CGH und der FISH. Da nur bei 17 der untersuchten 21 Tumore CGH-Ergebnisse vorlagen, wurden nur diese erwähnt und in die *Tabelle 6.3* aufgenommen.

Die hervorgehobenen Sequenzen weisen auf eine Übereinstimmung der beiden Untersuchungen hin. Es wurden nur die 4 Regionen, die durch die FISH untersucht wurden (#X, 16p, #17 und Her-2-neu), in die Tabelle der CGH eingetragen. Die anderen Veränderungen werden in dieser Darstellung nicht berücksichtigt. Die grau gedruckten Ergebnisse lagen bei der FISH unter der berechneten Signifikanzgrenze, die durch eine Berechnung eines Mittelwerts und die Standardabweichung festgelegt wurde. Ab dieser Grenze können die Veränderungen erst als solche gewertet werden, darunterliegende Werte fallen noch unter die Normalverteilung.

**Tabelle 6.3: Vergleich der Ergebnisse FISH- CGH (N=17)**

Fall	A	G	FISH- Ergebnisse	CGH- Ergebnisse
021	28	W	- #X, -16p	-16p -17p
025	31	M	- #X, -16p	+ #X
056	64	M	- #X, -16p - #17, -Her2neu	<b>-#17</b>
057	34	W	- #X, -16p - #17, - Her2neu	46, XX
063	15	M	- #X, - <b>16p</b> - #17, - Her2neu	+ #X, - <b>16p12p13.1</b>
072	69	M	- #X, - <b>16p</b>	+Xq; - <b>16p11.1-p11.2</b> ; -17p
082	62	M	- #X, - <b>16p</b>	+ #X; - <b>16p11.2- p13.2</b>
084	51	M	- #X, - <b>16p</b>	+Xq11.1q24; - <b>16p</b> -#17
097	29	W	- #X, -16p - #17, -Her2neu	<b>-17q12q21.3</b>
101	34	M	- #X, - 16p - #17, -Her2neu	+ #X; <b>-#16</b> <b>-17q21.1q24</b>
115	45	W	- #X, -16p - #17 - Her2neu	-17q22
125	75	M	- #X, - <b>16p</b> - #17, -Her2neu	<b>-16p11.2p13.2</b>
127	74	M	- #X, -16p - #17, -Her2 neu	+Xp11.2p21.1; +Xq11.1q26
141	48	W	- #X, -16p	46, XX
143	42	M	- #X, -16p - #17, -Her2neu	+Xq11.1q27
154	39	M	- #X, -16p - #17, -Her2neu	+17q21.1q25
161	75	W	- #X, -16p - #17, -Her2neu	46, XX

A= Alter, G= Geschlecht, W= weiblich, M= männlich, fett gedruckt: Übereinstimmung, grau: unter Signifikanzgrenze in FISH

Alle von uns gefundenen Verluste von 16p konnten bei den 17 untersuchten Tumoren mittels FISH-Analyse bestätigt werden, in Fall 021 lagen die Verluste in der FISH jedoch unterhalb der Signifikanzgrenze. Die FISH-Analyse zeigte in 81% der untersuchten Fälle 16p-Verluste. Der Nachweis von Verlusten von 16p im Vergleich beider Methoden stimmt in 37,5% der Fälle überein, der von Her-2/neu in 20% und der von #17 nur in 6,7% der Fälle. Die von uns vielfach gefundenen Gewinne von #X konnten in der FISH-Untersuchung in keinem Fall bestätigt werden. Vielmehr lagen hier vor allem X-Verluste vor (14/21, 67%). Die restlichen Tumore wiesen Verluste unterhalb der Signifikanzgrenze auf.

## 7 Diskussion

### 7.1 Materialdiskussion

Ein Vorteil der CGH-Untersuchung besteht darin, dass das Untersuchungsmaterial wie zum Beispiel Tumorgewebe im Gegensatz zur klassischen Zytogenetik auch direkt, das heißt ohne vorangehende Kultivierung der Tumorzellen, untersucht werden kann. Dadurch können durch klonale Selektion in der Kultur entstehende Fehler verhindert werden. Auch können bereits archivierte Tumore nach entsprechender Lagerung noch Jahre später untersucht werden.

Ein Nachteil der Methode begründet sich im Tumormaterial selbst. Vor allem die pleomorphen Adenome, jedoch auch die Warthin-Tumore, weisen einen sehr heterogenen Gewebsaufbau auf. Aufgrund der Gewebsheterogenität kann nicht näher abgeschätzt werden, in welchem Ausmaß sich die einzelnen Gewebeproben der verschiedenen Tumore unterscheiden. Gelegentlich ist der Tumor mit bloßem Auge vom umliegenden Gewebe nicht genau abgrenzbar. Es ist also nicht auszuschließen, dass beim asservierten Tumorgewebe neben dem Tumorgewebe auch normales Parotisgewebe vorliegt, welches das Ergebnis verfälschen kann.

Auch kann das DNA-Gemisch Zellen unterschiedlicher Dignität enthalten, die in dem CGH-Experiment das Ergebnis in Richtung eines normalen Karyotyps verschieben können. Hierbei ist beispielsweise der sehr unterschiedliche Gehalt an Entzündungszellen und Stromazellen in verschiedenen Abschnitten des Tumors zu beachten. Enthält das DNA-Gemisch einen Anteil von mehr als 50% Normal-DNA, sind die dem Tumor zugrunde liegenden Veränderungen nicht mehr nachweisbar (Kallioniemi et al., 1994).

Der fehlende Nachweis von chromosomalen Veränderungen bei 4 PA und 3 WT in dieser Studie kann bereits in dieser methodischen Limitation begründet sein.

### 7.2 Methodendiskussion

#### 7.2.1 CGH-Auswertung

Die Methode der vergleichenden genomischen Hybridisierung erlaubt lediglich Aussagen über relative quantitative Veränderungen des genomischen Materials. Eine Vermehrung oder Verminderung des Gesamtgenoms (z.B. bei einem tetraploiden Chromosomensatz) ist damit nicht zu erkennen. Strukturelle Aberrationen, wie zum Beispiel Insertionen oder Translokationen, können mit dieser Methode ebenso wenig nachgewiesen werden. Auch der Nachweis von Punktmutationen oder sehr kleinen quantitativen Veränderungen ist nicht möglich, weshalb sich in diesem Zusammenhang schon sehr bald nach Einführung der CGH Technik die Frage nach der potentiell möglichen Auflösung stellte.

Die Auflösungsgrenzen der CGH sind für Gewinne und Verluste unterschiedlich. Verluste können höchstens zwei homologe DNA-Strukturen betreffen. Zugewinne hingegen können mehrere bis zahlreiche Kopien darstellen (Amplifikationen), wodurch ein höherer Kontrast und somit eine höhere Auflösung resultiert. Die kleinsten zu detektieren Deletionen werden in den meisten Veröffentlichungen mit 10-20 Mbp angegeben (Kallioniemi et al., 1992a; Kallioniemi et al., 1992b; Benz et al., 1995; Cremer et al., 1995; Benz et al., 1998), allerdings sind auch höhere Auflösungen bis hin zu 2Mbp beschrieben (Pieper et al., 1995; Forozan et al., 1997). Selbst unter optimalen Bedingungen ist eine Auflösung unter 2Mbp nicht möglich (Pieper et al., 1995). Bei DNA-Gewinnen sind Auflösungen bis zu 1Mbp beschrieben (Forozan et al., 1997). Bei einer vielfachen Amplifikation eines kleinen Bereichs, zum Beispiel eines Onkogens, erreicht die CGH bei sehr guter Hybridisierungsqualität eine Auflösung von 1Mbp (Forozan et al., 1997; Kirchhoff et al., 1999). Kallioniemi und Mitarbeiter beschreiben gar eine Auflösung bis hin zu 300kb (Kallioniemi et al., 1992b) und Joos et al. bis zu 90kb (allerdings bei einer 20-fachen Amplifikation) (Joos et al., 1993).

Verschiedene Abschnitte des Genoms müssen bei der Interpretation der Ergebnisse kritisch betrachtet werden. So sind heterochromatinreiche Regionen, wie das Zentromer oder die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen, von der Interpretation

auszuschließen. Zentromernahe Bereiche mit einem hohen Anteil an Heterochromatin wie auf 1q, 9q, 16q und #Y sowie die Telomerregionen weisen eine große interindividuelle Variabilität auf und zeigen große Schwankungen in den Hybridisierungen (Kallioniemi et al., 1994). Auch die Chromosomen bzw. -abschnitte 1p32-p36, 16p, #19 und #22 können aufgrund Ihres GC-Gehalts falsche Ergebnisse aufzeigen (Kallioniemi et al., 1994; Karhu et al., 1997). Kim et al. zählen auch 17p zu den Chromosomenabschnitten, die potentiell falsche CGH-Ergebnisse zeigen (Kim et al., 1995). Mohapatra und Mitarbeiter fanden dagegen bei direktmarkierter DNA keine Fehlhybridisierungen der oben erwähnten Chromosomenabschnitte (Mohapatra et al., 1997; Mohapatra et al., 1998).

Bei dieser Studie kamen bei beiden Tumorgruppen häufige Verluste auf 16 p vor und wurden bisher bei den PA bereits mittels FISH-Analysen bestätigt. Eine Bestätigung der gefundenen Veränderungen bei den WT steht noch aus. Die ebenfalls häufigen Verluste auf #22, speziell im Bereich 22q12.2-q12.3, stellen bei beiden Tumorarten eine mögliche Konsensusregion dar, müssen aber zur Verifizierung ebenfalls mittels weiterführenden Studien (z. B. FISH) bestätigt oder verworfen werden. Auch Verluste auf #19 waren häufig und bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

Die Kontrolle der CGH Experimente fand auf verschiedenen Ebenen statt. Zum einen wurden Testhybridisierungen durchgeführt. Bei der Hybridisierung von unterschiedlich markierter und detektierter Normal-DNA musste das Ratio-Profil möglichst exakt auf der Mittellinie verlaufen. Diese parallel zu den Fallexperimenten durchgeführten Testhybridisierungen kontrollierten die Hybridisierungsbedingungen sowie die Wasch- und Stringenzbedingungen. Mögliche Fehler im experimentellen Ablauf wurden durch diese Kontrollexperimente erkannt.

Die zweite, interne Kontrollmöglichkeit bildete die Hybridisierung der Geschlechtschromosomen bei unterschiedlichem Geschlecht der Tumor- und Kontroll-DNA. Da bei unseren Versuchen das Geschlecht der Referenz-DNA und der Chromosomenpräparate immer männlich war, war die Tumor-DNA der variable Faktor. Ist diese weiblich, kommt es zu einem Gewinn von X und Verlust von Y, ist sie hingegen männlich, zeigt sich ein Normalbefund. Bei der Auswertung wurde dieser Faktor stets berücksichtigt.

### 7.3 Ergebnisdiskussion

Neoplasien entstehen durch Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen. Gewinne oder Amplifikationen von genetischem Material sprechen für eine Beteiligung von Onkogenen. Der Verlust von Tumorsuppressorgenen hingegen ist mit chromosomalen Deletionen assoziiert und spielt bei der Entstehung menschlicher Tumore eine wichtige Rolle. Ursprünglich waren diese Phänomene nur bei Kolonkarzinomen beschrieben worden, später wurden sie auch bei vielen anderen Tumoren gefunden. Das Wissen um Art und Lokalisation der möglichen Tumorsuppressorgene und Onkogene eröffnet neue therapeutische und diagnostische Möglichkeiten und Erklärungen über die Tumorentstehung und deren Progression.

Die vergleichende genomische Hybridisierung ist eine Methode, die Gewinne oder Verluste zuverlässig aufdecken und bereits in einem einzigen Versuch eine Übersicht über das gesamte Genom geben kann. Mit der Fragestellung nach möglichen Konsensusregionen für Tumorsuppressorgene oder Onkogene wurde diese CGH an pleomorphen Adenomen und Warthin-Tumoren durchgeführt.

Trotz der Vielzahl an Studien zu diesen Tumoren liegen bisher nur zwei CGH-Untersuchungen an pleomorphen Adenomen vor. Die erste stammt von Toida und Mitarbeitern aus dem Jahre 2001. Es wurden in dieser Studie jedoch nur 2 PA untersucht (Toida et al., 2001). 2008 führten Giefing und Mitarbeiter eine CGH-Studie an 14 pleomorphen Adenomen und 15 Warthin-Tumoren durch, machten jedoch keine strikte Ergebnisstrennung, sondern behandelten beide Gruppen gleichwertig (Giefing et al., 2008). Unsere Studie ist somit die erste, die ein ausreichend großes Kollektiv pro Tumorentität behandelt, um mit der Methode der CGH aussagekräftige Ergebnisse über numerische Veränderungen an diesen beiden Tumorarten zu erhalten. So können weitere Grundlagen für das Verständnis der Neubildungen und deren Pathogenese sowie Tumorbilogie geschaffen werden.

Auffällig ist, dass die Mehrzahl der untersuchten Tumore zahlreiche Veränderungen aufweisen. Die Beobachtung von überwiegenden Verlusten kann darauf hinweisen, dass der Verlust von Tumorsuppressorgenen in der Pathogenese der Tumore wichtig ist.

In Bezug auf das Geschlecht wichen unsere Ergebnisse etwas von der Statistik ab. So war das Verhältnis von Männern zu Frauen bei den 31 untersuchten pleomorphen Adenomen ungefähr 2:1 (20:11). Üblicherweise dominiert das weibliche Geschlecht mit ca. 59%. Der Altersgipfel lag hier bei 48 Jahren, was mit den durchschnittlich ermittelten Daten anderer Studien übereinstimmt. Diese beschreiben ein Auftreten im 4.-6. Lebensjahrzehnt. Bei den Warthin-Tumoren war das Verhältnis von Männern zu Frauen 3:2 (18:12) (in anderen Studien 3:1). Der Altersgipfel lag hier bei 59 Jahren. Damit lag er nur minimal unter dem beschriebenen Auftreten zwischen der 6.-7. Dekade. Diese Differenz in den Untersuchungsergebnissen mag Folge zahlreicher Faktoren wie Fallauswahl und verschiedener Kulturereignisse sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das Kollektiv nicht ausreichend groß war, um in diesem Bereich aussagekräftige Zahlen zu liefern.

Die zytogenetische Untersuchung von pleomorphen Adenomen ist schon seit 1980 Thema diverser Studien (Mark et al., 1980; Bullerdiek et al., 1987; Mark et al., 1989; Bullerdiek et al., 1993; Mark et al., 1997). Die meisten mittels Zytogenetik durchgeführten Untersuchungen wiesen eine hohe Zahl an strukturellen Aberrationen auf. Chromosomale Analysen ergaben häufige charakteristische Translokationen der Chromosomen 3p, 8q und 12q. Die Translokationen  $t(3;8)(p21;q12)$  und  $t(9;12)(p21;q13-15)$  gelten als die Häufigsten. Gewinne oder Verluste von genetischem Material wurden bisher seltener erwähnt. Die durch die Translokationen veränderten Chromosomen scheinen von großer Bedeutung für die Entstehung dieser Tumore zu sein. Wahrscheinlich enthalten die betroffenen Regionen Onkogene und Tumorsuppressorgene, die durch die Translokation an transkriptionsfähigen chromosomalen Regionen aktiviert werden und dadurch ihren Beitrag zur Tumorgenese leisten. Translokationen können allerdings mit der Methode der CGH nicht nachgewiesen werden, weshalb in den folgenden Kapiteln vor allem auf Gewinne und Verluste eingegangen wird.

Es fällt auf, dass in unserem Kollektiv bis auf das #2 bei den PA alle Chromosomen von Veränderungen betroffen sind und dass die Verluste gegenüber den Gewinnen



überwiegen. Am häufigsten traten bei den PA Verluste der chromosomalen Regionen 16p11.2 und 22q12.1-q12.3 auf. Auch auf 8p23.1-pter und 9p kam es zu Verlusten.

Die häufigsten Verluste bei den Warthin-Tumoren lagen auf 8p23.1-pter, 9p23pter und 22q12.2-q12.3.

Da Verluste dieser Regionen im Gegensatz zu den anderen Veränderungen überdurchschnittlich häufig auftraten, gehen wir von einem Verlust von TS-Genen innerhalb dieser möglichen Konsensusregionen aus.

Knuutila und Mitarbeiter fassten in ihrem Review 73 verschiedene Tumorentitäten zusammen, die mittels CGH auf Verluste der Kopienzahl untersucht worden waren (Knuutila et al., 1999). Die häufigsten Verluste traten in auf 9p23-p24, 8p23, 16q22 und 22q12 auf. Die Beobachtung eines gehäuften Verlustes von 16p11.2 bei pleomorphen Adenomen ist vor diesem Hintergrund bemerkenswert. Die Suche nach Verlusten von Tumorsuppressorgenen in diesem chromosomalen Abschnitt erscheint daher besonders interessant. Die LOH von #8p, #9p und #22q stimmen in der Lokalisation in etwa mit den von uns gefundenen Konsensusregionen überein.

Problematisch ist, dass bisher nur sehr wenige Studien zu diesem Thema vorliegen, welche einen Vergleich mit bisher gefundenen Veränderungen zulassen. Vor allem bei den Warthin-Tumoren gibt hierzu nur sehr wenig Literatur, weshalb hier auch auf potentielle Kandidatengene anderer Tumore eingegangen wird. Die häufig veränderten chromosomalen Regionen werden im Folgenden diskutiert.

### 7.3.1 Veränderungen auf Chromosom 3

Häufig sind Translokationen im Bereich 3p21 oder seltener 3p21-p27 beschrieben. Auf 3p21-pter wurde das Kandidatengen c-erbA-2 (Her-2/neu) lokalisiert, auf 3p35 c-raf. Diese Gene sollen an der Progression von PA beteiligt sein (Sahlin et al., 1994). Wir konnten keine Verluste in diesen Regionen nachweisen. Möglicherweise werden diese Gene nur durch Translokationen und nicht durch Gewinne aktiviert.

### 7.3.2 Verluste von 8p und mögliche Konsensusregionen

Eine häufige Veränderung beider Tumorgruppen war die Deletion von 8p, insbesondere der Region 8p23.1-pter. Bei den Warthin-Tumoren ist die Region 8p23.1-pter (30%, 9/30 Fälle) häufig verändert. Diese Veränderungen an 8p23.1-pter traten bei den PA mit 5/31 Fällen (16%) ebenfalls auf.

Verluste von 8p sind in der Literatur in Bezug auf Speicheldrüsentumoren bisher nur selten erwähnt worden, unter anderem bei einem PA (Camuto et al., 1988). Bei Mark und Mitarbeitern kam in der zytogenetischen Untersuchung von 8 WT nur ein WT mit einem Verlust von #8 vor (Mark et al., 1990). Gillenwater und Mitarbeiter fanden in ihrer Untersuchung an PA im Bereich von 8p LOH von nur 8%. Weitaus häufiger betroffen war dort die Region 8q (47%) (Gillenwater et al., 1997). Das stimmt ungefähr mit den Ergebnissen von Johns und Mitarbeitern überein (Johns et al., 1996). Auch bei adenoid-zystischen Karzinomen wurde ein LOH auf 8p beschrieben (Yamamoto et al., 1996). Auch Giefing und Mitarbeiter beschrieben nur bei jeweils einem PA einen Verlust im Bereich 8p23.pter bzw. 8q (Giefing et al., 2008).

Bei anderen Tumoren wurden Verluste bzw. LOH von 8p sehr häufig erwähnt, vor allem bei Prostata- und Mammakarzinomen, hepatozellulären Karzinomen, Kolon- und Lungenkarzinomen, Blasenkarzinomen, oralen Plattenepithelkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf-und-Halsbereichs (el-Naggar et al., 1998; Kurimoto et al., 2001; Armes et al., 2004; Stoehr et al., 2004; Lu et al., 2006; Steinemann et al., 2006; Lassmann et al., 2007). Zu Verlusten dieser Art kommt es auch bei B-Zell- und Mantelzell-Lymphomen (Martinez-Climent et al., 2001; Rubio-Moscardo et al., 2005), sowie Ovarial- und Zervix-Karzinomen (Lassus et al., 2001; Bhattacharya et al., 2004). Auch in Bezug auf Magen- und Gallenblasenkarzinome sowie Medulloblastome wurde ein Verlust von 8p erwähnt. Auf 8p sind bereits zahlreiche Kandidatengene für die Entstehung der unterschiedlichen Karzinome beschrieben worden. Bei den Mammakarzinomen sind es v.a. die möglichen TS-Gene MTUS1, PCM1, DUSP4/MKP-2, NKX3A, DLC1 und SFRP1 (Armes et al., 2004; Venter et al., 2005; Frank et al., 2007).

Auch bei den Prostata-Karzinomen wurden zahlreiche Genregionen identifiziert, auf denen mögliche TS-Gene liegen könnten. Gehäuft kamen dort Deletionen zwischen 8p23.1 und 8p21.3 vor und bei high-grade Tumoren war ein LOH von 8p22-23.2 häufig (Lu et al., 2006; Chang et al., 2007). Hierbei besteht eine Korrelation zwischen bestimmten Veränderungen und dem Malignitätsgrad. Deletionen von 8p22-p21.3 könnten eine Rolle in der Tumordifferenzierung spielen, wohingegen Deletionen von 8p21.1-p21.2 zur Tumorprogression beizutragen scheinen (Oba et al., 2001).

Bei den hepatozellulären Karzinomen scheint sich ein Tumorsuppressorgen auf 8p21.3-p22 zu befinden. Das Platelet-derived growth factor beta-like tumor suppressor gene (PRTL5) liegt in dieser Region und könnte eine wichtige Rolle in der frühen Hepatokanzerogenese spielen (Kahng et al., 2003). In der selben Region befindet sich auch das dynein light chain Gen (DLC1), welches bei Lebertumoren häufig deletiert ist (Knuutila et al., 1999). Auch ATIP/MTUS1 auf 8p22 ist ein Kandidat für ein mögliches TS-Gen und HTPAP auf 8p12 scheint ein neues metastatisches TS-Gen für HCC zu sein (Wu et al., 2006).

Bei oralen Plattenepithelkarzinomen sind 2 Regionen besonders häufig verändert, nämlich 8p12 und 8p22. Auf 8p22 liegt ein potentiell TS-Gen für die Entstehung dieser Tumore, nämlich FEZ/LZT1 (Ono et al., 2003). Auch MTUS1 auf 8p21.3 oder 8p22 gilt als Kandidaten-TS-Gen für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Ye et al., 2007).

Bei den kolorektalen Karzinomen wurde eine colorectal cancer-suppressor-Region (CSCR) auf 8p22-23.1 identifiziert. Das dort liegende Kandidatengen KIAA1456 wird als potentiell TS-Gen gesehen (Flanagan et al., 2004). Es kommen außerdem Amplifikationen im Bereich von E2F5 (8p22-q21.3) vor (Lassmann et al., 2007).

Bei den Blasen Tumoren ist die am häufigsten von einem Verlust betroffene Region ebenfalls 8p22. Verluste der Region von 8p23.3 korrelieren mit dem Tumorgrad (Muscheck et al., 2000). Der tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-Rezeptor 2 (TRAIL-R2), auch TNFRSF10B genannt, ist ein vielversprechendes Kandidatengen auf 8p21-22, dessen Mutationen bereits bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Mammakarzinomen, Plattenepitheltumoren des Kopf-Hals-Bereichs und Non-Hodgkin-Lymphomen gefunden wurden (Adams et al., 2005).

Der Verlust von 8p21-23 scheint ein früher und häufiger Schritt in der Karzinogenese von Lungentumoren zu sein, dessen Häufigkeit jedoch mit zunehmender Metastasierung steigt (Kurimoto et al., 2001). Auch bei diesen Tumoren besteht ein Zusammenhang mit dem FEZ1/LZTS1 Gen auf 8p22, das auch bei Prostata-, Ösophagus-, Magen-, Blasen- und Mammakarzinomen als Kandidatengen gilt und welches das Wachstum von Tumorzellen unterdrückt und die Mitose reguliert (Nonaka et al., 2005).

Fast alle genannten TS-Gene liegen in der Region um 8p22-23. Diese Region scheint demnach eine wichtige Rolle für die Karzinogenese zu spielen. Möglicherweise ist an der Entstehung von Parotistumoren ebenfalls das FEZ1-Gen beteiligt, da dessen Verlust zu Tumorwachstum und Fehlregulationen der Mitose führt, was grundlegende Voraussetzungen für die Tumorentstehung schafft. Dieses Gen wird bei 60% der epithelialen Tumore nicht mehr exprimiert (Ishii et al., 1999). Die bei uns häufiger deletierte Gensequenz befand sich allerdings distal davon auf 8p23.1-pter. Welches TS-Gen für die Entstehung der Parotistumore ursächlich ist, kann anhand der vorliegenden Studien nicht erörtert werden. Um diese Fragestellung zu klären, bedarf es weiterführender Untersuchungen der gefundenen Gensequenzen. Es darf jedoch berechtigt angenommen werden, dass sich auf 8p tumorrelevante Gene befinden.

### 7.3.3 Verluste von 9p und mögliche Konsensusregionen

Bei den Warthin-Tumoren kam es auf der chromosomalen Region 9p in 8 der Tumoren (26%) zu Verlusten, in 6 Fällen (20%) gezielt auf 9p23pter. Auch bei den pleomorphen Adenomen kamen Verluste auf 9p mit 7 Fällen mehrfach vor, da aber 2 Veränderungen bei einem Tumor gefunden wurden sind insgesamt nur 16% aller Tumore betroffen. Eine spezielle Region lässt sich dort jedoch nicht abgrenzen.

Wir konnten in 3 Fällen (10%) der PA und 3 der WT (10%) Verluste im Bereich von 9p21 nachweisen. Ein LOH von 9p21 wurde bisher nur bei Speicheldrüsenkarzinomen, nicht jedoch bei CXPA beobachtet (Fowler et al., 2006). Johns und Mitarbeiter beschrieben einen Verlust von 9p in 3/3 CXPA, wohingegen sie bei den benignen PA nur Verluste von unter 10% nachweisen konnten (Johns et al., 1996).

Bei el-Naggar und Mitarbeitern traten bei 11 untersuchten PA keine LOH von 9p auf (el-Naggar et al., 1997). Ein LOH des Interferon A-Gens auf 9p21-p22 konnte bei CXPA nicht nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1996). 16% der untersuchten PA wiesen einen Verlust der Region von p16 auf 9p21 auf (Poetsch et al., 2005).

In der Region 9p21 befindet sich das Tumorsuppressorgen, CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), welches für den Inhibitor des Zellzyklus, p16 (INK4A), kodiert. Verluste in diesem Bereich umfassen und inaktivieren das benachbarte Gen CDKN2B (p15), welches ähnliche Funktionen wie CDKN2A hat. In vielen Primärtumoren wurde eine hohe Anzahl an Deletionen dieses Gens beschrieben. Homozygote Verluste bilden den Hauptmechanismus der Inaktivierung dieser Gene. Keimzell-Alterationen von CDKN2A wurden bei Patienten mit familiären Melanomen häufig dargestellt, weshalb dieses Gen als das initiiierende Gen für diese Tumore gilt. Deletionen dieses Gens wurden zudem bei einigen Studien über akute lymphoblastische Leukämie als ungünstiger prognostischer Faktor bezeichnet und waren mit einer schlechten Remissionsrate assoziiert (Knuutila et al., 1999). 29% der untersuchten PA zeigten Alterationen, meist Methylierungen, an INK4a-ARF (Weber et al., 2002). Auch Mikrosatelliteninstabilitäten in diesem Bereich wurden in 1 PA gefunden (Suzuki und Fujioka, 1998). Häufige LOH (77%) auf 9p21 kommen bei Speicheldrüsenkarzinomen vor (Cerilli et al., 1999).

Die häufigsten mit CDKN2A assoziierten Tumore sind Lungentumore, maligne Melanome, Hirntumore, Plattenepithelkarzinome, Pankreaskarzinome, Blasen- und Mesotheliome (Murthy und Testa, 1999; Simon et al., 1999; van Tilborg et al., 1999; Pollock et al., 2001; Sato et al., 2005; Worsham et al., 2006; Salek et al., 2007). Bei allen diesen Tumoren wurden hohe Raten an LOH von 9p beschrieben. Möglicherweise ist auch im Fall der Parotistumore, speziell der Warthin-Tumore, die Deletion dieses Gens verantwortlich oder mitverantwortlich für das Entstehen dieser Tumore, was u.a. die Studie von Poetsch und Mitarbeitern nahe legt (Poetsch et al., 2005). Verluste im Bereich von CDKN2A konnten jedoch in der vorliegenden Untersuchung nur in je drei Fällen beobachtet werden. Giefing und Mitarbeiter beschrieben keine Verluste auf 9p (Giefing et al., 2008).

Ein anderes, in vielen Tumoren vorkommendes TS-Gen ist MTS1/CDK4 (multiple tumor suppressor 1/cyclin dependent kinase 4 inhibitor) auf 9p, welches einen

Inhibitor (p16) der Cyklin-abhängigen Kinase 4 darstellt. Deletionen des MTS1-Gens wurden häufig im Zusammenhang mit Tumoren der Lunge, der Brust, des Gehirns, der Knochen und der Haut sowie Blasen-, Nieren-, Ovarialkarzinomen und Lymphomen genannt. Die Beobachtung von MTS1 in Bezug auf die Pathogenese von Parotistumoren ist eine sinnvolle Forschungsintention. Auf der Region 9p23, die bei dieser Studie die meisten Verluste aufwies, befindet sich der protein tyrosine phosphatase receptor type D (PTPRD), der bei Lungentumoren häufig deletiert ist. Ob dieser auch bei den Parotistumoren von Bedeutung ist, muss in weitergehenden Studien untersucht werden.

### 7.3.4 Veränderungen auf 12q und Unterschiede zu den Vorergebnissen

Die vielfach bei PA beschriebenen Verluste auf 12q konnten in der vorgelegten Untersuchung nicht bestätigt werden. So wurden nur bei 2 der 31 PA (6%) Deletionen im Bereich von 12q24-qter detektiert. Eine entsprechende Häufigkeit wurde auch bei den WT (2/30; 7%) beobachtet. In der CGH von Giefing und Mitarbeitern wurden bei 12/29 Tumoren (14 PA und 15 WT) Verluste auf 12q24.2 gefunden. In dieser Region befindet sich das Harakiri-Gen (BCL2-Gen), ein Apoptose-Aktivator-Gen als potentiell TSG bei Speicheldrüsentumoren (Giefing et al., 2008). Johns und Mitarbeiter beschrieben LOH von 12q, welche 35% aller PA betrafen (Johns et al., 1996).

Von el-Naggar und Mitarbeitern wurden Deletionen auf 12q23-qter bei PA und den benignen Anteilen von CXPA bei insgesamt 28% der Tumore beobachtet. Bei den karzinomatösen Anteilen der CXPA kamen sie in 39% vor (el-Naggar et al., 2000). Auch Poetsch und Mitarbeiter berichteten in 32% über Verluste von 12q bei pleomorphen Adenomen, vor allem in der Region auf 12q23-q24.1. (Poetsch et al., 2005). Verluste dieser Sequenzen wurden bereits bei Magen- und Pankreas-karzinomen beschrieben. Ein potentiell TS-Gen ist die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) auf 12q23.3 oder das neu gefundene Gen TU12B1-TY, welches bei Pankreas-tumoren eine reduzierte Expression aufweist. Die divergierenden Ergebnisse sind möglicherweise durch die unterschiedlichen angewandten Untersuchungstechniken (LOH versus CGH) bedingt.

Auf 12q13-15 ist HMGA2 (früher HMGIC) lokalisiert, welches bei den PA eines der am häufigsten durch ein Rearrangement betroffenen Gene darstellt, z.B. HMGIC-PLAG1 oder HMGIC-FHIT und meist durch balancierte chromosomale Translokationen entsteht (Morio et al., 2002).

Ein bereits identifiziertes Kandidatengen auf #12 ist GLI, eine humane Gensequenz, welche auf der Region 12q13-14.3 lokalisiert ist. Es wurde gezeigt, dass dieses für ein Zinkfingerprotein mit einer bestimmten Gensequenz kodiert und dass das GLI-Genprodukt zur Kruppelfamilie gehört. Das bedeutet, dass das Gen DNA-bindende Eigenschaften besitzt und die Regulierung der Transkription beeinflussen kann (Kinzler et al., 1988). Da das Gen bereits mit PA, Lipomen, myxoiden Liposarkomen und uterinen Leiomyomen in Verbindung gebracht wurde und auch bei Gliomen und in embryonalen Karzinomzelllinien nachgewiesen werden konnte, werden diesem Gen die Fähigkeiten eines Onkogens zugesprochen (Arheden et al., 1989). Wir konnten keine Veränderungen nachweisen, die einen Hinweis auf die Bedeutung dieses Gens geben.

### 7.3.5 Gewinne auf Chromosom 13

In der CGH von Giefing und Mitarbeitern fielen bei den untersuchten 14 PA und 15 WT gehäuft Gewinne von 13q, speziell der Region 13q22.1-22.2, auf (13/29) (Giefing et al., 2008). Wir konnten hingegen nur bei einem PA und bei 3 der WT Gewinne in diesem Bereich feststellen. Giefing und Mitarbeiter sehen einen Zusammenhang zu den KLF5 und KLF12-Genen, die in dieser Region lokalisiert sind. KLF5 ist ein Gen, das häufig bei akuter lymphatischer Leukämie exprimiert wird. Es reguliert in Interaktion mit TP53 die Expression von Survivin, einem Onkogen, das bereits bei vielen menschlichen Tumoren nachgewiesen werden konnte. Dieses Onkogen inhibiert die Apoptose und spielt eine Rolle bei der Regulation der Mitose (Ambrosini et al., 1997; Zhu et al., 2006). Qi und Mitarbeiter fanden signifikante Unterschiede in der Survivin-Expression von benignen und malignen Speicheldrüsentumoren (Qi et al., 2007). Survivin könnte ein wichtiges Onkogen speziell in späten Phasen der Karzinogenese wie der Transformation von

benignen zu malignen Tumoren sein. Diesen Zusammenhang konnten wir mit unseren Ergebnissen jedoch nicht bestätigen.

### 7.3.6 Verluste von 16p und mögliche Konsensusregionen

Die von uns sehr häufig gefundenen Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 wurden auch in der CGH-Studie von Giefing und Mitarbeitern beschrieben. Diese unterschieden jedoch nicht zwischen WT und PA, so dass über die jeweilige Häufigkeit keine Zahlen vorliegen. Insgesamt kam es bei den 29 untersuchten Tumoren jedoch in 19 Fällen zu Verlusten auf 16p, in 5 Fällen zu einem kompletten Verlust von 16p. Häufige Verluste betrafen die Region 16p12 (59%). In 14 Fällen lag ein Verlust der Region 16p11.2 vor (48%) (Giefing et al., 2008). Auch Toida et al. beschrieben in ihrer CGH an 2 PA Studie in beiden Fällen einen Verlust von 16q11.2 (Toida et al., 2001). Molekulargenetische Veränderungen auf 16p wurden bisher zwar erwähnt, jedoch nicht in einen Zusammenhang mit der Tumorentstehung gebracht (Johns et al., 1996). Der LOH auf 16p betrug dort ca. 8% bei MEC und 10-12% bei ACC. Morio und Mitarbeiter beschrieben interessanterweise in ihrer CGH an CXPA gelegentliche Verluste von 16p sowohl in den adenomatösen als auch in den karzinomatösen Anteilen (Morio et al., 2002).

Bei unseren Versuchen lag die häufigste Deletion auf 16p11.2. Diese war in 26% der Tumore betroffen. Am zweithäufigsten war mit 23% die Region 16p11.2-p13.2 verändert. Weitergehende FISH-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe durch Frau Heike Meinelt mit speziellen Sonden auf 16p konnten alle von uns gefundenen Verluste von 16p bestätigen. Der Nachweis von Verlusten von 16p im Vergleich beider Methoden stimmt jedoch nur in 37,5% überein. Insgesamt wurde dort bei 17 von 21 mittels FISH-Analyse untersuchten Fällen (81%) ein Verlust von 16p nachgewiesen.

Durchschnittlich wurde in 18,2% der Fälle ein Verlust des kurzen Arms von Chromosom 16 ausgemacht, wobei im Mittel zu 17,3% ein kompletter Verlust dieser Region beobachtet wurde. Möglicherweise befindet sich auf 16p ein Tumorsuppressorgen, welches durch die Deletion inaktiviert wird und durch den Verlust zur Tumorentstehung oder Tumorprogression beiträgt. 16p ist bei der CGH



prinzipiell kritisch zu bewerten, da es hohe Anteile an GC-reichen Abschnitten enthält. Die genannte FISH-Untersuchung bestätigte jedoch diese Ergebnisse, weshalb wir sie als korrekt ansehen.

Bei den Warthin-Tumoren kam es in 5/30 Fällen (17%) zu einem Verlust auf 16p. Eine Konsensusregion ließ sich hier nicht abgrenzen. Diese Region scheint demnach einen Anteil an der Entstehung von Speicheldrüsentumoren zu haben, jedoch bei den pleomorphen Adenomen eine größere Rolle zu spielen als bei den WT. Bei diesen Tumoren wurden in der Literatur nur 2 Fälle mit kompletten Verlusten des #16 beschrieben (Nordkvist et al., 1994). LOH-Studien zu Warthin-Tumoren liegen bislang nicht vor.

Auf dem chromosomalen Abschnitt 16p sind bei anderen Tumoren bereits diverse Kandidatengene bekannt. Vor allem auf der Region 16p12.3-13.11 fand man einige putative Tumorsuppressorgene. Mehrere Kandidatengene wie TSC2 auf 16p13.3, PIG7 auf 16p13.1, TNFRSF17 auf 16p13.1, GSTP1 auf 16p13.1 SSI-1 auf 16p13, UBE2I auf 16p13.1 und XPF auf 16p13.2-p13.1 zeigen eine Beteiligung an der Zellzyklusregulation und Apoptose. Im Zusammenhang mit anderen Tumoren wurden Deletionen des kurzen Arms von #16 bereits mehrfach erwähnt. Häufige genetische Aberrationen des Chromosoms 16p sind bei Plattenepithelkarzinomen der Lunge, Prostatakarzinomen, Mammakarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Nasopharynxkarzinomen und Kolonkarzinomen beschrieben (Lininger et al., 1998; Lu et al., 1998; Jones et al., 2000; Chujo et al., 2002; Alcock et al., 2003; Chu et al., 2003; Kadota et al., 2003).

In 48% wurde ein LOH auf 16p bei hepatozellulären Karzinomen festgestellt. In dieser Region ist ein Gen für JAB (JAK-Bindungsprotein) lokalisiert, welches für die Regulierung des negativen Feedbacks des JAK-STAT-Pathways verantwortlich ist. (Koyama et al., 1999). Auch in einer weiteren Studie wird ein Zusammenhang chromosomaler Instabilitäten von 16p mit der Entstehung von Leberzellkarzinomen beschrieben (Herath et al., 2006). Ein mögliches Kandidatengen für diese Tumore ist das Axin-Gen, ein Partner der Wiggless-Kaskade, lokalisiert auf 16p. Dieses könnte möglicherweise ein alternativer Weg für die  $\beta$ -Catenin-Akkumulation in Tumorzellen sein (Legoix et al., 1999).

Es wurde außerdem eine Assoziation von 16p mit anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen beschrieben (Komoike et al., 1999). Auch Katoda und Mitarbeiter beschäftigten sich mit der Untersuchung dieser Tumore. Sie zeigten alle einen LOH auf 16p, wohingegen die Vergleichsgruppe aus papillären Schilddrüsenkarzinomen diesen nicht aufwies. Eine häufig deletierte Genregion wurde auf 16p13.3 gefunden, wo ein putatives TS-Gen vermutet wird (Kadota et al., 2003).

Ein LOH auf 16p und diversen anderen Chromosomenabschnitten wurde auch im Bezug auf Zervixkarzinome mit 20-33% erwähnt (Mullokanov et al., 1996). Bei der Untersuchung von Neuroblastomen wurde ein „hereditary neuroblastoma predisposition locus“ (HNB1) auf 16p12-13 beschrieben, dessen Inaktivierung zum Entstehen von familiären und nicht-familiären Neuroblastomen führen könnte (Weiss et al., 2000).

Bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus besteht eine Korrelation zwischen Deletionen auf 16p und der Infiltration in das Lymphsystem (Noguchi et al., 2003). Bei papillären Mammakarzinomen oder Karzinomen in Papillomen kam es in 63% der untersuchten Fälle zu einem LOH auf 16p13 in der Genregion TSC2/PKD1, bei den intraduktalen Mammatumoren waren es 60% (Lininger et al., 1998). Eine Mutation des PKD1-Gens ist verantwortlich für die adult-dominante Form von polyzystischen Nierenerkrankungen. TSC2 ist ein favorisiertes Kandidatengen und wurde bereits mit verschiedenen Neoplasien in Verbindung gebracht.

Die Funktion des Genprodukts von TSC2, Tuberin genannt, ist noch nicht vollständig geklärt. Es enthält jedoch eine kurze Aminosäuresequenz, die homolog zu den GTPase-aktivierenden Proteinen der *ras*-Familie ist (rap1GAP). Da mit TSC2-Mutationen auch die Unterdrückung des Zellwachstums durch das Genprodukt Tuberin gestört wird, ist eine Beteiligung an der Tumorentstehung durch eine verstärkte epitheliale Zellproliferation möglich.

Da auch papilläre Nierenzellkarzinome Mutationen des Chromosomenabschnittes 16p13 aufweisen und diese dem TSC2-Gen zugeordnet werden konnten, wird angenommen, dass TSC2 auch bei papillären Tumoren der Brust als Kandidatengen eine Rolle spielt. In 36% kam es bei Pankreastumoren zu einem LOH, meist auf der Region 16p13pter, in der Nähe der TSC2-Region auf 16p13.3 (Chung et al., 1998). Bei Adenokarzinomen der Lunge zeigten 57% einen LOH auf 16p am TSC2-Locus.

Ebenso viele LOH gab es auch am TSC1-Locus auf 9p. Die Ergebnisse lassen auf einen Zusammenhang zwischen den TSC-assoziierten Regionen und der Entstehung dieser Tumore schließen, weshalb diese Regionen als Kandidatenloci für TS-Gene gesehen werden. Weitere Tumore mit TSC2 als putativem Tumorsuppressorgen sind Astrozytome und Rezidive von Medulloblastomen (Warr et al., 2001; Zakrzewska et al., 2004).

Die TSC2-Region spielt demnach eine wichtige Rolle in der Entstehung einer Vielzahl von Tumoren. Ob sie auch für die Ausbildung und Progression von Parotistumoren verantwortlich ist, kann anhand der momentanen Datenlage nicht beurteilt werden. Es ist jedoch vorstellbar, dass diese Tumore durch eine verstärkte Epithelproliferation ausgelöst werden, zu der es durch den Verlust des hemmenden Einflusses von Tuberin auf das Zellwachstum kommt. Die Region auf 16p13.3 ist bei unseren Versuchen zwar nicht die am häufigsten betroffene Gensequenz, sie war jedoch in immerhin 5 der 31 PA (16%) und 4 der 30 WT (13%) deletiert. Eine Rolle dieses Genbereiches bei der Entstehung von PA und WT ist möglich und bedarf weitergehender Untersuchungen.

Neben Deletionen sind auch Inversionen auf 16 beschrieben. Eine häufige Inversion tritt bei der AML auf, nämlich  $inv(16)(p13;q22)$ . Diese schafft das CBF $\beta$ -MYH11-Fusionsgen, welches für ein Fusionsprotein namens CBF $\beta$ -SMMHC kodiert. Durch Inhibition des Core-binding-Faktors wird die hämatopoetische Differenzierung blockiert und die Leukämie durch zusätzliche Mutationen induziert. Interessanterweise wurden die bereits erwähnten Onkogene PLAG1 und PLAG2 als kooperierende Kandidatenproteine von CBF $\beta$ -SMMHC beschrieben. Bei einem Tierversuch mit Mäusen wurde durch diese eine Leukämie bereits nach einer kurzen Latenzzeit getriggert (Landrette et al., 2005).

Interessant ist dies deshalb, weil PLAG1 zuerst mit pleomorphen Adenomen in Verbindung gebracht wurde. Es liegt auf 8p12 und wird durch Translokationen aktiviert. Ob bei den pleomorphen Adenomen auch Inversionen des Chromosoms 16 vorliegen, ist bisher nicht beschrieben. Es wäre allerdings möglich, dass auch bei pleomorphen Adenomen ein Wechselspiel zwischen einem unbekanntem Fusionsprotein und PLAG1 besteht.

### 7.3.7 Verluste von 16q und mögliche Konsensusregionen

Etges und Mitarbeiter (2004) konnten aufzeigen, dass sowohl benigne als auch maligne Speicheldrüsentumore Proteine des Retinoblastom Pathways exprimieren. Darunter fallen Proteine wie Cyklin D1, cyclin-dependent kinase-4 (CDK-4), das retinoblastoma protein (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 Retinoblastom-Familie auf 16q12.2 zu sein (Russo et al., 2005). Häufige Veränderungen in diesem Bereich konnten in unserer Untersuchung weder bei den PA noch bei den WT nachgewiesen werden. Giefing und Mitarbeiter beschreiben bei den 29 untersuchten Tumoren (14 PA, 15 WT) in 11 Fällen (38%) Verluste von 16q24.1. Wir konnten diese nur bei 2 WT und 3 PA nachweisen (Giefing et al., 2008).

### 7.3.8 Veränderungen auf Chromosom 17

Auf dem Chromosom 17 kommen bei den PA in 8 Fällen (26%) Deletionen vor, in 2 Fällen eine Monosomie von #17, in 2 Fällen Verluste auf 17p und in 4 Fällen auf 17q. Deletionen auf 17p lagen also in insgesamt 13% vor. Bei den WT waren diese seltener, ein kompletter Verlust und 3 Verluste auf 17p, somit insgesamt 13% Verluste auf 17p.

Das auf Chromosom 17p13.1 gelegene Tumorsuppressorgen p53 ist das bisher am häufigsten gefundene veränderte Gen in menschlichen Tumoren. Bei normaler Funktion verhindert es die Proliferation genetisch geschädigter Zellen. Mit dem Verlust dessen physiologischer Funktion replizieren erbgutgeschädigte Zellen ihre DNA, sodass Mutationen im Genom fixiert werden.

Auch wenn eine einzige Mutation nicht ausreicht um eine Transformation der Zellen zu erreichen, prädisponiert der Verlust von p53 zu weiteren Mutationen mit der Folge der malignen Transformation. Zudem scheinen p53-Mutationen einen selektiven Wachstumsvorteil von Tumorzellen darzustellen.

Bei uns war die Region 17p13.1, auf der sich p53 befindet, nur in 4 Fällen (13%) der PA und 4 Fällen der WT (13%) deletiert. In den beiden mittels FISH untersuchten

PA unserer Arbeitsgruppe kam in 100% ein Verlust dieser Genregion vor, jedoch war dieses Kollektiv zu klein, um aussagekräftig zu sein. Die CGH von Giefing und Mitarbeitern konnte bei 11/29 Tumoren Verluste der Region 17p13.1 aufweisen (38%). Auffällig war hier, dass dieser Verlust gehäuft bei Tumoren größeren Durchmessers auffiel (Giefing et al., 2008). Diese Daten passen zu den Untersuchungen von Yamamoto und Mitarbeitern, die ein LOH von p53 an 57% der untersuchten PA und 86% der Karzinome aus pleomorphen Adenomen feststellten (Yamamoto et al., 1998).

Veränderungen an p53 wurden bei pleomorphen Adenomen in 19-67% der Fälle und p53-Protein-Überexpressionen in 41-75% der Fälle gefunden, was zur Annahme führt, dass dieses Gen zumindest in einigen Fällen eine Rolle bei der malignen Transformation spielt (Deguchi et al., 1993; Karja et al., 1997; Li et al., 1997; Nordkvist et al., 2000; Lewis et al., 2001; Freitas et al., 2005). Auch Aberrationen des Chromosom 17 konnten ausgemacht werden (Li et al., 1997). Die Inzidenz von Monosomien des #17 war bei PA häufiger als bei den Kontrollen. Sie lag bei 29,6%. Bei den untersuchten CXPA betrug sie 30,8%. Monosomien von #17 scheinen ein früher Schritt in der Tumorentstehung zu sein, der schon vor der malignen Transformation stattfindet (Li et al., 1997). p53-assoziierte genetische Veränderungen zeigten sich häufiger in Speicheldrüsenkarzinomen als in benignen Speicheldrüsentumoren. Bei den benignen Tumoren zeigen die pleomorphen Adenome die höchste Prävalenz von p53-Mutationen (Karja et al., 1997). Über Mutationen von p53 bestehen bereits zahlreiche Berichte. Die meisten Untersuchungen stützen sich hierbei auf die quantitative Bestimmung des p53-Genproduktes, ohne einen Zusammenhang mit entsprechenden genetischen Aberrationen oder entsprechenden Verlusten an Chromosom 17 herzustellen. LOH auf #17 korrelierten bei CXPA mit dem Krankheitsstadium sowie einer erhöhten Proliferationsrate und hatten zusammen mit LOH auf 8q und 12q die höchsten Raten an Verlusten (el-Naggar et al., 2000). Bei den PA hingegen waren Verluste auf 17p seltener (14%). Diese Zahl stimmt in etwa mit unseren Ergebnissen überein. Auch das spricht laut el-Naggar und Mitarbeitern dafür, dass Veränderungen auf 17p für einen frühen Schritt der malignen Transformation verantwortlich sind und dass auf 17p TS-Genregionen lokalisiert sind, die zur Tumorentstehung von PA und CXPA führen.

Die Immunreaktivität von p53 war bei den WT viel niedriger als bei den PA oder malignen Tumoren, was für dessen Bedeutung bei PA spricht (Ohki et al., 2001). Arida et al konnten bei den WT keine Überexpression von p53 und p16 nachweisen (Arida et al., 2005).

Ein weiteres, häufig verändertes, auf 17q12-21.32 lokalisiertes Gen ist Her-2/neu, auch c-erbB-2 genannt, welches an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt ist (Skalova et al., 2003). Dieses Protoonkogen zählt, zusammen mit epidermal growth factor Rezeptoren (EGFR: erbB1), erbB3 und erbB-4) zu der Familie der c-erb-Onkogene. Diese transmembranösen Tyrosinkinase-Rezeptoren binden zahlreiche EGF-Liganden, die zu einer Heterodimerisierung, Autophosphorylierung und Rezeptoraktivierung führen (Tzahar et al., 1996; Graus-Porta et al., 1997). Mutationen, welche durch eine einzelne Aminosäuresubstitution in seiner transmembranösen Domäne verursacht werden, führen zu einer Her-2/neu Amplifikation und somit zu dessen Aktivierung. Durch die Genamplifikation kommt es zu einer gesteigerten RNA- und Proteinsynthese, was den Zellen einen Wachstumsvorteil verschafft (Harari und Yarden, 2000). Eine Überexpression von Her-2/neu führt zu einer Stimulation der mitogen-activated protein Kinase (MAPK), welche ihrerseits Transkriptionsfaktoren wie das Protein ER81 aktiviert. Amplifikation und/oder Überexpression von Her-2/neu korrelieren, unabhängig von Lokalisation, Tumorgroße, Tumorigrad und Lymphknotenstatus, mit einer schlechten Prognose bei Mamma-, Ovarial-, Endometrium-, und wahrscheinlich auch Speicheldrüsenkarzinomen (Press et al., 1994). 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 (Skalova et al., 2003). Auch bei malignen Speicheldrüsentumoren wie Mukoepidermoidkarzinomen, CXPA und Speicheldrüsenkarzinomen scheint es eine wichtige Rolle zu spielen (Muller et al., 1994; Press et al., 1994; Skalova et al., 2003). Bei PA wurde bisher keine erhöhte Reaktivität von Her-2/neu beschrieben (Kahn et al., 1992; Muller et al., 1994). In der FISH-Untersuchung unserer Arbeitsgruppe wurden diese Ergebnisse allerdings widerlegt. Hier zeigte sich in 12,3% der Verlust eines oder beider Her-2/neu Gene (20,6%). Die Ergebnisse stimmten in 20% mit den in der CGH gefundenen Veränderungen der betreffenden Genregion

überein. Deletionen in diesem Bereich waren zuvor nie beschrieben worden. Somit ergeben sich Hinweise, dass der Verlust dieses Gens an der Entstehung oder malignen Transformation von pleomorphen Adenomen beteiligt sein kann.

### 7.3.9 Veränderungen auf Chromosom 19

Die 8 Gewinne (26%) und 5 Verluste (16%) auf Chromosom 19 bei den PA bzw. 9 Gewinne (30%) und 1 Verlust (3%) bei den WT müssen aufgrund des hohen GC-Gehalts dieser Abschnitte mit großer Zurückhaltung bewertet werden. Sie können erst als valide bezeichnet werden, wenn sie in weitergehenden Studien, z.B. einer FISH-Untersuchung, bestätigt wurden. Johns und Mitarbeiter beschrieben an PA allerdings bereits 19q-Verluste von über 20%. Ein LOH auf 19p lag in ca. 10% der Fälle vor (Johns et al., 1996). Auch bei CXPA beschreiben die Autoren in 3/3 Fällen einen Verlust dieser Genregion. Bei WT gibt es zu dieser Fragestellung bislang keine Ergebnisse.

### 7.4.0 Verluste von 22q und mögliche Konsensusregionen

Wenngleich das Chromosom 22 reich an GC-Anteilen ist und deshalb in der CGH Artefakte auftreten können, konnten wir in unseren Kontrollexperimenten keine Fehlhybridisierungen feststellen. Wir sehen den Bereich auf 22q12.1-q12.3, der in 23% der PA und 20% der WT verändert war, daher als mögliche Konsensusregion. Um diese bestätigen zu können, sind allerdings noch weitere zytogenetische Untersuchungen, wie beispielsweise eine FISH-Analyse, notwendig. Auch in der CGH von Giefing und Mitarbeitern wurden häufige Verluste auf 22q beschrieben (21/29; 72%), 14 im Bereich 22q12.1-q12.3 (48%), was unsere Ergebnisse bestätigt (Giefing et al., 2008). In der CGH von Toida und Mitarbeitern konnten an den PA keine Verluste von 22q beobachtet werden (Toida et al., 2001).

Johns et al beschrieben in ihrer LOH-Studie nur in ca. 9% einen Verlust des langen Arms von Chromosom 22q (Johns et al., 1996). Auch in zytogenetischen Untersuchungen an PA wurden Monosomien von #22 erwähnt (Mark und Dahlenfors, 1986). Morio und Mitarbeiter fanden hingegen sowohl bei den adenomatösen als

auch karzinomatösen Anteilen Verluste von 22q, jedoch häufiger im karzinomatösen Gewebe (Morio et al., 2002). Möglicherweise ist ein Verlust von 22q als Zeichen einer Tumorprogression oder beginnenden malignen Transformation zu sehen, was weitergehend untersucht werden sollte. Bei den WT wurden in zytogenetischen Studien mehrfach Verluste von #22 beschrieben (Nordkvist et al., 1994).

LOH auf 22q kommen in 22% der verschiedenen untersuchten Tumorarten vor (Knuutila et al., 1999). Am häufigsten kommen Verluste auf 22q bei Hirntumoren vor, hier insbesondere bei Meningeomen (50-70%), Astrozytomen und Gliomen (Zang und Singer, 1967; Dumanski et al., 1990; Brunner, 2000; Hartmann et al., 2004).

Das bekannteste TS-Gen auf #22 ist das Neurofibromin 2 (NF 2)-Gen, welches auf 22q12.2 lokalisiert ist (Ruttledge et al., 1994; Nishioka et al., 2002). Es ist bei ca. 60% der sporadischen Meningeome mutiert, was als primäres Ereignis in der Entstehung dieser Tumore gesehen wird (Ueki et al., 1999). Es spricht jedoch einiges dafür, dass sich distal davon ein weiteres putatives TS-Gen befindet (Schofield et al., 1996). Weitere Tumore mit einem häufigen Verlust von #22 sind vestibuläre Schwannome, welche unter anderem bei einer Neurofibromatose entstehen und welche bei den familiären Formen mit Verlusten von NF2 assoziiert sind. Auch Ependymome weisen häufig Verluste des #22 auf und zeigen einen möglichen Locus für ein TS-Gen auf 22q11 (Ammerlaan et al., 2005) bzw. 22pter-q11.2 (Hulsebos et al., 1999).

Auch bei epitheloiden Sarkomen wird der Verlust auf 22q und des NF 2-Gens in der Pathogenese diskutiert (Quezado et al., 1998). Weitere Tumore mit häufigen Deletionen von 22q sind Ovarialkarzinome, kolorektale Karzinome, und nicht-kleinzellige Lungentumore (Schofield et al., 1996; Wild et al., 2001; Nishioka et al., 2002; Zhou et al., 2002; Yanaihara et al., 2004). Der Verlust des MYO18b (22q12.1) wird in diesem Zusammenhang als bedeutend angesehen. Ob Myosin XVIIIIB auch einen Einfluß auf die Entstehung von Parotistumoren hat, wurde bisher noch nicht untersucht. Das genannte Gen befindet sich jedoch in der bei uns bei beiden Tumorgruppen am häufigsten veränderten Region auf 22q12.1-q12.3.

Ein weitere bekannte Veränderung des #22 ist die Translokation t(9;22), das so genannte Philadelphiachromosom, bei der chronisch myeloischen Leukämie.



Auch bei den Meningeomen wurden Translokationen beschrieben, die das Chromosom 22 betreffen. Im Bereich dieser Translokation wurden TS-Gene und Gene identifiziert, die an der Signaltransduktion und Modulation der Zellproliferation beteiligt sind.

Im Gegensatz zu den von uns beschriebenen Verlusten auf 22q wurden bei den ACC und BCAC häufig Gewinne auf 22q12.3-q13.1 beschrieben, welche mit der Aktivierung eines Protoonkogens in Verbindung gebracht werden. Dieses könnte möglicherweise c-sis sein, welches für den platelet derived growth factor  $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) kodiert und auf 12q13.1 lokalisiert ist (Toida et al., 2001; Freier et al., 2005). Gewinne dieser Art kamen bei den PA gar nicht, bei den WT nur in 3 Fällen vor (10%).

### 7.4.1 Veränderungen auf Chromosom X

Die häufigen Gewinne (32%) auf dem #X konnten in der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten FISH-Untersuchung an pleomorphen Adenomen nicht bestätigt werden. Dort zeigte sich mit durchschnittlich 25,2% in 17/21 untersuchten Fällen sogar ein #X-Verlust. In 17,2% war es ein Verlust von nur einem X-Chromosom. Unter den weiblichen Probanden traten im Mittel in 6,5% der Fälle Deletionen beider X-Chromosomen auf. In der CGH von Giefing und Mitarbeitern konnten die häufigen X-Gewinne ebenfalls nicht bestätigt werden (Giefing et al., 2008).

Grund für die sehr unterschiedlichen Ergebnisse ist mit höchster Wahrscheinlichkeit die schlechte Sensitivität der CGH bei den Geschlechtschromosomen. Die FISH-Untersuchung ist mit ihren speziell auf diese Region abgestimmten Sonden weitaus sensitiver. Auch die in der CGH-Untersuchung detektierten #X-Gewinne in 23% der WT sollten erst nach weiterführender FISH-Untersuchung bewertet werden. Dass aufgrund der verschiedenen Geschlechter der unterschiedlichen DNA-Formen falsch-positive Ergebnisse vorliegen, ist aufgrund der genauen internen Kontrolle nicht wahrscheinlich.

### 7.4.2 Weitere chromosomale Veränderungen

Das bei den Warthin-Tumoren häufig diskutierte MECT1-MAML2 Fusionsgen kann durch unsere Methode nicht nachgewiesen werden, ebenso wenig die dem zugrunde liegenden Translokationen t(11;19) (Enlund et al., 2004). Eine Expression dieses Gens konnte in der Untersuchung von Martins und Mitarbeitern mittels Zytogenetik, FISH und RT-PCR an 7WT und 10MEC nicht bestätigt werden (Martins et al., 2004).

Auch Okabe und Mitarbeiter konnten das MECT1-MAML2 Fusionstranskript nur bei 38% der untersuchten MEC, jedoch bei keinem WT oder sonstigen nicht-MEC nachweisen (Okabe et al., 2006)

Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse von Tirado und Mitarbeitern, welche 11 WT sowie 22 MEC auf die MECT1-TORC1-CRTC1/MAML2-Fusion untersuchten. Vier (36%) der untersuchten WT waren positiv für dieses Transkript (Tirado et al., 2007). Ob und in wie fern dieses Fusionsgen tatsächlich eine Rolle für die WT spielt ist bisher noch ungeklärt.

Weitere häufige Translokationen betreffen die Chromosomen 6 und 10, was mit der Methode der CGH nicht nachgewiesen werden kann. Auch sporadische Deletionen auf 5p13 mit dem Genlokus für PLAG1 wurden beschrieben (Johns et al., 1996; Jin et al., 2001; Roijer et al., 2002; Poetsch et al., 2005). Hinweise auf diese Veränderung an #5 konnten wir in keinem der pleomorphen Adenome nachweisen. Auch Zugewinne in den Regionen 13q1-2, 13q34 und 15q1 (Takashi et al., 2002; Di Palma et al., 2005) sowie LOH auf 6q, 8q, 9p, 12q und traten sowohl in den epithelialen als auch den mesenchymalen Komponenten häufig auf (Poetsch et al., 2005). Auch diese Beobachtungen konnten wir, außer bei 9q, anhand unserer Studie nicht weiter stützen. Im geringen Ausmaß zeigte bei anderen Autoren auch das Chromosom 6p21-23 strukturelle Veränderungen (bei uns nur in 3%) und mit 9q, 10p, 14q, 19q, 21q und 22q konnten weitere Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden (Johns et al., 1996; Mark et al., 1996). Auch diese konnten wir nur im Bereich von 19q (13%) und 22q (23%) bestätigen. Götte und Mitarbeiter fanden in ihrer Dual-FISH-Analyse an elf pleomorphen Adenomen eine wiederholte

Monosomie der Chromosomen 7, 11, 17 und 18, wovon wir nur die Monosomie 17 in 2 Fällen (6%) detektierten, sowie eine Polysomie der Chromosomen 3, 9 und 17, die wir allesamt nicht nachweisen konnten (Gotte et al., 2005).

Wiederholt wurde in pleomorphen Adenomen auch ein LOH auf 7q beschrieben. Eine genaue Genlokalisierung ist bisher nicht gelungen. Auch diesen konnten wir nur in einem Fall bestätigen. Da bei Prostata-, Mamma-, sowie Kopf-Hals-Karzinomen vom Vorliegen einer Vielzahl an Tumorsuppressorgenen auf 7q31.3 ausgegangen wird, ist die Vermutung von einer Beteiligung dieser Gene an der Tumorentwicklung und –progression naheliegend. Bei den WT und PA spricht allerdings bislang nichts für eine solche Beteiligung. Ob die genannten Unterschiede der Ergebnisse nun an den unterschiedlichen Methoden oder an den Tumoren selbst liegen, ist schwer zu beurteilen und bedarf weiterführender Studien.

Wahrscheinlich sind sowohl die von uns häufig gefundenen Deletionen als auch die in der Literatur berichteten Translokationen mit dadurch resultierenden Unterschieden durch z.B. Inaktivierung von TS-Genen oder Aktivierung von proliferationsfördernden Modulatoren für die Tumorentstehung von PA und WT verantwortlich. Inwiefern die eher selteneren Gewinne eine Rolle spielen ist bisher noch ungeklärt. Diese befanden sich v.a. auf den #4, #12, #19 und #X bei den PA und #3, #4, #6, #13, #X bei den WT. Auch Giefing und Kollegen fanden in 66% Gewinne auf 4q (Giefing et al., 2008). Auffällig ist, dass bestimmte Gewinne nur bei den WT vorkommen. So sind nur bei diesen Gewinne der Chromosomen 3, 9, 11, 18, 20 und 22 nachzuweisen, wohingegen es bei den PA auf diesen Chromosomen nur zu Verlusten kam. Bei den PA ist der einzige Gewinn, der bei keinem der WT vorkam, auf dem #7 lokalisiert. Ob diese Gewinne eine besondere Bedeutung für die Entstehung der Warthin-Tumore haben, ist anhand dieser Untersuchung nicht zu beurteilen, da keine Region überdurchschnittlich häufig verändert ist. Es wäre jedoch möglich, dass durch diese Gewinne spezielle Onkogene aktiviert werden.

### 8 Ausblick

Wir konnten mit unserer Untersuchung einen guten Überblick über die Vielfalt der chromosomalen Veränderungen in pleomorphen Adenomen und Warthin-Tumoren geben. Diese Studie ist neben einer Studie von Giefing und Mitarbeitern die einzige CGH mit einem großen Kollektiv an PA und die einzige überhaupt an WT. Bei dieser Tumorentität wurden bisher insgesamt nur sehr wenige Untersuchungen zu genetischen Veränderungen unternommen, die meisten davon waren zytogenetische Studien. Deshalb fällt der Vergleich zu Voruntersuchungen schwer. Sie ist die erste Studie, welche die genetischen Veränderungen an Warthin-Tumoren in einer Übersicht beschreibt. Sie schafft dadurch neue Möglichkeiten und gibt einen guten Überblick über potentielle Konsensusregionen. Diese liegen unserer Ansicht nach in den Regionen 16p11.2 und 22q11.2-q12.3 bei den pleomorphen Adenomen und auf 8p23.1-pter und 9p23-pter bei den Warthin-Tumoren. Diese Gensequenzen können nun in weiterführenden Studien gezielt untersucht werden, damit die Entstehung von Parotistumoren durch die Ermittlung der dafür verantwortlichen Genregionen besser verstanden werden kann. Speziell in Bezug auf die Warthin-Tumore bringen diese neuen Erkenntnisse einen Fortschritt, da das Wissen über chromosomale und molekulare Veränderungen bei diesen Tumoren bisher noch sehr gering ist.

Zukünftige Aufgabe ist es, in weiteren Untersuchungen speziell die von uns gefundenen Konsensusregionen präzise zu untersuchen, um deren Relevanz in der Entstehung von pleomorphen Adenomen und Warthin-Tumoren zu klären. Nach weiterer zytogenetischer Validierung der erhobenen Befunde ist die Analyse einzelner Gene von Interesse, um das Verständnis der Pathogenese dieser Tumore zu vertiefen

## 9 Literaturverzeichnis

- Adams J, Cuthbert-Heavens D, Bass S, Knowles MA. 2005. Infrequent mutation of TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2/DR5) in transitional cell carcinoma of the bladder with 8p21 loss of heterozygosity. *Cancer Lett* 220:137-144.
- Albrecht H, Arzt L. 1910. Beiträge zur Frage der Gewebsverirrung. Papilläre Cystadenome in Lymphdrüsen. *Frankfurt Z Pathol* 4:47- 69.
- Alcock HE, Stephenson TJ, Royds JA, Hammond DW. 2003. Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 37:369-380.
- 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 Pathol* 78:455-461.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3:917-921.
- Ammerlaan AC, de Bustos C, Ararou A, Buckley PG, Mantripragada KK, Verstegen MJ, Hulsebos TJ, Dumanski JP. 2005. Localization of a putative low-penetrance ependymoma susceptibility locus to 22q11 using a chromosome 22 tiling-path genomic microarray. *Genes Chromosomes Cancer* 43:329-338.
- Arakaki DT, Sparkes RS. 1963. Microtechnique for Culturing Leukocytes from Whole Blood. *Cytogenetics* 85:57-60.
- Arheden K, Mandahl N, Heim S, Mitelman F. 1989. In situ hybridization localizes the human type II alpha 1 collagen gene (COL2A1) to 12q13. *Hereditas* 110:165-167.
- Arida M, Barnes EL, Hunt JL. 2005. Molecular assessment of allelic loss in Warthin tumors. *Mod Pathol* 18:964-968.
- Armes JE, Hammet F, de Silva M, Ciciulla J, Ramus SJ, Soo WK, Mahoney A, Yarovaya N, Henderson MA, Gish K, Hutchins AM, Price GR, Venter DJ. 2004. Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers. *Oncogene* 23:5697-5702.
- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K. 1995. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82:57-65.
- Asp J, Persson F, Kost-Alimova M, Stenman G. 2006. CHCHD7-PLAG1 and TCEA1-PLAG1 gene fusions resulting from cryptic, intrachromosomal 8q rearrangements in pleomorphic salivary gland adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 45:820-828.
- Assor D. 1974. Bilateral carcinoma of the parotid, one cancer arising in a Warthin's tumor. *Am J Clin Pathol* 61:270-274.
- Astacio JN. 1974. Papillary cystadenoma lymphomatosum associated with pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 38:91-95.
- Astrom AK, Voz ML, Kas K, Roijer E, Wedell B, Mandahl N, Van de Ven W, Mark J, Stenman G. 1999. Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. *Cancer Res* 59:918-923.
- Batsakis JG. 1986. Recurrent mixed tumor. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 95:543-544.
- Belsky JL, Takeichi N, Yamamoto T, Cihak RW, Hirose F, Ezaki H, Inoue S, Blot WJ. 1975. Salivary gland neoplasms following atomic radiation: additional cases and reanalysis of combined data in a fixed population, 1957-1970. *Cancer* 35:555-559.
- Benz M, Huck K, Du Manoir S, Joos S, Werner C, Fischer K, Döhner H, Lichter P. 1995. Comparative genomic hybridization in chronic B- cell leukemias reveals a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 85:3610- 3618.
- Benz M, Pletsch A, Stilgenbauer S, Döhner H, Lichter P. 1998. Minimal size of deletions detected by genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 21:172- 175.

- Bhattacharya N, Singh RK, Mondal S, Roy A, Mondal R, Roychowdhury S, Panda CK. 2004. Analysis of molecular alterations in chromosome 8 associated with the development of uterine cervical carcinoma of Indian patients. *Gynecol Oncol* 95:352-362.
- Billroth T. 1859. Beobachtungen über Geschwülste der Speicheldrüsen. *Virchows Arch*
- Blin N, Stafford DW. 1976. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 3:2303-2308.
- Boveri T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumore. Verlag von Gustav Fischer, Jenaanulocytic.
- Brunner C. 2000. Vergleichende genomische Hybridisierung von Gliomen. Doktorarbeit.
- Bullerdiek J, Bartnitzke S, Weinberg M, Chilla R, Haubrich J, Schloot W. 1987. Rearrangements of chromosome region 12q13---q15 in pleomorphic adenomas of the human salivary gland (PSA). *Cytogenet Cell Genet* 45:187-190.
- Bullerdiek J, Haubrich J, Meyer K, Bartnitzke S. 1988. Translocation t(11;19)(q21;p13.1) as the sole chromosome abnormality in a cystadenolymphoma (Warthin's tumor) of the parotid gland. *Cancer Genet Cytogenet* 35:129-132.
- Bullerdiek J, Takla G, Bartnitzke S, Brandt G, Chilla R, Haubrich J. 1989. Relationship of cytogenetic subtypes of salivary gland pleomorphic adenomas with patient age and histologic type. *Cancer* 64:876-880.
- 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.
- Camuto PM, Greco MA, Persky M, Wolman SR. 1988. Abnormality of 8p in a benign salivary gland tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 31:301-303.
- Caselitz J. 1987. [Pleomorphic adenoma of the salivary glands. Histogenesis, cellular differentiation, tumor marker]. *Veroff Pathol* 126:1-253.
- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL. 1983. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305:779-784.
- Cerilli LA, Swartzbaugh JR, Saadut R, Marshall CE, Rumpel CA, Moskaluk CA, Frierson HF, Jr. 1999. Analysis of chromosome 9p21 deletion and p16 gene mutation in salivary gland carcinomas. *Hum Pathol* 30:1242-1246.
- Chang BL, Liu W, Sun J, Dimitrov L, Li T, Turner AR, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J. 2007. Integration of somatic deletion analysis of prostate cancers and germline linkage analysis of prostate cancer families reveals two small consensus regions for prostate cancer genes at 8p. *Cancer Res* 67:4098-4103.
- Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, Wang YP, Burian D, Clifton SW, Crabtree J, Freeman A, Iyer K, Jian L, et al. 1995. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 27:67-82.
- Chomette G, Auriol M, Vidal J-M, Soudant J. 1989. Epithelioma of the parotid gland and cystadenolymphoma. Report on one case. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 90:293-296.
- Chu LW, Troncoso P, Johnston DA, Liang JC. 2003. Genetic markers useful for distinguishing between organ-confined and locally advanced prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 36:303-312.
- Chujo M, Noguchi T, Miura T, Arinaga 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.
- Chung DC, Brown SB, Graeme-Cook F, Tillotson LG, Warshaw AL, Jensen RT, Arnold A. 1998. Localization of putative tumor suppressor loci by genome-wide allelotyping in human pancreatic endocrine tumors. *Cancer Res* 58:3706-3711.
- Claussen U, Mazur A, Rubtsov N. 1994. Chromosomes are highly elastic and can be stretched. *Cytogenet Cell Genet* 66:120-125.
- Collina G, Eusebi V, Carasoli PT. 1989. Pleomorphic adenoma with lymph-node metastases report of two cases. *Pathol Res Pract* 184:188-193.
- Conkright MD, Canettieri G, Sreaton R, Guzman E, Miraglia L, Hogenesch JB, Montminy M. 2003. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell* 12:413-423.

- Cossmann J, Deegan M, Batsakis J. 1977. Warthin's tumor. B- Lymphocytes within the lymphoid infiltrate. *Arch Pathol Lab Med* 101:354- 356.
- Cremer T, Jauch A, Ried T, Schrock E, Lengauer C, Cremer M, Speicher MR. 1995. Fluoreszenz- in-situ- Hybridisierung (FISH). *Deutsches Ärzteblatt* 92:1039- 1047.
- Cresson DH, Goldsmith M, Askin FB, Reddick RL, Postma DS, Siegal GP. 1990. Metastasizing pleomorphic adenoma with myoepithelial cell predominance. *Pathol Res Pract* 186:795-800; discussion 801-792.
- Croce CM, Klein G. 1985. Chromosome translocations and human cancer. *Sci Am* 252:54-60.
- Darzynkiewicz Z. 1990. Acid-induced denaturation of DNA in situ as a probe of chromatin structure. *Methods Cell Biol* 33:337-352.
- 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.
- Di Palma S, Simpson RH, Skalova A, Michal M. 1999. Metaplastic (infarcted) Warthin's tumour of the parotid gland: a possible consequence of fine needle aspiration biopsy. *Histopathology* 35:432-438.
- Di Palma S, Skalova A, Vanieek T, Simpson RH, Starek 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.
- Donath K, Ußmüller J. 2001. Ätiopathogenese und Histopathologie der Speicheldrüsenerkrankungen. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 80:1- 25.
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T. 1993. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90:590-610.
- Dumanski JP, Rouleau GA, Nordenskjold M, Collins VP. 1990. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res* 50:5863-5867.
- el-Naggar A, Batsakis JG, Kessler S. 1988. Benign metastatic mixed tumours or unrecognized salivary carcinomas? *J Laryngol Otol* 102:810-812.
- 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 Chromosomes Cancer* 27:162-168.
- el-Naggar AK, Coombes MM, Batsakis JG, Hong WK, Goepfert H, Kagan J. 1998. Localization of chromosome 8p regions involved in early tumorigenesis of oral and laryngeal squamous carcinoma. *Oncogene* 16:2983-2987.
- el-Naggar AK, Hurr K, Kagan J, Gillenwater A, Callender D, Luna MA, Batsakis JG. 1997. Genotypic alterations in benign and malignant salivary gland tumors: histogenetic and clinical implications. *Am J Surg Pathol* 21:691-697.
- Enlund F, Behboudi A, Andren Y, Oberg C, Lendahl U, Mark J, Stenman G. 2004. Altered Notch signaling resulting from expression of a WAMTP1-MAML2 gene fusion in mucoepidermoid carcinomas and benign Warthin's tumors. *Exp Cell Res* 292:21-28.
- Etges A, Nunes FD, Ribeiro KC, Araujo VC. 2004. Immunohistochemical expression of retinoblastoma pathway proteins in normal salivary glands and in salivary gland tumours. *Oral Oncol* 40:326-331.
- Evans RW, Cruickshank AH. 1970. Epithelial tumours of the salivary glands. *Major Probl Pathol* 1:1-299.
- Eveson JW, Cawson RA. 1989. Infarcted ('infected') adenolymphomas. A clinicopathological study of 20 cases. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 14:205-210.
- Fahmy S. 1973. Adenolymphoma of the tonsillar fossa. *J Laryngol Otol* 87:675-679.
- Flanagan JM, Healey S, Young J, Whitehall V, Trott DA, Newbold RF, Chenevix-Trench G. 2004. Mapping of a candidate colorectal cancer tumor-suppressor gene to a 900-kilobase region on the short arm of chromosome 8. *Genes Chromosomes Cancer* 40:247-260.
- Forozan F, Karhu R, Kononen J, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. 1997. Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet* 13:405-409.
- Fowler MH, Fowler J, Ducatman B, Barnes L, Hunt JL. 2006. Malignant mixed tumors of the salivary gland: a study of loss of heterozygosity in tumor suppressor genes. *Mod Pathol* 19:350-355.

- Frank B, Bermejo JL, Hemminki K, Sutter C, Wappenschmidt B, Meindl A, Kiechle-Bahat M, Bugert P, Schmutzler RK, Bartram CR, Burwinkel B. 2007. Copy number variant in the candidate tumor suppressor gene MTUS1 and familial breast cancer risk. *Carcinogenesis* 28:1442-1445.
- Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, Ohl S, Devens F, Burke B, Hassfeld S, Lichter P, Joos S, Hofele C. 2005. Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 159:89-95.
- Freitas LL, Araujo VC, Martins MT, Chone C, Crespo A, Altemani A. 2005. Biomarker analysis in carcinoma ex pleomorphic adenoma at an early phase of carcinomatous transformation. *Int J Surg Pathol* 13:337-342.
- Furuta Y, Shinohara T, Sano K, Meguro M, Nagashima K. 1990. In situ hybridisation with digoxigenin-labelled DNA probes for detection of viral genomes. *J Clin Pathol* 43:806-809.
- Gadient SE, Kalfayan B. 1975. Mucoepidermoid carcinoma arising within a Warthin's tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 40:391-398.
- Gaillard A, Nicouleau P, Jacquemaire D, Le Neel N, Cousin C. 1981. [Multiple cystadenolymphomas of the parotids and upper lip (author's transl)]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 82:282-285.
- Gall JG, Pardue ML. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63:378-383.
- Gehrking E, Gehrking I, Moubayed P. 2007. [Surgery of benign tumors of the parotid gland: the value of fine needle aspiration cytology]. *Hno* 55:195-201.
- Giefing M, Wierzbicka M, Rydzanicz M, Cegla R, Kujawski M, Szyfter K. 2008. chromosomal gains and losses indicate oncogene and tumor suppressor gene candidates in salivary gland tumors. *Neoplasma* 1:55-60.
- 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.
- Goodwin RE. 1980. Synchronous papillary cystadenoma lymphomatosum and oncocytoma in the parotid gland. *Ear Nose Throat J* 59:323-326.
- Gotte K, Ganssmann S, Affolter A, Schafer C, Riedel F, Arens N, Finger S, Hormann K. 2005. Dual FISH analysis of benign and malignant tumors of the salivary glands and paranasal sinuses. *Oncol Rep* 14:1103-1107.
- 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.
- Griffiths AP, Dekker P. 1991. Oncocytic metaplasia of the nasopharynx or extra-parotid Warthin's tumour? *J Clin Pathol* 44:1030-1032.
- Gross-Bellard M, Oudet P, Chambon P. 1973. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem* 36:32.
- Hansemann D. 1890. Über assymetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*:229-326.
- Harari D, Yarden Y. 2000. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 19:6102-6114.
- Hartmann C, Numann A, Mueller W, Holtkamp N, Simon M, von Deimling A. 2004. Fine mapping of chromosome 22q tumor suppressor gene candidate regions in astrocytoma. *Int J Cancer* 108:839-844.
- Hayashi Y, Kobayashi Y, Hirai H, Hanada R, Yamamoto K, Abe T, Sugita K, Nakazawa S, Suetake N, Hoshino H, et al. 1988. Immunoglobulin heavy chain gene rearrangements and mixed lineage characteristics in acute leukemias with the 11;19 translocation. *Cancer* 61:712-720.
- Hayter JP, Robertson JM. 1990. Familial occurrence of pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Br J Oral Maxillofac Surg* 28:333-334.
- Hazen RW, Pifer JW, Toyooka ET, Livingood J, Hempelmann LH. 1966. Neoplasms following irradiation of the head. *Cancer Res* 26:305-311.
- Heckmayr M, Seifert G. 1977. [Hematogenous metastases of benign pleomorphic adenomas of the salivary glands (author's transl)]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)* 56:19-27.
- Heinimann K. 2000. Molekulargenetische Diagnostik bei HNPCC (Hereditäres Kolorektales-Karzinom ohne generalisierte Polypose). *Schweizerische Ärztezeitung* 81:2009-2012.



- Herath NI, Leggett BA, MacDonald GA. 2006. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 21:15-21.
- Hibbard MK, Kozakewich HP, Dal Cin P, Sciort R, Tan X, Xiao S, Fletcher JA. 2000. PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. *Cancer Res* 60:4869-4872.
- Howard DR, Bagley C, Batsakis JG. 1982. Warthin's tumor: a functional immunologic study of the lymphoid cell component. *Am J Otolaryngol* 3:15-19.
- Hsu SM, Hsu PL, Nayak RN. 1981. Warthin's tumor: an immunohistochemical study of its lymphoid stroma. *Hum Pathol* 12:251-257.
- Hulsebos TJ, Oskam NT, Bijleveld EH, Westerveld A, Hermsen MA, van den Ouweland AM, Hamel BC, Tjissen CC. 1999. Evidence for an ependymoma tumour suppressor gene in chromosome region 22pter-22q11.2. *Br J Cancer* 81:1150-1154.
- Ishii H, Baffa R, Numata SI, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, Mori M, Fidanza V, Alder H, Croce CM. 1999. The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3928-3933.
- Jin C, Martins C, Jin Y, Wiegant J, Wennerberg J, Dictor M, Gisselsson D, Strombeck B, Fonseca I, Mitelman F, Tanke HJ, Hoglund M, Mertens F. 2001. Characterization of chromosome aberrations in salivary gland tumors by FISH, including multicolor COBRA-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 30:161-167.
- John H, Birnstein M, Jones K. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature genetics special issue* 223:582-587.
- Johns MM, 3rd, Westra WH, Califano JA, Eisele D, Koch WM, Sidransky D. 1996. Allelotype of salivary gland tumors. *Cancer Res* 56:1151-1154.
- 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.
- Joos S, Scherthan H, Speicher MR, Schlegel J, Cremer T, Lichter P. 1993. Detection of amplified DNA sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Hum Genet* 90:584-589.
- 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.
- Kahn HJ, Hanna W, Auger M, Andrulis I. 1992. Expression and amplification of neu oncogene in pleomorphic adenomas of salivary gland. *Arch Pathol Lab Med* 116:80-83.
- Kahng YS, Lee YS, Kim BK, Park WS, Lee JY, Kang CS. 2003. Loss of heterozygosity of chromosome 8p and 11p in the dysplastic nodule and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 18:430-436.
- Kallioniemi A, Kallioniemi O, Rutovitz D, Sudar D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992a. Comparative genomic hybridization: a new method based on isolated DNA to determine gains and losses of DNA sequences anywhere in the genom in a single hybridization. *Am J Hum Genetics* 51:A23, 80.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992b. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1994. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10:231-243.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1993. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol* 4:41-46.
- Karhu R, Kahkonen M, Kuukasjarvi T, Pennanen S, Tirkkonen M, Kallioniemi O. 1997. Quality control of CGH: impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. *Cytometry* 28:198-205.
- Karja VJ, Syrjanen KJ, Kurvinen AK, Syrjanen SM. 1997. Expression and mutations of p53 in salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med* 26:217-223.
- Karp JE, Broder S. 1995. Molecular foundations of cancer: new targets for intervention. *Nat Med* 1:309-320.

- Kas K, Voz ML, Roijer E, Astrom AK, Meyen E, Stenman G, Van de Ven WJ. 1997. Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nat Genet* 15:170-174.
- Kazmierczak B, Rosigkeit J, Wanschura S, Meyer-Bolte K, Van de Ven WJ, Kayser K, Kriehoff B, Kastendiek H, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996. HMGI-C rearrangements as the molecular basis for the majority of pulmonary chondroid hamartomas: a survey of 30 tumors. *Oncogene* 12:515-521.
- Kim DH, Mohapatra G, Bollen A, Waldman FM, Feuerstein BG. 1995. Chromosomal abnormalities in glioblastoma multiforme tumors and glioma cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 60:812-819.
- Kinzler KW, Ruppert JM, Bigner SH, Vogelstein B. 1988. The GLI gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332:371-374.
- Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761, 763.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Bentz M, Dohner H, Lundsteen C. 1999. Deletions below 10 megabasepairs are detected in comparative genomic hybridization by standard reference intervals. *Genes Chromosomes Cancer* 25:410-413.
- Knudson AG, Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820-823.
- Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, Huhta T, Kettunen E, Kiuru-Kuhlefelt S, Larramendy ML, Lushnikova T, Monni 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.
- 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.
- Kools PF, Wanschura S, Schoenmakers EF, Geurts JM, Mols R, Kazmierczak B, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. 1995. Identification of the 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.
- Kotwall CA. 1992. Smoking as an etiologic factor in the development of Warthin's tumor of the parotid gland. *Am J Surg* 164:646-647.
- 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 16p.13.13 in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 90:951-956.
- Kristensen S, Tveteras K, Friedmann I, Thomsen P. 1989. Nasopharyngeal Warthin's tumour: a metaplastic lesion. *J Laryngol Otol* 103:616-619.
- Kurimoto F, Gemma A, Hosoya Y, Seike M, Takenaka K, Uematsu K, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S. 2001. Unchanged frequency of loss of heterozygosity and size of the deleted region at 8p21-23 during metastasis of lung cancer. *Int J Mol Med* 8:89-93.
- Kurose K, Mine N, Iida A, Nagai H, Harada H, Araki T, Emi M. 2001. Three aberrant splicing variants of the HMGIC gene transcribed in uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 30:212-217.
- Kwitten J, Ober W, Mannheim H. 1966. Bilateral salivary gland tumors. *N Y State J Med* 66:649-651.
- 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.
- Lam K, Wei W, Ho H, Ho C. 1990. Whole organ sectioning of mixed parotid tumors. *Am J Surg* 160:377-381.
- Lamelas J, Terry JH, Jr., Alfonso AE. 1987. Warthin's tumor: multicentricity and increasing incidence in women. *Am J Surg* 154:347-351.
- Landrette SF, Kuo YH, Hensen K, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Perrat PN, Van de Ven WJ, Delwel R, Castilla LH. 2005. Plag1 and Plagl2 are oncogenes that induce acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfb-MYH11. *Blood* 105:2900-2907.
- Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6633-6637.

- Lassmann S, Weis R, Makowiec F, Roth J, Danciu M, Hopt U, Werner M. 2007. Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *J Mol Med* 85:289-300.
- Lassus H, Laitinen MP, Anttonen M, Heikinheimo M, Aaltonen LA, Ritvos O, Butzow R. 2001. Comparison of serous and mucinous ovarian carcinomas: distinct pattern of allelic loss at distal 8p and expression of transcription factor GATA-4. *Lab Invest* 81:517-526.
- Lathe R. 1990. Oligonucleotide probes for in situ hybridization. In: Polak, JM und Mc Gee, JO (Hrsg): *In situ Hybridization, principles and practice*, Oxford University Press, New York.
- 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* 36:381-386.
- Lefor AT, Ord RA. 1993. Multiple synchronous bilateral Warthin's tumors of the parotid glands with pleomorphic adenoma. Case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 76:319-324.
- Legoix P, Bluteau O, Bayer J, Perret C, Balabaud C, Belghiti J, Franco D, Thomas G, Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. 1999. Beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma correlate with a low rate of loss of heterozygosity. *Oncogene* 18:4044-4046.
- Leitch A, Schwarzacher T, Jackson D, Leitch I. 1994. *In-situ Hybridisierung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- Lejeune J, Turpin R, Gautier M. 1959. Le Mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Annales de Genetic* 1:41-49.
- Leverstein H, Van der Wal JE, Tiwari RM, Van der Waal I, Snow GB. 1997. Results of the surgical management and histopathological evaluation of 88 parotid gland Warthin's tumours. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 22:500-503.
- Lewis JE, Olsen KD, Sebo TJ. 2001. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. *Hum Pathol* 32:596-604.
- 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. Correlation with p53 expression. *Cancer* 79:2314-2319.
- 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. *Hum Genet* 80:224-234.
- Lichter P, Cremer T, Tang CJ, Watkins PC, Manuelidis L, Ward DC. 1988. Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9664-9668.
- 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. *Hum Pathol* 29:1113-1118.
- Loenneken I. 1989. [Multifocal presentation of cystadenolymphoma (Warthin tumor) in the parotid gland and larynx]. *Laryngorhinootologie* 68:212-215.
- Lu W, Takahashi H, Furusato B, Maekawa S, Ikegami M, Sudo A, Egawa S, Hano H. 2006. Allelotyping analysis at chromosome arm 8p of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and incidental, latent, and clinical prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 45:509-515.
- Lu YJ, Osin P, Lakhani SR, Di Palma S, Gusterson BA, Shipley JM. 1998. Comparative genomic hybridization analysis of lobular carcinoma in situ and atypical lobular hyperplasia and potential roles for gains and losses of genetic material in breast neoplasia. *Cancer Res* 58:4721-4727.
- Lumerman H, Freedman P, Caracciolo P, Remigio PS. 1975. Synchronous malignant mucoepidermoid tumor of the parotid gland and Warthin's tumor in adjacent lymph node. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 39:953-958.
- Lutz S, Welter C, Zang KD, Seitz G, Blin N, Urbschat K. 1992. A two-colour technique for chromosome in situ hybridization in tissue sections. *J Pathol* 167:279-282.
- Mark HF, Hanna I, Gnepp DR. 1996. Cytogenetic analysis of salivary gland type tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82:187-192.

- 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.
- Mark J, Dahlenfors R, Ekedahl C. 1982. On double-minutes and their origin in a benign human neoplasm, a mixed salivary gland tumour. *Anticancer Res* 2:261-264.
- Mark J, Dahlenfors R, Ekedahl C. 1983. Specificity and implications of ring chromosomes and dicentric chromosomes in benign mixed salivary gland tumours. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 91:397-402.
- Mark J, Dahlenfors R, Ekedahl C, Stenman G. 1980. The mixed salivary gland tumor- a normally benign human neoplasm frequently showing specific chromosomal abnormalities. *Cancer Genetics Cytogenetics* 2:231-241.
- Mark J, Dahlenfors R, Stenman G, Nordquist A. 1989. A human adenolymphoma showing the chromosomal aberrations del (7)(p12p14-15) and t(11;19)(q21;p12-13). *Anticancer Res* 9:1565-1566.
- Mark J, Dahlenfors R, Stenman G, Nordquist A. 1990. Chromosomal patterns in Warthin's tumor. A second type of human benign salivary gland neoplasm. *Cancer Genet Cytogenet* 46:35-39.
- Mark J, Dahlenfors R, Wedell B. 1997. Impact of the in vitro technique used on the cytogenetic patterns in pleomorphic adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 95:9-15.
- Martin T, Weber G, Steilen-Gimbel H, Jung V, Reichhardt S, Zang KD. 1998. Improved DOP-PCR for single chromosome microdissection. *Medizinische Genetik* 1:W 2-5.
- Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D, Blesa D, Marugan I, Benet I, Sole F, Rubio-Moscardo F, Terol MJ, Climent J, Sarsotti E, Tormo M, Andreu E, Salido M, Ruiz MA, Prosper F, Siebert R, Dyer MJ, Garcia-Conde J. 2001. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 98:3479-3482.
- Martins C, Cavaco B, Tonon G, Kaye FJ, Soares J, Fonseca I. 2004. A study of MECT1-MAML2 in mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor of salivary glands. *J Mol Diagn* 6:205-210.
- Martins C, Fonseca I, Felix A, Roque L, Soares J. 1995. Benign salivary gland tumors: a cytogenetic study of 21 cases. *J Surg Oncol* 60:232-237.
- Martins C, Fonseca I, Roque L, Pereira T, Ribeiro C, Bullerdiek 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. *Mod Pathol* 18:1048-1055.
- Martins C, Fonseca I, Roque L, Soares J. 1997. Cytogenetic characterisation of Warthin's tumour. *Oral Oncol* 33:344-347.
- Mitelman F. 1991. *ISCN, An international system for human cytogenetic nomenclature*. S. Karger, Basel.
- Mitelman F, Mertens F, Johansson B. 1997. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *nature genetics special issue*:417-474.
- Mohapatra G, Bollen AW, Kim DH, Lamborn K, Moore DH, Prados MD, Feuerstein BG. 1998. Genetic analysis of glioblastoma multiforme provides evidence for subgroups within the grade. *Genes Chromosomes Cancer* 21:195-206.
- Mohapatra G, Moore DH, Kim DH, Grewal L, Hyun WC, Waldman FM, Pinkel D, Feuerstein BG. 1997. Analyses of brain tumor cell lines confirm a simple model of relationships among fluorescence in situ hybridization, DNA index, and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 20:311-319.
- 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. *Pathol Int* 52:501-507.
- Morris RG, Arends MJ, Bishop PE, Sizer K, Duvall E, Bird CC. 1990. Sensitivity of digoxigenin and biotin labelled probes for detection of human papillomavirus by in situ hybridisation. *J Clin Pathol* 43:800-805.
- Muller 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.
- Mullokandov MR, Kholodilov NG, Atkin NB, Burk RD, Johnson AB, Klinger HP. 1996. Genomic alterations in cervical carcinoma: losses of chromosome heterozygosity and human papilloma virus tumor status. *Cancer Res* 56:197-205.

- Murthy SS, Testa JR. 1999. Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma. *J Cell Physiol* 180:150-157.
- Muscheck M, Sukosd F, Pesti T, Kovacs G. 2000. High density deletion mapping of bladder cancer localizes the putative tumor suppressor gene between loci D8S504 and D8S264 at chromosome 8p23.3. *Lab Invest* 80:1089-1093.
- Nishikawa H, Kirkham N, Hogbin BM. 1989. Synchronous extra-parotid Warthin's tumour. *J Laryngol Otol* 103:792-793.
- Nishioka M, Kohno T, Tani M, Yanaihara N, Tomizawa Y, Otsuka A, Sasaki S, Kobayashi K, Niki T, Maeshima A, Sekido Y, Minna JD, Sone S, Yokota J. 2002. MYO18B, a candidate tumor suppressor gene at chromosome 22q12.1, deleted, mutated, and methylated in human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12269-12274.
- 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.
- Nonaka D, Fabbri A, Roz L, Mariani L, Vecchione A, Moore GW, Tavecchio L, Croce CM, Sozzi G. 2005. Reduced FEZ1/LZTS1 expression and outcome prediction in lung cancer. *Cancer Res* 65:1207-1212.
- Nordkvist A, Mark J, Dahlenfors R, Bende M, Stenman G. 1994. Cytogenetic observations in 13 cystadenolymphomas (Warthin's tumors). *Cancer Genet Cytogenet* 76:129-135.
- Nordkvist A, Roijer E, Bang G, Gustafsson H, Behrendt M, Ryd W, Thoresen S, Donath K, Stenman G. 2000. Expression and mutation patterns of p53 in benign and malignant salivary gland tumors. *Int J Oncol* 16:477-483.
- Norlin R. 1965. Bilateral mixed tumor of the parotid initially regarded as pharyngeal neoplasm. *Pract Otorhinolaryngol (Basel)* 27:298-301.
- Nowell P, Hungerford D. 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132:1497.
- Nowell PC. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 20:462-466.
- Oba K, Matsuyama H, Yoshihiro S, Kishi F, Takahashi M, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiya K, Naito K. 2001. Two putative tumor suppressor genes on chromosome arm 8p may play different roles in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 124:20-26.
- Ohki K, Kumamoto H, Ichinohasama R, 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 proteins. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30:538-544.
- Okabe M, Miyabe S, Nagatsuka H, Terada A, Hanai N, Yokoi M, Shimozato K, Eimoto T, Nakamura S, Nagai N, Hasegawa Y, Inagaki H. 2006. MECT1-MAML2 fusion transcript defines a favorable subset of mucoepidermoid carcinoma. *Clin Cancer Res* 12:3902-3907.
- Ono K, Uzawa K, Nakatsuru M, Shiiba M, Mochida Y, Tada A, Bukawa H, Miyakawa A, Yokoe H, Tanzawa H. 2003. Down-regulation of FEZ1/LZTS1 gene with frequent loss of heterozygosity in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 23:297-302.
- Paige AJ. 2003. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cell Mol Life Sci* 60:2147-2163.
- Park CK, Manning JT, Jr., Battifora H, Medeiros LJ. 2000. Follicle center lymphoma and Warthin tumor involving the same anatomic site. Report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 113:113-119.
- Pieper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1995. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19:10-26.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2934-2938.
- 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.
- Pollock PM, Welch J, Hayward NK. 2001. Evidence for three tumor suppressor loci on chromosome 9p involved in melanoma development. *Cancer Res* 61:1154-1161.
- Pontilena N, Rankow RM. 1979. Coexisting benign mixed tumor and mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88:327-330.

- Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, et al. 1994. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 54:5675-5682.
- Qi H, Wang KM, Liang YQ, Yang LL. 2007. [Expression and clinic pathological significance of survivin mRNA and protein in salivary gland tumors]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 16:18-23.
- Queimado L, Lopes CS, Reis AM. 2007. WIF1, an inhibitor of the Wnt pathway, is rearranged in salivary gland tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 46:215-225.
- Quezado MM, Middleton LP, Bryant B, Lane K, Weiss SW, Merino MJ. 1998. Allelic loss on chromosome 22q in epithelioid sarcomas. *Hum Pathol* 29:604-608.
- Raap AK, Marijnen JG, Vrolijk J, van der Ploeg M. 1986. Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures. *Cytometry* 7:235-242.
- Rao PH, Murty VV, Louie DC, Chaganti RS. 1998. Nonsyntenic amplification of MYC with CDK4 and MDM2 in a malignant mixed tumor of salivary gland. *Cancer Genet Cytogenet* 105:160-163.
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113:237-251.
- Roijer E, Nordkvist A, Strom AK, Ryd W, Behrendt M, Bullerdiel J, Mark J, Stenman G. 2002. Translocation, deletion/amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Am J Pathol* 160:433-440.
- Rowley JD. 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243:290-293.
- Rubio-Moscardo F, Blesa D, Mestre C, Siebert R, Balasas T, Benito A, Rosenwald A, Climent J, Martinez JI, Schilhabel M, Karran EL, Gesk S, Esteller M, deLeeuw R, Staudt LM, Fernandez-Luna JL, Pinkel D, Dyer MJ, Martinez-Climent JA. 2005. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106:3214-3222.
- 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. *Clin Cancer Res* 11:3265-3273.
- Rutledge MH, Sarrazin J, Rangaratnam S, Phelan CM, Twist E, Merel P, Delattre O, Thomas G, Nordenskjold M, Collins VP, et al. 1994. Evidence for the complete inactivation of the NF2 gene in the majority of sporadic meningiomas. *Nat Genet* 6:180-184.
- Saemundsen AK, Albeck H, Hansen JP, Nielsen NH, Anvret M, Henle W, Henle G, Thomsen KA, Kristensen HK, Klein G. 1982. Epstein-Barr virus in nasopharyngeal and salivary gland carcinomas of Greenland Eskimos. *Br J Cancer* 46:721-728.
- Saenger EL, Silverman FN, Sterling TD, Turner ME. 1960. Neoplasia following therapeutic irradiation for benign conditions in childhood. *Radiology* 74:889-904.
- Sahlin P, Mark J, Stenman G. 1994. Submicroscopic deletions of 3p sequences in pleomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 10:256-261.
- Sahlin P, Mark J, Stenman G. 1995. Detection of hidden structural rearrangements by FISH in pleomorphic adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12:81-86.
- Saku T, Hayashi Y, Takahara O, Matsuura H, Tokunaga M, Tokunaga M, Tokuoka S, Soda M, Mabuchi K, Land CE. 1997. Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987. *Cancer* 79:1465-1475.
- Salek C, Benesova L, Zavoral M, Nosek V, Kasperova L, Ryska M, Strnad R, Traboulsi E, Minarik M. 2007. Evaluation of clinical relevance of examining K-ras, p16 and p53 mutations along with allelic losses at 9p and 18q in EUS-guided fine needle aspiration samples of patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 13:3714-3720.
- Sandros J, Stenman G, Mark J. 1990. Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 44:153-167.
- Santucci M, Gallo O, Calzolari A, Bondi R. 1993. Detection of Epstein-Barr viral genome in tumor cells of Warthin's tumor of parotid gland. *Am J Clin Pathol* 100:662-665.
- Sataloff RT, Price DB, Roberts BR. 1987. Bilateral synchronous mixed tumors of the parotid glands. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113:880-881.

- Sato M, Takahashi K, Nagayama K, Arai Y, Ito N, Okada M, Minna JD, Yokota J, Kohno T. 2005. Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 44:405-414.
- Schilling JA, Block BL, Spiegel JC. 1989. Synchronous unilateral parotid neoplasms of different histologic types. *Head Neck* 11:179-183.
- 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.
- 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.
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. 1995. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10:436-444.
- Schofield DE, Beckwith JB, Sklar J. 1996. Loss of heterozygosity at chromosome regions 22q11-12 and 11p15.5 in renal rhabdoid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 15:10-17.
- Schroeck E, Blume C, Meffert MC, du Manoir S, Bersch W, Kiessling M, Lozanowa T, Thiel G, Witkowski R, Ried T, T C. 1996. Recurrent gain of chromosome arm 7q in low-grade astrocytic tumors studied by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 15:199-205.
- Seifert G. 1966. Mundhöhle, Mundspeicheldrüsen, Tonsillen und Rachen. *Spezielle pathologische Anatomie, Bd 1*; Doerr W, Uehlinger E (Hrsg) Springer- Verlag, Berlin Heidelberg New York:1- 145.
- Seifert G, Brocheriou C, Cardesa A, Eveson JW. 1990. WHO International Histological Classification of Tumours. Tentative Histological Classification of Salivary Gland Tumours. *Pathol Res Pract* 186:555-581.
- Seifert G, Bull H, Donath K. 1980. Histologic subclassification of the cystadenolymphoma of the parotid gland. Analysis of 275 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat* 388:13- 38.
- Seifert G, Doerr W, Uehlinger E. 1996. *Oralpathologie I, Pathologie der Speicheldrüsen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Seifert G, Donath K. 1976. Die Morphologie der Speicheldrüsenerkrankungen. *Arch Otolaryngol* 213:111- 208.
- Seifert G, Heckmayr M, Donath K. 1977. Carcinome in papillären Cystadenolymphomen der Parotis. Definition und Differentialdiagnose. *Z Krebsforsch* 90:25- 36.
- Seifert G, Langrock I, Donath K. 1976. [A pathological classification of pleomorphic adenoma of the salivary glands (author's transl)]. *Hno* 24:415-426.
- Seifert G, Miehle A, Haubrich J, Chilla R. 1984. *Speicheldrüsenkrankheiten, Pathologie- Klinik- Therapie- Fazialischirurgie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Seifert G, Sobin L. 1991. WHO Histological typing of salivary gland tumours. Springer- Verlag, 2nd Edition, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Seifert G, Sobin LH. 1992. The World Health Organization's Histological Classification of Salivary Gland Tumors. A commentary on the second edition. *Cancer* 70:379-385.
- Seifert G, Steinbach E, Holtmann S, Kastenbauer E. 1992. Speicheldrüsentumoren. *Oto- Rhino- Laryngologie in Klinik und Praxis, Bd 2*. In: Naumann HH, Helms J, Herbold C, Kastenbauer E (Hrsg); Thieme- Verlag, Stuttgart New York:760- 766.
- Seven H, Calis AB, Basak T, Senvar A. 1999. Multifocal synchronous Warthin's tumor: a case report. *Am J Otolaryngol* 20:346-349.
- Shore R, Albert R, Pasternack B. 1976. Follow- up study of patients treated by X-ray epilation for tinea capitis. *Arch Environ Health* 31.
- Simon M, Koster G, Menon AG, Schramm J. 1999. Functional evidence for a role of combined CDKN2A (p16-p14(ARF))/CDKN2B (p15) gene inactivation in malignant gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 98:444-452.
- Skalova A, Starek I, Vanecek T, Kucerova V, Plank L, Szepe 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.

- Snyderman C, Johnson JT, Barnes EL. 1986. Extraparotid Warthin's tumor. *Otolaryngol Head Neck Surg* 94:169-175.
- Speicher MR, Ward DC. 1996. The coloring of cytogenetics. *Nat Med* 2:1046-1048.
- Spitz MR, Tilley BC, Batsakis JG, Gibeau JM, Newell GR. 1984. Risk factors for major salivary gland carcinoma. A case-comparison study. *Cancer* 54:1854-1859.
- Staats B, Bonk U, Wanschura S, Hanisch P, Schoenmakers EF, Van de Ven WJ, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996. A fibroadenoma with a t(4;12) (q27;q15) affecting the HMGI-C gene, a member of the high mobility group protein gene family. *Breast Cancer Res Treat* 38:299-303.
- Stanbridge EJ. 1990. Human tumor suppressor genes. *Annu Rev Genet* 24:615-657.
- Steinemann D, Skawran B, Becker T, Tauscher M, Weigmann A, Wingen L, Tauscher S, Hinrichsen T, Hertz S, Flemming P, Flik J, Wiese B, Kreipe H, Lichter P, Schlegelberger B, Wilkens L. 2006. Assessment of differentiation and progression of hepatic tumors using array-based comparative genomic hybridization. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:1283-1291.
- Stennert E, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP, Arnold G. 2001. Histopathology of pleomorphic adenoma in the parotid gland: a prospective unselected series of 100 cases. *Laryngoscope* 111:2195-2200.
- Stennert E, Kisner D, Jungehuelsing M, Guntinas-Lichius O, Schroder U, Eckel HE, Klussmann JP. 2003. High incidence of lymph node metastasis in major salivary gland cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129:720-723.
- Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H, Knuechel R, Krieg RC, Klopocki E, Dahl E, Wild P, Blaszyk H, Sauter G, Simon R, Schmitt R, Zaak D, Hofstaedter F, Rosenthal A, Baylin SB, Pilarsky C, Hartmann A. 2004. Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Lab Invest* 84:465-478.
- Suzuki H, Fujioka Y. 1998. Deletion of the p16 gene and microsatellite instability in carcinoma arising in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Diagn Mol Pathol* 7:224-231.
- 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.
- Takeichi N, Hirose F, Yamamoto H, Ezaki H, Fujikura T. 1983. Salivary gland tumors in atomic bomb survivors, Hiroshima, Japan. II. Pathologic study and supplementary epidemiologic observations. *Cancer* 52:377-385.
- Takeuchi J, Sobue M, Yoshida M, Esaki T, Kato 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.
- Tallini G, Vanni R, Manfioletti G, Kazmierczak B, Faa G, Pauwels P, Bullerdiek J, Giancotti V, Van Den Berghe H, Dal Cin P. 2000. HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) genes. *Lab Invest* 80:359-369.
- Tanke HJ, Wiegant J, van Gijlswijk RP, Bezrookove V, Pattenier H, Heetebrij RJ, Talman EG, Raap AK, Vrolijk J. 1999. New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA: COmbined Binary RAtio labelling. *Eur J Hum Genet* 7:2-11.
- Tirado Y, Williams MD, Hanna EY, Kaye FJ, Batsakis JG, El-Naggar AK. 2007. CRTCl/MAML2 fusion transcript in high grade mucoepidermoid carcinomas of salivary and thyroid glands and Warthin's tumors: implications for histogenesis and biologic behavior. *Genes Chromosomes Cancer* 46:708-715.
- Tjio JH, Levan A. 1956. The chromosome number of man. *Hereditas* 42:1-6.
- Toida M, Balazs M, Mori T, Ishimaru JI, Ichihara H, Fujitsuka H, Hyodo I, Yokoyama K, Tatematsu N, Adany R. 2001. Analysis of genetic alterations in salivary gland tumors by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 127:34-37.
- Toida M, Kato Y, Ohnoma T, Okuda T, Tatematsu N, Oka N. 1992. Benign pleomorphic adenoma associated with large cystic cavity. Review of 26 cases in the literature and discussion of the origin of the cystic cavity. *Hosp Dent, Tokyo* 4:5-8.
- Toida M, Mukai K, Shimosato Y, Ebihara A. 1990. Simultaneous occurrence of bilateral Warthin's tumor and pleomorphic adenoma in the parotid gland. *J Oral Maxillofac Surg* 48:1109-1113.



- Trejo IH, Harwood TR, Goldstein JC, Summers GW. 1972. Oxyphil adenoma four years after a benign mixed tumor. *Arch Otolaryngol* 96:570-572.
- 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. *Hum Pathol* 27:258-262.
- Turnball E, Frazell E. 1969. Multiple tumors in the major salivary glands. *Am J Surg* 118:787-789.
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran 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. *Mol Cell Biol* 16:5276-5287.
- Ueki K, Wen-Bin C, Narita Y, Asai A, Kirino T. 1999. Tight association of loss of merlin expression with loss of heterozygosity at chromosome 22q in sporadic meningiomas. *Cancer Res* 59:5995-5998.
- van Tilborg AA, Groenfeld LE, van der Kwast TH, Zwarthoff EC. 1999. Evidence for two candidate tumour suppressor loci on chromosome 9q in transitional cell carcinoma (TCC) of the bladder but no homozygous deletions in bladder tumour cell lines. *Br J Cancer* 80:489-494.
- Venter DJ, Ramus SJ, Hammet FM, de Silva M, Hutchins AM, Petrovic V, Price G, Armes JE. 2005. Complex CGH alterations on chromosome arm 8p at candidate tumor suppressor gene loci in breast cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 160:134-140.
- Vigliani R. 1990. [Adenolymphoma and microadenolymphoma. Histomorphogenetic considerations]. *Pathologica* 82:637-652.
- Voz ML, Agten NS, Van de Ven WJ, Kas K. 2000. PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res* 60:106-113.
- Voz ML, Astrom AK, Kas K, Mark J, Stenman G, Van de Ven WJ. 1998. The recurrent translocation t(5;8)(p13;q12) in pleomorphic adenomas results in upregulation of PLAG1 gene expression under control of the LIFR promoter. *Oncogene* 16:1409-1416.
- Voz ML, Mathys J, Hensen K, Pendevel 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.
- Voz ML, Van de Ven WJ, Kas K. 2000. First insights into the molecular basis of pleomorphic adenomas of the salivary glands. *Adv Dent Res* 14:81-83.
- Wahl GM, Stern M, Stark GR. 1979. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:3683-3687.
- Wanschura S, Belge G, Stenman G, Kools P, Dal Cin P, Schoenmakers E, Huysmans C, Van den Berghe H, Bartnitzke S, Van de Ven WJ, Bullerdiek 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.
- 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 comparative genomic hybridisation in malignant astrocytoma in children and young adults. *Genes Chromosomes Cancer* 31:15-22.
- Warthin A. 1929. Papillary cystadenoma lymphomatosum. A rare teratoid of the parotid region. *J Cancer Res* 13:116-125.
- Weber A, Langhanki L, Schutz A, Wittekind C, Bootz F, Tannapfel A. 2002. Alterations of the INK4a-ARF gene locus in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *J Pathol* 198:326-334.
- Weimert TA, Work WP. 1976. Bilateral asynchronous mixed tumors of the parotid gland. *Arch Otolaryngol* 102:702.
- 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-p13. *Med Pediatr Oncol* 35:526-530.
- Weiss R, Kramp B, Putzke H-P. 1994. Rezidivierung pleomorpher Adenome in Beziehung zur Subklassifizierung nach Seifert. *Eur Arch Otolaryngol [Suppl]* II Nr. 304.
- Wenig BM, Hitchcock CL, Ellis GL, Gnepp DR. 1992. Metastasizing mixed tumor of salivary glands. A clinicopathologic and flow cytometric analysis. *Am J Surg Pathol* 16:845-858.
- Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, van der Ploeg M, Tanke HJ, Raap AK. 1991. In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res* 19:3237-3241.

- Wild A, Langer P, Ramaswamy A, Chaloupka B, Bartsch DK. 2001. A novel insulinoma tumor suppressor gene locus on chromosome 22q with potential prognostic implications. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5782-5787.
- Williams C. 1980. Bilateral parotid neoplasms. *Plast Reconstr Surg* 66:448-452.
- Willis R. 1960. *Pathology of tumors*. Butterworths, 3rd Edition, London.
- Worsham MJ, Chen KM, Tiwari N, Pals G, Schouten JP, Sethi S, Benninger MS. 2006. Fine-mapping loss of gene architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a), and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132:409-415.
- Wu L, Liu J, Gao P, Nakamura M, Cao Y, Shen H, Griffin JD. 2005. Transforming activity of MECT1-MAML2 fusion oncoprotein is mediated by constitutive CREB activation. *Embo J* 24:2391-2402.
- Wu X, Jia HL, Wang YF, Ren N, Ye QH, Sun HC, Wang L, Liu YK, Tang ZY, Qin LX. 2006. HTPAP gene on chromosome 8p is a candidate metastasis suppressor for human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25:1832-1840.
- Yajin K, Harada Y, Omura R, Sera K, Hirakawa K, Sato S, Kishimoto A, Fujiwara M. 1987. Simultaneous pleomorphic adenomas of the right parotid and ipsilateral submandibular glands. *Auris Nasus Larynx* 14:47-55.
- 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. *Hum Pathol* 27:782-786.
- Yamamoto Y, Virmani AK, Wistuba II, McIntire D, Vuitch F, Albores-Saavedra J, Gazdar AF. 1996. Loss of heterozygosity and microsatellite alterations in p53 and RB genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Hum Pathol* 27:1204-1210.
- Yamamoto Y, Wistuba II, Kishimoto Y, Virmani AK, Vuitch F, Albores-Saavedra J, Gazdar AF. 1998. DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparison of molecular study and p53 immunostaining. *Pathol Int* 48:273-280.
- Yanaihara N, Nishioka M, Kohno T, Otsuka A, Okamoto A, Ochiai K, Tanaka T, Yokota J. 2004. Reduced expression of MYO18B, a candidate tumor-suppressor gene on chromosome arm 22q, in ovarian cancer. *Int J Cancer* 112:150-154.
- Ye H, Pungpravat N, Huang BL, Muzio LL, Mariggio MA, Chen Z, Wong DT, Zhou X. 2007. Genomic assessments of the frequent loss of heterozygosity region on 8p21.3 approximately p22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 176:100-106.
- Yoo GH, Eisele DW, Askin FB, Driben JS, Johns ME. 1994. Warthin's tumor: a 40-year experience at The Johns Hopkins Hospital. *Laryngoscope* 104:799-803.
- Youngs G, Scheuer P. 1974. Histologically benign mixed parotid tumour with hepatic metastases. *J Pathol* 109:171-173.
- 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.
- Zang KD, Singer H. 1967. Chromosomal constitution of meningiomas. *Nature* 216:84-85.
- Zhou CZ, Peng ZH, Zhang F, Qiu GQ, He L. 2002. Loss of heterozygosity on long arm of chromosome 22 in sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 8:668-673.
- Zhu N, Gu L, Findley HW, Chen C, Dong JT, Yang L, Zhou M. 2006. KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia. *J Biol Chem* 281:14711-14718.

## 10 Anhang

### 10.1 Lösungen und Puffer

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

#### **Blocking I:**

5 % BSA in 4xSSC

#### **Blocking II:**

3 % BSA in 4x SSC

#### **Denaturierungsmix (1ml):**

700 µl Formamid<sub>deion.</sub>

100 µl Natriumphosphatpuffer (0,5 M Stammlösung, pH 7,0), -20°C

100 µl 20x SSC

100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

#### **P I (ph 7,5):**

3,0g Tris- HCL

2,175g NaCl

in 250ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen

#### **P II:**

5ml PI + 150mg Blocking- Reagenz

#### **P III (ph 9,5):**

3,0g Tris-HCL

2,125g NaCl

2,5g MgCl<sub>2</sub>  
in 250ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> lösen

**Eindeckmedium:**

0,15 µg DAPI in 1 ml Antifade

**Hybridisierungsmix:**

20 µl Dextransulfat (10 %), -20°C  
20µl NaPO<sub>4</sub> (0,5M, pH 7,0), -20°C  
20µl steriles 2x SSC  
40µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
Lagerung bei -20°C

**Lysispuffer:**

155 mM NH<sub>4</sub>Cl  
10 mM KHCO<sub>3</sub>  
0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA(ph 7,4)

**SE-Puffer:**

75 mM NaCl  
25 mM Na<sub>2</sub>EDTA (ph 8)

**SSC (ph 7,0):**

3 M NaCl  
0,3 M Natriumcitrat

**TE-Puffer:**

10 mM Tris-HCl (ph7,6)  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA

**TN-Puffer:**

0,1 M Tris-HCL (ph 7,6)  
 0,15 M NaCl

**TNT-Puffer:**

0,1 M Tris-HCl (pH 7,6)  
 0,15 M NaCl  
 0,05 % Tween-20

**4T:** 4xSSC/0,1% Triton

**10.2 Geräte und Software**

**Tabelle 10.1: Geräte und Software**

<b>Gerät/Software</b>	<b>Firma</b>	<b>Typ</b>
Mikroskop	Olympus Optical	BX 60
Objektiv	Olympus Optical	Plan Apo 60 X; 1,40 Oil
Quecksilberlampe	Olympus Optical	BH2-RFL-T3 (100W, 19V)
CCD-Kamera	Photometrics	CH 250 (Kamera) CE 200 A (externe Kühlung)
Software	Metasystems	ISIS 2.5
Zentrifugen	Eppendorf	5804R
	Hermle	Z233MK

### 10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Einteilung der Speicheldrüsentumore .....	22
Tabelle 5.1: Fluorochrome mit den zugehörigen Detektionsfiltersets .....	61
Tabelle 6.1: CGH- Ergebnisse pleomorphe Adenome (N= 31).....	67
Tabelle 6.2: CGH- Ergebnisse Warthin-Tumoren (N= 30).....	71
Tabelle 6.3: Vergleich der Ergebnisse FISH- CGH (N=17).....	82
Tabelle 10.1: Geräte und Software .....	130

### 10.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 5.1: Nick-Translationsschema .....	50
Abb. 5.2: DOT-BLOT Farbreaktion.....	52
Abb. 5.3: Prinzip der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH).....	55
Abb. 5.4: Falschfarbenkodierte Darstellung .....	63
Abb. 6.1: Ideogramm der pleomorphe Adenome.....	69
Abb. 6.2: Relative Häufigkeit von Gewinnen und Verlusten bei PA.....	70
Abb. 6.3: Ideogramm der Warthin-Tumore .....	73
Abb. 6.4: Relative Häufigkeit der Gewinne und Verluste bei WT .....	74
Abb. 6.5: Vergleich der relativen Häufigkeit von Veränderungen bei PA und WT (1)...	77
Abb. 6.6: Vergleich der relativen Häufigkeit von Veränderungen bei PA und WT (2)...	78

## **11 Publikationen**

### **11.1 Posterpublikation und Postervortrag**

*Sauter, B., Urbschat, S., Verse, T., Brunner, C. (2006). Vergleichende genomische Hybridisierung benigner Parotistumore*

Vorgelegt bei der 77. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V.. Mannheim,

24.-28.05.2006.

## 12 Danksagungen

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. Bernhard Schick, meinem Betreuer und Doktorvater, für das Korrigieren der Arbeit und konstruktive Verbesserungsvorschläge. Frau Dr. Vivianne Willnecker für die Korrektur und stetige Hilfe bei sämtlichen Problemen und Fragen.

Frau Ulrike Bechtel für die Einführung in die Labortechniken und die praktische Anleitung bei den Versuchen.

Frau PD Dr. Steffi Urbschat und Frau Dr. Silke Wemmert vom Institut für Neurochirurgie für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse und die gute fachliche Beratung und Unterstützung.

Herrn Dr. Christian Brunner von der Klinik für HNO für die Betreuung und die Motivation, auch nach dem Weggang aus der Klinik in die eigene Praxis.

Frau Heike Meinelt für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und das gemeinsame Arbeiten.

Meinem Mann Mirco, für die Unterstützung und Geduld, bei diesem Projekt und bei allen anderen. Meinen Eltern, für die Liebe und Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg.



## 13 Lebenslauf

Name: Sauter  
Vorname: Birgit Gisela  
Geburtsdatum: 26.01.1980  
Geburtsort: Schwäbisch Hall

### Schulbildung :

1986- 1990: Grundschule Hörschbachschule Murrhardt  
1990- 1999: Heinrich-von-Zügelgymnasium Murrhardt,  
allg. Hochschulreife

### Praktika

1999- 2000 : Freiwilliges soziales Jahr Behindertenheim  
Rappertshofen, Reutlingen  
09/ 2000- 03/ 2001: Krankenpflegepraktikum Filderklinik, Filderstadt-  
Bonlanden

### Studium:

Ab 10/ 2001: Medizinstudium Universität des Saarlandes  
08/ 2003: Physikum  
08/ 2004- 01/ 2005: Erasmus-Studienaustausch am Karolinska Institutet  
Stockholm, Schweden  
08/ 2006- 07/ 2007: Praktisches Jahr:  
14.05.2008 2. Ärztliche Prüfung

### Beruflicher Werdegang

Seit 01.07.2008 Assistenzärztin Innere Medizin, Kreisklinikum  
Traunstein