

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Lehrstuhl für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde - Prof. Dr. med. Bernhard Schick

**Molekularzytogenetische Untersuchungen des Zystadenolymphoms mittels CGH
sowie Untersuchung der chromosomalen Region 20q13 und des Zentromers von
Chromosom 20 bei Zystadenolymphomen mittels FISH**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von: Sebastian Schuh

geb. am: 08.10.1982 in Völklingen

Tag der Promotion: 29.04.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. M. Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernhard Schick

Prof. Dr. rer. nat. Klaus Römer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis.....	VI
1 Zusammenfassung / Summary	1
2 Einleitung	3
2.1 Hinführung zur Thematik	3
2.2 Kanzerogenese.....	4
2.3 Das Zystadenolymphom.....	6
2.3.1 Klinisches Bild und Diagnose	9
2.3.2 Therapie	11
2.4 Verfahren der Molekularzytogenetik	12
2.5 Genese des Zystadenolymphoms.....	13
2.6 Die Region #20q13 und <i>ZNF217</i>	18
2.7 Zielsetzung der Arbeit.....	21
3 Material und Methode	22
3.1. Patienten- und Tumorkollektiv.....	22
3.2 Comparative genomische Hybridisierung (CGH).....	24
3.2.1 Blutkultur	24
3.2.2 Chromosomenpräparation.....	24
3.2.3 DNA-Isolierung aus Blut	25
3.2.4 DNA-Isolierung aus Tumorgewebe	26
3.2.5 Nukleinsäurequantifizierung und Reinheitsbestimmung.....	27
3.2.6 DNA-Markierung (NICK Translation).....	28
3.2.7 DOT-Blot	30
3.2.8 Comparative genomische Hybridisierung (CGH).....	31
3.2.9 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate	33
3.2.10 Denaturierung der Chromosomen.....	33
3.2.11 Vorbereitung der DNA	34
3.2.12 Hybridisierung	34
3.2.13 Stringenzwaschung	36
3.2.14 Detektion mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern	36
3.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	39

3.3.1 Blutkultur und Präparation von Metaphasechromosomen.....	39
3.3.2 FISH an Kontrollgewebe.....	40
3.3.2.1 Vorbehandlung der Präparate	40
3.3.2.2 Denaturierung und Hybridisierung der Präparate	40
3.3.2.3 Stringenzwaschung und DAPI-Färbung	42
3.3.2.4 Mikroskopie und Auswertung.....	42
3.3.3 FISH an Tumorgewebe.....	43
3.3.3.1 Vorbereitung der Tumorgewebsproben und Anfertigen von Kryostatschnitt- präparaten	43
3.3.3.2 Anfertigen von Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten.....	44
3.3.3.3 FISH am Tumorgewebeschnitt	44
3.3.3.4 Vorbehandlung der Präparate	44
3.3.3.5 Denaturierung und Hybridisierung der Präparate	45
3.3.3.6 Stringenzwaschung und DAPI-Färbung	45
3.3.3.7 Mikroskopie	46
3.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	46
3.4.1 Bildaufnahmen.....	48
3.4.1.1 CGH	48
3.4.1.2 FISH	48
3.4.2 Bildverarbeitung und Auswertung	48
3.4.2.1 CGH	48
3.4.2.2 FISH	50
3.5. Statistische Auswertung	50
4 Ergebnisse	51
4.1 Ergebnisse der Comparativen genomischen Hybridisierung (CGH).....	51
4.1.1 Patienten - und Tumorkollektiv	51
4.1.2 Deskriptive Analyse der vier hinzugefügten Tumore	52
4.1.2.1 Graphische Darstellung der Fälle 198 und 205 in der CGH	53
4.1.3 Übersicht über das Gesamtkollektiv.....	55
4.1.3.1 Analyse des Gesamtkollektivs.....	55
4.1.3.2 Spezifische Veränderungen und Konsensusregionen	60
4.2 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	61
4.2.1 Patienten- und Tumorkollektiv	61
4.2.2 Ergebnisse der Kontrollhybridisierungen	61
4.3 Ergebnisse der FISH an Tumorproben	64
4.3.1 Ergebnisse der zentromerspezifischen Sonde für Chromosom 20 (#20cen).....	64

4.3.2 Ergebnisse der lokusspezifischen Sonde #20q13	66
4.3.3 Gesamtüberblick über die Ergebnisse der FISH.....	68
4.3.4 Korrelation der Sondenergebnisse	71
4.4 Korrelation der CGH-Ergebnisse zur FISH	74
5 Diskussion	76
5.1 Materialdiskussion	76
5.1.1 Kontrollgewebe: Lymphozyten	76
5.1.2 Tumorgewebe und Tumorgewebeverarbeitung.....	78
5.2 Methodendiskussion	80
5.2.1 CGH	80
5.2.2 FISH	82
5.3 Ergebnisdiskussion.....	85
5.3.1 CGH-Ergebnisse.....	85
5.3.1.1 Gewinne und Verluste im Vergleich	86
5.3.1.2 Aberrationen der Regionen 1p und 19q	87
5.3.1.3 Aberrationen der Regionen 16p, 22q, 13q, 11p und 4q.....	88
5.3.1.4 Einfluss der Region 17p und dem Gen <i>p53</i>	90
5.3.1.5 Die Region #20q13 und <i>ZNF217</i>	93
5.3.2 FISH-Ergebnisse.....	94
5.3.2.1 Aberrationen der Region #20q13	94
5.3.2.2 Einfluss von <i>ZNF217</i> auf den Zellzyklus	97
5.3.2.3 Vergleich der codierenden Regionen von <i>ZNF217</i> und <i>p53</i>	97
5.3.2.4 Aberrationen der Zentromerregion von #20 und mögliche Translokationen ..	98
5.3.2.5 Vergleich von #20q13 und #20cen	100
5.3.3 CGH in Korrelation zur FISH	101
5.4 Ausblick.....	103
6 Literaturverzeichnis	VIII
7 Anhang	XXXI
8 Publikation	XXXVII
9 Danksagung	XXXVIII
10 Lebenslauf	XXXIX

Abkürzungsverzeichnis

#	Chromosom
#20q13	Region 13 des langen Armes von Chromosom 20
#20cen	Zentromer des Chromosoms 20
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, chromogenes Substrat
Bio-11-dUTP	mit Biotin über eine Kohlenstoffkette verknüpft Desoxyuridintriphosphatmolekül
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
cen	Zentromer
CGH	Comparative genomic hybridization (Vergleichende genomische Hybridisierung)
Cl	Chlorid
cm	Zentimeter
COT-DNA	Humane Plazenta-DNA
Cy3	Rhodamin
d.h.	das heißt
DAPI	4-6-Diamino-2-Phenylindiol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Komplexbildner
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinthiocyanat
g	Erdbeschleunigung 9.81 m/s ²
h	Stunde
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
H ₂	Wasserstoff
HCL	Salzsäure
ISH	In-situ-Hybridisierung
K	Kalium
Kb	Kilobasen
M	Molar

Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
m-RNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaCL	Natrium-Chlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, ein Redox Farbstoff
O ₂	Sauerstoff
p53	Regulatorprotein im Zellzyklus
PBS	phosphate buffered saline, (Phosphat-gepufferte Salzlösung, Waschpuffer)
p-Arm	kurzer Arm eines Chromosoms
PFA	Paraformaldehyd
pH	Latein: <i>potentia</i> , für Kraft und Latein: <i>hydrogenium</i> , für Wasserstoff
$\text{pH} = -\log_{10}(a_H)$,	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pRB	Retinoblastomprotein
q-Arm	langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribunuklease
rpm	Rounds per minute
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Saline-Sodium Citrate buffer (Natriumchlorid-Citrat-Puffer, Waschpuffer)
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan plus Ethylendiamintetraessigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
ZNF217	Zink Finger Protein 217 (<i>ZNF217</i> kodierendes Gen)
z.T.	zum Teil

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Überblick über das gesamte untersuchte Tumorkollektiv	23
Tabelle 2:	CGH-Ergebnisse der vier hinzugefügten Tumore mit Fallnummer und genomischer Veränderung	53
Tabelle 3:	CGH-Ergebnisse des Gesamtkollektivs mit Fallnummer und genomischer Veränderung	56
Tabelle 4:	Überblick der Gewinne und Verluste in der CGH der untersuchten..... Zystadenolymphome.....	59
Tabelle 5:	Sondentestung durch Kontrollhybridisierungen mit Signalverteilung in %.....	61
Tabelle 6:	Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontrollhybridisierungen.....	62
Tabelle 7:	Ergebnisse der FISH-Untersuchungen.....	68
Tabelle 8:	Vergleich von CGH und FISH	75

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Knudson's 2-hit Hypothese.....	5
Abb. 2:	MRT-Aufnahmen eines Zystadenolymphomes der rechten Parotis (A) und..... eines pleomorphen Adenoms der linken Parotis (B)	10
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Nicktranslation	29
Abb. 4:	Farbreaktion des DOT-Blot	30
Abb. 5:	Übersichtsschema der gesamten CGH	32
Abb. 6:	Genauere Reaktionsdarstellung des Hybridisierungsschrittes.....	35
Abb. 7:	Detektionsreaktion mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern	37
Abb. 8:	Denaturierung und Hybridisierungsreaktion.....	41
Abb. 9:	Stokes shift	46
Abb. 10:	Falschfarbenkodierte Darstellung der drei verschiedenen Fluorochrome einer.. Metaphase und eines Summationsbildes der einzelnen Farbbilder.....	49
Abb. 11:	Graphische Darstellung der Chromosomen	50
Abb. 12:	CGH-Ratioprofil des Tumors Nr. 198	54
Abb. 13:	CGH-Ratioprofil des Tumors Nr. 205	54
Abb. 14:	Ideogramm der untersuchten Zystadenolymphome	58
Abb. 15:	Prozentuale Angaben zu den Gewinnen und Verlusten auf den jeweiligen..... Chromosomen in Zystadenolymphomen	59
Abb. 16:	Doppelhybridisierung der zentromerspezifischen Sonde #20cen und der..... lokusspezifischen Sonde #20q13	63

Abb. 17:	Graphische Darstellung der Aberrationen der zentromerspezifischen Sonde für Chromosom 20	65
Abb. 18:	Graphische Darstellung der Aberrationen der lokusspezifischen Sonde für Region #20q13	67
Abb. 19:	Fluoreszenzaufnahme mit simultaner Darstellung von #20cen und #20q13 am Tumorgewebschnitt von Tumor Nr. 048.....	72
Abb. 20:	Fluoreszenzaufnahme mit simultaner Darstellung von #20cen und #20q13..... am Tumorgewebschnitt von Tumor Nr. 157.....	72
Abb. 21:	Fluoreszenzaufnahme mit simultaner Darstellung von #20cen und #20q13 am Tumorgewebschnitt von Tumor Nr. 158.....	73
Abb. 22:	Fluoreszenzaufnahme mit simultaner Darstellung von #20cen und #20q13 am Tumorgewebschnitt von Tumor Nr. 200	73
Abb. 23:	CGH Referenzlinie C320 (Kolonkarzinomzelllinie) mit Veränderungen auf Chromosom 8 und 3	78
Abb. 24:	Die Wirkung von <i>p53</i> im Zellzyklus	92

1 Zusammenfassung / Summary

Das Zystadenolymphom ist ein gutartiger Tumor der Glandula parotis, dessen Ätiologie unbekannt ist. Nachdem vergleichende genomische Untersuchungen erste Hinweise auf chromosomale Aberrationen in Form von Gewinnen und Verlusten am Chromosom 20 gezeigt haben, war es die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, das Chromosom 20 mittels der Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) im Zystadenolymphom näher zu charakterisieren. Im chromosomalen Abschnitt #20q13 ist das Zinkfingerprotein 217 (ZNF217) lokalisiert, welches bei Untersuchungen in Mammakarzinom- oder Kolonkarzinomzelllinien starke Amplifikationen gezeigt hat.

4 Zystadenolymphome wurden mittels der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) und 28 Zystadenolymphome wurden mit der FISH-Untersuchungstechnik unter Einsatz einer zentromerspezifischen Sonde für Chromosom 20 in Kombination mit einer lokusspezifischen Sonde für #20q13 untersucht. Bei 8 Tumoren war aufgrund der Gewebsqualität der Tumorschnitte keine FISH-Untersuchung möglich.

In 2 Zystadenolymphomen wurden mittels CGH chromosomale Aberrationen in Form von Gewinnen (Chromosom 1, 2, 11, 16, 19, 22 und X) und Verlusten (Chromosom 2, 3, 4, 13) detektiert. 18 der 20 Zystadenolymphome (90%) zeigten in den FISH-Untersuchungen Monosomien der Region #20q13 und 5 der 20 Tumore (25%) wiesen Gewinne in der Region #20q13 auf. Die Zentromerregion von Chromosom 20 zeigte mittels FISH in 80% (16/20) der untersuchten Tumore Monosomien auf.

Die ausgeführten Untersuchungen beobachteten deutliche Verluste im Zentromerabschnitt des Chromosoms 20 und der Region #20q13 bei Zystadenolymphomen. Die zusätzliche Beobachtung von Gewinnen in der Region #20q13 sind Ausdruck einer Tumorerheterogenität. Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene Befunde vergleichender genomischer Hybridisierungen chromosomaler Veränderungen des Chromosoms 20 in Zystadenolymphomen. Weitere molekularbiologische Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung der detektierten chromosomalen Veränderungen in der Tumorbologie des Zystadenolymphoms zu bestimmen.

1 Summary

Cystadenolymphoma is a benign tumor of the parotid gland, with unknown etiology. After comparative genomic analysis has indicated initial evidence regarding chromosomal aberrations in the form of gains and losses on chromosome 20, the aim of the present scientific work was to characterize chromosome 20 in more detail using the technique of fluorescence in situ hybridization (FISH) in cystadenolymphoma. The zinc finger protein 217 (ZNF217) is located in the chromosomal region #20q13, which has shown strong amplifications in studies in breast cancer or colon cancer cell lines.

4 cystadenolymphomas were examined using comparative genomic hybridization (CGH) and 28 cystadenolymphomas were examined using the FISH examination technique using a centromere-specific probe for chromosome 20 in combination with a locus-specific probe for #20q13. FISH examination was not feasible in 8 tumors due to the tissue quality of the tumor section quality.

In 2 cystadenolymphomas, chromosomal aberrations in form of gains (chromosomes 1, 2, 11, 16, 19, 22 and X) and losses (chromosomes 2, 3, 4, 13) were detected using CGH. 18 of 20 cystadenolymphomas (90%) showed monosomies in region #20q13 by FISH analysis and 5 of the 20 tumors (25%) showed gains in region #20q13. The centromeric region of chromosome 20 showed monosomies by FISH in 80% (16/20) of the tumors examined.

The conducted studies observed distinct losses in the centromere section of chromosome 20 and the region #20q13 in cystadenolymphomas. The additional observation of gains in region #20q13 is an expression of tumor heterogeneity. These results confirm previous findings of comparative genomic hybridizations of chromosomal alterations of chromosome 20 in cystadenolymphomas. Further molecular biological studies are necessary to clarify the consequence of the detected chromosomal alterations in the tumor biology of cystadenolymphoma.

2 Einleitung

2.1 Hinführung zur Thematik

Der Begriff Tumor bezeichnet unabhängig von der Ätiologie (u.a. traumatisch, entzündlich, neoplastisch, habituell) eine umschriebene Volumenzunahme von Gewebe. Im Speziellen wird damit eine Neubildung von Gewebe (Neoplasie) beschrieben, die nach Verlust der Wachstumskontrolle aus körpereigenen Zellen mit ursprünglich intaktem Zellzyklus und damit auch intakter Wachstumsregulation, entstehen. Dieses Basiswissen geht grundlegend auf Theodor Boveri und Mitarbeiter (1903 und 1914) zurück, welcher veröffentlichte, dass bei Neubildungen eine Zunahme der Vermehrungsfähigkeit von Zellen eintritt und in der Folge die Zellen morphologische Unterschiede zum Ursprungsgewebe zeigen. Des Weiteren proklamierte er, dass Tumorzellen nicht als krank im Sinne einer Herabsetzung ihrer Vitalität zu beurteilen sind, sondern vielmehr darin, dass die „Vermehrungsrichtung“ eine Falsche sei. Auch stellte er erste Theorien zur Tumorgenese auf, welche Einflussfaktoren förderlich bzw. kausal verantwortlich für die Tumorentstehung sein könnten, wie z.B. Hitze oder chemische Noxen. Er blieb jedoch grundsätzlich bei der Annahme, dass es innerhalb der Tumorzelle selbst ein Korrelat ihrer Andersartigkeit geben müsse und legte sich auf Veränderungen der Chromosomen fest. Auf diesen grundlegenden Ausführungen (Boveri und Mitarb., 1914), welche sich sachlich als später zutreffend erwiesen, bauten nachfolgende wissenschaftliche Publikationen auf. Der menschliche Chromosomensatz wurde numerisch determiniert (Tjio und Mitarb., 1956), wodurch anhand von numerischen Abweichungen von der Norm erstmals Krankheitsbilder kausal auf chromosomale Unterschiede zurückverfolgt wurden.

Zunächst fußten die Erkenntnisse auf der klassischen Zytogenetik. Erst in der jüngeren Vergangenheit wurden die technischen Möglichkeiten entwickelt, die tiefergehende Einblicke ermöglichten und die Ursprungsgedanken weiter stärkten. So ist der direkte mikroskopische Nachweis chromosomaler Aberrationen grundlegender Bestandteil der Tumorforschung. Weiterhin wurde wissenschaftlich erschlossen, dass veränderte genetische Informationen von einer Mutterzelle auf die jeweilige Tochterzelle im Rahmen der Zellteilung weitergegeben werden können. Ferner wurde darauf hingewiesen, dass Tumorstadium durch exogen bewirkte chromosomale Veränderungen beeinflussbar ist (Wagener und Mitarb., 1996). Durch die weitere Erforschung des menschlichen Erbgutes mittels molekulargenetischer Verfahren konnten einzelne veränderte Gene isoliert dargestellt werden, welche unmittelbar mit der Genese von Tumoren in Verbindung zu bringen waren. So handelte es sich hierbei u.a. um Gene, die Proteine kodierten, welche den zellulären Proliferationszyklus maßgeblich beeinflussten. Boveris Thesen wurden somit weiter gestärkt.

2.2 Kanzerogenese

Grundsätzlich werden Tumore nach ihrer Dignität (Verhalten) eingeteilt. Hierbei unterscheidet man gutartige (benigne) von bösartigen (maligne) Tumoren. Ist ein Tumor etwa durch hohe mitotische Aktivität, infiltratives Wachstum mit Destruktion des ihn umgebenden Gewebes und Metastasierung gekennzeichnet, so kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit einen malignen Tumor diagnostizieren. Von dieser Einteilung nach „sicheren“ Malignitätskriterien müssen jedoch Ausnahmen der Regel beachtet werden. So existieren etwa Borderline-Tumore, wie das Zystadenom des Ovars, bei welchem maligne Gewebsveränderungen mit Zell-, als auch Gewebsatypien vorliegen, wobei jedoch der histologische Beweis infiltrativen Wachstums nicht erbracht werden kann. Auch existieren sogenannte semi-maligne Tumore, wie etwa das Basaliom der Haut, welches lokal sowohl destruktiv als auch infiltrativ wächst, jedoch eine äußerst geringe Metastasierungswahrscheinlichkeit aufweist. Eine spezielle Tumorentität ist das Frühkarzinom, welches ein maligner Tumor mit infiltrativem Wachstum ist. Die Infiltrationstiefe ist zum Diagnosezeitpunkt auf die Tunica submucosa beschränkt. Die Nomenklatur des „Frühkarzinoms“ wird bei Tumoren beispielsweise des Magens verwandt sowie die Begrifflichkeit „Mikrokarzinom“ in Verbindung mit Zervixkarzinomen gebraucht wird. Betrachtet man diese Beispiele, so erschließt sich, dass es zwar generelle Möglichkeiten der Einteilung gibt, jede Tumorentität und ihr Wachstumsverhalten jedoch einzeln zu betrachten und zu bewerten sind.

In der Entstehung von Tumoren lassen sich unterschiedliche Phasen betrachten. Eine Initialschädigung des Genoms kann auftreten. Hierbei können fehlerhafte Zellteilungen in der Keimbahn oder zu einem späteren Zeitpunkt unterschieden werden. Als Beispiel hierzu lässt sich das von Knudson (1971) erforschte Retinoblastom nennen, bei welchem in der autosomal dominant vererbten beidseitigen Form schon ein Allelverlust in der Keimbahn nachgewiesen werden konnte (Lohmann und Mitarb., 1996). Dieser Verlust genetischen Materials kann durch Deletion, non-disjunction, nicht suffizienter Rekombination oder Punktmutationen erfolgen. Auch ist es möglich, dass es zu einem späteren Zeitpunkt durch exogene Noxen, etwa der langjährigen Exposition mit kanzerogenen Giftstoffen (z.B. Nikotin und Alkohol) im Falle des Larynxkarzinoms (Dietz und Mitarb., 2006; Petti und Mitarb., 2010), Nikotin im Falle des Zystadenolymphomes (Allen und Mitarb., 1980) oder UV-Strahlung beim malignen Melanom der Haut (Gilcrest und Mitarb., 1999; Trakatelli und Mitarb., 2010) eine primäre Genomschädigung auftritt. Bei diesen Schädigungen ist eine multilokuläre Entstehung zu berücksichtigen. So etablierte bereits Nordling (1953) eine Theorie von mehrfachen, multilokulären und zeitlich divergierenden Mutationen, die letztendlich zur Tumorgenese führen. Aufbauend auf diese These formulierte Knudson seine „multi-hit“ Hypothese, welche er anhand des Retinoblastoms etablierte. Diese wird in der folgenden Abbildung überblickartig

dargestellt (siehe Abb. 1). Bei dieser Tumorentität wurde nachgewiesen, dass die Neubildung erst dann entsteht, wenn beide Allele eines protein- kodierenden Gens verloren gegangen sind. Hierbei ist anzumerken, dass der erste Allelverlust in der Keimbahn erfolgen kann und der zweite während der weiteren Lebenszeit eintreten kann. Tritt diese Konstellation auf, kann bei den betroffenen Personen schon im Kindesalter eine Tumorentstehung auftreten.

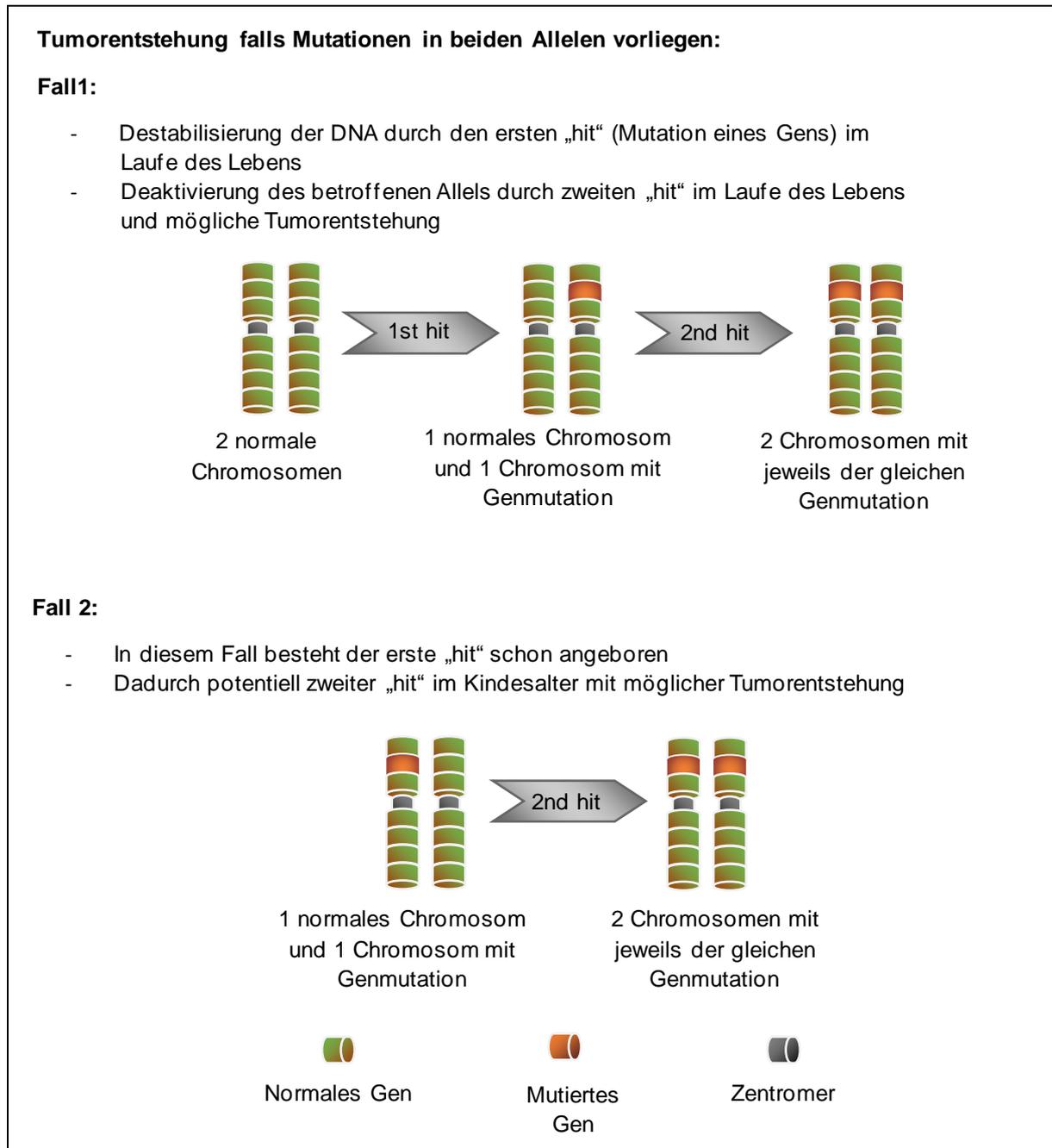


Abb. 1: Knudson's 2-hit Hypothese

An die Initiationsphase schließt sich eine Latenzphase an, welche die Zeit zwischen Initiation und klinischer Manifestation beschreibt. Je nach Tumorentität und Genese kann diese Latenzphase viele Jahre, wie beim Larynxkarzinom in Folge von langjährigem Nikotinabusus, oder nur wenige Jahre betragen. So kommt das papilläre Karzinom der Schilddrüse schon bei Kindern oder Jugendlichen mit nur wenigen Jahren der Latenz nach Bestrahlungen oder nach Umweltexposition in radioaktiv belasteten Gebieten vor (Ron, 2007; Yoskovitch und Mitarb., 1998).

Nach der Latenzphase kommt es zur sogenannten Tumorpromotion. Durch Proliferation wird der Genomschaden von der Mutterzelle auf die Tochterzellen weitergegeben und so die Aberration klonal etabliert.

Letztendlich erfolgt die Tumor-Progression, worunter die vielfache Proliferation der mutierten Zellklone zu verstehen ist, welche sich dann je nach Tumorbiologie mehr oder minder schnell entwickelt. Mit zunehmendem Wachstum wird das neoplastische Gewebe makroskopisch sichtbar und führt zu klinischen Symptomen. Eine gerichtete Therapie kann meist erst ab diesem Stadium erfolgen, da der Tumor eine ausreichende Größe besitzen muss, um diagnostiziert werden zu können.

Histologisch kann man zwar bereits oft während der Latenzzeit erste sich zeigende Veränderungen in Form von Dysplasien (Zellatypien in Verbindung mit reversiblen Differenzierungsverlust, etwa bei der Frühform des Mundbodenkarzinoms) oder Metaplasien (Umwandlung eines ausdifferenzierten Gewebes in ein anderes, wie beim Barrett-Oesophagus: Plattenepithel wird durch Zylinderepithel ersetzt) zeigen. Dies sind jedoch meist Zufallsbefunde, die im Rahmen anderer Eingriffe oder durch Vorsorgeuntersuchungen apparent werden. Meist kann erst ab dem Stadium der Tumorprogression eine gerichtete Therapie erfolgen, da der Tumor erst jetzt durch seine Größenzunahme oder Symptome klinisch erkannt wird.

2.3 Das Zystadenolymphom

Dieser Tumor wird auch als „Warthin's tumour“ bezeichnet. Benannt ist er nach Aldred S. Warthin, einem amerikanischen Pathologen, welcher die beiden ersten Fallstudien über die Tumorentität im „The Journal of Cancer Research“ veröffentlichte (Warthin, 1929). Zuvor war er 1895 erstmals von Hildebrand als Variante einer lateralen Halszyste und 1910 von Albrecht und Arzt als papilläre Zystadenome in Lymphknoten beschrieben worden. Warthin war es, der dieser Tumorentität den Namen papilläres Zystadenom lymphomatosum gab (1929).

Die durchschnittliche Inzidenz von Speicheldrüsentumoren beträgt etwa 5 je 100.000 Individuen (Pinkston und Mitarb., 1999), wobei etwa 65% nach den Daten des Hamburger Speicheldrüsenregisters davon benigne sind. Das Zystadenolymphom wird auch zu den benignen Speicheldrüsentumoren gezählt (Žurek und Mitarb., 2023). Der Anteil der Zystadenolymphome beträgt etwa 3% aller Speicheldrüsentumore (Ellis und Mitarb., 1996) oder 15% aller Tumore der Parotis (Seifert und Mitarb., 1996), wobei die Inzidenz in kleineren Regionen, wie den zentralen Teilen Pennsylvanias (Bundesstaat der USA) bis zu 30% betragen kann (Simpson und Mitarb., 2005). Das Zystadenolymphom ist der nach dem pleomorphen Adenom zweithäufigste gutartige Speicheldrüsentumor und tritt am häufigsten in der Ohrspeicheldrüse auf (Lyu und Mitarb., 2019; El-Naggar und Mitarb., 2017). Eine steigende Inzidenz des Warthin-Tumors ist weltweit zu beobachten (Tunc und Mitarb., 2020). In einer deutschen retrospektiven Studie war das Zystadenolymphom die am häufigsten vorkommende Tumorentität der Parotis (Franzen und Mitarb., 2018). Hierbei erhöhte sich der Anteil am untersuchten Tumorkollektiv von 20,6% (Auswertungszeitraum 1975-1986) auf 44,9% (Auswertungszeitraum 2008-2017). Am häufigsten erkrankten Patienten in der fünften und sechsten Lebensdekade mit einem mittleren Diagnosealter von 62 Jahren (Kotwall, 1992; Pinkston und Mitarb., 1996; Psychogios und Mitarb., 2020). In der Mehrheit der Fälle sind Männer von diesem Tumor betroffen, jedoch konnte in den letzten 50 Jahren eine Zunahme des Zystadenolymphoms bei Frauen beobachtet werden mit einem aktuellen Geschlechterverhältnis (Männer zu Frauen) von 2:1 bzw. 2,3:1 (Simpson und Mitarb. 2005; Ellis und Mitarb., 1996; Ebbs und Mitarb., 1986; Lamelas und Mitarb., 1987; Psychogios und Mitarb., 2020). Die bereits erwähnte Studie von Franzen und Mitarbeitern ergab eine Abnahme des Geschlechterverhältnisses (Männer zu Frauen) von initial 5,3:1 (1975-1986) auf nunmehr 2,1:1 (2008-2017). Als eine mögliche Ursache werden die veränderten Rauchgewohnheiten der weiblichen Bevölkerung mit Zunahme des Anteils der weiblichen Raucher diskutiert. Der Tumor hat eine achtfache höhere Inzidenz bei Rauchern im Vergleich zur Normalbevölkerung (Snyderman und Mitarb., 1986), bzw. weisen 93% der Patienten, die an einem Zystadenolymphom erkranken, eine positive Raucheranamnese auf.

Das Zystadenolymphom imponiert meist als verkapselter Tumor der Ohrspeicheldrüse, welcher sowohl zystische als auch solide Anteile beinhaltet. In der Regel entsteht das Zystadenolymphom am kaudalen Pol der Parotis und besteht aus onkozytären Epithelzelelementen, welche in Doppellayern angeordnet sind. Diese onkozytären Zellen könnten in Zukunft möglicherweise eine Option in der Diagnostik des Zystadenolymphomes darstellen, wie eine veröffentlichte Arbeit von Su und Mitarbeitern (2010) zeigt. Die per Feinnadelaspiration gewonnenen Onkozyten wiesen hier spezielle, nur beim Zystadenolymphom vorhandene Eigenschaften auf (exzentrische, sehr feine Nucleoli), und

stellen somit ein diagnostisches Kriterium dar. Seltene andere Manifestationen etwa in zervikalen oder submandibulären Lymphknoten sind beschrieben (Tascan und Mitarb., 2023)

Zytomorphologisch konnten in einer Studie typisch für die untersuchten Zystadenolymphome unter anderem folgende Charakteristika gezeigt werden: in 92% der Fälle konnten Lymphozyten nachgewiesen werden, in 83% der Fälle onkozytäre Layer und Papillen mit onkozytischen Zellen in 67% der Fälle (Köybaşıoğlu und Mitarb., 2020). Eine neuere Arbeit, welche Onkozyten aus Zystadenolymphomen untersuchte, konnte etwa Veränderungen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase nachweisen, einem Enzym das für die Glycolyse relevant ist und auf Chromosom 12 (12p13.31) codiert ist (Mandic und Mitarb., 2020). Der Tumor entwickelt im Verlauf seines Wachstums sowohl zystische und papilläre Gewebsanteile, als auch stromatöse Areale, welche Lymphgewebe beinhalten. Luminale Zellen innerhalb der Tumore besitzen eine große Ähnlichkeit zu den gestreiften Ausführungsgängen regulären Speicheldrüsengewebes und beinhalten eine große Anzahl an Mitochondrien. Die eher basal orientierten Zellen weisen unterschiedliche Grade der Differenzierung auf und können nach ihrer Zytokeratinexpression als regenerative Zellen beschrieben werden (Schwerer und Mitarb., 2001). Neben diesen epithelialen, zystischen Tumoranteilen liegen auch stromale Areale vor, welche lymphozytäre Infiltrate sowie Lymphfollikel aufweisen, die sich jedoch durch die epithelialen Anteile stark von ihrer normalen Anlage unterscheiden. Des Weiteren ist zu bemerken, dass etwa 8-10% der Zystadenolymphome Areale mit Plattenepithelmetaplasien und regressiven Veränderungen zeigen.

Anhand des Verhältnisses von epithelialen und lymphoiden Anteilen lässt sich das Zystadenolymphom in vier histologische Subtypen einteilen (Masuda und Mitarb., 1994). Beim Subtyp I, dem „typischen“ Zystadenolymphom sind beide Gewebstypen gleich stark ausgebildet. Bei einem Überwiegen der epithelialen Zellen handelt es sich um die „stromaarme“ Form (Subtyp II). Beträgt der Anteil der epithelialen Gewebsabschnitte 20-30% liegt die „stromareiche“ Form vor (Subtyp III). Werden ausgedehnte Plattenepithelmetaplasien festgestellt, handelt es sich um den Subtyp IV.

In seinem Anfangsstadium imponiert das Zystadenolymphom meist asymptomatisch und zeigt ein sehr langsames Wachstumsverhalten. Erst später imponiert das Zystadenolymphom als indolente Schwellung der Ohrspeicheldrüse. In der überwiegenden Mehrheit der Fälle tritt der Tumor einseitig auf, kann aber auch in etwa 4-10% der Fälle beidseitig entstehen (Seifert und Mitarb., 1980; Favia und Mitarb., 1995; Renehan und Mitarb., 1996; Seifert und Mitarb., 1996; Pätz und Mitarb., 1997). In etwa 8% der Fälle kommt es zur Entstehung von Zystadenolymphomen in zervikalen Lymphknoten, der Glandula submandibularis oder dem Larynx (Astor und Mitarb., 1996; Patterson und Mitarb., 1999; Simpson und Mitarb., 2005).

Auch kann ein gemeinsames synchrones Vorliegen etwa mit Adenomen, wie dem pleomorphen Adenom, dem onkozytischen papillären Zystadenom (Kakkar und Mitarb., 2020), unterschiedlichen Typen von Karzinomen oder malignen Lymphomen (Alnoor und Mitarb., 2020) in derselben Ohrspeicheldrüse vorkommen. Es ist weiterhin von großer Bedeutung nach der gestellten Verdachtsdiagnose eines Warthin-Tumors das entnommene Gewebe genau histologisch zu untersuchen, da durchaus neben den benignen Tumoranteilen maligne Tumorbereiche vorliegen können, welche die Prognose des Patienten maßgeblich beeinflussen.

Jedoch bleibt anzumerken, dass eine maligne Transformation eines primären vorliegenden Zystadenolymphoms mit etwa 0.1-2% äußerst selten zu beobachten ist (Foschini und Mitarb., 2005; Skalova und Mitarb., 2005). Eine der überaus seltenen malignen Transformationen stellt etwa die Transformation zu einem Plattenepithelkarziom dar (Kim und Mitarb., 2019). Die überaus größte Mehrheit solcher „maligner Zystadenolymphome“ ist nach einer Studie von Batsakis und Mitarbeitern (1978) auf parallel vorliegende Zweittumore zurückzuführen.

2.3.1 Klinisches Bild und Diagnose

Regulär imponiert das Zystadenolymphom als schmerzlose langsam zunehmende Schwellung präaurikulär (Yoshimura und Mitarb., 1979). Palpatorisch zeigt sich das Zystadenolymphom zystisch bis prall-elastisch und ist glatt begrenzt. Es wird klinisch eine Verdopplung des Tumolvolumens in etwa 9 Jahren beobachtet (Schwalje und Mitarb., 2015). Auch ist das typische Zystadenolymphom etwas weicher, als das häufiger auftretende pleomorphe Adenom. Diese beiden Tumorformen können in Einzelfällen aber schwer unterscheidbar sein. Im Gegensatz zum pleomorphen Adenom besitzt das Zystadenolymphom eine von der Umgebung gut abzugrenzende Kapsel. Eine MRT gestütztes Diagnosemodell zur Unterscheidung der beiden Entitäten, welches maschinelles Lernen einbegreift, liegt aktuell vor (Yang und Mitarb., 2024).

Eine erste differentialdiagnostische, klinische Überprüfung auf Vorliegen eines Malignoms ist durch die Funktionsprüfung des Nervus facialis möglich, wobei eine Parese des Gesichtsnervs ein wichtiges klinisches Zeichen für das Vorliegen einer malignen Infiltration sein kann. Bei einem Zystadenomlymphom ist keine Fazialisparese zu erwarten.

Sonographisch stellt sich das Zystadenolymphom als glatt und scharf begrenzte Raumforderung mit zystischen und soliden Anteilen zum Teil mit bandförmigen Schallauslöschungsphänomenen dar. Das differentialdiagnostische zu bedenkende pleomorphe Adenom hat im Gegensatz dazu eine homogene Binnenstruktur. Die durchschnittliche Ausdehnung des Zystadenolymphomes beträgt etwa 2 x 4 cm (Dietert, 1975;

Vanhaudenarde und Mitarb., 1988; Rehberg und Mitarb., 1998,). Bei eindeutigem klinischem Befund ist keine Probeexzision indiziert, da dieses Verfahren die Gefahr in sich birgt Tumorzellen in unbefallene Drüsenanteile oder das umgebende Gewebe zu verstreuen. Die Gefahr einer Nervenschädigung ist bei einer Probebiopsie zu beachten. Durch eine etwaige histologische Bestätigung ändert sich zudem nichts an der Therapie. Diese besteht in Form einer je nach Befund zu modifizierenden Parotidektomie. In unklaren Fällen ist die Feinnadelbiopsie ein etabliertes Verfahren zur Sicherung der Verdachtsdiagnose, dessen prädiktiver Wert bei 91-98% liegt (Fisher und Mitarb., 2022). Diese kann noch zusätzlich mit einer Tc-99m (Technetium 99m) Szintigraphie kombiniert werden (Nishimura und Mitarb., 2022; Zahran und Mitarb., 2021; Boccato und Mitarb., 1998; Filopoulos und Mitarb., 1998; Tanaka und Mitarb., 1998; Chan und Mitarb., 1992).

Präoperativ kann zur genaueren Eingrenzung und besseren operativen Planung eine MRT durchgeführt werden. In der folgenden Abbildung zweier MRTs, welche ein Zystadenolymphom unter (A) sehr gut darstellt, zum Vergleich unter (B) ein pleomorphes Adenom (siehe Abb. 2).

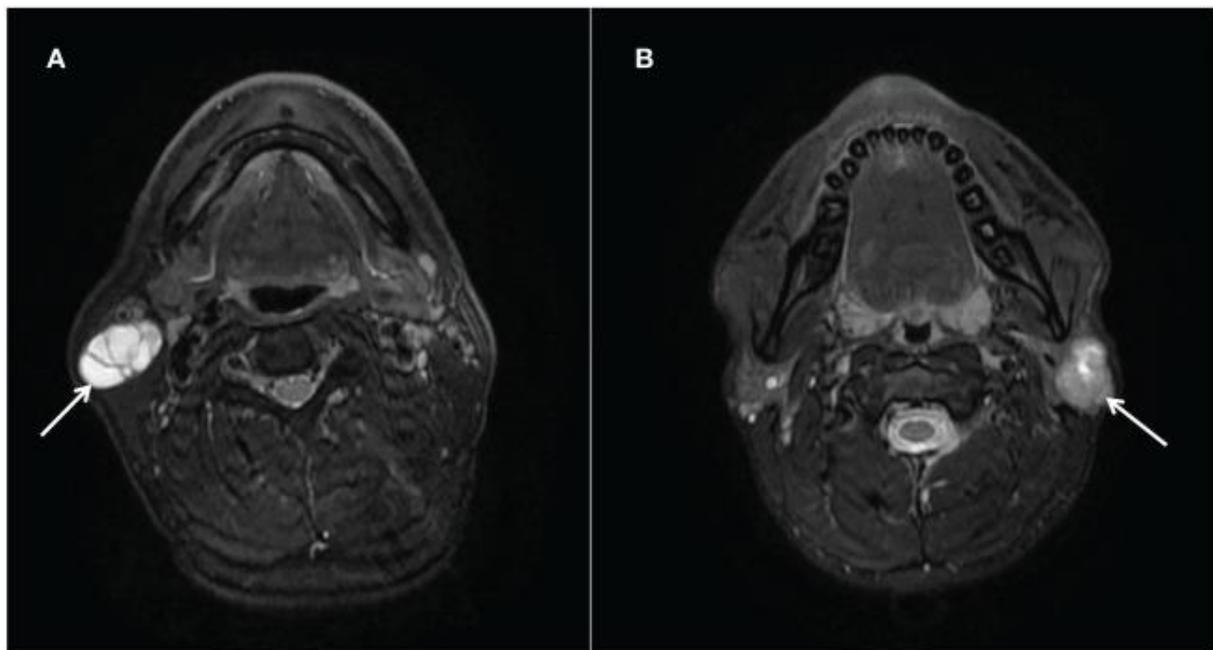


Abb. 2: MRT-Aufnahmen eines Zystadenolymphomes der rechten Parotis (A) und eines pleomorphen Adenoms der linken Parotis (B), (entnommen aus: *frontiers in Oncology*, Yang und Mitarb., 2024). (A) Zystadenolymphom (Pfeil) in der rechten Ohrspeicheldrüse eines 52-jährigen Mannes. Das T2-gewichtete Bild (Achsenabene) zeigt einen Tumor mit deutlich hoher Intensität; Darin ist eine Septierung sichtbar. (B) Pleomorphes Adenom (Pfeil) in der linken Ohrspeicheldrüse eines 26-jährigen Mannes. Das T2-gewichtete Bild (axiale Ebene) zeigt einen leicht hypointensen Tumor. Im oberen Teil des Tumors gibt es unregelmäßige Bereiche mit hoher Intensität.

2.3.2 Therapie

Bei klinisch gestellter und sonographisch, ggf. mit MRT oder Feinnadelaspiration bestätigter Verdachtsdiagnose eines Zystadenolymphomes stellt sich oft die Indikation zur operativen Therapie. Die operative Therapie stellt einen kurativen Therapieansatz dar, der ein mit nur 2-5% äußerst geringes Rezidivrisiko aufweist (Comoretto und Mitarb., 1990; Debets und Mitarb., 1992; Yu und Mitarb., 1998; Williamson und Mitarb., 2000). Je nach Tumorbefund und Patient kann auch ein konservativer Therapieansatz (wait and scan) mit klinischen, sonographischen und radiologischen Kontrollen vorgenommen werden (Borsetto und Mitarb., 2020).

Je nach Lage und Ausdehnung des Tumors wird die Indikation zur lateralen, subtotalen (Leverstein und Mitarb., 1997) oder totalen Parotidektomie gestellt. In der Regel der Fälle genügt eine laterofaziale Resektion zur Resektion des Tumors. Diese Operationstechniken stellen die aktuell am häufigsten vorgenommenen operativen Verfahren dar (Quer und Mitarb., 2021). Als operative Alternativen findet eine extrakapsuläre Dissektion Anwendung (Lee und Mitarb. 2017; Iwai und Mitarb., 2005; Mantsopoulos und Mitarb., 2018). Sollte der Tumorprozess weiter ausgedehnt sein oder sich intraoperativ eine maligne Entartung darstellen, wird eine subtotale oder totale Parotidektomie unter angestrebter Erhaltung des Nervus facialis vorgenommen.

Nach der Exposition der Parotis durch einen S-förmigen Hautschnitt präaurikulär und zentraler Anhebung eines Hautlappens wird zunächst der Nervus facialis zwischen der Pointerspitze des Tragus und dem Musculus digastricus dargestellt, um nachfolgend die Bifurkation des Gesichtsnervs und die weiteren Nervenäste soweit notwendig zu präparieren. Intraoperativ hat sich hier das kontinuierliche Nervenmonitoring als sehr hilfreich gezeigt. Sowohl die laterale Drüsenportion als auch die medialen Drüsenanteile können, falls erforderlich, unter kontinuierlicher Kontrolle der Nervenfunktion mit dem Tumor reseziert werden. Bei Resektion sind die drüsigen Anteile oft mit einem weißlichen oder bräunlichen, cremigen Sekret gefüllt (Limaïem und Mitarb., 2023; Köybaşıoğlu und Mitarb., 2020). Bei Malignomverdacht wird intraoperativ eine Schnellschnitthistologie durchgeführt und die Ausdehnung des Eingriffes dann dementsprechend modifiziert. Risiken der operativen Therapie sind passagere Sensibilitätsausfälle im Operationsgebiet infolge einer Durchtrennung von Hautnerven von in bis zu 64% der Operationen, partielle Fazialispareesen (je nach Literatur 25-40%) oder totale Fazialispareesen bei 1,6-2% (Albosaily und Mitarb., 2020; Tung und Mitarb., 2014; Ruohoalho und Mitarb., 2017). Weitere Komplikationen sind postoperativ auftretende Infektionen (12,8%) oder Speichelfisteln (9,8%). Ebenso kann es zu einem Frey-Syndrom (Kauschwitzen) in bis zu 50% der Fälle kommen, welches erst mit einer Latenz von mehreren Monaten bis zu einem Jahr postoperativ auftritt. (Stewart und Mitarb., 2021; Tung und Mitarb., 2014; Ruohoalho und Mitarb., 2017).

Die operative Therapie stellt derzeit den einzig klinisch fest etablierten, regulär eingesetzten kurativen Therapieansatz in der Behandlung des Zystadenolymphoms dar. Wenn ein Malignom ausgeschlossen ist, wird ein zunächst abwartendes Verhalten ebenfalls für möglich gehalten. Das in Kontrollen wahrnehmbare Wachstumsverhalten und das subjektive Empfinden bilden dann die Grundlage für die therapeutische Entscheidung. In Ausnahmesituationen, wie im Falle einer inoperablen 77-jährigen Patientin, kann bei Tumorwachstum eine alleinige Radiotherapie zur Anwendung kommen (Stallmann und Mitarb., 2001). Der bei ihr vorliegende 7cm große Tumor konnte durch Bestrahlung mit 50 Gy in Vollremission gebracht werden. Eine primäre Bestrahlung wurde in einem weiteren Fall durchgeführt (Yoshimura und Mitarb., 1979). Wenngleich von einer Einzelbeobachtung keine Therapieempfehlung abgeleitet werden kann, ist dieser Ansatz im Einzelfall zu beachten, wenn Patienten eine Operation strikt ablehnen, ein erhöhtes, nicht vertretbares Operationsrisiko vorliegt oder eine erhebliche Gefährdung besteht. Weitere mittlerweile verfügbare Therapieverfahren stellen die Mikrowellenablation, die Radiofrequenzablation oder die ultraschallgesteuerte Ethanol Sklerotherapie dar (Jin und Mitarb., 2019; Tung und Mitarb., 2019; Cha und Mitarb., 2021; Mamidi und Mitarb., 2021). Mit diesen Verfahren konnten etwa Patienten therapiert werden, die sich keiner konventionellen Operation unterziehen konnten oder wollten. Die Reduktion des Tumolvolumens wird etwa durch die Radiofrequenzablation mit 94,3 % angegeben. Facialisläsionen wurden in den erwähnten Studien nicht beschrieben. Allerdings stehen bei diesen neuen Verfahren mit nur kleinen Fallzahlen Langzeitstudien aus. Sie stellen jedoch potentielle alternative Behandlungsoptionen in der Zukunft dar.

2.4 Verfahren der Molekularzytogenetik

Die grundlegenden Techniken, welche die heute vorliegenden Forschungsergebnisse erst ermöglichten, wurden in Form der In-situ-Hybridisierung (ISH) durch John und Mitarbeitern (1969), Pardue und Gall (1969) und der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH, comparative genomic hybridization) von Kallioniemi und Mitarbeitern (1992, 1993, 1994) sowie du Manoir und Mitarbeitern (1993) etabliert.

Die ISH ermöglicht das Einbringen von markierten DNA-Sequenzen, welche sich im biologischen Präparat (in situ) mit ihren jeweils komplementären Basensequenzen des Präparates zusammenlagern. Diese markierten Sequenzen, welche man auch als Sonden bezeichnet, werden spezifisch für die zu untersuchenden chromosomalen Abschnitte hergestellt und mit Fluorochromen markiert, welche die spätere Auswertung ermöglichen. Die Technik der indirekten Fluoreszenzmarkierung durch Pinkel und Mitarbeiter (1986) und die Etablierung der direkten Fluoreszenzmarkierung durch Bauman und Mitarbeiter (1980), sowie

Wiegant und Mitarbeiter (1991) stellen die Grundlage dessen dar, was heute immer noch Anwendung findet. Die ISH und die im Rahmen dieser Arbeit verwandte FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) mit direkt markierten Sonden ermöglichen das Hybridisieren spezifischer Sonden an unterschiedlichen Geweben und Zellen, wie etwa aus Lymphozyten gewonnenen Metaphasechromosomen, Interphasekernen oder zu untersuchenden Tumorgewebschnitten.

Weitere Techniken, die auf der ISH beruhen bzw. diese ergänzen, stellen die chromosomale in-situ suppression (CISS) und das „chromosome-painting“ dar. Die CISS, welche durch Lichter und Mitarbeiter (1988) eingeführt wurde, ermöglicht die Signalunterdrückung repetitiver Sequenzen, da diese Areale das Ergebnis einer FISH verfälschen können. Dies wird durch eine zusätzliche Vorhybridisierung gewährleistet. Ein anderer Ansatz, um repetitive Sequenzen zu blocken, stellt die Zugabe von Plazenta-DNA dar. Das „chromosome-painting“ ermöglicht die Markierung gesamter Chromosomen oder etwa die Rückhybridisierung von Chromosomen auf Metaphasechromosomen nach vorheriger PCR-Amplifikation. Wendet man beide Verfahren gemeinsam an, ist die Rückhybridisierung kompletter Tumorgenome auf Normalchromosomen möglich (Joos und Mitarb., 1993).

Die CGH (comparative genomic hybridization), welche auf der Technik der FISH beruht, ermöglicht eine Aussage über Gewinne und Verluste kodierender Regionen des Genoms im Überblick. So wird im Versuchsaufbau einer CGH, Referenz-DNA (Normal-DNA) und TumordNA nach unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung im gleichen Verhältnis, simultan auf Chromosomen hybridisiert. Folgend kommt es, je nach Kopienzahl des spezifischen Abschnittes zu Über- oder Unterrepräsentation des jeweiligen Bereiches. Dadurch kann etwa eine Amplifikation von onkogencodierenden Bereichen oder die Deletion von Tumorsuppressorgen codierenden Bereichen nachgewiesen werden. Die CGH wurde in der vorliegenden Dissertation eingesetzt, um das Tumorkollektiv grundlegend zu untersuchen und einen Überblick über numerische Veränderungen und interessante Konsensusregionen zu erhalten.

2.5 Genese des Zystadenolymphoms

Die Genese des Zystadenolymphoms konnte trotz verschiedener Forschungsarbeiten bislang nicht geklärt werden. Derzeit werden unterschiedliche Theorien zur Tumorentstehung eines Zystadenolymphoms diskutiert. Die erste Theorie geht von einer adenomatösen Veränderung der Ohrspeicheldrüse aus, welche eine lymphozytäre Infiltration erfährt. Die zweite Theorie legt der Tumorgenese eine Heterotopie zugrunde. Der dritte Ansatz diskutiert eine immunogene Genese.

Die Theorie der adenomatösen Genese gründet sich darauf, dass Zystadenolymphome in frühen Stadien nahezu ausschließlich aus epithelialen Anteilen bestehen, jedoch in späteren Stadien immer mehr Anteile an lymphoidem Stroma aufweisen. Allerdings wurde von Honda und Mitarbeiter (2000) nachgewiesen, dass die lymphozytären Infiltrate polyklonalen Ursprungs sind. Dies steht der allgemein anerkannten Definition entgegen, dass ein Tumor als monoklonaler Prozess zu verstehen ist, welcher sich aus einer einheitlichen Zellpopulation entwickelt. Demnach würde das Zystadenolymphom keinen regulären Tumor darstellen, sondern eher zum Kollektiv der tumorähnlichen Läsionen gezählt werden müssen.

Die Theorie der Heterotopie basiert auf den Thesen von Albrecht und Arzt (1910), welche besagen, dass es zur Entstehung von Zystadenolymphomen kommt, weil eine Speicheldrüsengewebsheterotopie in peri- und intraparotidealen Lymphknoten vorliegt. Dieser Gedanke wird durch die Beobachtung untermauert, dass Speichelganggewebseinschlüsse in lymphoidem Gewebe bei Feten und Kindern beobachtet wurde (Rauch und Mitarb., 1959; Thompson und Mitarb., 1950). Erklärbar ist dies durch die Einwanderung epithelialer Zellen der Mundschleimhaut während der Embryogenese in die sich erst später verkapselnde Parotis. Dies führt zu einem Vorliegen von sozusagen „gefangenen“ intraparotidealen Lymphknoten und Resten von heterotopem Speicheldrüsengewebe in diesen Lymphknoten. Demnach sei der Ursprung des Zystadenolymphomes in diesen epithelialen Einschlüssen zu suchen.

Ein anderer Ansatz diskutiert eine mögliche immunogene Genese (Allegra und Mitarb., 1971). So besteht eine gewisse Ähnlichkeit zwischen Zystadenolymphomen und Schilddrüsengewebe bei bestehender Thyreoiditis vom Typ Hashimoto. Wenn man eine hypersensible Immunreaktion vom verzögerten Typ zugrunde legt, führt diese zu einer Metaplasie der duktaalen Epithelien der Parotis, welche bei weiterem Fortbestehen auch zur Bildung von zystischen Strukturen führen kann. Die zystischen Anteile können wiederum reabsorbiert und phagozytiert werden, was eine Einwanderung von immunkompetenten Zellen voraussetzt. Diese Reaktion zwischen lymphoidalem Stroma und Epithel konnte durch immunhistochemische Verfahren gezeigt werden (Ogawa und Mitarb., 1990). So besteht die Möglichkeit, dass onkozytäre Zellen den eigentlichen Tumor bilden und es erst reaktiv zu einer Hyperplasie des lymphoiden Stromas kommt. Auch konnte von Ogawa und Mitarbeiter (1990) gezeigt werden, dass Infiltrate, die aus dem subepithelialen Raum stammen, große Mengen an Ig-A produzierenden B-Zellen enthalten. Hierbei sind die Epithelzellen des Tumors in der Lage einen Ig-A Transport ins Lumen durchzuführen, was eine große Ähnlichkeit des Tumorgewebes mit intestinalem lymphoidalem Gewebe zeigt. Auch wird in diesem Zusammenhang diskutiert, dass diese epithelialen Zellen des Tumors wie die intestinalen Schleimhautzellen als antigenpräsentierende Zellen fungieren. Damit wären sie maßgeblich

sowohl an der Induktion als auch der Regulation von Immunreaktionen beteiligt. Des Weiteren konnten MHC II (Major histocompatibility complex class II) Antigene und IL-1 (Interleukin-1) innerhalb der luminalen onkozytären Zellen isoliert werden, was eine mögliche antigenpräsentierende Attributierung der luminalen Tumorzellen suggeriert. Hierbei zeigte sich keine Korrelation zwischen hohen oder niedrigen Konzentrationen an T-Lymphozyten und der Menge an MHC-II und IL-2. In diesem Zusammenhang berichteten Kuzenko und Mitarbeiter (2016), dass Sie auf dem Boden immunhistochemischer Untersuchungen nachweisen konnten, dass die epitheliale Komponente des Tumors als Trigger für dessen Wachstum verantwortlich sein könnte und die Ätiologie des Tumors inflammatorischer Genese sein könnte. Weitere Hinweise auf diese immunogene bzw. autoimmunogene Genese liefert eine Arbeit, welche die Interaktion zwischen Stammzellen des lymphoiden Stromas und epithelialen Zellen der Speicheldrüse untersuchte. Hier wird diskutiert, ob eine chronische Veränderung der Zellen durch Tabak oder eine virale Infektion (z.B. Ebbstein-Barr-Virus), als antigenrepräsentierende Zellen fungieren und MHC II exprimieren. Damit könnten sie als Aktivator und Modulator einer autoimmunen Antwort fungieren (Dell Aversana Orabona und Mitarb., 2015).

Es existiert eine große Anzahl von möglichen Risikofaktoren, die eine Tumorgenese triggern, von welchen die Wichtigsten im Folgenden näher beschrieben werden. So konnte bei einer großen Zahl an Zystadenolymphomen EBV-DNA (Ebbstein-Barr-Virus-DNA) nachgewiesen werden. Hier besteht jedoch eine widersprüchliche Studienlage. So gehen Santucci und Mitarbeiter (1993) davon aus, dass eine EBV- Infektion kausal der Tumorgenese zugrunde liegt. Diese Feststellung konnte jedoch von Laane und Mitarbeitern (2002) nicht bestätigt werden. Weiterhin wird der Einfluss des HHV-8 (Humanes Herpes Virus 8) auf die Tumorentstehung des Zystadenolymphoms diskutiert. Veröffentlichte Arbeiten zeigten mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) im untersuchten Kollektiv von 43 Tumoren 19 mit positiven Testergebnissen auf HHV-8 DNA (Dalpa und Mitarb., 2008). Neben den beiden gerade beschriebenen Virusarten werden auch CMV, HHV-6 und HHV-7 oft in Speicheldrüsengewebe isoliert. Eine abschließende Einordnung einer möglichen kausalen Beteiligung an der Tumorentstehung konnte bisher nicht erfolgen. Strahlenexposition stellt einen weiteren ätiologischen Faktor (Saku und Mitarb., 1997) neben dem Vorliegen von Autoimmunerkrankungen dar (Gallo und Mitarb., 1997). Ein anderer Risikofaktor, der nicht derart kontrovers diskutiert wird, ist das Rauchen. Etwa 93% der Patienten welche an einem Zystadenolymphom erkranken weisen eine positive Raucheranamnese auf (Psychogios und Mitarb., 2020) So besteht beim Zystadenolymphom, eine im Gegensatz zu anderen Tumorerkrankungen von Speicheldrüsen, erhöhte Korrelation zum Rauchen (Cadier und Mitarb., 1992; Gallo und Mitarb., 1997; Vories und Mitarb., 1997; Yu und Mitarb., 1998; Chung und Mitarb., 1999). Im Vergleich weist etwa das pleomorphe Adenom nur in 47% der Fälle

eine positive Korrelation zu einer Raucheranamnese auf (Psychogios und Mitarb., 2020). In vielen Zystadenolymphomen konnten onkozytäre Zellen isoliert werden, welche Mitochondrien aufwiesen, die eine deutlich herabgesetzte metabolische Funktion aufwiesen oder stark strukturell verändert waren. Diese Veränderungen treten regulär normalerweise im Zuge des Alterns auf, liegen aber bei Rauchern schon zu einem viel früheren Zeitpunkt vor. Die im Rauch enthaltenen Giftstoffe (z.B. Benzol, Nitrosamine oder Formaldehyd) und vor allem deren reaktive Sauerstoffverbindungen können zu einer Zellschädigung und im Speziellen zu einer Schädigung der mitochondrialen DNA führen (Allen und Mitarb., 1980). Dies konnte in onkozytären Zellen des Zystadenolymphomes gezeigt werden (Lewis und Mitarb., 2000). Durch Rauchen ausgelöste bzw. verstärkte chronische Entzündungsreaktionen und daraus resultierender abnormer mitochondrialer Stoffwechsel über einen zunehmenden Verlust der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) stellen möglicherweise einen zentralen Anteil der Tumorgenese dar (Aoki und Mitarb., 2024).

Hormonelle Einflüsse in der Tumorentstehung werden ebenfalls diskutiert. So konnten Progesteronrezeptoren in Zystadenolymphomen nachgewiesen werden (Teymoortash und Mitarb., 2001), welche dafür verantwortlich sein könnten, dass das männliche Geschlecht häufiger von dieser Tumorentität betroffen ist. Allerdings könnte es sich dabei auch nur um einen Cofounder handeln, da in Relation mehr betroffene Männer als Frauen rauchen und somit eine eindeutige Aussage über eine hormonelle Einflussnahme aussteht. Diese Erkenntnisse bezüglich Nikotinexposition und möglicher hormoneller Einflüsse bestätigten sich in einer klinischen retrospektiven Studie von Teymoortash (Teymoortash und Mitarb., 2001), welche in einer Fallzahl von 96 auf das klinische Bild des Zystadenolymphoms sowie bekannte und bislang nicht bestätigte Risikofaktoren einging.

Die Daten, die aus der Zytogenetik vorliegen, zeigen sowohl reguläre Karyotypen als auch strukturelle und numerische Aberrationen bei Zystadenolymphomen (Martins und Mitarb., 1997). Daher besteht die Vermutung, dass es sich hierbei pathogenetisch um durchaus unterschiedliche Gruppen von genetischen bzw. chromosomalen Veränderungen, bezogen auf das gesamte Tumorkollektiv, handelt. Alle bisherigen zytogenetischen Studien zusammengenommen erreichen eine Fallzahl von annähernd 40 Fällen (Bullerdiek und Mitarb., 1998; Nordkvist und Mitarb., 1994; Martins und Mitarb., 1995; Martins und Mitarb., 1997). Diese Arbeiten zielten darauf ab, einen Überblick über mögliche, gehäufte chromosomale Aberrationen, bzw. Konsensusregionen des Zystadenolymphomes zu erhalten. Hierbei wurde zum Beispiel die Translokation t(11;19) (q21;p13) in einigen Fällen beschrieben, welche ein Fusionsgen erzeugt, bei welchem Exon 1 des CRTC1 (CREB (cAMP response element-binding protein) regulated transcription coactivator 1) Genes mit den Exons 2-5 des MAML2 (Mastermind-like protein 2) Genes fusionieren. Arbeiten, die sich etwa mit

diesem speziellen Lokus befassen (Fehr und Mitarb., 2008) zeigen, dass nur in wenigen Fällen diese Translokation in Zystadenolymphomen nachzuweisen ist. Und wenn sie vorhanden war, sei der Tumor nur grenzwertig von einer anderen Tumorentität, in diesem Falle vom mukoepidermoiden Karzinom, abzugrenzen gewesen. Eine maligne Transformation von Zystadenolymphomen zu Mukoepidermoidkarzinomen wurde diskutiert (Rotellini und Mitarb., 2012; Yan und Mitarb., 2023; Yorita und Mitarb., 2019; Bieńkowski und Mitarb., 2020). In einer neueren Arbeit wird die Relevanz von FISH Studien zur Detektion von MAML2-Veränderungen mit dem Ziel aufgezeigt, das Zystadenolymphom von einem mukoepidermoiden Karzinom abzugrenzen (Zhang und Mitarb., 2020).

Weitere beobachtete Translokationen sind t(11;19) (q21;p12-13) (Martins und Mitarb., 1997), t(6;8)(p23;q22) (Martins und Mitarb., 1995) und t(7;12)(q11;q21) (Mark und Mitarb., 1989). An chromosomalen Veränderungen sind bei Zystadenolymphomen eine Vielzahl an numerischen Aberrationen bekannt, welche jedoch von Tumor zu Tumor erheblich divergieren können und sich bisher als keine die Mehrheit betreffende allgemein vorfindbare Veränderung darstellen ließ.

Es liegen nur wenige Studien vor, die das Zystadenolymphom mittels CGH untersucht haben. Hier fanden sich mit einer gewissen Häufigkeit folgende interessante Konsensusregionen: Verluste auf Chromosom 8 in der Region 8p23.1pter (ANGPT2/Angiopoietin 2 Protein, MCPH1/Microcephalin, PINX1/ *PIN2/TERF1*-interagierender Telomerase Inhibitor 1), Verluste auf Chromosom 17 in der Region 17p13.1 (TP53, Tumoprotein 53) und Chromosom 12 in der Region 12q24.2 (HRK-Gene, oder Harakiri Gen) sowie Gewinne auf Chromosom 5 in der Region 5q15-21.1.1 (PCSK1 Gen, Proprotein convertase subtilisin/kexin Typ 1) (Giefing und Mitarb., 2008; Wemmert und Mitarb., 2014). Verluste des Y-Chromosoms oder des Chromosoms 17 wurden in weiteren Studien beim Zystadenolymphom berichtet (Martins und Mitarb., 1997; Mark und Mitarb., 1989).

Neben den Verfahren der Karyotypisierung und den in dieser Arbeit verwendeten CGH und der spezifischen FISH werden auch andere Methoden, wie die DNA-Durchflusszytometrie angewandt. Hier zeigte sich in einer Arbeit, welche unter anderen Tumorentitäten auch 51 Zystadenolymphome mit dieser Technik auf Aneuploidieraten hin untersuchte, dass alle untersuchten Tumoren wie auch andere benigne Tumore diploid waren (Driemel und Mitarb., 2007).

2.6 Die Region #20q13 und ZNF217

Amplifikationen der Region #20q13 werden in einer Vielzahl unterschiedlicher Neoplasien beobachtet, wie z.B. Tumore der Brust (Courjal und Mitarb., 1997) oder des Ovars (Sonoda und Mitarb., 1997). Des Weiteren zeigte sich bei dieser Veränderung eine deutlich reduzierte Überlebenszeit (De Angelis und Mitarb., 2001), eine erniedrigte tumorfreie Überlebenszeit nach Therapie (Diebold und Mitarb., 2000), und eine deutlich erhöhte Aggressivität des Tumorwachstums bei Brusttumoren (Tanner und Mitarb., 1995; Isola und Mitarb., 1995). Die Tatsache, dass eine Amplifikation dieser Region mit gesteigertem Tumorwachstum einhergeht, legt die Vermutung nahe, dass an diesem Locus verschiedene Tumorpromotorgene lokalisiert sind. In dieser Region sind Gene codiert, welchen tumorwachstumsfördernde Interaktionen zugeschrieben wird: *STK15/BTAK/Aurora2* (Aurora kinase 2), (Sen und Mitarb., 1997; Bischoff und Mitarb., 1998; Ewart-Toland und Mitarb., 2003), *CAS* (von CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-associated), (Brinkmann und Mitarb., 1996; Savelieva und Mitarb., 1997; Peiro und Mitarb., 2002) *BCAS1/NABC1* (von Brain Enriched Myelin Associated Protein 1), (van Dekken und Mitarb., 2006), *PFDN4* (von Prefoldin Subunit 4), (Heidenblad und Mitarb., 2005), *EEF1A2* (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 2), (Lee und Mitarb., 2003), *CYP24* (Cytochrome P450 Family 24), (Albertson und Mitarb., 2000) sowie dem zentralen *ZNF217* (Collins und Mitarb., 1998).

Diese Gene werden bezüglich ihrer Funktionsweise und möglicher Zusammenhänge zur Entstehung maligner Neubildungen näher beschrieben. So steuert die Aurora-2 Kinase, welche durch *STK15* codiert wird, die Progression des Zellzyklus von der G2- zur M-Phase. Des Weiteren regelt es die Formation von Mikrotubuli insbesondere zur Stabilisierung der Spindelpole während der Mitose oder zum Mikrotubuliremodeling während der Neuritenextension (Nigg und Mitarb., 2002). Eine Begünstigung des Tumorwachstums bei Mutation dieses Genes wird in der Literatur diskutiert (Zhou und Mitarb., 1998). Mittlerweile konnte anhand unterschiedlicher Tumorentitäten wie etwa dem Mammakarzinom (Cox und Mitarb., 2006) oder dem Magenkarzinom (Fang und Mitarb., 2010) gezeigt werden, dass eine Überexpression oder ein Polymorphismus der Aurorakinase den Progress von Tumoren deutlich beschleunigt. Das CAS Protein spielt möglicherweise eine Rolle im tyrosinkinasebasierenden Signalweg, der Zelladhäsionsvorgänge steuert, und ist beim Wachstum der Zellen involviert. Des Weiteren wird vermutet, dass CAS die Funktion von Importin alpha im Zellkern bzw. dem Zytoplasma beeinflusst. Tumorsuppressorgenprodukte wie z.B. P53 (Tumor protein 53) oder BRCA1 (Breast cancer type 1 susceptibility protein) Protein (Behrens und Mitarb., 2003) sind wie auch Transskriptionsfaktoren in ihrem Stoffwechsel abhängig von Importin alpha. *p53* gehört zu den am besten erforschten

Tumorsupressorgenen. Seine Hauptfunktionen sind: Induktion der Apoptose und das Stoppen des Zellzyklus, DNA-Reparatur sowie Steuerung des Zellmetabolismus und der Zellalterung (Engeland und Mitarb., 2022; Levine und Mitarb., 2009; Hernández-Borrero und Mitarb., 2021; Lane und Mitarb., 1992). In über 50% der bösartigen Tumore des Menschen ist *p53* mutiert und eine biologische Inaktivierung des Proteins ist zu beachten (Lain und Mitarb., 2003). Auch bei *BCAS1* (breast carcinoma amplified sequence) handelt es sich um ein Gen, welches bei einigen Brustkarzinomzelllinien deutlich amplifiziert vorliegt, aber nicht regelhaft bei allen Mammakarzinomen zu finden ist (Beardsley und Mitarb., 2003). Diskutiert wird, dass es sich dabei um ein Onkogen handelt. Das Protein PFDN4 (Prefoldin 4) stellt einen von 6 Prefoldin Untereinheiten dar, welches einen molekularen Chaperonkomplex bildet, der neu synthetisierte Polypeptide stabilisiert und bindet, wodurch eine korrekte Faltung derselben ermöglicht wird. Dieser Chaperonkomplex besteht aus zwei alpha und vier beta Untereinheiten (Vainberg und Mitarb., 1998). Von *EEF1A2* (eukaryotic translation elongation factor alpha 2) ist bekannt, dass es einen Elongationsfaktor für Proteine codiert und es in der Lage ist, NIH3T3-Fibroblasten zu transformieren, wobei diese Zellen wiederum Tumore in Mäusen hervorrufen (Lee und Mitarb., 2003). Bei *CYP24A1* (cytochrome P450 family 24 subfamily 24 polypeptide 1) handelt es sich um ein Mitglied der Superfamilie der P450 Enzyme. Diese sind Monooxygenasen, welche eine Vielzahl an Metabolisierungsschritten innerhalb der Verstoffwechslung etwa von Medikamenten oder der Synthese von Cholesterin, Steroiden und anderen Lipiden spielen.

ZNF217 schließlich, welches sich in der zentralen Region von #20q13 befindet, scheint das Schlüsselgen dieser amplifizierten Region zu sein, wie Collins und Mitarbeiter (1998) durch Klonierung dieser Region feststellen konnte. Sie vermehrten eine 1Mb Region innerhalb von #20q13, der als Bereich von etwa 260 kb besonders stark bei Mammakarzinomen amplifiziert vorlag. In dieser zentralen Region wurde das Gen *ZNF217* entdeckt. Anschließende Testreihen ergaben, dass es sich bei *ZNF217* um das Hauptgen des Amplikons #20q13 handelt. Neben Tumoren der Brust (Daigo und Mitarb., 2001), ist die Region #20q13 auch in anderen Tumorentitäten amplifiziert, wie Tumore des Magens (Weiss und Mitarb., 2003), des Ovars (Tanner und Mitarb., 2000), des Pankreas (Holzmann und Mitarb., 2004), oder von B-Zelllymphomen (Briest und Mitarb., 2023). Konnte eine Amplifizierung von #20q13 bzw. eine Überexprimierung von *ZNF217* nachgewiesen werden, so war dies mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Littlepage und Mitarb., 2012), welche durch erhöhte Metastasierungsneigung und gesteigerte Invasivität gekennzeichnet war (Koynova und Mitarb., 2007). Des Weiteren konnte anhand von Mammakarzinomzellen gezeigt werden (Nonet und Mitarb., 2001), dass *ZNF217* eine Bedeutung hat, Krebszellen zu immortalisieren, was als entscheidender Schritt der Tumorprogression zu werten ist. Diese durch *ZNF217* immortalisierten Zelllinien zeigten vollkommen stabile Telomerregionen und eine deutlich

erhöhte Telomerase-Aktivität. Diese Wirkung wird zu Teilen *ZNF217* zugeschrieben. Eine Folgearbeit, welche durch Transduktion von *ZNF217* und Zugabe EGF (Epithelial Growth Factor) in immortalisierten Ovarzellen untersuchte, konnte zeigen, dass beide Komponenten benötigt wurden um eine Immortalisierung zu erreichen. War dies jedoch erreicht, war eine weitere Zuführung von EGF nicht mehr notwendig, um ein weiteres Wachstum zu gewährleisten (Li und Mitarb., 2007). Ein durch Zugabe von siRNA induzierter knock-down von *ZNF217* führte zum Arrest des Wachstums, was als Beweis der *ZNF217* Wachstumsabhängigkeit zu werten ist. Des Weiteren zeigten Huang und Mitarbeiter (2005), dass *ZNF217* einen erheblichen Einfluss auf die zelluläre Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen hat. So haben *ZNF217* überexprimierende Zellen eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Doxyrubicin oder Apoptoseeinleitung, hervorgerufen durch Veränderung der Telomerregion.

ZNF217 weist 8 C2H2 Domänen auf, welche an eine spezifische DNA-Sequenz binden, (T/A)(G/A)CAGAA(T/G/C), und damit die Expression von etwa E-cadherin Promotoren unterdrückt oder die Transkription von C-terminalem-Bindungsprotein (CtBP) hemmt (Nunez und Mitarb., 2011; Cassandri und Mitarb., 2017). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass *ZNF217* in den Stoffwechsel von Proteinen eingreift welche in der Region #20q13 codiert sind: AURKA (Aurorakinase A), BCL2L1 (B-cell Lymphom 2 ähnliches Protein 1), sowie eEF1A2 (Elongationsfaktor 1-alpha 2) (Cohen und Mitarb., 2015).

Die Region #20q13 mit ihrem zentralen codierten *ZNF217* stellt also eine äußerst interessante Region dar, welche sich erwiesenermaßen in einigen Tumoren amplifiziert darstellt. Im Falle des Zystadenolymphoms ist eine Untersuchung bezüglich des #20q13 Status bislang ausstehend.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur weiteren chromosomalen Charakterisierung des Zystadenolymphoms zu leisten. Da nur wenige molekulargenetische Erkenntnisse zu diesem Tumor vorliegen, sollte zunächst durch die Ausweitung der molekularzytogenetischen Charakterisierung mittels CGH eine Erhöhung der Fallzahl dieses bislang in nur relativ geringem Umfang mittels CGH untersuchten Tumors erreicht werden. In Anbetracht des heterogenen Tumors ist die Analyse von weiteren Zystadenolymphomen erforderlich, um Konsensusregionen zu erkennen.

Voruntersuchungen an der Klinik und Poliklinik für HNO-Heilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes zeigten spezifische genetische Veränderungen in einem Kollektiv von 30 Zystadenolymphomen, die mittels CGH analysiert wurden (Sauter, 2010; Wemmert und Mitarb., 2014). Hierbei lagen Hinweise auf numerische Veränderungen in der Region #20q13 vor. Zu diesem bestehenden Tumorkollektiv wurden im Rahmen dieser Arbeit 4 operierte Tumore hinzugefügt und ebenfalls mittels CGH charakterisiert. Aus der Gesamtzahl dieser Tumoren war es das Ziel dieser Arbeit, numerische Veränderungen der Zentromerregion von Chromosom 20 und Region #20q13 mit lokusspezifischen Sonden im Rahmen der FISH zu untersuchen. Neben der Überprüfung der in den CGH-Untersuchungen angedeuteten chromosomalen Veränderungen am Chromosom 20 sollte die mögliche Konsensusregion #20q13 überprüft werden mit der Frage nach dem Ausmaß detektierbarer vorliegender chromosomaler Veränderungen im Zystadenolymphom.

3 Material und Methode

3.1. Patienten- und Tumorkollektiv

Untersucht wurden mittels CGH 35 Tumore, welche von 32 Patienten stammten. Die Tumoren wurden mit Fallnummern versehen. Den Fallnummern 045 (Ersteingriff), 058 und 059 (Revisionseingriffe) sowie 205 (Ersteingriff) und 207 (Ersteingriff kontralateral) sind nur zwei Personen zuzuordnen.

Die aufgeführten Tumore stammen von 13 Frauen und 19 Männern. An diesem Tumorkollektiv wurde im Rahmen dieser Arbeit viermal die im Folgenden erläuterte CGH (comparative genomic hybridization) und 28 mal eine FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) durchgeführt.

Die Tumoren mit den Fallnummern 033 bis einschließlich 196 (31 von 35 Tumoren) waren in einer vorangegangenen Arbeit (Sauter, 2010) bereits mittels CGH vorcharakterisiert worden. Hiervon waren 29 in der CGH auswertbar.

Die vier Tumoren mit den Fallnummern von 198 bis 207 wurden im Rahmen dieser vorliegenden Dissertation hinzugefügt und mittels CGH charakterisiert. Einen Gesamtüberblick über das Tumorkollektiv bietet die folgende Tabelle 1.

Tabelle 1: Überblick über das gesamte untersuchte Tumorkollektiv

Fall Nr.	Geschlecht/ Alter bei OP/ OP-Datum	Lokalisation/ Größe [cm]	Fall Nr.	Geschlecht/ Alter bei OP/ OP-Datum	Lokalisation/ Größe [cm]
033	w 79 03.07.2000	k.A.	126	m 58 17.02.2004	R / 5,5x3x2,5
036	w 56	k.A.	133	m 46 09.06.2004	R / 8,5x5x2
040	m 63 24.08.2000	L / 2,8x2x2	138	m 63 19.11.2004	L / 5x2,7x2
043	w 53 28.08.2000	L / 7,5x4,5x2,5	140	m 57 17.01.2005	R / 6x4x3,1
045	m 58 22.09.2000	R / 1,3x1x1	149	m 40 19.04.2005	L / 4x3,1x2,1
048	m 50 27.10.2000	R / 4x2,7x1,3	153	w 63 06.06.2005	L / 5,6x4,8x1,9
055	m 54 02.02.2001	R / 4x4x2	157	w 72 23.06.2005	R / 6x5,2x1,5
058	m 59 02.03.2001	R / 5,5x4x1,5	158	w 56 27.06.2005	L / 5,5x2,9x2,5
059	m 59 15.03.2001	R / k.A.	159	m 67 29.06.2005	L / 4,5x3,1x1,4
064	m 51 30.03.2001	R / 5x3x2,5	164	m 56 20.07.2005	L / 6x2,9x1,5
067	m 57 03.05.2001	R / 5,5x4,5x2,5	189	m 42 20.01.2006	R / 5,2x3,7x2,1
075	w 87 13.12.2001	L / 2,5x3x1,5	190	m 52 31.01.2006	L / 8,9x5,2x4,5
078	w 63 29.01.2002	L / 4,5x4x2,5	196	w 65 03.03.2006	L / 5,4x3,5x2,5
088	m 63 17.07.2002	R / Ca.3x3x3	198	m 78 28.06.2006	L / 2,5x2x1,5
099	w 46 12.11.2002	R / 2,8x3,2x1,3	203	m 72 28.08.2006	L / 9,5x5,4x4,2
100	m 65 14.01.2003	L / 7x4,2x2,3	205	w 57 04.09.2006	R / 2x1,9x1,4
107	w 62 26.08.2003	L / 3x2x1,5	207	w 58 17.01.2007	L / 3,2x4x2,4
108	w 80 05.05.2003	R / 9x8x6			

L: Links, R: Rechts, w: weiblich, m: männlich, k.A.: Keine Angabe

3.2 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH (comparative genomic hybridization) wurde 1992 von Kallioniemi und Mitarbeitern entwickelt. Sie basiert auf dem Prinzip der In-situ-Hybridisierung, mit ihr ist es möglich quantitative, nicht balancierte strukturelle Aberrationen auf Chromosomen nachzuweisen. Es werden gleiche Anteile an Referenz-DNA und Tumor-DNA an Spenderlymphozyten hybridisiert. Zuvor muss verifiziert werden, dass der Spender keine genetischen Auffälligkeiten aufweist und gesund ist. Im Folgenden konkurriert die Spender-DNA und die Tumor-DNA um ihre jeweiligen Bindungsstellen der Chromosomen.

Liegen in der Tumor-DNA Verluste vor (Deletionen) überwiegen die bindungsfähigen Sequenzen der Referenz-DNA, welche an die chromosomalen Bindungsstellen binden. Liegen Gewinne in der Tumor-DNA (Amplifikationen) vor, wird diese vermehrt an die Chromosomen binden. Da beide DNA-Kollektive mit den Haptenen (Biotin und Digoxigenin) markiert wurden, welche eine spätere Bindung von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglichen, lässt sich nun eine Aussage über Veränderungen des Tumorgenoms treffen. Dies geschieht durch die Aufnahme mehrerer Bilder der Chromosomen mittels einer CCD-Kamera (Charge-Coupled Device-Kamera), welche jedes Chromosom einzeln in Graustufen kodiert. Dieses Bildmaterial wird nun digital abgespeichert und mittels einer Bildverarbeitungssoftware (ISIS Metasystems, Altusheim) durch Berechnung der Signalintensitäten ausgewertet. Hierbei werden Veränderungen auf dem jeweiligen Chromosom, welche unter (Verluste) oder über (Gewinne) den errechneten Signifikanzniveaus liegen, in Form eines Ratioprofils dargestellt. Hierdurch lässt sich eine Aussage über numerische Veränderungen in der vorliegenden Tumor-DNA treffen.

3.2.1 Blutkultur

In eine Kulturflasche wurden 8 ml PB-MAX-Medium („Peripheral-Blood“-max Kulturmedium) pipettiert, zu denen 800 µl Lithium-Heparinblut hinzugefügt wurden. Diese Kultur wurde für 72 Stunden bei 37°C und 90% Luftfeuchte mit 5%iger CO₂-Begasung inkubiert. Da sich nach dieser Zeit etwa 45% der Zellen in der S-Phase befinden, also dem mitotischen Maximum, wurden nun 200 µl des Spindelgiftes Colcemid hinzugegeben, um den Zellzyklus zu stoppen. Dann folgte die Inkubation bei 37°C für 2 Stunden.

3.2.2 Chromosomenpräparation

Die Blutkultur wurde resuspendiert und bei 800rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dann wurde der Überstand vorsichtig abgehoben und das Pellet mit der

restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Dann wurde tropfenweise 0,52%, 37°C warmes KCl bis zur Gesamtmenge von 6 ml unter ständiger Resuspendierung auf das Pellet gegeben. Die nun gut durchmischte Suspension wurde für 9 Minuten inkubiert. Dies stellt die Hypotoniebehandlung dar, welche der Aufblähung der Zellen dient. Zentrifugation bei 800rpm für 10 Minuten. Das Pellet wurde mittels Pipette abgehoben.

Die Fixierung der Chromosomen erfolgte, indem tropfenweise eiskaltes Fixans (3 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig -20°C) bis zur Gesamtmenge von 10 ml direkt auf das Pellet pipettiert und sofort gut durchmischt wurden. Dieser Ansatz wurde für 60 Minuten bei -20°C inkubiert, und im Anschluss bei 800upm für 10 Minuten zentrifugiert.

Dann wurde der Überstand entfernt. In einer Menge von 2 ml Fixans erfolgte die Waschung des erhaltenen Pellets. Zentrifugieren für 10 Minuten bei 800rpm. Dieses Waschprozedere wurde so oft durchgeführt bis das Sediment weiß erschien. Im Anschluss wurde das Pellet, entsprechend der jeweiligen Größe, in ca. 1,5 ml Fixans aufgenommen, auf einen Objektträger gebracht und konnte im Anschluss in der FISH oder CGH eingesetzt werden.

3.2.3 DNA-Isolierung aus Blut

Als Referenz-DNA wurde DNA verwendet, welche aus Lymphozyten eines gesunden männlichen Spenders stammten. Diese DNA wurde zunächst aus den gewonnenen Lymphozyten extrahiert. Später fand sie in ihrer gelösten Reinform Verwendung.

Das Vollblut mit den darin enthaltenen Lymphozyten wurde über eine periphere Venenpunktion unter sterilen Bedingungen entnommen und in EDTA-Monovetten überführt. Von diesem Blut wurden 10 ml mit 30 ml Lysispuffer gemischt und für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Zeit war das Gemisch homogen, klar und dunkel gefärbt. Es schloss sich eine Zentrifugation für 10 Minuten, bei 2000rpm an. Der resultierende Überstand wurde verworfen. Es folgte die Waschung in 40 ml PBS und wiederum Zentrifugieren bei 2000rpm für 10 Minuten. Es konnte durch diesen Versuchsaufbau ein sog. „Pellet“ im Überstand erzeugt werden. Dieses wurde separiert und in 4,5 ml SE-Puffer aufgelöst. Zusätzlich wurden dann 0,5 ml SDS hinzu pipettiert und miteinander vermengt. Nun konnten die Proben analog der Aufbereitung von Tumorgewebe weiter behandelt werden

3.2.4 DNA-Isolierung aus Tumorgewebe

Die für die CGH benötigte Tumor-DNA stammte aus kryokonserviertem Tumorgewebe und wurde aus der jeweiligen Tumorprobe extrahiert. Hierzu wurde das Gewebe mechanisch und enzymatisch aufbereitet, um daraus die genomische DNA extrahieren zu können.

Nach der operativen Entnahme des Tumormaterials und sterilen Verbringung desselben wurde es in flüssigem Stickstoff gelagert, um degenerative Vorgänge sowie bakterielle Besiedlung zu verhindern. Im ersten Schritt der Aufbereitung wurde es zerkleinert, was die Gewebsoberfläche vergrößert und dadurch die Effizienz der zugegebenen Verdauenzyme erhöht. Dazu wurden 300-500 mg Tumorgewebe mit 5 ml SE-Puffer (pH 8,0), 0,5 ml SDS (10%) in ein steriles 50 ml Gefäß vorgelegt und vorsichtig durchmischt. Die folgende Aufbereitung erfolgte für Tumor und Blut identisch.

Zunächst wurde eine Spatelspitze Proteinase K zur Suspension hinzugefügt, durchmischt und bei 55°C im Schüttelwasserbad für 2-4 Tage unter kontinuierlicher Bewegung verdaut. Alle 24 Stunden wurde Proteinase K (aus *Tritirachium album*), welches eine Serinprotease ist und Keratin sowie Peptidamide proteolytisch spaltet, zugegeben, bis die Suspension vollständig homogen war. Die Verdauzeit für die Blutsuspensionen lag bei 1-2 Tagen, die der Tumorsuspensionen bei 3-4 Tagen. Im Anschluss wurde vorgewärmte, gesättigte 6 M NaCl-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1,5 M (hier 1,65 ml, 6 M NaCl) hinzu pipettiert. Nun pipettierte man 1 Volumenanteil Chloroform (6-7 ml) vorsichtig am Rande des Gefäßes hinzu, was zur Bildung von 2 Phasen führte. Die Suspension wurde für 1-2 Stunden in einem Überkopfschüttler bei 10rpm bewegt, was der Extraktion der DNA diente. Im Anschluss wurde sie bei 400rpm für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Die DNA befindet sich aufgrund ihres geringen Molekulargewichts in der obersten klaren Phase. Nur etwa 650 Dalton pro DNA-Basenpaar stehen den mehrere 10.000 Dalton wiegenden, in der Lösung enthaltenen Proteine, gegenüber. Diese obere Phase wurde vorsichtig mittels einer schräg gekürzten und somit im Durchmesser vergrößerten Pipettenspitze abgehoben. Dies erfolgte ohne die Interphase zu berühren, da sich in dieser, denaturierte Proteine befinden und somit eine Verunreinigung darstellen würden und wurde in ein neues 50 ml Gefäß überführt. Die Pipettenspitze wurde gekürzt, um einer akzidentiellen Fragmentierung oder Scherung der DNA beim Abheben vorzubeugen und den Fluss zu homogenisieren.

Nun wurde 1 Volumenteil 100% Isopropanol, -20°C, zur DNA-Lösung hinzugegeben und vorsichtig miteinander vermischt. Dies führte zum Ausfällen der DNA als weiße, knäuelartige Struktur, wobei dieser Ansatz zur effektiveren DNA-Fällung über Nacht bei -20°C gelagert wurde. Die hochmolekulare DNA wurde über Nacht bei -20°C in 500-1000 µl 70% Ethanol

eingbracht. Durch diesen Schritt wird die Aufreinigung der DNA erzielt. Dieser Schritt wäscht RNA und Reste der verwandten Präparationslösungen aus der Suspension heraus.

Die DNA wurde aus dem 70% Ethanol entnommen, in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in einem Exsikkator getrocknet bis das Ethanol vollständig entfernt war.

Das DNA-Pellet wurde es in sterilem TE-Puffer, pH 8,0 aufgelöst. Je nach Größe des DNA-Pellets in einer Menge von 100 µl bis hin zu 500 µl. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Wenn keine Ausfällung nach Hinzufügen des Isopropanols zu verzeichnen war, erfolgte eine Zentrifugation der DNA bei 4000rpm für 20 Minuten. Der Überstand wurde in der Folge abgehoben und in 400 µl TE-Puffer, pH 7,0 eingebracht. Der folgende Arbeitsschritt zum Lösen der DNA erfolgte wahlweise entweder bei 65°C (20 Minuten) oder bei 4°C (60 Minuten). Nach dem Lösen der DNA wurden 40 µl 3 M NaAc, pH 7,0 und 800 µl 100% Ethanol bei -20°C hinzugegeben was zur Fällung der DNA führte. Weiter oben ist das Weiterverarbeitungsprotokoll der DNA bereits aufgeführt. Es schloss sich wiederum ein Reinigungsschritt über Nacht an. Dieser wurde bei -20°C mittels 70% Ethanol durchgeführt. Die Weiterverarbeitung erfolgte unter dem initialen Protokoll.

3.2.5 Nukleinsäurequantifizierung und Reinheitsbestimmung

Diese Konzentrationsbestimmung ist von großer Bedeutung, da es in der folgenden CGH wichtig ist, möglichst gleiche Mengen an Tumor- und Referenz-DNA zu verwenden. Auch wurde somit getestet, ob sich Verunreinigungen in der Lösung befanden, welche die Ergebnisse der CGH beeinflussen können.

Die Referenz-DNA und Tumor-DNA wurden in jeweils in 1 µl TE-Puffer gelöst. Diese Suspension wurde in 99 µl H₂O_{dd} in einer Mikroküvette hinzugefügt. Es folgte der Nullabgleich der Suspension mit 100 µl H₂O_{dd}. Mittels Spektralphotometer wurden bei 260 nm und bei 280 nm die jeweiligen Absorptionen der Suspensionen gemessen. Der Nullabgleich erfolgte wieder mit 100 µl H₂O_{dd}. Hieraus ließ sich die DNA-Konzentration der jeweiligen Lösung ermitteln, wobei sich der Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration der untersuchten Lösung und ihrer Lichtabsorption linear darstellt [Konzentration (K) = Absorption (a) x Faktor (F)]. Beträgt die Konzentration einer DNA-Lösung 50 µg/µl, wird das Licht zu 90% absorbiert. Die Messung erfolgte mit Licht von 260 nm Wellenlänge. Somit ließ sich durch die Lichtabsorptionsmessung bei 260 nm die vorliegende DNA-Konzentration ermitteln.

3.2.6 DNA-Markierung (NICK Translation)

Im Folgenden wurden Referenz- und Tumor-DNA über Einbau von Biotin und das Hapten Digoxigenin markiert, was die spätere Anlagerung der Fluoreszenzfarbstoffe ermöglichte. Im Versuchsaufbau wurden Biotin-dUTP (an Tumor-DNA) und Digoxigenin-11-d-UTP (an Kontroll-DNA) zur Markierung der DNA verwendet. Die Bindungsstelle des Biotin-dUTP ist die C4-Position des Pyrimidinringes, die des Digoxigenin-11-d-UTP ist die C5-Position des Uridinnukleotids. Für die Nick-Translation kamen jeweils ein Dig-Nick-Translationsmix, sowie ein Biotin-Nick-Translationsmix zum Einsatz, welche bereits Biotin-, Digoxigenin-markierte und nicht markierte Nukleotide, Enzyme, sowie Ionen-, und Pufferlösungen beinhaltete. Während der Nick-Translation wurden durch die Aktivität der DNase I in die Kontroll-DNA mit Digoxigenin-markierte und in die Tumor-DNA mit Biotin-markierte Nukleotide eingebaut. Diese erzeugten in der Gegenwart von Mg^{2+} an randomisiert verteilten Loci der vorliegenden DNA, als „nicks“ bezeichnete Einzelstrangbrüche. Hier griff dann DNA-Polymerase I (aus *Escherichia coli* synthetisiert) an den 3' OH-Enden dieser „nicks“ zur 5'-3'-DNA Synthese an. Diese erfolgte dann komplementär zum intakten DNA-Strang. Währenddessen wurden die Nukleotide in Syntheserichtung durch die DNA-Polymerase I entfernt (5'-3'-Exonucleasekomponente). Parallel dazu entfernte die 5'-3'- Exonucleasekomponente der DNA-Polymerase I die Nukleotide in Syntheserichtung. Die hierdurch abgebauten DNA-Areale wurden im Folgenden durch die markierten Nukleotide ersetzt. Der Reaktionsablauf ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

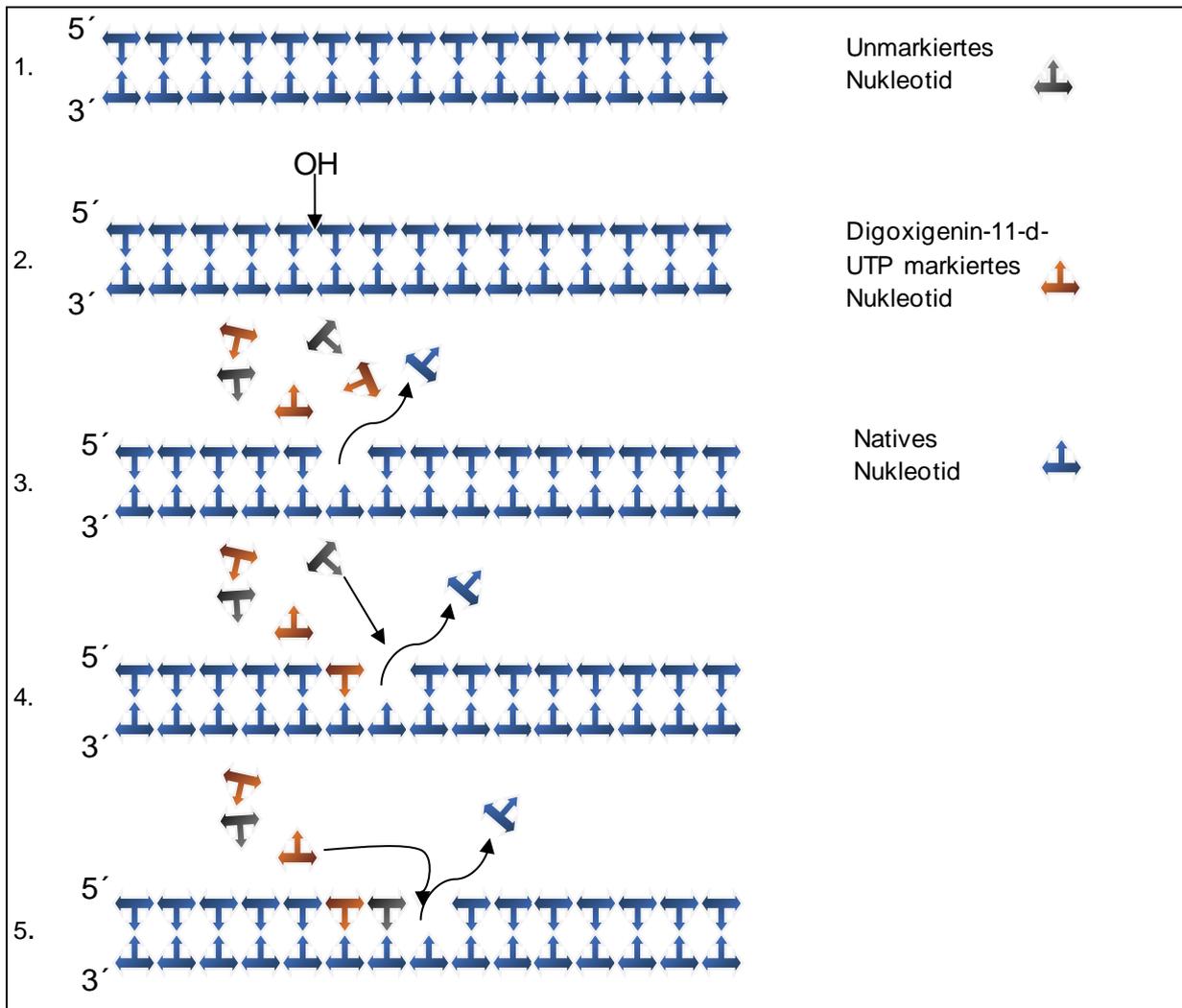


Abb. 3: **Schematische Darstellung der Nicktranslation.** 1. Durch die DNase1 und die DNA-Polymerase können Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) in den DNA-Doppelstrang eingebaut werden. 2. Durch die Einwirkung von DNase 1 wird ein Einzelstrangbruch erzeugt (Nick). Dadurch werden 3'OH-Gruppen exponiert. 3. Beginnend vom Nick aus werden Nucleotide mittels DNA-Polymerase I entfernt (Exonucleasekomponente). 4. Neue dNTPs werden beginnend am 3'-OH-Ende des Nicks integriert (DNA-Polymerasekomponente). 5. Durch die konsekutive Wirkung der beiden DNA-Polymerasekomponenten entsteht ein neuer komplementärer DNA-Strang. Hierbei werden auch die markierten Nucleotide mit integriert und können später detektiert werden.

Zunächst wurden zur Markierung der Tumor-DNA und der Referenz-DNA Translationsmixe hinzugegeben. Korrespondierend wurden jeweils 1 µg DNA (Tumor-DNA oder Referenz-DNA) mit 4 µl Biotin-Nick-Translationsmix (Roche, Mannheim) oder 4 µl Digoxigenin-Nick-Translationsmix (Roche, Mannheim) in Reaktion gebracht und mit H₂O_{dd} bis auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde kurz zentrifugiert und dann für 90 Minuten bei 15°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 EDTA mit pH 8 nach 90 Minuten gestoppt. Es folgte eine Inkubation bei 65° für 10 Minuten. Ausfällung der DNA durch die Addition von 2,1

µl 3 M Natriumacetatlösung in Kombination mit 46 µl 100% Ethanol. Nun Zentrifugation für 25 Minuten, 14.000rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet. Über Nacht wurde das Pellet in 10 µl H₂O_{dd} gelöst und bei 4°C gelagert.

3.2.7 DOT-Blot

Das in der Nick-Translation implementierte Biotin und Digoxigenin wurde nun durch den DOT-Blot semiquantitativ nachgewiesen. Dies geschah durch die Inkubation eines Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugats (Biotin-Nachweis) bzw. eines Antidigoxigenin-alkalische-Phosphatase-Konjugats (Digoxigenin-Nachweis), welche an die eingefügten Nukleotidsequenzen binden. Das zugegebene BCIP (5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat) erzeugt ein blaues Präzipitat, was den Farbreaktionsverstärker NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz) reduziert. Hieraus entsteht Indigo (blauer Farbstoff) durch die ablaufende Dimerisierungsreaktion. Durch Reduktion von NBT zu Diformazin (violett) entsteht der zweite Farbstoff. Beide zusammen spiegeln die Quantität der eingebauten Nukleotide in der DNA wieder. Die chemischen Vorgänge dieser Farbreaktion sind in Abbildung 4 veranschaulicht.

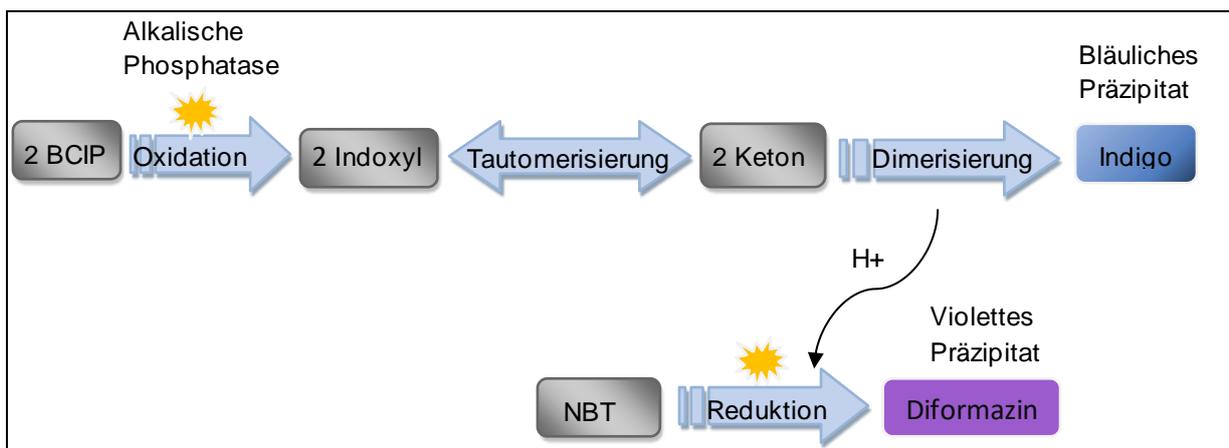


Abb. 4: **Farbreaktion des DOT-Blot.** Überführung von BCIP (5-Bromo-4-Chloro-Indolylphosphat, chromogenes Substrat) in Indoxyl (Derivat von Indol und Vorstufe von Indigo) durch Oxidation. Dieser wird durch Tautomerisierung (durch Umlagerung von Atomen bzw. Elektronenverschiebungen Wechsel der strukturellen Form) hin zu einem Keton überführt, welches durch Dimerisierung (Zusammenlagerung zweier Monomere zu einem Dimer) zu Indigo wird (blaue kristalline organische Verbindung, Farbstoff). Reduktion von NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz, Farbstoff) zu Diformazin (Farbstoff), (nach Brunner, 2000, Promotion).

Von der zuvor markierten DNA wurde eine Verdünnungsreihe erzeugt. Hierzu wurden auf einen Parafilm 19 µl 6xSSC geträufelt zu dem dann 1 µl der jeweiligen Probe pipettierte. Die Vermischung erfolgte mittels Pipette durch vorsichtiges, repetitives aufziehen und ausdrücken. Von dieser Verdünnung wurde nun wieder 1 µl in den nächsten Tropfen 6xSSC überführt und resuspendiert, etc. bis alle Reaktionsansätze bearbeitet waren.

Pro Verdünnungsstufe wurde 1 µl pipettiert und auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht. Im Anschluss wurde diese für 30 Minuten per Auto-Cross-Link bei 90°C, ultraviolettem Licht der Energie 1,2 J ausgesetzt. Die Nitrozellulosemembran wurde dann zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 30 Minuten in Pufferlösung II eingelegt (5 ml bei 37°C). Im Anschluss daran wurde mit 5 ml Pufferlösung I für 2x2 Minuten gewaschen. Dann wurden 3 µl Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat bei der Tumor-DNA bzw. 3 µl Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase bei der Normal-DNA, jeweils in 3 ml Pufferlösung I pipettiert. Dies wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. In der Folge wurde die Membran jeweils in 5 ml Pufferlösung I 2x gewaschen (30 Minuten bei Raumtemperatur). Dann wurde die Membran für den Zeitraum von 10 Minuten in Pufferlösung III eingelegt. Dann Inkubation der Membran in einer Lösung aus 33 µl BCIP, 45 µl NBT und 5,7 ml Puffer III, für 30 Minuten in Dunkelheit und Schüttelbad. Zum Stoppen der Reaktion wurde 70% Brennspiritus hinzugegeben und die Membran im Dunkeln getrocknet.

3.2.8 Comparative genomische Hybridisierung (CGH)

Nun erfolgte die eigentliche CGH. Die folgende Abbildung (siehe Abb. 5) stellt einen zusammengefassten Gesamtüberblick mit den unterschiedlichen Arbeitsschritten der CGH dar.

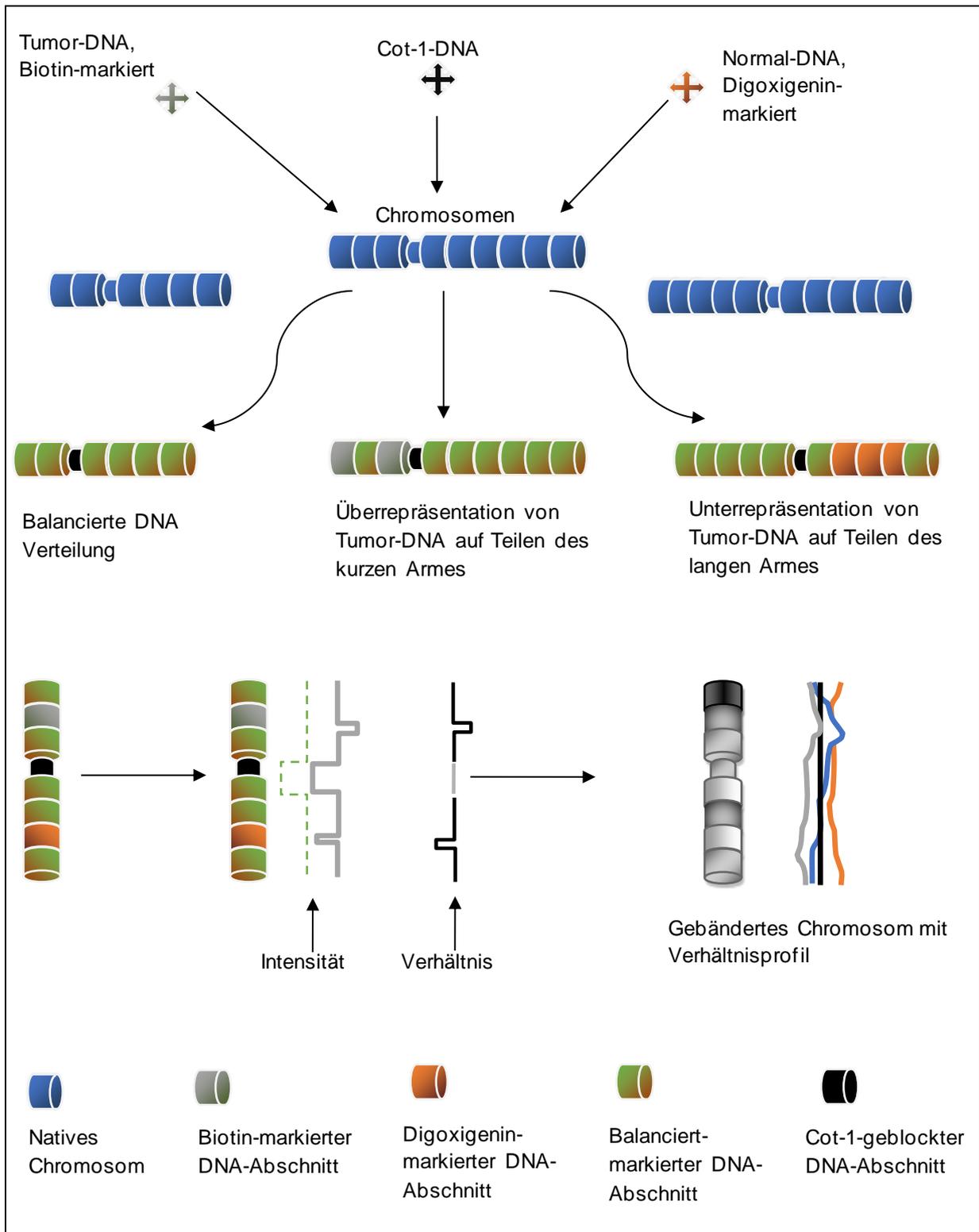


Abb. 5: **Übersichtsschema der gesamten CGH.** Hybridisierung von Tumor-DNA markiert mit Biotin, Cot-1-DNA (plazentare DNA) und Digoxigenin-markierter normaler DNA an Chromosomen. Cot-1-DNA bindet an den Zentromeranteil. Tumor-DNA und normale DNA bindet nun komparativ an die Chromosomen. Durch Markierung der unterschiedlichen DNA mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können durch Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen unterschiedliche Farbsignale erzeugt werden, aus denen dann aufgrund der unterschiedlichen Intensität in unterschiedlichen Arealen der Chromosomen Verhältnisprofile der unterschiedlichen Chromosomen erzeugt werden können.

3.2.9 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Es erfolgte erst eine Aufreinigung der Präparate von störenden Bestandteilen, die zu fehlerhaften Bindungen führen können sowie einer enzymatischen Vorbereitung der zellulären Strukturen, um die Chromosomen freizulegen.

Um unspezifische Hybridisierungen von fragmentierter RNA zu blocken, wurde RNase-Verdau vorgenommen. Die Präparate wurden zuvor in 2xSSC kurz gewaschen. Auf das Präparat wurden 1 µl RNase-Stammlösung (10 mg/ml Aqua dest.) und 99 µl 2xSSC getropft und selbiges mit einem Deckgläschen bedeckt. Inkubation der Präparate in einer feuchten Kammer für 20 Minuten bei einer Temperatur von 37°C. Nach Entfernung des Deckgläschens wurde der Objektträger mit Präparat auf einem Schüttler für 3x5 Minuten in 2xSSC gewaschen. Dann wurde er für 90 Sekunden bei 37°C in eine Küvette eingestellt. Diese war mit 100 ml 0,01 M HCL-Lösung und 100 µl 5% Pepsin in H₂O_{dd} befüllt. Dies diente dazu, die Chromosomen der Hybridisierung leichter zugänglich zu machen, da verbliebene Gewebsreste und Proteine entfernt wurden. Das Präparat wurde nun bei Raumtemperatur in PBS für 5 Minuten gewaschen. Dann erfolgte die Fixierung für 10 Minuten bei 4°C in 4% PFA/PBS. Dieser Schritt soll das Chromosomenpräparat der Denaturierung stabilisieren. Dadurch wird einem Verlust von DNA vorgebeugt. Es folgte eine Waschung in PBS für 5 Minuten. Dann folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe der Konzentrationen 70%, 80% und 96%. Abschließend wurde das Lymphozytenpräparat für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.10 Denaturierung der Chromosomen

Die Denaturierung diente der Überführung der Chromosomen und somit der DNA in Einzelstränge. Dies ermöglichte, dass die später zugegebene Tumor- bzw. Referenz-DNA während der Hybridisierung an die komplementären Bindungsstellen binden konnte. Dem Präparat wurden 100 µl Denaturierungsmix (70% Formamid/ 2xSSC) aufpipettiert und blasenfrei abgedeckt. Der Objektträger wurde für 1,5 Minuten auf eine 72°C erwärmte Heizplatte aufgelegt. Dieses hemmte die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der DNA und wirkte somit destabilisierend. Je zugesetztem Volumenprozent an Formamid wurde die benötigte Schmelztemperatur T_m, welche benötigt wurde, um die DNA-Doppelhelix in komplementäre DNA-Einzelstränge zu überführen, um 0,72°C herabgesetzt. Die Schmelztemperatur T_m lässt sich mittels folgender Gleichung nach Leitch und Mitarbeitern (1994) berechnen:

$$T_m = 0.41 (\% \text{Guanin} + \text{Cytosin}) + 16.6 \log (\text{mol Na}^+ / \text{l}) - 55/n - 0.61 (\% \text{FA}) + 81.5^\circ \text{C}.$$

Um eine sichere Denaturierung zu erreichen wurde die Denaturierungstemperatur so gewählt, dass sie 30°C über der errechneten Schmelztemperatur lag. Die folgende Denaturierung erfolgte nach Abheben des Deckgläschens für 5 Minuten pro Schritt in einer Alkoholreihe der Konzentrationen 70%, 80% und 96%, welche eisgekühlt war. Dann wurde das Präparat für mindestens 30 Minuten getrocknet.

3.2.11 Vorbereitung der DNA

Die vorbereitete DNA (Tumor- und Referenz-DNA) wurde zusammen mit Cot-1-DNA, welche im Überschuss zugegeben wurde und der Blockung repetitiver Sequenzen diente, zusammengeführt. Zu viel Cot-1-DNA beeinträchtigt jedoch die Hybridisierung. (Lichter und Mitarb. 1988). 9 µl biotinylierte Tumor-DNA (1 µg/ µl) und 9 µl digoxigenerter Referenz-DNA (1 µg/ µl) sowie 60 µl Cot-1-DNA (1 ng/ µl) wurden mit 10 µl ssDNA (1:10 Boehringer, Ingelheim, single-strandedDNA) und 8,8 µl 3 M Natriumacetat pH 5,5 vermischt. Die Fällung der DNA erfolgte über Nacht bei -20°C in 220 µl Ethanol. Es folgte die Zentrifugation des DNA-Gemischs mit 14000rpm für 20 Minuten bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Nun wurde eine Waschung mit 200 µl, -20°C kaltem, 70% Ethanol durchgeführt und eine Zentrifugation mit 14000rpm für 15 Minuten bei 4°C vorgenommen. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in einem Exsikkator für 30 Minuten getrocknet. 5 µl deionisiertes Formamid wurden zum Pellet pipettiert mit folgendem Schütteln für 45 Minuten. Dann wurden zusätzlich 5 µl 4xSSC/20%DS zugefügt, mit Endkonzentration von 50% Formamid, 2xSSC, 10% DS und erneut für 45 Minuten geschüttelt. Es schloss sich eine Denaturierung der DNA-Proben welche im Hybridisierungsmix gelöst waren an. Dies erfolgte für 5 Minuten in einem 75°C heißen Wasserbad. Es folgte ein Pre-annealing von 30 Minuten bis zu einer Stunde in einem Wasserbad bei 37°C.

3.2.12 Hybridisierung

Nun konnte die Hybridisierung durchgeführt werden, indem 10 µl DNA-Hybridisierungs-Mix auf das getrocknete Präparat aufpipettiert wurde und dieses dann luftblasenfrei mit einem Deckgläschen abgedeckt wurde. Das Präparat wurde unter Zuhilfenahme von Fixogum komplett abgedeckt und für drei Tage in einer feuchten Kammer bei 37°C hybridisiert. Hierbei lagert sich die zugeführte Tumor- bzw. Referenz-DNA an die Chromosomen je nach anteiligem Vorkommen an und stellt somit den Hauptreaktionsschritt der CGH dar, welcher in Abbildung 6 genau dargestellt wird.

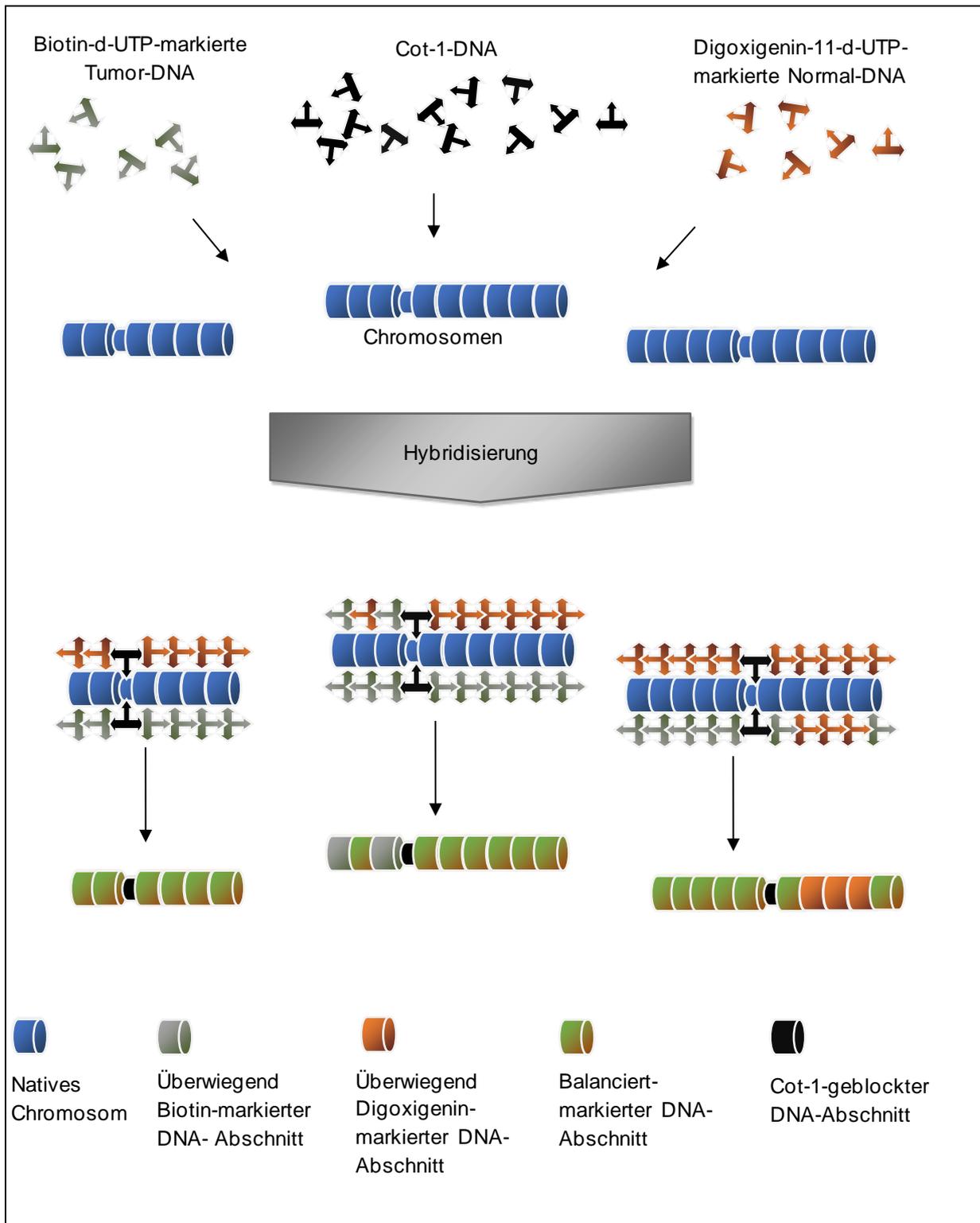


Abb. 6: **Genaue Reaktionsdarstellung des Hybridisierungsschrittes.** Anlagerung der markierten Tumor-DNA mit Biotin-d-UTP-(Biotinyliertes Desoxyuridintriphosphat, DNA-Marker) markiert, Digoxigenin-11-d-UTP-(Digoxigeninnyliertes Desoxyuridintriphosphat, DNA-Marker) markierte Normal-DNA sowie COT-1-DNA (Plazenta-DNA) an die Chromosomen in der Hybridisierung auf einem Objektträger. Die DNA lagert sich je nach vorhandener Menge konkurrierend an die Chromosomen an, woraus unterschiedliche Verteilungsmuster resultieren.

3.2.13 Stringenzwaschung

In der folgenden Stringenzwaschung wurden falsche oder nur teilweise gebundene DNA-Moleküle entfernt, indem eine kationenarme Umgebung erzeugt wurde, wodurch sich die anionischen DNA-Phosphatgruppen gegenseitig abstießen. Zunächst erfolgte die Entfernung des Fixugums und das vorsichtige Abheben des Deckgläschens vom Präparat. Dann wurde das Präparat in 50% FA/2xSSC für dreimal je 5 Minuten bei 45°C eingelegt. Nun wurde das Präparat bei Raumtemperatur für 5 Minuten in 0,1xSSC eingebracht. Dann wurde das Präparat für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 4xSSC/0,1%Triton eingestellt.

3.2.14 Detektion mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

Während der sich anschließenden Fluoreszenzmarkierung wurde die Digoxigenin-markierte DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin nachgewiesen. Dieses war mit Anti-Digoxigenin-Antikörper (Fab-Fragment) konjugiert, was der immunologischen Detektion von Digoxigenin diente. Rhodamin besitzt ein Emissionsmaximum bei 580 nm (rot, pH 8,0). Die Biotin-markierte DNA wurde mittels des Glykoproteins Streptavidin detektiert, welches mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert war. FITC hat sein Emissionsmaximum bei 515 nm (grün). Die Darstellung dazu ist in Abbildung 9 (Seite 46) zu finden. DAPI interkalierte in das Chromatingerüst der Chromosomen. Dies stellte die Gegenfärbung dar und erzeugt die typische Bänderung der Chromosomen, welche durch die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der verschieden kondensierten Chromosomenabschnitte begründet ist. Diese Färbung dient der Identifizierung der Chromosomen. DAPI hat sein Emissionsmaximum bei 450 nm (blau). Die genaue Detektionsreaktion ist in Abbildung 7 dargestellt.

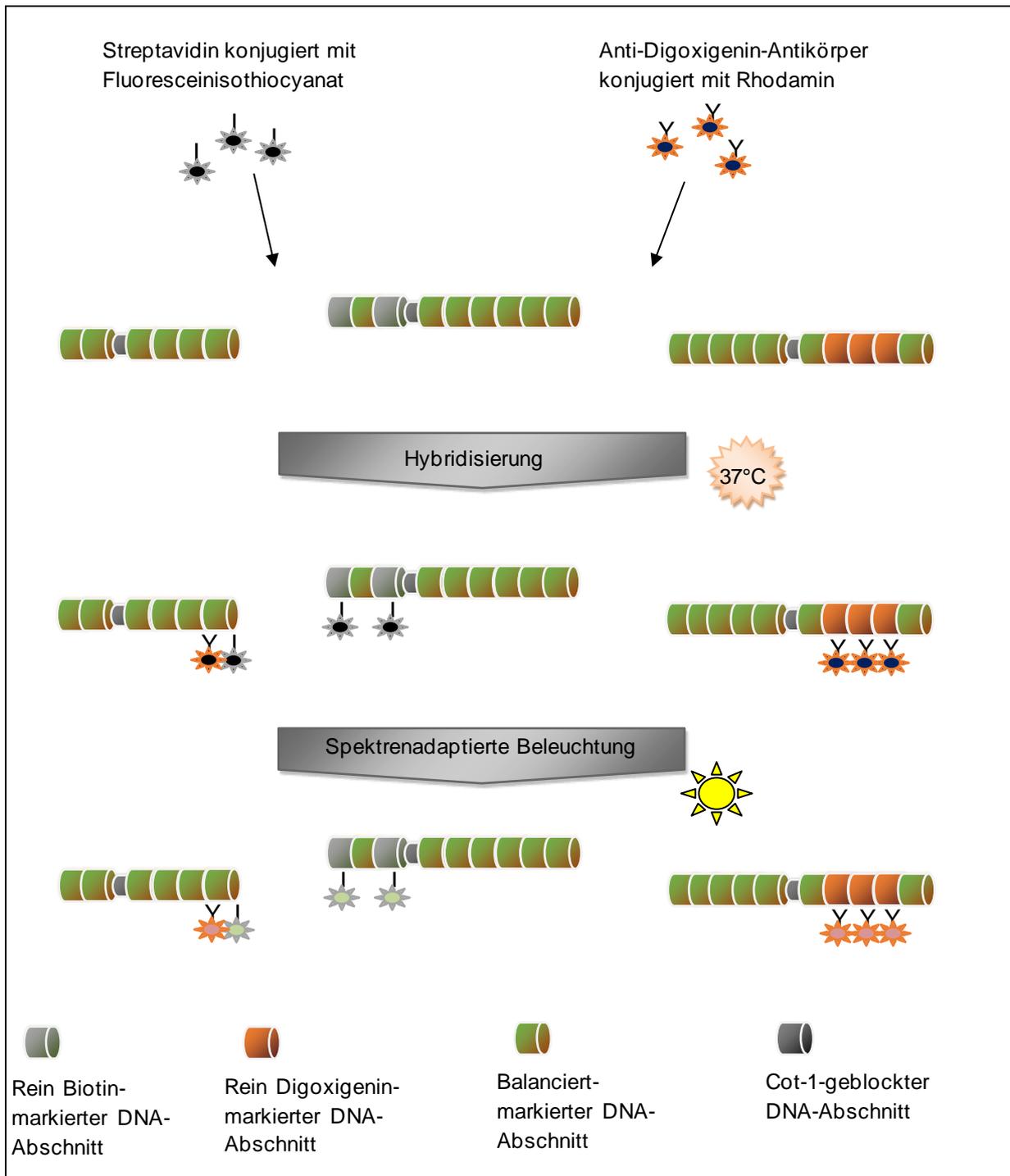


Abb. 7: **Detektionsreaktion mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.** Zugabe von Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern, welche selektiv an die zuvor in der Hybridisierung (Abb. 6) mittels Biotin- und Digoxigenin- markierter DNA binden können. Der mit Rhodamin (Fluoreszenzfarbstoff) verbundene Anti-Digoxigenin-Antikörper bindet nun in einer erneuten Hybridisierung bei 37°C an Digoxigenin und das mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Fluoreszenzfarbstoff) verbundene Streptavidin an die Biotin-markierte DNA. Durch spektrienadaptierte Beleuchtung können Farbsignale hervorgerufen werden.

Zunächst wurden 100 µl 5% BSA in 4xSSC aufpipettiert, welches unspezifische Bindungsloki blockierte. Das Präparat wurde mittels Deckgläschen bedeckt und bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für 20 Minuten inkubiert. Dann wurden 2 µl Streptavidin-FITC 1:50, Anit-Digoxigenin-Rhodamin 1:20 auf den Objektträger aufgebracht. Es schloss sich eine Inkubation in der feuchten Kammer bei 37°C für 45 Minuten an. Es folgten 3 Waschschrirte in 4xSSC mit zugesetztem 0,1% Triton für jeweils 5 Minuten bei 37°C. Dies diente der Eliminierung von überschüssigem Streptavidin-FITC. Nun wurden 5 µl Anti-Dig-Rhodamin sowie 100 µl Blockreagenz zusammen auf das Präparat hinzu pipettiert. Die Präparate wurden zur Inkubation dann bei 37°C für 45 Minuten in eine feuchte Kammer platziert. Erneut wurde das Präparat wie zuvor mit 4xSSC/0,1% Triton dreimal für je 5 Minuten bei 37°C gewaschen. Die abschließende Dehydrierung wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe der Konzentration 70%, 80% und 100% durchgeführt, für je 5 Minuten pro Konzentrationsstufe. Nachdem die Präparate getrocknet waren, wurden die Präparate mit 20 µl DAPI-Antifade-Lösung eingedeckt. Die Präparate wurden lichtgeschützt bis zur Auswertung bei 4°C aufbewahrt.

3.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde von Mary Lou Pardue und Joe Gall 1969 ursprünglich unter Zuhilfenahme von radioaktiv markierten Sonden etabliert und ermöglicht den gezielten Nachweis von vorher determinierten DNA- oder RNA-Bereichen. Mittlerweile haben sich speziell auf den jeweiligen zu untersuchenden DNA-Lokus gefertigte und mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Sonden etabliert, welche nicht die gesundheitsschädlichen Nebenwirkungen und ein besseres Auflösungsvermögen als die ehemals radioaktiv markierten Sonden haben. Zudem ist ein gleichzeitiges Hybridisieren mehrerer DNA-Sonden möglich. Zunächst muss das zu untersuchende Gewebe vorbereitet werden, was eine Entfernung von störendem Gewebe und RNA sowie die Überführung der DNA in Einzelstränge beinhaltet. Dann werden die Sonden hinzugefügt und durch Hybridisierung an der jeweils zur Sonde komplementären Zielstruktur gebunden. Die an die Sonden gebundenen Fluorochrome, wie z.B. Fluorescein (FITC) und Cy3 emittieren später unter dem Fluoreszenzmikroskop Licht, welches es ermöglicht, eine Aussage über chromosomale Gewinne bzw. Verluste in der entsprechenden untersuchten Region zu treffen.

3.3.1 Blutkultur und Präparation von Metaphasechromosomen

Um die SONDENSPEZIFITÄT und die Hybridisierungsbedingungen zu optimieren, wurden die in dieser Arbeit eingesetzte lokusspezifische Sonde für die Region #20q13 (rot markiert) und die zentromerspezifische Sonde #20cen (grün markiert) im Rahmen eines sogenannten „cut off“ an gesundem Gewebe getestet. Hierfür eignen sich Lymphozyten, da sie leicht verfügbar und präparierbar sind. In der vorliegenden Arbeit stammten sie von einem genotypisch gesunden, männlichen Spender. Hierzu wurde eine Vollblutkultur zur Metaphasengewinnung angesetzt. Diese Technik wurde ursprünglich von Moorhead und Mitarbeitern (1960) unter Verwendung von Phytohemagglutinin (PHA) als Mitosenstimulanz für eigentlich nicht mitotisch aktive Zellverbände etabliert. Verwendet wurde das Komplettmedium PB-MAX („Peripheral-Blood“-max Kulturmedium), welches bereits Phytohemagglutinin enthält und T-Lymphozyten zur Teilung anregt. Durch die anschließende Chromosomenpräparation wurden die Lymphozyten so aufgearbeitet, dass die in ihnen enthaltenen Chromosomen einer Untersuchung besser zugänglich waren, was durch eine Hypotoniebehandlung, die eine Aufblähung der Zellstrukturen zur Folge hat, erreicht wurde. Schließlich wurden sie fixiert, um das erzielte Ergebnis für die nachfolgenden Arbeitsschritte zu konservieren.

Zur Blutkultur und zur Gewinnung der Metaphasechromosomen und Interphasekernen wurden die entsprechenden Techniken und Lösungen verwendet, wie sie auch in der CGH genutzt wurden (siehe Kapitel 3.2, Comparative genomische Hybridisierung).

3.3.2 FISH an Kontrollgewebe

3.3.2.1 Vorbehandlung der Präparate

Die Vorbehandlung diente der Entfernung von störender RNA, Proteinen und Bindegewebe aus den Präparaten, was etwaige Fehlbindungen der Sonden verhinderte. Des Weiteren wurden die Zellstrukturen soweit aufgelöst, dass die später verwendeten Sonden sie penetrieren konnten. Dies ermöglichte, dass die Sonden in die Zellkerne und somit an die DNA im Zellkern gelangen konnten. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur kurz in 2xSSC (pH 7,0) eingestellt. Dann folgte in der feuchten Kammer für 20 Minuten mit je 100 µl RNase pro Präparat ein Ribonuclease (RNase)-Verdau. Dies sorgte dafür, dass die gesamte im Präparat vorkommende RNA entfernt wurde und im späteren Verlauf nicht zu einer fehlerhaften Hybridisierung führte. Im Folgenden wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt und die Präparate für je 3x5 Minuten in 2xSSC bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler gewaschen. Nun erfolgte ein je nach Alter der Präparate sowie Zytoplasmaresten auf den Chromosomen und Interphasekernen ein 1-3-minütiger Pepsinverdau (Ansatz: 50 ml 0,01 NaCl+ 100 µl 5% Pepsin in einer Küvette) bei 37°, welcher die im Präparat vorkommenden Zytoplasmareste verdaut bzw. andaut, um die Zellkerne bzw. Chromosomen für die später durchgeführte Hybridisierung zugänglich zu machen. Die Präparate wurden dann bei Raumtemperatur in PBS (pH 7,0) für 5 Minuten gewaschen. Hiernach schloss sich eine 10-minütige Fixierung mit 4% PFA/PBS und wiederum eine 5-minütige Waschung mit PBS an. In einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70%, 80% und 100% für jeweils 5 Minuten erfolgte die finale Dehydrierung. Im Anschluss wurde für mindestens 30 Minuten luftgetrocknet, bevor die Denaturierung durchgeführt wurde.

3.3.2.2 Denaturierung und Hybridisierung der Präparate

Die sich anschließende Denaturierung sorgte dafür, dass die sich normalerweise in der kondensierten Form von Chromosomen vorliegende Doppelstrang-DNA in DNA-Einzelstränge überführt wurde. Dies geschah durch die Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen, welche hauptsächlich für den Zusammenhalt der Doppelstränge verantwortlich sind. Hierzu wurde die DNA mittels der Schmelztemperatur T_m , die man exakt errechnen kann (siehe Kapitel 3.2.10, Denaturierung der Chromosomen) und mithilfe eines Denaturierungsmixes, welcher die Wasserstoffbrückenbindungen zusätzlich schwächte, in Einzelstränge überführt, damit die später hinzugefügten, fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisieren konnten. Durch die spezifische Bindung der Sonden an der Ziel-DNA konnte eine Auswertung erfolgen. Dieser Mechanismus wird in der folgenden Abbildung verdeutlicht (siehe Abb. 8).

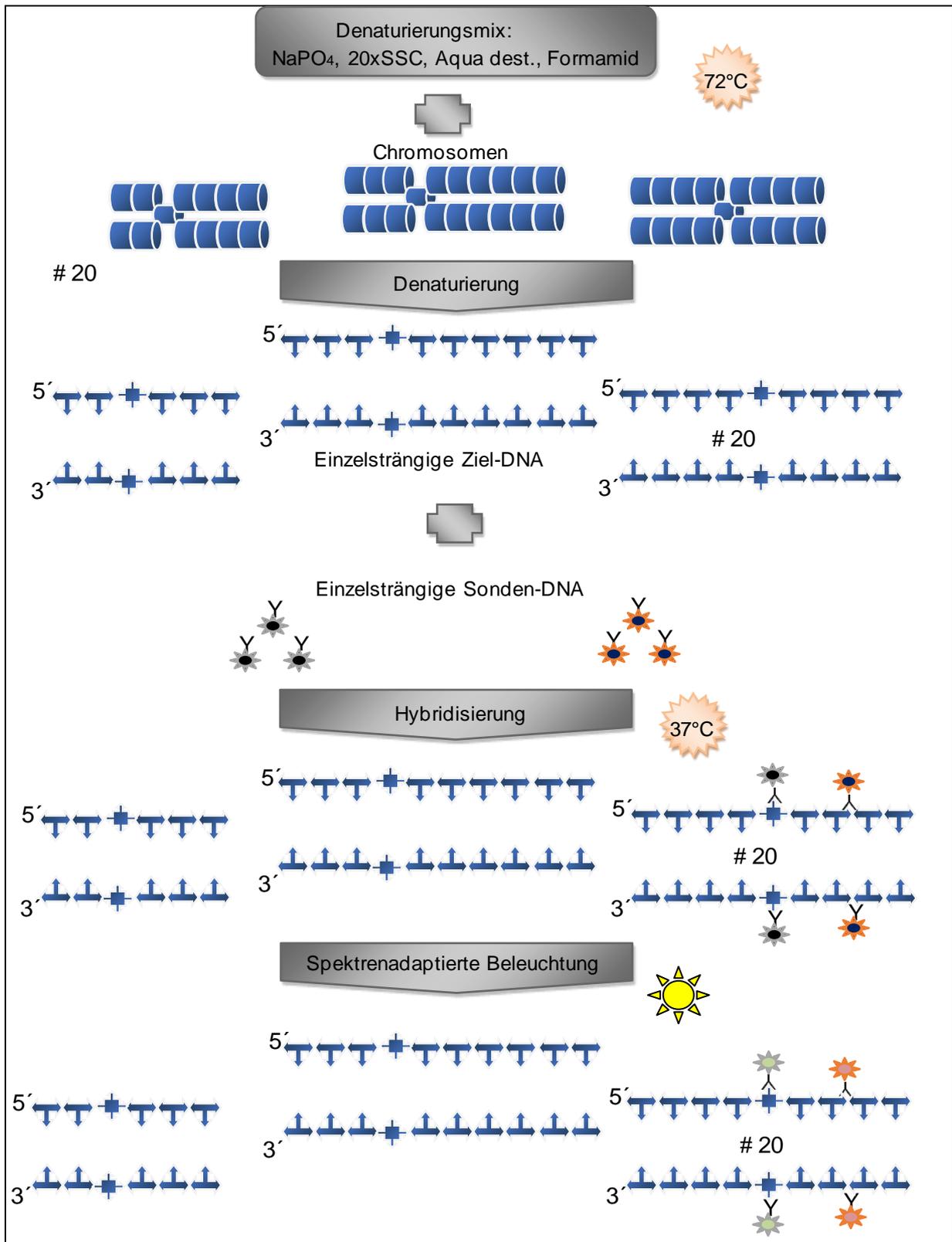


Abb. 8: **Denaturierung und Hybridisierungsreaktion.** Zugabe eines Denaturierungsmixes bestehend aus NaPO₄ (Natriumphosphat), 20xSSC (Natriumchlorid-Citrat-Puffer), Aqua dest (destilliertes Wasser) und Formamid bei 72°C. Dies führt zum Aufbrechen der chromosomalen Doppelstrang-DNA in DNA-Einzelstränge. Durch die Zugabe von den in dieser Arbeit lokusspezifischen fluoreszenzfarbstoffmarkierten DNA-Sonden für #20 Zentromer, sowie #20q13 können diese Regionen bei 37°C selektiv markiert werden. Durch eine an die Fluorochrome spektralenadaptierte Bestrahlung der Präparate kann dann eine Lichtemission derselben erzeugt werden.

Es wurden je Objektträger 100 µl Denaturierungslösung aufgebracht, ein Deckglas aufgelegt und der Objektträger für 90 Sekunden bei 72°C auf einer Heizplatte denaturiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Deckgläschens erfolgte die Dehydrierung in einer dreistufigen, eiskalten Alkoholreihe der Konzentrationen 70%, 80% und 100% für je 5 Minuten pro Stufe. Die Präparate wurden für mindestens 30 Minuten luftgetrocknet, bevor die Sonden aufgetragen wurden.

Hybridisierungsansatz: 7 µl Hybridisierungspuffer (Fa. Abbott Vysis) + 1µl #20q13-orange + 2µl #20cen-green.

Die Denaturierung des Hybridisierungsansatzes erfolgte bei 74°C für 10 Minuten. Dieser wurde dann direkt auf die Präparate aufgebracht, im Standard 5 µl je Präparat. Das jeweilige Präparat wurde dann mit einem Deckgläschen bedeckt und abschließend mit Fixugum versiegelt. Bis dieses getrocknet war, verblieben sie auf einer 37°C warmen Heizbank. Zur Hybridisierung wurden die Präparate in einer feuchten Kammer bei 37°C bis zum nächsten Tag in einem Wärmeschrank gelagert.

3.3.2.3 Stringenzwaschung und DAPI-Färbung

Die Stringenzwaschung diente dem Lösen unspezifischer Sondenbindungen, welche das Ergebnis verfälschen. Hierbei destabilisierte und löste das zugesetzte Formamid wiederum fehlerhafte Bindungen. Der DNA-interkalierende Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) diente einer besseren Darstellung der vorliegenden DNA und später bei der Bearbeitung der Tumorpräparate zur Kontrolle der Integrität der Zellkerne.

Nachdem die Deckgläser vorsichtig von den Objektträgern entfernt worden waren, wurden diese in einer 50% Formamid/ 2xSSC Lösung bei 45°C dreimal für je 5 Minuten gewaschen. Es folgte eine zweimalige Waschung für je 5 Minuten bei 45°C in 2xSSC und eine einmalige Waschung in PBS für 1 Minute bei Raumtemperatur. Es schloss sich eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 100%) an, bei welcher die Objektträger für je 5 Minuten dehydriert wurden und im Anschluss für mindestens 30 Minuten luftgetrocknet wurden.

Abschließend wurde DAPI-Antifade zur Gegenfärbung der Zellkerne aufgetragen (10-15 µl je nach Präparatgröße) bevor ein Deckglas aufgebracht wurde und die Präparate zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop bereit waren.

3.3.2.4 Mikroskopie und Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61 Mikroskop). Die hier erhobenen Daten dienten als Ausgangs- bzw. Vergleichswert zur später

durchgeführten FISH an Tumorgewebe. Durch die hier durchgeführten Testhybridisierungen konnte anhand der Metaphasen überprüft werden, ob die verwandten Sonden spezifisch an das entsprechende Zielchromosom gebunden hatten. Die Effizienz der jeweiligen Sonde wurde durch die ausgezählten Zellkernsignale erhoben, wobei je Präparat 200 Interphasekerne ausgezählt wurden.

Ausgezählt wurden nur vollständige, sehr gut abgrenzbare sowie sich nicht überlagernde Interphasekerne. Diese erste Beurteilung erfolgte im DAPI-Filter. Dadurch wurde verhindert, dass durch die Aufbereitung ungeeignete Interphasen in das Ergebnis mit aufgenommen wurden. Erst danach erfolgte die Auswertung unter Verwendung der entsprechenden Filter. Ausgezählt wurde in 40-facher und 100-facher Vergrößerung.

Das Ergebnis der 200 ausgezählten Interphasekerne pro Präparat wurde in ein Schema eingetragen, welches sich nach der Signalanzahl pro Zellkern aufbaut: grüne Signale für die zentromerspezifische Sonde für Chromosom 20 und rote Signale für die lokusspezifische Sonde #20q13. Im Schema existierten für die zentromerspezifische Sonde für Chromosom 20 Spalten von 0 bis 3 Signalen je Zellkern, für die lokusspezifische Sonde #20q13 gab es Spalten von 0 bis 5 Signalen je Zellkern. Mit dieser Einteilung war es möglich alle ausgewerteten Zellkerne mit den darin vorkommenden Signalkombinationen aufzuschlüsseln.

3.3.3 FISH an Tumorgewebe

3.3.3.1 Vorbereitung der Tumorgewebsproben und Anfertigen von Kryostatschnittpräparaten

Das Tumormaterial war nach der operativen Entnahme vom Patienten in flüssigem Stickstoff in einer Tumorbank gelagert worden. Diese Lagerung erfolgte, um das Gewebe langfristig zu konservieren und vor Keimern zu schützen. Zur Anfertigung der Kryostatschnitte wurde das gefrorene Tumormaterial mittels Aufblockmaterial im Kryostat fixiert, wobei darauf zu achten war, dass sich kein Aufblockmaterial in der Kryostatschnittebene befand, da dieses sonst später die Auswertung der Präparate durch das Erzeugen von Hintergrundstrahlung nahezu unmöglich gemacht hätte. Die Kryostatschnitte wurden mit einer Schichtdicke von 6 µm angefertigt und zwecks verbesserter Bindung der Präparate auf silanisierte Objektträger aufgebracht, was ein Abschwimmen vom Objektträger verhinderte. Dann wurden sie bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Pro Tumor wurden sieben Schnitte angefertigt, wobei ein Schnitt zur HE-Färbung verwandt wurde und die anderen sechs als Präparate zur FISH bzw. als Präparatevorrat für weitere FISH-Untersuchungen dienten.

3.3.3.2 Anfertigen von Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten

Die HE-gefärbten Kryostatgewebeschnitte ermöglichten das Abschätzen des benötigten Pepsinverdau, der für jedes Präparat separat ermittelt werden musste. Dies ist in der Gewebeskonsistenz begründet, welche je nach Präparat unterschiedlich kompakte Gewebsteile oder auch mehr zystische Strukturen enthalten kann. Es war von großer Bedeutung, den Verdau so exakt wie möglich zu bestimmen. Zu lange Verdauzeiten entfernten nicht nur störende Gewebsteile, wie z.B. Bindegewebe, sondern schädigen auch die Zellen selbst, wodurch eine Auswertung unmöglich wurde. Zu kurze Verdauzeiten verhinderten eine Hybridisierung, da die Sonden die Zellkerne nicht in ausreichendem Maße penetrieren und somit die DNA nicht hybridisieren konnten. Die Präparate wurden für 10 Minuten in eiskaltem 4% PFA/PBS fixiert und für 2 mal 5 Minuten in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Abschließend wurde eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80% und 100%) für je 5 Minuten vorgenommen. Die Färbung erfolgte mittels Hämalaun nach Mayers (Merk 1.09249.05000) für 10 Minuten, wonach mit Aqua dest. in 3 hintereinander geschalteten Gefäßen gewaschen wurde. Es folgte eine HCl-Alkoholreihe zum differenzieren (1ltr. 70% Ethanol + 10 ml 25% HCL) in 3 Gefäßen. Das Bläuen wurde durch Zugabe von kaltem Leitungswasser für 10 Minuten erzielt. Anschließend wurden die Präparate in 1% Eosin für 30 Sekunden eingebracht um sie zu färben. Abschließend wurden die Präparate wiederum in Aqua dest. gespült. Die finale Dehydrierung erfolgte mittels aufsteigenden Alkoholreihe der Konzentrationen 70%, 80% und 100% für je 5 Minuten pro Stufe. Nach Einstellen in Xylol konnten die Präparate mit Entellan eingedeckt werden. Nach einer Lagerung unter einem Abzug erfolgte die Beurteilung der Schnitte unter einem Durchlichtmikroskop, um die Pepsinverdauzeit der späteren FISH abschätzen zu können.

3.3.3.3 FISH am Tumorgewebeschnitt

Die FISH an Tumorgewebe erfolgte entsprechend dem an den Lymphozyten etablierten Versuchsaufbau, mit den im Folgenden dargelegten Modifikationen.

3.3.3.4 Vorbehandlung der Präparate

Bei Raumtemperatur wurden nun die Präparate kurz in 2xSSC (pH 7,0) eingebracht. Es folgte ein 20-minütiger Ribonuklease-Verdau (RNase) bei 37°C (RNase-Stammlösung 1:100 in 2x SSC verdünnter, Stammlösung: 10 mg/ml) mit jeweils 100 µl RNase in einer feuchten Kammer. Nun wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt und die Präparate für je 3x5 Minuten in 2xSSC bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte ein je nach histologischem Aufbau der Präparate unterschiedlich langer Pepsinverdau. Dies wurde anhand der HE-gefärbten Kryostatschnitte ermittelt. Der Pepsinverdau erfolgte (Ansatz: 50 ml 0,01 NaCl + 100 µl 5% Pepsin) in einer

Küvette bei 37°C, um die im Präparat vorkommenden Bindegewebsbestandteile zu verdauen und die Zellen für die später durchgeführte Hybridisierung penetrierbar zu machen. Der Pepsinverdau war im Gesamtkollektiv starken Schwankungen unterlegen. So wurden manche Präparate 1 Minute, andere bis zu 12 Minuten mit Pepsin behandelt. Der Durchschnitt lag bei 7 Minuten. Die Präparate wurden dann in PBS (pH 7,0) für 5 Minuten eingestellt. Dann wurden sie bei Raumtemperatur in Aqua dest. für 5 Minuten gewaschen. Hiernach schloss sich eine 10-minütige Inkubation in 70°C heißem 2xSSC mit sofortigem Überführen in die abschließende Dehydrierung (aufsteigende Alkoholreihe von 70%, 80% und 100%, für je 5 Minuten) an. Im Anschluss wurden die Präparate mindestens 30 Minuten an der Luft getrocknet.

3.3.3.5 Denaturierung und Hybridisierung der Präparate

Pro Objektträger wurden 100 µl Denaturierungslösung [Ansatz: 350 µl deionisiertes Formamid, 50 µl NaPO₄ (0,5 M pH = 7,0), 50 µl steriles 20xSSC und 50 µl steriles Aqua dest. aufgebracht. Dann wurde ein Deckglas aufgelegt und die Proben auf dem Objektträger für 2 Minuten auf einer 80°C heißen Heizplatte denaturiert. Danach wurde das Deckglas entfernt und es schloss sich eine dreistufige Dehydrierung in einer aufsteigenden, kalten Alkoholreihe (70%, 80% und 100%) für je 5 Minuten pro Schritt bei -20°C an. Die Präparate wurden für mindestens 30 Minuten an der Luft getrocknet bevor die Sonden aufgetragen wurden.

Hybridisierungsansatz: 6 µl Hybridisierungspuffer (Fa. Abbott) + 1 µl #20q13 + 3 µl #20cen

Der Sondenansatz wurde für 10 Minuten bei 74°C denaturiert und kurz zentrifugiert. Nun wurden auf die auf 37°C vorgewärmten Präparate der denaturierte Sondenansatz aufgebracht. Je nach Größe des Präparates waren dies 5-10 µl, folgend mittels Deckgläschen abgedeckt dann erfolgte die Versiegelung mittels Fixogum. Bis diese getrocknet waren, verblieben sie bei 37°C. Die abschließende Denaturierung erfolgte bei 80°C für 10 Minuten. Die abschließende Hybridisierung der Präparate wurde in einem Wärmeschrank bei 37°C vorgenommen. In diesen wurde eine feuchte Kammer mit den Präparaten über einen Zeitraum von 2 Tagen eingestellt.

3.3.3.6 Stringenzwaschung und DAPI-Färbung

Die abschließende Stringenzwaschung und Kernfärbung wurde exakt nach demselben Versuchsaufbau wie im Versuchsaufbau der Lymphozyten (siehe Kapitel 3.3.2.3, Stringenzwaschung und DAPI-Färbung) vorgenommen.

3.3.3.7 Mikroskopie

Die Auswertung der Präparate wurde mit demselben Fluoreszenzmikroskop, welches auch zur Auswertung der Lymphozyten verwendet wurde, durchgeführt. Je Tumorschnittpräparat wurden bis zu 200 Kerne ausgezählt, welche vor Aufnahme in die Statistik mittels der DAPI-Gegenfärbung auf ihre zelluläre Integrität hin zu prüfen waren und die Anzahl der Signale für die beiden Sonden dokumentiert. Des Weiteren musste sichergestellt werden, dass die dokumentierten Zellkerne sich nicht überlagerten und es so zu fehlerhaften Signalverteilungen kam. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach dem Schema wie unter Kapitel 3.3.2.4, (Mikroskopie und Auswertung) beschrieben.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluorochrome, welche wie zuvor beschrieben, mittels DNA-Sonden gekoppelt in die Präparate gebunden wurden, können durch Bestrahlung mit Licht in einen Anregungszustand gebracht werden. Diese werden mit Photonen einer vordefinierten Wellenlänge bestrahlt. Nach der Anregung wird die absorbierte Lichtenergie, welche die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gebracht hat, innerhalb von 10^{-10} bis 10^{-7} Sekunden wieder in Form von gleicher Wellenlänge (Resonanzfluoreszenz) oder längerer Wellenlänge abgegeben (siehe Abb. 9).

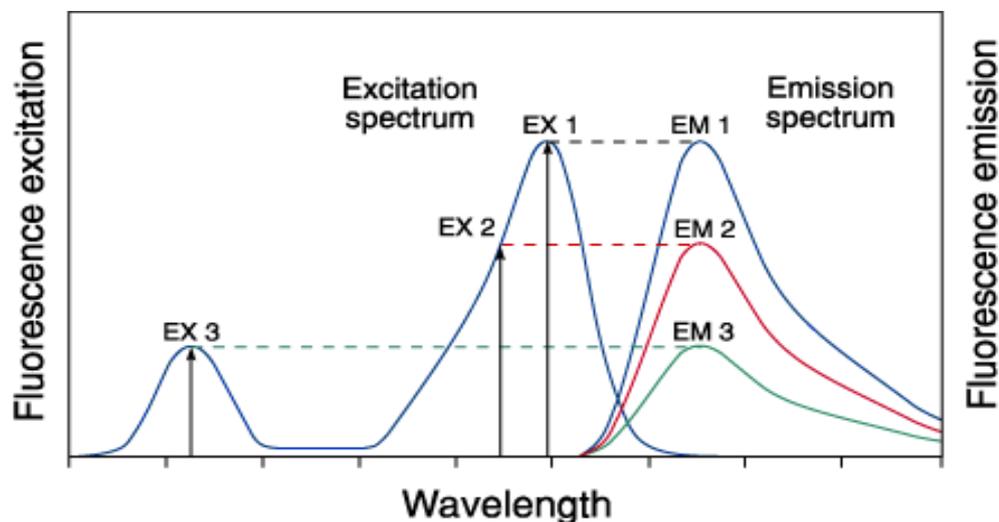


Abb. 9: **Stokes shift** (entnommen aus: Handbook of probes Invitrogen, 2008). Maximale Lichtsignal-emissionen (Fluorescence emission, EM) unterschiedlicher DNA-Sonden (1,2 und 3) bei unterschiedlichen Wellenlängen (wavelength), bei den jeweiligen maximalen Fluoreszenz-Anregungsbereichen (EX, Fluorescence excitation) je nach Wellenlänge des zur Bestrahlung verwendeten Lichts

Mittels einer Quecksilberverdampfungslampe (100 W) wurde die hierzu notwendige Lichtenergie im emittierten Lichtspektrum von ultraviolett bis infrarot zugeführt. Dieses Licht wurde durch entsprechend zu wählende Anregungsfilter des Mikroskops über das jeweilige Objektiv auf das Präparat fokussiert. Der Filter war so zu wählen, dass der zu untersuchende Fluoreszenzfarbstoff maximal angeregt werden konnte. Hierbei fanden Schmalbandfilter Verwendung, die nur Licht eines sehr schmalen Spektrumausschnittes passieren ließen.

Mittels eines Teilerspiegels (dichromatisch) wurde das Licht in einem Winkel von 45° auf das jeweilige Präparat gelenkt. Licht kurzer Wellenlänge wurde vom Teilerspiegel reflektiert. Das von den angeregten Fluorochromen innerhalb des Präparates emittierte, längerwellige Licht wurde ungehindert vom Teilerspiegel durchgelassen. Dieses traf dann auf einen Langwellen-Sperrfilter. Dieser ist nur für Licht oberhalb einer definierten Wellenlänge durchlässig, sodass nur ein extrem selektiertes Lichtsignal im Okular betrachtet wurde. Von diesem Bild konnten über eine in der Mikroskopanordnung verbauten Kamera Photographien angefertigt werden. Ebenfalls war eine digitale Visualisierung und Speicherung von Bildausschnitten der Präparate mittels CCD-Kamera möglich. Bei dem verwandten Olympus BX60 Mikroskop wurden folgende Objektive und Filter genutzt: Plan Apo 60x; 1,40 Oil, Olympus Optical.

Am Mikroskop konnten mittels eines Wechselrads die jeweils benötigten Filter (Olympus Optical) korrespondierend zu den verwendeten Fluorochromen einrotiert werden. Die im Rahmen der Versuchsanordnung dieser Arbeit verwendeten Filterkombinationen zu den jeweiligen Fluorochromen werden übersichtsartig zusammengefasst:

- CY3 (Anregungslicht: grün, Filternummer: BP520-550, Teilerspiegelnummer: DM565, Sperrfilternummer: BA580IF, emittierte Farbe: Rot)
- FITC (Anregungslicht: violett, Filternummer: BP460-490, Teilerspiegelnummer: DM505, Sperrfilternummer: BA515-550, emittierte Farbe: Grün)
- DAPI (Anregungslicht: ultraviolett, Filternummer: BP360-370, Teilerspiegelnummer: DM400, Sperrfilternummer: BA420, emittierte Farbe: Blau)

Fluoreszenzfarbstoffe: DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, nach IUPAC-Bezeichnung für Internationale Union für reine und angewandte Chemie), FITC (IUPAC- Bezeichnung: Fluoresceinisothiocyanat), Cy3 (IUPAC-Bezeichnung: Cyanin-3-Carbonsäure) mit zugehörigen Herstellerbezeichnungen.

3.4.1 Bildaufnahmen

3.4.1.1 CGH

Von jedem der angefertigten Präparate wurden zwischen 10 und 20 Metaphasen ausgewählt, bei welchen eine gute Spreitung vorlag und es möglichst wenige chromosomale Überlagerungen gab. Mittels der CCD-Kamera konnten bei Vergrößerung, Aufnahmen der entsprechenden Bildausschnitte angefertigt werden (verwendetes Objektiv: Plan Apo 60x; 1,40 Oil). In der jeweiligen Metaphase wurde für jede Fluoreszenzmarkierung separat ein monochromes Bild in Graustufen hinterlegt. Somit wurden pro Metaphase drei getrennte Bilder benötigt. Da für jedes Bild aus der Stärke der Lichtsignale, sowie der Lichtmenge eine individuelle Integrationszeit errechnet wurde, konnte eine optimale Aufnahmequalität erreicht werden. Hierbei generierte die Software aus den jeweiligen Lichtintensitäten, den korrespondierenden Funktionen der Lichtmengen und den daraus berechneten Integralen graphische Darstellungen. Anhand dieser Integrale konnte die korrekte Belichtungszeit ermittelt und gegebenenfalls manuell nachjustiert werden. Da die CCD-Kamera mit einem Computer verbunden war, wurden alle gewonnenen Aufnahmen digital in der Software ISIS (Version 2.5) hinterlegt

3.4.1.2 FISH

Zur Dokumentation der FISH wurde aus repräsentativem Gewebe Bildmaterial gewonnen, welches sowohl Zellkerne mit regulärer Signalverteilung (2 rote, 2 grüne Lichtsignale) als auch Zellkerne mit divergierenden Signalmustern zeigte.

3.4.2 Bildverarbeitung und Auswertung

3.4.2.1 CGH

Die initial abgespeicherten Fluoreszenzaufnahmen wurden mittels der Software weiterverarbeitet. Für die einzelnen hinterlegten Graustufen berechnete die Software Falschfarbenbilder in rot, grün und blau korrespondierend zu den verwendeten Fluorochromen. (siehe Abb. 10). Hieraus konnte nun ein viertes Bild errechnet werden, welches alle drei einzeln aufgenommenen Spektren übereinander projizierte. So diente die DAPI-Färbung der Chromosomenidentifikation, die FITC-Färbung stellte die Tumor-DNA und Rhodamin schließlich die Referenz-DNA dar. Die Regulation der Intensitäten der separaten Fluoreszenzbilder konnte bei Bedarf automatisch über die Software erfolgen um die Auswertbarkeit zu verbessern. Die Hintergrundstrahlung der einzelnen Bilder ließ sich im Bedarfsfall ebenfalls korrigieren.

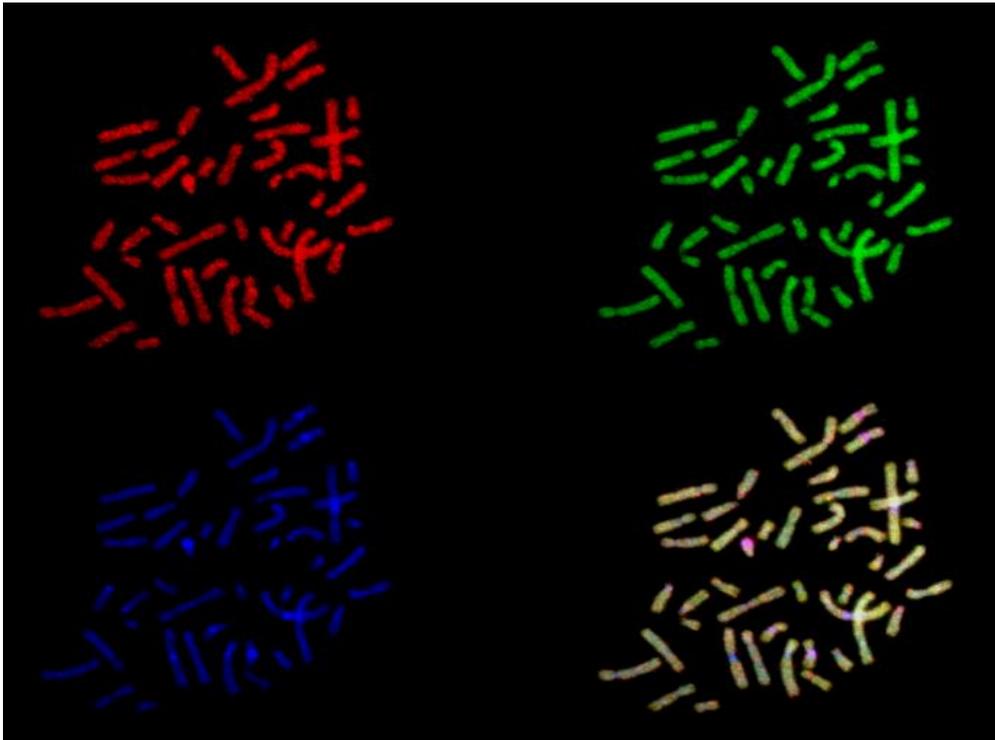


Abb. 10: **Falschfarbenkodierte Darstellung der drei verschiedenen Fluorochrome einer Metaphase und eines Summationsbildes der einzelnen Farbbilder** (entnommen aus: Brunner, 2000, Promotion).

Die jeweiligen Metaphasen wurden karyotypisiert. In jeder einzelnen Metaphase wurden die Chromosomen virtuell ausgeschnitten und einzeln in ein Karyogramm eingeordnet. In die Auswertung kamen nur eindeutig identifizierte, freiliegende und axial gespreitete Chromosomen. Die Zuordnung erfolgte über eine inverse Darstellung der DAPI-Färbung, die der G-Bänderung entsprach. Die im Karyogramm zugeordneten Chromosomen wurden im Folgenden automatisch begradigt und wenn notwendig manuell in Ihrer Achse korrigiert. Senkrecht zu dieser Mittelachse wurde die Intensität der FITC und Rhodamin Signale für jeden einzelnen Pixel miteinander verglichen und in ein Verhältnis gesetzt. Dieses Verhältnis der Signalintensität wurde entlang der chromosomalen Achse als Graph neben einem Idiogramm abgebildet (siehe Abb. 11). Die einzelnen ausgewerteten Chromosomen mehrerer Metaphasen wurden in ihrer Länge normiert, wobei das Zentromer den Fixpunkt bildete. Die so normierten Profile wurden nun für alle Chromosomenpaare der 10 bis 15 Metaphasen gemittelt und als Summenprofil neben einem Idiogramm dargestellt.

Diese Verteilung und Mittelung der einzelnen Pixel wurde errechnet und ein Konfidenzintervall, welches 99% abdeckte, als Wahrscheinlichkeitsgrenze entlang des Profils graphisch als Linie dargestellt. Als signifikant wurden Abweichungen vom Verhältnisprofil (hinterlegter Mittelwert 1) erst registriert, falls die Sicherheitsgrenzen überschritten wurden.

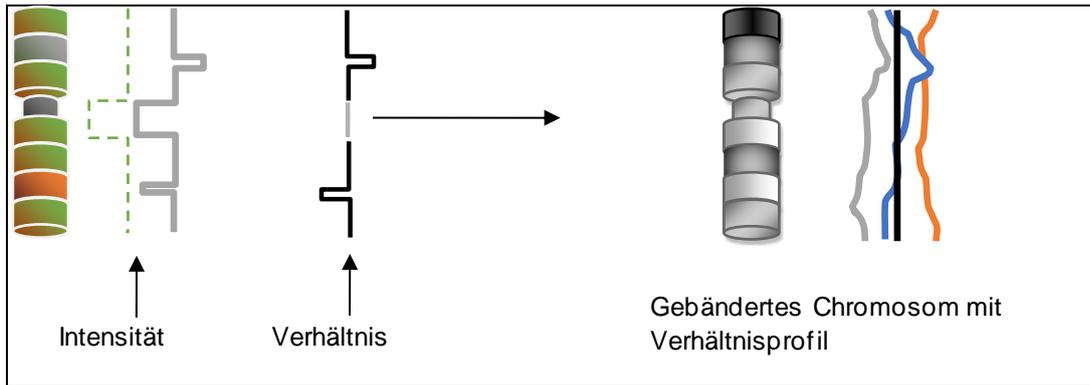


Abb. 11: **Graphische Darstellung der Chromosomen.** Die in ein Karyogramm zugeordneten und fluoreszenzfarbstoffmarkierten (FITC und Rhodamin) Chromosomen werden die Intensitäten von Rhodamin und FITC verglichen und in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Diese werden graphisch entlang der Achse eines normiert dargestellten Idiogramms als Graph abgebildet. (nach Brunner, 2000, Promotion).

Somit wurde dargestellt, auf welchen Chromosomen/ Chromosomenabschnitten, Aberrationen der Tumor DNA vorlagen.

3.4.2.2 FISH

Hier erfolgte eine manuelle Nachbearbeitung jedes einzelnen Bildes durch Anpassung der Kontrastwerte sowie der Farbsättigung, um die Bildqualität zu erhöhen. Diese Bildaufnahmen erfolgten während der Auswertung, wenn sich repräsentative Präparatareale zeigten. Die Aufnahmen wurden dann später unter Belassung der Originale nachbearbeitet. Die Auswertung der FISH wurde schon behandelt (siehe Kapitel 3.3.2.4, Mikroskopie und Auswertung und 3.3.3.7, Mikroskopie)

3.5. Statistische Auswertung

In der deskriptiven Analyse wurden die Tumoren mit Fallnummern, Alter und Geschlecht der Patienten am OP Tag, sowie Lokalisation und Größe des Tumors angegeben. Die demographischen Parameter Geschlecht und Alter wurden mit Angaben von Fallzahl n, Mittelwert und Standardabweichung, Minimum, Maximum und 95%- Konfidenzintervall beschrieben.

Die Ergebnisse zu den Gewinnen und Verlusten auf den untersuchten Chromosomen im Rahmen der CGH erfolgten mit Angaben von Fallzahl n, sowie prozentualer Angabe.

Die im Rahmen der FISH verwendete Kontrollhybridisierung der Sonden #20cen und #20q13 wurden auf Validität geprüft. Hierzu wurden jeweils die Mittelwerte, Standardabweichung und doppelte Standardabweichung erhoben.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Comparativen genomischen Hybridisierung (CGH)

4.1.1 Patienten - und Tumorkollektiv

Das mittels CGH am Universitätsklinikum des Saarlandes untersuchte Tumorkollektiv umfasst inzwischen 35 Tumore, die von 32 Patienten stammen (Tabelle 1). Die Fallnummern 045 (Ersteingriff) sowie 058, und 059 (jeweils Revisionseingriff) sind einem einzelnen Patienten zuzuordnen, ebenso die Fallnummern 205 (Ersteingriff, rechte Parotis) und 207 (Ersteingriff kontralateral, linke Parotis).

Das untersuchte Gesamtkollektiv besteht aus 13 Frauen und 19 Männern. Die Patienten waren am Tag der OP zwischen 40 und 87 Jahre alt (Ersteingriff). Das durchschnittliche Alter betrug 60,3 Jahre \pm 11,0 Jahre (95% Konfidenzintervall: 56,5 – 64,2 Jahre). Frauen waren im Mittel 64,5 \pm 11,9 Jahre alt, Männer 57,5 \pm 9,7 Jahre.

Zwei Tumore ließen sich nicht mittels CGH auswerten (Fallnummer 040 und 189, beides Männer). Somit verbleibt ein Tumorkollektiv von 33 mittels CGH-Untersuchungen auswertbaren Tumoren, davon 13 Frauen und 17 Männer. Tabelle 3 (Seite 56) gibt einen Überblick über die bereits vorliegenden 29 CGH-Ergebnisse aus einer vorliegenden Arbeit (Sauter, 2010).

Die Voruntersuchungen von 29 CGH-Untersuchungen bei Zystadenolymphomen lagen wie erwähnt vor und konnten in dieser Arbeit um 4 CGH-Untersuchungen von Zystadenolymphomen ergänzt werden. Diese 4 Tumore wurden während der Ausarbeitung dieser Dissertation in der Universitätsklinik des Saarlandes in der Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde operiert und standen für eine CGH-Auswertung zur Verfügung.

4.1.2 Deskriptive Analyse der vier hinzugefügten Tumore

Während in den Tumoren 198 und 205 chromosomale Veränderungen gefunden wurden, konnten in den Zystadenolymphomen 203 und 207 keine Gewinne oder Verluste detektiert werden.

In Tumor 198 wurden Gewinne von #19 (#, Chromosom), #22 und dem X-Chromosom detektiert. Des Weiteren zeigten sich Gewinne der Region 1p34.2pter des #1 und Gewinne der Region 16p des #16. Verluste lagen auf #13 in der Region 13q vor.

In Tumor 205 wurden Gewinne von #19 und # 22 detektiert sowie Gewinne in der Region 11p11.1-p12 des #11. Verluste lagen in den Regionen 2q21.3q24.3 des #2 und 4q26q31.1 des #4 vor.

Im Folgenden werden die Befunde der im Rahmen dieser Arbeit durch CGH charakterisierten 4 Zystadenolymphome tabellarisch in Tabelle 2 dargestellt (Fallnummern 198, 203, 205 und 207).

Eine detaillierte Darstellung über Gewinne und Verluste von Banden und Sub-Banden der jeweiligen Regionen erfolgte mittels ISCN Schreibweise (International System of Cytogenetic Nomenclature). Gewinne sind dabei als reverse in situ hybridization enhanced (rev ish enh) und Verluste als reverse in situ hybridization diminished (rev ish dim) definiert (Mitelman, 1995). Die erste Zahl beschreibt jeweils das Chromosom, der folgende Buchstabe p für „petit“ (französisch klein) beschreibt den kurzen Arm des Chromosoms, der Buchstabe q (q folgt im lateinischen Alphabet auf p) beschreibt den langen Arm des Chromosoms. Die darauffolgende Zahl grenzt, falls angegeben, die von Veränderungen betroffene Region weiter ein. Beispielhaft etwa an Fall 205 11p11.1-p12 beschrieben: rev ish enh (Gewinne), 11 (Chromosom 11), p (kurzer Arm), 1 (Region1), 1 (Bande1), 1(Subbande1) -p12 (bis Region 1 Bande 2).

Die Ergebnisse der chromosomalen Imbalancen nach CGH sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: **CGH-Ergebnisse der vier hinzugefügten Tumore mit Fallnummer und genomischer Veränderung**

Fall Nr.	Chromosomale Imbalancen nach CGH
198+	rev ish enh (1p34.2pter, 16p, 19, 22, X), rev ish dim (13q)
203+	46, XY
205**+	rev ish enh (11p11.1-p12, 19, 22), rev ish dim (2q21.3q24.3, 4q26q31.1)
207**+	46, XX

** Fall 205 Ersteingriff der rechten Parotis, Fall 207 Ersteingriff der linken Parotis

+ Im Rahmen dieser Arbeit der vorbestehenden Datenbank hinzugefügte Ergebnisse rev ish enh (reverse in situ hybridization enhanced), rev ish dim (reverse in situ hybridization diminished), X (Chromosom X), Y (Chromosom Y), 46 (Normaler Chromosomensatz). Die erste Zahl beschreibt jeweils das Chromosom, der folgende Buchstabe p beschreibt den kurzen Arm des Chromosoms, oder der Buchstabe q beschreibt den langen Arm des Chromosoms. Die darauf folgenden Zahlen grenzen, falls angegeben, die von Veränderungen betroffene Region (Region, Bande und Subbande) näher ein.

4.1.2.1 Graphische Darstellung der Fälle 198 und 205 in der CGH

In den beiden folgenden Abbildungen 12 und 13 sind die Ergebnisse der jeweiligen CGH (Ratioprofile) der Fälle 198 sowie 205 als Ideogramm dargestellt, um die deletierten Veränderungen auf einen Blick visuell dazustellen. Neben den vorbefundlich durch die vorangegangenen CGH-Untersuchungen bekannte Veränderungen kommen als neue Befunde Verluste der Region 13q (Fall 198), Gewinne der Region 4q26q31 (Fall 205) sowie Gewinne der Region 1p34.2pter zur Darstellung.

Die erste Zahl unter jedem Chromosom gibt das Chromosom selbst an, die zweite Zahl gibt die Anzahl der Chromosomen an, aus denen der Mittelwert für dieses Profil errechnet wurde. Bei den beiden hier dargestellten Ratioprofilen handelt es sich um die beiden neu hinzugekommenen Fälle, welche über mittels CGH nachweisbare Veränderungen verfügten.

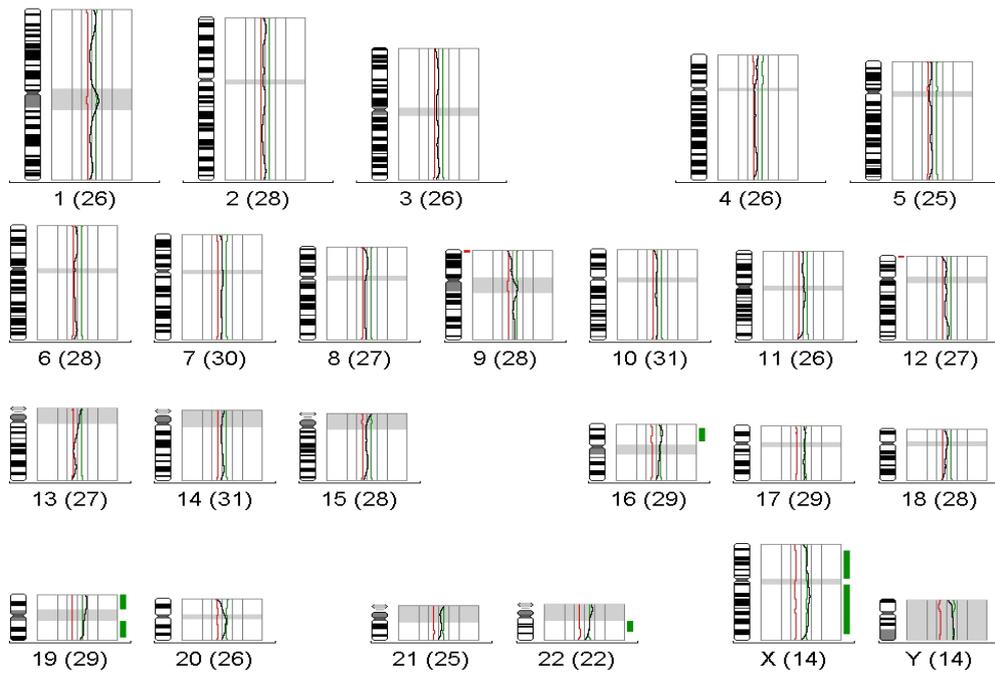


Abb. 12: **CGH-Ratioprofil des Tumors Nr. 198.** Grüne Balken repräsentieren Gewinne, rote Balken Verluste der entsprechenden Region. Die erste Zahl bezeichnet das Chromosom, die Zahl in Klammern die Anzahl der Chromosomen aus welchen der Mittelwert des jeweiligen Profils errechnet wurde.

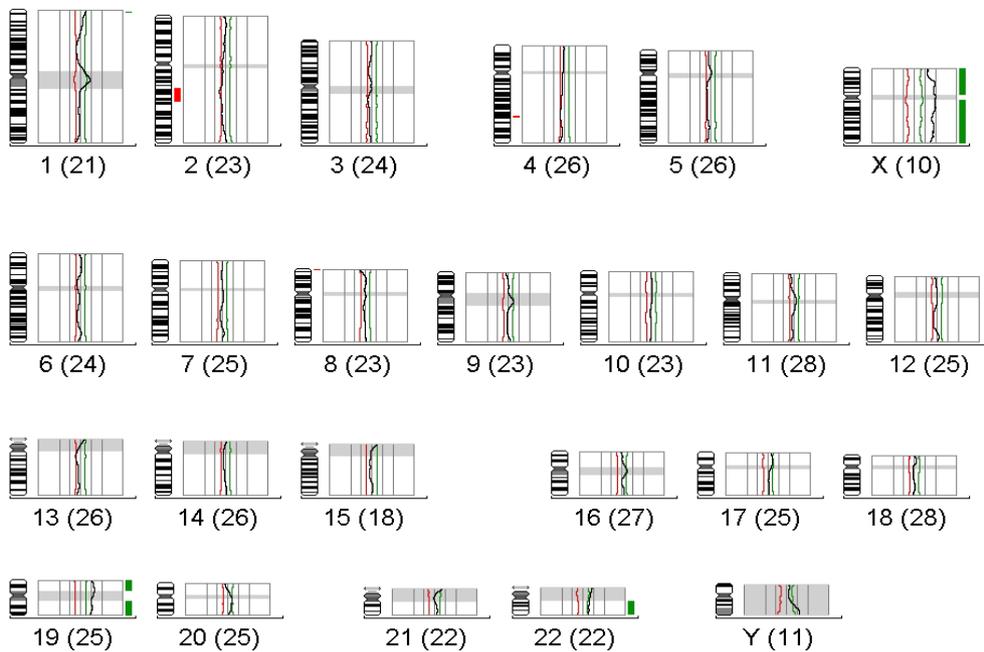


Abb. 13: **CGH-Ratioprofil des Tumors Nr. 205.** Grüne Balken repräsentieren Gewinne, rote Balken Verluste der entsprechenden Region. Die erste Zahl bezeichnet das Chromosom, die Zahl in Klammern die Anzahl der Chromosomen aus welchen der Mittelwert des jeweiligen Profils errechnet wurde.

4.1.3 Übersicht über das Gesamtkollektiv

4.1.3.1 Analyse des Gesamtkollektivs

Die mittels CGH-Analysen delektierten chromosomalen Veränderungen von n=33 Zystadenolymphomen zeigten eine Vielzahl chromosomaler Gewinne und Verluste. Gewinne wurden auf insgesamt 19 von 24 Chromosomen detektiert. Vor allem auf #19 und dem X-Chromosom waren deutliche Gewinne feststellbar. Chromosom 19 wies bei 10 Tumoren Gewinne auf (30%). Bei 8 von den 33 untersuchten Tumoren (24%) waren Gewinne auf dem X-Chromosom feststellbar.

Gewinne lagen bei den Chromosomen: #1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8, #10, #11, #12, #13, #15, #16, #17, #19, #20, #22 und dem X-Chromosom vor. Auf den Chromosomen #9, #14, #18, #21 und dem Y-Chromosom konnten keine Gewinne dargestellt werden.

Verluste wurden bei insgesamt 22 von 24 Chromosomen beobachtet. Vor allem auf den Chromosomen #8, #9 und #16 waren diese ausgeprägt. Auf #8 hatten 10 von den 33 untersuchten Tumoren Verluste zu verzeichnen (30%). Bei 12 Tumoren lagen Verluste auf #9 vor (36%) und bei 8 Tumoren auf #16 (24%). Auf #1 konnte ein Verlust bei 7 (21%), auf #22 bei 6 (18%) Tumoren dargestellt werden. Des Weiteren konnten Verluste auf den Chromosomen: #2, #3, #4, #5, #7, #8, #10, #11, #12, #13, #14, #15, #17, #18, #19, #20, #21, #22 und dem Y-Chromosom dargestellt werden. Auf #6 und dem X-Chromosom konnten keine Verluste festgestellt werden.

In folgender Tabelle ist das Gesamtkollektiv der mittels CGH untersuchten Tumore dargestellt (Tabelle 3). Die Beschreibung ist analog zur detaillierten Beschreibung von Tabelle 2 unter Kapitel 4.1.2 (Deskriptive Analyse der vier hinzugefügten Tumore).

Tabelle 3: **CGH-Ergebnisse des Gesamtkollektivs mit Fallnummer und genomischer Veränderung**

Fall Nr.	Chromosomale Imbalancen nach CGH
033	rev ish enh (3q11q21, 4q28q31, 6q11q16, 12q11q13), rev ish dim (22q11q12)
036	rev ish enh (3q11q13.3, 4q26q31.3, 8q13q22, 13q14q22)
040	n.d.
043	46, XX
045*	rev ish enh (5q14q23, 6q21q22)
048	rev ish enh (13q22qter)
055	46, XY
058a*	rev ish enh (Xq), rev ish dim (Y)
059b*	rev ish dim (4p15.1p15.3)
064	rev ish dim (8q24.1qter, Y)
067	rev ish dim (5p14)
075	rev ish enh (4q11q13.1, 12q11q12) rev ish dim (1p33p36.1, 16p11.1p12)
078	rev ish enh (2q32.1q33, 3q25.3q26.3, 4p11p14, 4q11q21.3), rev ish dim (15q21.1q22.3, 16p13.1pter, 22q11.1q13.1)
088	rev ish enh (5p11p14, 5q11q23.3, 6q11q22.1, X) rev ish dim (3p24.3pter, 5q34qter, 7q33qter, 8p23.1pter, 9q32q34.1, 11q23.1qter, 12q24.2qter, 13q32qter, 15q21.1qter, 16p12pter, 16q23qter, 17, 18q, 19q13.3qter, 20q, 21q22.1qter, 22q12.2qter)
099	rev ish enh (3q11.2q13.3, 4q11q22, 6q12q21, 13q14.3q22), rev ish dim (8p23.1pter, 9q32q34.1, 10q26.1qter, 11q23.3qter, 12q24.2qter, 14q21qter, 15q23qter, 16q22qter, 17p, 20q13.2qter, 22q11.1q13.2)
100	rev ish enh (19p, X), rev ish dim (1p34.1p36.2, 1q21.2q23, 1q32.1q41, 2p16p23, 8p21.3pter, 8q21.3q23, 9q22.1q33, 10q22.1q24.1, 11q14.1q22.1, 15q21.1q25, 16p11.2p13.1, 18q12.1q21.3, 20q, 22)
107	rev ish enh (7q11.1q31.2, 10q21.2q22.2, 13q14.1q22) rev ish dim (1q41qter, 8p22pter, 16p)
108	rev ish enh (17q21.2q22, 19), rev ish dim (5q34qter, 9p23pter, 13q34qter)

Fall Nr.	Chromosomale Imbalancen nach CGH
126	rev ish enh (X), rev ish dim (3q27qter, 4p16pter, 8p22pter, 9q31q34.1, 16p12pter, 17p13pter, 21q22.3qter)
133	rev ish enh (19, X), rev ish dim (8p23.1pter, 9p23pter, 11q24qter)
138	rev ish enh (12p11p12.1) rev ish dim (2q11.1q14.3, 3q28qter, 8p21.3pter, 15q21.3qter, 22q11.1q12.3)
140	rev ish enh (19)
149	rev ish enh(19p, X), rev ish dim (2q12q23, 8p23.1pter)
153	rev ish enh (15q21.2q24, 17, 19, 20q, 22q12.3qter), rev ish dim (2q21.1q24.2, 8p23.1pter, 9p)
157	rev ish enh (1p33pter, 17p11pter, 19, 20q11.1q13.1, 22q, X), rev ish dim (9p22pter, 13q33qter, 20p13pter)
158	rev ish enh (1p32.3pter, 19p, 22q12.2qter), rev ish dim(3q28qter, 4q33qter, 5q14q21, 9p11p13, 9p23pter)
159	rev ish enh (1p34.1pter, 19, 20), rev ish dim (41q43qter, 9p)
164	rev ish dim (9p11p21)
189	n.d.
190	rev ish dim (1p22.1p31.1, 10q24.3qter)
196	rev ish dim (17p)
Im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Tumore:	
198+	rev ish enh (1p34.2pter, 16p, 19, 22, X), rev ish dim (13q)
203+	46, XY
205**+	rev ish enh (11p11.1-p12, 19, 22), rev ish dim (2q21.3q24.3, 4q26q31.1)
207**+	46, XX

n.d.: nicht durchführbar, Fallnummern,

Fälle 033-196 entnommen wie erwähnt aus Sauter, 2010, Promotion

* Fall 045 Ersteingriff, die Fälle 058a und 059b Revisionseingriffe

** Fall 205 (Ersteingriff, rechte Parotis) und 207 (Ersteingriff kontralateral, linke Parotis)

+ Im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte Tumore.

Die nachfolgende Ideogrammdarstellung (siehe Abb.14) fasst die Ergebnisse der durchgeführten CGH-Untersuchungen im graphischen Überblick zusammen. Veränderungen, die sowohl den p-Arm als auch den q-Arm eines Chromosoms betreffen, sind nur als eine Veränderung illustriert. Wahrgenommene chromosomale Gewinne und Verluste im Zystadenolymphom kommen so in der Gesamtheit zu Darstellung.

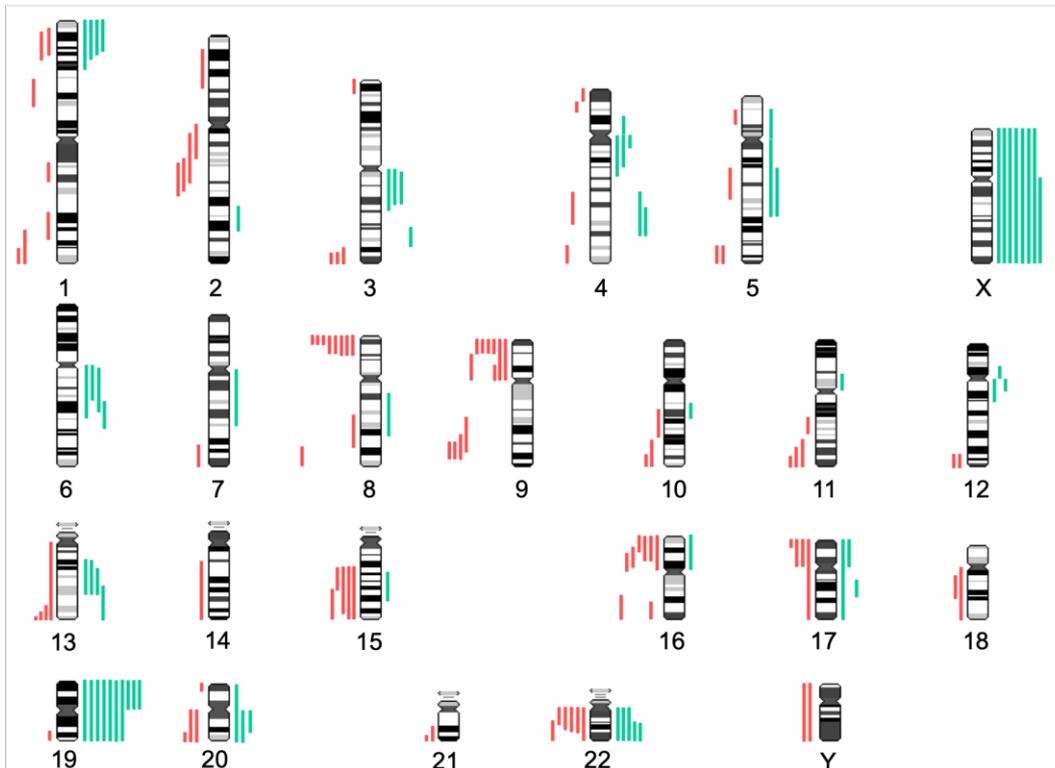


Abb. 14: **Ideogramm der untersuchten Zystadenolymphome** (n=33);
rote Balken links: Verluste; grüne Balken rechts: Gewinne

Eine weitere Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Tabelle 4 und der Abbildung 15. Während die Tabelle 4 eine präzise Darstellung der numerischen Veränderung gibt, können in Abbildung 15 auf einen Blick die prozentualen Beobachtungen von chromosomalen Veränderungen erfasst werden. Gewinne, die mehr als 20 % der Tumore des untersuchten Kollektivs betrafen, fanden sich auf den Chromosomen #19 und dem X-Chromosom. Verluste, die mehr als 20% der Tumore des untersuchten Kollektivs betrafen, fanden sich auf den Chromosomen #1, #8, #9 und #16. Das Chromosom 20 wies sowohl Gewinne als auch Verluste auf.

Tabelle 4: **Überblick der Gewinne und Verluste in der CGH der untersuchten Zystadenolyphome (n=33)**

Chromosom #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Gewinne bei n Tumoren / in %	4 / 12,1	1 / 3,0	4 / 12,1	5 / 15,2	2 / 6,1	4 / 12,1	1 / 3,0	1 / 3,0	0 / 0	1 / 3,0	1 / 3,0	3 / 9,1
Verluste bei n Tumoren / in %	7 / 21,2	5 / 15,2	4 / 12,1	4 / 12,1	4 / 12,1	0 / 0	1 / 3,0	10 / 30,3	12 / 36,4	3 / 9,1	4 / 12,1	2 / 6,1

Chromosom #	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Gewinne bei n Tumoren / in %	4 / 12,1	0 / 0	1 / 3,0	1 / 3,0	3 / 9,1	0 / 0	10 / 30,3	3 / 9,1	0 / 0	5 / 15,2	8 / 24,2	0 / 0
Verluste bei n Tumoren / in %	4 / 12,1	1 / 3,0	5 / 15,2	8 / 24,2	4 / 12,1	2 / 6,1	1 / 3,0	4 / 12,1	2 / 6,1	6 / 18,2	0 / 0	2 / 6,1

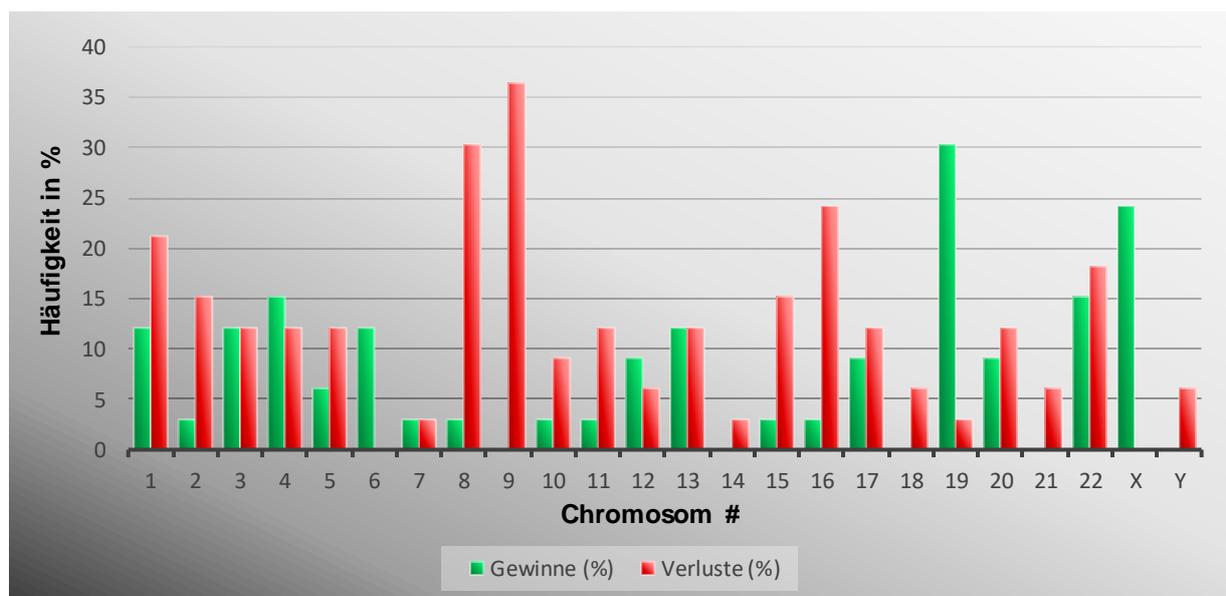


Abb. 15: **Prozentuale Angaben zu den Gewinnen und Verlusten auf den jeweiligen Chromosomen in Zystadenolyphomen (n = 33)**

4.1.3.2 Spezifische Veränderungen und Konsensusregionen

Besonderes Augenmerk galt in dieser Promotionsarbeit der Region 20q, da bereits mehrere Amplifikationen der Region #20q13 bei Tumoren, wie z.B. der Brust (Courjal und Mitarb., 1997) oder des Ovars (Sonoda und Mitarb., 1997), beobachtet wurden.

Im Rahmen dieser Untersuchung war die Region 20q in 3 von 33 Fällen von Verlusten betroffen (9%) und in 2 von 33 Fällen von Gewinnen (6%).

Betrachtet man die Ergebnisse der CGH auf übereinstimmende Veränderungen in unterschiedlichen Tumoren über die Region #20q.13 hinaus, so ergeben sich mehrere interessante Konsensusregionen.

Etwa die Tumore 153, 157 und 158 wiesen ein ähnliches Profil auf. Diese drei Fälle zeigten Verluste der Region 8p23.1pter und 9p23. Weiterhin konnten in diesen Tumoren Gewinne auf 17p, 20q und 22q nachgewiesen werden, also in 3 von 33 Fällen (9%). Im übrigen Tumorkollektiv wurden jedoch ausschließlich Verluste dieser chromosomalen Regionen beobachtet.

Ebenso auffallend ist, dass sich bezogen auf ihre chromosomalen Veränderungen, die Tumore 088 und 099 fast identisch verhielten. So wiesen sie ähnliche bzw. gleiche Veränderungen mit Verlusten in den Regionen 8p23, 17p, 11q23, 12q24, 15q21qter, 16q22, 20q13.2 und 22q11.1q13.2 und einem Gewinn in 6q11q12 auf.

Als weitere interessante Regionen stellten sich 6q mit ausschließlich Gewinnen in 6 von 33 Fällen (18%), 4q mit zwei Verlusten in 2 von 33 Fällen (6%) und fünf Gewinnen in 5 von 33 Fällen (15%) dar.

In den Regionen 8p und 9p lagen ausschließlich Verluste in 8 von 33 Fällen (24%) vor. Ebenso fanden sich in der Region 11q ausschließlich Verluste vor in 4 von 33 Fällen (12%).

Des Weiteren bestehen interessante Veränderungen auf den Chromosomen 17, 20 und 22, hier konnten sowohl Gewinnen als auch Verluste detektiert werden. Diese bestanden in 17p, 20q, sowie 22q.

4.2 Ergebnisse der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

4.2.1 Patienten- und Tumorkollektiv

Im Rahmen der FISH wurden Tumorgewebeschnitte von 28 Zystadenolyphomen untersucht. Die Tumoren mit der Fallnummer 043, 107, 108, 126, 196, 198, 203 und 205 waren aufgrund von mangelhafter Gewebsqualität der Tumorproben nicht auswertbar, dementsprechend konnten 20 Tumore mittels FISH ausgewertet werden. Diesen stammten von 8 Frauen und 12 Männern.

4.2.2 Ergebnisse der Kontrollhybridisierungen

Zur Sondentestung wurden Kontrollhybridisierungen an gesundem männlichen (m) Spendergewebe (Lymphozyten) durchgeführt. Hierdurch konnten Aussagen über die Stringenzbedingungen sowie die Detektionssysteme getroffen werden. Hierzu wurden jeweils 200 Interphasekerne ausgewertet (siehe Tabelle 5). Hieraus ergaben sich dann die Spezifität, sowie die Standardabweichungen der jeweiligen Sonde (Tabellen 5 und 6).

Die Spezifität der zentromerspezifischen Sonde #20 beträgt demnach 87,25% im Mittel, die der lokusspezifischen Sonde #20q13 im Mittel 95,25% (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Sondentestung durch Kontrollhybridisierungen mit Signalverteilung in %

Kontroll-gewebe	Geschlecht/ Alter	Anzahl der Signale in % #20cen	Anzahl der Signale in % #20q13
Lymphozyten, Kontrolle 1	m / 36	1 Signal: 15,5% 2 Signale: 83,5% 3 Signale: 1%	1 Signal: 6% 2 Signale: 94% 3 Signale: 0%
Lymphozyten, Kontrolle 2	m / 36	1 Signal: 6,5% 2 Signale: 91% 3 Signale: 2,5%	1 Signal: 2,5% 2 Signale: 96,5% 3 Signale: 1%

m (Mann), #20cen (Chromosom 20 Zentromer), #20q13 (Chromosom 20 Region q13), Angabe der jeweiligen Signalverteilung in %

Die bestimmten Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die sich daraus ergebenden doppelten Standardabweichungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: **Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontrollhybridisierungen**

Sonde für	Anzahl der Signale in %			
		1 Signal	2 Signale	3 Signale
# 20cen	Mw	11	87,25	1,75
	Std	6,36	5,3	1,06
	Mw ± 2 Std	0,0 - 23,72	76,65 - 97,85	0,0 - 3,87
# 20q13	Mw	4,25	95,25	0,5
	Std	2,47	1,77	0,71
	Mw ± 2 Std	0,0 - 9,19	91,71 - 98,79	0,5 - 1,92

#20cen (Chromosom 20 Zentromer), #20q13 (Chromosom 20 Region q13), Mw (Mittelwert), Std (Standardabweichung)

Aufgrund dessen werden Signalverluste bzw. Signalgewinne erst über dem entsprechenden erhobenen Mittelwert in Addition mit ihrer jeweiligen zweifachen Standardabweichung gewertet. Diese ergeben sich für die Sonden folgendermaßen:

- als signifikant für **Sonde #20cen** gewertet wurden:

Verluste ab: 24% (11% + 12,72%=23,72%)

Gewinne ab: 4% (1,75% + 2,12%=3,87%)

- als signifikant für **Sonde #20q13** gewertet wurden:

Verluste ab: 10% (4,25% + 4,94%= 9,19%)

Gewinne ab: 2% (0,5% + 1,42%= 1,92%)

In Abbildung 16 wird beispielhaft ein Interphasekern und eine Mitose in der Ansicht unter dem Fluoreszenzmikroskop gezeigt. Es liegt hier eine Doppelhybridisierung der zentromerspezifischen Sonde #20cen (direkt markiert FITC - grün) und der lokusspezifischen Sonde #20q13 (direkt markiert CY3 - rotorange) vor.

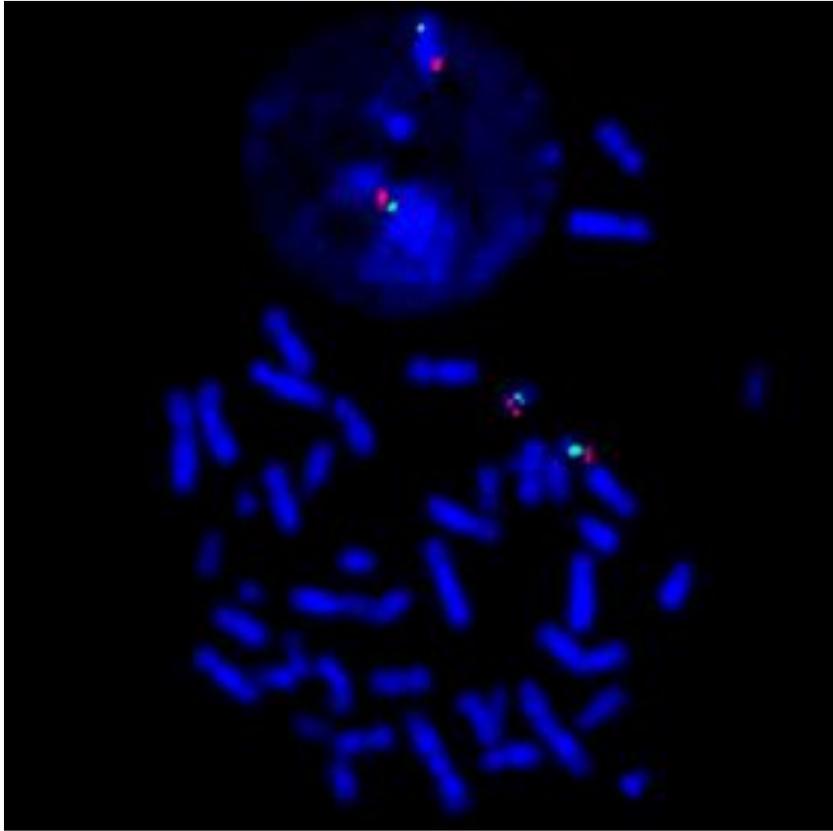


Abb.16: **Doppelhybridisierung der zentromerspezifischen Sonde #20cen** (direkt markiert FITC - grün) **und der lokusspezifischen Sonde #20q13** (direkt markiert CY3 - rotorange) markiert an Interphasekern und Mitose. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI.

4.3 Ergebnisse der FISH an Tumorproben

4.3.1 Ergebnisse der zentromerspezifischen Sonde für Chromosom 20 (#20cen)

Die Auswertung der Ergebnisse der FISH, unter der Berücksichtigung der Kontrolluntersuchungen, zeigte in 80% (16/20) der untersuchten Zystadenolymphome eine Monosomie von Chromosom 20. Der prozentuale Anteil der betroffenen Zellkerne variierte hierbei bei den einzelnen Zystadenolymphomen zwischen 25% und 74% der ausgewerteten Zellkerne.

In 35% (7/20) der Fälle zeigten bis zu 30% der Zellkerne diese Veränderung. In 20% der Tumore (4/20) bestand eine Monosomie von Chromosom 20 in bis zu 50% der Zellkerne. Darüber hinaus wurden in 25% (5/20) der untersuchten Tumore mehr als 50% Monosomien von Chromosom 20 nachgewiesen (Tumore: 040, 100, 153, 157, 159), wobei Tumor 159 in 74% seiner Zellkerne eine Monosomie aufwies und damit am häufigsten von dieser Aberration betroffen war. Nullisomien von Chromosom 20 wurden nicht beobachtet.

Eine Trisomie 20 konnte in 2 Fällen (Tumoren 067 und 133) in 4% der Zellkerne beobachtet werden. Interessanterweise lagen diese chromosomalen Gewinne in Fall 067 neben Zellkernen mit einer Monosomie 20 vor. Eine Tetrasomie 20 konnte in keinem der untersuchten Tumore beobachtet werden.

Trisomien von Chromosom 20 wurden in 10% (2/20) der Fälle in den Tumoren 067 und 133 knapp oberhalb der Signifikanzgrenze nachgewiesen. In beiden Tumoren waren 4% der Zellkerne von dieser Aberration betroffen. Hierbei ist interessant, dass nur bei Tumor 067 gleichzeitig sowohl signifikante Monosomien als auch signifikante Trisomien von Chromosom 20 nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 17 dargestellt.

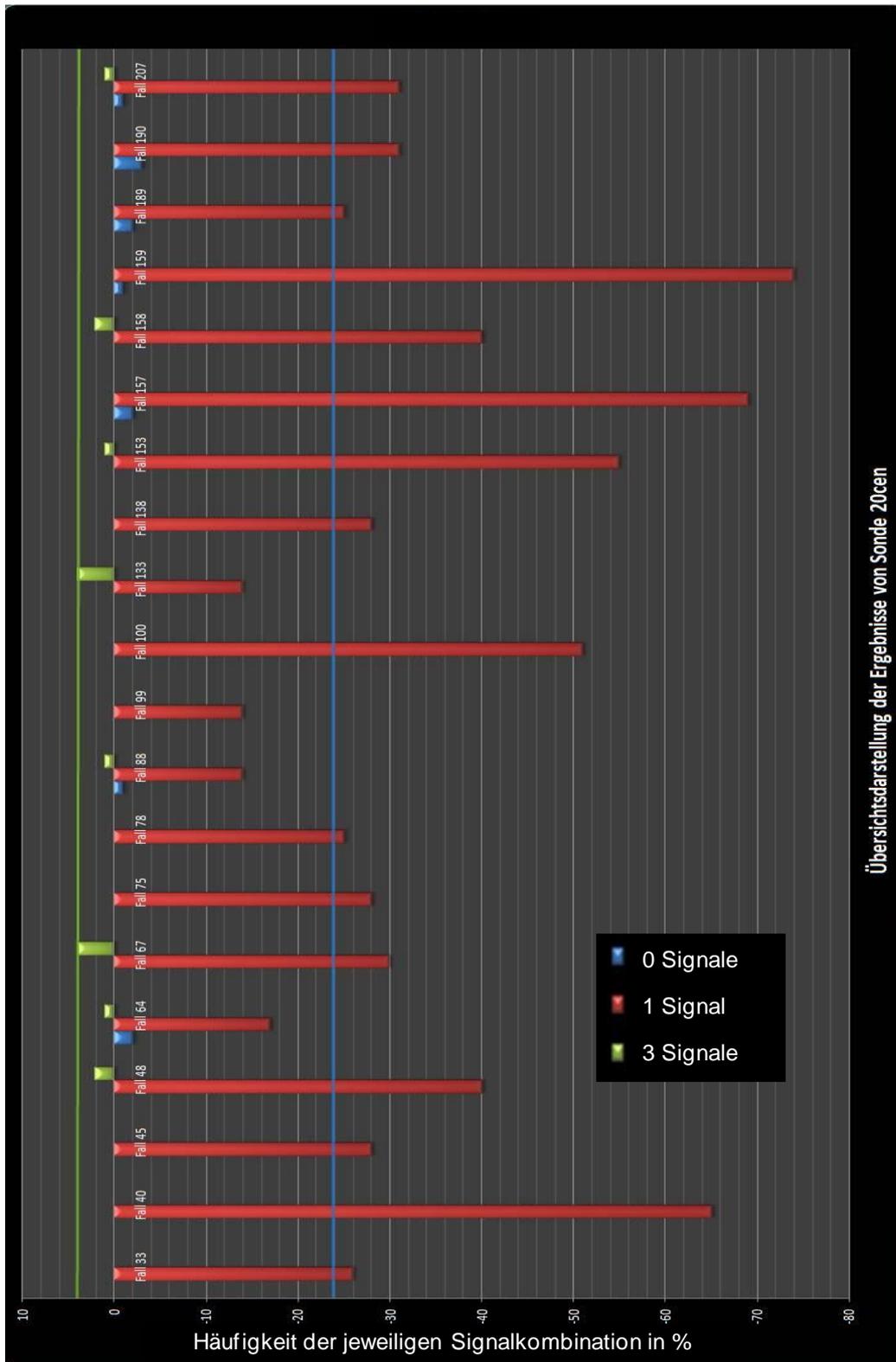


Abb. 17: Graphische Darstellung der Aberrationen der zentromerspezifischen Sonde für Chromosom 20.

Balken: Blau: Nullisomie, Rot: Monosomie 20, Grün: Trisomie 20

Linien (Wertungsgrenzen): grün: Gewinne, blau: Verluste

4.3.2 Ergebnisse der lokusspezifischen Sonde #20q13

Unter Berücksichtigung des in den Kontrollhybridisierungen ermittelten Signifikanzgrenze zeigten sich in 90% (18/20) der Fälle Monosomien der Region #20q13. Diese Aberration betraf in 45% (9/20) der Tumore bis zu 20% der Zellkerne. 35% der Fälle (7/20) wiesen heterozygote Verluste bis zu maximal 40% der Zellkerne auf.

Mehr als 40% der Zellkerne waren von einem heterozygoten Verlust der Region #20q13 in 10% (2/20) der Tumore betroffen (Tumor 088 und 100). Das Maximum an heterozygoten Verlusten der Region #20q13 lag in Tumor 088 mit 61% betroffener Zellkerne vor. Homozygote Deletionen der Region #20q13 wurden nicht beobachtet.

Signifikante Gewinne von #20q13 lagen in 25% (5/20) der untersuchten Tumore vor. Gewinne im Bereich bis 10% lagen in 20% (4/20) der Tumore vor, wobei hier 3-7% der Zellkerne von dieser Aberration betroffen waren.

Hervorzuheben ist Tumor 153, der in 23% seiner Zellkerne Gewinne der Region #20q13 aufwies und somit aus dem Gesamtkollektiv herausragt. Des Weiteren lag in diesem Fall zusätzlich ein geringer Prozentsatz an heterozygoten Verlusten in 10% der untersuchten Zellkerne vor. Auffallend sind auch die Tumoren 045 und 099, die als einziger Tumore keine signifikante Anzahl an heterozygoten Verlusten zeigen. Diese Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 18 dargestellt.

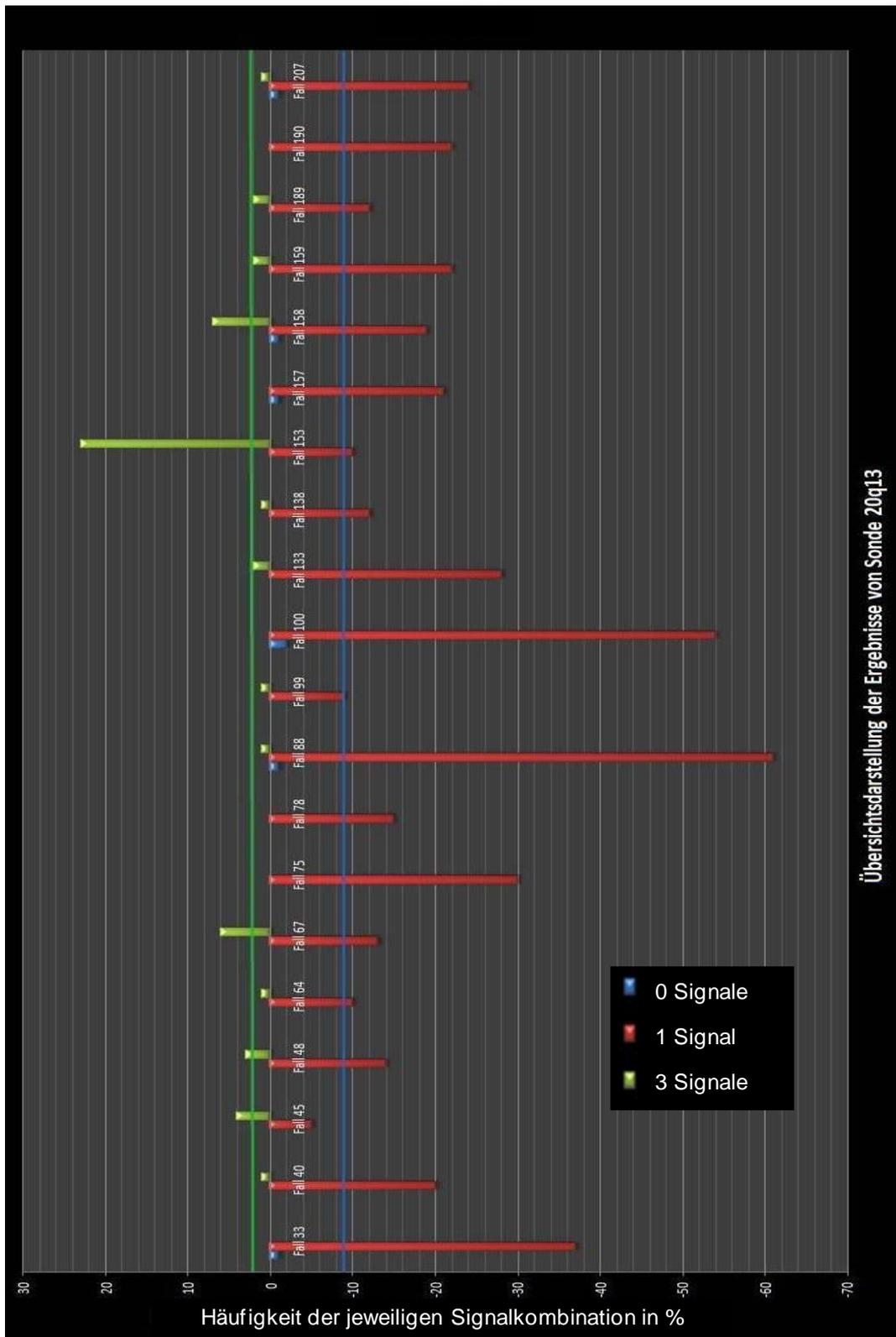


Abb. 18: Graphische Darstellung der Aberrationen der lokusspezifischen Sonde für Region #20q13.

Balken: Blau: homozygote Deletion, Rot: heterozygote Deletion, Grün: Gewinn der Region #20q13 (3 Kopien)

Linien (Wertungsgrenzen) grün: Gewinne, blau: Verluste

4.3.3 Gesamtüberblick über die Ergebnisse der FISH

Mit der zentromerspezifischen Sonde für #20 sowie einer lokuspezifischen Sonde für Region #20q13 konnten Tumorgewebeschnitte von 20 Zystadenolymphomen ausgewertet werden. Die einzelnen Ergebnisse der FISH zu der zentromerspezifischen Sonde für #20 sowie der lokusspezifischen Sonde #20q13 werden im Kapitel 4.3.1 (Ergebnisse der zentromerspezifischen Sonde für Chromosom 20) und Kapitel 4.3.2 (Ergebnisse der lokusspezifischen Sonde #20q13) erläutert. In Tabelle 7 werden die Ergebnisse der FISH an Tumorgewebeschnitten von 20 Zystadenolymphomen zusammenfassend dargestellt.

Die mittels unterstrichener Kursivschrift hervorgehobenen Daten der folgenden Tabelle 7 beinhalten die nach statistischer Auswertung erhaltenen signifikanten Gewinne bzw. Verluste der eingesetzten Proben.

Tabelle 7: Ergebnisse der FISH-Untersuchungen

Fall Nr.	Geschlecht Alter bei OP OP-Datum	Lokalisation/ Größe [cm]	Anzahl der Signale in % #20cen	Anzahl der Signale in % #20q13
033	w 79 03.07.2000	k.A.	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 26%</u> 2 Signale: 74% 3 Signale: 0%	0 Signale: 1% <u>1 Signal: 37%</u> 2 Signale: 62% 3 Signale: 0%
040	m 63 24.08.2000	L- 2,8x2x2	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 65%</u> 2 Signale: 35% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 20%</u> 2 Signale: 79% 3 Signale: 1%
043	w 53 28.08.2000	L- 7,5x4,5x2,5	n.a.	
045	m 58 22.09.2000	R- 1,3x1x1	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 28%</u> 2 Signale: 72% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% 1 Signal: 5% 2 Signale: 91% <u>3 Signale: 4%</u>
048	m 50 27.10.2000	R- 4x2,7x1,3	0 Signale: 0% <u>1 Signale: 40%</u> 2 Signale: 58% 3 Signale: 2%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 14%</u> 2 Signale: 83% <u>3 Signale: 3%</u>
064	m 51 30.03.2001	R- 5x3x2,5	0 Signale: 2% 1 Signal: 17% 2 Signale: 80% 3 Signale: 1%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 10%</u> 2 Signale: 89% 3 Signale: 1%

Fall Nr.	Geschlecht Alter bei OP OP-Datum	Lokalisation/ Größe [cm]	Anzahl der Signale in % #20cen	Anzahl der Signale in % #20q13
067	m 57 03.05.2001	R- 5,5x4,5x2,5	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 30%</u> 2 Signale: 66% <u>3 Signale: 4%</u>	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 13%</u> 2 Signale: 81% <u>3 Signale: 6%</u>
075	w 87 13.12.2001	L- 2,5x3x1,5	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 28%</u> 2 Signale: 72% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 30%</u> 2 Signale: 70% 3 Signale: 0%
078	w 63 29.01.2002	L- 4,5x4x2,5	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 25%</u> 2 Signale: 75% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 15%</u> 2 Signale: 85% 3 Signale: 0%
088	m 63 17.07.2002	R- Ca.3x3x3	0 Signale: 1% 1 Signal: 14% 2 Signale: 84% 3 Signale: 1%	0 Signale: 1% <u>1 Signal: 61%</u> 2 Signale: 37% 3 Signale: 1%
099	w 46 12.11.2002	R- 2,8x3,2x1,3	0 Signale: 0% 1 Signal: 14% 2 Signale: 86% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% 1 Signal: 9% 2 Signale: 90% 3 Signale: 1%
100	m 65 14.01.2003	L- 7x4,2x2,3	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 51%</u> 2 Signale: 49% 3 Signale: 0%	0 Signale: 2% <u>1 Signal: 54%</u> 2 Signale: 44% 3 Signale: 0%
107	w 62 26.08.2003	L- 3x2x1,5	n.a.	
108	w 80 05.05.2003	R- 9x8x6	n.a.	
126	m 58 17.02.2004	R- 5,5x3x2,5	n.a.	
133	m 46 09.06.2004	R- 8,5x5x2	0 Signale: 0% 1 Signal: 14% 2 Signale: 82% <u>3 Signale: 4%</u>	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 28%</u> 2 Signale: 70% <u>3 Signale: 2%</u>
138	m 63 19.11.2004	L- 5x2,7x2	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 28%</u> 2 Signale: 72% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 12%</u> 2 Signale: 87% 3 Signale: 1%

Fall Nr.	Geschlecht Alter bei OP OP-Datum	Lokalisation/ Größe [cm]	Anzahl der Signale in % #20cen	Anzahl der Signale in % #20q13
153	w 63 06.06.2005	L- 5,6x4,8x1,9	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 55%</u> 2 Signale: 44% 3 Signale: 1%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 10%</u> 2 Signale: 67% <u>3 Signale: 23%</u>
157	w 72 23.06.2005	R- 6x5,2x1,5	0 Signale: 2% <u>1 Signal: 69%</u> 2 Signale: 29% 3 Signale: 0%	0 Signale: 1% <u>1 Signal: 21%</u> 2 Signale: 79% 3 Signale: 0%
158	w 56 27.06.2005	L- 5,5x2,9x2,5	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 40%</u> 2 Signale: 58% 3 Signale: 2%	0 Signale: 1% <u>1 Signal: 19%</u> 2 Signale: 73% <u>3 Signale: 7%</u>
159	m 67 29.06.2005	L- 4,5x3,1x1,4	0 Signale: 1% <u>1 Signal: 74%</u> 2 Signale: 25% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 22%</u> 2 Signale: 76% <u>3 Signale: 2%</u>
189	m 42 20.01.2006	R- 5,2x3,7x2,1	0 Signale: 2% <u>1 Signal: 25%</u> 2 Signale: 73% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 12%</u> 2 Signale: 86% <u>3 Signale 2%</u>
190	m 52 31.01.2006	L- 8,9x5,2x4,5	0 Signale: 3% <u>1 Signal: 31%</u> 2 Signale: 66% 3 Signale: 0%	0 Signale: 0% <u>1 Signal: 22%</u> 2 Signale: 78% 3 Signale: 0%
196	w 65 03.03.2006	L- 5,4x3,5x2,5	n.a.	
198	m 78 28.06.2006	L- 2,5x2x1,5	n.a.	
203	m 72 28.08.2006	L- 9,5x5,4x4,2	n.a.	
205	w 57 04.09.2006	R- 2x1,9x1,4	n.a.	
207	w 58 17.01.2007	L- 3,2x4x2,4	0 Signale: 1% <u>1 Signal: 31%</u> 2 Signale: 67% 3 Signale: 1%	0 Signale: 1% <u>1 Signal: 24%</u> 2 Signale: 74% 3 Signale: 1%

n.a.: Nicht auswertbar, w: weiblich, m: männlich, L: Links, R: Rechts, die mittels unterstrichener Kursivschrift hervorgehobenen Daten der Tabelle beinhalten die nach statistischer Auswertung erhaltenen signifikanten Gewinne bzw. Verluste der eingesetzten Proben.

4.3.4 Korrelation der Sondenergebnisse

In 75% der Tumoren (15/20) zeigte sich, dass Verluste der Zentromerregion von #20 und der Region #20q13 gemeinsam auftraten, d.h. der lange Arm von Chromosom 20 deletiert war.

In 50% (10/20) der mit der lokusspezifischen Sonde #20q13 untersuchten Tumore betrug die heterozygoten Verluste 20%. Mit der zentromerspezifischen Sonde #20 wurden in diesen Fällen ebenfalls in 80% (8/10) Monosomien in über 24% der Zellkerne erfasst.

Darüber hinaus zeigten 5/20 Tumore einen Verlust der Zentromerregion von #20, in über 50% der Zellkerne, in denselben Tumoren wurden in 100% der Fälle (5/5) auch heterozygote Verluste von #20q13 über 10% dargestellt.

Die lokusspezifische Sonde für #20q13 detektierte in 90% der Tumore (18/20) heterozygote Verluste über 10%. Die zentromerspezifische Sonde #20 detektierte in 80% der Tumore (16/20) Monosomien in über 24% der ausgewerteten Zellkerne.

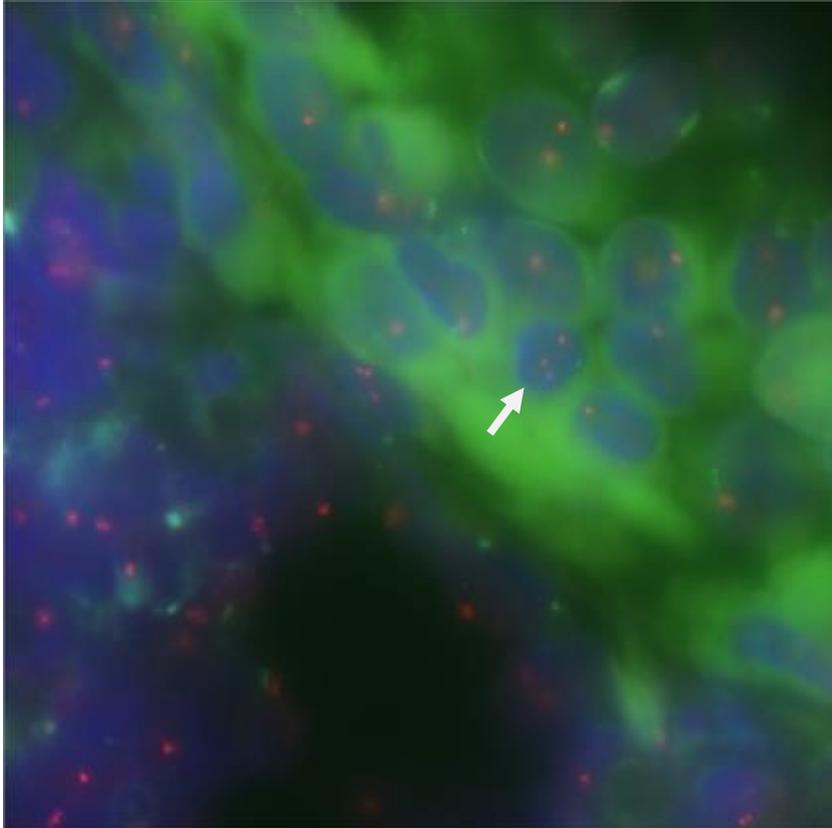
Während in 20% (4/20) der Tumore (Fall 075, 100, 190 und 207) die heterozygoten Verluste bzw. Monosomien in einer vergleichbaren Häufigkeit von Zellkernen beobachtet wurden, zeigten die übrigen Tumoren eine höhere Monosomie von #20cen im Vergleich zur heterozygoten Deletion von #20q13.

Demgegenüber zeigten 3 Tumore (Fall 033, 088 und 133) eine hohe Anzahl an heterozygoten Verlusten von #20q13, die nicht mit vergleichbar hohen Verlusten von #20cen gemeinsam auftrat.

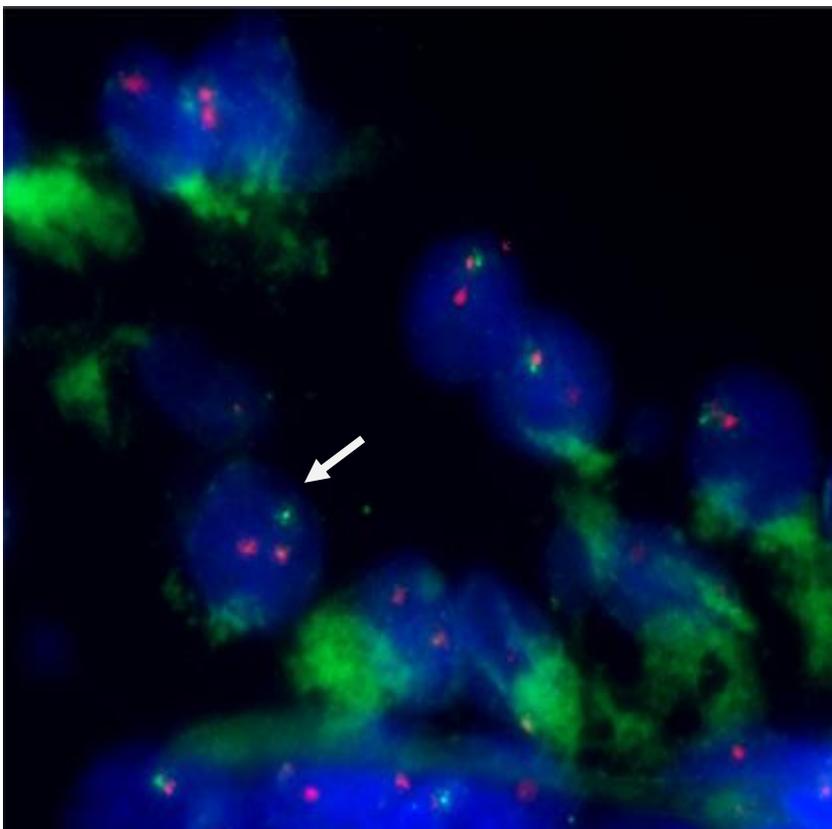
In 10% (2/20) der Tumoren konnten Trisomien der Zentromerregion mit 4% der Zellkerne direkt an der Wertungsgrenze der Sonde detektiert werden (Tumor 067 und Tumor 133). In beiden Fällen lagen auch heterozygote Gewinne von #20q13 vor: In Tumor 133 mit 4% der Zellkerne und in Tumor 067 mit 6% der Zellkerne.

In 40% (8/20) der Tumore wurden heterozygote Gewinne über 2% der Zellkerne von #20q13 detektiert. In Tumor 153 mit 23% der Zellkerne, im Tumor 067 in 6% der Zellkerne und in Tumor 158 in 7% der Zellkerne wurden die höchsten Werte ermittelt. In den folgenden Tumoren jeweils knapp an der Wertungsgrenze waren: 045 (4%), 048 (5%) und 159 sowie 189 jeweils in 2%.

Exemplarisches Bildmaterial zur Veranschaulichung der Auswertung der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ist in den nachfolgenden Abbildungen 19, 20, 21 und 22 dargestellt.



Ab. 19:
Fluoreszenzaufnahme mit simultaner Darstellung von #20cen (direkt FITC-grün markiert) **und #20q13** (direkt Cy3-rotorange markiert) **am Tumorgewebschnitt von Tumor Nr. 048** (Olympus BX60 Mikroskop), 3 Signale für #20q13, 1 Signal für #20cen (mit Pfeil markiert)



Ab. 20:
Fluoreszenzaufnahme mit simultaner Darstellung von #20cen (direkt FITC-grün markiert) **und #20q13** (direkt Cy3-rotorange markiert) **am Tumorgewebschnitt von Tumor Nr. 157** (Olympus BX60 Mikroskop), 2 Signale für #20q13, 1 Signal für #20cen. (mit Pfeil markiert)

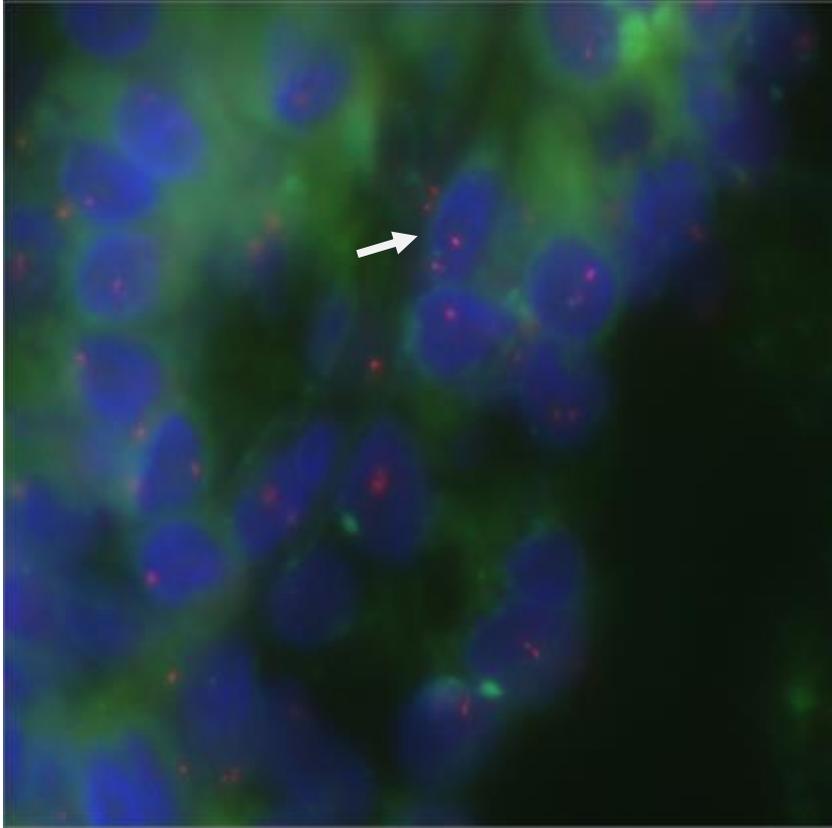


Abb. 21:
Fluoreszenzaufnahme mit simultaner Darstellung von #20cen (direkt FITC-grün markiert) **und #20q13** (direkt Cy3-rotorange markiert) **am Tumorgewebschnitt von Tumor Nr. 158** (Olympus BX60 Mikroskop) (mit Pfeil markiert) Der Schnitt verdeutlicht die Schwierigkeit des Abschätzens des Pepsinverdaus. Mittig und unten im Bild genügend verdautes Areal, links und oben und rechts nicht ausreichend verdauter Bereich.

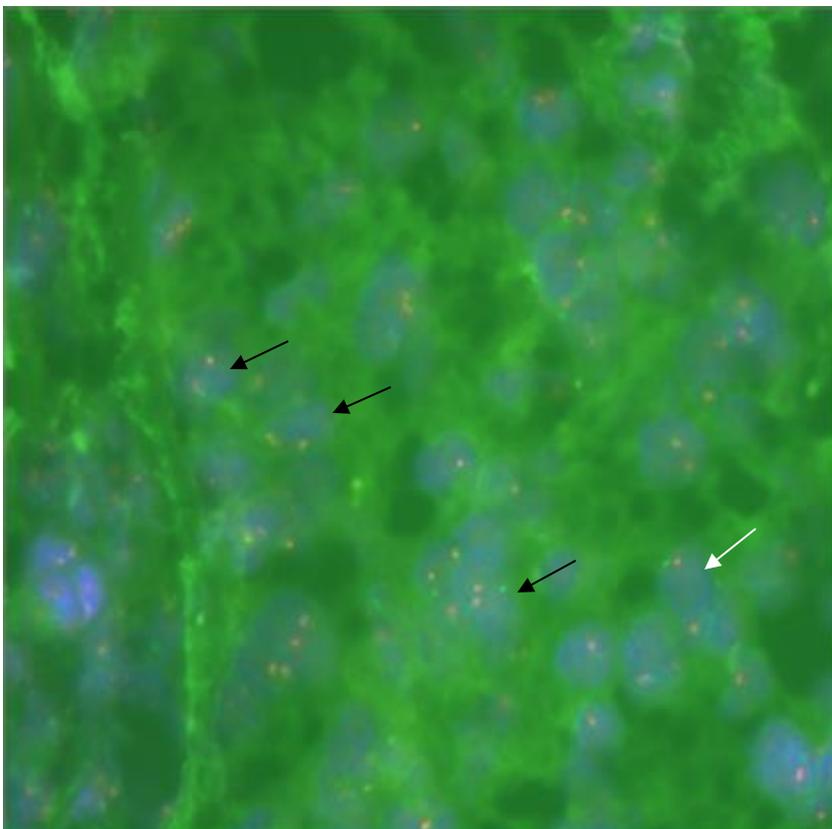


Abb. 22:
Fluoreszenzaufnahme mit simultaner Darstellung von #20cen (direkt FITC-grün markiert) **und #20q13** (direkt Cy3-rotorange markiert) **am Tumorgewebschnitt von Tumor Nr. 200** (Olympus BX60 Mikroskop). Der Schnitt zeigt einen gut auswertbaren Bereich von Zellkernen mit 2 Signalen #20q13 und 1 Signal von #20. (schwarze Pfeile). Des Weiteren einen Zellkern mit jeweils 1 Signal von #20q13 und 1 Signal von #20cen. (weißer Pfeil). Auch gut zur Darstellung kommt hier bindegewebereiches Areal dieses Zystadenolyphoms oben links.

4.4 Korrelation der CGH-Ergebnisse zur FISH

Wie unter Kapitel 4.1 (Ergebnisse der Comparativen genomischen Hybridisierung) erwähnt wurden die Zystadenolymphome mit den Fallnummern von 033 bis 196 (29 auswertbare Fälle) von Sauter mittels CGH im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit (Sauter, 2010) untersucht und die Tumore mit den Fallnummern 198 bis 207 (4 Fälle) im Rahmen dieser Arbeit hinzugefügt.

In 28 Fällen wurde eine FISH durchgeführt, welche in 20 Fällen (71%) auswertbar war. In 5 Fällen lagen in der CGH Veränderungen vor, welche mittels der angewandten Sonden in der FISH weiter zu untersuchen waren. Diese sind nachfolgend in Tabelle 8 dargestellt.

Dabei konnten die in der CGH erhobenen Befunde in 3 Fällen (088, 100 und 153) bestätigt werden. Die Fälle 088 und 100 wiesen in der CGH Verluste von #20q auf, welche sich in einer heterozygoten Deletion von #20q13 in 61% der untersuchten Zellkerne (Tumor 088) bzw. 54% der untersuchten Zellkerne (Tumor 100) in der FISH bestätigte.

Darüber hinaus konnte der in der CGH gezeigte Befund in Tumor 153 von einem Gewinn auf #20q durch die in der FISH gezeigten Gewinne von #20q13 in 23% der ausgezählten Zellkernen bestätigt werden.

In zwei Fällen (099 und 159) bestätigten sich die Ergebnisse der CGH nicht in der FISH. In Tumor 099 waren in der CGH Verluste in #20q13.2qter detektiert worden, in den mittels FISH untersuchten Zellkernen lagen die Verluste jeweils knapp unterhalb der jeweiligen Signifikanzschwelle der beiden Sonden: im Fall der lokusspezifischen Sonde für #20q13 in 9% (1 Signal) der ausgewerteten Zellkerne (Signifikanzschwelle 10%) und für die Sonde #20cen in 14% (1 Signal) der ausgewerteten Zellkerne (Signifikanzschwelle 24%).

In Tumor 159 waren in der CGH Gewinne auf Chromosom 20 detektiert worden, dies bestätigte sich in den mittels FISH untersuchten Zellkernen nicht. Es zeigten sich heterozygote Deletionen von Region #20q13 in 22% der untersuchten Zellkerne, sowie Monosomien von #20cen in 74% der untersuchten Zellkerne.

Angegeben sind in Tabelle 8 die Fallnummer und die genomischen Veränderungen des jeweiligen Tumors, welche mittels ISCN Schreibweise beschrieben wurden. Gewinne sind dabei als reverse in situ hybridization enhanced (rev ish enh) und Verluste als reverse in situ hybridization diminished (rev ish dim) definiert. Die genaue Nomenklatur wurde in Kapitel 4.1.2 (Deskriptive Analyse der vier hinzugefügten Tumore) erläutert.

Beispiel: Tumor 088 verzeichnet auf dem Chromosomenarm 20q einen Verlust bei der CGH (rev ish dim). In der FISH zeigte sich dabei auf dem Chromosomenabschnitt #20q13 bei 61% der untersuchten Tumorzellen nur 1 Signal und auf #20cen bei 14% der untersuchten Zellen.

Tabelle 8: Vergleich von CGH und FISH

	Verluste			Gewinne		
	GCH	FISH		GCH	FISH	
Fall Nr.	Verluste	1 Signal	% Anteil mit 1 Signal	Gewinne	3 Signale	% Anteil mit 3 Signalen
088	20q	#20q13 #20cen	61 14	-	-	0
099	20q13.2qter	#20q13 #20cen	9 14	-	-	0
100	20q	#20q13 #20cen	54 51	-	-	0
153	-	#20q13 #20cen	10 55	20q	#20q13	23
159	-	#20q13 #20cen	22 74	20	#20q13	2

5 Diskussion

5.1 Materialdiskussion

5.1.1 Kontrollgewebe: Lymphozyten

Bei vielen experimentellen Arbeiten stellt sich das Problem der Testung von Sonden bzw. Methoden im Allgemeinen in Bezug auf ihre Zuverlässigkeit und Verhalten an unverändertem Gewebe. Nur dadurch wird es möglich, die Ergebnisse an Tumorgewebe sinnvoll zu interpretieren und gegebenenfalls Modifikationen am Versuchsaufbau oder den verwandten Materialien vorzunehmen. Hier besteht jedoch die Problematik der Gewinnung solchen Vergleichsgewebes. Humanes, gesundes Parotidgewebe ist weder regulär verfügbar, noch aufgrund der heterogenen Gewebszusammensetzung, als wertvolles Vergleichsgewebe zu werten. Somit wurde zur Sondentestung auf gesunde humane Spenderlymphozyten zurückgegriffen. Dieses Verfahren ist sehr gut etabliert und es ermöglicht zuverlässig die Sondentestung an einem nachweislich normalen Chromosomensatz. Lymphozyten weisen die notwendigen Zielstrukturen auf und sind so aufzubereiten, dass ein vergleichbarer Versuchsaufbau daran zu etablieren ist. Des Weiteren sind Lymphozyten nach ethischen Grundsätzen gewinnbar, sowie leicht in ausreichenden Mengen verfügbar. Die im Rahmen dieser Arbeit als Referenzgewebe zur Etablierung der Methode FISH mit den entsprechenden Sonden eingesetzten humanen Lymphozyten stellen ein solches Gewebe dar. Allerdings reichen sie in unterschiedlichen Punkten nur begrenzt an die Eigenschaften von humanem Parotidgewebe heran. So existieren keinerlei bindegewebige Strukturen, noch ist die Zelldichte von Tumorgewebe zu erreichen. Aus diesen Gründen lässt sich zwar eine sinnvolle Sondentestung an Interphasekernen durchführen, jedoch bleibt zu berücksichtigen, dass es durch die eben genannten Unterschiede zu Parotidgewebe teils deutliche Anpassungen in Bezug auf Dosierung und Einwirkzeit enzymatischer Verdauzeiten vorzunehmen gilt.

Eine weitere Problematik besteht darin, dass die Lymphozyten von einem „gesunden“ Spender stammen. Dies ist jedoch eine Proklamation bzw. eine Annahme. Sie beruht auf Wahrscheinlichkeiten, da man sich ohne zusätzliche genetische vorab Diagnostik nur auf das sich bietende klinische Bild und die Angaben des Probanden verlassen kann. Somit sind chromosomale Aberrationen oder klinisch nicht manifeste Veränderungen des Erbgutes letztendlich bei diesem Vorgehen zwar äußerst unwahrscheinlich, aber letztendlich nicht auszuschließen. Dies kann also zur Folge haben, dass falsche Ausgangswerte erhoben werden und somit das Ergebnis als solches verfälscht wird. Um diese Fehlerquelle auszuschließen müsste vorab eine genaue genetische Abklärung des Probanden erfolgen, um eine zuverlässige Kontrollstruktur zu etablieren. Diese genau untersuchten, gesunden Spender könnten dann in vielen Untersuchungen als sichere Kontrolle dienen. Des Weiteren

bleibt zu beachten, dass Lymphozytenpräparate in ihrer Präparation bislang international betrachtet nur unzureichend standardisiert aufzubereiten sind. So hat jedes Labor seine eigenen teilweise erheblich voneinander divergierenden Präparationsvorschriften. Die Präparation als solche ist sehr anfällig u.a. für äußere Einflüsse wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, vorherrschender Atmosphärendruck oder die Auftropfhöhe der Lymphozytensuspension auf den Objektträger. Dies führt teilweise dazu, dass ganze Präparationen nicht verwertbar oder in ihrer Spreizung unzulänglich sind. Manifest wird eine solche ungenügende Präparation etwa in einem zu hohen Kondensationsgrad (Spowart und Mitarb., 1994), was die maximal erreichbare Auflösung deutlich herabsetzen kann. Befinden sich die Chromosomen noch in der Prometaphase, zeigen sich regelhaft Überlagerungsphänomene, welche eine Auswertung erheblich erschweren oder unmöglich machen. Auch eine ungenügende Entfernung von Zytoplasmaresten kann teils erhebliche Hintergrundstrahlung oder Artefakte hervorrufen (Karhu und Mitarb., 1997), welche im Fall der FISH das Auszählen deutlich erschweren oder unmöglich machen kann.

Auch in der CGH bilden präparierte Lymphozyten die Grundlage des gewählten Versuchsaufbaus und können somit bei schlechter Hybridisierungsqualität das Ergebnis verfälschen, da hier die Relation von Hintergrundstrahlung zur Fluoreszenzstrahlung zu beachten ist, bzw. Farbintensitäten als solche das Ergebnis beeinflussen können. Dies kann durch die Verarbeitungssoftware korrigiert werden, stellt jedoch potentiell eine Beeinflussung dar. Eine bestehende Möglichkeit, die Eignung präparierter Chromosomen zu testen besteht in der Testhybridisierung von DNA mit vorher bekannten genetischen Veränderungen, wie z.B. der auch in dieser Arbeit verwendeten Kolonkarzinomzelllinie Colo 320 (siehe Abb. 23) oder Normal-DNA vs. Normal-DNA. Kommt es zu divergierenden Ergebnissen von diesem vorher bekannten Standard, muss eine erneute Versuchsdurchführung erfolgen bzw. im wiederholten Falle eine neuerliche Chromosomenpräparation vorgenommen werden. Theorien über Einflussfaktoren auf die einzelnen Präparationsschritte, wie der Hypotoniebehandlung, der Colcemidbehandlung oder etwa der Trocknung existieren viele, sind aber meist nicht reproduzierbar und sollen in ihrer Darlegung nicht Gegenstand dieser Arbeit sein.

Auch sind die Lymphozytenpräparate nicht langfristig haltbar und sollten optimalerweise unmittelbar nach der Präparation experimentell verwandt werden, da eine bakterielle Besiedlung, auch bei möglichst sterilem Arbeiten, rasch erfolgen kann.

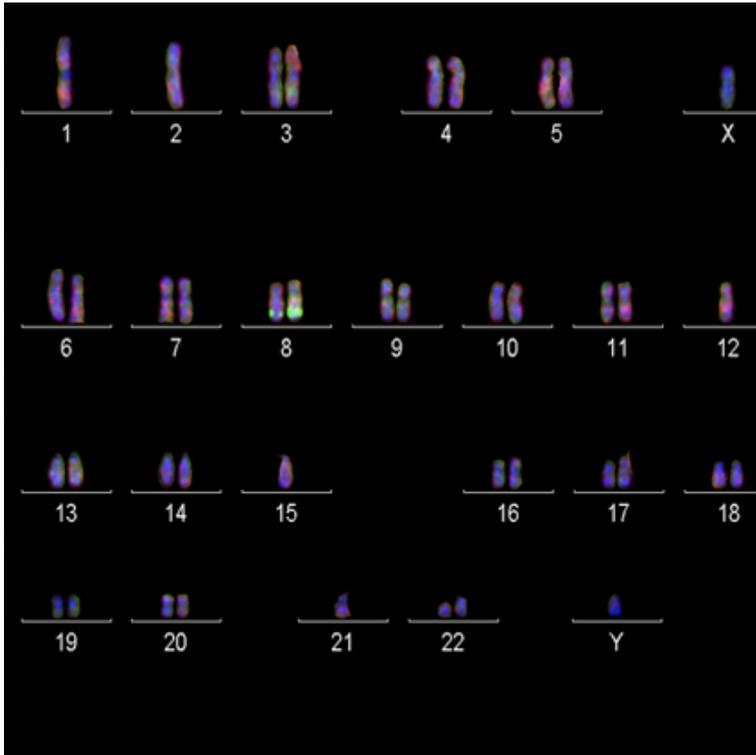


Abb. 23: **CGH Referenzlinie C320 (Kolonkarzinomzelllinie) mit Veränderungen auf Chromosom 8 und 3.** Zu sehen ist hier ein zugeordneter Satz an Chromosomen, der CGH Referenzlinie C320 (Kolonkarzinomzelllinie), mit bekannter, und hier gut zur Darstellung kommender Veränderung auf den Chromosomen 8 und 3 (entnommen aus Wemmert, 2006, Promotion).

5.1.2 Tumorgewebe und Tumorgewebeverarbeitung

Um ein zuverlässiges Endergebnis zu gewährleisten, müssen an das Zielgewebe mehrere Anforderungen gestellt werden, welche sowohl die Präparation, die Aufbewahrung und die definitive Aufbereitung betreffen. So erfolgt durch den Operateur während der Resektion des Tumors eine Vorauswahl der für die Pathologie bestimmten Gewebeprobe, falls nicht das gesamte Präparat, sondern nur Teile davon zur histopathologischen Aufarbeitung übersendet werden. In der Pathologie wird dann über die definitive Eignung der Gewebeproben entschieden und an ihnen die Diagnose gestellt. So kann eine nicht repräsentative Gewebeprobe zu erheblichen Ergebnisdivergenzen führen, die dann fälschlicherweise dem Tumor zugeschrieben werden, oder eine Diagnosestellung erschweren oder gar unmöglich machen. Im Falle des hier untersuchten Zystadenolymphoms ist die Auswahl der Tumorphobie von großer Bedeutung. Wenn die operative Versorgung der Tumore in frühen Stadien erfolgt, kann eine nur beschränkte Tumorgewebsprobe zur Verfügung stehen. Des Weiteren besteht das Zystadenolymphom aus sehr heterogenen Gewebsanteilen. So lagen innerhalb des untersuchten Tumorkollektives Gewebeproben vor, die fast nur aus zystischem oder kryptischem Gewebe bestanden, aber auch sehr solide und kompakt imponierende Tumorphoben, welche sich rein optisch vollständig von den erstgenannten unterschieden. So kann innerhalb von Zystadenolymphomen auch lediglich proliferiertes Normalgewebe vorliegen, welches aus lymphozytären Einschlüssen oder aus stromatösem Gewebe besteht (Eveson

und Mitarb., 1992). Es lässt sich demnach insbesondere bei relativ kleinem Tumor nicht gänzlich ausschließen, das Gewebe in das Tumorkollektiv aufgenommen wird, welches aus einem Randbereich stammt bzw. Bestandteile beinhaltet, welche als nicht repräsentativ zu bezeichnen sind. Diese Fehlerquelle lässt sich nur durch den Operateur mit einer möglichst optimalen Wahl des eingesandten Gewebes und durch eine strikte Kontrolle der Schnitte durch HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, verbreitete Färbung in der Pathologie zur Übersichtsfärbung von Tumoren) minimieren.

Ähnlich hohe Anforderungen stellen sich an den anzufertigenden Kryostatschnitt. Hier ist wiederum auf eine perfekte Schnittführung zu achten, sodass ein gleichmäßiger regelrecht auf den Objektträger einzupassender Schnitt vorliegt. Da nur bedingt viel Gewebe zur Verfügung steht, kann dies bei mehreren Versuchsreihen ein limitierender Faktor sein. Als Schnittdicke wurde in dieser Arbeit 6 µm gewählt, da diese Schichtdicke einerseits gerade noch groß genug ist um Zellkerne unberührt zu lassen, andererseits aber dünn genug ist, um eine möglichst differenzierte Aussage über das vorhandene Zellmaterial zu ermöglichen. Auch bei dieser Schichtung kann es teils zu Überlagerungsphänomenen von Zellkernen kommen, welche somit auch Signalüberlagerungen bedingen bzw. ist es möglich, dass akzidentiell Zellkerne angeschnitten werden und somit fälschlicherweise Signale fehlen, oder sich trotz der gewählten Schichtdicke überlagern. Dies erschwert in solchen Schnittarealen das Auszählen der Fluoreszenzsignale erheblich, da eine sichere Abgrenzung der einzelnen Kerne zueinander zum Teil auch durch wiederholtes Nachstellen der im Fokus abgebildeten Ebene nicht möglich ist. Grundlegend bestehen unterschiedliche Optionen den Schnitt zur weiteren Bearbeitung auf dem Objektträger abzudecken, in dieser Arbeit wurden die Tumorschnitte mit einem Glasplättchen abgedeckt. Allerdings sind auch andere Techniken zur Abdeckung möglich, wie Überzug mit einem Film (Xylene Activated Adhesive-Backed Tissue-Tek® Coverslipping Film, Sakura™, Tokyo, Japan), oder das Abdecken mit einer Flüssigkeit (Cristallo® Diapath™, Martinengo, Italy). Eine Arbeit verglich diese Methoden, hierbei ergaben sich Vorteile der Glasabdeckungsmethode in der Resistenz der Präparate hinsichtlich Austrocknung, jedoch Nachteile in Bezug auf Lufteinschlüsse, welche auch in der hier vorliegenden Arbeit manchmal auftraten (Ferreira und Mitarb., 2022). Ein weiterer Punkt bei der Herstellung der Schnitte ist der sparsame Gebrauch des Aufblockmediums. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete TissueTec erzeugt, sollte es akzidentiell in die Schnittebene und somit in das Präparat gelangt sein, bei der späteren Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop starke Hintergrundstrahlung. Diese schränkt die Färbung der Zellkerne in ihrer Aussagekraft ein, da die Integrität des Zellkerns in manchen Fällen nicht sicher beurteilt werden kann. In geringerem Maße wurde auch die Auswertbarkeit der anderen Fluoreszenzsignale erschwert. In manchen Fällen werden ganze Schnittreihen durch diesen Umstand unauswertbar und mussten wiederholt neu bearbeitet werden.

Letztlich wirkt sich eine etwaige lange Lagerung der Schnitte negativ auf die spätere Hybridisierungsqualität aus. So waren die zellulären Strukturen der Schnittpräparate durch die Lagerung teils derart degeneriert, dass die enzymatische Behandlung derselben mit Pepsin nahezu alle geweblichen Bestandteile verdaute. Auch eine deutliche Reduzierung der Verdauzeiten ergab keine Verbesserung des Ergebnisses. Jedoch war es nach dem Anfertigen einer neuen Schnittserie des betreffenden Tumors ohne weiteres möglich, diese mit adäquaten Einwirkzeiten mit Pepsin zu behandeln.

5.2 Methodendiskussion

5.2.1 CGH

Für das Ergebnis der CGH ist wie eingangs erwähnt eine hochwertige Lymphozytenpräparation erforderlich, da sie die Auswertbarkeit grundlegend beeinflusst. Die Qualität der Präparation fällt bereits bei der Zuordnung der Chromosomen ins Gewicht, welche anhand der DAPI-Bänderung erfolgt. Diese lässt sich mit einer GTG-Bänderung (G-Bands by trypsin using Giemsa), welche die Standardmethode in der Analyse von Chromosomen zur Detektion struktureller oder numerischer Aberrationen (Vance und Mitarb., 2020) vergleichen, ist aber nicht so hochauflösend wie eine GTG-Bänderung (Wan und Mitarb., 2024). Durch Erfahrung muss eine sichere Zuordnung gewährleistet sein. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Bildqualität ist die Integrationszeit der Bildaufnahmen, da durch sie die Kontrastwerte maßgeblich beeinflusst werden. Bei der Zuordnung zeigen sich vor allem die Chromosomen der C-Gruppe als mittelgroße submetazentrische Chromosomen (Chromosom 6-12) und der Gruppe F als kurze metazentrische Chromosomen (Chromosom 16-18), aufgrund ihrer ähnlichen Bänderungsmuster anspruchsvoll. Unklar abgebildete sich überlagernde oder nicht zuzuordnende Chromosomen wurden nicht in die Auswertung aufgenommen. Je Fall wurden 10-15 Metaphasen zugeordnet. Anhand dieser Metaphasen erfolgt nun mittels der Software die eigentliche Auswertung. Hier fällt die Qualität der Chromosomenpräparation ein weiteres Mal ins Gewicht, da durch eine schlechte Präparation hier teils deutliche Abweichungen in den Profilen erzeugt werden. Eine Limitierung dieser Methode zeigt sich bei den Chromosomen #1, #9, #16 und #19, da sie relativ hohe Heterochromatinanteile aufweisen und deshalb mittels herkömmlicher CGH nur bedingt zu beurteilen sind (Kallioniemi und Mitarb., 1994; Heller und Mitarb., 2009). Auch sind generell Telomerregionen und Zentromerregionen bei unterschiedlichen Individuen teils variabel angelegt und zeigen starke Hybridisierungsschwankungen (Kallioniemi und Mitarb., 1994; Karhu und Mitarb., 1997).

Des Weiteren sind mittels der CGH erst Veränderungen detektierbar, die in etwa 40-50% der Zellkerne vorhanden sind (Dupont und Mitarb., 2003). Dadurch bedingt bleiben

Veränderungen unterhalb dieser Schwelle unerkannt. Insbesondere sind auch balancierte Veränderungen nicht detektierbar.

Es wurden in den Jahren der experimentellen Phase dieser Arbeit große Fortschritte erzielt, um die maximale Auflösungsgrenze herkömmlicher CGH-Versuche von etwa 10-20 Mb an Veränderungen der Kopienzahl zu erhöhen. So erreichen etwa Sequence Based High Resolution-CGH´s eine maximale Auflösungsfähigkeit von bis zu 2 Mb (Kowalska und Mitarb., 2010). Die ebenfalls hochauflösende Microdissection-based-CGH (Heller und Mitarb., 2009) oder die Array-CGH mit einem Auflösungsvermögen von 0,5-1 Mb (Pinkel und Mitarb., 2005) bis hin zu theoretisch 36 kb (etwa Agilent 244A, Human Genome CNV Microarrays Part Number: G4423B, Agilent™2024) stellen mittlerweile etablierte hochauflösende Alternativen zur konventionellen CGH dar (Coe und Mitarb., 2007; Silva und Mitarb., 2019). Die letztgenannte Technik (Array-CGH) stellt mittlerweile eines der Standardverfahren der Molekularzytogenetik dar und hat die konventionelle CGH verdrängt. Die Array-CGH hat zwar ein höheres Auflösungsvermögen (Shaw und Mitarb., 2004) als die in dieser Arbeit verwandte konventionelle CGH, hat jedoch die ähnlichen prinzipiellen Schwächen der Methode, u.a. bei nur kleinen Gewebeproben, heterogenem Gewebe, Detektion von Single-copy-changes oder balancierten Veränderungen. Die Array-CGH wurde unter anderem in Arbeiten von Yang und Mitarbeitern (2005) an Magentumoren oder von Holzmann und Mitarbeitern (2004) an Pankreastumoren eingesetzt, um Aussagen über eine *ZBF217*-Expression zu treffen. Aktuelle Arbeiten nutzten diese Technik etwa, um Mikrozephalie bei Kindern oder chromosomale Aberrationen bei wiederholten Fehlgeburten zu untersuchen (Tsoutsou und Mitarb., 2017; Kowalczyk und Mitarb., 2022).

Speziell die Problematik heterogener Tumorstrukturen kommt an dieser Stelle beim Zystadenolymphom zum Tragen, da der Tumor wie unter Kapitel 2.6 (Die Region #20q13 und *ZNF217*) beschrieben aus unterschiedlichen Gewebsanteilen aufgebaut ist.

Abschließend ist zu sagen, dass die CGH als solche zum damaligen Zeitpunkt der experimentellen Phase dieser Arbeit dazu geeignet war, quantitative unbalancierte Veränderungen des genomischen Materials zu zeigen, es mittlerweile jedoch hochauflösendere Weiterentwicklungen der Technik gibt. Strukturelle Aberrationen, wie balancierte Translokationen bleiben durch die Methode bedingt, wie auch Insertationen oder etwa kleine Veränderungen, wie Punktmutationen unerkannt, ihre Detektion muss durch andere Verfahren erfolgen. Somit ist das Verfahren grundlegend geeignet, um in einem Tumorkollektiv überblicksartig größere chromosomale Veränderungen oder etwa Konsensusregionen zu detektieren. Sie sollte aber, wie in dieser Arbeit geschehen, mit einem zweiten davon unabhängigen, spezifischeren Verfahren, wie hier der FISH, kombiniert werden, um die Hinweise der konventionellen CGH zu überprüfen.

5.2.2 FISH

Die FISH stellt ein hochauflösendes Verfahren zur Detektion definierter chromosomaler Veränderungen dar und wurde schon erfolgreich an anderen Tumorentitäten genutzt, um numerische Veränderungen oder eine erhöhte Amplifikationsraten der *ZNF217* codierenden Region nachzuweisen. Kolorektale Karzinome (Hidaka und Mitarb., 2000), Mammakarzinome (Shimada und Mitarb., 2005), Ovarialtumore (Tanner und Mitarb., 2000; Li und Mitarb., 2006) spinözelluläre Karzinome (Freier und Mitarb., 2003) sowie Melanome (Koynova und Mitarb., 2007) sind an dieser Stelle aufzuführen. Eine Arbeit nutzt die Weiterentwicklung der FISH, nämlich die Mikro Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (μ FISH), um den humanen epidermalen Wachstumsfaktor 2 (HER2) in Brustkrebsgewebe zu detektieren (Huber und Mitarb., 2018; Nguyen und Mitarb., 2017; Perez-Toralla und Mitarb., 2015).

Da dieses Verfahren empfindlich ist, ist es von besonderer Bedeutung optimale Hybridisierungsbedingungen für die eingesetzten Sonden zu schaffen. Dies beginnt mit der Ermittlung der Einwirkzeit von Pepsin. Diese sogenannte „Verdauzeit“ variiert von Präparat zu Präparat und ist teils erheblich. In dieser Arbeit waren Verdauzeiten von 2 Minuten bis hin zu 12 Minuten notwendig. Um die Präparate optimal zu verdauen und sie für die Sonden zugänglich zu machen, wird ein HE-Schnitt je Präparat angefertigt. In einem ersten Schritt gestattet dieser Schnitt die Verdauzeit gut anhand der vorliegenden Zelldichte, bindegewebiger Strukturen und Gewebsarchitektur abzuschätzen. Eine Problematik zeigte sich, wenn die Biopsie aus einem Bereich des Zystadenolymphomes mit rein zystischen Anteilen stammte. Hier war es bei manchen Schnitten auch bei minimaler Einwirkzeit, etwa bei den Präparaten 108 und 205, nicht möglich, eine geeignete Verdauzeit zu ermitteln. Durch geringe Mengen von Bindegewebe und sehr geringer Zelldichte war hier eine Auflösung fast der gesamten Zellschubstanz nicht zu verhindern, weshalb diese Tumore mittels FISH nicht untersucht werden konnten. Andere Präparate waren selbst nach starker Erhöhung der Einwirkzeit des Pepsins nicht ausreichend aufzubereiten, um suffiziente Hybridisierungsbedingungen zu schaffen. Die Etablierung eines einheitlichen Aufbereitungsprotokolls, wie etwa von Wilkens (Wilkens und Mitarb., 2005) für unterschiedliche Gewebe wie Schmierpräparationen etabliert, war hier nicht möglich, da die vorliegenden Präparate teils komplett unterschiedliche Gewebeskonsistenzen aufwiesen. Dies ist bei Schmierpräparationen nicht gegeben.

Möglicherweise kann eine Vorbehandlung mittels Mikrowellenstrahlung (Shi und Mitarb., 1991; Wilkens und Mitarb., 2005) auch im Falle des eines schwer aufzubereitenden Zystadenolymphomgewebes zu einer besseren Hybridisierungsqualität beitragen. Der Effekt der Mikrowellenstrahlung gründet sich hier auf die Lösung sogenannter cross-links, welche durch Fixierschritte mit Formalin oder Formamid verursacht werden können (McGhee und

Mitarb., 1977; Shi und Mitarb., 1991; Wilkens und Mitarb., 2005). Des Weiteren wird diesem veränderten Aufbereitungsprozedere eine verbesserte Detektionsfähigkeit für DNA zugeschrieben (Nolte und Mitarb., 1995; Wilkens und Mitarb., 1996). Auch wurden hier deutlich geringere Hybridisierungszeiten benötigt. Lag im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit die Hybridisierungszeit bei etwa 2 Tagen, so reichten in diesem modifizierten Versuchsaufbau mit Paraffin eingebetteten Schnitten 30 Minuten aus. Eine Modifizierung des hier angewendeten Protokolls wäre vor allem in Bezug auf die Zeitersparnis bei gleicher Hybridisierungsqualität zu überdenken.

Eine gute Anpassung der applizierten Sondenmenge bzw. Zusammensetzung des Hybridisierungsmixes ist ebenfalls anzustreben (Komminoth und Mitarb., 2010), um einerseits Fehlbindungen zu vermeiden und andererseits genügend Sondenmaterial einzubringen, um die Zielloki zu erreichen und somit ein optimales Hybridisierungsergebnis zu erzielen. Hierbei sollte neben der Größe des jeweiligen Schnittes auch die mittels HE-Schnitt begutachteten Gewebscharakteristika Beachtung finden. Die erwähnte μ FISH kann sowohl die Inkubationszeiten stark auf etwa 10 Minuten Einwirkzeit und die Menge der eingesetzten Sonden auf 1% reduzieren (Huber und Mitarb., 2018).

Eine weitere Problematik besteht in der unterschiedlichen Intensität der emittierten Fluoreszenzsignale. Hier zeigte sich eine deutlich bessere Diskriminierbarkeit der zentromerspezifischen Sonde #20 (grün), jedoch fiel das Signal deutlich schwächer aus. Die Signale waren jedoch im Vergleich zur lokusspezifischen Sonde #20q13 wesentlich feiner und schärfer voneinander abgrenzbar. Die lokusspezifische Sonde #20q13 (rot) zeigte zwar ein stärkeres Signal, welches jedoch auch eine größere Unschärfe mit Bildung von Splittsignalen aufwies. Dies erschwerte die Auswertung teils erheblich, da zwischen Splittsignalen und wirklich nahe beieinander liegenden, regelrecht zur Darstellung kommenden, multiplen Signalen unterschieden werden musste. Dieses Unschärfephänomen bzw. auch Fehlbindungen der lokusspezifischen Sonde #20q13 wurden auf akzidentiell Vorhandensein von Einbettmedium und ungenügenden Verdau mittels Pepsin und RNase zurückgeführt. Auch nahm das emittierte Fluoreszenzsignal der zentromerspezifischen Sonde #20 in Relation zur lokusspezifischen Sonde #20q13 deutlich schneller ab, was die Auswertung und die Gewinnung von repräsentativem Bildmaterial erschwerte.

In den Kontrollhybridisierungen an gesunden, humanen Lymphozyten ergaben sich deutliche Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz der beiden verwendeten Sonden. Die Sonde für #20cen zeigte in gesunden Lymphozyten im ersten Versuch 15,5% Verluste, sowie im zweiten Versuch 6% Verluste. Die Sonde für #20q13 zeigte im ersten Fall 6% Verluste und im zweiten Versuch 2,5 % Verluste. Ob im ersten Versuch ggf. ungünstige Hybridisierungsbedingungen herrschten oder die Sonde generell eine schlechte Hybridisierungseffizienz hat, ist anhand der

beiden Kontrollhybridisierungen schlecht beurteilbar. Eine größere Testreihe an Kontrollhybridisierungen wäre retrospektive sinnvoll gewesen, um dem nachzugehen.

Aufgrund dessen wurde die Signifikanzschwelle für die beiden Sonden wie unter Kapitel 4.2.2 (Ergebnisse der Kontrollhybridisierung) hoch unterschiedlich angelegt, sodass für #20cen erst Verluste ab 24% gewertet wurden, für #20q13 Verluste ab 10%. In Ermangelung einer alternativen Sonde, wurde die Sonde für #20cen unter den genannten Rahmenbedingungen eingesetzt.

Zusammenfassend betrachtet stellt die Kombination von konventioneller CGH und hochauflösender FISH eine wertvolle Kombination dar, um chromosomale Veränderungen zu erkennen und zielgerichtet zu überprüfen. Die Auflösungsfähigkeit der Methode FISH variiert dabei je nach verwendeter Zellpopulation, den zur Anwendung kommenden Sonden und der Präparationstechnik. So ist bei Hybridisierungen an Metaphasechromosomen von einer Auflösung von 3-10 Mb auszugehen, an Interphasekernen sind es etwa 50 kb (Trask und Mitarb., 1989). Die hier verwendeten Sonden detektieren ein Zielsequenz mit 433 kb. Aus diesem Grund wurde die FISH stetig weiterentwickelt, um ihre Spezifität und ihr räumliches Auflösungsvermögen zu verbessern. Alternativen zur hier angewendeten FISH stellen die „COMBINatorial Oligo FISH“ (COMBO-FISH) (Schmitt und Mitarb., 2010) oder die wiederum modifizierte „triple helical“ COMBO-FISH dar, welche neben der Verwendung spezifischerer, auflösungsstärkerer Sonden ein deutlich schonenderes Aufbereitungsprotokoll ermöglichen. In dieser Methode binden die verwendeten Sonden als dritter Strang an den nativen DNA-Doppelstrang der zu untersuchenden Zelle (Schwarz-Finsterle und Mitarb., 2007) und ersparen somit die in der FISH benötigte thermische Behandlung oder die Zugabe von Denaturierungssubstanzen, wie Formamid. Durch eine Erniedrigung der thermischen Behandlung wird etwa die Morphologie von Metaphasechromosomen oder von Zellkernen deutlich besser erhalten (Winkler und Mitarb., 2003; Solvei und Mitarb., 2002). Dementsprechend ist der morphologische Erhaltungsgrad bei der „triple helical COMBO-FISH“ am höchsten, da hier gänzlich auf eine Trennung des DNA-Doppelstranges verzichtet wird.

Eine weitere Methode, welche aufbauend auf der FISH etabliert wurde, stellt die „COMET“-FISH dar. Sie wurde erstmals von Santos und Mitarbeitern (Santos und Mitarb., 1997) beschrieben und kombiniert einen COMET-assay mit der FISH. Hier dient der COMET-assay zur Detektion von DNA-Schäden in individuellen Zellen (Collins und Mitarb., 2004), wobei nur eine Aussage über das Ausmaß vorhandener DNA-Schäden möglich ist. In Kombination mit der FISH lässt sich jedoch eine weitaus genauere Lokalisierung durchführen, etwa ob das Zielgen sich innerhalb des beschädigten Areales befindet oder nicht. Die Auflösungsfähigkeit des COMET-assays liegt hier bei 10-800 kb, also deutlich höher als das maximale Auflösungsvermögen der CGH. In Kombination mit der FISH, bei der die meisten

kommerziellen Sonden ein Auflösungsvermögen von 30-100 kb besitzen, welche eine spezifische DNA-Sequenz abdecken (Ooi und Mitarb., 2002), lässt sich eine sehr dezidierte Aussage treffen. Die sehr guten Auflösungsfähigkeiten dieser Methode wurden etwa in Arbeiten über das Tumorprotein p53 und die p53 codierende Region (Glei und Mitarb., 2009; McKelvey-Martin und Mitarb., 1998), die Lokalisierung von Zentromeren sowie Telomeren (Santos und Mitarb., 1997), oder die exakte örtliche Determinierung von UV-A Strahlung induzierten Strangabbrüchen (Bock und Mitarb., 1999) gezeigt. Aktuelle Anwendung findet dieses Verfahren etwa in der Grundlagenforschung bei der Detektion DNA-Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen in der sog. Flash COMET-assay (Bivehed und Mitarb., 2024), oder der Diagnostik der Basenexzisionsreparaturaktivität von humanen Lymphozyten und Plazentazelllinien (Mircheva und Mitarb., 2023). Dieses hochauflösende Verfahren stellt somit neben der weiter oben beschriebenen „triple helical“ COMBO-FISH bzw. COMBO-FISH ein hinreichend exaktes, mögliches Alternativverfahren zur CGH-FISH-Kombination dar.

5.3 Ergebnisdiskussion

5.3.1 CGH-Ergebnisse

Wie einleitend erwähnt, ist die Tumorentstehung und das Tumorwachstum eng mit Tumorsuppressorgenen, Tumor promotoren sowie Onkogenen korreliert. Um eine Aussage über eine mögliche Beteiligung eines bestimmten Genes machen zu können, bedarf es zunächst des Nachweises von Veränderungen der chromosomalen Region, in welcher das betreffende Gen kodiert ist. Kann nun der Nachweis von Gewinnen genetischen Materials geführt werden, so ist von einer Einwirkung von Onkogenen auszugehen. Liegen jedoch im jeweiligen Tumor Verluste in der untersuchten Region vor, so ist anzunehmen, dass möglicherweise Tumorsuppressorgene in ihrer Expression und Wirksamkeit eingeschränkt oder nicht länger wirksam sind. Diese grundlegende Untersuchung wurde mittels der Methode CGH durchgeführt und reiht sich damit in ein relativ kleines Kollektiv an Versuchsreihen zum Zystadenolymphom ein (Bullerdiek und Mitarb., 1988; Nordkvist und Mitarb., 1994; Martins und Mitarb., 1995; Martins und Mitarb., 1997; Giefing und Mitarb., 2008). In den genannten Arbeiten wurde das Zystadenolymphom jedoch nur mittels konventioneller Karyotypisierung untersucht. Nur Giefing 2008, Sauter 2010 und die hier vorliegende Arbeit untersuchten das Zysadenolymphom mittels CGH.

Dies mit dem Ansatz, dem bislang kleinen mittels CGH publizierten Tumorkollektiv von Zystadenolymphomen weitere Tumore hinzuzufügen, um ggf. weitere Konsensusregionen für Tumorsuppressorgene oder Tumor promotorgene identifizieren zu können oder bereits bekannte Konsensusregionen zu bestätigen. Das weitere Ziel war, das mittels CGH

vorcharakterisierte Tumorkollektiv aus Zystadenolymphomen (Sauter, 2010), der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes, mittels FISH weiter zu untersuchen.

5.3.1.1 Gewinne und Verluste im Vergleich

Es liegen nur zwei Arbeiten zu Zystadenolymphomen vor welche diesen Tumor mittels CGH untersuchten (Giefing und Mitarb., 2008; Sauter, 2010). In der Arbeit von Giefing wurden 15 Zystadenolymphome mittels CGH untersucht, in der Arbeit von Sauter, wie unter Kapitel 3.1 (Patienten- und Tumorkollektiv) beschrieben, 29 Zystadenolymphome. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vier neu der Tumorbank der Klinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde hinzugefügten Zystadenolymphome mittels CGH untersucht.

In den beiden erwähnten Arbeiten ergab sich ein sehr heterogenes Gesamtbild der mittels CGH detektierten Veränderungen der Zystadenolymphome. Diese wiesen viele und sehr unterschiedliche Veränderungen mit sowohl Gewinnen als auch Verlusten auf. In manchen Chromosomen wurden jedoch überwiegend oder ausschließlich Verluste oder Gewinne nachgewiesen. Bei Sauter 2010 wurden auf Chromosom 9 etwa ausschließlich Verluste erfasst, betroffen waren 12 Tumore (40%), auf Chromosom 8 fast nur Verluste mit 11 Tumoren (37%) und nur einem Tumor mit Gewinnen. Auf Chromosom X konnten nur Gewinne ermittelt werden, vorliegend bei 7 Tumoren (23%).

Das in dieser Arbeit näher mittels FISH untersuchte Chromosom 20 zeigte sowohl Verluste als auch Gewinne in der CGH. Es waren 4 Tumore (12%) von Verlusten betroffen (Fall Nr. 088, 099, 100 und 157), 3 Tumore (9%) wiesen Gewinne auf (Fall Nr. 153, 157 und 159). Hervorzuheben ist Tumor 157, der sowohl Verluste als auch Gewinne in Chromosom 20 aufwies.

Zwei der hinzugefügten Zystadenolymphome stammten von Männern (Fall Nr. 198 und 203). Die beiden Männer waren zum Zeitpunkt des Eingriffs 78 und 72 Jahre alt. Die beiden anderen Tumore stammten von einer Frau, der Tumor 205 entstammt einem Ersteingriff rechts, der Tumor 207 einem Ersteingriff links. Die Frau war beim ersten Eingriff 57 Jahre alt und beim kontralateralen Zweiteingriff 58 Jahre alt.

Die vier hinzugefügten Zystadenolymphome wiesen die folgenden strukturellen Aberrationen auf. In Tumor 198 lagen Gewinne in den Regionen 1p34.2pter und 16p vor, sowie auf den Chromosomen #19, #22, und dem X-Chromosom. Verluste lagen in der Region 13q vor.

Tumor 205 wies Gewinne der Region 11p11.1-p12, sowie Gewinne der Chromosomen #19 und #22 auf. Verluste lagen in den Regionen 2q21.3q24.3 und 4q26q31.1 vor.

Die anderen beiden Tumore ergaben jeweils einen normalen Chromosomensatz (Fall Nr. 203: 46, XY; Fall Nr. 207: 46, XX). Bemerkenswert ist hier wie zuvor erwähnt, dass die Tumore 205 und 207 von der selben Frau stammten und in einem Fall Aberrationen vorlagen und in dem anderen Fall ein Normalbefund in der CGH. Ob dies in den beiden Tumoren mit Normalbefund womöglich der Nachweisgrenze der CGH von 40-50% von veränderten Zellkernen, geschuldet ist, oder ob andere mittels CGH nicht detektierbare, etwa balancierte strukturelle Aberrationen vorlagen, lässt sich nicht abschließend beantworten.

5.3.1.2 Aberrationen der Regionen 1p und 19q

Die neu hinzugekommenen Tumore bestätigten teils schon bekannte Aberrationen. So konnten Gewinne in 1p34.2pter bei Tumor 198 nachgewiesen werden, einer ähnlichen Region, wie der nachgewiesenen Gewinne in 1p34.1pter in Tumor 159. In Tumor 100 lagen hingegen Verluste in 1p34.1p36.2 vor. Die Region 1p34.2-pter wurde in einer Arbeit identifiziert, welche Gene codiert, die in der Tumorentstehung von kolorektalen Karzinomen beteiligt sein können (Praml und Mitarb., 1995). In der Region lagen ebenfalls Verluste in der genannten Arbeit vor. Eine aktuelle Arbeit beschreibt ebenfalls den Einfluss von Deletionen von 1p in der Kombination von Deletionen von Chromosom 19, auf die Entstehung von kolorektalen Karzinomen und Gliomen (Lehrer und Mitarb., 2023). In der Region 1p wird unter anderem ein Onkogen codiert, welches relevant in der Entwicklung von Gliomen ist. Dies führt bei einem Verlust von 1p zu einer verbesserten Prognose (Lehrer und Mitarb., 2018). Eine andere Arbeit diskutierte die Prognose von Neuroblastomen bei Deletionen von 1p (Kuick und Mitarb., 2022). Die Prognose ist hierbei unabhängig von Deletionen oder einem normalen Vorliegen von 1p schlecht, da Mutationen der in Region 1p kodierten Gene denselben Einfluss auf die Prognose haben können, wie der Verlust der Region. Beschrieben werden unter anderem die Tumorsuppressorgene CHD5 (Chromodomänen-Helikase-DNA-bindende Protein 5), das als Suppressor von Metastasen in Neuroblastomen wirkt (Laut und Mitarb., 2022) und KIF1B β (kinesin family member 1B), welches die Bindungsaktivität von Mikrotubuli beeinflusst und in der Entstehung von Neuroblastomen oder Phäochromozytomen beteiligt ist (Ando und Mitarb., 2019)

Interessant ist hier der Zusammenhang von einer gezeigten Überexpression von CHD5 durch einen sog. "Knock-down" (Blockierung der Expression eines Gens durch genetische Veränderungen der DNA-Sequenz) von p53 (TP53 oder Tumorprotein 53). Dadurch verliert CHD5 in diesem Fall seine Inhibition der Invasionsneigung der Tumore (Laut und Mitarb., 2022).

Die Kombination von Verlusten von 1p und 19q konnte in Oligodendrogliomen bei Kindern gezeigt werden (Kreiger und Mitarb., 2005; Li und Mitarb., 2014). Hier konnte gezeigt werden,

dass Deletionen von 1p und 19q in einer erhöhten SOX17 (SRY-Box Transcription Factor 17) Expression resultieren, was dann wiederum zu einer erhöhten Sensitivität der Tumore auf Chemotherapeutika führt. Dies bedingt eine verbesserte Prognose. SOX17 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine Rolle im Zellzyklus spielt. Eine aktuelle Arbeit beschäftigt sich mit Kolontumoren welche in Knock-out Mäuse, in welchen SOX17 inaktiviert war, implantiert wurden. Dies führte zu einer deutlich verstärkten Immunantwort auf die Tumore (Goto und Mitarb., 2024; Trafton und Mitarb., 2024). SOX17 weist Interaktionen mit *p53* auf und ist in der Entstehung von unterschiedlichen Tumorentitäten beteiligt. Je nach Tumor liegt eine Hochregulierung (Ovarialkarzinome), Herabsetzung der Expression (Hämatologische Krebserkrankungen und Magenkarzinome), sowie alternierend entweder Hochregulierung oder Herabsetzung der Expression (Tumore des Hodens) vor (Jiang und Mitarb., 2024).

Veränderungen von Chromosom 19 wurden in dieser Arbeit in Form von Gewinnen in den Tumoren 198 und 205 nachgewiesen. Im vorbestehenden Tumorkollektiv lagen nur in Tumor 088 Verluste vor (19q13.3qter), Gewinne lagen in den Tumoren 100 (19p), 108 (#19), 133 (#19), 140 (#19), 149 (19p), 153 (#19), 157 (#19), 158 (19p) und 159 (#19) vor. Somit bestätigten die beiden neu hinzugefügten Fälle 198 und 205 diese Veränderungen im bestehenden Tumorkollektiv.

Veränderungen auf 1p und Chromosom 19 wurden mittels CGH in Tumor 198 gezeigt, sowie Gewinne von Chromosom 19 in Tumor 205 und stellen eine interessante Konsensregion dar.

5.3.1.3 Aberrationen der Regionen 16p, 22q, 13q, 11p und 4q

Tumor 198 wies Gewinne der Region 16p auf, die Tumore 075 (16p12pter), 078 (16p13.1pter), 088 (16p12pter), 107 (16p) und 126 (16p12pter) wiesen Verluste auf. In 16p kodierte Gene spielen eine Rolle in der Entstehung von Adenokarzinomen der Lunge in Kombination mit Erhöhung der Expression von MYC (Protoonkogen, welches Einfluss auf den Zellzyklus, zelluläre Transformation und Apoptose hat) (Job und Mitarb., 2010; El-Telbany und Mitarb., 2012). Überexpression von MYC, etwa bei Brustkrebs, konnte im untersuchten Kollektiv in bis zu 22% gezeigt werden. MYC wird eine zentrale Rolle in der Entstehung von Brustkrebs zugeschrieben (Celikkaya und Mitarb., 2023). Veränderungen auf Chromosom 22 in Form von Gewinnen wurden jeweils in Tumor 198 als auch in Tumor 205 nachgewiesen. Im restlichen Kollektiv lagen Verluste in den Tumoren 033, (22q11q12), 078 (22q11.1q13.1), 088 (22q12.2qter), 099 (22q11.1q13.2), 100 (#20), (22q11.1q12.3) und 138 (22q11.1q12.3) vor. Gewinne bestanden in den Tumoren 153 (22q12.3qter), 157(22q) und 158 (22q12.2qter).

In Region 22q11.2 ist etwa das Gen CRKL (CRK like proto-Onkogen), von CRK (CT10 Regulator of Kinase) kodiert. CRKL kodiert ein Adaptermelokül, welches die intrazelluläre

Signaltransduktion mehrerer Wachstumsfaktoren, wie etwa den fibroblastischen Wachstumsfaktor (FGF) reguliert (Lopez-Rivera und Mitarb., 2017). FGF wiederum ist an der Angiogenese sowie der Wundheilung beteiligt und gehört zur Gruppe der Mitogene. Es spielt etwa eine Rolle in der Entstehung von Blasenkarzinomen (Ascione und Mitarb., 2023). Aktuell wird an der Blockade der dazugehörigen Rezeptoren (FGFRs) geforscht, um darüber den Tumor therapieren zu können. Weitere bekannte Beteiligungen von FGFR's sind etwa in der Tumorenstehung von Kopf und Hals Tumoren (15% Amplifikationen von FGFR1), dem nichtkleinzelligen Lungenkarzinom, kleinzelligen Lungenkarzinomen, Magenkarzinomen, Urothelkarzinomen, Brustkarzinomen oder Rhabdomyosarkomen (Krook und Mitarb., 2021) beschrieben.

In der Region 16p wurden Gewinne in Tumor 198 nachgewiesen, in den Tumoren 075 (16p11.1p12), 078 (16p13.1pter), 088 (16p12pter), 100 (16p11.2p13.1), 107 (16p) und 126 (16p12pter) konnten ausschliesslich Verluste gezeigt werden. Im restlichen Tumorkollektiv lagen keine Veränderungen der Region 16p vor. Auch in der Arbeit von Giefing (2008) konnten Verluste auf 16p nachgewiesen werden, jedoch keine Gewinne. Die Literatur bezüglich Veränderungen ist nicht umfangreich und es besteht wohl bislang kein nachgewiesener Einfluss auf potentielle Tumorentstehung. Mikrodeletionen in 16p13.11 wurden jedoch mittels Array-CGH nachgewiesen. Eine Mikrodeletion bedingt eine deutliche Verzögerung der Entwicklung von aufwachsenden Kleinkindern, wie etwa verzögertes Gehen und Sitzen oder der Sprachaneignung. Desweiteren sind Krampfneigungen oder Mikrozephalien beschrieben (Balasubramanian und Mitarb., 2011).

Verluste bestanden auf Tumor 198 in Region 13q, desweiteren konnten Verluste in den Tumoren 088 (13q22qter), 108 (13q34qter) und 157 (13q33qter), sowie Gewinne in den Tumoren 036 (13q14q22), 048 (13q22qter), 099 (13q14.3q22) und 107 (13q14.1q22) nachgewiesen werden. In dieser Region sind Gene kodiert, welche eine Rolle in Plasmazellmyelomen spielen (Bhardwaj und Mitarb., 2021), etwa das Gen *RB1* (Retinoblastom Gen 1, in 13q14.2) und das Gen *LAMP1* (Lysosomales assoziiertes Membranprotein in 13q34). *RB1* ist, wie eingangs in dieser Arbeit besprochen, das erste detektierte Tumorsuppressorgen, anhand dessen Knudson seine „multi-hit“ Hypothese etablierte (Knudson, 1971). Es spielt wie beschrieben eine Rolle in der Entstehung von kindlichen Retinoblastomen sowie Blasentumoren und Osteosarkomen (Zhang und Mitarb., 2021; Ren und Mitarb., 2017; Imbert-Bouteille und Mitarb., 2019). Es wirkt in der Stabilisierung der Chromatinstruktur.

In Tumor 205 konnten Gewinne in 11p.11.1-12 nachgewiesen werden, im restlichen Tumorkollektiv waren keine Veränderungen dieser Region detektiert. Dies stellt somit eine neue detektierte Region bei Zystadenolymphomen dar, welche in der CGH von

Veränderungen betroffen ist. Verluste konnten bei Tumor 205 in 2q21.3q24.3 nachgewiesen werden. In den Tumoren 078, 138, 149 und 153 ergaben sich ebenfalls Veränderungen auf 2q, jedoch nicht in der selben Region.

In der Literaturrecherche ergab sich kein Anhalt für bislang veröffentlichte Relevanz der in diesen Regionen (11p.11.1-12, 2q21.3q24.3) codierten Gene auf Tumorentstehung.

Schließlich konnten bei Tumor 205 Verluste in 4q26q31.1 gezeigt werden, im restlichen Kollektiv wurden Gewinne bei den Tumoren 033 (4q28q31), 036 (4q26q31.3), 075 (4q11q13.1), 078 (4q11q13.1) und 099 (4q11q22) nachgewiesen. Verluste lagen nur bei Tumor 158 (4q33qter) vor. In einer ebenfalls mittels CGH durchgeführten Arbeit korrelierten Verluste in 4q mit einer schlechten Prognose in duktalem Adenokarzinomen des Pankreas (Luebke und Mitarb., 2012).

Zusammenfassend konnten also in den vier neu hinzugefügten Tumoren teils nachgewiesene Veränderungen betroffener Regionen bestätigt und ergänzt werden und andere Veränderungen neu aufgezeigt werden.

Ein interessanter Zusammenhang besteht hier in den Veränderungen von Chromosom #1 und #19 mit dem darin kodierten Tumorsuppressorgen *CHD5* und dem Gen *KIF1B β* , welches die Bindungsaktivität von Mikrotubuli beeinflusst. Diese interagieren, wie beschrieben, mit *p53* und *SOX17* und haben einen Einfluss auf die Entstehung unterschiedlicher Tumore.

5.3.1.4 Einfluss der Region 17p und dem Gen *p53*

Hinsichtlich der *p53* kodierenden Region 17p konnten anhand des vorliegenden Tumorkollektivs Folgendes nachgewiesen werden:

Im Falle der Region 17p ergab sich eine interessante Konstellation. So lag im Tumor mit der Fallnummer 088 ein kompletter Verlust von Chromosom 17 vor sowie in den Tumoren 099, 126 und 196 Verluste des kompletten kurzen Armes von Chromosom 17 bzw. der Region 17p13pter. Diese von Verlusten betroffene Region wurde schon von Giefing und Mitarbeitern (2008) beschrieben und konnte somit bestätigt werden. Bei Giefing und Mitarbeitern (2008) zeigten sich in 12 von 29 untersuchten Tumoren (41% der Fälle) Verluste von 17p13.1, und damit *p53* (Tumorprotein 53). Im hier vorliegenden Tumorkollektiv lagen in 9% der Zystadenolymphome Verluste dieser Region vor. Auch Martins und Mitarbeiter (1997) hatten Veränderungen auf Chromosom 17 bei Zystadenolymphomen mittels DNA-Durchflusszytometrie gezeigt. Die Translokation t(16;17) (q13;p13) wurde dort beschrieben. Somit konnten Veränderungen von 17p mittels unterschiedlicher Methoden gezeigt werden. Mit einem Verlust dieser Region geht die kodierende Region für *p53* verloren.

Bei *p53* handelt es sich um ein zellzyklusregulierendes Protein, welchem multiple Einflussmöglichkeiten auf den zellulären Replikationszyklus zugeschrieben werden (Maiti und Mitarb., 2005; Stiewe und Mitarb., 2007). *p53* wird in gesunden Zellen nur in sehr niedrigen Mengen exprimiert, wird jedoch in vielen maligne entarteten Zellen in deutlich höheren Mengen nachgewiesen (hier häufig mutiert und damit ohne Funktion). Eine Aktivierung von *p53*, z.B. durch fehlerhafte DNA-Replikation während der Zellteilung induziert DNA-Reparaturvorgängen, etwa über *p21*. Dieses hemmt die Cyclin Komplexe D/CDK4/6 und E/CDK2, welche durch Phosphorylierung von pRB (Retinoblastomprotein) zur Freisetzung der an pRB gebundenen Transkriptionsfaktorengruppe E2F benötigt werden. Einen Überblick hierüber liefert Abbildung 24. Diese Transkriptionsfaktoren liegen normalerweise in ihrer höchsten Konzentration in der späten G1-Phase der Zelle vor und stehen in direktem Zusammenhang zum Progress zur S-Phase. Durch diese *p53* induzierte Hemmung wird die Konzentration der E2F Gruppe derart herunterreguliert, dass es zum temporären Arrest des Replikationszyklus kommt und somit möglicherweise eine Reparatur der DNA erfolgen kann (Timmers und Mitarb., 2007). Andererseits kann über *p53*, so es in höheren Konzentrationen vorliegt, auch die Apoptose der Zelle eingeleitet werden (Levine 1997; Evan und Mitarb., 2001; Flores und Mitarb., 2002). Verliert die Zelle die Möglichkeit *p53* als Reaktion auf zelluläre Stresssignale zu aktivieren, kann dies zu präneoplastischen Läsionen führen und damit einen entscheidenden Schritt zur Tumorentstehung bedeuten. Die in manchen Tumoren nachgewiesenen hohen Mengen an *p53* sind meist darauf zurückzuführen, dass das exprimierte *p53* durch Mutation oder Verluste in der kodierenden chromosomalen Region unwirksam wurde oder wichtige, damit interagierende Faktoren beeinträchtigt sind, was etwa im Falle von Mammakarzinomen gezeigt werden konnte (Bourdon., 2008; Klein und Mitarb., 2008).

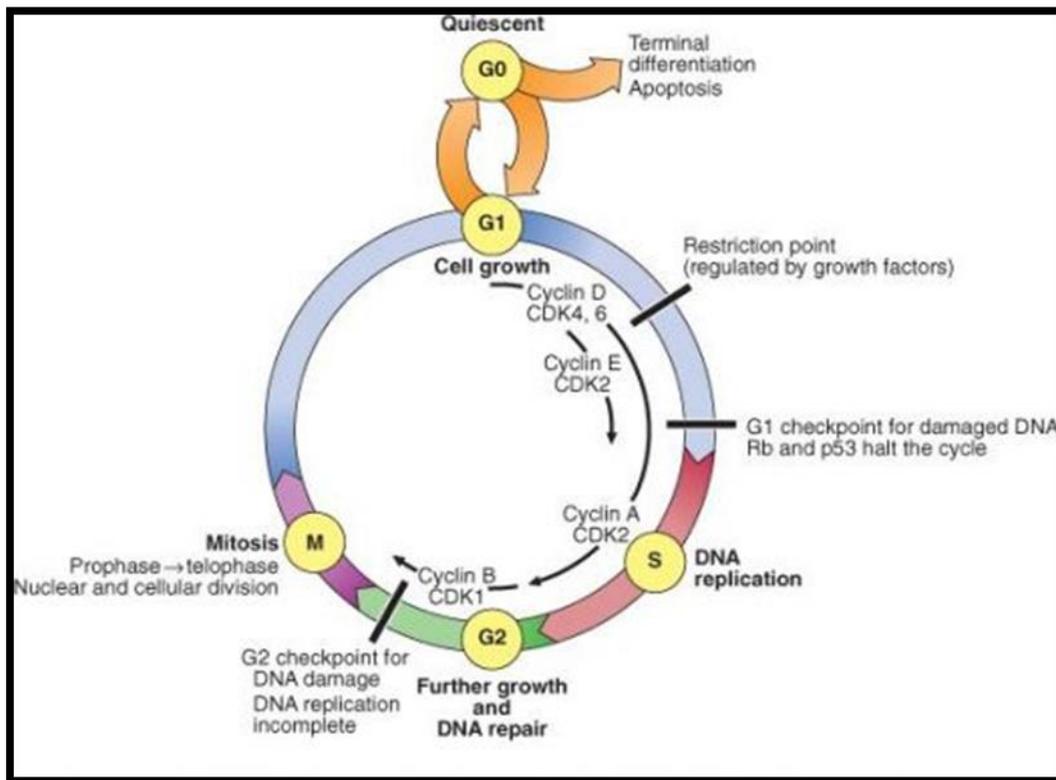


Abb. 24: **Die Wirkung von p53 im Zellzyklus**, welches zum Ende der G1-Phase den Zyklus stoppen kann (entnommen von: http://hubpages.com/hub/cell_biology).

Aktuelle Arbeiten konnten den genaueren Wirkmechanismus von *p53* im Zusammenspiel mit *Rb* untersuchen, diese ergaben, dass *p53* seine vielen Ziel-Gene indirekt unterdrückt (Fischer und Mitarb., 2016) und dass die meisten der Ziel-Gene mit Ihren Promotoren an pRB binden, nicht jedoch an *p53*. Auch konnte erarbeitet werden, dass etwa die Hälfte aller von *p53* transkriptionell regulierten Gene reprimiert werden, also wenn *p53* in seiner Funktion eingeschränkt ist diese Gene stärker exprimiert werden (Engeland und Mitarb., 2018; Engeland und Mitarb., 2022; Fischer und Mitarb., 2016;).

Den Hinweis auf eine derartige Veränderung im Falle von Zystadenolyphomen geben der Tumor 153 mit Gewinnen auf Chromosom 17 und Tumor 157 mit Gewinnen in der Region 17p11pter. Anhand dieser Konstellation von einerseits nachgewiesenen Verlusten und andererseits Gewinnen dieser Schlüsselregion kann die Vermutung getätigt werden, dass *p53* auch beim Zystadenolyphom eine Rolle in der Tumorentstehung spielt. Diese beiden Tumore (153 und 157) zeigten auch im Falle der FISH ein bemerkenswertes Ergebnis, wie später ausgeführt wird. An dieser Stelle bleibt anzumerken, dass im Falle einer zellulären Deaktivierung oder mangelnden Expression von *p53* therapeutische Ansätze vorliegen, diese umzukehren (Xue und Mitarb., 2007). So konnte im Falle von genetisch modifizierten Mäusen die Tumorsuppressivität von *p53* künstlich induziert werden, was zu einer kompletten

Remission der vorliegenden Tumore führte und damit seine zentrale Rolle im zellulären Regulationszyklus zeigte.

Des Weiteren als interessant zu erwähnen bleibt, dass *p53* empfindlich auf Noxen, wie Nikotin und Aflatoxin reagiert, wobei Nikotin nachgewiesenermaßen einen erheblichen Faktor bei der Entstehung von Zystadenolymphomen spielen kann, wie eingangs dargelegt wurde (Cadier und Mitarb., 1992; Gallo und Mitarb., 1997; Vories und Mitarb., 1997; Yu und Mitarb., 1998; Chung und Mitarb., 1999; Allen und Mitarb., 1980). Dies könnte neben anderen Triggern ein denkbarer molekularbiologischer Mechanismus sein, der die Entstehung von Zystadenolymphomen bedingt.

Interessanterweise wurde in einer Arbeit von Soini und Mitarbeitern (1992) die Expression von *p53* in Speicheldrüsentumoren mit der von Lungenkarzinomen verglichen. Hier zeigte sich, dass *p53* nur in 16-22% der Speicheldrüsentumore, jedoch in 61% der Lungenkarzinome exprimiert war. Des Weiteren zeigte sich, dass das *p53* positive Kollektiv aus Mukoepidermoidkarzinomen bestand und dass sich vor allem eine hohe *p53* Expression in den niedrigdifferenzierten Tumoren dieser Gruppe fanden. Nach dieser Publikation kann eine deutlich erhöhte Expression von *p53* als Malignitätskriterium bei Speicheldrüsentumoren gewertet werden, da in diesen Fällen *p53* wohl mutiert und damit funktionslos geworden ist. In diesem Zusammenhang wäre eine Arbeit bezüglich der Expression von *p53* in Zystadenolymphomen in einem ausreichend großen Kollektiv interessant, da sowohl das Lungenkarzinom, welches häufig erhöhte *p53* Level aufweist, wie das Zystadenolymphom auch eine starke Assoziation zu der Noxe Nikotin aufweisen.

5.3.1.5 Die Region #20q13 und ZNF217

Verluste, die das Chromosom 20 und damit *ZNF217* betrafen, wurden etwa in den Arbeiten von Mark und Mitarbeitern (1990) oder Nordkvist und Mitarbeitern (1994) gezeigt, wobei Nordkvist sowohl Verluste als auch Gewinne von Chromosom 20 ermitteln konnten. Abschließend wurden im vorliegenden Tumorkollektiv in der der Region 20q die folgenden Veränderungen nachgewiesen. Verluste zeigten sich bei den Tumoren 088 (20q), 099 (20q13.2qter), und 100 (20q). Gewinne wurden in den Tumoren 153 (20q), 157 (20q11) und 159 (#20) nachgewiesen. Wie unter Kapitel 4.1.3.1 (Analyse des Gesamtkollektivs) expliziert aufgeführt, lässt sich klar anhand der CGH feststellen, dass sich die Tumore 153, 157 und 159 was ihre genetischen Veränderungen anbelangt, deutlich vom Restkollektiv unterschieden, sogar entgegengesetzt verhielten. In der FISH wiesen diese Tumore ebenfalls ähnliche Befunde auf. Dies kann als weiterer Beleg für eine genetische Heterogenität oder genetische Instabilität bei Zystadenolymphomen gewertet werden.

In der Region sind *ZNF217*, sowie *CAS* oder *STK15/BTAK/Aurora* kodiert, wie ausführlich unter Kapitel 2.6 (Die Region #20q13 und *ZNF217*) diskutiert wurde. Diese Region sollte im Rahmen der weiteren Arbeit genauer mittels FISH und der lokusspezifischen Sonde für #20q13 untersucht werden. *ZNF217* ist eines der 20 am meisten amplifizierten Gene bei metastasierenden Tumoren, *CAS* interagiert etwa mit *p53*. Die Region 20q bzw. 20q13 stellt zusammengefasst also eine interessante Konstellation dar, die in der Tumorentstehung von Zystadenomlymphomen relevant sein könnte.

5.3.2 FISH-Ergebnisse

Nach den zuvor durchgeführten Untersuchungen am Tumorkollektiv mittels CGH und Karyotypisierungen in den anderen Arbeiten (Bullerdiek und Mitarb., 1998; Nordkvist und Mitarb., 1994; Martins und Mitarb., 1995; Martins und Mitarb., 1997; Giefing und Mitarb. 2008; Sauter, 2010), in welchen auf #20 sowohl Gewinne als auch Verluste nachgewiesen worden waren, wurden die Tumore konsekutiv mittels FISH untersucht. Die FISH kann die als interessant bewerteten Regionen #20cen und #20q13 auf Chromosomen deutlich fokussierter untersuchen und methodenbedingt einen zusätzlichen Informationsgewinn erzielen. Da die CGH bekannte Limitierungen hinsichtlich einer beschriebenen Nachweisgrenze von 40%-50% betroffener Zellkerne aufweist und darüber hinaus keine balancierten strukturellen Aberrationen nachweisen kann, diente die FISH dazu diese Limiten zu erweitern. Somit können die Vorteile beider Verfahren kombiniert werden.

5.3.2.1 Aberrationen der Region #20q13

In der Region 20q waren unter anderem die folgenden kodierten Gene von Interesse, wie eingangs unter Kapitel 2.6 (Die Region #20q13 und *ZNF217*) ausführlich beschrieben:

STK15/BTAK/Aurora2, (Sen und Mitarb., 1997; Bischoff und Mitarb., 1998; Ewart-Toland und Mitarb., 2004), *CAS* (Brinkmann und Mitarb., 1996; Savelieva und Mitarb., 1997; Peiro und Mitarb., 2002) *BCAS1/NABC1* (van Dekken und Mitarb., 2006), *PFDN4*, (Heidenblad und Mitarb., 2005), *EEF1A2*, (Lee und Mitarb., 2003), *CYP24* (Albertson und Mitarb., 2000) sowie dem zentral in der Region #20q13 kodierten *ZNF217* (Collins und Mitarb., 1998). Auf *ZNF217* wurde durch die Wahl der lokusspezifischen Sonde #20q13 auch der Hauptfokus gerichtet.

Ausgehend von den Vorbefunden der CGH zeigte die ausgewählte Zielregion #20q bzw. #20q13 der Arbeit inhomogene Befunde mit sowohl Gewinnen als auch Verlusten, wie in Kapitel 5.3.1 (CGH-Ergebnisse) beschrieben.

So zeigen sich bei allen untersuchten 20 Tumoren Verluste der Region #20q13. Diese waren in 18 von 20 Fällen (90%) signifikant. Drei Zystadenolymphome (Tumor 033, 088 und 100) zeigten Verluste von über 30%. Es stellt sich somit ein heterogenes Ergebnisbild in der Ausprägung der Verluste dar. Ebenfalls waren in der Auswertung der einzelnen Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop Zellkerne mit normalem Signalverhalten neben Zellkernen mit verändertem Signalverhalten zu beobachten. Es lagen in keiner der untersuchten FISH Untersuchungen an Tumorschnittpräparaten aus Zystadenolymphomen komplette Bereiche mit gleichgerichteten Veränderungen vor.

Neben den Verlusten waren auch Gewinne in 14 Fällen nachweisbar, wobei diese nur in 5 Fällen (045, 048, 67, 153, und 158), also bei 25% als signifikant zu werten sind. Setzt man diese Ergebnisse nun in Relation zu Publikationen anderer Tumorentitäten, welche den Amplifikationsstatus von #20q13 und damit auch *ZNF217* untersuchten, so bietet sich folgendes Bild. In zuvor mittels FISH untersuchten Kollektiven unterschieden sich die Anteile von Gewinnen der *ZNF217* kodierenden Region #20q13 in untersuchten Tumoren teils erheblich. In einer Studie von Hidaka und Mitarbeiter (2000) bei kolorektale Tumoren, bestanden in bis zu 89% der Tumore Gewinne in #20q13, mit bis zu 23 Kopien von #20q13. Den geringsten Anteil an von Vermehrungen der Zielregion betroffenen Tumoren wiesen spinozelluläre Karzinome mit 6,5% auf (Freier und Mitarb., 2003). Alle anderen Publikationen berichteten über Werte zwischen 6,5% und 89%. Die weiteren Arbeiten ergaben folgende Gewinne: Ovarkarzinome 15-52% (Ginzinger und Mitarb., 2000; Tanner und Mitarb., 2000), Mammakarzinomen 10-39% (Daigo und Mitarb., 2001; Letessier und Mitarb., 2006) und Urothelkarzinomen 24% (Toncheva und Mitarb., 2005).

Betrachtet man nun die absoluten Werte der Gewinne von Region #20q13 der untersuchten Zystadenolymphome, so liegen diese, bis auf den Tumor 153 (23%), in sehr geringen Prozentzahlen vor, welche nur 2-6,5% der untersuchten Zellkerne betrafen. Außerdem bleibt zu erwähnen, dass, falls es Gewinne dieser Region gab, diese je Zelle aus nur maximal 3 Kopien bestanden. Im Vergleich zur erwähnten Arbeit von Hidaka und Mitarbeitern (2000) bei kolorektalen Tumoren, zeigte ein signifikanter Anteil der mittels FISH untersuchten Tumorzellen Signale von bis zu 23 Kopien der Region #20q13 in Relation zu 2-6 Kopien der Zentromerregion von #20. Somit liegen anhand der vorliegenden Daten im Falle des Zystadenolymphomes deutlich weniger Gewinnen der Region #20q13 im Vergleich zu anderen Tumorentitäten vor. Damit kann auch in Relation zu den anderen Tumorentitäten eine niedrigere Überexpression der in #20q13 kodierten Gene wie etwa *ZNF217*, *STK15/BTAK/Aurora2* oder *CAS* auszugehen. Dies bedeutet allerdings keineswegs, dass diese im Rahmen von 20 untersuchten Tumoren gezeigte, geringgradige Vermehrung der *ZNF217* codierenden Region, nicht Einfluss auf die Tumorgenese bzw. Progression von

Zystadenolyphomen haben kann. Die Tatsache, dass es sich beim Zystadenolyphom um eine heterogen aufgebaute Tumorentität handelt und Zellen polyklonalen Ursprungs (Honda und Mitarb., 2000) an seiner Genese beteiligt sind, lässt die Vermutung zu, dass möglicherweise nur ein bestimmtes Zellkollektiv von derartigen Veränderungen betroffen ist, während andere davon unberührt bleiben. Dies ist bei der hohen Zahl an vom Autor angenommenen Zellen derselben Klonalität, von Hidaka untersuchten kolorektalen Tumoren, nicht der Fall.

Des Weiteren liegen im Fall des Zystadenolyphoms, aufgrund der Seltenheit des Tumors, weniger Präparate im Vergleich zu anderen Tumorentitäten vor. Im Rahmen einer Studie mit einer deutlich größeren Fallzahl könnten mehr Tumore mit einer ähnlich hohen betroffenen Zellpopulation, wie in Fall 153 vorliegen und eine Subkategorie bilden. Auch gibt es keine Belege über einen Schwellenwert an Amplifikation von *ZNF217*, der erreicht sein muss, um einen Einfluss auf Tumorprogress bzw. Malignität zu haben.

Es wurde jedoch anhand von Studien gezeigt, dass Amplifikationen der Region #20q13 und damit *ZNF217* auch zu einer Überexpression von *ZNF217* und der dazu in Relation stehenden Transkriptionsrepressorkomplexe bestehend aus CoREST (You und Mitarb., 2001), der Lysin spezifischen Histon Demethylase LSD-1 (BHC110), dem Transkriptionscorepressor *CtBP1* (Shi und Mitarb., 2003; Cowger und Mitarb., 2007) und der Histondeacetylase HDAC1 führen können. Dies bedingt dann ein gesteigertes Maß an Malignität.

Da jedoch nur sehr geringe Gewinne der Region #20q13 im Vergleich zu ausgeprägten Verlusten im Tumorkollektiv mittels FISH detektiert wurden, spielt der genannte Mechanismus wohl im Zystadenolyphom keine bzw. eine untergeordnete Rolle. Sollte *ZNF217* eine Rolle in der generellen Genese von Zystadenolyphomen spielen, so unterbleibt hier in der überaus großen Mehrzahl der Fälle diese *ZNF217* korrelierte Malignitätserhöhung, da dieser Tumor als benigne Tumorentität gilt. Nur etwa maximal 2% der Zystadenolyphome erfährt eine maligne Transformation und selbst diese können nur selten von korrelierten malignen Zweitumoren abgegrenzt werden (Batsakis und Mitarb., 1978). Ein seltener Fall war die maligne Transformation eines Zystadenolyphoms zu einem Plattenepithelkarzinom (Kim und Mitarb., 2019).

In den Tumoren, in denen sowohl signifikant gewertete Gewinne als auch Verluste in #20q13 vorlagen, zeigten sich im Verhältnis zum restlichen Kollektiv tendenziell weniger Verluste oder die Verluste waren nicht signifikant (Tumor 045). Die Verluste der anderen Tumoren mit signifikanten Gewinnen betragen: 14% (Tumor 048), 13% (Tumor 067), 28% (Tumor 133), 10% (Tumor 153), 19% (Tumor 158), 22% (Tumor 159) und 12% (Tumor 189).

5.3.2.2 Einfluss von *ZNF217* auf den Zellzyklus

Denkbar bleibt, dass die nur moderat erhöhte Kopienzahl der Region #20q13 und damit unter Umständen nur leicht erhöhte Exprimierung von *ZNF217* und des korrelierten Transkriptionsrepressorkomplexes eine von den anderen untersuchten Tumorentitäten abweichende Wirkung innerhalb des Zellzyklus hat. Möglich wäre hier etwa eine Modifikation bestimmter Promotoren, die Einfluss auf die zelluläre Differenzierung haben, jedoch eine Immortalisierung der Zellen oder Einflussnahme von E-cadherin unterbleibt. Der kausale Nachweis einer *ZNF217* induzierten Immortalisierung erfolgte bislang nur an Uteruszellen (Li und Mitarb., 2007), bzw. wurde von Collins und Mitarbeitern (1998) für Mammakarzinomzellen gezeigt, wobei bei Collins mindestens vier Kopien der *ZNF217* codierenden Region vorlagen. Im Falle des Zystadenolymphomes ist eine starke Einwirkung auf E-Cadherin aller Wahrscheinlichkeit nach auszuschließen, da keine Metastasierungen bei Zystadenolymphomen bekannt sind.

Andererseits ließe sich auch durch die, sowohl von Giefing und Mitarbeitern (2008) beschriebenen und durch die dieser Arbeit zugrunde liegenden CGH-Daten angedeuteten Verluste der Region #20q13, welche sich mittels FISH bestätigen, eine mögliche Einflussnahme auf den Proliferationszyklus vermuten. Es wurden durch die FISH am Gesamtkollektiv deutliche Verluste der Tumore wohl in #20cen als auch in #20q13 gezeigt. *ZNF217* bildet mit CtbP (C-terminal binding protein), welches Teil eines Transkriptionskorepressorkomplexes ist und bei der Repression vieler Gene beteiligt ist, einen relevanten Einfluss auf die Entstehung von Tumoren. So sind Ziele etwa das Rb (Retinoblastom) Protein oder der Tumorrepressor *BRCA1* (Fusco und Mitarb., 1998; Wong und Mitarb., 1998; Makharashvili und Mitarb., 2015). Dieser Transkriptionsrepressorkomplex weist ebenfalls Interaktionen mit einem Großteil der Zielpromotoren von *p53* auf und hat hierbei gegenregulatorische Wirkung (Huang und Mitarb., 2005; Grooteclaes und Mitarb., 2003). Damit kann durch die Verminderung der Kopienzahl von *ZNF217* die Funktionsfähigkeit der genannten Komplexe beeinflusst werden und damit der Zielpromotoren (Cowger und Mitarb., 2007).

5.3.2.3 Vergleich der codierenden Regionen von *ZNF217* und *p53*

Lag in allen anderen Tumoren entweder keine mittels CGH feststellbare numerische Veränderung in der *p53* codieren Region (17p13.1) vor oder war diese Region wie in den Fällen 088, 099, 126 und 196 mittels FISH durch Verluste gekennzeichnet, so zeigen die Tumore 153 und 157 dort Gewinne. Möglich sind hier z.B. jedoch durch die CGH nicht detektierbare balancierte strukturelle Aberrationen. Demnach liegt in Fall 153 eine besonders

interessante Konstellation vor. So weisen hier sowohl die *p53* als auch die *ZNF217* codierende Region Gewinne auf, was diesen Tumor aus dem gesamten übrigen Kollektiv herausstellt.

Um bei der Diskussion der Fälle 153 und 157 zu bleiben, könnten bei einer Amplifizierung von #20q13 auch die dort codierten Proteine Aurorakinase und CAS vermehrt exprimiert sein. Dies könnte, wie am Falle von Magenkarzinomen (Fang und Mitarb., 2010) gezeigt, auch eine mögliche Einflussnahme einer mutiert und vermehrt exprimierten Aurorakinase in der Genese des Tumors 153 bedeuten. Auch CAS, könnte somit vermehrt sein. Es ist durch seine regulatorische Wirkung auf *p53* in diesem Zusammenhang von großem Interesse und kann bei diesem Tumor auch im Hinblick auf die amplifizierte, *p53* kodierende Region zu seiner Genese beigetragen haben. Tumor 157, der ebenfalls über eine amplifizierte *p53* kodierende Region verfügt, zeigte jedoch keine Gewinne der *ZNF217* codierenden Region und stellt somit eine andere Situation dar. In den Tumoren 088, 099, 126 und 196 lag eine verminderte Kopienzahl der *p53* kodierenden Region vor, kombiniert mit einer ebenfalls von Verlusten betroffenen Region #20q13 und damit von *ZNF217*, die im Fall von 088 mit Verlusten von 60% mehr als deutlich ausfällt, vor. Die Tumore 126 und 196 konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mittel FISH untersucht werden, weshalb keine Aussage zu den dort vorliegenden Gewinnen oder Verlusten der Zielregionen möglich ist.

Somit zeigt sich wiederholt ein stark heterogenes Bild der untersuchten Tumore, was in Bezug auf ihre Genese unterschiedliche pathogenetische Vorgänge denkbar macht. Des Weiteren bleibt anzumerken, dass die durch CGH festgestellten Verluste der *p53* codierenden Region etwa über 40% (Dupont und Mitarb., 2003) der Zellen betroffen sein müssen, da dies dem maximalen Auflösungsbereich der Methode entspricht. Um also eine präzise Aussage über den Status dieser Region in der Zusammenschau mit den hier vorliegenden Daten zu ermöglichen, müssten andere Untersuchungen der Region 17p13 erfolgen., damit eine bessere Aussage über mögliche Zusammenhänge zwischen parallel vorliegenden Gewinnen oder Verluste bzw. möglicherweise damit verbundener Veränderungen der Funktion von *p53* und *ZNF217* möglich ist.

5.3.2.4 Aberrationen der Zentromerregion von #20 und mögliche Translokationen

Die Sonde für die Zentromerregion von #20 zeigte in den meisten Tumoren teils erheblich höhere prozentuale Verluste, als die lokusspezifische Sonde #20q13. Besonders hervorzuheben sind hierbei fünf von 20 Fällen (Tumor 040, 100, 153, 157 und 159), da in diesen Tumoren mehr als 50% der Zellen Verluste der Zentromerregion aufwiesen. Bemerkenswert ausgeprägt war dies in Fall 159 mit 74% Verlusten. Hervorzuheben ist ebenfalls Fall 100, da sich hier sowohl bei der lokusspezifischen Sonde #20q13 Verluste von 53%, als auch bei zentromerspezifischen Sonde #20 Verluste von 51,5% zeigten. Diese

Verluste vergleichbarer Größenordnung zeigten sich in keinem der anderen vier erwähnten Tumore. Das Gesamtestkollektiv wies zwischen den von der zentromerspezifischen Sonde #20 und der lokusspezifischen Sonde #20q13 gezeigten Verlusten mehr oder minder starke Divergenzen auf, die mindestens 2% in Tumor 075 und maximal bis zu 50% in Tumor 150 betragen. Diese Diskrepanz ist erheblich und verdeutlicht wiederum das heterogene Bild der Zystadenolymphome.

Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz könnte eine Translokation des 20q-Armes und eines damit einhergehenden teilweisen Verlustes der Zentromerregion oder der Deletion des restlichen Chromosoms 20 darstellen. Translokationen sind bei Zystadenolymphomen bereits an den Loci t(11;19) (q21;p13) (Mark und Mitarb., 1989; Stenman und Mitarb.; 2005, Tirado und Mitarb., 2007) und t(11;16) (q13-14;q23) (Bullerdiek und Mitarb., 1998) gezeigt worden. Im Falle der t(11;19) Translokation kommt es zur Entstehung des *CRTC1-MAML2* ((CREB (cAMP response element-binding protein) regulated transcription coactivator 1) Genes mit den Exons 2-5 des *MAML2* (Mastermind-like protein 2) Fusionsgens (Martins und Mitarb., 2004; O'Neill und Mitarb., 2009), wie unter Kapitel 2.5 (Genese des Zystadenolymphoms) diskutiert. Dieses Fusionsgen wurde bislang gut an MEC (Mucoepidermoidtumoren) untersucht und führt dort zur Störung eines Notch-Signalwegs (Tonon und Mitarb., 2003; Ni und Mitarb., 2021; Chen und Mitarb., 2021; De La Sancha und Mitarb., 2023). In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, sollte es zur Expressierung des *CRTC1-MAML2* Fusionsgenes kommen, dass dies mit einer Erhöhung der Malignität einhergeht (Fehr und Mitarb., 2008; Bell und Mitarb., 2008; Chen und Mitarb., 2021). So war ein Tumor ein primär malignes Zystadenolymphom, bei dreien lag parallel dazu ein MEC der Parotis vor und zwei Fälle waren metaplastische Varianten des Zystadenolymphomes. Diese Zystadenolymphome exprimierten das *CRTC1-MAML2* Fusionsgen. In den Fällen, in denen parallel zum Zystadenolymphom ein MEC vorlag, wurden metaplastische Veränderungen der Zystadenolymphome des onkozytären Epithels registriert, welches sich im Übergangsbereich der beiden Tumore befand. Diese stellen jedoch Ausnahmefälle dar, da das überaus größte Kollektiv der Zystadenolymphome keine derartige maligne Transformation aufweisen.

Andere Studien zeigen auch die Expressierung des *CRTC1-MAML2* Fusionsgenes in pleomorphen Adenomen (Röser und Mitarb., 2007), was belegen könnte, dass zwischen den Tumorentitäten Zystadenolymphom, Mucoepidermoidkarzinom und pleomorphem Adenom weitere genetische Ähnlichkeiten vorliegen. Sollte auch im Falle von 20q eine Translokation vorliegen, könnte dies wie in dem eben näher bezeichneten und gut erforschten Gebiet zur Generierung von ähnlichen Fusionsgenen führen. Dies wiederum würde, wie im Fall von *CRTC1-MAML2*, neue potentielle Möglichkeiten der Diagnostik oder der Therapie eröffnen (Komiya und Mitarb., 2006; Keerthika und Mitarb., 2023).

5.3.2.5 Vergleich von #20q13 und #20cen

Andere Erklärungen der Divergenzen an Verlusten zwischen der lokusspezifischen Sonde für #20q13 und der zentromerspezifischen Sonde für #20 sind die schon beschriebene deutlich unterschiedliche Hybridisierungseffizienz an den Lymphozytenpräparaten. Da jedoch, wie erwähnt, keine andere Sonde mit besserer Qualität zur Verfügung stand wurden die Signifikanzgrenzen dementsprechend angepasst.

Eine andere Erklärung der Divergenzen an Verlusten zwischen der lokusspezifischen Sonde für #20q13 und der zentromerspezifischen Sonde für #20, könnte jedoch auch darin begründet liegen, dass Nachforschungen bezüglich der Sondenzusammensetzung ergeben haben, dass in der Sondencharge, welche im Rahmen der FISH an Tumorgewebe verwendet wurde, vom Hersteller plazentare COT-DNA zugesetzt war. In allen anderen verwendeten Chargen war keine COT-DNA zugesetzt. Diese COT-DNA war zur potentiellen Abblockung störender repetitiver Sequenzen zugesetzt worden, um fehlerhafte Sondenbindungen zu verhindern. Dies könnte jedoch im hier vorliegenden Versuchsaufbau, in welchem beide Sonden parallel am Testgewebe hybridisiert wurden, dazu geführt haben, dass die Zentromerregion in manchen Fällen durch die COT-DNA abgeblockt wurde und somit ein Teil der Verluste dieses Areales dadurch vorgetäuscht wurden.

Ebenfalls relevant ist, dass im Rahmen der Arbeit bei den Tumoren wohl unterschiedliche Anteile des jeweiligen Tumors aufgearbeitet wurden und auch in der Auszählung unter dem Fluoreszenzmikroskop in jedem Schnitt auch nur die klar auswertbaren Regionen mit zuzuordnenden Kernen ausgewertet wurden, sodass auch hier eine potentielle Einflussnahme durch die Gewebeeigenschaften des heterogenen Tumorkollektivs vorliegt. Beschreibungen des klinischen Erscheinungsbildes der jeweiligen Fällen sind nicht dokumentiert und konnten nicht in die Diskussion einbezogen werden.

Im Vergleich der beiden Sonden zeigte sich, dass die zentromerspezifische Sonde #20 wohl aus unterschiedlichen Gründen in den meisten Tumoren eine größere Anzahl an Monosomien zeigte als die lokusspezifische Sonde #20q13. Ob dies in einer generellen schlechteren Hybridisierungsqualität der zentromerspezifischen Sonde #20 begründet liegt, lässt sich an dieser Stelle nicht abschließend beantworten. Es ist durch die Kontrollhybridisierungen ersichtlich, dass sie im Vergleich zur lokusspezifischen Sonde #20q13 mehr als fehlerhaft zu wertende Monosomien bei den untersuchten Lymphozyten anzeigte. In diesem Zusammenhang wäre es aufschlussreich gewesen weitere Testungen an gesunden Lymphozyten durchzuführen um zu erschließen, ob die schlechtere Hybridisierungsqualität konsistent ist.

Auch können die unterschiedlichen Resultate auch mit durch die Heterogenität des Tumors Zystadenolymphom begründet liegen und sich nicht allein auf eine generelle schlechtere Hybridisierungsqualität der zentromerspezifischen Sonde #20 oder eine Beeinflussung durch die bei der lokusspezifischen Sonde #20q13 zugesetzte COT-DNA zurückführen lassen.

Zusammengefasst konnten also sowohl Gewinne der Region #20q13 als auch Verluste gezeigt werden, was impliziert, dass der Einfluss dieses Areales in Hinblick auf die Genese der betreffenden Tumore unterschiedlich zu werten ist.

5.3.3 CGH in Korrelation zur FISH

In den 33 mittels CGH und 20 mittels FISH untersuchten Tumoren zeigten sich in fünf Fällen (Tumor 088, 099, 100, 153 und 157) mittels CGH detektierbare Veränderungen auf 20q und einmal von #20 (Tumor 159) und damit potentiell in Region #20q13. Diese konnten in vier von fünf Fällen mittels FISH bestätigt werden. Die einzige Ausnahme stellte der Fall 157 dar, in welchem die CGH Gewinne der Region 20q11.1q13.1 erbrachte, was sich mittels FISH nicht bestätigen ließ, da eine lokusspezifische Sonde für #20q13 verwendet wurde. Möglich erscheint hier auch, dass es durch die Limitierung der Nachweisgrenze in der CGH begründet ist, die bei etwa 40%-50% liegt. In der FISH wurden in Tumor 157 21% Verluste nachgewiesen, was unterhalb der Nachweisgrenze der CGH liegt. Da jedoch zur FISH und CGH jeweils unterschiedliches Gewebematerial aus der Tumorbioptie verwandt wurde, können schon allein daraus Differenzen im Ergebnis der beiden Methoden resultieren, was generell geringe Unterschiede in den Ergebnissen beider Methoden in Korrelation zueinander erklärt.

Des Weiteren sind mittels CGH in der Regel nur Veränderungen sicher detektierbar, welche mindestens 40-50% der Zellkerne betreffen. Diese beiden Fälle 088 mit 61% und 100 mit 54% von Deletionen der Region #20q13 betroffenen Zellkerne wurden durch die FISH bestätigt. Auch bleibt in diesem Zusammenhang zu bedenken, dass die CGH, wie der Name schon sagt, ein komparatives und kein absolutes Verfahren darstellt. Somit können sich Verluste und Gewinne innerhalb einer Region negieren und es wird vordergründig ein „normales“ Verteilungsmuster abgebildet, obwohl sowohl Verluste als auch Gewinne einer Region vorliegen. Dadurch lässt sich erklären, dass immer eine gewisse Diskrepanz zwischen Befunden von CGH und FISH besteht, da dies in der Methodik selbst begründet liegt. Somit bleiben die mittels FISH gezeigten Verluste, welche sich in der Mehrzahl der Fälle unter 40% an betroffenen Zellkernen beziffern, unterhalb der Nachweisgrenze der CGH. Zusätzlich ist zu bedenken, dass in den durchgeführten Untersuchungen mittels CGH und FISH immer unterschiedliche Gewebestücke untersucht werden. Die mittlerweile als Weiterentwicklung der CGH genannte Array-CGH ist methodisch ebenfalls nicht in der Lage diese Art von

balancierten Aberrationen nachzuweisen (Frost und Mitarb., 2022). Da in der vorliegenden Arbeit Tumorschnitte untersucht wurden, kann auch eine Aussage erfolgen ob die beobachteten Aberrationen klonal, jeweils in bestimmten Lokalisationen des jeweiligen Tumorschnittes auftraten, oder heterogen im Tumorschnitt verteilt waren. In jedem der untersuchten Tumorschnitte lag ein heterogenes Verteilungsmuster vor, in welchem Zellen mit Verlusten neben Zellen mit Gewinnen oder auch Zellen mit normalen Signalverhalten vorhanden waren. Mittels der CGH wurden wie diskutiert Verluste und Gewinne auf #20q bzw. #20 nachgewiesen und diese konnten in den meisten Fällen auch mittels den verwendeten Sonden in der FISH bestätigt werden. Allerdings deckt die lokusspezifische Sonde #20q13 nur einen kleinen Teil von 20q ab, in welchem mittels CGH Veränderungen aufgezeigt worden waren. Die in #20q13 kodierten Proteine (wie etwa ZNF217, CAS oder STK15/BTAK/Aurora2), zu welchen hinsichtlich ihrer möglichen Einflüsse auf die Tumorentstehung von Zystadenolymphomen mittels FISH neue Informationen gewonnen werden konnten, bilden jedoch nur einen Teil der auf #20q codierten Gene bzw. Proteine. Da mittels FISH nur ein eng umgrenzter Bereich von 20q näher untersucht werden konnte, kann keine Aussage über Veränderungen anderer in der Tumorentstehung von Zystadenolymphomen potentiell relevanter Gene gemacht werden. In der Datenbank Cancer GeneticsWeb (Cotterill, 2019, <https://www.cancer-genetics.org>) werden aktuell 57 Gene gelistet, welche in der Literatur nachweisen nachgewiesen sind, die auf Chromosom 20 kodiert sind und mit Neoplasien korreliert sind. Potentiell relevante Gene in der Genese von Zystadenomlyphomen könnten beispielhaft etwa *HCK* (von Tyrosine-protein kinase -hemopoietic cell kinase, in 20q11-q12, bei Leukämie oder Magenkarzinomen), *BMP2* (von Bone Morphogenetic Protein 2A, in 20p12, bei Lungenkarzinomen, Prostatakarzinomen), oder *RBL1* (von Retinoblastoma-Like Protein 1, in 20q11.23, bei Zervixkarzinomen, Retinoblastomen) darstellen.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch die Untersuchung der Regionen 20q13 und 20 Zentromer neue wichtige Erkenntnisse über die Genese von Zystadenolymphomen gewonnen werden. So eröffnen die nun erhobenen Daten die Möglichkeit anknüpfend weitere Forschung durchzuführen.

Es bildeten sich im untersuchten Kollektiv einige Tumore vollkommen verschieden bezüglich ihres Status der Region 20q13 ab. Sowohl Gewinne als auch Verluste innerhalb der Region wurden dargestellt und lassen Rückschlüsse bezüglich dadurch bedingter Einflüsse der dort kodierten Gene *ZNF217*, *STK15* oder *CAS* zu. Um dies näher zu untersuchen wären weitere Studien hinsichtlich des Expressionsverhaltens der genannten Gene interessant, um eine mögliche Korrelation weiter zu erforschen. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang die in einer geringen Anzahl von Fällen gezeigte mögliche Korrelation von *p53* zu *ZNF217* im Falle von Zystadenolymphomen. Da diese Ergebnisse sich auf die Methode CGH gründen, erscheint eine ergänzende FISH, mit spezifischen Sonden für die Region 17p13.1 interessant. Dies könnte interessante Einblicke in das Zusammenwirken dieser beiden wichtigen Regulationsfaktoren schaffen und die Daten der CGH präzisieren, da sich womöglich noch mehrere mittels CGH bislang nicht detektierte Veränderungen der Region 17p13.1 darstellen könnten.

Weitere Karyotypanalysen an einem größeren Patientengut könnten möglicherweise rekurrente Translokationen aufzeigen, mit deren Hilfe weitere Fusionsgene, wie im Fall von *CRTC1-MAML2* erschlossen werden könnten. Hierzu wären Versuchsreihen mittels Zellkultur durchzuführen.

Auch die Weiterbeobachtung der Tumore des Kollektivs in Bezug auf ihren langfristigen postoperativen Verlauf ist von Interesse, da sich hiermit in der Zusammenschau mit den in dieser Arbeit erbrachten Resultate mögliche Zusammenhänge von Rezidivverhalten und genetischem Status der Tumore zeigen könnten. Hier erscheint im besonderen Tumor 153 in Bezug auf mögliche Rezidive und den weiteren Verlauf von besonderem Interesse. Auch die weitere Vergrößerung der CGH Datenbank bzw. Untersuchung mit einem aktuellen hochauflösenderen Verfahren und konsekutive Weiterbearbeitung mittels COMET-assay und FISH wäre möglich um eine breitere und präzisere Datenbasis zu erhalten. Dies macht vor allem in Hinblick auf das Herausarbeiten möglicher existierender Subgruppen innerhalb des Kollektivs aller Zystadenolymphome Sinn.

Nach wie vor ist auch im Falle des Zystadenolymphomes noch viel Forschungsarbeit zu leisten, um seine bislang nicht abschließend erklärte Genese zu entschlüsseln. So bleibt immer noch offen, ob es überhaupt „Das Zystadenolymphom“ als solches gibt oder ob es sich

um eine tumorartige Läsion handelt, welche sich auf differente pathogenetisch Subpopulationen aufzweigt (Sobrinho-Simões und Mitarb., 2006). Auch erschließen sich immer mehr genetische Assoziationen zu anderen Tumoren der Parotis, wie dem pleomorphen Adenom oder dem MEC (Bell und Mitarb., 2008). Somit dehnt sich das Feld der Möglichkeiten zur Erforschung und der schlussendlichen Einordnung des Zystadenolymphomes ein weiteres Mal auf. Unumgänglich in der Realisierung dieses Bestrebens ist es Forschung an deutlich größeren Tumorkollektiven zu betreiben, um möglicherweise existierende sich voneinander unterscheidende Populationen isolieren zu können.

In Hinblick auf den langen Zeitraum zwischen der Datenerhebung und der nun fertiggestellten Arbeit liegen allerdings neuere Verfahren, wie die etwa in aktuellen Arbeiten verwendete Array-CGH (Tsoutsou und Mitarb., 2017; Kowalczyk und Mitarb., 2022), die Flash COMET-assay (Bivehed und Mitarb., 2024), oder die μ FISH (Huber und Mitarb., 2018) vor. Mit diesen wäre aufgrund ihrer höheren Auflösungsfähigkeit präzisere Aussagen über das untersuchte Tumorkollektiv oder generell Zystadenolymphome möglich. Auch existieren nach wie vor wenige publizierte Studien zu chromosomalen Aberrationen des Zystadenolymphoms, wie etwa die Arbeit von Wemmert und Mitarbeitern (2014), in welcher die Resultate der 4 mittels CGH charakterisierten Tumore dieser Arbeit mit integriert und veröffentlicht wurden. Untersuchungen von Zystadenolymphomen in Studien mit großen Fallzahlen würden zur weiteren Erforschung der Genese dieses Tumors beitragen.

Diese Arbeit stellt einen Beitrag dar, im Fall des bislang nur in kleinen Fallstudien erforschten Zystadenolymphoms, das erforschte Tumorkollektiv zu vergrößern. Weiterführende Studien sind in der Erforschung des Zystadenolymphoms notwendig.

6 Literaturverzeichnis

1. Agilent Technologies Inc. (2024) Human Genome CNV Microarrays Part Number: G4423B. URL www.agilent.com/store/en_US/Prod-G4423B/G4423B (Abruf am 27.07.2024)
2. Albertson D.G., Ylstra B., Seagraves R., Collins C., Dairkee S.H., Kowbel D., Kuo W.L., Gray J.W., Pinkel D. (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene, *Nat. Genet.* 25:144–146
3. Albrecht H., Arzt U. L. (1910) Beiträge zur Frage der Gewebsverirrung. I. Papilläre Cystadenome in Lymphdrüsen. *Frankfurt Z Pathol* 4:47–69
4. Albosaily A., Aldrees T., Doubi A., Aldhwaiti L., Al-Gazlan N.S., Alessa M., Al-Dhahri S., Al-Qahtani K. (2020) Factors associated with facial weakness following surgery for benign parotid disease: a retrospective multicenter study. *Ann Saudi Med.* 40:408-416.
5. Allegra S.R. (1971) Warthin's tumor: a hypersensitivity disease? Ultrastructural, light, and immunofluorescent study. *Hum Pathol* 2:403–420
6. Allen J.A., Coombs M.M. (1980) Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature* 287:244–245
7. Alnoor F., Gandhi J.S., Stein M.K., Gradowski J.F. (2020) Follicular Lymphoma Diagnosed in Warthin Tumor: A Case Report and Review of the Literature. *Head and Neck Pathology* 14:386-391
8. Ando K., Yokochi T., Mukai A., Wei G., Li Y., Kramer S., Ozaki T., Maehera Y. Nakagawara A. (2019) Tumor suppressor KIF1B β regulates mitochondrial apoptosis in collaboration with YME1L1 *Mol Carcinog* 58:1134-1144
9. Aoki R., Tanaka T. (2024) Pathogenesis of Warthin's Tumor: Neoplastic or Non-Neoplastic? *Cancers (Basel)* 16:912-928
10. Ascione C.M., Napolitano F., Esposito D., Servetto A., Belli S., Santaniello A., Scagliarini S., Crocetto F., Bianco R., Formisano L. (2023) Role of FGFR3 in bladder cancer: Treatment landscape and future challenges. *Cancer Treat Rev* 115:102530
11. Astor F.C., Hanft K.L., Rooney P., Benson C.A., Flores C.T., Lavertu P. (1996) Extraparotid Warthin's tumor: clinical manifestations, challenges, and controversies. *Otolaryngol Head Neck Surg* 114:732–5
12. Balasubramanian M., Smith K., Mordekar S.R., Parker M.J. (2011) Clinical report: An interstitial deletion of 16p13.11 detected by array CGH in a patient with infantile spasms. *Eur J Med Genet* 54:314-318
13. Batsakis J.G., Regezi J.A. (1978) The pathology of head and neck tumors: salivary glands, part 1. *Head Neck Surg* 1:59–68

14. Bauman J.G.J., Wiegant J., Borst P., van Duijn P. (1980) A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. *Experimental Cell Research* 128: 485-490
15. Beardsley D.I., Kowbel D., Lataxes T.A, Mannino J.M., Xin H., Kim W.J., Collins C., Brown K.D. (2003) Characterization of the novel amplified in breast cancer-1 (NABC1) gene product, *Experimental Cell Research* 290:402-413
16. Behrens P., Brinkmann U., Wellmann A. (2003) CSE1L/CAS: Its role in proliferation and apoptosis, *Apoptosis*, 8:39-44
17. Bell D., Luna M.A., Weber R.S., Kaye F.J., El-Naggar A.K. (2008) CRTC1/MAML2 fusion transcript in Warthin's tumor and mucoepidermoid carcinoma: evidence for a common genetic association. *Genes Chromosomes Cancer* 47:309–314
18. Bhardwaj M.K., Mishra S.K., Sharma S., Salona B., Mohanty S.K. (2021) Potential Prognostic Significance of Patterns of Deletion (13q) in Plasma Cell Myelomas—Reappraisal of a Perennial Bone of Contention. *Indian J Med Paediatr Oncol* 42:e2-e2
19. Bieńkowski M., Kunc M, Iliszko M., Kuźniacka A., Studniarek M., Biernat W. (2020) MAML2 rearrangement as a useful diagnostic marker discriminating between Warthin tumour and Warthin-like mucoepidermoid carcinoma. *Virchows Arch* 477:393-400
20. Bischoff J.R., L. Anderson, Y. Zhu, K. Mossie, L. Ng, B. Souza, B. Schryver, P. Flanagan, F. Clairvoyant, C. Ginther, C.S. Chan, M. Novotny, D.J. Slamon, G.D. Plowman (1998) A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers, *EMBO J.* 17:3052–3065
21. Bivehed E., Hellman B., Wenson L., Stenerlöv B., Söderberg O., Heldin J. (2024) Visualizing DNA single- and double-strand breaks in the Flash comet assay by DNA polymerase-assisted end-labelling. *Nucleic Acids Res* 52:22
22. Boccato P., Altavilla G., Blandamura S. (1998) Fine needle aspiration biopsy of Salivary gland lesions. A reappraisal of pitfalls and problems. *Acta Cytol* 42:888–988
23. Bock C., Rapp A., Dittmar H., Monajembashi S., Greulich K.O. (1999) Localisation of specific sequences and DNA single strand breaks in individual UV-A irradiated human lymphocytes by COMET FISH, *Prog. Biomed. Optics* 3568:207–217
24. Borsetto D., Fussey J.M., Cazzador D., Smith J., Ciorba A., Pelucchi S., Donà S., Boscolo-Rizzo P., Tomasconi M., Lombardi D., Nicolai P., Zanoletti E., Colangeli R., Emanuelli E., Osborne M.S., Harrison K., Ahsan S.F., Tofanelli M., Tirelli G. (...) Nankivell P. (2020) The diagnostic value of cytology in parotid Warthin's tumors: International multicenter series. *Head Neck* 42:2215-2216
25. Bourdon J.C. (2008) Abnormal expression of p53 isoforms can be associated with poor survival in primary breast tumours, *Breast Cancer Research* 10:52

26. Boveri, Theodor (Boveri 1903) Über den Einfluss der Samenzelle auf die Larvencharaktere der Echiniden. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 16: 340–363
27. Boveri T (1914) Zur Frage der Entstehung maligner Tumore. Verlag von Gustav Fischer, Jena
28. Briest F., Noerenberg D., Hennch C., Yoshida K., Hablesreiter R., Nimo J., Sasca D., Kirchner M., Mansouri L., Inoue Y., Wiegand L., Staiger A.M., Casadei B., Korkolopoulou P., Weiner J., Lopezi-Guillermo A., Warth A., Schneider T., Nagy A. (...) Damm F. (2023) Frequent ZNF217 mutations lead to transcriptional deregulation of interferon signal transduction via altered chromatin accessibility in B cell lymphoma. *Leukemia* 37:2237-2249
29. Brinkmann U., Gallo M, Polymeropoulos M.H., Pastan I (1996) The human CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene mapping on chromosome #20q13 is amplified in BT474 breast cancer cells and part of aberrant chromosomes in breast and colon cancer cell lines, *Genome Res.* 6:187–194
30. Brunner C. (2000) Vergleichende genomische Hybridisierung von Gliomen. Doktorarbeit. Universität des Saarlandes
31. Brunner C., Jung V., Henn W., Zang K.D., Urbschat S. (2000) Comparative genomic hybridization reveals recurrent enhancements on chromosome 20 and in one case combined amplification sites on 15q24q26 and 20p11p12 in glioblastomas. *Cancer Genet Cytogenet* 121:124-127
32. Bullerdiek, J., Haubrich, J., Meyer, K. and Bartnizke, S. (1998) Translocation t(11;19) (q21;p13.1) as the sole chromosome abnormality in a cystadenolymphoma (Warthin's tumor) of the parotid gland. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 35:129-132
33. Cadier M., Watkin G., Hobsley M. (1992) Smoking predisposes to parotid adenolymphoma. *Br J Surg* 79:928–30
34. Cassandri M., Smirnov A., Novelli F., Pitolli C., Agostini M., Malewicz M., Melino G., Raschelle G. (2017) Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov* 3:17071
35. Celikkaya B., Durak T., Faroogi A.A., Inci K., Tokgun P.E., Tokgun O. (2023) The effects of MYC on exosomes derived from cancer cells in the context of breast cancer. *Chem Biol Drug Des* 102:65-75
36. Cha C-H., Luo S.-D., Chiang P.-L., Chen W.-C., Tung Y.-C., Su Y.-Y-, Lin W.-C. (2021) Long-Term Outcomes of Radiofrequency Ablation for Treatment of Cystic Warthin Tumors versus Solid Warthin Tumors. *Int J Environ Res Public Health* 18:6640
37. Chan M.K., McGuire L.J., King W., Li A.K., Lee J.C. (1992) Cytodiagnosis of 112 salivary gland lesions. Correlation with histologic and frozen section diagnosis. *Acta Cytol* 36:353–63

38. Chen Z., Ni W., Li J.-L., Lin S., Zhou X., Sun Y., Li J.W., Leon M.E., Hurtado M.D., Zolotukhin S., Liu C., Lu J., Griffin J.D., Kaye F.J., Wu L. (2021) The CRTC1-MAML2 fusion is the major oncogenic driver in mucoepidermoid carcinoma. *JCI Insight* 6:e139497
39. Chung Y.F., Khoo M.L., Heng M.K., Hong G.S., Soo K.C. (1999) Epidemiology of Warthin's tumour of the parotid gland in an Asian population. *Br J Surg* 86:661–664
40. Coe B.P., Ylstra B., Carvalho B., Meijer G.A., Macaulay C., Lam W.L. (2007) Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* 89:647-653
41. Cohen P.A., Donini C.F., Nguyen N.T., Lincet H., Vendrell J.A. (2015) The dark side of ZNF217, a key regulator of tumorigenesis with powerful biomarker value. *Oncotarget*. 6:41566-81
42. Collins A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 26:249–261
43. Collins C., Rommens J.M., Kowbel D., TGodfrey T., Tanner M., Hwang S.I., Polikoff D., Nonet G., Cochran J., Myambo K., Jay K.E., Froula J., Cloutier T., Kuo W.L., Yaswen P., Dairkee S, Giovanola J., Hutchinson G.B., Isola J. (...) Gray J.W. (1998) Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at #20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:8703–8708
44. Comoretto R., Barzan L. (1990) Benign parotid tumour enucleation – a reliable operation in selected cases. *J Laryngol Otol* 104:706–708
45. Cotterill SJ. (2019) Chromosome 20, *Cancer Genetics Web*: <http://www.cancer-genetics.org/clinkc20.htm> (Abruf am 30.07.2024)
46. Courjal F., Cuny M., Simony-Lafontaine J., Louason G., Speiser P., Zeillinger R., Rodriguez C., Theillet C. (1997) Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumors: definition of phenotypic groups, *Cancer Res.* 57:4360–4367
47. Cowger J.J., Zhao Q., Iovic M., Torchia J. (2007) Biochemical characterization of the zinc-finger protein 217 transcriptional repressor complex: identification of a ZNF217 consensus recognition sequence, *Oncogene* 26:3378-3386
48. Cox D.G., Susan E., Hankinson D, Hunter J. (2006) Polymorphisms of the AURKA (STK15/Aurora kinase) gene and breast cancer risk (United States), *Cancer Causes and Control* 17:81–83
49. Daigo Y., Chin S.F., Gorringer K.L., Bobrow L.G., Ponder B.A., Pharoah P.D., Caldas C. (2001) Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction-based array comparative genomic hybridization for extensive amplicon profiling of breast cancers: a new approach for the molecular analysis of paraffin-embedded cancer tissue, *Am. J. Pathol.* 158:1623–1631

50. Dalpa E., Gourvas V., Baritaki S., Miyakis S., Samaras V., Barbatis C., Sourvinos G., Spandidos D.A (2008) High prevalence of Human Herpes Virus 8 (HHV-8) in patients with Warthin's tumors of the salivary gland, *Journal of Clinical Virology* 42:182–185
51. De Angelis P.M., Stokke T., Beigi M., Mjaland O., Clausen O.P. (2001) Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 16:38–45
52. De la Sancha C., Kuhar M., Kraft A., Alomari A. (2023) Primary mucoepidermoid carcinoma of the external auditory canal with a CRTC1: MAML2 fusion: A case report and a review of literature. *J. Cutan Pathol* 50:947-950
53. Debets J.M., Munting J.D. (1992) Parotidectomy for parotid tumours: 19-year experience from The Netherlands. *Br J Surg* 79:1159–1161
54. Dell Aversana Orabona G., Abbate V., Piombino P., Romano A., Schonauer F., Iaconetta G., Salzone G., Farina F., Califano L. (2015) Warthin's tumour: Aetiopathogenesis dilemma, ten years of our experience. *J Craniomaxillofac Surg* 43:427-431
55. Diebold J., Mosinger K., Peiro G., Pannekamp U., Kaltz C., Baretton G.B., Meier W., Lohrs U. (2000) 20q13 and cyclin D1 in ovarian carcinomas. Analysis by fluorescence in situ hybridization, *J. Pathol.* 190:564–571
56. Dietert S.E. (1975) Papillary cystadenoma lymphomatosum (Warthin's tumor) in patients in a general hospital over a 24-year period. *Am J Clin Pathol* 63:866–75
57. Dietz A (2006) Nikotin und Krebsentstehung im oberen Aerodigestivtrakt. *HNO* 54:345-346
58. Driemel O., Kraft K., Hemmer J. (2007) DNA-Ploidie und proliferative Aktivität bei Speicheldrüsentumoren, *Mund Kiefer GesichtsChir* 11:139–144
59. Du Manoir S., Speicher M.R., Joos S., Schröck E., Popp S., Döhner 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
60. Dupont C., Pipiras E., Candtot-Bastaraud S., Verloes A., Baumann C., Wolf J.-P., Benzacken B. (2003) CGH and direct diagnosis of mosaic structural chromosomal abnormalities: description of a mosaic ring chromosome 17 and review of the literature. *Eur J Hum Genet* 11:452-456
61. Ebbs S.R., Webb A.J. (1986) Adenolymphoma of the parotid: aetiology, diagnosis and treatment. *Br J Surg* 73:627–630
62. Ellis G.L., Auclair P.L. (1996) Tumors of the salivary glands. Washington D.C., Armed Forces Institute of Pathology, 268-281

63. El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Takata T., Grandis J.R., Slootweg P. (2017) The fourth edition of the head and neck World Health Organization blue book: editors' perspectives. *Human Pathology* 66:10-12
64. El-Telbany A., Ma P.C. (2012) Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any? *Genes Cancer* 3:467-480
65. Engeland K. (2018) Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ* 25:114-132
66. Engeland K. (2022) Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ* 29:946-960
67. Evan G.I., Vousden K.H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342-348
68. Eveson J.W. (1992) Troublesome tumours 2: borderline tumours of salivary glands. *J Clin Pathol.* 45:369-377
69. Ewart-Toland A., Briassouli P., de Koning J.P., Mao J.-H., Yuan J., Chan F., MacCarthy-Morrogh L., Ponder B.A.J., Nagase H., Burn J., Ball S., Almeida M., Linardopoulos S., Balmain A. (2003) Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet* 34:403-412
70. Ewart-Toland A., Balmain A., (2004) The genetics of cancer susceptibility: from mouse to man. *Toxicol Pathol* 32:26-30
71. Fang Z., Xiong Y., Li J., Liu L., Li M., Zhang C., Zhang W., Wan J. (2010) Copy-number increase of AURKA in gastric cancers in a Chinese population: a correlation with tumor progression, *Med Oncol* 28:1017-1022
72. Favia G., Pratelli D., Bux M., De Falco V.A., Albrizio M., Maiorano E. (1995) Adenolymphoma of the salivary glands. The anatomicoclinical, epidemiological and therapeutic aspects of 76 cases. *Minerva Stomatol* 44:325–333
73. Fehr A., Röser K., Belgea G., Löning T., Bullerdiek J. (2008) A closer look at Warthin tumors and the t(11;19), *Cancer Genetics and Cytogenetics* 180: 135-139
74. Ferreira D., Vale J., Curado M., Polonia A., Eloy C. (2022) The impact of different coverslipping methods in the quality of the whole slide images used for diagnosis in pathology. *Pathol Inform* 13:100098
75. Filopoulos E., Angeli S., Daskalopoulou D., Kelessis N., Vassilopoulos P. (1998) Preoperative evaluation of parotid tumours by fine needle biopsy. *Eur J Surg Oncol* 24:180–183
76. Fischer M., Grossmann P., Padi M., DeCaprio J.A. (2016) Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Res* 44:6070-6086

77. Fisher R., Ronan O. (2022) Cytologic diagnosis of parotid gland Warthin tumor: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck* 44:2277-2287
78. Flores E.R., Tsai K.Y., Crowley D., Sengupta S., Yang A., McKeon F., Jacks F. (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage, *Nature* 416:560-564
79. Foschini M.P., Malvi D., Betts C.M. (2005) Oncocytic carcinoma arising in Warthin tumour. *Virchows Arch* 446:88–90
80. Franzen A.M., Kaup-Franzen C., Guenzel T., Lieder A. (2018) Increased incidence of Warthin tumours of the parotid gland: a 42-year evaluation. *Head Neck* 275:2593-2598
81. Freier K., Joos S., Flechtenmacher C., Devens F., Benner A., Bosch F.X., Lichter P., Hofele C. (2003) Tissue Microarray Analysis Reveals Site-specific Prevalence of Oncogene Amplifications in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, *Cancer Res* 63:1179-1182
82. Frost A., van Campen J. (2022). National Genomics Education Programme | GeNotes. Microarray (array CGH). URL www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/microarray-array-cgh/ (Abruf am 27.07.2024)
83. Fusco C., Raymond A., Zervos A.S. (1998) Molecular cloning and characterization of a novel retinoblastoma-binding protein. *Genomics* 51:351-358
84. Gallo O., Bocciolini C. (1997) Warthin's tumour associated with autoimmune diseases and tobacco use. *Acta Otolaryngol* 117:623–627
85. 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* 55:55-60
86. Gilchrest B.A., Eller M.S., Geller A.C., Yaar M. (1999) The pathogenesis of melanoma induced by ultra violet radiation. *N Engl J Med* 340:1341–1348
87. Ginzinger D.G., Godfrey T.E., Nigro J., Moore D.H. II, Suzuki S., Pallavicini M.G., Gray J.W., Jensen R.H. (2000) Measurement of DNA copy number at microsatellite loci using quantitative PCR analysis, *Cancer Res.* 60:5405–5409
88. Gleib M., Hovhannisyan G., Pool-Zobel B.L.(2009) Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681:33-43
89. Goto N., Westcott P.M.K., Goto S., Imada S., Taylor M.S. Eng G., Brayerman J., Deshpande V., Jacks T., Agudo J. (2024) SOX17 enables immune evasion of early colorectal adenomas and cancers. *Nature* 627:636-645

90. Grootclaes M., Deveraux Q., Hildebrand J., Zhang Q., Goodman R.H. and Frisch, S.M. (2003) C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100:4568–4573
91. Heidenblad M., Lindgren D., Veltman J.A., Jonson T., Mahlamaki E.H., Gorunova L., van Kessel A.G., Schoenmakers E.F., Hoglund M. (2005) Microarray analyses reveal strong influence of DNA copy number alterations on the transcriptional patterns in pancreatic cancer: implications for the interpretation of genomic amplifications, *Oncogene* 24:1794–1801
92. Heller A., Liehr Th. (2009) Micro-CGH: Microdissection-Based Comparative Genomic Hybridization, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide VII:411-420
93. Hernández-Borrero L.J., El-Deiry W. (2021) Tumor Suppressor p53: Biology, Signaling Pathways, and Therapeutic Targeting. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1876:188556
94. Hidaka S., Yasutake T., Takeshita H., Kondo M., Tsuji T., Nanashima A., Sawai T., Yamaguchi H., Nakagoe T., Ayabe H., Tagawa Y. (2000) Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis, *Clin. Cancer Res.* 6:2712–2717
95. Hildebrand O. (1895) Über angeborene epitheliale Cysten und Fisteln des Halses. *Arch Klin Chir* 49:167–206
96. Holzmann K., Kohlhammer H., Schwaenen C., Wessendorf S., Kestler H.A., Schwoerer A., Rau B., Radlwimmer B., Dohner H., Lichter P., Gress T., Bentz M. (2004) Genomic DNA-chip hybridization reveals a higher incidence of genomic amplifications in pancreatic cancer than conventional comparative genomic hybridization and leads to the identification of novel candidate genes, *Cancer Res.* 64:4428–4433
97. Honda K., Kashima K., Daa T., Yokoyama S., Nakayama I. (2000) Clonal analysis of the epithelial component of Warthin's tumor. *Hum Pathol* 31:1377–1380
98. Huang G., Krig S., Kowbel D., Xu H., Hyun B., Volik S., Feuerstein B., Mills G.B., Stokoe D., Yaswen P., Collins C. (2005) ZNF217 suppresses cell death associated with chemotherapy and telomere dysfunction, *Hum. Mol. Genet.* 14:3219–3225
99. Huber D., Kaigala G.V. (2018) Rapid micro fluorescence in situ hybridization in tissue sections. *Biomicrofluidics.* 12:042212
100. Huber D., Oskooei A., Solvas X.C.I., deMello A., Kaigala G.V. (2018) Hydrodynamics in Cell Studies. *Chem Rev* 118:2042-2079
101. Hubpages. URL http://hubpages.com/hub/cell_biology (Abruf 10.06.2009).
102. Imbert-Bouteille M., Gauthier-Villars M., Leroux D., Menuier I., Aerts I., Lumbrosco-Le Rouic L., Lejeune S., Delnatte C., Abadie C., Pujol P., Houdayer C., Corsini C. (2019) Osteosarcoma without prior retinoblastoma related to RB1 low-penetrance germline

- pathogenic variants: A novel type of RB1-related hereditary predisposition syndrome? *Mol Genet Genomic Med* 7:e913
103. Invitrogen, by life technologies, Fluorescence Fundamentals, Stokes shift URL: www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Introduction-to-Fluorescence-Techniques.html (Abruf am 22.07.2024)
 104. Isola J.J., Kallioniemi O.P., Chu L.W., Fuqua S.A., Hilsenbeck S.G., Osborne C.K., Waldman F.M. (1995) Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer, *Am. J. Pathol.* 147:905–911
 105. Iwai H., Yamashita T. (2005) Local excision procedure for Warthin's tumor of the parotid gland. *Otolaryngol Head Neck Surg* 132:577-58
 106. Jiang J., Wang Y., Sun M., Luo X. Zhang Z., Wang Y., Li S., Hu D., Zhang J., Wu Z., Chen X., Zhang B., Xu X. Wang S., Xu S., Huang W., Xia L. (2024) SOX on tumors, a comfort or a constraint? *Cell Death Discov* 10:67
 107. Jin M., Fu J., Lu J., Xu W., Chi H., Wang X., Cong Z. (2019) Ultrasound-guided percutaneous microwave ablation of parotid gland adenolymphoma: A case report. *Medicine (Baltimore)* 98:e16757
 108. Job B., Bernheim A., Beau-Faller M., Camilleri-Broet S., Girard P., Hofman P., Mazières J., Toujani S., Lacroix L., Laffaire J., Dessen P., Fouret P. (2010) Genomic aberrations in lung adenocarcinoma in never smokers. *PLoS One* 5:e15145
 109. John H.A., Birnstiel M.L., Jones K.W. (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223:582-587
 110. Joos S.; Scherthan H.; Speicher M. R.; Schlegel J.; Cremer T., Lichter P. (1993) Detection of amplified sequences by reverse chromosome painting using genomic tumor DNA as probe. *Human Genetics* 90:584-589
 111. Kakkar A., Zubair A., Sharma N., Monga R., Sharma S.C. (2020) Synchronous Oncocytic Papillary Cystadenoma and Warthin Tumor of the Parotid Gland. *Int J Surg Pathol* 28:296-301
 112. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821
 113. Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Rutovitz D., Sudar D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization: a new method based on isolated DNA to determine gains and losses of DNA sequences anywhere in the genome in a single hybridization. *American Journal of Human Genetics* 51: A23, 80
 114. Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Sudar D.; Rutovitz D.; Gray J.W.; Waldman F.; Pinkel D. (1993). Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Seminars in Cancer Biology* 4:41-46

115. Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Piper J., Isola J., Waldman F.M., Gray J.W., Pinkel D. (1994). Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy changes in solid tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 10:231-243
116. Karhu R., Kähkönen M., Kuukasjärvi 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
117. Keerthika R., Devi A., Kamboj M., Sivakumar N., Vijayakumar G., Narwal A., Girdhar A. (2023) Diagnostic Reliability of CRTC1/3:MAML2 Gene Fusion Transcripts in Discriminating Histologically Similar Intraosseous Mucoepidermoid Carcinoma from Glandular Odontogenic Cyst: A Systematic Review and Meta-analysis. *Head Neck Pathol* 17:233-245
118. Kim J.E., Kim T.G. (2019) Squamous cell carcinoma arising from Warthin's tumor in the parotid gland. *BJR Case Rep*. 5:20190032
119. Klein Ch., Vassilev, L. (2008) Targeting the p53/MDM2 Pathway for Cancer Therapy, *Cancer Drug Discovery and Development*, 19-56
120. Knudson A.G. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amerika* 68:820-823
121. Komiya T., Park Y., Modi S., Coxon A.B., Oh H., Kaye F.J. (2006) Sustained expression of Mect1-Maml2 is essential for tumor cell growth in salivary gland cancers carrying the t(11;19) translocation. *Oncogene* 25:6128–6132
122. Komminoth P., Walch A., Werner M., Perren A.A. (2010) *Methods in Cellular and Molecular Pathology*. Lloyd R.V. (ed) *Endocrine Pathology Differential Diagnosis and Molecular Advances*. 2nd ed. Springer, 1-44
123. Kotwall C.A. (1992) Smoking as an etiologic factor in the development of Warthin's tumor of the parotid gland. *Am J Surg* 164:646–647
124. Kowalczyk K., Smyk M., Bartnik-Głaska M., Plaskota I., Wiśniowiecka-Kowalnik B., Bernaciak J., Chojnacka M., Paczkowska M., Niemiec M., Dutkiewicz D., Kozar A., Magdziak R., Krawczyk W., Pietras G., Michalak E., Klepacka T., Obersztyn E., Bal J., Nowakowska B.A. (2022) Application of array comparative genomic hybridization (aCGH) for identification of chromosomal aberrations in the recurrent pregnancy loss. *Genetics* 39:357-367
125. Kowalska A., Bozsaky E., Ambros P.F. (2010) Sequence-Based High Resolution Chromosomal Comparative Genomic Hybridization (CGH), *Methods in Molecular Biology* 659:299-312
126. Köybaşıoğlu F.F., Önal B., Han Ü., Adabağ A., Şahpaz A. (2020) Cytomorphological findings in diagnosis of Warthin tumor. *Turk J Med Sci* 50:148-154

127. Koynova D.K., Jordanova E.S., Milev A.D., Dijkman R., Kirov K.S., Toncheva D.I., Gruis N.A. (2007) Gene-specific fluorescence in-situ hybridization analysis on tissue microarray to refine the region of chromosome 20q amplification in melanoma, *Melanoma Res.* 17:37–41
128. Kreiger P.A., Okada Y., Simon S., Rorke L., Louis D.N., Golden J.A. (2005) Losses of chromosomes 1p and 19q are rare in pediatric oligodendrogliomas. *Acta Neuropathol* 109:387-392
129. Krook M.A., Reeser J.W., Ernst G., Barker H., Wilberding M., Li G., Chen H.-Z., Roychowdhury S. (2021) Fibroblast growth factor receptors in cancer: genetic alterations, diagnostics, therapeutic targets and mechanisms of resistance. *Br J Cancer* 124:880-892
130. Kuick C.H., Tan J.Y., Jasmine D., Sumanty T., Ng A.Y.J., Venkatesh B., Chen H., Loh E., Jain S., Seow W.Y., Ng E.H., Lian D.W.Q., Soh S.Y., Chang K.T.E, Chen Z.X., Loh A.H.P. (2022) Mutations of 1p genes do not consistently abrogate tumor suppressor functions in 1p-intact neuroblastoma. *BMC Cancer* 22:717
131. Kuzenko Y.V., Romanuk A.M., Dyachenko O.O., Hudymenko O. (2016) Pathogenesis of Warthin's tumors. *Interv Med Appl Sci.* 8:41–48
132. Laane C.J., Murr A.H., Mhatre A.N., Jones K.D., Lalwani A.K. (2002) Role of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in the etiology of benign parotid tumors. *Head Neck* 24:443–450
133. Lain S., Lane D. (2003) Improving cancer therapy by non-genotoxic activation of p53. *European Journal of Cancer* 39:1053–1060
134. Lamelas J., Terry J.H. Jr, Alfonso A.E. (1987) Warthin's tumor: multicentricity and increasing incidence in women. *Am J Surg* 154:347–51
135. Lane D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Natur* 358:15-6
136. Laut A.K., Dorneburg C., Fürstberger A., Barth T.F.E., Kestler H.A., Debatin K.M., Beltinger C. (2022) CHD5 inhibits metastasis of neuroblastoma. *Oncogene* 41:622-633
137. Lee D.H., Yoon T.M., Lee J.K., Lim S.C. (2017) Extracapsular dissection for Warthin tumor in the tail of parotid gland. *Acta Otolaryngol* 137:1007-1009
138. Lee J.M. (2003) The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1:69-73
139. Lehrer S., Rheinstein P.H., Rosenzweig K.E. (2018) Loss of MycBP may be associated with the improved survival in 1P co-deletion of lower grade glioma patients. *Clin Neurol Neurosurg* 172:112-115
140. Lehrer S. Rheinstein P.H. (2023) Chromosome 1p deletion in colorectal cancer and lower grade glioma: possible relationship with the enteric nervous system. medRxiv Preprint „running a pilot“ from National Library of Medicine

141. Leitch A., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I. (eds) (1994) In- situ Hybridisierung. 1st ed. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin Oxford.
142. Letessier A., Sircoulomb F., Ginestier C., Cervera N., Monville F., Gelsi-Boyer V., Esterni B., Geneix J., Finetti P., Zemmour C., Viens P., Charafe-Jauffret E., Jacquemier J., Birnbaum D., Chaffanet M. (2006) Frequency, prognostic impact, and subtype association of 8p12, 8q24, 11q13, 12p13, 17q12, and 20q13 amplifications in breast cancers, *BMC Cancer* 6:245-257
143. 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* 22:500–503
144. Levine A.J. (1997) p53, the Cellular Gatekeeper Review for Growth and Division, *Cell* 88:323–331
145. Levine A.J., Oren M. (2009) The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9:749–758
146. Lewis P.D., Baxter P., Paul Griffiths A., Parry J.M., Skibinski D.O. (2000) Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthin's tumour. *J Pathol* 191:274–281
147. Li J., Zhong M., Song L.L., Su G.D. (2006) Oncogene ZNF217 amplification on chromosome 20 q in ovarian serous cystadenocarcinoma and its clinical implications. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26:824–825
148. Li J., Miao N., Liu M., Cui W., Liu X., Li X., Shi X., Qing S., Ma Y., Zhang W., Biekemitsuofu H. (2014) Clinical significance of chromosome 1p/19q loss of heterozygosity and Sox17 expression in oligodendrogliomas. *Int J Clin Exp Pathol* 7:8609-8615
149. Li P., Maines-Bandiera S., Kuo W.L., Guan Y., Sun Y., Hills M., Huang G., Collins C.C., Leung P.C., Gray J.W., Auersperg N. (2007) Multiple roles of the candidate oncogene ZNF217 in ovarian epithelial neoplastic progression, *Int. J. Cancer* 120:1863–1873
150. Lichter P., Cremer T., Tang C.J.C., Watkins P.C., Manuelidis L., Ward D.C. (1988). Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:9664-9668
151. Limaïem F, Jain P. (2023) Warthin Tumor. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557640/> (Abruf am 27.07.2024)
152. Littlepage L.E., Adler A.S., Kouros-Mehr H., Huang G., Chou J., Krig S.R., Griffith O.L., Korkola J.E., Qu K., Lawson D.A., Xue Q., Sternlicht M.D., Dijkgraaf G.J.P., Yaswen P., Rugo H.S. Sweeney C.A., Collins C.C., Gray J.W., Chang H.Y., Werb Z. (2012) The transcription factor ZNF217 is a prognostic biomarker and therapeutic target during breast cancer progression. *Cancer Discov* 2:638-651

153. Lohmann D.R., Brandt B., Hopping W., Passarge E., Horsthemke B. (1996) The spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 58:940–949
154. Lopez-Rivera E., Liu Y.P., Verbitsky M., Anderson B.A. Capone V.P., Otto E.A., Yan Z., Mitrotti A., Martino J., Steers N.J., Fasel D.A., Vukojevic K., Deng R., Radeco S.E., Liu Q., Werth M., Westland R., Vivante A., Makar G.S., Bodria M. (...) Sanna-Cherchi S. (2017) Genetic Drivers of Kidney Defects in the DiGeorge Syndrome. *N Engl J Med* 376:742-754
155. Luebke A.M., Baudis M., Matthaei H., Vashist Y.K., Verde P.E., Hosch S.B., Erbersdobler A., Klein C.A., Izbicki J.R., Knoefel W.T., Stoecklein N.H. (2012) Losses at chromosome 4q are associated with poor survival in operable ductal pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 12:16-22
156. Lyu H.X., Wang Z.R., Gao Y.Q., Yu M., Li B.Q., Zhang Z.B. (2019) [Clinical pathologic analysis on 3 724 cases of salivary gland tumors]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 54:10-16
157. Maiti B., M., Li J., de Bruin A., Gordon F., Timmers C., Opavsky R., Patil K., Tuttle J., Cleghorn W., Leone G. (2005) Cloning and Characterization of Mouse E2F8, a Novel Mammalian E2F Family Member Capable of Blocking Cellular Proliferation, *The Journal of biological chemistry* 280:18211–18220
158. Makharashvili N., Paull T.T. (2015) CtIP: A DNA damage response protein at the intersection of DNA metabolism. *DNA Repair (Amst)* 32:75-81
159. Mamidi I., Lee E., Benito D.A., Li L., Goodman J.F., Thakkar P.G., Joshi A. (2021) Ultrasound-guided ethanol sclerotherapy for non-surgical treatment of Warthin's tumor. *Am J Otolaryngol* 42:102813
160. Mandic R., Agaimy A., Pinto-Quintero D., Roth K., Teymoortash A., Schwarzbach H., Stoehr C.G., Rodepeter F.R., Stuck B.A., Bette M. (2020) Aberrant Expression of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) in Warthin Tumors. *Cancers (Basel)* 12:1112
161. Mantsopoulos K., Goncalves M., Koch M., Iro H. (2018) Extracapsular dissection for warthin tumors despite the risk of ipsilateral metachronous occurrence. *Laryngoscope* 128:2521-2524
162. 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* 9:1565–6
163. 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

164. Martins C., Fonseca I., Félix A., Roque L, Soares J. (1995) Benign salivary gland tumors: a cytogenetic study of 21 cases. *Journal of Surgical Oncology* 60:232-237
165. Martins C., Fonseca I., Roque L., Soares J. (1997) Cytogenetic characterisation of Warthin's tumour. *Oral Oncol* 33:344–347
166. Martins C., Cavaco B., Tonon G., Kaye F.J., 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
167. Masuda A., Kasajima T. (1994) Morphometrical analysis of cystadenolymphoma (Warthin's tumor). Subclassification and characterization of the lymphoid stroma in comparison with gastric lymphoid follicles. *Pathol Res Pract.* 190:457–65
168. McGhee J.D., von Hippel P.H. (1977) Formaldehyde as a probe of DNA Structure. 4. Mechanisms of the initial reaction of formaldehyde with DNA. *Biochemistry* 16:3276–3293
169. McKelvey-Martin V. J., Ho E.T., McKeown S.R., Johnston S.R., McCarthy P.J., Rajab N.F., Downes C.S. (1998) Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells, *Mutagenesis* 13:1–8
170. Mircheva A., Vangrieken P., Al-Nasiry S., van Schooten F.-J., Goldschalk R.W.L., Langie S.A.S. (2023) Optimizing the Comet Assay-Based In Vitro DNA Repair Assay for Placental Tissue: A Pilot Study with Pre-Eclamptic Patients. *Int J Mol Sci* 25:187
171. Mitelman F. (ed) (1995) *ISCN, 1995 – An international System for Human Cytogenetic Nomenclature.* 1st ed. S. Karger Verlag, Basel
172. Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J., Battips D.M., Hungergord D.A. (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613-616
173. Nguyen H.T., Trouillon R., Matsuoka S., Fiche M. de Leval L., Bisig B., Gijs M.A. (2017) Microfluidics-assisted fluorescence in situ hybridization for advantageous human epidermal growth factor receptor 2 assessment in breast cancer. *Lab Invest* 97:93-103
174. Ni W., Chen Z., Zhou X., Yang R., Yu M., Lu J., Kaye F.J., Wu L. (2021) Targeting Notch and EGFR signaling in human mucoepidermoid carcinoma. *Signal Transduct Target Ther* 6:27
175. Nigg E.A. (2002) Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer* 2:815–225
176. Nishimura H., Kawata R., Kinoshita I., Higashino M., Terada T., Haginomori S.I., Tochizawa T. (2022) Management for Warthin Tumor of the Parotid Gland: Surgery or Observation. A 21-Year Retrospective Study of 387 Cases. *Ear Nose Throat J* 0:1-8 1455613221080927

177. Nolte M, Werner M, Ewig M, von Wasielewski R, Wilkens L, Georgii A (1995) Demonstration of the Philadelphia translocation by fluorescence in situ hybridization (FISH) in paraffin sections and identification of aberrant cells by a combined FISH/immunophenotyping approach. *Histopathology* 26:433–437
178. Nonet G.H., Stampfer M.R., Chin K., Gray J.W., Collins C.C., Yaswen P. (2001) The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells, *Cancer Res.* 61:1250–1254
179. Nordkvist, A., Mark, J., Dahlenfors, R., Bende, M., Stenman G., (1994) Cytogenetic observations in 13 cystadenolymphomas (Warthin's tumours). *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 76:129–135
180. Nordling C.O. (1953) A New Theory on Cancer-inducing Mechanism, *Br J Cancer*, 7:68-72
181. Nunez N., Clifton M.M.K., Funnell A.P.W., Artuz C., Hallal S., Quinlan K.G.R., Font J., Vandevenne M., Setiyaputra S., Pearson R.C.M., Mackay J.P., Crossley M. (2011) The multi-zinc finger protein ZNF217 contacts DNA through a two-finger domain. *J Biol Chem* 286:38190-38201
182. O'Neill Ian D. (2009) t(11;19) translocation and CRTC1-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma, *Oral Oncology* 45:2–9
183. Ogawa Y., Hong S.S., Toyosawa S., Chang C.C., Yagi T. (1990) Expression of major histocompatibility complex class II antigens and interleukin-1 by epithelial cells of Warthin's tumor. *Cancer* 66:2111–2117
184. Ooi A. (2002) 3 HER-2/neu Gene amplification and protein overexpression in breast carcinoma: immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. In Hayat M.A. (ed) *Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas. Molecular Genetics; Lung and Breast Carcinomas.* 1st ed. Academic Press. 259-265
185. Pardue M.L., Gall J.G. (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations, *Proc Natl Acad Sci USA* 64:600-604
186. Patterson J.W., Wright E.D., Camden S. (1999) Extraparotid Warthin's tumor. *J Am Acad Dermatol* 40:468–470
187. Pätz S., Möbius H. (1997) Simultaneous occurrence of a cystadenolymphoma (Warthin tumor) in the parotid gland and larynx. *HNO* 45:91–3
188. Peiro G., Diebold J., Lohrs U. (2002) CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene expression in ovarian carcinoma: correlation with 20q13.2 copy number and cyclin D1, p53, and Rb protein expression, *Am. J. Clin. Pathol.* 118:922–929
189. Perez-Toralla K., Mottet G., Guneri E.T., Champ J., Bidard F.C., Pierga J-Y., Klijanienko J., Draskovic I., Malaquin L., Viovy J-L., Descroix S (2015) FISH in chips:

- turning microfluidic fluorescence *in situ* hybridization into a quantitative and clinically reliable molecular diagnosis tool. *Lab Chip* 15:811-822
190. Petti S., Scully C. (2010) Determinants of oral cancer at the national level: just a question of smoking and alcohol drinking prevalence? *Odontology* 98:144-152
 191. Pinkel D., Straume, T., Gray, J. (1986). Cytogenetic analysis using qualitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:2934-2938
 192. Pinkel D., Albertson D.G. (2005) Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer, *Nature Genetics* 37:11-17
 193. Pinkston J.A., Cole P. (1996) Cigarette smoking and Warthin's tumor. *Am J Epidemiol* 144:183-187
 194. Pinkston J.A., Cole P. (1999) Incidence rates of salivary gland tumors: results from a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 120:834-840
 195. Praml C., Finke L.H., Herfarth C., Schlag P., Schwab M., Amler L. (1995) Deletion mapping defines different regions in 1p34.2-pter that may harbor genetic information related to human colorectal cancer. *Oncogene* 11:1357-1362
 196. Psychogios G., Vlastos J., Thölken R., Zenk J. (2020) Warthin's tumour seems to be the most common benign neoplasm of the parotid gland in Germany. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 277:2081-2084
 197. Quer M., Hernandez-Prera J.C., Silver C.E., Casasayas M., Simo R., Vander Poorten V., Guntinas-Lichius O., J Bradley P.J., Tong-Ng W., Rodrigo J.P., Mäkitie A.A., Rinaldo A., Kowalski L.P., Sanabria A., de Bree R., Takes R.P., López F., D Olsen K., Shaha A.R., Ferlito A. (2021) Current Trends and Controversies in the Management of Warthin Tumor of the Parotid Gland. *Diagnostics (Basel)* 11:1467
 198. Rauch S (ed) (1959) Papilläre Zystadenolymphome. (Die Speicheldrüsen des Menschen) Thieme, Stuttgart, 368-373
 199. Rehberg E., Schroeder H.G., Kleinsasser O. (1998) Surgery in benign parotid tumors: individually adapted or standardized radical interventions? *Laryngorhinootologie* 77:283-288
 200. Ren W., Gu G., (2017) Prognostic implications of RB1 tumour suppressor gene alterations in the clinical outcome of human osteosarcoma: a meta-analysis. *Eur J Cancer Care (Engl)* 24
 201. Renehan A., Gleave E.N., Hancock B.D., Smith P., McGurk M. (1996) Long-term followup of over 1000 patients with salivary gland tumours treated in a single centre. *Br J Surg* 83:1750-1754
 202. Ron E. (2007) Thyroid cancer incidence among people living in areas contaminated by radiation from the Chernobyl accident. *Health Phys.* 93:502-511

203. Röser K., Fehr A., Belge G., Bullerdiek J., Schumacher U. (2007) Subtyping of carcinoma ex pleomorphic adenoma in salivary glands as mucoepidermoid carcinoma ex pleomorphic adenoma by a t(11;19) translocation assay (abstract). *Oral Oncol Suppl* 2:223
204. Rotellini M., Paglierani M., Pepi M., Franchi A. (2012) MAML2 rearrangement in Warthin's tumour: a fluorescent in situ hybridisation study of metaplastic variants. *J Oral Pathol Med* 41:615-620
205. Ruohoalho J., Mäkitie A.A., Aro K., Atula T., Haapaniemi A., Keski-Säntti H., Takala A., Bäck L.J. (2017) Complications after surgery for benign parotid gland neoplasms: A prospective cohort study. *Head Neck* 39:170-176
206. Santos S. J., Singh N.P., Natarajan A.T. (1997) Fluorescence in situ hybridization with comets, *Exp. Cell Res.* 232:407–411
207. 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
208. Sauter B. (2010) Vergleichende genomische Hybridisierung an pleomorphen Adenomen und Warthin-Tumoren, Dissertation, Universität des Saarlandes
209. Savelieva E., Belair C.D., Newton M.A., DeVries S., Gray J.W., Waldman F., Reznikoff C.A. (1997) 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16 E7 transformed human uroepithelial cells. *Oncogene* 14:551–560
210. Schmitt E., Schwarz-Finsterle J., Stein S., Boxler C., Müller P., Mokhir A., Krämer R., Cremer Ch., Hausmann M. (2010) Combinatorial Oligo FISH: Directed Labeling of Specific Genome Domains in Differentially Fixed Cell Material and Live Cells, *Fluorescence in situ Hybridization (FISH) Methods in Molecular Biology*, 659:185-202
211. Schwalje A.T., Uzelac A., Ryan W.R. (2015) Growth rate characteristics of Warthin's tumours of the parotid gland. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44:1474-1479
212. Schwarz-Finsterle J., Stein S., Großmann C., Schmitt E., Trakhtenbrot L., Rechavi G., Amariglio N., Cremer Ch., Hausmann M. (2007) Comparison of triple helical COMBO-FISH and standard FISH by means of quantitative microscopic image analysis of abl/bcr positions in cell nuclei. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70:397-406
213. Schwerer M.J., Kraft K., Baczako K., Maier H. (2001) Cytokeratin expression and epithelial differentiation in Warthin's tumour and its metaplastic (infarcted) variant. *Histopathology* 39:347– 352
214. Seifert G., Bull H.G., Donath K. (1980) Histologic subclassification of the cystadenolymphoma of the parotid gland. Analysis of 275 cases. *Virchows Arch Pathol Anat.* 388:13–38

215. Seifert G. (1996) Warthin tumoren (Adenolymphome). In: Doerr W, Seifert G, Uehlinger E (eds) *Oralpathologie I, Pathologie der Speicheldrüsen*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 440–463
216. Sen S., Zhou H., White R.A. (1997). A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14:2195–2200
217. Shaw C.J., Stankiewicz P., Bien-Willner G., Bello S.C., Shaw C.A., Carrera M., Jurado L.P., Estivill X., Lupski J.R. (2004) Small marker chromosomes in two patients with segmental aneusomy for proximal 17p. *Hum Genet* 115:1-7
218. Shi S.R., Key M.E., Kalra K.L. (1991) Antigen retrieval in formalin- fixed, paraffin-embedded tissues; an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39:741–748
219. Shi Y., Sawada J., Sui G., Affar el B., Whetstine J.R., Lan F., Ogawa H., Luke M.P., Nakatani Y., Shi Y. (2003) Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex, *Nature* 422:735–738
220. Shimada M., Imura J., Kozaki T., Fujimori T., Asakawa S., Shimizu N., Kawaguchi R. (2005) Detection of Her2/neu, c-MYC and ZNF217 gene amplification during breast cancer progression using fluorescence in situ hybridization. *Oncol. Rep.* 13:633–641
221. Silva M., de Leeuw N., Mann K., Schuring-Blom H., Morgan S., Giardino D., Rack K., Hastings R. (2019) European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. *European Journal of Human Genetics* 27:1-16
222. Simpson R.H.W., Eveson J.W. (2005) Barnes EL, Eveson JW, Sidransky D. Lyons (eds). *Warthin tumor. Pathology and Classification of Head and Neck Tumours*. 3rd ed. IARC 263–265
223. Skalova A., Michal M. (2005) Cystadenoma. *Pathology and Classification of Head and Neck Tumours*. Edited by Barnes EL, Eveson JW, Sidransky D. Lyons, IARC 273–274
224. Snyderman C., Johnson J.T., Barnes E.L. (1986) Extraparotid Warthin's tumor. *Otolaryngol Head Neck Surg* 94:169–175
225. Sobrinho-Simões M., Máximo V. (2006), Warthin's tumour, *Virchows Arch* 448: 877–878
226. Soini Y., Kamel D., Nuorva K., Lane D.P., Viihikangas K., Piiikk P. (1992) Low p53 protein expression in salivary gland tumours compared with lung carcinomas, *Virchows Archiv A Pathol Anat* 421:415-420
227. Solvei I., Cavallo A., Schermelleh L., Jaunin F., Scasselati C., Cmarko D., Cremer C., Fakan S., Cremer T. (2002) Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during threedimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res* 276:10–23

228. Sonoda G., Palazzo J., du Manoir S., Godwin A.K., Feder M., Yakushiji M., Testa J.R. (1997) Comparative genomic hybridization detects frequent overrepresentation of chromosomal material from 3q26, 8q24, and 20q13 in human ovarian carcinomas, *Genes Chromosomes Cancer* 20:320–328
229. Spowart G. (1994) Mitotic metaphase chromosome preparation from peripheral blood for high resolution. *Methods Mol Biol.* 29:1-10
230. Stallmann Ch., Vacha P., Vesely H., Richter E., Feyerabend Th. (2001) Radiotherapie bei einem Zystadenolymphom der Parotis (Warthin-Tumor). *Strahlenther Onkol* 177:247–51
231. Stenman G. (2005) Fusion oncogenes and tumor type specificity – insights from salivary gland tumors. *Semin Cancer Biol* 15:224–35
232. Stewart K.E., Bannon R., Bannister M. (2021) Benign parotid mass and facial palsy: systematic review. *Ann R Coll Surg Engl* 103:47-52
233. Stiewe Th. (2007) The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 7:165-167
234. Su Ch.-Ch., Li Ch.-F., Lin Ch.-N. (2010) Unreported Cytologic Characteristics of Oncocytes in Warthin's Tumors. *Tzu Chi Medical* 22:137-140
235. Saku T., Hayashi Y., Takahara O., Matsuura H., Tokunaga M., Tokunaga, Tokuokan S, Soda M., Mabuchi K., Land C.E. (1997) Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987. *Cancer* 79:1465–1475
236. Tanaka K., Masuda M., Shinden S., Ogata A., Suzuki M. (1998) Fine-needle aspiration cytology of tumors of major salivary glands. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 101:1283–91
237. Tanner M.M., Tirkkonen M., Kallioniemi A., Holli K., Collins C., Kowbel D., Gray J.W., Kallioniemi O.P., Isola J. (1995) Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications, *Clin. Cancer Res.* 1:1455–1461
238. Tanner M.M., Grenman S., Koul A., Johannsson O., Meltzer P., Pejovic T., Borg A., Isola J.J. (2000) Frequent amplification of chromosomal region 20q12– q13 in ovarian cancer, *Clin. Cancer Res.* 6:1833–1839
239. Tascan I.S., Yeniguri A., Ozkan F., Dogan M. (2023) Locational and Clinical Varieties of Warthin Tumor: Two Rare Case Presentations. *Ear Nose Throat J* 0:1-4 1455613221146895
240. Teymoortash A., Lippert B.M., Werner J.A. (2001) Steroid hormone receptors in parotid gland cystadenolymphoma (Warthin's tumour). *Clin Otolaryngol* 26:411–416
241. Thompson A.S., Bryant H.C. (1950) Histogenesis of papillary cystadenoma lymphomatosum (Warthin's tumor) of the parotid salivary gland. *Am J Pathol* 26:807–829

242. Timmers C., Sharma N., Opavsky R., Maiti B., Wu L., Wu J., Orringer D., Trikha P., Saavedra H.I., Leone G. (2007) E2f1, E2f2, and E2f3 control E2F target expression and cellular proliferation via a p53-dependent negative feedback loop. *Molecular and Cellular Biology* 27:65-78
243. Tirado Y., Williams M.D., Hanna E.Y., Kaye F.J., Batsakis J.G., El-Naggar A.K. (2007) CRTC1/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: 708–15
244. Tjio, J.H., Levan, A. (1956) The chromosome number of man. *Hereditas* 42: 1-6
245. Toncheva D., Zaharieva B. (2005) Coexistence of copy number changes of different genes (INK4A, erbB-1, erbB-2, CMYC, CCND1 and ZNF217) in urothelial tumors, *Tumour Biol.* 26:88–93
246. Tonon G., Modi S., Wu L., Kubo A., Coxon A.B., Komiya T., O'Neil K., Stover K., El-Naggar A., Griffin J.D., Kirsch I.R., Kaye F.J. (2003) t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet* 33(2):208–13
247. Trafton A. (28.02.2024) MIT News on Campus and around the world. How early-stage cancer cells hide from the immune system. URL news.mit.edu/2024/how-early-stage-cancer-cells-hide-immune-system-0228 (Abruf am 28.07.2024)
248. Trakatelli M., de Vries E., Katsanos G., Tzachanis D., Eggermont A. (2010) in Stockfleth E., Rosen T., Shumack S. (eds) (2010) *Managing Skin Cancer*. 1st ed. Springer. 79-110
249. Trask B., Pinkel D., van den Engh G. (1989) The proximity of DNA sequences in interphase cell nuclei is correlated to genomic distance and permits ordering of cosmids spanning 250 kilobase pairs*1. *Genomics* 5:710-717
250. Tsoutsou, E., Tzetis, M., Giannikou, K., Braoudaki M., Mitrakos A., Amenta S., Selenti N., Kanavakis E., Zafeiriou D., Kitsiou-Tzeli S., Fryssira H. (2017) Application of high-resolution array comparative genomic hybridization in children with unknown syndromic microcephaly. *Pediatr Res* 82:253-260
251. Tunc O. Gönüldaş B., Yusuf Arslanhan Y., Kanlıkama M. (2020) Change in Warthin's tumor incidence: a 20-year joinpoint trend analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 277:3431-3434
252. Tung B.-K., Chu P.-Y., Tai S.-K., Wang Y.-F., Tsai T.-L., Lee T.-L., Hsu Y.-B. (2014) Predictors and timing of recovery in patients with immediate facial nerve dysfunction after parotidectomy. *Head Neck* 36:247-251
253. Tung Y.-C., Luo S.-D., Su Y.-Y., Chen W.-C., Chen S.-L., Chen K.-L., Lin W.-C. (2019) Evaluation of Outcomes following Radiofrequency Ablation for Treatment of Parotid Tail Warthin Tumors. *J Vasc Interv Radiol* 30:1574-1580

254. Vainberg I.E., Lewis S.A., Rommelaere H., Ampe Ch., Vandekerckhove J., Klein H.L., Cowan N.J. (1998) Prefoldin, a Chaperone that Delivers Unfolded Proteins to Cytosolic Chaperonin, *Cell* 93:863–873
255. van Dekken H., Vissers K., Tilanus H.W., Kuo W.L., Tanke H.J., Rosenberg C., Ijszenga M., Szuhai K. (2006) Genomic array and expression analysis of frequent high-level amplifications in adenocarcinomas of the gastroesophageal junction, *Cancer Genet. Cytogenet.* 166:157–162
256. Vance G.H. (2020) Cytogenetics/cytogenomics. In Keohane E.M., Otto C.N., Walenga J.M. (eds) (2020) *Rodak's Hematology. Clinical Principles and Applications.* 6th ed. Saunders imprint of Elsevier. 525-539
257. Vanhauenderde J.M., Chevalier D., Delmotte J., Piquet J.J. (1988) Cystadenolymphoma of the parotid gland. A study of 40 cases. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 42:413–21
258. Vories A.A., Ramirez S.G. (1997) Warthin's tumor and cigarette smoking. *South Med J* 90:416–418
259. Wagener, C. (ed) (1996). *Molekulare Onkologie.* 1st ed. Thieme Verlag. Stuttgart, New York
260. Wan T.S.K., Ma E.S.K. (2024) Chromosome Bandings and Recognition. *Methods Mol Biol* 2825:137-150
261. Warthin A.S. (1929) Papillary cystadenoma lymphomatosum. A rare teratoid of the parotid region. *J Cancer Res* 13:116–125
262. Weiss M.M., A.M. Snijders, E.J. Kuipers, B. Ylstra, D. Pinkel, S.G. Meuwissen, P.J. van Diest, D.G. Albertson, G.A. Meijer (2003) Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization. *J. Pathol.* 200. 320–326
263. Wemmert S. (2006) Molekularzytogenetische Untersuchungen zur Abhängigkeit des Therapieerfolgs maligner menschlicher Gliome mit Temozolomid-Chemotherapie von der Art der vorliegenden genetischen Veränderungen. Dissertation, Universität des Saarlandes
264. Wemmert S., Willnecker V., Sauter B., Schuh S., Brunner C., Bohle R.M., Urbschat S., Schick B. (2014) Genomic alterations in Warthin tumors of the parotid gland. *Oncol Rep* 31:1899-1904
265. Wiegant J., Ried T., Nederlof P.M., van der Ploeg M., Tanke H.J., Raap A.K. (1991) In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acid Research* 19:3237-3241
266. Wilkens L., von Wasielewski R., Werner M., Nolte M., Georgii A. (1996) Microwave pretreatment improves RNA-FISH in various formalin-fixed tissues using a uniform protocol. *Pathol Res Pract* 192:588–594

267. Wilkens L., Gerr H., Gadzicki D., Kreipe H., Schlegelberger B. (2005) Standardised fluorescence in situ hybridisation in cytological and histological specimens, *Virchows Archiv* 447:586-592
268. Williamson J.D., Simmons B.H., el-Naggar A., Medeiros L.J. (2000) Mucoepidermoid carcinoma involving Warthin tumor. A report of five cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 114:564–570
269. Winkler R., Perner B., Rapp A., Durm M., Cremer C., Greulich KO., Hausmann M. (2003) Labelling quality and chromosome morphology after low temperature FISH analysed by scanning far-field and near-field optical microscopy. *J Microsc* 209:23–33
270. Wong A.K., Ormonde P.A., Pero R., Chen Y., Lian L., Salada G., Berry S., Lawrence Q., Dayananth P., Ha P., Tavtigian S.V., Teng D.H., Bartel P.L. (1998) Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein. *Oncogene* 17:2279-2285
271. Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R.A., Hernando E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C., Lowe S.W. (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas, *Nature* 445:656-660
272. Yan L., Xu J., Liu L., Li X. (2023) Warthin-like mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: Clinicopathological observation and literature review. *Sci Prog* 106: 368504231179816
273. Yang J., Bi Q., Jin Y., Yang Y., Du J., Zhang H., Wu K. (2024) Different MRI-based radiomics models for differentiating misdiagnosed or ambiguous pleomorphic adenoma and Warthin tumor of the parotid gland: a multicenter study. *Front Oncol* 14: 1392343
274. Yang S.H., Seo M.Y., Jeong H.J., Jeung H.C., Shin J., Kim S.C., Noh S.H., Chung H.C., Rha S.Y. (2005) Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients, *Clin. Cancer Res.* 11:612–620
275. Yorita K., Nakagawa H., Miyazaki K., Fukuda J., Ito S., Kosai M. (2019) Infarcted Warthin tumor with mucoepidermoid carcinoma-like metaplasia: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep* 13:12
276. Yoshimura Y., Gabka J. (1979) Clinical evaluation of Warthin's tumor. An analysis of 43 cases. *Int J Oral Surg* 8:8–17
277. Yoskovitch A., Laberge JM., Rodd C., Sinsky A., Gaskin D. (1998) Cystic thyroid lesions in children. *J Pediatr Surg*.33:866-70
278. You A., Tong J.K., Grozinger C.M., Schreiber S.L. (2001) CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:1454–1458
279. Yu G.Y., Liu X.B., Li Z.L., Peng X. (1998) Smoking and the development of Warthin's tumour of the parotid gland. *Br J Oral Maxillofac Surg* 36:183–185

280. Zahran M., Alsedra S., Cope D., Youssef A. (2021) The Role of FNAC in the Diagnosis and Management of Warthin Tumour: Analysis of 74 Cases. *Int Arch Otorhinolaryngol.*25:379-382
281. Zhang D., Tian J., Xia Q., Yang Z., Gu B. (2021) Significance and Mechanisms Analyses of *RB1* Mutation in Bladder Cancer Disease Progression and Drug Selection by Bioinformatics Analysis. *Bladder Cancer* 7:113-142
282. Zhang X., Baloch Z.W., Cooper K., Zhang P.J., Puthiyaveetil R., LiVolsi V.A. (2020) The significance of mucinous metaplasia in Warthin tumor: a frequent occurrence and potential pitfall. *Hum Pathol* 99:13-26
283. Zhou H., Kuang J., Zhong L., Kuo W.L., Gray J.W., Sahin A., Brinkley B.R., Sen S. (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20:189–193
284. Żurek M., Fus L., Niemczyk K., Rzepakowska A. (2023) Salivary gland pathologies: evolution in classification and association with unique genetic alterations. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 280:4739-4750

7 Anhang

7.1 Material und Herstellernachweis

7.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterial

anti-DIG-Rhodamin	Roche Diagnostics, Mannheim
Biotin-Nick-Translation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Colcemid	BCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe
DAPI (Vectashield® with DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DIG-Nick-Translation-Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Digoxigenin-alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Eindeckmedium für Eosinschnitte	
Eosin	
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Fixogum	Marabu, Tamm
Fixiermaterial für Kryostat	
Objektträger	Superfrost
Pbmax	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pepsin (2500 U/mg)	Sigma, Taufkirchen
RNase H (100 µg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
Streptavidin-alkalische Phosphatase	Vector, Burlingame, CA, USA

Alle weiteren, hier nicht genannten Puffersalze, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

7.1.2 Lösungen

20xSSC

3,0 M NaCl

0,3 M Na-citrat

Blutkulturmedium

- 50 ml PB-Max, Lot.-Nr.: 1125372 Fa. Difco Nährmedium.

- 100ml 0,52% KCL: 520 mg auf 100ml Aqua.dest.

- Colcemid 10 µl / ml (Fa. Invitrogen)

Chromosomenfixans

- 30 ml Methanol

- 10 ml Eisessig

7.1.2.1 Lösungen und Medien zur FISH

Denaturierungsmix (für Referenz als auch Tumorgewebe)

- 350 µl deionisiertes Formamid
 - 50 µl NaPO₄
 - 50 µl steriles 20xSSC
 - 50 µl steriles Aqua.dest.
- Davon 100 µl pro Präparat aufbringen

Eingesetzte Sonden

1. -Chromosom X, direct-labelled Red, Fa. Q-Biogene, Cat.: PSA T000X-R
-Chromosome 16p, direct-labelled FITC, Fa. Q-Biogene Cat.: PTEL16P-G

Ansatz Verfahrensetablierung:

- 1 µl #X-Sonde + 1,5 µl #16p Sonde + 2,5 µl Hybridisierungs-Mix Fa.Qbiogene
2. -Chromosome 20centromer-green, direct-labelled FITC, Fa. MP-Biomedical, Cat.: PSA T0020
-Chromosome #20q13-orange, direct-labelled Cy3, Fa. Vysis Cat.: 75647

Ansatz Referenzgewebe:

7 µl Hyb.-P. Vysis + 1 µl #20q13 Sonde + 2 µl #20cen Sonde

Ansatz Tumorgewebe:

6 µl Hyb.-P. Vysis + 1 µl #20q13 Sonde + 2 µl #20cen Sonde

7.1.2.2 Lösungen und Medien zur CGH

Medium zur Aufnahme der Tumorproben:

- Eine Spatelspitze Proteinase K: Roche Mannheim Best-Nr.: 745 723, Lagerung bei +4°C
- 5,0 ml SE-Puffer pH = 8,0 (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8 mit NaOH einstellen)
- 0,5 ml 10% SDS

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,6)
1 mM Na₂EDTA

P1 Pufferreagenz:

1,2 g Tris + 0,87 g NaCl in 100 ml Aqua.dest. lösen pH = 7,5

P2 Pufferreagenz:

5 ml P1 + 150 mg Blocking Reagenz, Roche Mannheim

P3 Pufferreagenz :

1,2 g Tris + 0,85 g NaCl + 1g MgCl₂ in 100 ml Aqua.dest. lösen pH = 9,5

Detektionsmix :

5,7 ml P3 + 45 µl NBT + 33 µl BCIP

7.2 Geräte und Software

Abzug	Vogel medizinische Technik, VAE 988, Giessen
Brutschrank, begast	Heraeus, Thermo ST5042, Hanau
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX60 Mikroskop
Heizplatte	Medax Nagel KG, 5p12, Kiel
Optische Software	ISIS
Kryostat	Leica, CM 30505, Solms
Kühlzentrifuge	Hettich, Rotanta P, Tuttlingen
Ph-Messgerät	Listad 8F93, E163694
Schüttler	1. Edmund Bühler, SM25, Tübingen 2. Edmund Bühler, SM30, Corthal 3. Edmund Bühler, 7400, Tübingen
Thermocycler	Eppendorf, Thermomixer comfort, Hamburg
Tischzentrifuge	Heraeus, Biofuge Pro, Osterode
Waagen	1. Mettler-Spoerhase, ME 13034, Giessen 2. Kern 510-41, 10376, Balingen-Frommern
Wasserbäder	1. GFL, 1004, Burgwedel 2. GFL, 1083, Burgwedel

7.3 Rohdaten FISH

Kontrollhybridisierungen

KontrolleII	FISH Datum: 06.03.07		Auswertungsdatum:	
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13			
Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0			
	1		13	
	2	5	175	2
	3		5	

KontrolleI	FISH Datum: 22.01.07		Auswertungsdatum:	
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13			
Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0			
	1	4	27	
	2	8	159	
	3		2	

Ergebnisse der FISH an den jeweiligen Tumoren

Nr.040	FISH Datum: 17.07.07		Auswertungsdatum: 25.07.07	
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13			
Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0			
	1	32	96	2
	2	8	62	
	3			

Nr.033	FISH Datum: 20.03.07		Auswertungsdatum: 26.03.07	
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13			
Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0			
	1	35	18	
	2	40	105	
	3			

Nr.048	FISH Datum: 14.08.07		Auswertungsdatum: 16.08.07	
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13			
Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0			
	1	24	56	
	2	4	110	3
	3			3

Nr.045	FISH Datum: 24.07.07		Auswertungsdatum: 26.07.07	
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13			
Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0			
	1	6	50	
	2	4	132	8
	3			

Nr.067	FISH Datum: 24.07.07		Auswertungsdatum: 26.07.07	
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13			
Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0			
	1	22	39	
	2	4	121	7
	3		2	5

Nr.064	FISH Datum: 14.08.07		Auswertungsdatum: 16.08.07	
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13			
Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0			
	1	3	32	
	2	18	139	2
	3		2	

Nr.075	FISH Datum: 27.03.07		Auswertungsdatum: 29.03.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		24	32	
	FITC, 20cen	2	36	108	
		3			

Nr.078	FISH Datum: 27.03.07		Auswertungsdatum: 02.04.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		20	30	
	FITC, 20cen	2	10	140	
		3			

Nr.088	FISH Datum: 06.08.07		Auswertungsdatum: 08.08.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		3		
	FITC, 20cen	1	23	6	
	2	96	68	1	
		3		1	

Nr.099	FISH Datum: 29.01.07		Auswertungsdatum: 19.03.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		8	20	
	FITC, 20cen	2	11	160	1
		3			

Nr.100	FISH Datum: 02.04.07		Auswertungsdatum: 04.04.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		57	41	
	FITC, 20cen	2	51	46	
		3			

Nr.133	FISH Datum: 06.08.07		Auswertungsdatum: 16.08.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		21	8	
	FITC, 20cen	2	36	126	1
		3	5	3	

Nr.138	FISH Datum: 06.08.07		Auswertungsdatum: 08.08.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		20	36	
	FITC, 20cen	2	4	139	1
		3			

Nr.153	FISH Datum: 17.07.07		Auswertungsdatum: 25.07.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		17	79	15
	FITC, 20cen	2	4	54	29
		3		2	

Nr.157	FISH Datum: 10.07.07		Auswertungsdatum: 13.07.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		1	4	
	FITC, 20cen	1	31	106	
	2	9	48		
		3			

Nr.158	FISH Datum: 14.08.07		Auswertungsdatum: 16.08.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
		0	1	2	3
	Farbstoff/ Sonde:		2	33	40
	FITC, 20cen	2	5	106	6
		3	1	2	

Nr.159	FISH Datum: 10.07.07		Auswertungsdatum: 16.07.07		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
	Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0	1			
	1	40	106	2	
	2	3	47	1	
	3				

Nr.189	FISH Datum: 13.05.08		Auswertungsdatum: 21.05.08		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
	Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0	5			
	1	9	41		
	2	10	131	4	
	3				

Nr.190	FISH Datum: 19.05.08		Auswertungsdatum: 29.05.08		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
	Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0		6		
	1	16	46		
	2	27	105		
	3				

Nr.207	FISH Datum: 27.05.08		Auswertungsdatum: 05.06.08		
	Farbstoff/ Sonde : Cy3, #201q13				
	Farbstoff/ Sonde: FITC, 20cen	0	1	2	3
	0		2		
	1	21	40		
	2	27	106		
	3				2

8 Publikation

Publikation im Zusammenhang mit dieser Arbeit:

Genomic alterations in Warthin tumors of the parotid gland

Autoren:

Silke Wemmert, Vivienne Willnecker, Birgit Sauter, Sebastian Schuh, Christian Brunner, Rainer Maria Bohle, Steffi Urbschat, Bernhard Schick.

Published online on: February 18, 2014, p 1899-1904, doi.org/10.3892/or.2014.3028

ONCOLOGY REPORTS 31: 1899-1904, 2014

Genomic alterations in Warthin tumors of the parotid gland

SILKE WEMMERT¹, VIVIENNE WILLNECKER¹, BIRGIT SAUTER¹, SEBASTIAN SCHUH¹,
CHRISTIAN BRUNNER¹, RAINER MARIA BOHLE², STEFFI URBSCHAT³ and BERNHARD SCHICK¹

¹Department of Otolaryngology, ²Institute of Pathology, and ³Department of Neurosurgery,
Saarland University Medical Center, D-66421 Homburg/Saar, Germany

Received December 2, 2013; Accepted January 21, 2014

DOI: 10.3892/or.2014.3028

9 Danksagung

Ich danke allen die mich bei meiner Promotion unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Univ. - Prof. Dr. med. B. Schick, Lehrstuhl für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität des Saarlandes für die Übernahme meines Promotionsthemas und die weitere Bereitstellung der zur Fertigstellung benötigten Umgebung, sowie seine Unterstützung. Auch bedanke ich mich an dieser Stelle für die Korrektur meiner Dissertation, sowie die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung.

Ich bedanke mich bei Herrn Univ. - Professor Dr. med. M. Bloching für die initiale Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung der Laborkapazität sowie aller verwendeten Materialien.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Frau Dr. rer. nat. S. Wemmert für ihre Geduld, ihre hervorragende Korrektur und wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit. Ohne sie würde meine Dissertation nicht in ihrer jetzigen Form vorliegen.

Auch danke ich Frau PD Dr. rer. nat. S. Urbschat für ihr Mitwirken an der Arbeit und die Verifizierung der im Rahmen der CGH erhobenen Daten.

Ebenso danke ich Frau Dr. rer. nat. A. Hessenauer, für die initiale wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion und Einarbeitung.

Auch danke ich Herrn Univ. - Prof. Dr. med. R. Bohle, Leiter des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums Homburg, für die Befundung der Präparate und Mitbetreuung meiner Arbeit.

Ebenfalls Danke ich Frau U. Bechtel und Frau M. Hoffmann für die praktische Betreuung meiner Arbeit, sowie ihre Unterstützung in der Einarbeitung. Dank auch an Frau Dr. rer. nat. Vivienne Willnecker.

Ich danke meinen Eltern, die mich sowohl während des gesamten Studiums, als auch während der Promotion unterstützt haben. Ohne sie wäre beides in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ich danke meiner Freundin Catherine, die mich während der Promotion ebenfalls liebevoll unterstützt hat.

10 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

