

Aus dem Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf

Institut für

Oralpathologie

Prof. Dr. med. T. Lönig

**Untersuchungen zur Bedeutung des Tumorsuppressorgens *p16* in Karzi-
nomen im pleomorphen Adenom**

-

Expressions- und Mutationsanalyse nach Laser-gestützter Mikrodissektion

Dissertation

Zur

Erlangung des

Doctor medicinae

Der medizinischen Fakultät

Der Universität Hamburg

**Vorgelegt von
Susanne Krusche
aus Delmenhorst**

Hamburg 2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Theorien zur Tumorentstehung	6
1.2. Karzinome im pleomorphen Adenom - ein Modell zur Aufklärung der Ursachen für die Tumorentstehung?	8
1.3. Tumoren der Speicheldrüsen	9
1.3.1. Pleomorphes Adenom	9
1.3.2. Karzinome im pleomorphen Adenom	11
1.4. Das Tumorsuppressorgen <i>p16</i> - Beteiligung an der Tumorgenese in malignen Speicheldrüsentumoren?	12
1.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Untersuchungsgut	15
2.1.2. Verwendete Kontrollzelllinien	18
2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterial	19
2.1.4. Chemikalien	20
2.1.5. Oligonukleotide	24
2.2. Methoden	25
2.2.1. Immunhistochemie	25
2.2.1.1. Nachweis von Ki 67 mittels DAB	26
2.2.1.2. Nachweis von p16	27
2.2.1.3. Quantitative und semiquantitative Auswertung	28
2.2.2. Mutationsanalyse	29
2.2.2.1. Laser-gestützte Mikrodisektion	29
2.2.2.1.1. Vorbereitung der Objektträger und Aufziehen der Folien	31

2.2.2.1.2. Materialgewinnung	31
2.2.2.1.3. DNA-Extraktion	32
2.2.2.2. Amplifikation der DNA	33
2.2.2.2.1. Isolierung der DNA	33
2.2.2.2.2. Vorbereitung der Proben und Deparaffinierung	34
2.2.2.2.3 Master- Mix	34
2.2.2.2.4. PCR- Programm	35
2.2.2.2.5. PCR- Kontrolle (β - Globin)	36
2.2.2.2.6. Agarose- Gelelektrophorese	36
2.2.2.2.7. Giessen des Agarose- Gels	37
2.2.2.2.8. Vorbereitung der Proben	37
2.2.2.3 Mutationsanalyse	38
2.2.2.3.1. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	38
2.2.2.3.1.1. Aufbereitung der PCR- Produkte	39
2.2.2.3.1.2. Reinigung	40
2.2.2.3.1.3. Denaturierung	40
2.2.2.3.1.4. Ethanol f ällung	40
2.2.2.3.5. Polyacrylamidgelelektrophorese [PAGE]	40
2.2.2.3.6. Vorbereitung der Gelkammer	40
2.2.2.3.7. Herstellung des PAGs	41
2.2.2.3.8. Elektrophoresebedingungen	42
2.2.2.3.9. Probeneinlauf	42
2.2.2.3.10. Übersicht über die SSCP- Laufbedingungen	42
2.2.2.3.11. Silberfärbung des Polyacrylamidgels	42
2.2.2.4. DNA- Sequenzierung	43
2.2.2.4.1. Eluierung der DNA aus den SSCP- Gelen	44
2.2.2.4.2. Isopropanol f ällung	44
2.2.2.4.3. Sequenzreaktion	45

3. Ergebnisse **46**

3.1. Das Patientenkollektiv	47
3.1.1 Altersverteilung	47

3.1.2. Verteilung der Lokalisation	48
3.2. Gewebeproben	49
3.2.1. Karzinome im pleomorphen Adenom	49
3.2.2. Kontrollen	50
3.3. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	51
3.3.1. Auswertung der Ki 67- Immunhistochemie	51
3.3.2. Auswertung der p16- Immunhistochemie	52
3.3.2.1. Karzinome im pleomorphen Adenom	52
3.3.2.1.1. P16- Expression in den Karzinomanteilen der Karzinome im pleomorphen Adenom	53
3.3.2.2. Kontrollen	53
3.3.2.2.1. Karzinome	53
3.3.2.2.2. Pleomorphe Adenome	55
3.4. Auswertung der Mutationsanalyse	56
3.4.1. SSCP	56
3.4.2. Direkte Sequenzierung	56
3.5. SSCP- Gel: Mutationen im Exon 2b	60
3.6. SSCP- Gel: Mutationen im Exon 2a	61
<u>4. Diskussion</u>	<u>62</u>
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>66</u>
<u>6. Abbildungen der Karzinome im pleomorphen Adenom</u>	<u>67</u>
<u>7. Anhang</u>	<u>74</u>
7.1. Literaturverzeichnis	74
7.2. Verzeichnis der Tabellen	84
7.3. Verzeichnis der Abbildungen	85
7.4. Verzeichnis der Abkürzungen	86

7.5. Danksagung	89
7.6. Lebenslauf	90
7.7. Erklärung	91

1. Einleitung

1.1. Theorien zur Tumorentstehung

Neben Herz- Kreislauf- Erkrankungen stellen Tumorerkrankungen die häufigste Todesursache in westlichen Industrieländern dar. Als Tumor, Geschwulst oder Neoplasma bezeichnet man eine unkontrolliert wachsende Gewebsmasse, die durch unregulierte oder unvollständig regulierte und fortschreitende Vermehrung von körpereigenen, entarteten Zellen (Tumorzellen) entsteht (Böcker, Heitz, Denk 1996). Maligne Tumoren zeigen zudem ein invasives, destruierendes Wachstumsverhalten mit der Fähigkeit zur Verschleppung und Absiedlung von Zellen in anderen Geweben (Metastasierung). Zytologisch finden sich charakteristischerweise Kern- und Zellveränderungen (Atypien).

Adenome sind definitionsgemäß gutartige epitheliale Tumoren, die hauptsächlich in endo- und exokrinen Drüsen, in der Leber, in der Niere, im Schleimhautepithel des Magen- Darm-Traktes und selten im Respirationstrakt entstehen (Böcker, Heitz, Denk 1996).

Als Karzinome werden maligne epitheliale Tumoren bezeichnet, die in endo- und exokrinen Drüsen und parenchymatösen Organen, im Schleimhautepithel des Magen- Darm- Traktes, des Urogenitaltraktes und der Haut entstehen können. Karzinome machen ca. 80% aller malignen Tumoren aus.

Die Karzinogenese beschreibt einen meist mehrstufigen Prozess (Mehrschritt-Theorie der Krebsentstehung). Es existieren zwei unterschiedliche Modellvorstellungen, die Dysplasie-Karzinom- Sequenz und die Adenom- Karzinom- Sequenz, anhand derer versucht wird, die Umwandlung ursprünglich gutartigen Gewebes in einen bösartigen Tumor zu erklären. Aus einer atypischen Zellproliferation, die noch nicht das Vollbild einer Neoplasie aufweist, kann sich gemäß der Dysplasie- Karzinom- Sequenz ein invasives Karzinom entwickeln. Der bösartige Tumor geht dabei in der Regel von einer einzigen transformierten Zelle aus (monoklonale Entwicklungstheorie). Die Adenom- Karzinom- Sequenz beschreibt dagegen die Entwicklung maligner Tumoren aus vorbestehenden primär benignen Tumoren, wie z. B. für das kolorektale Karzinom diskutiert.

Zahlreiche Gene wurden entdeckt, die durch Mutation so verändert sind, dass ihnen eine Beteiligung an der Tumorentstehung nachgewiesen werden konnte. Sie kodieren z.B. für Tu-

morsuppressorgene, Protoonkogene, Cytokine, Inhibitoren für Cyclin- abhängige Kinasen (CDKs) und andere Zellzyklusregulatoren.

Die Rolle von p16 als Tumorsuppressorgen wurde bereits an verschiedenen Tumorarten untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von p16 bösartige Tumoren zu induzieren vermag. Zu nennen sind das familiäre Melanom, bestimmte Ovarialkarzinome, Tumoren des Gastrointestinaltraktes und Glioblastome (Bogenrieder et al. 2001, Arap et al. 1997, Milde- Langosch et al. 2001). Die Rolle von p16 in Karzinomen im pleomorphen Adenom war bisher nur selten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen und stellt aufgrund der geringen Inzidenz des Tumors und der histologischen Komplexität eine Herausforderung dar. Um die Frage beantworten zu können, ob sich die Karzinome im pleomorphen Adenom direkt aus dem vorbestehenden gutartigen pleomorphen Adenom entwickeln oder eine zweites Tumorereignis vorliegt, wäre der Nachweis möglicher Indikatoren im vorbestehenden pleomorphen Adenom sehr hilfreich.

Somit soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nur untersucht werden, inwieweit bei den Karzinomen im pleomorphen Adenom p16 exprimiert wird, sondern auch, ob sich die p16 Expression in den Anteilen der Karzinome von der im Adenomanteil unterscheidet.

In einem zweiten Teil soll ebenfalls vergleichend zwischen Karzinom- und Adenomanteil nachgewiesen werden, ob der auf Protein- Ebene nachgewiesenen fehlenden p16- Expression oder einer p16-Überexpression Mutationen im p16- Gen zugrunde liegen.

Die Untersuchung sollen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Tumorgenese evtl. als Folge einer gestörten Regulation des Zellzyklus leisten.

1.2. Karzinome im pleomorphen Adenom - ein Modell zur Aufklärung der Ursachen für die Tumorentstehung?

Karzinome im pleomorphen Adenom sind seltene Tumore, die innerhalb eines pleomorphen Adenoms entstehen, das auf diese Weise „maligne entartet“.

Eine maligne Transformation innerhalb gutartiger Adenome ist auch von anderen Tumorarten bekannt und wird insbesondere beim kolorektalen Karzinom als Grundlage für ein Modell zur Karzinogenese angesehen (Adenom- Karzinom- Sequenz).

Untersuchungen zu den Mechanismen, die zur malignen Entartung in einem vorbestehenden Adenom führen können, sind insbesondere beim kolorektalen Karzinom Gegenstand vieler Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung vom Adenom zum Karzinom durch unterschiedliche genetische Veränderungen ausgelöst werden können, dazu gehören neben der Aktivierung des Ki-ras-Onkogens, APC- (5q)- Mutationen, DNA- Hypermethylierung am Chromosom 5, Deletionen auf dem Chromosom 18 und nicht zuletzt der Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens p53 (Chromosom 17p13) (Sahm & Caspary 2004).

Die Frage, ob die Karzinome im pleomorphen Adenom der Speicheldrüsen auch einer solchen Adenom- Karzinom- Sequenz folgen mit genetischen Veränderungen innerhalb eines vorbestehenden Adenoms, ist nicht hinreichend geklärt und soll Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen sein.

Es ist bekannt, dass bereits im pleomorphen Adenom genetische Alterationen vorliegen, so kennt man Veränderungen im pleomorphic adenoma gene 1 (PLAG-1), dem man eine Bedeutung beim Übergang eines pleomorphen Adenoms in ein Karzinom im pleomorphen Adenom zuschreibt (Martins et al. 2005).

Insbesondere die getrennte Untersuchung des Adenom- Karzinom- Anteils durch lasergestützte Mikrodisektion soll diese Frage klären, da beide Tumorkomponenten getrennt auf genetische Alterationen des p16- Gens untersucht werden können.

1.3. Tumore der Speicheldrüsen

Tumoren der Speicheldrüsen sind selten. Die Inzidenz beträgt weltweit 0.4 bis 6.5 Neuerkrankungen/100.000/J (Ellis et al.1996). 64 bis 80% der gutartigen epithelialen Tumoren entstehen in der Gl. parotis, 7 bis 11% in den submandibulären, ca. 1% in den sublingualen und 9 bis 23% in den kleinen Speicheldrüsen. Ebenso ist der Anteil der malignen Tumoren an der Gesamtheit der Tumoren unterschiedlich verteilt. In der Gl. Parotis ist der Anteil der malignen Tumoren mit ca. 20% am geringsten, wogegen 70 bis 90% der Tumoren der Gl.submandibularis maligne sind.

Am häufigsten treten Speicheldrüsentumore im höheren Lebensalter auf (6.bis 7. Lebensjahrzehnt). Das Durchschnittsalter liegt bei ca. 50 Jahren.

Obwohl die Ursachen der Entstehung maligner Speicheldrüsentumoren oft ungeklärt bleiben, sind eine Reihe von Risikofaktoren bekannt. Untersuchungen der Opfer der Atombombenexplosionen in Hiroshima und Nagasaki zeigten, dass ionisierende Strahlen zum vermehrten Auftreten von malignen Speicheldrüsentumoren führen (Rice et al. 1976). Auch Röntgenstrahlen in Zusammenhang mit medizinischen und zahnmedizinischen Untersuchungen sind mit einer erhöhten Inzidenz der Tumore verbunden (Rice et al.1976). Da Speicheldrüsen in der Lage sind, Jod zu konzentrieren, liegt auch bei Patienten, die sich einer Radiojodtherapie unterzogen haben, ein geringfügig erhöhtes Risiko vor.

1.3.1. Pleomorphes Adenom

Das pleomorphe Adenom ist der häufigste Speicheldrüsentumor. Er stellt 40-50% aller Speicheldrüseneschwülste dar (Wolf et al. 1997). Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer. Der Tumor hat seinen Altersgipfel im höheren Lebensalter (5.-6- Lebensjahrzehnt). Über 80% der pleomorphen Adenome entstehen in der Glandula parotis, nur 5% liegen in der Glandula submandibularis, 7% in den kleinen Speicheldrüsen des Gaumens. Extrakranielle Lokalisationen wie Haut der Extremitäten, des Stammes und des äußeren Genitales werden in der Literatur beschrieben. Obwohl es sich um einen gutartigen Tumor handelt, kann es in seltenen Fällen es zu einer Metastasierung kommen (Hoorweg et al. 1998, Goodisson et al. 1999).

Makroskopisch ist der Tumor in der Regel von einer Pseudokapsel umgeben und zeigt eine abwechselnde Konsistenz, die teils knorpelähnlich, teils weich sein kann. Meist ist der Tumor

lappenartig aufgebaut, gut abgrenzbar und hinsichtlich der Schnittfläche gelblich-weiß mit zystischen und hämorrhagischen Anteilen.

Histologisch zeigt das pleomorphe Adenom ebenfalls ein mannigfaltiges Bild mit epithelialen und mesenchymalen Anteilen. Die Epithelzellen können klein und dunkel, aber auch plasmatisch hell erscheinen. Die Zellen können strang- und netzförmig angeordnet sein. Oft kommen Plattenepithelinseln mit zentraler Verhornung vor. Das Stroma selbst besteht aus mukoiden, hyalinen, chondroiden, chondromyxomatösen und fibrösen Anteilen. Oft sind im Tumor auch Kalkablagerungen sowie knorpelartige Anteile und Fettgewebe zu finden.

Manche Autoren (Böcker, Heitz, Denk 1996) teilen das pleomorphe Adenom in stromareiche Adenome (30-80% Stroma- Anteil) und stromaarme Adenome (Stroma- Anteil < 30%) ein. Immunhistochemisch charakteristisch ist eine Expression von Zytokeratin, Vimentin, S-100 Protein, Aktin, Lysozym, Laktoferrin, Chymotrypsin und Glykosaminoglykanen (Böcker, Heitz, Denk 1996).

An der Entwicklung eines pleomorphen Adenoms sind auch Myoepithelzellen beteiligt, die sich teilweise zu spindelförmigen Stromazellen umwandeln.

Die klinischen Symptome eines pleomorphen Adenoms bestehen in einer meist einseitigen, schmerzlosen, derben oder knotigen, gut verschieblichen Vergrößerung der Speicheldrüse ohne Anzeichen für Malignität.

Die Therapie des pleomorphen Adenoms besteht in der vollständigen Entfernung mit einem Saum gesunden Gewebes, da sonst die Gefahr eines lokalen Rezidivs deutlich erhöht ist (Yasumoto et al. 1999). Da die meisten Tumoren in der Glandula parotis lokalisiert sind, ist die laterale Parotidektomie der häufigste Eingriff bei gutartigen Speicheldrüsentumoren. Dabei wird zunächst der Stamm des N. facialis aufgesucht und von dort ausgehend die Drüsenanteile lateral der Nervenäste exzidiert. In vielen Fällen kann so die Funktion des N. facialis erhalten werden.

Rezidive nach chirurgischer Behandlung treten in ca. 10% der Fälle auf, meist nach unvollständiger chirurgischer Entfernung des Tumors. Eine maligne Transformation in Form eines Karzinoms im pleomorphen Adenom ist selten und tritt etwa in 5% der Fälle nach langjährigem Bestehen des pleomorphen Adenoms auf. Klinische Anzeichen für einen malignen Tumor sind: schnelles Wachstum (Wochen bis Monate) eines schmerzhaften, nicht verschieblichen Knotens mit Zeichen der Tumordinfiltration in Muskeln, Haut oder Nerven (Fazialisparese) sowie Lymphknotenvergrößerungen.

1.3.2. Karzinom im pleomorphen Adenom

Die Karzinomentstehung im pleomorphen Adenom ist ein seltenes Ereignis, lediglich ca. 4% aller Speicheldrüsentumore und 12.0% aller malignen Speicheldrüsentumore sind Karzinome im pleomorphen Adenom (Olsen et al. 2001). Der bösartige Tumor geht vom epithelialen Anteil der Speicheldrüse aus und entwickelt sich innerhalb eines gutartigen pleomorphen Adenoms, das meist schon jahrelang persistiert. Nur ca. 6% aller pleomorphen Adenome enthalten ein Karzinom. Der Tumor entsteht meist im höheren Lebensalter und kommt bei Frauen etwas häufiger vor als bei Männern. Zum Zeitpunkt der Diagnose ist das häufigste Symptom eine schnell größer werdende Geschwulst im Gesicht-Nackebereich. Einige Patienten geben starke Schmerzen an. Rund ein Drittel der Betroffenen entwickelt eine Fazialisparese mit charakteristischen Ausfällen der mimischen Gesichtsmuskulatur. Andere Symptome sind schmerzlose Vergrößerungen der Lymphknoten im Kopf-Hals-Bereich, Hautulzerationen durch die schnell größer werdenden Tumormassen. In einigen Fällen werden Schluckbeschwerden beschrieben (Becelli et al. 1999).

Das Karzinom im pleomorphen Adenom entwickelt sich meist in der Glandula parotis (86%) und in der Glandula submandibularis (12%).

Das kapselübergreifend wachsende Karzinom im pleomorphen Adenom ist ein hochaggressiver Tumor mit einer schlechten Prognose. Makroskopisch imponiert der Tumor als weißlich-graue Tumormasse mit hämorrhagischen Anteilen, Nekrosen und zentralen zystischen Degenerationen.

Der Karzinomanteil kann in vielfältiger histologischer Differenzierung sowohl als Epidermoidkarzinom, adenoid- zystisches Karzinom, Speichelgangkarzinom, Basalzelladenokarzinom, Adenokarzinom, Mukoepidermoid- Karzinom, adenosquamöses Karzinom als auch myoepitheliales Karzinom vorkommen. Oft ist es schwierig, den Tumor histologisch zu klassifizieren oder eindeutig den Karzinomanteil vom pleomorphen Adenom abzugrenzen.

1.4. Das Tumorsuppressorgen p16 – Beteiligung an der Tumorgenese in malignen Tumoren?

Die Erforschung von Genen, die für Proteine kodieren, die an der Regulation des Zellzyklus und damit der Proliferation beteiligt sind, haben in den letzten Jahren zu neuen Erkenntnissen in Bezug auf den Mechanismus beigetragen, der der Regulation des Zellzyklus zugrunde liegt. Hier sind von besonderer Bedeutung Tumorsuppressorproteine, Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen. (Hinds et al. 1994, Bishop et al. 1991, Kamb 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Tumorsuppressorprotein p16 durchgeführt. Das entsprechende p16-Tumorsuppressorgen besteht aus 2 Exons und ist auf Chromosom 9 lokalisiert.

Die zentrale Aufgabe des Tumorsuppressorproteins p16 besteht in der Kontrolle des Zellwachstums durch Bindung an die Cyclin-abhängige Kinase Cdk4/6. P16 ist ein Prototyp der Familie der Cdk-Inhibitoren, zu der auch p15, p18 und p19 gehören. Wirksam werden diese Tumorsuppressorgene, indem sie die Assoziation von Cyclin D an Cdk4/6 blockieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Cdk4-Bindungsstellen in Zellen mit hohem endogenem p16-Level fast ausschließlich mit p16 besetzt sind anstelle von CyclinD (Shapiro et al. 1996).

P16 und p19 bestehen aus vier bzw. sechs Ankyrin-Repeats. P16 bindet gegenüber der Bindungsstelle für Cyclin-D an die Cdk4/6. Während der Bindung kommt es zu Interaktionen mit dem aminoterminalen Ende (Beta-Faltblatt-reich) und dem carboxyterminalen Ende (Alpha-Helix-reich). Die Bindungen erfolgen über Wasserstoffbrücken. Die Cdk6, an die p16 gebunden hat, wird dadurch inaktiviert, da das Cyclin nicht mehr binden kann. Somit kann die für die Aktivierung notwendige Phosphorylierung nicht erfolgen. Cyclin-Bindung und Phosphorylierung bewirken bei der Cdk eine aktivierende Konformationsänderung in zwei regulative Elemente der Kinase. Demgegenüber führt die Bindung von p16 an die Cdk führt nicht zu einer aktivierenden Konformationsänderung. Die Bindung von p16 bewirkt, daß die N- und C-Loops der Cdk6 räumlich voneinander getrennt werden, und das katalytische Zentrum der Cdk blockiert wird (Russo et al. 1998).

Bei einigen Tumoren sind diejenigen Aminosäuren durch Mutationen verändert, die an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Die Mutationen im p16-Gen, die die Cdk6-Aktivierung verhindern, wurden in den Positionen Asp 74, Asp 84, Arg 87 (Russo et al. 1998) gefunden. Korrespondierende Mutationen im Cdk6-Gen wurden u.a. beim familiären Melanom in der Position Arg 24 beschrieben (Bogenrieder et al. 1995). Bei anderen Mutationen

im p16-Gen ist die Bindungsdomäne der T-Schleife betroffen. Und zwar Glu 26 und Asp 92, die an Wasserstoffbrücken-Bindungen mit dem C- Loop von Cdk6 beteiligt sind.

Daneben wurden beim Karzinom im pleomorphen Adenom auch Deletionen im Bereich des Chromosoms 5(q22-23, q32-33) mit daraus folgender Deletion/Amplifikation der HMGIC und MDM2 Gene beschrieben (El Naggar et al.1998, Jin et al. 2001). Weiter sind genetische Alterationen im Bereich 8q12 und 12q13-15 bekannt mit Translokationen unter Beteiligung der Gene HMGIC und MDM2 (Rao et al. 1998). 40% der untersuchten Tumore zeigten cytogenetisch eine Amplifikation.

Mikrosatellitenanalysen bei Karzinomen im pleomorphen Adenom zeigten LOHs im Bereich von Chromosom 8q und 17p. Separate Analysen der beiden Tumoranteile, pleomorpher Adenom- und Karzinomanteil zeigten beide Alterationen in den Bereichen 8q und/oder 12q und zusätzlich nur im Karzinomanteil Alterationen im Bereich 17p (El Naggar et al., 2000). Einer, der untersuchten Tumoren zeigte eine homozygote Deletion im p16-Gen (Suzuki et al., 1998)

1.5. Fragestellung und Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Expression des p16- Tumorsuppressorgens in Karzinomen im pleomorphen Adenom der Speicheldrüsen durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, inwieweit Veränderungen der p16-Expression an der Entstehung von Karzinomen innerhalb von pleomorphen Adenomen beteiligt sind. Hierzu wurden vergleichend pleomorphe Adenome und verschiedene Karzinome der Speicheldrüsen in die Studie mit einbezogen.

In einem weiteren Schritt sollte die Ursache für Veränderungen in der p16-Expression geklärt werden. Methodisch wurden für die Untersuchungen neben der Immunhistochemie zum Nachweis der p16-Expression, PCR-Verfahren mit anschließender SSCP-Analyse an mikrodissezierten Gewebeproben zum Nachweis von Mutationen im p16-Gen eingesetzt.

Im Detail sollten folgende Fragen anhand der Untersuchungsergebnisse beantwortet werden:

- (1) Existieren Unterschiede in der p16- Expression zwischen pleomorphen Adenomen, Karzinomen und Karzinomen im pleomorphen Adenom?
- (2) Existieren Unterschiede in der p16-Expression bei histologisch unterschiedlichen Karzinomen im pleomorphen Adenom?
- (3) Liegen bei fehlender p16-Expression oder p16-Überexpression Genmutationen im Tumorsuppressorgen p16 vor, die eine Fehlfunktion des Genproduktes zur Folge haben kann?
- (4) Sind etwaige Genmutationen im Karzinomanteil mit denen im pleomorphen Adenom identisch?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Untersuchungsgut

Die in dieser immunhistochemischen und molekulargenetischen Untersuchung verwendeten Proben bestanden aus in Paraffin eingebettetem Gewebe. Die Karzinome im pleomorphen Adenom, die Karzinome und die pleomorphen Adenome stammten von 48 Patienten im Alter von 27 bis 80 Jahren. Das Material war aus verschiedenen deutschen Kliniken zur histologischen Beurteilung an das Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf (UKE) eingesandt worden und wurde in das Hamburger Speicheldrüsenregister aufgenommen.

Die histologische Einordnung des Materials ist in Tabelle 1 abgebildet. Analysiert wurden 37 Karzinome im pleomorphen Adenom, 6 Karzinome, 4 pleomorphe Adenome. Histologisch handelt es sich bei den Karzinomen im pleomorphen Adenom in 10 Fällen um ein myoepitheliales Karzinom, in 4 Fällen um adenoidzystische Tumoren, in 1 Fall um ein Basalzellenadenokarzinom, in einem Fall um ein 1 Speichelgangskarzinom, in 3 Fällen um Mukoepidermoidkarzinome, in 4 Fällen um Adenokarzinome, in 1 Fall um ein Epidermoidkarzinom, in 1 Fall um ein epithelial- myoepitheliales Karzinom, in 1 Fall um ein Basalzellenadenokarzinom, in 2 Fällen um adenosquamöse Karzinome und in 7 Fällen um unklassifizierte Karzinome.

Die Vergleichsgruppe der Karzinome bestand aus 2 Mukoepidermoidkarzinomen und 4 Azinuszellkarzinome.

Die Stadieneinteilung der Karzinome erfolgte nach der TNM- Klassifikation für maligne Speicheldrüsentumoren.

Tabelle I: Untersuchungsgut mit histologischer Klassifikation. Karzinome im pleomorphen Adenom

Fall	Lokalisation	Diagnose	Alter	Geschlecht
1	Gl.parotis	Hochdifferenziertes Adenokarzinom	74	w
2	Gl.parotis	Schleimbildendes Adenokarzinom	37	w
3	Gl. Parotis	Mukoepidermoidkarzinom	72	w
4	Gl submandibu-	Epithelial- myoepitheliae und ade-	64	w

	laris	noidzystische Anteile		
5	Gl. Parotis	Schleimbildendes Adenokarzinom und Differenzierung eines Speicheldrüsenkarzinoms	63	w
6	Gl. Parotis	Hochdifferenziertes Mukoepitheloidkarzinom und Differenzierung eines Speicheldrüsenkarzinoms	47	m
7	Gl. Parotis	Epitheloidkarzinom	80	w
8	Gl. Parotis	Nicht- invasives Karzinom	42	m
9	Gl. Parotis	Myoepitheliales Karzinom	30	w
10	Gl. Parotis	Myoepitheliales Karzinom	67	m
11	Gl. Submandibularis	Mukoepitheloidkarzinom	52	w
12	Gl. Submandibularis	Nicht klassifizierbar, Anteile eines Riesenzelltumors	70	m
13	Gaumen	Adenoid- zystisches Karzinom	69	m
14	Gl. parotis	Myoepitheliales Karzinom	71	m
15	Gaumen	Myoepitheliales Karzinom	69	m
16	Gl. parotis	Multifokales Rezidiv eines stromareichen pleomorphen Adenoms	27	m
17	Gl. parotis	Myoepitheliales Karzinom	69	w
18	Gl. parotis	Myoepitheliales Karzinom	57	w
19	Gl. parotis	Myoepitheliales Karzinom	32	m
20	Gl. parotis	Myoepitheliales Karzinom. Rezidiv	57	m
21	Oberlippe	Basalzellenkarzinom	73	m
22	Gl. parotis	Adenokarzinom	66	w
23	Gl. parotis	Invasives Karzinom in einem multifokal wachsenden pleomorphen Adenom	63	m
24	Gl. parotis	Adenoidzystisches Karzinom	50	w
25	Gl. parotis	Adenosquamöses Karzinom	70	w
26	Gl. submandibularis	Infiltrativ wachsendes Karzinom. Nicht klassifizierbar	69	w
27	Fossa	Infiltrativ wachsender Tumor. Nicht klassifizierbar	54	m
28	Gl. parotis	Mukoepitheloidkarzinom	66	w
29	Gl. parotis	Adenosquamöses Karzinom	76	w
30	Gl. parotis	Invasives Karzinom. Nicht klassifizierbar	53	w
31	Gl. parotis	Adenoid-zystisches Karzinom	37	w
32	Gl. parotis	Myoepitheliales Karzinom	63	w
33	Gl. parotis	Invasives Karzinom. Nicht klassifizierbar	48	m
34	G. parotis	Nicht klassifizierbar	66	w
35	Gl. submandibularis	Adenoid- zystisches Karzinom	58	m
36	Gl. parotis	Epithelial- myoepitheliale Differenzierung	43	w
37	Gl. submandibularis	Invasives Karzinom. Nicht klassifizierbar	66	w

--	--	--	--	--

Tabelle II: Vergleichsgruppe Karzinome

1	Gl. parotis	Mukoepidermoidkarzinom	68	w
2				
3	Gl. parotis	Azinuszellkarzinom	39	m
4	Gl. parotis	Azinuszellkarzinom.	31	w
5	Gl. parotis	Azinuszellkarzinom	38	m
6	Gl. Submandibularis	Mukoepidermoidkarzinom	61	m
7	Gl. parotis	Azinuszellkarzinom	47	m

Tabelle III: Vergleichsgruppe pleomorphe Adenome

1	Gl. parotis	Pleomorphes Adenom	45	m
2	Gl. parotis	Pleomorphes Adenom	43	w
3	Gl. parotis	Pleomorphes Adenom	29	m
4	Gl. parotis	Pleomorphes Adenom	44	m

2.1.2. Verwendete Kontrollzelllinien

1. Exon 1: Kontrolle für p16: DNA- Extrakt aus der Zelllinie Capan –2 (6bp- Insertion, Caldas et.al. 94)

2. Exon 2a: Kontrolle für p16: DNA- Extrakt aus Ovarialkarzinomen Nr. 31,103,25

3. Exon 2b: Kontrolle für p16: DNA- Extrakt aus Ovarialkarzinomen Nr. 66,69,12

2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterial

PTC-100 TM Thermal controller	Watertown, Mass. USA
Eppendorf Thermomix 5436	<i>Wilke und Witzel</i> , Hamburg Eppendorf
Leica Histoslide	<i>Leica</i> , Nussloch
TRIO Heated Lid	<i>Biometra</i> , biomech. Analytik Göttingen
TGGE - Kammer	<i>Diagen</i> , Hilden
Spannungsgerät Phero- stab. 500 Y2K	<i>BioTec Fischer</i> , Reiskirchen
GFL	Burgwedel
Vibrofix VF 1	<i>Jahnka und Kunkel</i> , IKA
	Labortechnik, Staufen
Shaker	<i>Heidolph</i> , REAX 2000, W.- Germany
Biofuge fresco	<i>Heraeus instruments</i>
Magnetrührer IKAMAG RET-GS	<i>Jahnka und Kunkel</i> , Staufen
Biometra Agagel mini Elektrophorese- Kammer	<i>Biometra GmbH</i> , Göttingen
UV- Transilluminator	<i>Spectrolin</i> e, Deutschland
Polaroid MP-4 Land Camera	<i>Polaroid Corporation</i> , Offenbach
Polaroid 665 Instant Pack Film	<i>Polaroid Corporation</i> , Offenbach
Palm robot Laser Mikroskop	<i>Palm</i> , München

2.1.4. Chemikalien

Agarose

APS 4%

Ampliwax Kügelchen

Aqua dest.

Aqua bidest.

BigDye Reaktionslösung

Citratpuffer, pH 6.0 200ml H₂O

DAB- Kit:	DAB- Lösung
	Lösung A
	Lösung B

DNTP- Mix 2mM ((MBI)

DMSO

Eiswasser

Ethanol 100%, 96%, 80%, 70%,

Glycerin

H₂O₂ 30 %

Horse- Serum 2%

Isopropanol 75%

Kaninchen Anti- Mouse IgG 1:800 in PBS und Horse- Serum.

Phar Mingen international

Lastpuffer

MDE (2x) Acrylamid

Methanol

Molekulargewichtsmarker V

MOPS (1x)

Na- Acetat (pH 5.2) 3M

Nucleo Spin Kit C&T

Lösungen und Enzyme:

Buffer T1

Buffer B1-B5

Elution Buffer BE

Proteinase K

Vorbereitung für Buffer B3: Buffer B2 wird für 5 min. bei 70°C im Wasserbad vorgeheizt.

Buffer B2 und Buffer B1 werden dann im Verhältnis 1:4 gemischt.

PBS Puffer (1x)

PCR Puffer (MBI)

Puffer A 200ml 100% Ethanol
 10ml 100% Eisessig
 ad 2l steriles Aqua dest.

Puffer B 1g Silbernitrat (AgNO₃)
 Ad 1l steriles Aqua dest.

Puffer C 4.5g NaOH
 Etwas steriles Aqua dest. zum Lösen
 0.03g NaBH₄
 1.2ml Formaldehydlösung
 ad 300ml steriles Aqua dest.

Puffer D 15g NaCO₃
 Ad 2l steriles Aqua dest.

Puffer J (10x):

 600mM Tris. HCL, pH 9.5
 150mM (NH₄)₂SO₄
 20mM Mg Cl₂

Purified Mouse Anti- Human p16

 Clone G175- 405

 Mouse IgG1

 0.1mg Antikörper in 10 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7.2

 PharMingen International

Purified Mouse Anti Ki-67

 PharMingen international

Sybr Gold

Stop- Lösung:

 95% Formamid

 20mM EDTA

 0.05% Bromphenolblau

 0.05% Xylen- Cyanol

Taq Polymerase 5000U/ml, Appligene

TBE (10x):

108g Tris- Base

55g Borsäure

40ml 0.5 M EDTA pH 8.0

Aqua dest. Ad 1000ml

TEMED

Vectastatin- Kit

PharMingen international

2.1.5. Oligonukleotide

2.1.2.1. Verwendete Primer für die SSCP- Analyse

Exon 1

E1- F: 5'- (GC40)AAgAAAgAggAggggcTg-3'
E1- R: 5'- gcgcTAccTgATTccAATTc- 3'

Exon 2a

E2-F1: 5'- (gc40)AgCTTCCTTTCCgTCATgC-3'
E2- R1: 5'- CAAggTCCACgggCAgt-3'

Exon 2b

E2- F2: 5'- Cg(40)TggACgTgCgCgATgC-3'
E2- R2: 5'TCTgAgCttTggAAgCTCTC-3'

2.1.2.2. Verwendete Primer für die Sequenzanalyse

Exon 1

E1- F: 5'-gTcAccAgAgggTggggcggA-3'
E1- R: 5'-cTgcAAAcTTcgTccTccAg-3'

Exon 2a

E2- F1: 5'-cTggcTcTgAccATTcTg-3'
E2- R1:5'-cccAggcATcgcgAcgTC-3'

Exon 2b

E2- F2: 5'-TgccTggggccgTcTgcc-3'
E2- R2: 5'-cAgggTAcAAATTcTcAg-3'

2.2.Methoden

2.2.1.Immunhistochemie

Immunhistochemie (ICH) bezeichnet verschiedene Techniken, die zur Darstellung von Zell- und Gewebe- spezifischen Antigenen (meist Proteine) verwendet werden, indem diese mit Hilfe von Antikörpern in situ markiert und visualisiert werden. Durch den spezifischen Nachweis von Proteinen erlaubt IHC die Darstellung von Zellen mit gleichen funktionellen Eigenschaften oder Zellen mit gleicher Histogenese. Immunhistochemische Techniken beruhen auf dem Prinzip der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das darzustellende Antigen und der anschließenden Sichtbarmachung des gebundenen Antikörpers. Zur Sichtbarmachung kommen in Frage direkte oder indirekte Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, Markierung mit einem Enzym (Peroxidase, Alkalische Phosphatase) oder indirekte Markierung mit Goldpartikeln für die Elektronenmikroskopie.

Die immunhistologische Nachweisbarkeit von Konzentrationen an Tumorsuppressor- Wildtypproteinen ist durch die kurze Halbwertszeit von Tumorsuppressor- Genprodukten normalerweise begrenzt. Der Nachweis des Proteins durch Immunhistologie ist daher oft mit Faktoren gekoppelt, die den natürlichen Abbauprozess des Proteins verhindern, wie z.B. Mutationen im Tumorsuppressorgen selbst oder in den abbauenden Enzymen, Anwesenheit bestimmter stabilisierender Proteine oder viraler Antigene, die eine Mutation des Tumorsuppressors oder eine Veränderung des Metabolismus, in den ein Tumorsuppressor eingebunden ist, bewirken können

2.2.1.1. Nachweis von Ki 67 mittels DAB

Die Paraffinblöcke wurden mit dem Handmikrotom ca. 4µm dick geschnitten und auf Frost-Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet und dann bei 60°C 30min. grob deparaffiniert. Die Schnitte wurden daraufhin einer Methanolblockade unterzogen. Dazu wurden 400ml Methanol mit 10ml 30% H₂O₂ versetzt, gemischt und in ein Glasgefäß eingebracht, in das die Gewebeschnitte hineingestellt wurden, so dass das Gewebe vollständig mit dem Methanol- Peroxid- Gemisch bedeckt war. Die Schnitte wurden 30min. bei Raumtemperatur in der Blockadeflüssigkeit stehen gelassen und danach mit H₂O gespült. Es schloss sich eine 15-minütige Mikrowellenbehandlung in Citratpuffer und eine anschließende Abkühlung durch fließendes Wasser von außen an. Die Schnitte wurden aus dem abgekühlten Citratpuffer genommen und 3x3min. in 1x PBS gespült und in eine feuchte Kammer eingebracht und 20 min. in einem Gemisch aus PBS und Horse- Serum geblockt. Dazu wurden auf 1ml PBS 20µl Horse- Serum gegeben, kurz gemischt und auf die in der feuchten Kammer liegenden Objektträger aufgetropft und mit einer sterilen Pipette gleichmäßig auf dem Gewebe verteilt. In einem vorgefertigten BSA/PBS- Gemisch wurde der monoklonale Ki 67- Antikörper im Verhältnis 1:200 verdünnt und die damit überschichteten Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Präparate wurden dann 3x3min. in PBS gespült und mit dem Kaninchen- Anti- Mouse- Antikörper , der im Verhältnis 1:200 in PBS verdünnt wurde, inkubiert. Die Schnitte wurden abermals 3x3min. in PBS gespült. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Tertiärantikörper, wobei 1ml PBS mit je 10µl Lösung A bzw. Lösung B vermischt wurden und auf die Objektträger aufgebracht wurde. Danach wurde wieder 3x3min. in PBS gespült und mit dem DAB- Kit die Farbreaktion vorbereitet. Auf 5ml Aqua dest. wurden aus dem Kit 2 Tropfen Buffer, 4 Tropfen DAB und ein Tropfen Peroxid gegeben, gemischt und wieder 30min. bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Präparate gegeben und gleichmäßig verteilt. Nach ca. 15 min. Inkubation konnten die Schnitte in H₂O gespült und kurz mit Hämalaun gegengefärbt werden. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde das H₂O aus dem Gewebe entfernt. Anschließend wurden die Schnitte in Xylol eingedekelt.

2.2.1.2. Nachweis von p16 mittels DAB

Von den Paraffinblöcken wurden für den immunhistochemischen Nachweis von p16 ca. 4µm dicke Schnitte angefertigt und im Wasserbad auf beschichtete Objektträger (Super Frost) aufgezogen. Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte bei 60°C für 30min. im Wärmeschrank inkubiert. Danach erfolgte die Deparaffinierung in 2x 10min. Xylol und die Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe. Für die folgende Blockade der endogenen Peroxidase wurden 3.5ml 30% H₂O₂ in ein Gefäß gegeben und auf 100ml mit 100% Ethanol aufgefüllt. Die Objektträger wurden so in das Gefäß gestellt, dass das Gewebe vollständig bedeckt war. Die Präparate wurden 30min. bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend in Aqua dest. und 3x 3min. in PBS gespült. Zur Demarkierung der Antigene wurden die Schnitte dann in Citratpuffer 15 min. in der Mikrowelle gekocht. Es folgte eine schonende Abkühlung der Schnitte im Citratpuffer durch fließendes Wasser von außen. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte aus dem Citratpuffer genommen und 3x 3min. in PBS gespült. Die Objektträger wurden in eine feuchte Kammer eingebracht und 15min. in PBS mit 2% Horse- Serum inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach der Inkubation wurde das aufgetropfte „Blocking“- Gemisch von den Objektträgern abgegossen und Reste an den Rändern der Objektträger mit einem Tuch vorsichtig abgetupft, ohne dabei das Gewebe zu berühren. Die Schnitte wurden dann mit dem Primärantikörper, der in einer Verdünnung von 1:800 in PBS und mit 2% Horse- Serum angesetzt wurde, bedeckt. Die feuchte Kammer mit den Schnitten wurde mit einem Deckel verschlossen und über Nacht zur Inkubation bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 3x3min. in PBS gespült und dann 30min. mit Sekundärantikörper Kaninchen- anti-Maus Ig, angesetzt in einer Verdünnung von 1:800 in PBS und Horse- Serum. Die Schnitte wurden 30min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann wiederum 3x 3min. in PBS gespült. Die Detektion des Antigens erfolgte mit dem Vectastatin- Kit: PBS wurde im Verhältnis von je 1:1000 mit der Lösung A und B vermischt, auf die Schnitte aufgetropft und 35min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte eine Spülung 3x 3min. in PBS. Für die Farbreaktion wurde der DAB- Kit verwendet: In 5ml Aqua dest. wurde 1 Tropfen Puffer gegeben, gemischt, und mit 4 Tropfen DAB- Lösung versetzt. Nach nochmaligem Mischen wurden 2 Tropfen H₂O₂ dazugegeben, wiederum wird kurz gemischt. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur ca. 20min. stehen gelassen, bis sich der Farbstoff komplexiert hat und dann behutsam auf die Schnitte aufgetropft. Nach ca. 15min. Inkubation war das Reaktionsprodukt

sichtbar. Die Schnitte wurden in H₂O gespült und 10s mit Hämalaun gegengefärbt. Das H₂O wurde über eine aufsteigende Alkoholreihe entfernt (80%, 96%, 100%) und die Schnitte wurden mit Xylol eingedeckelt.

2.2.1.3. Qualitative und semiquantitative Auswertung

Durch eine mikroskopische Auswertung des immunhistologisch dargestellten Proteins war es möglich, den Anteil p16- exprimierender Zellen in den einzelnen Gewebeabschnitten einzustufen sowie über die Färbeintensität eine semi- quantitative Einschätzung vorzunehmen.

Cytoplasmatische Färbung

- keine Färbung
- + schwache Färbung
- ++ mittelstarke Färbung
- +++ starke Färbung

intranukleäre Färbung

- kein positiver Zellkern
- + bis zu 25% positive Zellkerne
- ++ 26- 50% positive Zellkerne
- +++ 50- 100% positive Zellkerne

Die Schnitte wurden mikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde bei 400-facher Vergrößerung ein Areal mit hohem Anteil Ki-67 positiver Zellen aufgesucht und pro Präparat 1000 Zellen ausgezählt. Der Anteil positiver Zellen wurde in Prozent angegeben.

2.2.2.Mutationsanalyse

2.2.2.1. Lasergesteuerte Mikrodissektion

Die Heterogenität des zu untersuchenden Gewebes mit einer Mischung von verschiedenen Zellpopulationen des Karzinomanteils und des pleomorphen Adenoms, die teilweise schwer voneinander abgrenzbar sind, kann das Ergebnis und die Interpretation von molekularpathologischen Untersuchungen beeinflussen. Seit einigen Jahren wird die Technik der lasergesteuerten Mikrodissektion von Paraffinmaterial und zytologischen Präparaten für die Isolierung von homogenen, morphologisch identischen Zellpopulationen angewendet, um dieses Problem zu umgehen.

Bei diesem Verfahren werden unter optischer Kontrolle einzelne Zellen und Zellpopulationen durch ein Laser- Pressure- Catapulting System aus heterogenem Gewebe isoliert. Zur Mikrodissektion von Zellarealen und einzelnen Zellen wurde im Zuge dieser Doktorarbeit auf das PALM MicroBeam System der Firma P.A.L.M. Microlaser Technologies zurückgegriffen. Gegenüber älteren Verfahren mit einer Nadel zeigt dieses System viele Vorteile. Durch einen gepulsten Stickstofflaser (Wellenlänge 337nm, UV-a) erfolgt eine berührungslose Mikrodissektion mit anschließender Überführung des Probenmaterials in ein Reaktionsgefäß. Durch eine computergesteuerte Software ist die Bedienung der gesamten Arbeitseinheit vereinfacht und wenig zeitintensiv. Das Prinzip der Laser- Mikrodissektion mit einem gepulsten UV-a-Laser basiert auf der sog. Kalten Ablation, bei der aufgrund von Photonendichte im Laserfokus biologisches Material in einzelne Atome und Moleküle zerlegt wird. Durch diesen photo-lytischen Prozess wird das angrenzende Material nicht beeinträchtigt, da eine Erhitzung so vermieden wird. Auch eine Beschädigung der DNA durch kurzwellige UV- Strahlung ist ausgeschlossen.

Mit einem gepulsten UVA- Laser (337 nm) kann man im Gewebe Schnittbreiten von weniger als 1 µm erzielen. Dazu wird das Gewebe zunächst mit einem Mikrotom oder Kryotom in ca. 5 µm dünne Sektionen geschnitten und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Schnitte können dann mit den in der Histologie üblichen Färbemethoden weiterbehandelt werden und auch immunhistochemisch gefärbt werden, um dem Untersucher die Identifikation unter dem Mikroskop zu erleichtern. Unter Sicht kann auf Knopfdruck ein gepulster Laserstrahl ausgelöst werden, mit dem der Untersucher die ausgewählte Zelle oder Zellareale umfahren kann und sie damit von dem umgebenden Gewebe trennt. Bei diesem ablativen Photodekompensa-

tionsprozess wird keine Wärme frei, die eine schädigende Wirkung auf die so entnommenen Zellen haben könnte. Es ist gewährleistet, dass es zu keiner negativen Veränderung der genetischen und molekulargenetischen Information der Moleküle kommen kann. Nach dem Schneideprozess werden die Zellen mit einem Laserkatapult in ein kleines Sammelgefäß katapultiert. Zur weiteren Analyse werden die Zellen lysiert und mit entsprechenden Puffersystemen RNA, DNA oder Proteine aus ihnen herausgelöst. Gleichzeitig kann nicht gewünschtes Material vor dem Katapultvorgang gezielt entfernt werden, so dass auch in einem homogenen Gewebe nur die ausgewählten Zellen oder Gewebestrukturen in ein Sammelgefäß katapultiert werden können.

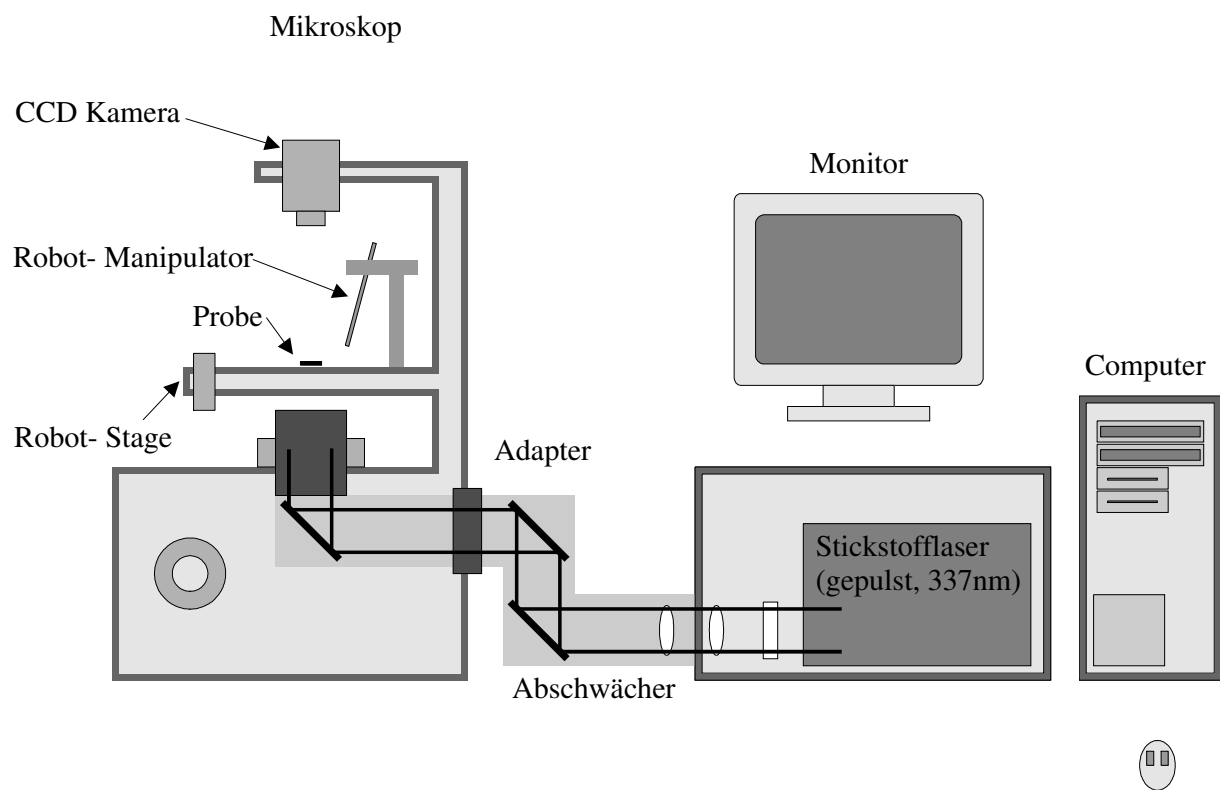


Abb.I: Schematische Darstellung des Mikrodisektions- Mikroskopes

2.2.2.1.1. Vorbereitung der Objektträger und Aufziehen der Folien

Neben der Verwendung fertiger speziell beschichteter Objektträger können handelsübliche Objektträger verwendet werden, die von Hand mit einer adhäsiven Spezialfolie beschichtet werden, die gewährleistet, dass sich das zu untersuchende Material mit dem Untergrund verbindet und sich durch die Laserimpulse vom Untergrund wegkatapultieren lässt.

Die Objektträger werden dazu zunächst in 70%-iges Ethanol getaucht. Die zu geschnittene Folie wird dann auf die mit Ethanol befeuchteten Objektträger gelegt und leicht angedrückt. Nach Trocknung wird die Oberfläche ein dünner Film Poly- Lysin (0.1% w/v, *Sigma P8920*) gegeben, der die hydrophoben Eigenschaften der Membran aufheben soll. Nach einer Trocknungszeit von 30 Min. können die ca. 5mm dicken Paraffinschnitte aufgezogen werden. Alternativ zur Behandlung mit Poly- L- Lysin kann eine UV- Bestrahlung bei 254nm über 30Min. durchgeführt werden, die einen ähnlichen Effekt erzielt. Auch eine Kombination beider Behandlungen kann durchgeführt werden und hat sich bei bestimmten Geweben, wie z.B. ZNS als erfolgreich erwiesen.

Nach dem Aufziehen der Schnitte werden diese über Nacht bei 37-40°C getrocknet.

Die Schnitte werden dann nach folgendem Schema deparaffiniert: Xylol 2 Min., Ethanol abs. 2 Min., Ethanol 96% 2 Min., Ethanol 70% 2 Min. , Spülen mit H₂O. Folgende Färbungen werden empfohlen: Hämatoxylin 1 Min., Methylgrün 10 s., Toluidin- Blau 10 s. In diesem Fall wurde die Methylgrün- Färbung angewendet.

Fixierung der Schnitte: Ethanol 96% 1 Min.-Wiederholung, Ethanol abs. 1 Min., danach Trocknung der Objektträger für 30 Min. bei 37°C.

2.2.2.1.2. Materialgewinnung

10ml T1- Lösung wurden in das über dem Objektisch lokalisierte Mikrokatapult eingebracht. Der Objektträger mit den aufgezogenen Gewebeschnitten wurde darunter auf dem Objektisch platziert. Bei kleiner Vergrößerungsstufe wurde der Bereich aufgesucht, aus dem Gewebe entnommen werden soll. Erst dann wurde das Manipulationsobjektiv in den Strahlengang gedreht. Mit der linken Maustaste konnte nun bei eingeschaltetem Laser das gewünschte Areal umfahren und ausgeschnitten werden. Nach dem Schneideprozess wurde das umfahrene Gewebe mittig justiert, scharf gestellt und mit einem durch die Fußbedienung ausgelösten Laserimpuls in das wenige mm darüber befindliche Sammelgefäß katapultiert. Durch Ad-

häsionskräfte verbleibt die Gewebeprobe in der Lösung. Auf diese Weise konnten pro Fall etwa 20-30 Zellareale von ca. 10µm Durchmesser gewonnen werden.

2.2.2.1.3. DNA- Extraktion

Die Herauslösung der DNA aus dem mikrodisezierten Gewebe erfolgte mit dem Nucleo Spin Kit C&T der Firma Machery- Nagel.

Statt 150 ml T1- Lösung wurde in Relation zur geringeren Menge an Probe 60ml genommen. Beim Dissezieren wurden 10 ml dieser Lösung in das Mikrokatapult gefüllt, nach 2h dissezieren wurden 10ml aufgefüllt, um die in dieser Zeit verdampfte Menge zu erneuern. Am Ende des Dissezierens wurden die restlichen 40ml dazugegeben. Hinzugefügt wurden dann 8.4ml Proteinase K und 70ml Buffer BE. Das Gemisch wird dann für 10 Min. bei 70°C im Wasserbad inkubiert. 210ml Ethanol werden hinzugefügt, der Tube wird dann in den 2ml- Zentrifugen- Tube platziert und 1 Min. bei 6000rpm zentrifugiert. 500ml Buffer B5 wird hinzugefügt, 1Min. bei 6000rpm zentrifugiert. Wiederholung dieses Schrittes und nochmaliges Zentrifugieren. Der Tube wird in ein 1.5ml- Eppendorf –Tube platziert. Die DNA wird mit 100ml 70°C vorgeheiztem Buffer BE ausgewaschen.

Als Alternative können 30ml Proteinase K direkt in das Auffanggefäß des Mikrokatapultes gefüllt werden. Nach dem Dissezieren der Proben wird das Gewebe über Nacht bei 37°C mit der Proteinase K inkubiert. Danach kurz Abzentrifugieren und Erhitzen für 10Min. auf 98°C, um die Proteinase K zu deaktivieren, die sonst die PCR beeinflussen könnte. Abkühlung auf 20°C. Die so vorbereitete Probe kann dann direkt für die PCR eingesetzt werden.

2.2.2.2. Amplifikation der DNA mittels PCR

Die PCR wurde Anfang der 1980er Jahre von Mullis erfunden und gehört inzwischen in jedem medizinischen und biologischen Forschungslabor zu den Standardmethoden. Vorteil der PCR ist, dass zur Amplifikation der DNA sehr wenig Ausgangsmaterial benötigt wird, im Prinzip ist ein einziger Strang ausreichend.

DNS- Polymerase kommt in allen Lebewesen vor und dient der Verdoppelung der DNS vor der Zellteilung. Sie bindet an einen einzelnen DNS- Strang und erzeugt dazu einen komplementären Strang. Verwendet wird DNS- Polymerase von thermophilen Bakterien. Ein Nachteil der Taq- Polymerase liegt darin, dass sie manchmal Fehler beim Kopieren der DNS produziert, was zu Mutationen in der DNS- Sequenz führen kann. Es gibt inzwischen neuere Polymerasen, die über einen Korrektur- Mechanismus verfügen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde eine PCR mit Standard- Bedingungen und einer Taq- Polymerase eingesetzt.

2.2.2.2.1. Isolierung der DNA

Das Gewebe wurde in 180µl T1- Puffer resuspendiert. Zu jeder Probe wurden 25µl Proteinase K hinzu pipettiert. Das Gemisch wurde dann bei 56°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde ein 70°C heißes Wasserbad vorbereitet. Zu jeder Probe wurden 200µl Puffer B3 hinzugefügt , gemischt und im Wasserbad bei 70°C für 10min. inkubiert. 210µl Ethanol wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde auf die 2ml Nucleo Spin Säule gegeben und 1min. bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen.

In die Säule mit der DNA- haltigen Membran wurden 500µl Puffer B5 hinzugefügt und für 1min. bei 6000rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Die Säule mit der DNA- haltigen Membran wurde in ein steriles 1.5ml Eppendorf- Reaktionsgefäß eingesetzt und die DNA mit 100µl auf 70°C vorgeheiztem Buffer BE durch einminütiges Zentrifugieren bei 6000 rpm ausgelöst.

Die DNA- haltige Probe kann sofort für die PCR eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.2.2. Vorbereitung der Proben und Deparaffinierung

Das Paraffinmaterial wurde in 1- 3 ca. 8µm dicke Schnitte mit einem mit Ethanol gereinigten Mikrotommesser geschnitten und in ein steriles 1.5ml Eppendorf- Gefäß überführt. 1ml Xylol wurde hinzu pipettiert, gemischt und bei Raumtemperatur 30min. stehen gelassen. Das Gemisch wurde 5min. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde 1ml 96% Ethanol in das Gefäß pipettiert, gemischt und 5min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das so deparaffinisierte Gewebe wurde bei 37°C 10-15min. im geöffneten Gefäß in den Trockenschrank gestellt, bis das restliche Ethanol verdampft war.

2.2.2.3. Master- Mixer

Zu 9µl DNA- haltigem Puffer wurde folgende Lösung gegeben:

DMSO: 2.5µl

5' - Primer (sense): 2.5µl

3' - Primer (antisense): 2.5µl

H₂O ad 25µl: 3.5µl

Die 25µl des PCR- Gemisches der Unterphase wurden in sterile PCR- Reaktionsgefäße pipettiert. Zu diesem Gemisch wurde mit abgeflammter Pinzette je ein Kügelchen Ampliwax gegeben und im PCR- Thermocycler geschmolzen:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	80°C	5min.	
2	20°C	2min.	
3	18°C	8	

Oberphase:

DNTP's	4µl
Taq- Polymerase	0.1µl
H2O ad 25µl	20.8µl

Die Oberphase wurde vorsichtig auf die mit der Wachsschicht bedeckten Unterphase auf pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden in den Heizblock des PCR- Thermocyclers gestellt. Die Amplifikation erfolgte bei geöffnetem Heizdeckel mit folgendem PCR-Programm:

2.2.2.2.4. PCR- Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	95°C	3min.	
2	95°C	1min.	
3	65°C	1min.	
4	72°C	1.5min	5 Zyklen 2.-4.
5	95°C	1min.	
6	60°C	1min.	
7	72°C	1.5min.	5 Zyklen 5—7.
8	95°C	1min.	
9	55°C	1min.	
10	72°C	1.5min.	35 Zyklen 8.-10
11	72°C	6min.	
12	20°C	8	

2.2.2.2.5. Kontroll- PCR (β - Globin)

Parallel wurde zur Kontrolle der Intaktheit der extrahierten DNA eine Beta- Globin- PCR angesetzt. Dazu wurde nach folgendem Schema pipettiert:

10x Puffer J	5l
dNTP's	4l
PCO4	2.5 μ l
GH20	2.5 μ l
Taq Polymerase	0.2 μ l
H2O ad 45 μ l	30.8 μ l
+ 5 μ l Probe	

= 50 μ l Gesamtmenge

Zur Amplifikation wurde folgendes PCR- Programm gewählt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	95°C	5min.	
2	95°C	30s	40 Zyklen 2.-4.
3	55°C	30s	
4	72°C	1min.	
5	72°C	5min.	
6	20°C	8	

2.2.2.2.6. Agarose- Gelelektrophorese

Agarose ist eine Mischung aus Polysacchariden, die aus Rotalgen (Familie Rhodophyceae) gewonnen werden. Werden diese in Gegenwart eines wässrigen Puffers geschmolzen und können danach abkühlen, so polymerisieren sie und bilden alternierend α (1-3) und β (1-4) Bindungen, die ein poröses und elastisches Gel ergeben. Dieses Gel kann zur Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen eingesetzt werden.

2.2.2.2.7. Giessen des Agarose- Gels

Für ein 2%-iges Gel wurden 1g NuSieve Agarose mit Aqua dest auf 45ml aufgefüllt. 5ml 10x TBE- Puffer wurden hinzupipettiert. Das Gemisch wurde mit dem Magnetrührer gemischt und in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Der Vorgang wurde fortgesetzt, bis sich sämtliche Agarose aufgelöst hat. Nach dem Siedeprozess wurde das flüssige Gel auf dem Magnetrührer unter ständigem Rühren auf ca. 65°C abgekühlt. Es wurden 5µl Sybr Gold hinzu pipettiert. Die abgekühlte Agarose- Lösung wurde auf den vorbereiteten Gelträger gegossen, der vorher mit Klebeband abgedichtet worden war und in den der Kamm für die Probenaschen eingesetzt worden war. Mit einer Glas- Sonde wurden störende Luftblasen aus dem Gel entfernt.

Das Gel wurde bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis es komplett abgekühlt und fest war (ca. 30min.). Anschließend wurde vorsichtig der eingesetzte Kamm entfernt, indem der Kammhalter an beiden Enden behutsam nach oben gezogen wurde.

Beim Einsetzen des Gels in die Kammer müssen die Probenaschen zur negativen Elektrode orientiert sein. Anschließend wurde die Kammer mit 400ml 1x TBE- Laufpuffer aufgefüllt, bis die Oberfläche des Gels etwa 1mm mit Puffer überschichtet war.

2.2.2.2.8. Vorbereitung der Proben

Je 4µl Lastpuffer wurden in neue sterile Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß 1µl des PCR- Produktes pipettiert, wobei die Wachsschicht, die die PCR- Produkte bedeckt, vorsichtig mit der Pipette durchstoßen wurde. Als Negativkontrolle wurde stat des Amplifikates Aqua dest. eingesetzt. Als Positivkontrolle für Exon 1 und Exon 2a DNA aus CAP und C8, für Exon 2b DNA aus CAP. In ein weiteres Reaktionsgefäß wurden 15µl Lastpuffer und 1µl Molekulargewichtsmarker V pipettiert und gemischt. Je 5µl der DNA-Proben bzw. 2µl von dem Molekulargewichtsmarker wurden vorsichtig in die Gelaschen pipettiert.

Die Elektrophoresekammer wurde so aufgestellt, dass die Proben zum Pluspol laufen. Die Kammer wurde dann mit dem Sicherheitsdeckel verschlossen, an die Stromquelle angeschlossen und eine Spannung von 80V eingestellt.

Die Auftrennung konnte beendet werden, wenn die Farbstoffbande bis maximal 2.5cm ab Tasche laufen gelassen (ca.30min.).

Die Detektion der DNA- Banden erfolgte mit Hilfe eines UV- Transilluminators. Die Größe der amplifizierten DNA-Banden konnte durch den Vergleich mit dem DNA- Molekulargewichtsmarker bestimmt werden. Die Dokumentation der Agarose- Gele erfolgte mittels Fotografie auf der UV- Platte mit einer Polaroid- Sofortbildkamera.

2.2.2.3. Mutationsanalyse

2.2.2.3.1. Single- strand- conformation polymorphism (SSCP)

Single Strand Conformation Polymorphism beruht auf der Erkenntnis, dass Nukleinsäurestränge eine ausgeprägte Neigung zur Basenpaarung haben. RNA und einzelsträngige DNA paaren, da kein komplementärer Strang vorhanden ist, mit sich selbst und nehmen dabei komplexe Konformationen an. Die Konformation ist dabei von vielen verschiedenen Faktoren abhängig, u.a. von der Sequenz und der Temperatur. Die Mutation einer einzigen Base kann dabei zu einer Konformationsänderung führen, die die Laufeigenschaften des Fragments im Polyacrylamidgel verändert. Hat man diese Bedingungen gefunden, kann man viele Proben in kurzer Zeit untersuchen. V.a. beim Screenen von Patienten auf Mutationen, die für Krankheiten verantwortlich sind, wird die Methode gegenwärtig eingesetzt. Entscheidend dabei ist die Temperierbarkeit der Elektrophoresekammer. Während des Gel- Laufes muss eine konstante, definierte Temperatur gehalten werden, da nur bei einer bestimmten Temperatur der gesuchte Polymorphismus sichtbar wird. Bei der Suche nach bestimmten Mutationen kann die gefundene Temperatur dann beibehalten werden.

Vorteile der SSCP- Gelanalyse bestehen darin, dass beliebige Primer verwendet werden können, ein Nachteil liegt darin, dass die Länge der Fragmente, die mittels SSCP analysiert werden können, auf etwa 250 Basenpaare begrenzt sind, bei längeren Fragmenten nimmt die Wahrscheinlichkeit, eine Mutation nachweisen zu können, stark ab. Allgemein geht man davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit, eine beliebige Mutation mittels SSCP zu finden, bei 60 bis 85% liegt. Die Reproduzierbarkeit liegt etwa bei 80% (Jordanova et al. 1997).

Die DNA lässt sich im Gel auf verschiedenen Wegen nachweisen. Ursprünglich wurde eine radioaktive Markierung durchgeführt, die anschließend durch Autoradiografie nachgewiesen wurde. Heute wird meist eine Silberfärbung durchgeführt, da diese Methode schneller und

nicht- radioaktiv ist und die silbergefärbten Gele danach aufbewahrt werden können. Eine mögliche Färbung mit Ethidiumbromid wird aufgrund der geringen Sensitivität kaum durchgeführt.

Mit Hilfe der SSCP- Gele war es möglich, die aufgereinigten proteinfreien PCR- Produkte auf Mutationen in Exon 1, 2a und 2b zu untersuchen.

2.2.2.3.1.1. Aufbereitung der PCR- Produkte

Referenz: Protokoll des Quiaquick PCR- Purifikation Kit (Quiagen)

Der PCR- Reaktionsansatz wurde mit 250µl PB- Buffer versetzt und auf eine in einem 2ml Mikrozentrifugengefäß platzierte Quiaquick Spin Säule gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13000rpm wurde der Durchlauf entfernt und die Membran mit 750µl PE- Puffer gewaschen. Zur vollständigen Entfernung von PE- Pufferresten (PE-Puffer enthält Ethanol) wurde nochmals 1min. bei 13000rpm zentrifugiert. Nach Überführung der Quiaquick spin Säule in ein neues 1.5ml Eppendorf- Gefäß wurde das PCR- Produkt mit 30µl auf 50°C vorgewärmtes Wasser eluiert. Die gereinigten PCR- Produkte können bei -20°C gelagert werden.

2.2.2.3.1.2. Reinigung

3µl PCR- Produkt und 3µl Stop- Lösung wurden in einem sterilen Reaktionsgefäß zusammen pipettiert.

2.2.2.3.1.3. Denaturierung:

Das Gemisch wurde 10min. bei 90°C im Wasserbad erhitzt, in Eiswasser abgeschreckt und dann kurz zentrifugiert.

2.2.2.3.1.4. Ethanolfällung

PCR- Produkte, die im Agarosegel schwach sind, werden mit Ethanol gefällt.

30µl PCR- Produkt werden mit 1/10 Volumen Na- Acetat versetzt. Hinzu pipettiert wurden 70µl auf –20°C herabgekühltes Ethanol. Das Gemisch wurde kurz gemixt und über Nacht zur Ausfällung der DNA bei –20°C in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde das Gemisch 20min. bei 13000rpm zentrifugiert, dabei wurden die Gefäße in der Zentrifuge so orientiert, dass beim anschließenden Abpipettieren das mit bloßem Auge nicht sichtbare Pellet gekennzeichnet ist. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA kann entweder im getrockneten Zustand bei –80°C oder in 20µl 1x MOPS bei –20°C oder –80°C aufbewahrt werden. Getrocknete DNA wird in 6µl Stop- Lösung gelöst und wie oben beschrieben denaturiert.

2.2.2.3.5. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

2.2.2.3.6. Vorbereitung der Gelkammer

Zum Giessen des Gels wurde eine Gelkammer verwendet, zu der zwei Glasplatten, ein Spacer, eine Gelträgerfolie und einige Klammern zur Fixation der Glasplatten gehörten. Die Gelfolie wurde mit der hydrophoben Seite in Richtung Glasplatte ausgerichtet und leicht an

die Glasplatte angerieben. Auf die zweite Glasplatte wurde der Spacer gelegt. Beide so vorbereitete Glasplatten wurden aneinander gelegt und mit den Fixationsklammern fest miteinander verbunden, so dass aus der so entstandenen Kammer kein flüssiges Gel auslaufen konnte.

Zur Vorbereitung der Kammer wurden die Puffertanks mit 1x TBE- Puffer etwa gleich hoch angefüllt. Das inzwischen polymerisierte Gel wurde mit der Folie aus der Gelkammer entnommen und mit Aqua dest. leicht gespült, um störende Ladungen zu entfernen.

Das Gel wurde daraufhin luftblasenfrei mit der Folienseite nach unten auf die Heizplatte der Apparatur gelegt. Die Probestaschen wurden zur Kathodenseite ausgerichtet. Auf das Gel wurde zum Schutz vor Austrocknung unter Aussparung der Taschenleiste eine dünne Folie gelegt. Zwei Elektrodentücher wurden in sterilem Wasser in der Mikrowelle ausgekocht und in 1x TBE- Puffer getaucht und von beiden Seiten an das Gel angelegt, so dass eine Verbindung zwischen Puffertank und Gel entstand, die den Ladungsfluss gewährleisten sollte. Befestigt wurde der Aufbau mit einer Glasplatte, die auf Schutzfolie und Elektrodentücher gelegt wurde.

2.2.2.3.7. Herstellung des PAG

Das Gel wurde für 40ml in TGGE- Apparatur nach folgendem Schema hergestellt:

Mit Glycerin	ohne Glycerin	Stammlösung	Endkonzentration
10ml	10ml	2xMDE	0.5x
2.4ml	2.4ml	10xTBE	0.6x
5.0ml	-	40% Glycerin	5%
22.6ml	27.6ml	Aqua dest.	
400µl	400µl	4% APS	
16µl	16µl	TEMED	

Für die Herstellung des Acrylamidgels wurde das Aqua dest., der TBE- Puffer und die MDE- Stammlösung in einen Messzylinder pipettiert. Für das Exon 1 wurde zusätzlich Glycerin dazugegeben. Dieser Ansatz wurde durch das APS und TEMED ergänzt und mit dem Magnetrührer gemischt, bis sich die Komponenten vermengt hatten. Das Gemisch wurde

dann mit einer Perfusorspritze aufgezogen und in die vorbereitete Gelkammer eingebracht. Das Gel wurde dann ca. 1h bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis es sich fest war.

2.2.2.3.8. Elektrophoresebedingungen

Bevor die Proben in die Geltaschen eingebracht wurden, wurde bei -20°C eine Vorelektrophorese für 30min. bei 330 V durchgeführt.

2.2.2.3.9. Probeneinlauf

Nach Beendigung der Vorelektrophorese wurden der Kammerdeckel und die schützende Glasplatte entfernt, die vorbereiteten Proben in die Geltaschen pipettiert und das System wieder geschlossen.

2.2.2.3.10. Übersicht über die SSCP- Laufbedingungen

Exon	Vorlauf	Probeneinlauf
1	Temp.: 20°C	Temp.: 20°C
Zeit: 30min.	Zeit: 18h	
Spannung: 330V	Spannung: 220V	
2a	wie oben	Zeit: 3.5h
2b	wie oben	Zeit: 5.5h

2.2.2.3.11 Silberfärbung des Polyacrylamidgels

Nach der Kontrollelektrophorese wurde das Gel mit der Folienseite nach unten in eine Färbeschale gelegt. Die Färbeschale wurde auf ein Schwenkgerät aufgesetzt, auf dem unter leichtem Schütteln die Färbeschritte mit je etwa 200- 300ml der angegebenen Puffer erfolgten.

Zunächst wurde das Gel 3min. in Puffer A geschwenkt. Danach folgte eine 10- minütige Inkubation in Puffer B. Darauf folgte ein mehrmaliges kurzes Waschen des Gels in Aqua bi-

dest. und eine 20- minütige Inkubation mit Puffer C, während der sich die Banden entwickeln. Der Puffer C muss immer frisch hergestellt werden, am besten während der Inkubation des Gels mit Puffer B. Durch anschließende 10- minütige Inkubation mit Puffer D wurde die Silbernitratfärbung fixiert. Nach dem Fixationsschritt wurde das Gel abschließend kurz in sterilem Aqua bidest. abgespült und mit etwas Aqua bidest. luftdicht in eine Folie eingeschweißt und konnte auf einem Leuchttisch ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert werden. Eine längere Lagerung bei 4°C ist möglich.

2.2.2.4. DNA- Sequenzierung

Referenz: Protokoll des BigDye Terminator Kits (ABI)

Die automatische Sequenzierung wurde mit den entsprechend vorbereiteten Proben im Institut für Neurobiologie der Universität Hamburg durchgeführt (automatisches Sequenziergerät von ABI (Applied Biosystems). Die DNA wird dabei mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die vom Gerät während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen werden. Die Leseweiten sind dadurch deutlich länger als bei der früher üblichen Sequenzierung von Hand. Die Standardleseweiten liegen bei der automatischen Sequenzierung bei 500 bis 1000 Nukleotiden. Die Markierung findet an Didesoxynukleotiden statt, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert werden, so dass das Ergebnis in Form eines vierfarbigen Ausdruckes vorliegt. Ein Nachteil beim Dye Terminator Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems ist die manchmal schwere Lesbarkeit der G`s. Außerdem führen nicht eingebaute markierte Nukleotide Primer zu einem starken Hintergrund, der das Lesen der ersten 100 Basen erschweren kann. Die Ansätze wurden daher vor dem Auftragen durch eine Ethanol-fällung gereinigt.

Durchführung:

11.2µl des PCR- Produktes und 0.8µl Sequenzier- Primer wurden mit 8µl BigDye- Reaktionslösung versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 20µl gebracht. In jedes Reaktionsgefäß wurde ein Tropfen Öl pipettiert.

Die Sequenzierung erfolgte in einem PCR- Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm:

Schritt	Temperatur	Zeit	Anmerkung
1	96°C	30s	
2	50°C	15s	
3	60°C	4min.	25 Zyklen 1.-3.
4	4°C	8	

2.2.2.4.1. Eluierung der DNA aus SSCP- Gelen

Die zu eluierende DNA- Bande wurde mit Hilfe eines Leuchttisches lokalisiert und mit einem sterilen Skalpell möglichst knapp aus dem SSCP- Gel herausgeschnitten. Das Gelstück wurde daraufhin in ein steriles PCR- Reaktionsgefäß überführt und mit 100µl Aqua dest. versetzt, so dass das Gelstück vollständig mit H₂O bedeckt war. Das Gefäß wurde daraufhin über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt, damit die DNA aus dem Gel eluiert werden konnte. Die eluierte DNA kann sofort für die PCR eingesetzt werden oder bei –20°C aufbewahrt werden.

2.2.2.4.2. Isopropanolfällung der Sequenzierproben

Zur Fällung der Sequenzierproben wurde zunächst das Öl vorsichtig ab pipettiert. Das 20µl Probenvolumen wurde in ein 1.5ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und mit 80µl 75% Isopropanol versetzt. Das Gemisch wurde 15min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und daraufhin zur Abtrennung der gefällten DNA 20 min. bei 13000rpm zentrifugiert. Vor dem Zentrifugieren wurde an den Reaktionsgefäßen gekennzeichnet, an welcher Stelle sich das ab- zentrifugierte Pellet festgesetzt hatte. Der Überstand wurde an der gegenüberliegenden Seite behutsam ab pipettiert und verworfen.

Zum Waschen der DNA wurden 250µl 75% Isopropanol hinzugefügt und erneut 5min. bei 13000rpm zentrifugiert. Das Isopropanol wurde ab pipettiert und verworfen. Zur vollständigen Entfernung des Isopropanols wurde erneut 1min. bei 13000rpm zentrifugiert und der Rest Isopropanol abpipettiert. Die Probe wurde dann 1min. auf einem Heizblock bei 90°C getrocknet.

2.2.2.4.3. Sequenzreaktion

Die DNA- Sequenzierung erfolgte durch Mitarbeiter des Servicelabors am Institut für Zellbiologie und klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf (UKE) auf einem ABI Prism TM377 DNA- Sequenzer der Firma *Applied Biosystems*. Die Sequenz wurde in Form eines Vier- Far- ben- Elektropherogramms dokumentiert.

3. Ergebnisse

Die Expression des Tumorsuppressorgens p16 wurde an einem Patientenkollektiv von 37 Karzinomen im pleomorphen Adenom untersucht. Zum Vergleich wurden 6 Karzinomen und 4 pleomorphen Adenome in die Untersuchungen einbezogen.

Hierzu wurde zunächst die p-16- Expression in dem Tumor immunhistologisch bestimmt. Die Ursachen einer veränderten Expression sollte anschließend in einer Mutationsanalyse geklärt werden. Hierzu wurden die beiden Tumorareale – Adenom und Karzinom- mikrodiseziert, und getrennt analysiert. Aus den mikrodisezierten Geweben wurde die DNA extrahiert und das p-16-Gen mittels PCR amplifiziert. Die Auswertung erfolgte über eine SSCP- Gelanalyse. Vom Wildtyp abweichende Banden wurden herausgeschnitten, die DNA eluiert und parallel sequenziert

3.1. Das Patientenkollektiv

3.1.1. Altersverteilung

Das Kollektiv der Patienten, die an einem Karzinom im Pleomorphen Adenom litten, umfasste 37 Fälle. Das Patientenalter variierte zwischen 27 und 80 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 56 Jahren und einem Altersgipfel zwischen 60 und 69 Jahren. Unter den 37 Patienten befanden sich 22 Frauen und 15 Männer. Diese Befunde entsprechen den Angaben der Literatur (Olsen et al. 2001).

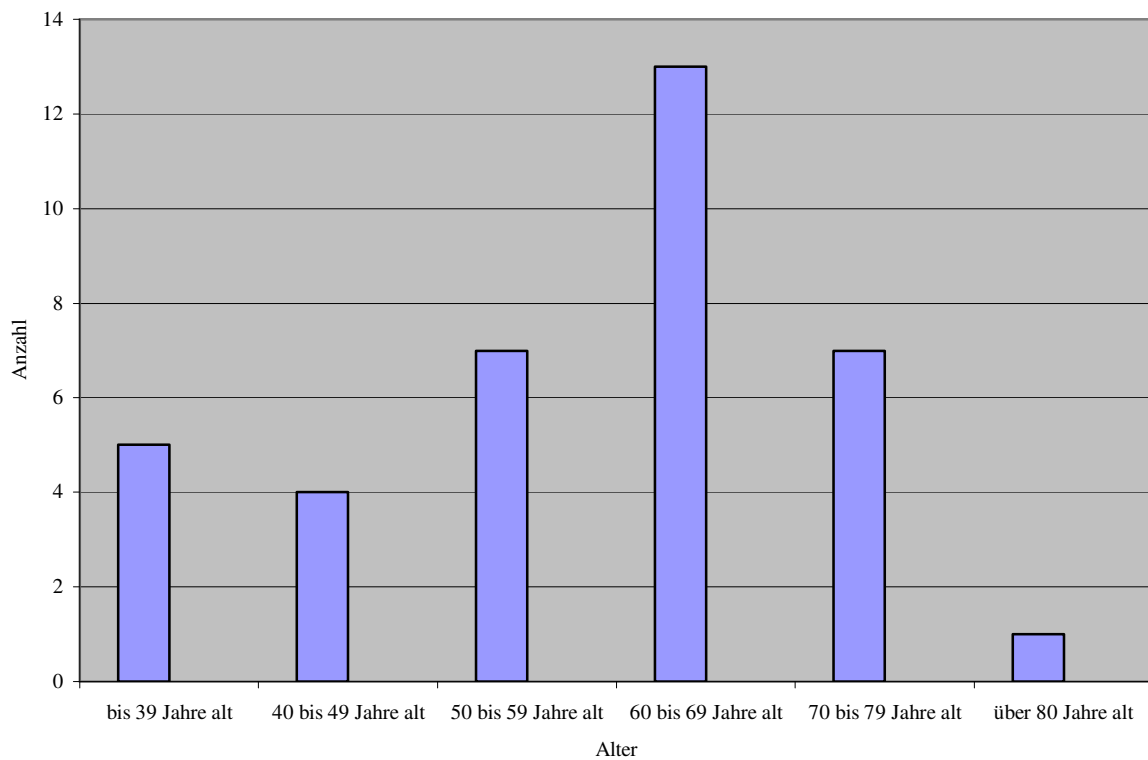


Abb I: Altersverteilung

3.1.2. Verteilung der Lokalisation

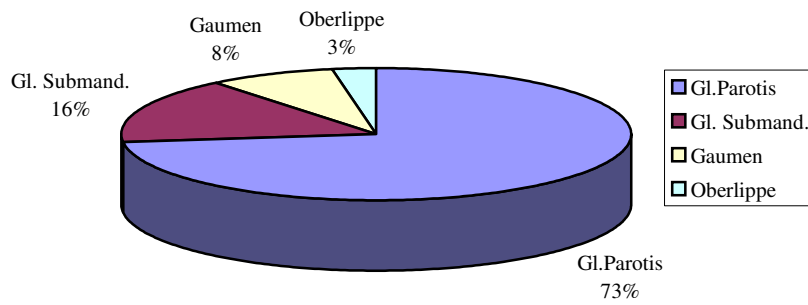


Abb.II: Lokalisation

73% der untersuchten Karzinome im pleomorphen Adenom stammten aus der Glandula parotis. 16 % waren in der Glandula submandibularis lokalisiert, 8% in den kleinen Speicheldrüsen des Gaumens und 3% im Bereich der Oberlippe. (Vgl. Olsen et al. 2001).

3.2. Gewebeproben

3.2.1. Karzinome im pleomorphen Adenom

Insgesamt wurden 37 Karzinome im pleomorphen Adenom untersucht. In der histologischen Begutachtung war es möglich, den Karzinomanteil unterschiedlichen Tumorentitäten zuzuordnen.

3.1.1. Verteilung der Karzinomtypen

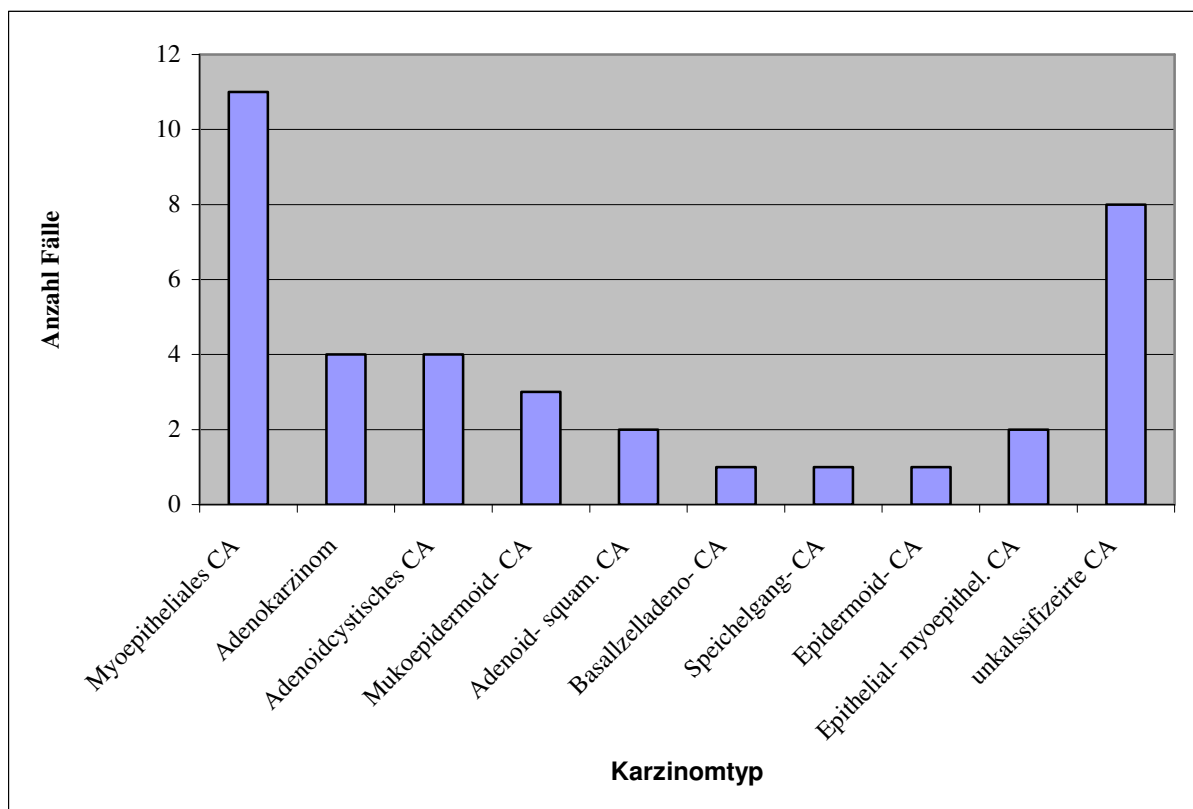


Abb.III: Verteilung der histologischen Differenzierungen der Karzinome im pleomorphen Adenom

Die Karzinome, die sich im pleomorphen Adenom entwickelten, wiesen unterschiedliche Differenzierungen auf. In den hier untersuchten Fällen wiesen 11 Fälle die histologische Diffe-

renzierung eines myoepithelialen Karzinoms auf und bildeten somit die größte Gruppe. Je vier Fälle ließen sich einem Adenokarzinom bzw. einem Adenoid-zystischen Karzinom zuordnen. Seltener fanden sich das Mukoepidermoid-Ca (3 Fälle), und das Adenoid-squamöse Ca (2 Fälle). Basalzelladenokarzinom, Epidermoid-CA, epithelial-myoepitheliales CA waren mit je einem Fall vertreten. Eine Gruppe von 8 Tumoren enthielt einen Karzinomanteil, der nicht eindeutig histologisch klassifiziert werden konnte.

3.2.2. Kontrollen

Zum Vergleich wurden in alle Untersuchungen als Kontrollen sowohl pleomorphe Adenome (n = 4) als auch Karzinome (n = 6) unterschiedlicher Entitäten eingesetzt.

3.3. Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

3.3.1. Ki-67

Zum Nachweis der Proliferationsaktivität wurde Ki- 67, ein proliferationsassoziiertes Antigen, benutzt. Für die Gruppen der Karzinome im pleomorphen Adenom, der pleomorphen Adenome und der verschiedenen Karzinome ergaben sich immunhistochemisch unterschiedliche durchschnittliche Proliferationsraten. Die höchste Proliferationsrate zeigte die Gruppe der „reinen“ Karzinome mit einer Rate von durchschnittlich 32.3%, die Gruppe der Karzinome im pleomorphen Adenom wies insgesamt mit 21.6% eine etwas geringere Proliferationsrate auf. Deutlich niedriger lag die Proliferationsrate in der Gruppe der pleomorphen Adenome mit einem Durchschnittswert von 13.7%.

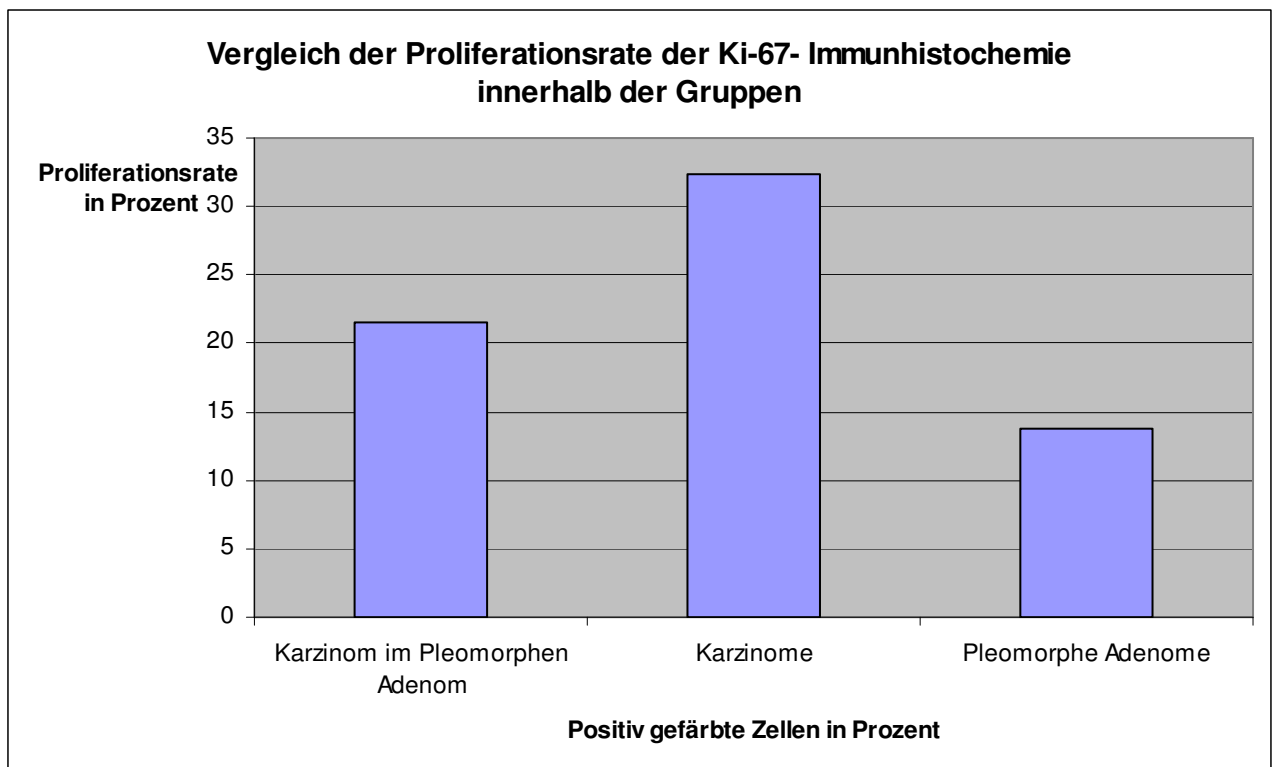


Abb. IV: Ki-67- Immunhistochemie

3.3.2. P16

Der immunhistologische Nachweis der p16-Expression wird mit einer semiquantitativen Methode ausgewertet, so dass die Ergebnisse für die einzelnen Untersuchungsgruppen getrennt dargestellt werden.

3.3.2.1. Karzinome im pleomorphen Adenom

Die semiquantitative Auswertung der immunhistologischen Untersuchungen zur p16-Expression im Karzinomanteil im pleomorphen Adenom ergab insgesamt in 32 von 37 Fällen eine positive Expression. Davon konnte in 12 Fällen eine starke (+++), in 11 Fällen eine mittlere (++) und in 9 Fällen eine schwache (+) p-16-Expression nachgewiesen werden. 5 Fälle waren negativ (-). Im Vergleich dazu zeigte sich im Adenomanteil in 34 von 37 Fällen eine positive Expression.. 12 Fälle zeigten eine starke (+++) Färbung, 13 Fälle eine mittlere Färbung (++) , 9 Fälle eine schwache Färbung (+) und 3 Fälle keine Färbung (-).

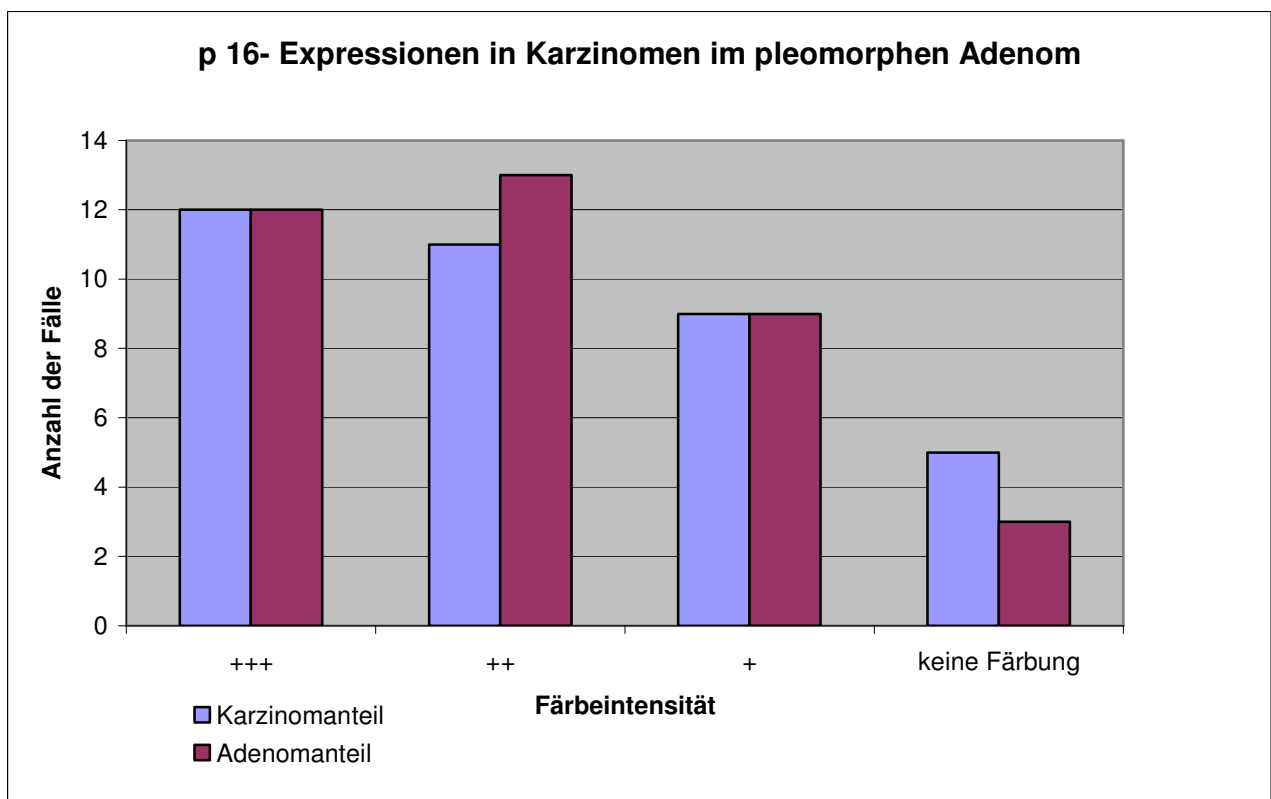


Abb.V p-16- Immunhistochemie in Karzinomen im pleomorphen Adenom

3.3.2.1.1. P16-Expression in den Karzinomanteilen der Karzinome im pleomorphen Adenom

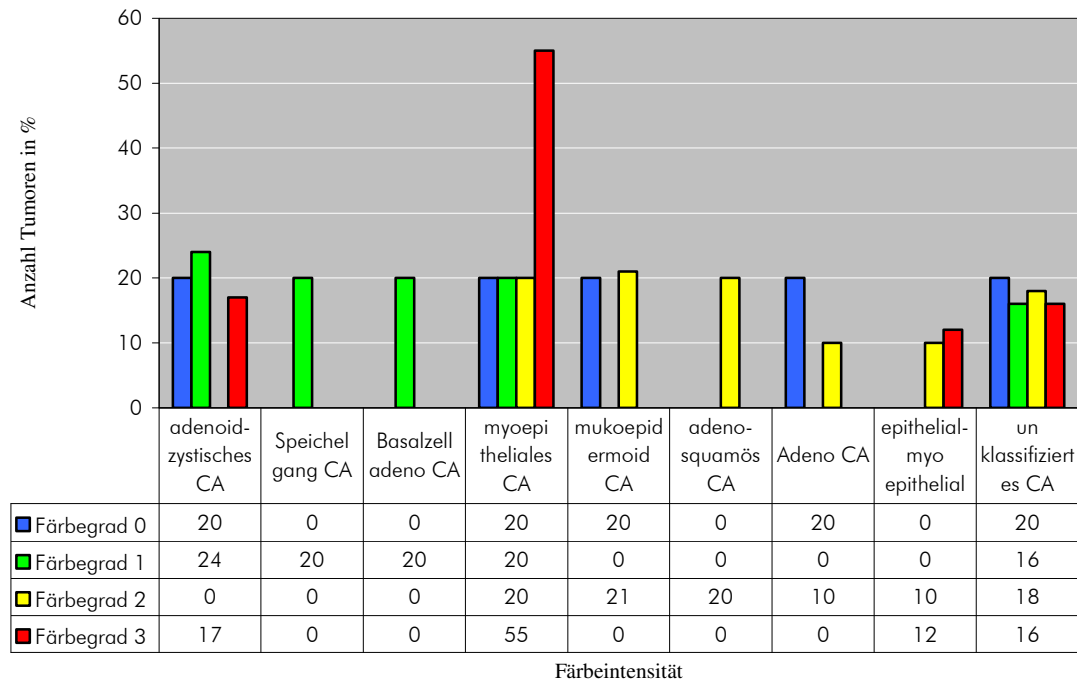


Abb. VI: p16- Expression in den verschiedenen Karzinomanteilen

Eine auffallend starke (+++) p16- Expression konnte in der Gruppe der myoepithelialen Karzinome im pleomorphen Adenom (55%) nachgewiesen werden, die auch im Vergleich zu den anderen histologischen Karzinom- Differenzierungen eine hohe Expressionsrate zeigt. Im Vergleich zeigt die Gruppe der adenoidcystischen Karzinome im pleomorphen Adenom und die Gruppe der epithelial- myoepithelialen Karzinome im pleomorphen Adenom einen Anteil von 17% bzw. 12% stark positivee (+++) Fälle, die Gruppe der unklassifizierten Karzinome im pleomorphen Adenom einen Anteil von 16% der stark positiver Fälle (+++).

3.3.2.2. Kontrollen

3.3.2.2.1. Karzinome

Für die Vergleichsgruppe der „reinen“ Karzinome konnte in 2 Fällen eine (+++), in 2 Fällen eine (++) und in je 1 Fall eine (+) bzw. (-) Immunreaktion nachgewiesen werden.

Bei den beiden negativen Fällen handelte es sich um ein Mukoepitheloid- CA und ein Adenozell- CA.

Für das Mukoepitheloid-CA konnte der Befund mittels SSCP- Gelanalyse durch eine aberrierende Bande in Exon 2b bestätigt werden.

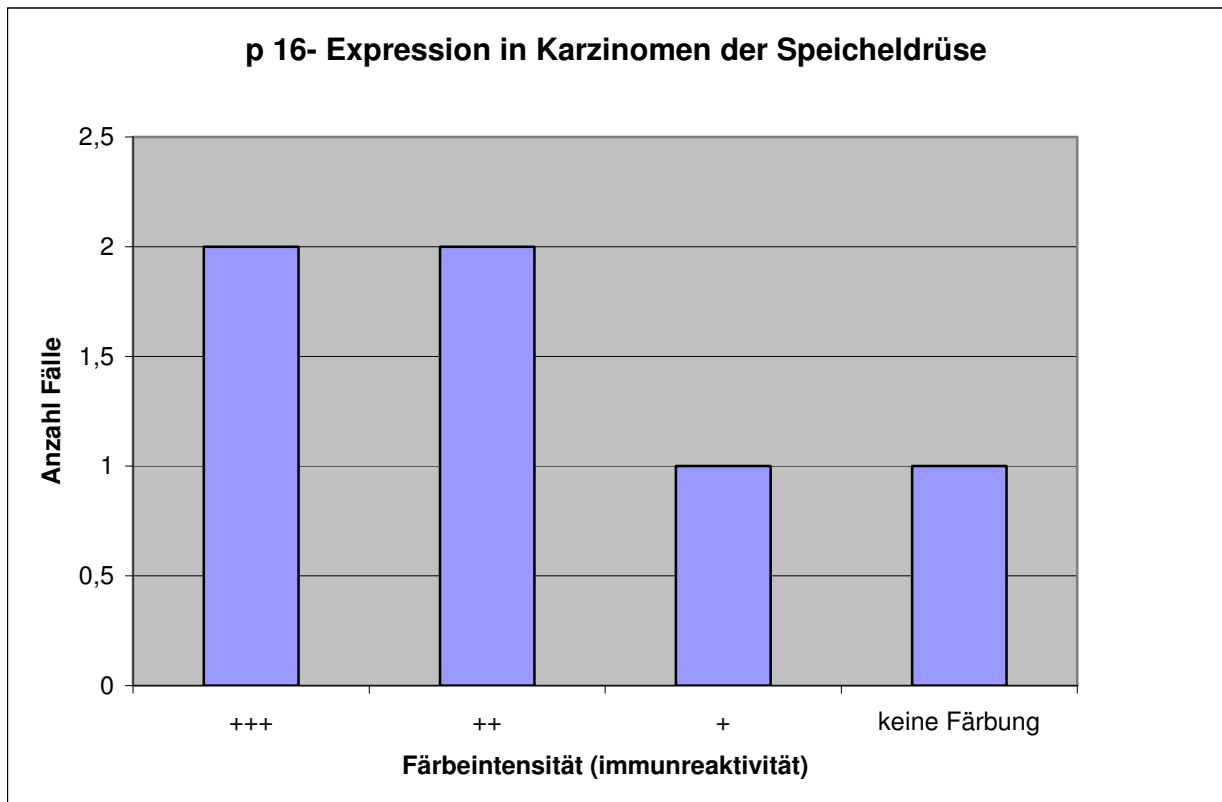


Abb.VII: p16- Immunhistochemie Karzinome

3.3.2.2.2. Pleomorphe Adenome

Von den untersuchten pleomorphen Adenomen zeigten 3 Fälle eine (++) , und 1 Fall zeigte eine (+) Immunreaktion

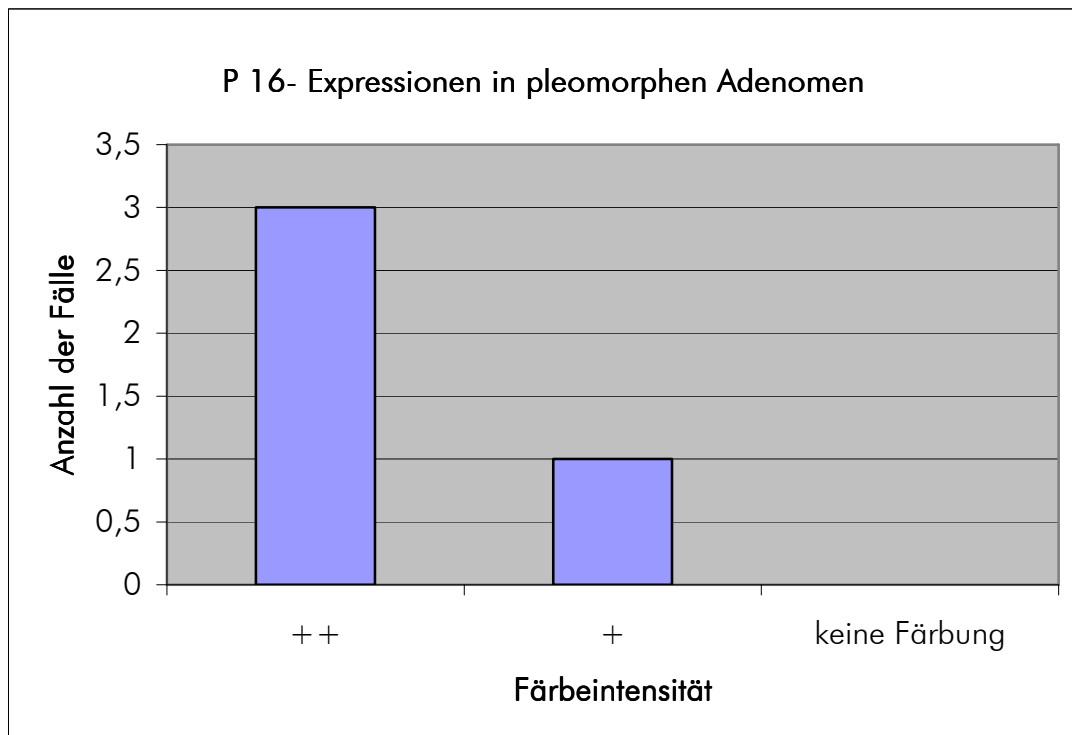


Abb VIII: p16- Immunhistochemie pleomorphe Adenome.

Insgesamt zeigte sich, dass von den 37 untersuchten Fällen (mit PA-Anteilen der mikrodissierten Fälle) (siehe Ergebnistabelle S. 57) 3 Fälle eine fehlende p16- Expression, 8 Fälle eine schwache (+) p16- Expression, 18 Fälle eine mittlere (++) p16- Expression und 9 Fälle eine starke (+++) p16- Expression zeigten.

Eine Korrelation der p16- Expression mit der Ki-67- Expression konnte nicht gezeigt werden. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der p16- Expression zwischen den Adenomanteilen und Karzinomanteilen konnten nicht nachgewiesen werden. Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Ki-67- Expression zwischen den Karzinomanteilen und Adenomanteilen der mikrodissierten Fälle.

3.4. Auswertung der Mutationsanalyse

3.4.1. SSCP

Von den 37 Fällen mit der Diagnose Karzinomen im pleomorphen Adenom konnte in 22 Fällen DNA isoliert und die Exons 1 und 2 des p16-Gens amplifiziert werden. In den übrigen Fällen war es trotz wiederholter DNA- Extraktion nicht möglich, intakte DNA zu isolieren, so dass auch nach Wiederholung der PCR- Reaktion keine Amplifikation der entsprechenden Exons möglich war. Bei diesen Fällen handelte es sich meist um Paraffinblöcke älteren Datums.

In der SSCP- Gelanalyse zeigten 11 Fälle ein aberrierendes Bandenmuster im Exon 2b, 3 Fälle in Exon 2a und 2 Fälle in Exon 1.

Auffällige Bandenmuster zeigten sich gehäuft in den Tumoren, deren Karzinomanteile einem myoepitheliale Karzinom (Fall Nr. 10, 15, und 17) und einem Mukoepidermoidkarzinom (Fall Nr. 1, 28) entsprachen. Aber auch die Karzinome im pleomorphen Adenom, die histologisch nicht eindeutig einer Entität zuzuordnen waren, zeigen z. T. aberrierende Banden in der SSCP- Analyse (Fall Nr. 26).

In 6 Fällen konnte der Karzinomanteil getrennt vom Anteil des pleomorphen Adenoms untersucht werden.

Die Eignung der Fälle für die Mikrodissektion ergab sich aus den histologische Voraussetzungen, die eine saubere Trennung zwischen Karzinomanteil und Adenomanteil der Tumore ermöglichen mussten.

Ein aberrierendes Bandenmuster ergab sich in diesen Fällen fast nur für die Karzinomanteile, lediglich in einem Fall (Fall Nr.6) zeigte sich auch im Adenomanteil ein aberrierendes Bandenmuster.

Die SSCP-Gelanalyse diente u.a. der Vorauswahl derjenigen Proben, für die eine Bestätigung der Mutation mittels direkter Sequenzierung in Betracht kam.

3.4.2. Direkte Sequenzierung

Von den 12 Fällen, die in der SSCP-Gelanalyse eine genetische Veränderung im p16-Gen vermuten ließen, konnte diese in 6 Fällen durch direkte Sequenzierung bestätigt werden.

Insgesamt konnten bei den Karzinomen im pleomorphen Adenom 7 Mutationen nachgewiesen werden. 6 Mutationen befanden sich in Exon 2b, eine Mutation in Exon 2a. In einem Fall lag eine Doppelmutation (Exon 2b) vor.

Zu den Tumoren, in denen sich eine Mutationen im p16-Gen nachweisen lies, gehörten 2 myoepitheliale Karzinome (Fall Nr. 17 und 15) im pleomorphen Adenom, 1 Adenokarzinom im pleomorphen Adenom (Fall Nr. 5), 2 unklassifizierte Karzinome im pleomorphen Adenom (Fall Nr. 12 und 33) sowie ein Mukoepidermoidkarzinom im pleomorphen Adenom (Fall Nr. 28). In einem Fall eines Myoepithelialen Karzinoms (Fall Nr.17) lag eine Doppelmutation vor.

Bei den Mutationen handelt es sich um homozygote Punktmutationen mit einem Basenaustausch in beiden Allelen. 2 der gefundenen Mutationen traten im Codon 130 auf (Fall Nr. 5 und 28). In 4 Fällen führte der Basenaustausch zu einem Aminosäureaustausch (Fall Nr. 12, 17, 5, 28). 3 der untersuchten Fälle zeigten eine sog. „silent mutation“ bzw. balanzierte Mutation ohne Aminosäureaustausch (Fall Nr. 17, 33, 15) (vgl. Ergebnistabelle IV).

In den 6 Fällen, in denen der Karzinomanteil getrennt vom Anteil des pleomorphen Adenoms untersucht wurde, konnten in der Sequenzanalyse 5 Mutationen bei 4 Fällen bestätigt werden. Alle 6 mikrodisszierten Fälle wiesen in der SSCP-Gelanalyse die aberrierenden Banden in Exon 2b auf. Fall Nr.28 (Mukoepidermoidkarzinom) zeigte zusätzlich eine aberrante Bande in Exon 2a.

Nach Sequenzierung ergaben sich nur im Exon 2b (Fälle Nr. 12, 17, 28, 33) Mutationen. Fall Nr. 17 zeigte eine Doppelmutation in Exon 2b. Im Anteil des pleomorphen Adenoms konnte in allen Fällen (Fall Nr. 6, 28, 17, 7, 12 und 33) in der Sequenzanalyse keine Mutation nachgewiesen werden.

Histologisch befanden sich unter den 6 mikrodisszierten Fällen 2 unklassifizierte Karzinome im pleomorphen Adenom (Fall Nr. 12 und 33), 1 myoepitheliales Karzinom im pleomorphen Adenom (Fall 2, Nr. 17), 1 Mukoepidermoidkarzinom im pleomorphen Adenom (Fall Nr. 6 und 28) und 1 Fall eines Plattenepithelkarzinoms im pleomorphen Adenom (Fall Nr.7).

In den beiden Vergleichsgruppen, pleomorphe Adenome und Karzinome (Adenoid-Zystisches Karzinom und Azinuszellkarzinomen) konnten weder in der SSCP-Analyse aberrierende Bandenmuster gefunden wurden, noch ließen sich über direkte Sequenzierung Mutationen aufdecken.

4 Fälle der Karzinome im pleomorphen Adenom mit nachgewiesener Mutation im p16-Gen, zeigten immunhistologisch eine fehlende (Fall Nr. 15) oder nur schwache p16-Expression (Fall Nr. 5, 28, 33). Einer der Fälle (Nr. 17) mit Mutation zeigte eine mittlere p16-Expression und 1 Fall (Nr. 12) eines unklassifizierten Karzinoms im pleomorphen Adenom sogar eine hohe p16-Expression.

Tabelle: Ergebnisse													
Mutationen im p16-Gen												Immunhistologie	
Fal- l	Bemer- kung	Histol. Diff. des Kar- zinomanteils	SSCP- Analyse		Sequenz- Analyse	Co- don	Nucleotid-change		AS- change	Art der Mutati- on	p16- Ex- pression	Ki67- Expressi- on	
			Exon 1	Exon 2a	Exon 2b								
5		Adeno- CA	-	+	+	Exon 2b	130	AGA zu AAA	G/A	Arg/Lys	+	37%	
13		Adenoid-zystisches CA	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	47%	
31		Adenoid-zystisches CA	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2%	
35		Adenoid-zystisches CA	-	-	-	-	-	-	-	-	++	9%	
25		Adeno-squamöses CA	-	-	-	-	-	-	-	-	++	27%	
4		Epithelial-myoepitheliales CA	-	-	-	-	-	-	-	-	++	22%	
36		Epithelial-myoepitheliales CA	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	27%	
6	Ca-Anteil	Mukoepidermoid-CA / Azinuszell- CA	-	-	-	-	-	-	-	-	++	18%	
	Ca-Anteil	Mukoepidermoid-CA	-	-	-	-	-	-	-	-	++	4%	
	PA- An- teil	Mukoepidermoid-CA	-	-	+	-	-	-	-	-	+	4%	
11		Mukoepidermoid-CA	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	
28	Ca-Anteil	Mukoepidermoid-CA	-	+	+	Exon 2b	130	AGA zu ATA	G/T	Arg/Ile	+	18%	
	PA- An- teil	Mukoepidermoid-CA	-	-	-	-	-	-	-	-	++	20%	
10		Myoepitheliales CA	+	-	+	-	-	-	-	-	+++	14%	
15		Myoepitheliales CA	-	+	-	Exon 2a	52	GCG zu GCC	G/C	Ala/Ala	silent	-	5%
17	Ca-Anteil	Myoepitheliales CA	-	-	+	Exon 2b	127	GGG zu GGC	G/C	Gly/Gly	silent	++	46%
	Ca-Anteil	Myoepitheliales CA	-	-	+	Exon 2b	140	GCG zu ACG	G/A	Ala/Thr		++	46%

	PA- Anteil	Myoepitheliales CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	45%
18		Myoepitheliales CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	26%
19		Myoepitheliales CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	41%
7	Ca-Anteil	Platteneithel CA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	80%
	PA- Anteil	Platteneithel CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	60%
8		Unklassifiziertes CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	20%
12	Ca-Anteil	Unklassifiziertes CA	-	-	+	Exon 2b	135	GCC zu GAC	C/A	Ala/Asp		+++	38%
	PA- Anteil	Unklassifiziertes CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	38%
20		Unklassifiziertes CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	9%
26		Unklassifiziertes CA	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2%
33	Ca-Anteil	Unklassifiziertes CA	-	-	+	Exon 2b	111	GAG zu GAA	G/A	Glu/Glu	silent	+	18%
	PA- Anteil	Unklassifiziertes CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	20%
A1	Kontrolle	Pleomorphes Adenom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	20%
A2	Kontrolle	Pleomorphes Adenom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	15%
A3	Kontrolle	Pleomorphes Adenom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	15%
A4	Kontrolle	Pleomorphes Adenom	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5%
A5	Kontrolle	Azinuszell- CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	30%
A6	Kontrolle	Azinuszell- CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	70%
A7	Kontrolle	Azinuszell- CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	51%
A8	Kontrolle	Mukoepidermoid-CA	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	20%
A9	Kontrolle	Mukoepidermoid-CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	5%

Pleomorphe Adenome der Kontrollgruppe													
Mikrodissezierte Fälle													
PA- Anteile													

Tabelle IV: Ergebnisse der Immunhistochemie und der Mutationsanalyse

3.5. SSCP- Gel: Mutationen im Exon 2b

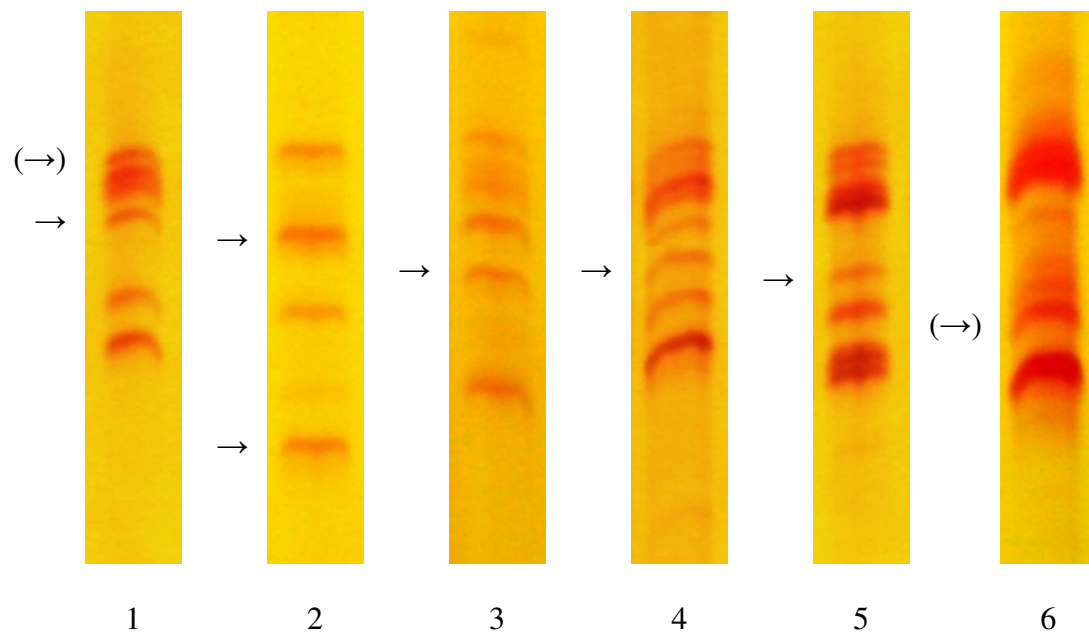


Abb. VIII: SSCP- Gel, Mutationen im Exon 2b

- 1 = Fall 33: unklassifiziertes invasives CA
- 2 = Fall 12: unklassifiziertes CA
- 3 = Fall 17: myoepitheliale Differenzierung
- 4 = Fall 5: Adeno- CA
- 5 = Fall 28: mukoepidermoide Differenzierung
- 6 = Positivkontrolle

3.5.1: SSCP- Gel: Mutationen im Exon 2a

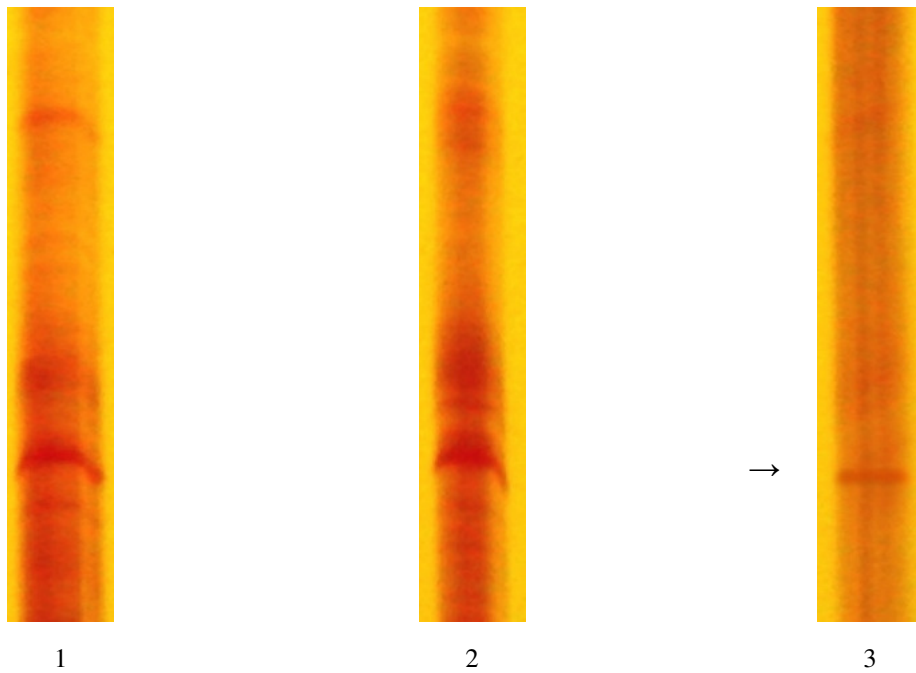


Abb. IX: SSCP- Gel, Mutation im Exon 2a

1. = Positivkontrolle
2. = Positivkontrolle
3. = Fall 15: myoepitheliale Differenzierung

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Bedeutung des p16-Tumorsuppressorgens in Karzinomen im pleomorphen Adenom zu durchgeführt.

Um die Frage zu beantworten, ob bei fehlender p16-Expression oder p16-Überexpression eine Mutation vorliegt, die eine Fehlfunktion des Genproduktes zur Folge hat, wurde eine Mutationsanalyse mittels SSCP-Analyse und/oder direkter Sequenzierung durchgeführt.

Von den 21 untersuchten Karzinomen im pleomorphen Adenom konnte in 11 Fällen ein vom Wildtyp (wt) abweichendes Bandenmuster in den Exons 1 bis 2 des p16-Gens dargestellt werden. Grund für das veränderte Laufverhalten der DNA können Mutationen sein. In diesem Fall kann bei der Transkription ein verändertes Protein mit veränderter Funktion entstehen. Der Verdacht auf eine Mutation wurde über eine direkte Sequenzierung des entsprechenden Genabschnitts überprüft und die hieraus resultierenden Veränderungen der Proteinstruktur immunhistologisch mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers kontrolliert.

In 6 der 11 Fälle ließ sich die Mutation über direkte Sequenzierung nachweisen, wobei in einem Fall 2 Mutationen in einem Exon auftraten. Solche Phänomene lassen sich mit der SSCP nicht mehr auflösen. Auch gibt die SSCP keine Auskunft über die Lokalisation der Mutation innerhalb des untersuchten Exons. Allgemein geht man bei der SSCP-Gelanalyse von einer Wahrscheinlichkeit von 60 bis 85% aus, eine beliebige Mutation zu finden. Die Reproduzierbarkeit der Methode liegt bei ca. 80% (Suzuki et al., 1991; Jordanova et al., 1997).

In 4 Fällen kam die Mutation auch durch Veränderungen in der p16 Expression zum Ausdruck. In der Immunhistologie zeigte sich in den Fällen keine oder nur eine schwache (+) Expression. Ein Verlust der p16-Expression konnte auch in adenoidzystischen Karzinomen der Speicheldrüsen (Shintani et al., 2000) und bei Ovarialkarzinomen (Milde-Langosch et al., 1998) gezeigt werden. Eine fehlende p16-Expression ist entweder auf eine Punktmutation oder eine Hypermethylierung zurückzuführen (Little & Wainwright, 1995). Es werden verschiedene Alterationsmechanismen beschrieben, darunter homozygote Deletionen (Kamb et al., 1994) und Hypermethylierung des 5-Cp-G-Abschnittes der Promotorregion (Merlo et al., 1995). Punktmutationen wurden von Milde-Langosch et al. (1998) gehäuft im Codon 140 mit einem Aminosäure-Austausch von Glycin zu Alanin gefunden. Diese Punktmutationen führen zu strukturellen Veränderungen des p16-Genproduktes, die die Tertiärstruktur des Prote-

ins so verändern, dass daraus eine verminderte oder fehlende Bindungsfähigkeit für Cdk4 resultiert (Russo et al., 1998; Milde-Langosch et al., 1998).

Interessanterweise zeigt der Fall mit der Doppelmutation weder eine fehlende noch eine Überexpression von p16. Vermutlich führt die Mutation in diesem Fall zu einer Veränderung der Proteinstruktur, die sich mit den ausgewählten Antikörpern nicht nachweisen läßt. Eine Aussage, inwieweit die Funktion von p16 gestört ist, lässt sich nach den vorliegenden Ergebnissen nicht machen. Hierzu müsste an diesem Fall funktionelle Analysen durchgeführt werden.

In 2 Fällen mit schwacher bzw. fehlender p16-Expression konnte durch die Sequenzanalyse keine Veränderung der Nukleotidsequenz nachgewiesen werden, obwohl die SSCP-Analyse eine Mutation vermuten ließ. Hier ist anzunehmen, daß die Versuchsbedingungen und – Voraussetzungen (DNA-Qualität, DNA-Menge, „antigen retrieval“ usw.) für die ausgewählten Methoden nicht optimal waren.

Die Bestimmung der Proliferationsrate ergab, dass eine geringe oder fehlende p16-Expression häufig mit einer auffallend geringen Proliferation assoziiert ist. Auch Shintani et al. (2000) fanden beim adenoidzystischen Karzinom der Speicheldrüsen eine negative Korrelation zwischen p16-Expression und der Proliferationsrate, während andere Autoren eine fehlende Assoziation zwischen p16-Expression und Proliferationsrate beschrieben (Milde-Langosch et al., 1998).

Charakteristisch für das Karzinom im pleomorphen Adenom ist die unterschiedliche histologische Differenzierung des Karzinomanteils. Beschrieben sind adenoidzystische Karzinome, Speichelgangkarzinome, Basalzelladenokarzinome, Adenokarzinome, Mukoepitheloidkarzinome, Plattenepithelkarzinome, myoepitheliale Karzinome und Speichelgangkarzinome, d.h. prinzipiell können alle speicheldrüsentypischen Karzinome in einem vorbestehenden pleomorphen Adenom entstehen. Die Heterogenität dieser Tumoren bereitet nicht selten diagnostische Schwierigkeiten, die einerseits bei der histologischen Differenzierung auftreten und andererseits bei der Abgrenzung des pleomorphen Adenoms vom Karzinom.

Für die Expression von p16 ergab die vorliegende Studie, dass alle drei untersuchten adenoidzystischen Karzinome keine Mutation haben und p16 unterschiedlich stark (+, ++, +++)

exprimieren. Entsprechendes gilt für die beiden epithelial-myoepithelialen Karzinome. Das Epidermoidkarzinom im pleomorphen Adenom trägt ebenfalls keine Mutation, zeigt dabei eine hohe Proliferationsrate und eine mittlere (++) p16-Expression.

In einem von drei Mukoepidermoidkarzinomen ließ sich eine Mutation in Exon 2b nachweisen und zwar nur im Karzinomanteil. Von 5 untersuchten myoepithelialen Karzinomen ließ sich in zwei Fällen eine Mutation nachweisen, in einem Fall in Exon 2a, bei der es sich um eine sog. „silent“ Mutation handelt, die aber dennoch zu einem Verlust der p16-Expression führte. In dem anderen Fall traten zwei Mutationen in Exon 2b auf. Dabei handelte es sich bei der einen Mutation ebenfalls um eine „silent“ Mutation. Mutationen in Exon 2b des p16-Gens traten auch bei dem Adenokarzinom auf.

Immunhistologisch zeigten sich keine Auswirkungen auf die p16-Expression. Von den 5 unklassifizierten Tumoren trat in 2 Fällen eine Mutation in Exon 2b ausschließlich im Karzinomanteil auf. Die Mutationen lagen in unterschiedlichen Codons und führten einmal zu einer „silent“ Mutation, verbunden mit einer geringen p16-Expression. Dagegen führte der Purin-Pyrimidin-Basenaustausch im anderen Fall zu einer erhöhten p16-Expression. Insgesamt zeigten von den untersuchten Karzinomen im pleomorphen Adenom 32% eine p16-Überexpression (+++). Allerdings ließ sich die Überexpression nur in dem einen Fall auf eine Mutation zurückführen.

Eine p16-Überexpression wurde neben einem Expressionsverlust ebenfalls im Zusammenhang mit malignen Tumoren beschrieben (Klaes et al., 2001; Masumoto et al., 2003). Von diesen Autoren wurde eine p16-Überexpression insbesondere bei Kopf-Hals-Tumoren und bei kleinzelligen Zervixkarzinomen in Kombination mit einer HPV-Infektion beobachtet. In Verbindung mit der HPV Infektion wird postuliert, dass es durch die Einwirkung viraler Antigene bei diesen Tumoren zu einer vermehrten Produktion von funktionsuntüchtigem p16 kommt (Klaes et al. 2001).

Gerade bei Karzinomen im pleomorphen Adenom ist die Prognose abhängig vom histologischen Subtyp und dem Malignitätsgrad der Karzinomkomponente. Diese Ergebnisse lassen sich aufgrund der geringen Fallzahl aber nur eingeschränkt einem bestimmten Malignitätsgrad und einer entsprechenden Klassifikation maligner Speicheldrüsentumoren zuordnen. Danach zeigen nur Karzinome, die der Gruppe der „intermediate-grade“ Tumoren (Ellis, 1995) angehören Mutationen im p16-Gen.

Auch bei verschiedenen anderen Tumorarten konnte gezeigt werden, dass bei malignen Tumoren eine fehlende p16-Expression mit dem Malignitätsgrad und einer schlechten Prognose

korreliert, so u.a. beim Melanom, den Adenokarzinomen des Pankreas, den Leiomyosarkomen, den cholangiozellulären Karzinomen und den Leukämien (Bogenrieder et al., 2001; Gruttgen et al., 2001; Hussussian et al., 1994). Bei Ovarialkarzinomen zeigten insbesondere Tumore mit muzinöser und endometrioider Differenzierung einen Expressionsverlust (Milde-Langosch et al., 2001).

Hinsichtlich der Bedeutung des Tumorsuppressorgens p16 für die Entstehung eines Karzinoms im pleomorphen Adenom hat sich gezeigt, dass allein mittels Expressionanalysen keine Aussage möglich ist. Es ist dagegen bemerkenswert, dass Mutationen im p16-Gen ausschließlich im Karzinomanteil auftraten. Bestätigt werden die Befunde durch die der Kontrollgruppe der pleomorphen Adenome, in der ebenfalls keine Mutationen nachweisbar waren.

Über die Mechanismen, die für die Entstehung eines Karzinoms im pleomorphen Adenom verantwortlich sind, ist bisher nur wenig bekannt. Es wird vermutet, dass genetische Instabilitäten für die maligne Umwandlung eines Adenoms in ein aggressiv wachsendes Karzinom im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz ursächlich sind (Olsen & Lewis, 2001; Sahn & Caspary 2004). Ein entscheidender Unterschied zum kolorektalen Karzinom ist, dass sich in einem vorbestehenden pleomorphen Adenom unterschiedliche Karzinomentitäten entwickeln können, so dass vermutlich sequenzielle „Zweitereignisse“ nicht nur für die maligne Progression, sondern auch für die komplexen phänotypischen Entwicklungen verantwortlich sind. Die immunhistologischen Ergebnisse zur p16-Expression lassen hier, wie bereits erwähnt, keine Schlußfolgerung zu, da zwischen Adenom- und Karzinomanteil keine signifikanten Unterschiede in der Expression bestehen.

Unterstützt wird das Modell eines „Zweischritttereignisses“ bei der Entstehung eines Karzinoms im pleomorphen Adenom durch die Ergebnisse von El-Naggar et al. (2000), die in ihrer Studie 26 Karzinome im pleomorphen Adenom untersucht haben und bei den mikrodisszezierten Fällen nur in den Karzinomanteilen genetische Alterationen im Sinne eines LOH (loss of heterozygosity) gefunden haben.

5. Zusammenfassung

Karzinome im pleomorphen Adenom zählen zu den seltenen Tumorentitäten mit einer schlechten klinischen Prognose. Um die Frage zu beantworten, ob bei fehlender p16- Expression oder p16- Überexpression eine Mutation vorliegt und ob Unterschiede in der p16- Expression in den verschiedenen Tumoranteilen vorliegen, wurde ein Kollektiv von 37 Karzinomen im pleomorphen Adenom nach Mikrodissektion mittels SSCP- Analyse und/oder direkter Sequenzierung untersucht.

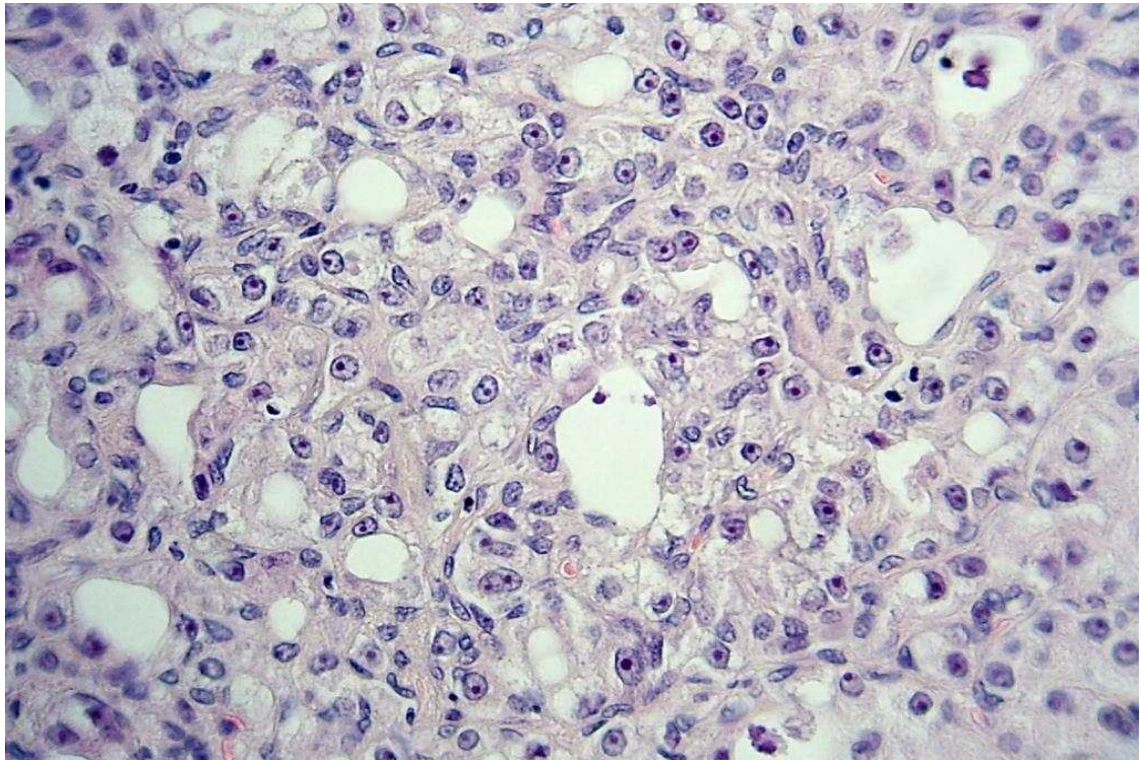
In der SSCP- Analyse konnte in 11 Fällen ein aberrierendes Bandenmuster in den Exons 1 bis 2 gefunden werden. In 6 der 11 Fälle ließ sich die Mutation über direkte Sequenzierung nachweisen, in einem Fall traten 2 Mutationen in einem Exon auf. In 4 Fällen führte die Mutation zu Veränderungen der p16- Expression. In der Immunhistologie zeigte sich in diesen Fällen keine oder nur eine schwache (+) Expression. Die Bestimmung der Proliferationsrate ergab, dass eine geringe oder fehlende p16- Expression oft mit einer auffallend geringen Proliferationsrate einherging.

Die unterschiedliche histologische Differenzierung des Karzinomanteils ist ein Charakteristikum der Karzinome im pleomorphen Adenom. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass nur Karzinome aus der Gruppe der „intermediate- grade“- Tumoren Mutationen im p16- Gen aufwiesen. Aufgrund der geringen Fallzahl geben die Ergebnisse nur Hinweise auf eine Assoziation zu einem bestimmten Malignitätsgrad und einer Tumorklassifikation.

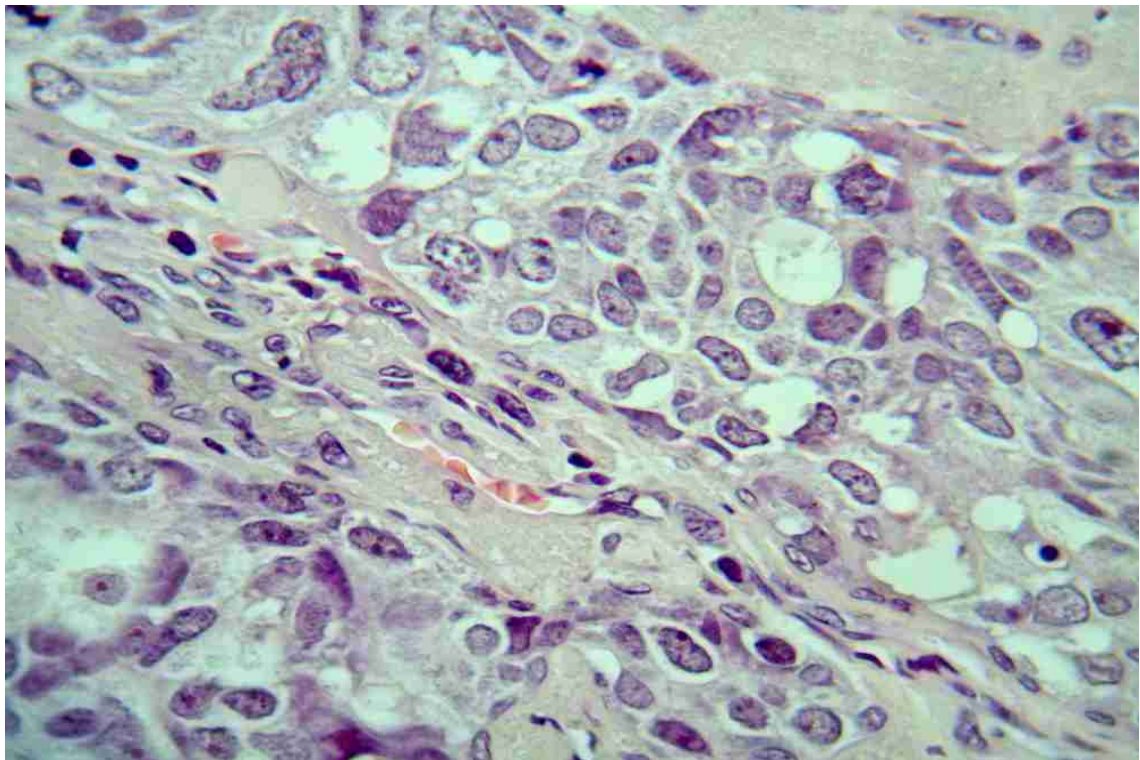
Bemerkenswert bei dieser Untersuchung ist, dass durch die Mikrodissektion gezeigt werden konnte, dass Mutationen im p16- Gen ausschließlich im Karzinomanteil auftraten. Dieses Ergebnis wird durch die Kontrollgruppe der pleomorphen Adenome bestätigt, in der keine Mutationen nachweisbar waren. Dies lässt vermuten, dass ein sequentielles „Zweitereignis“ für die maligne Umwandlung und die unterschiedlichen phänotypischen Entwicklungen ursächlich ist

6. Fotoabbildungen Karzinome im pleomorphen Adenom

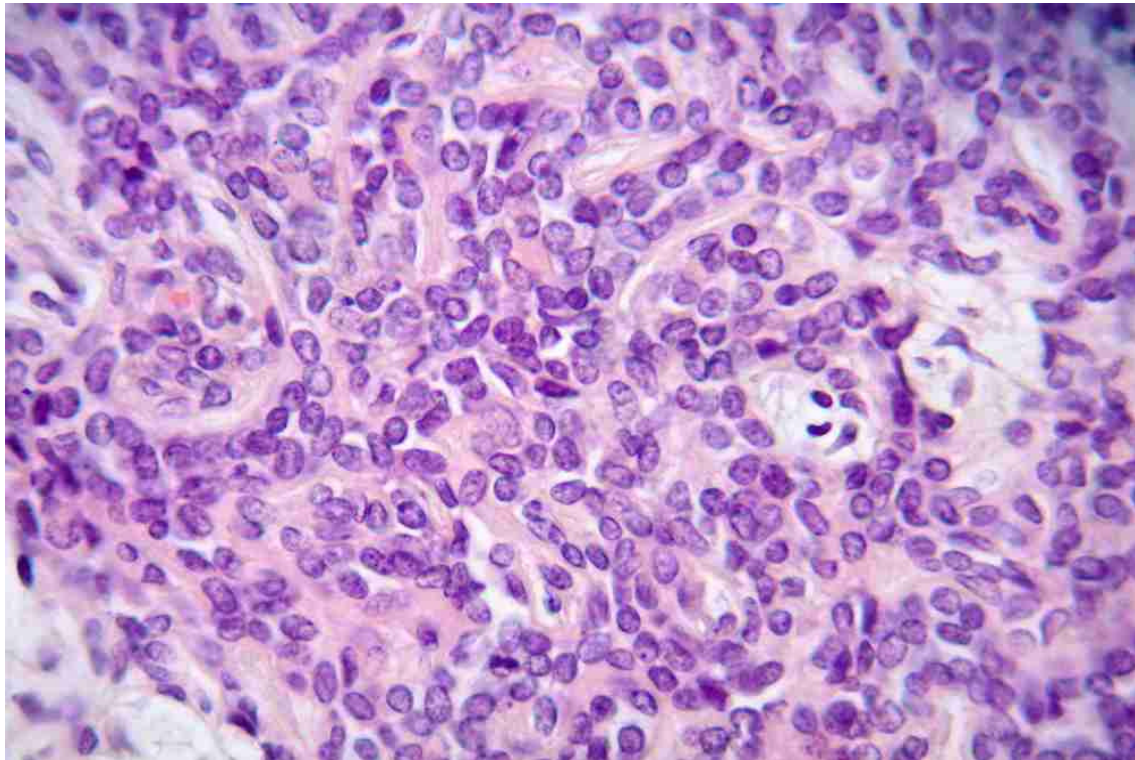
- I) **Mukoepidermoid- CA:** Die Tumoren sind wenig abgegrenzt und weisen zystische Strukturen auf, die schleimgefüllt sind. Man findet plattenepithelial und drüsig differenzierte schleimbildende Anteile.
- II) **Adeno- CA:** charakteristisch ist ein trabekuläres Wachstum mit gangartigen Strukturen
- III) **Myoepitheliales CA:** Aufbau aus atypischen Myoepithelzellen mit hoher mitotischer Aktivität und deutlich invasivem Wachstum. Zellen sind spindelförmig oder rund und haben z.T. ein eosinophiles Cytoplasma.
- IV) **Adenoid- squamöses CA:** zeigt einen drüsenähnlichen Aufbau.
- V) **Undifferenziertes CA:** hochmaligner Tumor, mikroskopisch als Epithelzellen erkennbar.
- VI) **Adenoid- cystisches CA:** makroskopisch gut abgekapselt, zeigt ähnlich den Pleomorphen Adnomen eine gallertartige Beschaffenheit. Alveolär- kribriformer Aufbau und epithel- drüsig Struktur mit Einschluss von PAS- positiven Schleimanteilen. Die Epithelstränge bestehen aus 2 Typen von Epithelzellen (Gangsystem und Myoepithelzellen).
- VII) **Basalzell- Adeno- CA:** Aufbau erinnert an Basaliom. Kleine runde Zellen mit wenig Cytoplasma und dunklem basophilem Zellkern und polygonale längliche Zellen mit eosinophilem Zytoplasma und einem größeren, leicht basophilem Zellkern.
- VIII) **Epithelial- myoepitheliales CA:** bestehend aus 2 Zelltypen, die gangartige Strukturen bilden. Eine innere Schicht aus flachen Gangepithelzellen und eine äußere Schicht aus Klarzellen. Diese Zellen sind positiv für S-100 Protein und Myosin. In den Zellen ist Glykogen nachweisbar.
 - IX) **P16 ICH:** schwache Färbung
 - X) **P16 ICH:** mittlere Färbung
 - XI) **P16 ICH:** starke Färbung



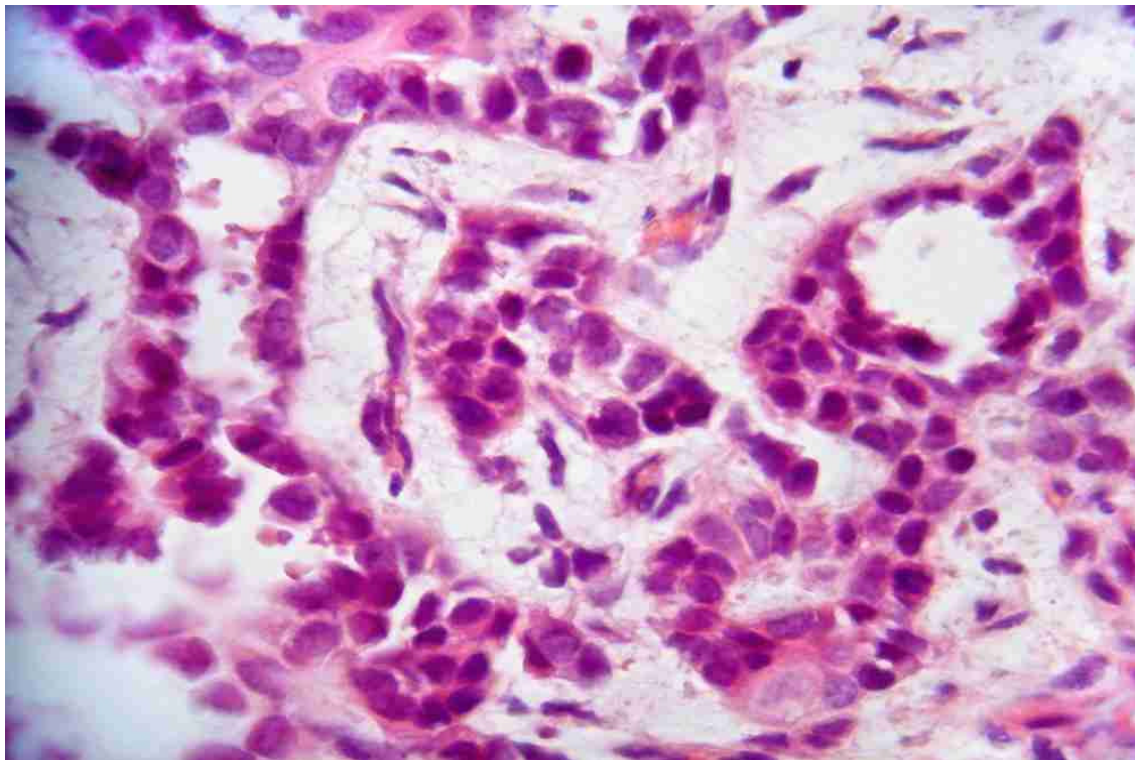
I. Mukoepidermoid- CA



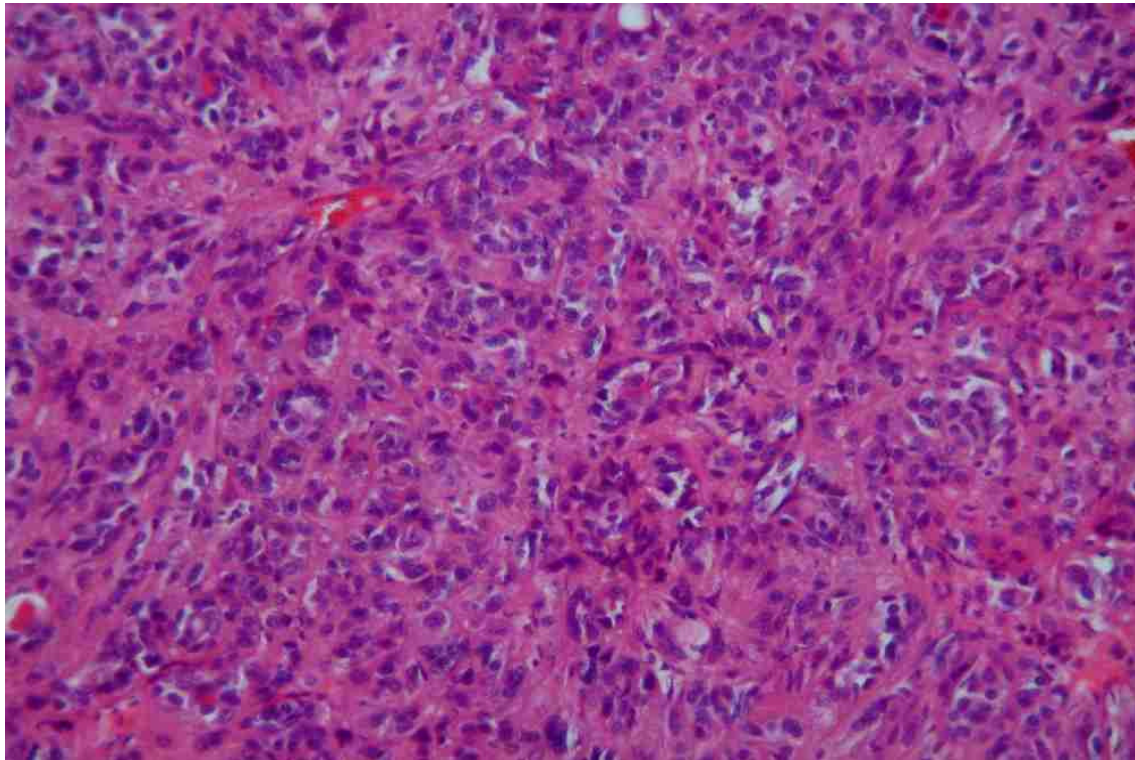
II. Adeno- CA



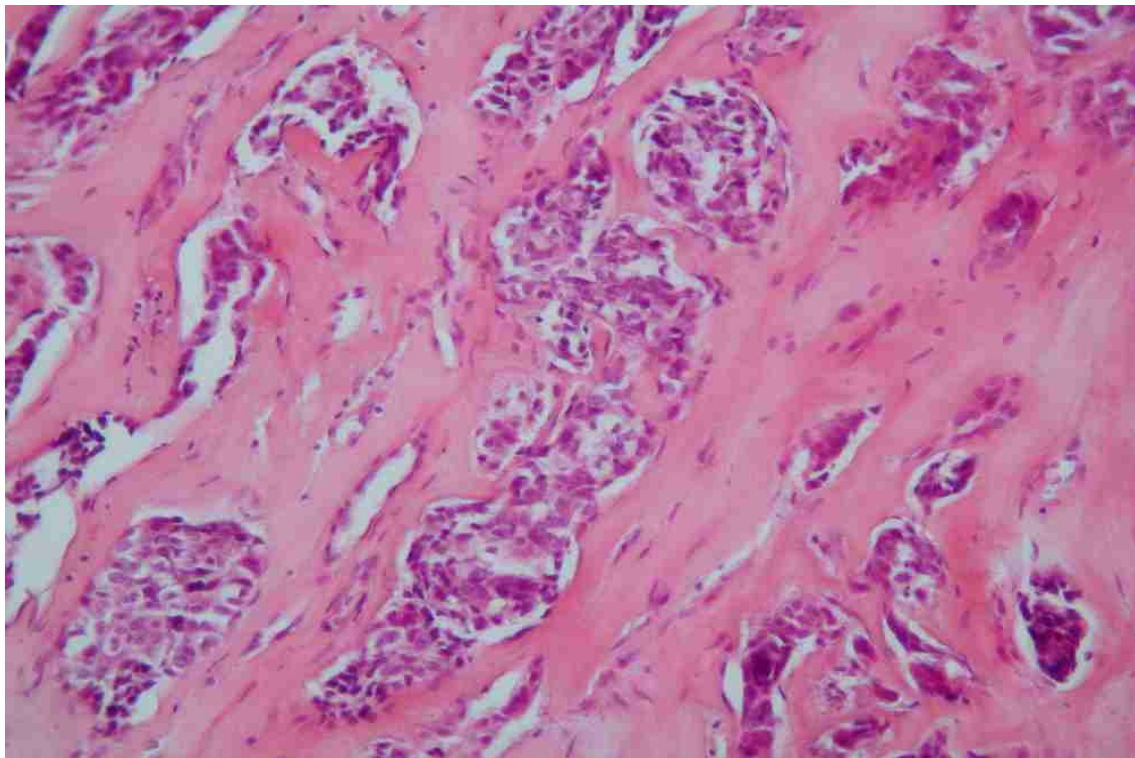
III. Myoepithelial CA



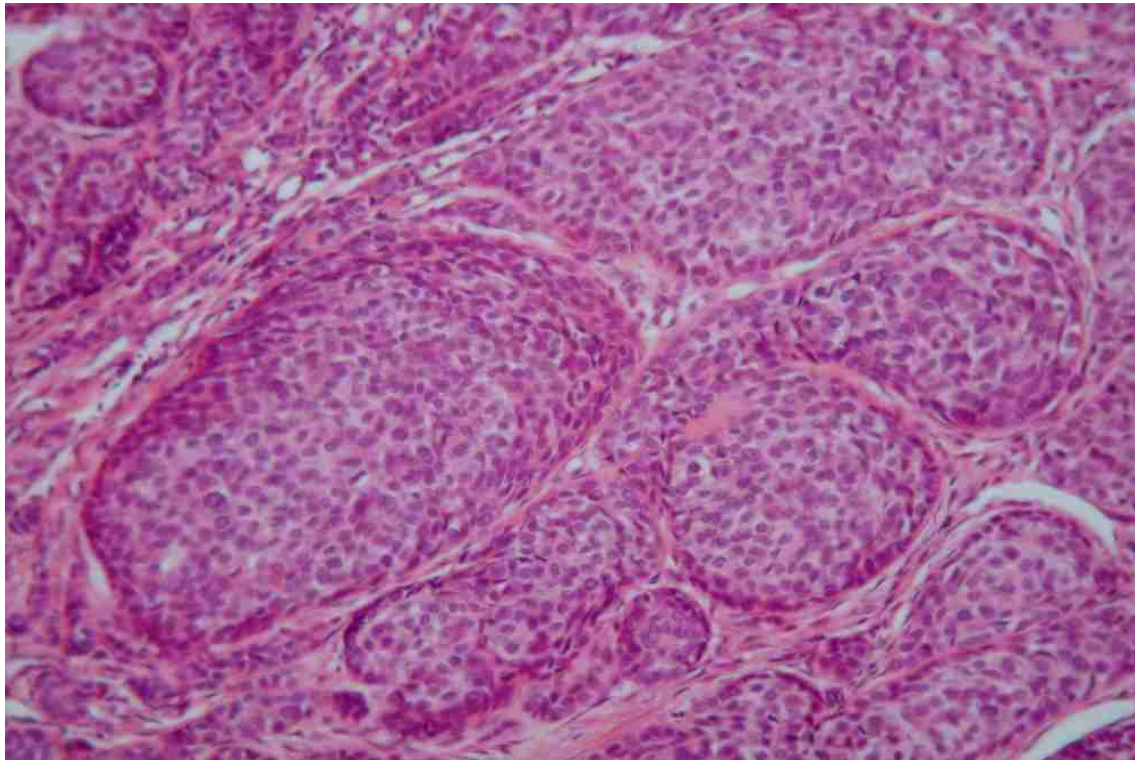
IV. Adenoid-squamous CA



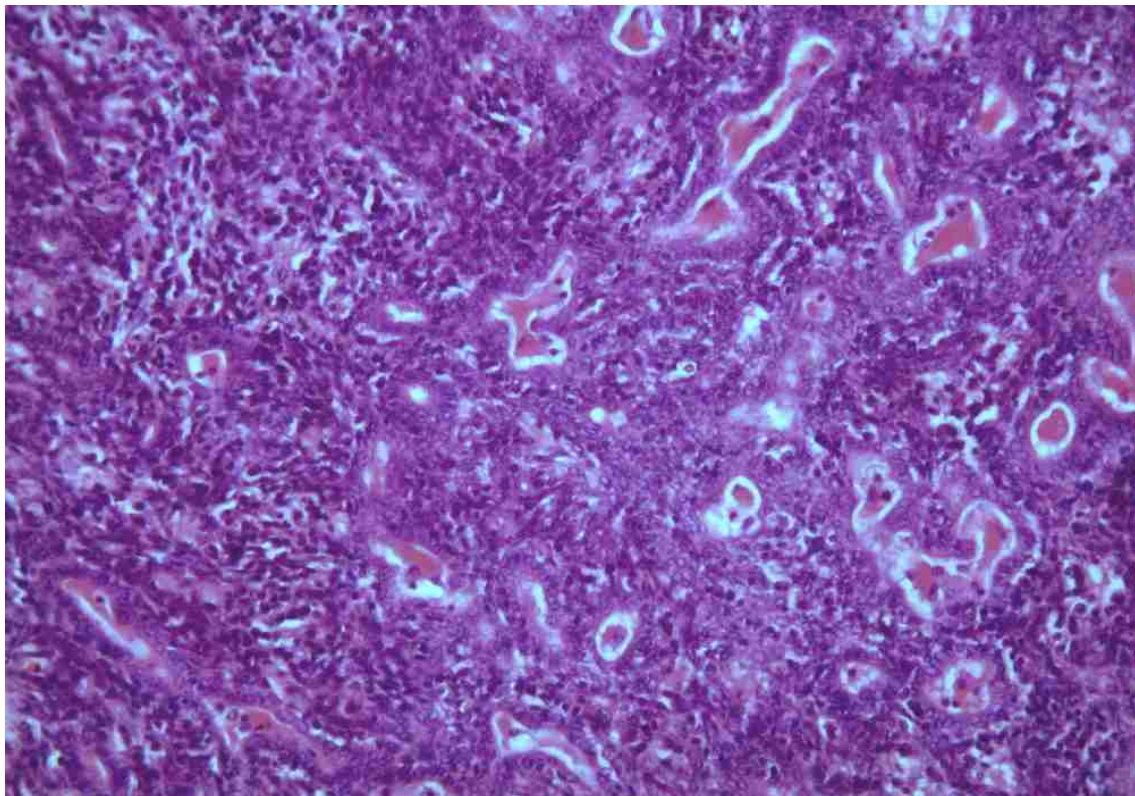
V. Undifferenziertes CA



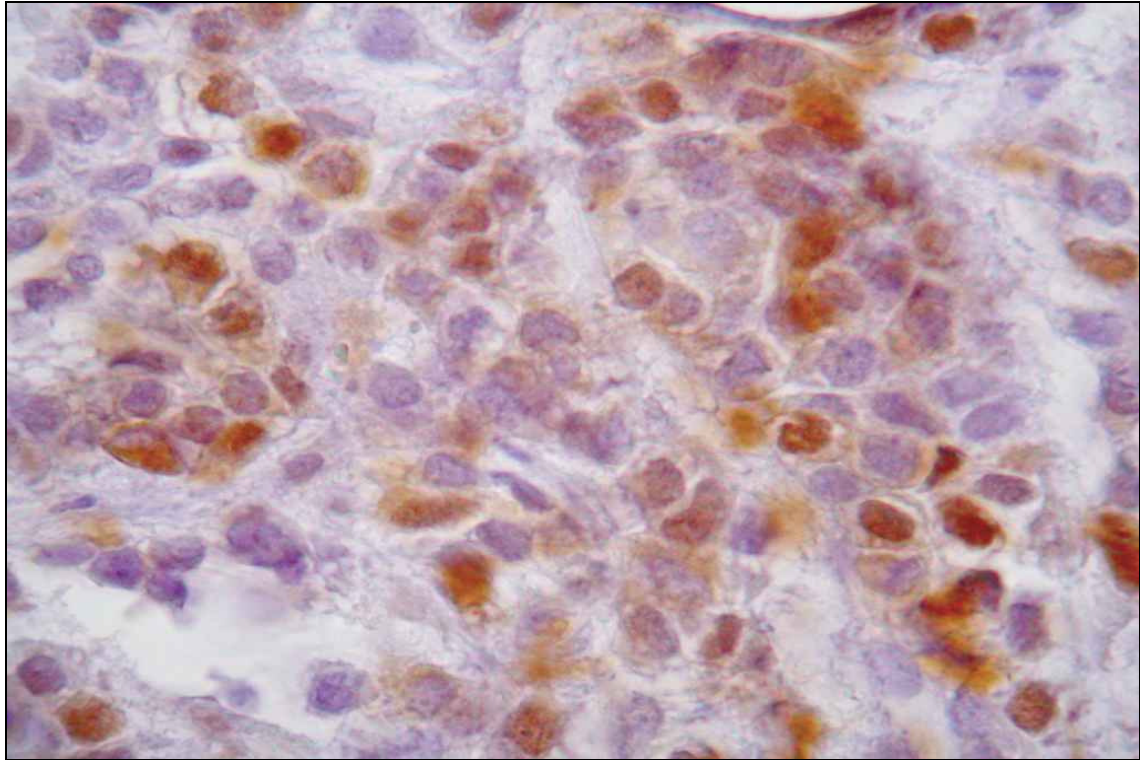
VI. Adenoid-cystisches CA



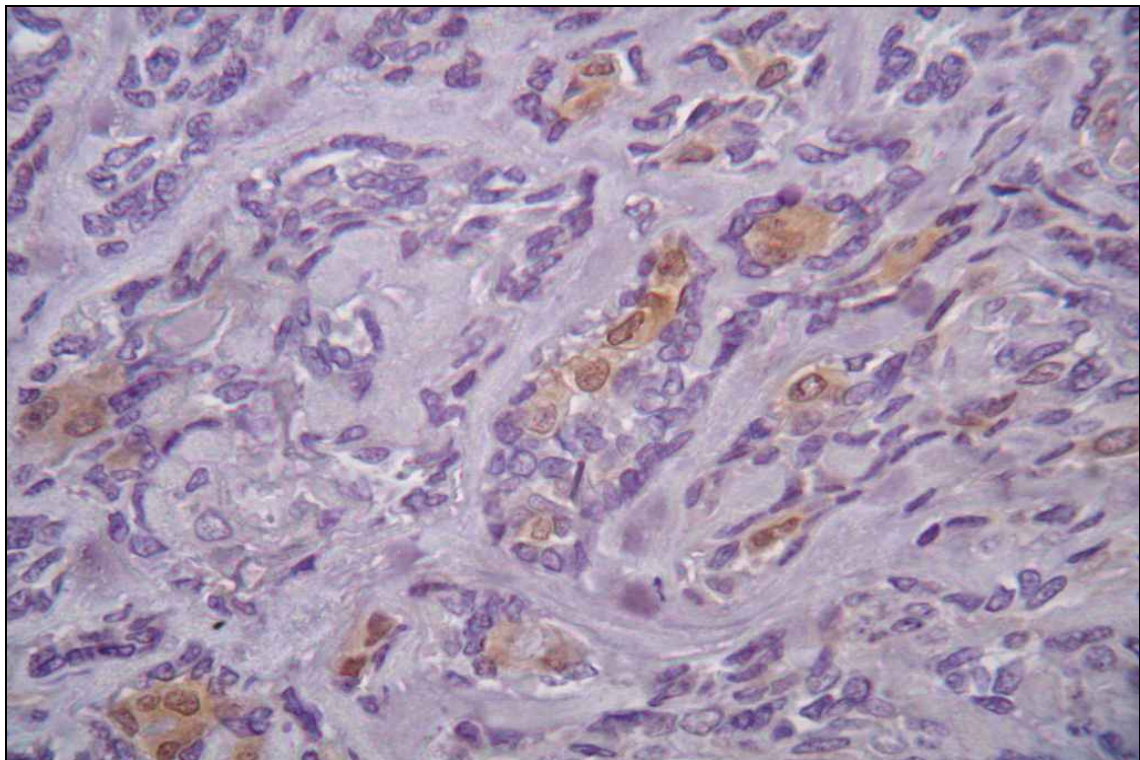
VII. Basalzell- Adeno- CA



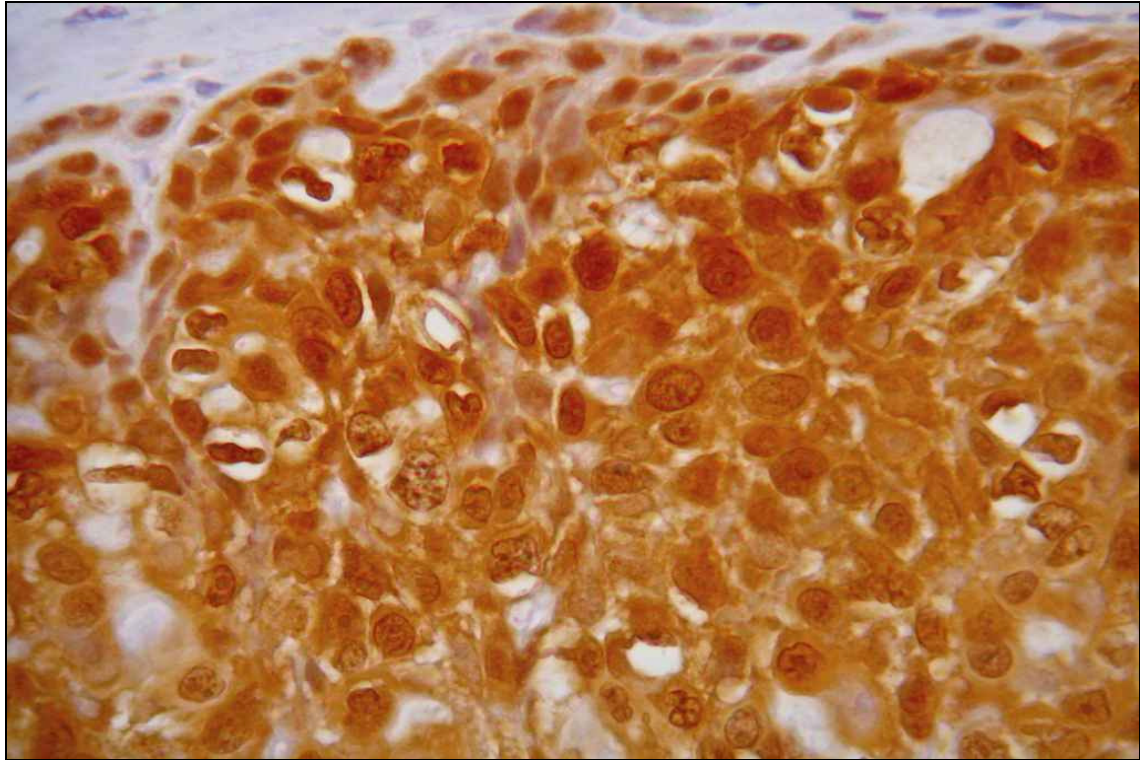
VIII. Epithelial- myoepitheliales CA



IX. P16- IHC mittlere Färbung (++)



X. P16- IHC schwache Färbung (+)



XI. P16 IHC starke Färbung (+++)

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

Anderson MLM, Spandidos DA Onco- suppressor genes and their involvement in cancer.
Anticancer res 8:873-880 (1998)

Arap W, Knudsen ES, Wang JY, Canene WK, Huang HJ Point mutations can inactivate in vitro and in vivo activities of the p16(INK4a)/CDKN2 in human glioma
Oncogene 14, 603- 609 (1997)

Barton Rogers B, Alpert LC, Hine EA; Buffone GJ Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction
Am J Pathol 136:541-48 (1998)

Becelli R, Frati R, Renzi G, Ianetti G. Facial nerve functionality after parotid tumors surgery
J Exp Clin Cancer Res 1999 Dec; 18(4):469-73

Beerendonk van HM, Rozeman LB, Taminiou A, Sciot R, Bovee J, Cleton- Jansen AM- Ho- gendoorn PCW. Molecular analysis of the INK4A-ARF gene locus in conventional (central) chondrosarkomas and enchondromas: indication of an important gene for tumour progression
Journal of Pathology 2004; 202:359-366

Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Magagnoli G, Ragazzini P, Gobbi GA, Sangiorgi L, Pazzaglia L, Asp J, Brantsing C, Picci P Involvement of INK4a gene products in the patho- genesis and development of human osteosarkoma
Cancer 2001 Dec 15:92(12):3062-7

Bishop JM Molecular themes in oncogenesis
Cell 64:235-248 (1991)

Bogenrieder T, Landthaler M, Stol W. P16 INK4a/MTS1/CDKN2_ das „Melanomgen“
Der Hautarzt 49,2:91-100 (2001)

Bonetta L. Tumor suppressor genes. Open questions on p16.

Nature 370:180 (1994)

Bornstein SR, Willenberg HS, Scherbaum WA Progress in molecular medicine: "laser capture microdissection"

Med Klein 1998 Dec 15;93(12):739-43

Böcker, Heitz, Denk, Lehrbuch der Pathologie 1996

Bullerdiek J, Wobst G, Meyer- Bolte K, Chilla R, Haubrich J, Thode B, Bartnitzke S Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas. Correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behaviour.

Cancer Genet Cytogenet 65: 27-31 (1993)

De Araujo VC, de Sousa SO, Carvalho YR, de Aroujo NS Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors

Appl Immunohistochem Mol Morphol 2000 Sep;8(3):195-202

Elledge SJ, Winston J, Harper JW A question of balance: the role of cyclin- kinase inhibitors in development and tumorigenesis.

Fend F, Raffeld M. capture microdissection in pathology

J Clin Pathol 2000 Sep;53(9):666-72

Ellis GL, Auclair PL Malignant mixed tumor. In: Atlas of tumor pathology, third series, Fascicle 17: Tumors of the salivary glands. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, pp 228-251, 1996

El Naggar AK, Callender D, Coombes MM, Hurr K, Luna AL, Batsakis JG. Molecular genetic alterations in carcinoma ex- pleomorphic adenoma: A putative progression model?

Genes Chromosomes Cancer 27:162- 168, 2000

Gadd M, Pisc C, Branda J, Ionescu- Tiba V, Nikolic Z, Yang C, Wang T, Shackelford GM, Cardiff rd, Schmidt EV. Regulation of cyclin D1 and p16(INK4a) is critical for growth arrest

during mammary involution

Cancer Res 2001 Dec 15;61(24):8811-9

Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE Immunohistochemical detection of cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16 INK4A in archival solid tumours: correlation with retinoblastoma protein expression.

Cancer Res, 55, 6006-6011 (1995)

Geradts J, Wilentz RE, Roberts H Immunohistochemical detection of the alternate INK4a-encoded tumor suppressor protein p14(ARF) in archival human cancers and cell lines using commercial antibodies: correlation with p16 (INK4a) expression

Mod Pathol 2001 Nov;14(11):1162-8

Gonzales- Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing.

Cancer Res, 55, 4531-4535 (1995)

Goodisson DW, Burr RG, Creedon AJ, Stirling RW, Morgan PR, Odell EW, Buff RG A case of metastasizing pleomorphic adenoma

Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999 Mar;87(3):341-5

Gruttgen A, Reichenzeller M, Junger M, Schlien S, Affolter A, Bosch FX Detailed gene expression analysis but not microsatellite marker analysis of 9p21 reveals differential defects in the INK4a gene locus in the majority of head and neck cancers

J Pathol 2001 Jul;194(3):311-7

Hafkamp HC, Speel EM, Haesevoets A, Bot F, Dinjens WNM, Ramaekers FCS, Hopman AN, Manni JJ. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV16/18 DNA and overexpression of p16INK4a and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8

International Journal of Cancer 2003, Aug,107(3), 394-400

Hall M, Peters G Genetic alterations of cyclin, cyclin- dependant kinases, and cdk inhibitors in human cancer

Adv. Cancer Res 68, 68-108 (1996)

Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa J, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with an aberrant DNA-Methylation in all common human cancers.

Cancer Res, 55, 4525- 4530 (1995)

Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes.

Curr Opin Genet Dev 4:135-141 (1994)

Hirama T, Koeffler HP Role of the cyclin- dependent kinase inhibitors in the development of cancer.

Blood 86:841-854 (1995)

Hoorweg JJ, Hilgers FJ, Keus RB, Zoetmulder FA, Loftus BM Metastasing pleomorphic adenoma: a report of three cases

Eur J Surg Oncol 1998 Oct;24(5):452-5

Hussussian C J et al. Germline p16 mutations in familial melanoma

Nature Genet 8, 15-21 (1994)

Ishikawa N, Hashimoto K Bilateral pleomorphic adenoma of the parotid gland

J Otolaryngol 1998 Apr; 27(2):94-6

Ishinaga H, Kato A, Yamada H Neck dissection for salivary gland carcinoma

Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho 1998 Jul;101(7):895-9

Jones AS, Beasley NJP, Houghton DJ, Helliwell TR, Husband DJ. Tumours of the minor salivary glands.

Clin Otolaryngol 23:27-33, 1998

Jin C, Martins C, Jin Y, Wiegant J, Wennerberg J, Dictor M, Gisselsson D, Stromberg B, Fonseca I, Mitelman F, Tanke HJ, Hoglund M, Mertens F. Characterisation of chromosome aberrations in salivary gland tumours by FISH, including multicolor COBRA- FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2001; 30: 161-167

Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth a, Casals T, Kremensky I SSCP analysis: a blind sensivity trial
Hum Mutat 1997;10(1):65-70

Kamb A et al. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus.
Nature Genet 8, 23-26 (1994)

Kamb A. Cell cycle regulators and cancer
TIG 11:136-140 (1995)

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach- Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M Overexpression of p16(INK4a) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri
Int J cancer 2001 Apr 15;92(2):276-84

Klijanienko J, Servois V, Jammet P, Pouillart P, Vielh P, El- Naggar AK Pleomorphic adenoma
Am J Surg Pathol 1998 Jun;22(6): 772-3

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E Tumour- derived p16 alleles encoding proteins defective in cell- cycle inhibition
Nature 375, 506- 510 (1995)

Larsen CJ. P16 INK4A: a gene with a dual capacity to encode unrelated proteins that inhibit cell cycle progression.
Oncogene, 12, 2041-2044 (1996)

Lee AW, Li JH, Shi W, Li A, Ng E, Liu TJ, Klamut HJ, Liu FF. P16 Gene therapy: A potentially efficacious modality for nasopharyngeal carcinoma
Mol Cancer Therapy 2003 Febr, 2, 961-969

Little M, Wainwright B Methylation and p16:suppressing the suppressor.
Nature Med 1:633-634 (1995)

Lukas J et al. Retinoblastoma- protein- dependant cell- cycle inhibition by the tumour suppressor p16
Nature 375, 503-506 (1995)

Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D A novel p16 INK4A transcript.
Cancer Res 55:2995-2997 (1995)

Martin EA, Robinson PJ, Franklin RA. Oxidative stress regulates the interaction of p16 with Cdk4
Biochem Biophys Res Commun 2000 Sep 7;275(3):764-7

Martins C, Fonseca I, Roque L, Pinto AE, Soares J. Malignant salivary gland neoplasms: a cytogenetic study of 19 cases
Eur J Cancer B oral pathology 2005

Masumoto N, Fuji T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, Susumu N, Mukai M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S P16INK4a overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix
Human Pathology 2003 Aug, 34(8), 778-783

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D 5`CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers.
Nat Med. 1995 Jul;1(7):686-92

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, Kelp B, Löning T Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype
Breast cancer Res Treat 2001 May;67(1):61-70

Milde- Langosch K, Riethdorf L, Bamberger A, Löning T. P16/MTS1 and RB expression in endometrial carcinomas
Virchows archive (1999) 434: 23-28

Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusukawa N, Highsmith WE Single- strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel- based mutation detection
Electrophoresis 1999 Jun;20(6):1177-85

Olsen KD, Lewis JECarcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review
Head Neck 2001 Sep;23(9):705-12

Omura- Minimisawa M, Diccianni MB, Chang RC, Batova A, Bridgeman LJ, Schiff J, Cohn SL P16(INK4a)/p14(ARF) cell cycle regulatory pathways in primary neuroblastoma:p16 expression is associated with advanced stage disease
Clin Cancer Res 2001 Nov;7(11):3481-90

Plath T, Detjen K, Welzel M, von Marschall Z, Murphy D, Schirner M, Wiedenmann B, Rowsewicz A novel function for the tumor suppressor p16(INK4a): induction of anoikis via upregulation of the alpha(5)beta(1) fibronectin receptor
J cell Biol 2000 Sep 18;150(6):1467-78

Rao PH, Murty VV, Louie DC, Chaganti RS. Nonsyntenic amplifications of MYC with CDK4 and MDM2 in malignant mixed tumour of salivary gland
Cancer Genet Cytogenet 1998; 105:160-163

Rice DH, Batsakis JG, McClatchey KD Postirradiation malignant salivary gland tumor
Arch Otolaryngol. 102(11):699-701.

Rocco JW, Sidransky D. (MTS-1/CDKN/INK4a) in cancer progression
Exp Cell Res 2001 Mar 1064(1):42-55

Rohen C, Rogalla P, Meyer- Bolte K, Bartnitzke S, Chilla R, Bullerdiek J Pleomorphic adenomas of HMGIY rearrangements.

Cancer Genet Cytogenet 111: 178-181 (1999)

Russo AR, Tong L, Lee JO, Jeffrey PD, Jeffrey NP Structural basis for inhibition of the cyclin- dependant kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4.

Nature 395,237-243 (1998)

Sahm, Caspary Gastroenterologische Onkologie.

Schattauer Verlag 2004

Serrano M, Lee HW, Chin L, Cordon- Cardo C, Beach D Role of the INK4A locus in tumor suppression and cell mortality.

Cell, 85, 27-37 (1996)

Shapiro GI, Rollins BJ P16 INK4A as a tumor suppressor.

Biochem Biophys Acta 1242, 165-169 (1996)

Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Kiyota A, Yoshihama Y, Ueyama Y, Matsumura T Infrequent alternations of RB pathway (Rb-p16INK4A-cyclinD1) in adenoid cystic carcinoma of salivary glands.

Anticancer Res. 2000 May-Jun;20(3B):2169-75

Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single- strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products.

Oncogene. 1990 Jul;5(7): 1037-43

Wang W, Wu J, Tong T Characterization of regulatory elements on the promoter region of p16(INK4a) that contribute to overexpression of p16 in senescent fibroblasts

J Biol Chem 2001 Dec 28;276(52):655-61

Wolf JS,Goldberg AN, Bigelow DC Pleomorphic adenoma of the parotid
Am Fam Physician 1997 Jul;56(1):185-92

Wong SC, Chan JK, Lee KC, Hsiao WL Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin
D1/D3 and their relationship to cell proliferation, apoptosis and tumour progression in inva-
sive ductal carcinoma of the breast
J Pathol 2001 May;194(1):35-42

Xie D, Sham JST, Zeng WF, Lin HL, Che LH, Wen JM, Fang Y, Hu L, Guan XY Heteroge-
nous expression and association of Beta- Catenin, p16 and c-myc in multistage colorectal tu-
morigenesis and progression detected by tissue microarray
Cancer Cell Biology 2003 Sep, 107(6) 896-902

Yamamoto Y, Kishimoto Y, Wistuba II, Virmani AK, Vuitch F, Gazdar AF, Albores-
Saavedra J. DNA- analysis at p53 locus in carcinomas arising from pleomorphic adenomas of
salivary glands: comparison of molecular study and p53 immunostainig
Pathol Int 1998 Apr;48(4):265-72

Yang R, Gombart AF, Serrano M, Koeffler HP Mutational effects on the p16INK4a tumor
suppressor protein
Cancer Res 55, 2503- 2506 (1995)

Yasumoto M,Sunaba K,Shibuya H, Kurabayashi T Reurrent pleomorhic adenoma of the head
and neck
Neuroradiology 1999 Apr;41(4):300-4

Zielinski GD, Snijders PJF, Rozendaal L, Daalmeijer NF, Risse EKJ, Voorhorst FJ, Jiwa
NM, Van der Linden HC, Schipper FA, Runsink AP, Meijer CJ The presence of high- risk
HPV combined with specific p53 and p16INK4a expression patterns points to high- risk HPV
as the main causative agent for adenocarcinoma of the cervix
The Journal of Pathology 2003 Oct, 201(4) 535-543

7.2. Tabellenverzeichnis

2. Material und Methoden	Seite
Tabelle I: Untersuchungsgut mit histologischer Klassifizierung Karzinome im pleomorphen Adenom	15
Tabelle II: Vergleichsgruppe Karzinome	16
Tabelle III: Vergleichsgruppe pleomorphe Adenome	16
3. Ergebnisse	
Ergebnistabelle: Ergebnisse der Mutationsanalyse und Immunhistochemie	57

7.3. Verzeichnis der Abbildungen

2. Material und Methoden

Abb. I: Schematische Darstellung des Mikrodisektions- Mikroskopes 30

3. Ergebnisse

Abb.I: Altersverteilung 47

Abb.II: Lokalisation 481

Abb.III: Verteilung der histologischen Differenzierungen 49

Abb.IV: Ki67- Immunhistochemie 51

Abb.V: p16- Immunhistochemie in Karzinomen im pleomorphen Adenom 52

Abb.VI: p16- Expression in den Karzinomanteilen 53

Abb.VII: p16-Immunhistochemie in Karzinomen 54

Abb.VIII: p16- Immunhistochemie in pleomorphen Adenomen 58

Abb.IX: SSCP- Gel- Mutationen im Exon 2b 60

Abb.X: SSCP- Gel- Mutationen in Exon 2a 61

7.4. Verzeichnis der Abkürzungen

ABI	Applied Biosystems
Ag	Antigen
AgNO ₃	Silbernitrat
al.	Alius/alii
Ala	Alanin
Arg.	Arginin
Asp.	Asparagin
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
ATP	Adenosintriphosphat
B	Buffer
BE	Elution Buffer
BRCA	Breast cancer
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca.	Karzinom
Cap.	Capan
CDK	Cyclin- dependent kinase
CMV	Cytomegalie- Virus
CT	Computertomografie
EBV	Epstein- Barr- Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gl.	Glandula
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Glu	Glutamin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPV	Humanes Papilloma-Virus
ICH	Immunhistochemie

IgG	Immunglobulin
l	Liter
LOH	loss of heterozygosity
mM	millimolar
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MRT	Magnetresonanztomografie
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mg	Milligramm
min.	Minute
Na	Natrium
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaCO ₃	Natrumcarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
NF	Neurofibromatose
Nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PH- Wert	lat.: potentia hydrogenii- Mass für die Wasserstoffio- nenkonzentration
PLAG-1	Pleomorphic adenoma gene 1
RB	Retinoblastom
Rez.	rezidivierend
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotations per minute
s	Sekunde
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TBE	Tris- Borat- EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGGE	Temperatur- Gradienten- Gelelektrophorese

TNM	tumor, nodes, metastasis
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
WT	Wildtyp
VHL	Von- Hippel- Lindau
V	Volt
WHO	World health organization
WT	Wilms- Tumor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7.5. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. T. Löning, Institut für Pathologie der Universität Hamburg, möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Frau Dr. rer. nat. Kerstin Röser, Institut für Oralpathologie der Universität Hamburg, bin ich für die wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung der Laborarbeiten und die Unterstützung der Auswertung zu großem Dank verpflichtet.

Herr Dr. med. Thorsten Jäkel möchte ich für die Unterstützung und Beratung bei der histologischen Auswertung danken.

Frau Tanja Carstens danke ich für die freundliche Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Herrn Stefan Schröder danke ich für die technische Unterstützung bei der Erstellung der Fotos.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung.

7.6. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Susanne Krusche

Wohnort: Calenberger Esplanade 5
30169 Hannover
Tel: 0179/ 6650225
0511/ 988 65 52

Geburtstag
und -ort: 09.12.1965 in Delmenhorst

Lebenslauf, Tabellarisch

1978 - 1985 19.06.1985	Gymnasium an der Willmsstrasse, Delmenhorst Abitur
1986 – 1992	Kommunikations- Design- Studium FH Kiel Diplomprüfung, Note: gut
1992 - 1996	Tätigkeit als Grafik- Designerin in Kiel
04/1996 – 05/2002: 27.05.2002:	Studium Humanmedizin Universität Hamburg Ärztliche Prüfung, Gesamtnote: sehr gut (1.49)
05/2002 bis 09/2002	Abschluss der Promotionsarbeiten im Labor des Institutes für Pathologie UKE
16.09.2002:	Geburt meines Sohnes Jan
01.12.2002	Ärztin im Praktikum Medizinische Hochschule Hannover, Abt. Hepatologie, Gastroenterologie und Endokrinologie.
01.06.2004	Ärztliche Approbation
Seit 01.06.2004	Assistenzärztin MHH Abt. Hepatologie, Gastroenterologie und Endokrinologie

7.7 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher keinem Fachvertreter an einer anderen Hochschule vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

