Institut für Oralpathologie
des Universitätsklinikums Hamburg – Eppendorf
Prof. Dr. Thomas Löning

# Phäno- und genotypische Charakterisierung eines langzeitig rezidivierenden pleomorphen Adenoms - eine Verlaufsstudie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Claudine Wiedhahn
aus Hamburg

Hamburg 2007

## Inhaltsverzeichnis


### 1. Einleitung

1.1. Das pleomorphe Adenom 4
1.2. Pleomorphic adenoma gene 1 (*PLAG1*) 6
1.3. HMGA 7
1.4. EMMPRIN (CD147) und Fos-related-antigen 2 (Fra-2) 9
1.5. Fragestellung 11

### 2. Material und Methoden

2.1. Material
2.1.1. Untersuchungsgut 12
2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Geräte 13
2.1.3. Chemikalien 14
2.1.4. Lösungen 15

2.2. Methoden
2.2.1. Zellkulturen
2.2.1.1. Anlegen einer Zellkultur 18
2.2.1.2. Pflege der Zellkulturen 18
2.2.1.3. Subkultivierung der Zellen 18
2.2.1.4. Erstellen einer Wachstumskurve 19
2.2.1.5. Einfrieren von Zellen 19

2.2.2. Zytogenetische Methoden
2.2.2.1. Chromosomenpräparation 19
2.2.2.2. G-Banding (Seabright, 1971) 20
2.2.2.3. Karyotypanalyse 20

2.2.3. Vorbereitungen für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung
2.2.3.1. DNA-Isolierung zur Herstellung von DNA-Sonden 20
2.2.3.2. Konzentrationsbestimmung der DNA über Agarosegel-Elektrophorese 21
2.2.3.3. Indirekte Markierung der DNA-Sonden 22

2.2.4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Zellen
2.2.4.1. Prä-Hybridisierung 22
2.2.4.2. Denaturierung und Hybridisierung 23
2.2.4.3. Post-Hybridisierung 23
2.2.5. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Paraffingewebe
2.2.5.1. Vorbehandlung der Objektträger 24
2.2.5.2. Prä-Hybridisierung 24
2.2.5.3. Denaturierung und Hybridisierung 24
2.2.5.4. Post-Hybridisierung 25
2.2.6. Immunhistochemie
2.2.6.1. Immunhistochemischer Nachweis der HMGA1-,HMGA2-, CD 147- und Fra-2- Expression mit der DAB-Methode 25
2.2.7. Scid-Maus 27

## 3. Ergebnisse

3.1. Histologie der Rezidive des pleomorphen Adenoms 28
3.2. Zellkulturen
3.2.1. Wachstumsverhalten der Zellen 30
3.2.2. Etablierung und Charakterisierung einer Zelllinie 31
3.3. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung 32
3.3.1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Zellen 32
3.3.2. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Paraffingewebe (PLAG1) 33
3.3.3. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Paraffingewebe (Zentromer 17/ HER-2) 34
3.4. Immunhistochemische Untersuchungen
3.4.1. Ergebnisse zur HMGA 1-Expression 35
3.4.2. Ergebnisse zur HMGA 2-Expression 35
3.4.3. Ergebnisse zur CD 147-Expression 35
3.4.4. Ergebnisse zur Fra-2-Expression 36
3.5. Überprüfung des Tumorwachstums im Scid-Maus-Modell 36

## 4. Diskussion


4.1. Klinische Daten im Zusammenhang mit dem Auftreten von Rezidive des pleomorphen Adenoms 37

4.2. Histologische Merkmale einer malignen Transformation 37

4.3. Etablierung und Charakterisierung einer Zelllinie 39

4.4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

4.4.1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit PLAG1-spezifischen Sonden 40

4.4.2.Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit einer HER-2-Sonde in Kombination mit der Zentromer 17-Sonde 42

4.5. Immunhistochemie

4.5.1. HMGA1- und HMGA2-Immunhistochemie 43

4.5.2. CD147- und Fra-2-Immunhistochemie 44

4.6. Verhalten der Tumorzellen im Scid-Maus-Modell 45

**5. Zusammenfassung** 46

**6. Abkürzungsverzeichnis** 47

**7. Literaturverzeichnis** 48

**8. Danksagung** 59

**9. Lebenslauf** 60

**10. Erklärung** 61

# 1. Einleitung

## 1.1. Das pleomorphe Adenom

Das pleomorphe Adenom ist der häufigste benigne Tumor der großen und kleinen Speicheldrüsen.

Frauen sind von diesem Tumor etwas häufiger betroffen als Männer. Das pleomorphe Adenom kann in allen Altersgruppen auftreten, der Altersgipfel liegt jedoch im 5.-6. Lebensjahrzehnt.

In 85% tritt das pleomorphe Adenom in der Glandula parotis auf, in 10% in den kleinen Speicheldrüsen und zu 5% in der Glandula submandibularis (Seifert, 1986).

Pleomorphe Adenome weisen eine große morphologische Vielfalt auf, weshalb sie früher auch als Mischtumoren bezeichnet wurden. Die wesentlichen Bestandteile werden durch eine bindegewebige Kapsel, epitheliale und myoepitheliale Zellen sowie mesenchymale und / oder stromareiche Elemente dargestellt.

Die Kapseldicke variiert stark (Webb et al., 2001) und ist manchmal, besonders in pleomorphen Adenomen mit überwiegend mukoiden Anteilen, nur schwer zu erkennen. Die meisten Tumore zeigen Regionen, in denen das Tumorgewebe fingerähnlich in die Kapsel eindringt. Neben diesen Pseudopodien-artigen Vorwölbungen werden auch Satellitenknoten beschrieben, die durch Einwachsen des Tumorgewebes in die Kapsel entstehen (Lam et al., 1990).

Die epithelialen Anteile zeigen viele verschiedene Zelltypen - basaloide, squamöse und spindelförmige Zellen, sowie in seltenen Fällen muköse und seröse Azinuszellen.

In manchen Anteilen bilden kubische Zellen des Epithels gangartige Strukturen mit deutlichen Lumen. Häufig können auch myoepitheliale Zellen auftreten, so dass eine morphologische Ähnlichkeit zu adenoid-zystischen Karzinomen oder myoepithelialen Karzinomen bestehen kann. Das Vorkommen von Keratinperlen und Zellen mit auffallend klarem Zytoplasma können auch zu Verwechselungen mit einem Mukoepidermoidkarzinom führen.

Die mesenchymähnliche Komponente setzt sich aus mukoiden, hyalinen und chondroiden Anteilen zusammen. Eine Zunahme der Hyalinisation zeigt sich vor allem bei einigen lang bestehenden Tumoren (Auclair, 1996).

Lang bestehende pleomorphe Adenome bergen ein erhöhtes Risiko einer malignen Progression. In seltenen Fällen (3-4 %) tritt eine maligne Entartung in Form eines Karzinoms im pleomorphen Adenom auf (Seifert, 1991).

Das Karzinom im pleomorphen Adenom wird als eine Folge von genetischen Veränderungen innerhalb eines langbestehenden pleomorphen Adenoms angesehen (Righi et al., 1994; Rosa et al., 1996; El-Naggar et al., 2000; Roijer et al., 2002; Voz et al., 2004). Obwohl die Kriterien, welche die benignen Anteile von den malignen in einem Karzinom im pleomorphen Adenom unterscheiden, ausführlich beschrieben sind, gibt es keine eindeutigen histologischen Merkmale, die auf ein erhöhtes Risiko einer malignen Progression in einem benignen pleomorphen Adenom hinweisen (Auclair, 1996).

Pleomorphe Adenome können eine hohe Rate an Lokalrezidiven (20% - 45%) aufweisen, insbesondere bei Lokalisation in der Parotis und /oder vor allem, wenn der Tumor nur enukleiert wurde (Stennert, 2001). Nach einer lateralen oder totalen Parotidektomie ist die Rezidivrate (1% - 5%) jedoch wesentlich geringer (Douglas, 2001).

Unabhängig von der Operationstechnik besteht eine Korrelation zwischen dem Alter des Patienten bei dem ersten Auftreten des Tumors und der Häufigkeit der nachfolgenden Rezidive (Mc Gregor et al., 1988). Patienten mit mehr als einem Rezidiv sind deutlich jünger (mittleres Alter: 28 Jahre zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors) als Patienten, bei denen der Tumor nur einmal rezidiviert (mittleres Alter: 35 Jahre zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors) (Laskawi et al., 1998).

Überwiegend mukoide Tumore neigen zu Rezidiven (Renehan et al., 1996). Daneben sind eine geringe Kapseldicke, die Neigung des Tumors in die Kapsel einzudringen (Henriksson et al., 1998), intratumorale Risse unterhalb der Kapsel sowie das Streuen von Tumorzellen im Operationsbereich weitere mögliche Gründe für das Auftreten von Rezidiven.

Obwohl es sich bei dem pleomorphen Adenom um einen gutartigen Tumor handelt, kann es in seltenen Fällen auch zu einer Metastasierung kommen (Hoorweg et al., 1989, Goodisson et al., 1999).

Zytogenetische Studien zeigen in 70% der pleomorphen Adenome wiederkehrende spezifische chromosomale Anomalien (Sandros et al., 1990; Bullerdiek et al., 1993; Mark et al., 1997). Hierbei lassen sich vier Subgruppen unterscheiden.

Die erste, in 40% der Fälle auftretende Subgruppe zeigt strukturelle Veränderungen im Bereich der chromosomalen Bande q12 auf Chromosom 8, wobei der Bruchpunkt in der Promoterregion des *PLAG1*-Gens (pleomorphic adenoma gene) liegt. Als Folge dieses Ereignisses kommt hierbei häufig eine Translokation zwischen dem Chromosom 3 (p21) und dem Chromosom 8 (q12) vor.

Die zweite, in 8% auftretende Subgruppe ist charakterisiert durch Veränderungen des Chromosoms 12 in der Region q13-15. In dieser chromosomalen Bande konnte das HMGA2-Gen lokalisiert werden (Ashar et al., 1995; Schoenmarkers et al., 1995).
Der dritten in 23% auftretenden Subgruppe werden alle pleomorphe Adenome zugeordnet, die sporadische klonale Veränderungen aufweisen, welche weder die Chromosomen 8q12 noch 12q13-15 betreffen.
Pleomorphe Adenome mit einem normalen Karyotyp treten in 30% auf und stellen die vierte Subgruppe dar.
Einige Studien zeigen, dass Patienten mit einem pleomorphen Adenom, die einen normalen Karyotyp aufweisen, deutlich älter (ca. 51 Jahre) sind als jene, bei denen ein Adenom mit einer Veränderung des Chromosoms 8q12 auftritt (ca. 39 Jahre). Häufig stellen sich pleomorphe Adenome mit einem normalen Karyotyp stromareicher dar als Tumore mit chromosomalen Veränderungen im Bereich 8q12 (Bullerdieck et al., 1993).

### 1.2. Pleomorphic adenoma gene 1 (*PLAG1*)

*PLAG1* liegt auf Chromosom 8q12 und fungiert während der Fetalentwicklung als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expresssion von zahlreichen Wachstumsfaktoren. Die onkogene Aktivierung des Protoonkogens *PLAG1* in adulten Zellen gilt als entscheidendes Ereignis bei der Ausbildung von pleomorphen Adenomen (Kas et al., 1997; Vo et al., 1998).
Der Mechanismus der Aktivierung beruht auf einer Chromosomentranslokation, bei der ein Promoteraustausch erfolgt, wobei mehrere mögliche Translokationspartner für das *PLAG1*-Gen in Frage kommen. Während *PLAG1* nur temporär und vorrangig in der Zeit der Fetalentwicklung exprimiert wird, handelt es sich bei den Translokationspartnern um Gene, die permanent exprimiert werden.
Es werden drei mögliche Translokationspartner beschrieben. Am häufigsten findet eine Translokation mit dem CTNNB1-Gen auf Chromosom 3 (q21) statt. Das CTNNB1-Gen kodiert für ß-Catenin, ein Protein, das sowohl bei der Signaltransduktion als auch der Zelldifferenzierung während der Embryogenese eine wesentliche Rolle spielt (Miller et al., 1996).
Ein weiterer Translokationspartner ist das leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) -Gen auf Chromosom 5 (p13) (Voz et al., 1998) sowie ein weiteres Gen auf Chromosom 3 (p21.3 -22), welches für den Elongationsfaktor SII kodiert (Åström et al., 1999).

Bei allen diesen Translokationen kommt es durch die Fusion zu einem sog. ,,promotor - swapping“. Die Fusion erfolgt immer in der nichtkodierenden 5’–Region des *PLAG1*-Gens, so dass ein Austausch der regulatorischen Kontrollelemente stattfindet, ohne dabei die kodierende Sequenz des Gens zu beeinträchtigen. Der Promotoraustausch bewirkt eine Aktivierung des *PLAG1*-Gens, das normalerweise im adulten Gewebe inaktiv ist, und es kommt zu einer außerplanmäßigen Expression von PLAG1 in den genetisch veränderten Zellen (Kas et al., 1997).
Diese chromosomalen Veränderungen, die das *PLAG1*-Gen betreffen, wurden zuerst im pleomorphen Adenom der Speicheldrüse entdeckt. Später wurden auch für Lipoblastome chromosomale Veränderungen der Bande 8q12 beschrieben, die zu einer hochregulierten Expression des Transkriptionsfaktors PLAG1 führen (Åström et al., 2000; Hibbard et al., 2000).

### 1.3. HMGA

Die *HMGA*-Gene kodieren für die HMGA-Proteine. Zu unterscheiden ist das *HMGA*1-Gen, welches auf der chromosomalen Bande 6p21.3 lokalisiert ist von dem *HMGA*2-Gen, das sich auf der chromosomalen Bande 12q13-15 befindet. Diese Proteine gehören zu den High-Mobility-Group-Proteinen. Hierbei handelt es sich um kleine, Chromatin-assoziierte nicht-Histon-Proteine. Die HMGA-Proteine besitzen drei DNA-bindende Domänen, die sog. AT-hooks, mit denen sie an die kleine Furche AT- reicher DNA-Sequenzen binden (Reeves et al., 1990). Sie können allein keine Transkription auslösen, sondern bewirken durch Änderung der DNA-Konformation definierte Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechsel- wirkungen. Sie werden deshalb auch als architektonische Transkriptionsfaktoren bezeichnet (Wolffe, 2001). Die *HMGA*-Gene werden während der Embryonalentwicklung stark exprimiert, jedoch ist ihre Expression in differenzierten und sich nicht-teilenden Zellen sehr gering oder nicht nachzuweisen (Rogalla et al., 1996; Hirning-Folz et al., 1998).
In neoplastischen Zellen kann es aufgrund chromosomaler Veränderungen zu einer Reaktivierung der Expression der *HMGA*-Gene kommen (Schoenmakers et al., 1995).
In verschiedenen benignen mesenchymalen Tumoren wie Lipomen, Uterusleiomyomen, Hamartomen der Lunge und der Brust, Fibroadenomen der Brust, Angiomyxomen, sowie in den epithelialen Endometriumpolypen und pleomorphen Adenomen ist das *HMGA2*-Gen von Chromosomenveränderungen betroffen (Ashar et al., 1995; Schoenmarkers et al., 1995). Auch das *HMGA1*-Gen

kann in vielen gutartigen mesenchymalen Tumoren wie Uterusleiomyomen, Hamartomen der Lunge und der Brust und in epithelialen Endometriumpolypen von Chromosomenaberrationen betroffen sein (Dal Cin et al., 1997; Kazmierczak et al., 1998; Kazmierczak et al., 1999). In diesen benignen Tumoren beruht die Reaktivierung der Expression der *HMGA*-Gene auf chromosomalen Veränderungen in den Banden 6p21.3 bzw. 12q13-15 (Williams et al., 1997; Henning et al., 1997; Gattas et al., 1999; Sornberger et al., 1999). Es kann aber auch in malignen Tumoren zu einer Reaktivierung der *HMGA*-Genexpression kommen, die wahrscheinlich nicht auf Chromosomenaberrationen zurückzuführen ist, sondern auf Mechanismen der Genregulation beruht. Für das *HMGA1*-Gen konnte eine Reaktivierung der Expression in vielen verschiedenen Karzinomen wie dem Schilddrüsenkarzinom, kolorektalen Karzinom, Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom, Zervixkarzinom, Ovarialkarzinom und Magenkarzinom nachgewiesen werden (Tamimi et al., 1993; Chippetta et al., 1995; Bandiera et al., 1998; Abe et al., 2000; Chippetta et al., 2001; Masciullo et al., 2003; Nam et al., 2003). Eine veränderte Expression des *HMGA2*-Gens wurde in Leukämien, Lungenkarzinomen, Liposarkomen und Pankreaskarzinomen beobachtet (Rommel et al., 1997; Berner et al., 1997; Rogalla et al., 1998; Abe et al., 2003).

Für HMGA1 konnte gezeigt werden, dass die Menge an *HMGA1*-Proteinen in den Tumorzellen häufig positiv mit einer schlechten Differenzierung und/oder bei Karzinomen mit einem erhöhten Metastasierungspotential korreliert (Tamimi et al., 1993; Fedele et al., 1996; Abe et al., 2000). Zudem gilt die Expression von *HMGA1* bei Schilddrüsenzellen als eine Voraussetzung für eine maligne Transformation (Berlingieri et al., 2002).

Es wird vermutet, dass eine hohe *HMGA2*-Expression, die auf einer Genamplifikation beruht, von großer Bedeutung für die maligne Transformation pleomorpher Adenome ist (Roijer et al., 2002).

In einer Studie von Miyazawa et al. (2004) wurde die Expression von *HMGA2* in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle untersucht. Es konnte gezeigt werden, das 100% der Patienten (23 von 23 untersuchten Patienten) mit einem HMGA2 positiven Tumor an einem Tumorrezidiv starben und das weitere 100% der Patienten (11 von 11 untersuchten Patienten), deren Tumor HMGA2 negativ war, ohne ein Tumorrezidiv überlebten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die *HMGA2*-Expression die Möglichkeit birgt, Rückschlüsse auf die Rezidivneigung eines Tumors und dessen Aggressivität zu ziehen.

## 1.4. EMMPRIN (CD147) und Fos-related-antigen 2 (Fra-2)

Ein Hauptmerkmal maligner epithelialer Tumore ist ihre Fähigkeit zu metastasieren. Dieser Prozess besteht aus mehreren Teilschritten, an dem zahlreiche Enzyme und regulatorische Faktoren beteiligt sind. Die Karzinomzellen wandern in das umliegende Gewebe ein, um sich dort anzusiedeln. Dazu müssen sich die Tumorzellen von ihrer Basalmembran lösen und durch die extrazelluläre Matrixbarriere wandern.

An der Degradierung der kollagenen Matrix sind vorrangig Matrixmetalloproteinasen (MMPs) beteiligt, die die Invasion der Tumorzellen fördern (Yan et al., 2005).

Beim CD147 (EMMPRIN = extrazellular matrix metalloproteinase inducer) handelt es sich um ein membranständiges Glycoprotein, das die Fähigkeit besitzt, die Expression von MMPs (Matrixmetalloproteinase) zu stimulieren (Gabison et al., 2005; Sun et al., 2001). Eine erhöhte CD147-Expresssion wurde in zahlreichen malignen Tumoren beobachtet. Bei Mammakarzinomen wird vermutet, dass CD 147 eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression spielt (Reimers et al., 2004; Tang et al., 2005).

Auch maligne Speicheldrüsentumore zeigen wesentlich häufiger eine erhöhte CD147-Expresssion als benigne pleomorphe Adenome (Riethdorf et al., 2006).

An der Regulation des proteolytischen Systems sind Transkriptionsfaktoren aus der Gruppe der AP-1-Proteine beteiligt. Hierzu gehören Fra-1, Fra-2, c-Fos und FosB aus der Fos-Familie und Mitglieder der Jun-Familie (c-Jun, JunB und JunD). Diese Proteine haben die Fähigkeit, an die Promoter- bzw. Enhancer-Region der Zielgene zu binden und auf diese Weise viele Mitglieder des proteolytischen Systems zu regulieren. Hierzu zählen neben den MMPs, Cathepsine und Mitglieder des uPA-PAI-Systems, welche an der Degradierung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix beteiligt sind und dadurch die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen ermöglichen (Milde-Langosch et al., 2004).

In einer Studie von Maruya et al. (2004) wurden pleomorphe Adenome, Mukoepidermoidkarzinome, Azinuszellkarzinome, Speichelgangkarzinome und adenoidzystische Karzinome hinsichtlich einer Über- bzw. Unterexpression von 5000 Genen im Vergleich zur Genexpression im normalen Speicheldrüsengewebe überprüft. Bei 136 Genen unterschied sich die Expression im normalen Gewebe zu der in benignen Tumoren und malignen Neoplasien. Die meisten dieser Gene zeigen funktionelle Ähnlichkeiten zu Genen, die bei Prozessen von Adhäsion und Proliferation sowie bei der Signaltransduktion beteiligt sind. Die

Daten dieser Expressionsanalyse ergaben für das pleomorphe Adenom verglichen mit normalem Gewebe der Speicheldrüse eine erhöhte Expression von 15 bekannten Genen zu denen u. a. Collagen-Typ1, Calponin, Transforming growth factor-beta und Fra-2 zählten. Zu den neun unterexprimierten Genen gehörten u. a. Galectin-9 und Human multidrug resistance protein 5 (MDR5). Verglichen mit Karzinomen zeigten pleomorphe Adenome für die Gene S-100, Galectin-9, Vimentin und einem Tyrosinkinase-Rezeptor eine erhöhte Expression.

## 1.5. Fragestellung

In der vorliegenden Studie sollte anhand eines langzeit-rezidivierenden pleomorphen Adenoms überprüft werden, ob sich tumorspezifische Merkmale und Dignitätseigenschaften im Verlauf der Erkrankung verändert hatten.

Der Tumor wurde zunächst hinsichtlich des Vorliegens von chromosomalen Veränderungen charakterisiert.

Hierzu wurde von einer Gewebeprobe des 11. Rezidivs eine Primärkultur angelegt. Das Karyogramm ergab neben anderen chromosomalen Aberrationen die für pleomorphe Adenome als charakteristisch beschriebene Translokation t(3;8), bei der das *PLAG1*-Gen betroffen ist. Mittels FISH-Analyse mit *PLAG1*-flankierenden Sonden, die den Bruchpunkt überspannen, sollte überprüft werden, ob diese Translokation bereits im Primärtumor vorlag oder ob sie im Verlauf der Erkrankung aufgetreten war.

Eine weitere für pleomorphe Adenome charakteristische Translokation ist die t(12q13-15), bei der das *HMGA2*-Gen involviert ist. Das Vorliegen dieser Translokation sollte über den immunhistologischen Nachweis der durch die Translokation verursachten gesteigerten Expression von HMGA2 dargestellt werden.

Begleitend sollte untersucht werden, ob im Verlauf der Tumorrezidivierung Merkmale einer malignen Entartung auftreten. Da sich die maligne Entartung, neben zytologischen Merkmalen, definitionsgemäß im Invasionsverhalten der Tumorzellen und ihrer Fähigkeit in immundefizienten Mäusen Tumoren zu entwickeln ausdrückt, wurde die Expression von Faktoren, die an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt sind (CD 147 und Fra-2), immunhistochemisch untersucht und die aus dem 11. Rezidiv generierte Zelllinie im Scid-Maus Modell überprüft.

# 2. Material und Methoden

## 2.1. Material

### 2.1.1. Untersuchungsgut

Als Patientengut standen für die vorliegende Arbeit Paraffinblöcke aus dem Speicheldrüsenregister des Institutes für Oralpathologie des Universitätsklinikums Hamburg – Eppendorf zur Verfügung.
Das Material stammte aus den Jahren 1971 – 2004.
Das Frischmaterial stammt aus der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik des Universitätsklinikums Hamburg – Eppendorf.
Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Fall handelt es sich um ein langzeit-rezidivierendes (über 30 Jahre) pleomorphes Adenom.
1971 wurde bei einer 37 jährigen Patientin ein pleomorphes Adenom in der rechten parapharyngealen Region diagnostiziert. Nach elf Jahren trat ein Rezidiv in der Maxilla auf. Zwischen 1982 und 2004 folgten 13 weitere Rezidive im Bereich des Rachens, der Wange, des Halses sowie im Oberkiefer und im M. masseter.

| OP-Dat. | Fall-Nr. | Alter | Diagnose | Lokalisation |
|---|---|---|---|---|
| 1971 | 10708/71 | 37 | Pleomorphes Adenom | Parapharyngeal |
| 1982 | 23600/82 | 48 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Wange |
| 1987 | 6167/87 | 63 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Paramandibulär |
| 1989 | 3282/89 | 65 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Masseter |
| 1995 | 550/95 | 71 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Fossa temporalis |
| 1997 | 1705/97 | 73 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Kinnregion, Gaumen |
| 2000 | 1403/00 | 76 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Pharynx |
| 2002 | 2142/02 | 78 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Nasopharynx |
| 2002 | 2180/02 | 78 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Nasenhaupthöhle |
| 2002 | 5848/02 | 78 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Kieferhöhle |
| 2002 | 8771/02 | 79 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Nasopharynx |
| 2003 | 5013/03 | 79 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Nasopharynx |
| 2003 | 6941/03 | 79 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Gl.parotidea |
| 2004 | 3638/04 | 80 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Nasopharynx |
| 2004 | 1501/04 | 80 | Rezidiv des pleom. Adenoms | Nasopharynx |

Tab.1 Verlauf des rezidivierenden pleomorphen Adenoms

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Geräte

| | |
|---|---|
| Brutschrank für Zell- und Gewebekulturen | Labotect |
| Deckgläser | Omnilab |
| Entparaffinator Shandon Varistain 24-4 | Thermo-Elektron Cooperation |
| Eppendorfcups 1,5 und 2,2 ml | Eppendorf |
| Eppendorf-Pipetten 10, 20, 50, 100 ml | Eppendorf |
| Färbeküvetten mit Objektträgereinsatz | Assistent |
| Feuchte Kammer | |
| Fixogum | Henkel |
| Fluoreszenzmikroskop Axiphot | Zeiss |
| Glaswaren | Schott |
| Gefrierschrank | Liebherr |
| Gewebekulturflaschen, 50 ml | Greiner |
| Kühlschrank Comfort | Liebherr |
| Küvetten | |
| Mikroliterpipetten | Gilson |
| Mikrotom HM | Mikrom |
| Mikrowelle Mikromat Duo | AEG |
| Mikrowellengefäße | Dako |
| Neubauer Zählkammer | Resistance |
| Objektträger, Mattstreifen beidseitig | Assistent |
| Objektträger, beschichtet | Histobond |
| Pasteurpipetten | Brand |
| Petrischalen | Falkon |
| Phasenkontrastmikroskop | Zeiss |
| Photometer | BioRad |
| Pipettenspitzen | Eppendorf |
| Pipettierhilfe | Greiner |
| Plastikröhrchen | Sarstedt |
| Präparierbesteck : Pinzette, Schere | |
| Schüttelgerät Reax 2000 | Heidolph |
| Schüttelgerät 3016 | GFL |
| SpeedVac Concentrator | Savant |
| Sterilfilter | Millipore |
| Sterilskalpelle | Aeskulap |
| Sterilwerkbank | Heraeus |
| Thermocycler | Biometra |
| Trockenschrank | eraeus |
| Vortexer VF2 | Janke & Kunkel |
| Wärmeschrank, 37C° | Memmert |
| Wasserbad | Wilke & Witzel |
| Zentrifuge | Sigma |
| Zentrifuge | Heraeus |
| Zentrifugenröhrchen | Schott |

2.1.3. Chemikalien

| | |
|---|---|
| Ameisensäure | |
| ABC-Vectastain Elite | Vector Lab. Inc. |
| Antibiotika – Stammlösung 10.000 E Penicillin, 10.000 E Streptomycin | Biochrom |
| Antibody Diluent Verdünnungslösung | Dako |
| Anti Digoxigenin Fluorescin Fab Fragmente | Roche |
| Agarose | |
| Citronensäure | Merk |
| Colcemid-Stammlösung | Biochrom |
| Collagenase | Boeringer |
| Cy3 conjugated Streptavidin | Dianova |
| DABCO (1-4-Diazabicyvlo-2-2-2-Octan) | |
| Dextran-Sulfat | Serva |
| Diaminobenzidin | , |
| Dinatriumhydrogenphosohat ($Na_2HPO_4$) | Merk |
| DNA, menschliche Plazenta | Sigma |
| DNA Polymerase | Boeringer M. |
| DNase | Boeringer M. |
| EDTA | Merk |
| Essigsäure | Riedel deHaen |
| Ethanol | Merk |
| Eukitt | |
| Formamid | Janssen |
| Fötales Kälberserum | Gibco |
| Fra-2 (Q-20): sc-604 | SantaCruz Biotechnology, Inc. |
| Giemsa - Stammlösung | Merk |
| Glycerol | Serva |
| $H_2O_2$ 30% | Merk |
| HCl | Merk |
| HMG-I/HMG-Y (FL-95):sc-8982 (HMGA1) | SantaCruz Biotechnology, Inc. |
| HMGI-C (FL-109):sc-30223 (HMGA2) | SantaCruz Biotechnology, Inc. |
| Isopropanol | |
| Kaliumdihydrogenphospat ($KH_2PH_4$) | Merk |
| Kanamycin | |
| Lachssperm - DNA | Sigma |
| Mayers Hämalaun | Merk |
| Medium 199, Earl's Salts | Gibco |
| Methanol, abs. | Riedel deHaen |
| Miller Luria Both Base | Gibco |
| Mounting Medium | |
| Mouse anti-human CD 147 | RDIResearch Diagnostics |
| Natriumacetat | Riedel deHaen |
| Natriumchlorid | anssen |
| Natriumthiocyanat | |
| Normalserum Schwein | Dako |

| | |
|---|---|
| Nick - Translationskit | BRL |
| Pepsin | |
| Propidiumiodid | Sigma |
| Proteinase K – Stammlösung | Boehringer |
| Rabbit anti S 100 | Dako |
| RNase | Boehringer |
| Schwein anti-Kaninchen IgG | Dako |
| Tris-Hydroxymethylaminomethan | Sigma |
| Tris-Hydroxymethylaminomethan - Hydrochlorid | Sigma |
| Trizma - Base | Sigma |
| Trockenmilch | Protifar |
| Trypsin/EDTA – Lösung, 0,05%/0,02% in PBS | Biochrom |
| Trypsin-Trockensubstanz, 1:250 | Difco |
| Xylol | Merk |

### 2.1.4. Lösungen

| | |
|---|---|
| ABComplex | 1 Tropfen Lsg.A<br>1Tropfen Lsg.B<br>2,5 ml TBS |
| Ameisensäure 85% / $H_2O_2$ 0,3% | 85 ml Ameisensäure<br>1 ml $H_2O_2$ auf 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen |
| Antifadelösung | 9 Teile Glycerol/2%DABCO<br>1 Teil 0,2mmol/1 Tris/0,02% $NaN_3$ pH7,5<br>0,5µg/ml Propidiumiodid |
| Citratpuffer | 4,2028 g Citronensäure<br>ad 2000 ml Aqua bidest. |
| DAB - Gebrauchslösung | 1 ml DAB – Stocklösung<br>60 µl 30% $H_2O_2$ |
| DAB - Stocklösung | 100 mg Diaminobenzidin in 20 ml TBS<br>1:10 in TBS |
| Fixativ | Methanol : Essigsäure 3 : 1 |
| Giemsa - Gebrauchslösung | 5 ml 1/15 mol/1 $KH_2PO_4$<br>5 ml 1/15 mol/1 $Na_2HPO_4$<br>5 ml Ethanol, 1,5 Giemsa-Stammlösung<br>ad 100 ml Aqua bidest |
| Hypotonische Lösung | Medium 199 : Aqua bidest 1 : 6 |
| LB – Medium | 12,5 g Luria Broth Base in 500 ml Aqua dest.<br>15 min bei 121 ° C autoklavieren |

| | |
|---|---|
| Medium 199 compl. | 78% Medium 199 Earle's Salts<br>20% fötales Kälberserum2% Antibiotika - Stammlösung |
| Methanol – Blockierungslsg. | 180 ml Methanol<br>20 ml $H_2O_2$ |
| Natriumthiocyanat 1M | 12,5 ml 8M NaSCN auf 100ml mit Aqua bidest auffüllen |
| Normalserum (Schwein) | Verdünnung : 1: 10 in Dako – Antibody Diluent Lösung |
| PBS (10x) pH 7,5 | 82,33 g/l $Na_2HPO_4$<br>23,45 g/l $NaH_2PO_4$<br>40 g/ l NaCl |
| PBS (1x) pH 7,5 | 900 ml Aqua dest.<br>100 ml 10 x PBS |
| Primärantikörper | HMGA1 Verdünnung : 1:100 in Dako -Antibody Diluent- Lsg.<br>HMGA2 Verdünnung : 1:100 in Dako -Antibody Diluent- Lsg.<br>CD 147 Verdünnung : 1:250 in Dako -Antibody Diluent- Lsg.<br>Fra-2 Verdünnung : 1:50 in Dako -Antibody Diluent- Lsg.<br>S 100 Verdünnung : 1 :400 in Dako -Antibody Diluent- Lsg. |
| Puffer P1<br>(Resuspensionspuffer) | 50 mM Tris Cl, pH 8, 0<br>10 mM EDTA<br>100µg / ml RNase A |
| Puffer P2 (Lysepuffer)<br>1 % SDS | 200 mM NaOH |
| Puffer P3 (Neutralisationspuffer) | 3 M Potassiumacetat pH 5,5 |
| Puffer QBT<br>(Equilibrationspuffer) | 750 mM NaCl<br>50 mM MOPS, pH 7, 0<br>15% Isopropanol<br>0,15 % Triton X - 100 |
| Puffer QC (Waschpuffer) | 1 M NaCl<br>50 mM MOPS, pH 7, 0<br>15 % Isopropanol |
| Puffer QF (Verdünnungspuffer) | 1, 25 M NaCl<br>50 mM Tris – Cl, pH 8, 5<br>15 % Isopropanol |
| RNase-Stammlösung | 100 µg/µl in 2xSSC RNase (200 µg/µl) wurde in STE-Puffer gelöst,<br>10 min bei 100C° gekocht und mit 4xSSC 1:50 verdünnt |
| STE-Puffer | 10 mmol/l Tris-HCL, pH8,0<br>100mmol/l NaCl<br>1 mmol/l EDTA, pH8,0 |

| | |
|---|---|
| SSC (20 x) | 3 mol/l NaCl |
| | 0,3 mol/l Natriumacetat |
| SSC (2 x) | 450 ml Aqua dest. |
| | 50 ml 20 x SSC |
| SSPE (20 x) | 174 g/l NaCl |
| | 27,6 g/l $NaH_2PO_4$ |
| | 1mmol/l EDTA |
| Sörensen - Puffer | 410 ml 1/15 mol/l $KH_2PO_4$ |
| | 590 ml 1/15 mol/l $Na_2HPO_4$ |
| Sekundärantikörper | Schwein anti-Kaninchen IgG<br>Verdünnung: 1:200 in<br>Dako – Antibody Diluent Lösung |
| TBS - Puffer | 30, 29g Trizma – Base |
| | 43,55 g NaCl |
| | 100 ml HCl |
| | ad 1000 ml Aqua bidest |
| TE-Puffer | 10mmol/l Tris-HCl, pH 8,0 |
| | 1mmol/1EDTA |

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkulturen

#### 2.2.1.1. Anlegen einer Zellkultur

Das Ansetzen der Zellkultur erfolgte sofort nach der Operation. Dazu wurde die Gewebeprobe zunächst in eine Petrischale mit 0,8% Kollagenase-Lösung gegeben und mit Hilfe von Schere und Skalpell zerkleinert. Für 30 Minuten wurde der Gewebebrei mit Zugabe von Kollagenase und Trypsin bei 37°C in den Rüttler gegeben. Diese enzymatische Reaktion wurde durch Lagerung des Gewebes auf Eis abgebrochen. Mit 40ml Medium 199 compl. wurde der Gewebebrei filtriert und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 1200Upm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 2,0ml Medium199 compl. resuspendiert, in kleine Kulturschalen (3cm Durchmesser) überführt und bei 37°C und 5% $CO_2$ im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.1.2. Pflege der Zellkulturen

Zeigte der pH-Indikator einen Umschlag der Farbe des Nährmediums (Medium199 compl.) von Rot nach Gelb, erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Dies geschah alle 3 bis 4 Tage.

Dazu wurde das verbrauchte Nährmedium aus der Kulturflasche abgesaugt und anschließend 5ml Nährmedium in die Kulturflasche gegeben. Die Kulturflasche wurde mit dem Datum der Fütterung beschriftet und wieder in den Brutschrank gestellt.

#### 2.2.1.3. Subkultivierung der Zellen

Die Kulturen wurden täglich mit Hilfe eines Phasenkontrast-Mikroskops auf ihr Wachstum kontrolliert. Wenn sich eine konfluente Zellschicht auf dem Boden der Kulturflaschen gebildet hat, wurde das Kulturmedium abgesaugt. Die verbliebenen Mediumreste wurden durch Waschen mit PBS entfernt.

Damit sich die Zellen von dem Boden der Kulturflasche lösten, wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37% im Brutschrank. Die abgelösten Zellen wurden mit ca. 1 ml Medium 199 compl. resuspendiert und auf zwei jeweils mit 5 ml Medium befüllten Kulturflaschen verteilt.

#### 2.2.1.4. Erstellen einer Wachstumskurve

Die Zellen einer Kulturflasche wurden trypsiniert und in 2 ml Medium aufgenommen. Davon wurden 45 µl in die Neubauer Zählkammer gegeben um die Zellzahl zu bestimmen. Die Zellsuspension wurde entsprechend mit Medium 199 compl. verdünnt, so dass in einem Milliliter 5000 Zellen vorhanden waren.

Diese Zellsuspension wurde auf eine 24-well-Platte (1ml pro Kammer) gegeben und bei 37C° inkubiert. Über zwölf Tage wurde alle 24 Stunden die Zellzahl von jeweils zwei Kammern bestimmt und in einer Wachstumskurve eingetragen.

#### 2.2.1.5. Einfrieren von Zellen

Die Zellen einer Kulturflasche wurden trypsiniert, in 5 ml Medium aufgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach einer 4 minütigen Zentrifugation bei 1000rpm wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in eiskaltem Einfriermedium (70% Medium, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen gegeben. Diese wurden zunächst in einer Styroporbox bei –80C° eingefroren und anschließend am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

### 2.2.2. Zytogenetische Methoden

#### 2.2.2.1. Chromosomenpräparation

Zur Erstellung eines Karyogramms wurden Metaphasen-Chromosomen präpariert.

Hierzu wurden die Zellen in der Proliferationsphase durch Zugabe von 50 ml Colcemid in das Medium der Kulturflasche arretiert und für 2-4 Stunden bei 37°C inkubiert. War eine ausreichende Anzahl an Mitosen im Phasenkontrastmikroskop zu erkennen, erfolgte die Präparation der Chromosomen. Dafür wurden die Zellen trypsiniert und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation mit hypotonischer Lösung bei RT für 20 Minuten auf dem Schüttler.

Die Zellsuspension wurde in ein silikonisiertes Zentrifugenröhrchen pipettiert, 5 Minuten bei RT inkubiert und 10 Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 0,5 ml abgesaugt, das Pellet vorsichtig resuspendiert, und zur Fixierung der Zellen schrittweise 8 ml Fixativ hinzugegeben und resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 100 x g für 10 Minuten wurde das Fixativ gewechselt und die Suspension über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Vor dem Auftropfen auf die Objektträger wurde die Suspension bei 100 x g 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt. Das Pellet wurde resuspendiert und auf fettfreie, eiskalte, feuchte Objektträger getropft. Die Präparate wurden 3-5 Tage bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet.

2.2.2.2. G-Banding (Seabright, 1971)

Für die Bänderung der Präparate wurden 0,003 g Trypsintrockensubstanz in 50 ml vorgewärmten Sörensen-Puffer gegeben und 7 Minuten bei 37°C im Wasserbad gelöst.

Durch das Eintauchen der Präparate in die Trypsin/Sörensen-Puffer-Lösung für 6-8 Sekunden werden vor allem die an den GC-reichen Regionen der DNA gebundenen Proteine herausgelöst, so dass sich während des Eintauchens der Präparate in die 1,5%ige Giemsa-Gebrauchslösung für 8-10 Minuten die an den AT-reichen Regionen gebundenen Proteine anfärben können.

Anschließend wurden die Objektträger zweimal in Aqua bidest. gespült und zwischen einem Filterpapierblock trockengepresst.

2.2.2.3. Karyotypanalyse

Für die Karyotypananlyse wurden gut gespreizte Metaphasen mit einer hohen chromosomalen Bandenauflösung (400-600 Banden pro haploiden Chromosomensatz) ausgewählt und bei 1000-facher Vergrößerung fotografiert. Die Chromosomen wurden nach der Vergrößerung gezählt, ausgeschnitten und nach der ISCN (1995) zugeordnet.

2.2.3. Vorbereitungen für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

2.2.3.1. DNA-Isolierung zur Herstellung von DNA-Sonden

Bei der Isolierung von Plasmid -DNA wurde entsprechend den Angaben des QIAGEN Plasmid Purification Handbook 08 / 2003 (QIAGEN Medi Protocol), das zum „QIAGEN Plasmid Kit“ gehört, vorgegangen.

Für die Anzucht der E. coli Bakterien wurden zunächst einzelne Kolonien der Kultur entnommen und unter Zugabe des Selektions- Antibiotikums (Kanamycin, Endkonzentration:25 µl/ml) in 5ml LB-Medium bei 37°C und 300 rpm für ca. 8 Stunden inkubiert.

Mit 0,5 ml dieser Startkultur wurden 200 ml TB beimpft, das Antibiotikum zugegeben und bei 37°C, 300 rpm für 16-18 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und max. rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 25 ml eines Resuspensionspuffers (P1) gelöst. Die in diesem Puffer enthaltene RNase eliminiert die störende RNA. Der Aufschluß der Zellen erfolgt nach Zugabe von 25 ml Lysepuffer (P2), welcher NaOH enthält und zur Zelllyse führt.

Nach einer Inkubation von max. 5 Minuten wurden 25 ml eines weiteren Puffers (P3) zugegeben. Dieser Puffer neutralisiert P2 und bindet Proteine und Zelltrümmer. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten sowie eine Zentrifugation bei 4°C, max. rpm für 30 Minuten. Der Überstand wurde zur zusätzlichen Aufreinigung in 200 ml Flaschen filtriert (6x mit je 2x Filterpapier) und nach Zugabe von 0,7x Vol Isopropanol (52,5 ml) für 30 Minuten bei 4°C und max. rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml 10mM TrisHCL (pH 8,5) gelöst. Um den pH-Wert und eine richtige Salzkonzentration auf der Säule einzustellen wurde noch 18 ml QBT-Puffer dazugegeben. Anschließend wurde die DNA-Lösung auf die Säule gegeben und 2x mit 10 ml QC-Puffer, welcher Isopropanol enthält und der Aufreinigung der gebundenen DNA dient, gewaschen.

Die Eluation der DNA erfolgte durch Zugabe von 2x 2,5 ml, auf 65°C vorgewärmtem, QF-Puffer. Die Zugabe von Isopropanol und 70%igem Ethanol mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 4°C und max. rpm führte zu einer Aufreinigung und Aufkonzentrierung der DNA. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet für 10 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100-150 ml 10T3E aufgenommen und bei Raumtemperatur gelöst. Die DNA wurde photometrisch quantifiziert.

#### 2.2.3.2. Konzentrationsbestimmung der DNA über Agarosegel-Elektrophorese

Die erhaltene DNA wurde über eine Agarosegel-Eletrophorese quantifiziert. Bei dieser Methode wurde die isolierte DNA und ein DNA-Standard ($\gamma$-DNA) in einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und die Bandenintensität mit dem Standard verglichen.

Für das Agarosegel (0,6%) wurden 50ml 1xTAE-Puffer und 0,3g Agarose in einem Erlenmeyerkolben vermischt und aufgekocht. Nach dem Aufkochen wurde 0,5µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10mg/ml) zugegeben. Die Agaroselösung wurde bis auf ca. 55°C abgekühlt und in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit 1xTAE-Puffer überschichtet.

Die Geltaschen wurden mit einer Verdünnungsreihe der $\gamma$-DNA und einer Verdünnungsreihe der isolierten Proben-DNA beschickt. Nach Anlegen einer Spannung von 65 Volt lief die im neutralen pH-Bereich polyanionische DNA im elektrischen Feld der Gelkammer vom Minus- zum Pluspol. Nach ca. 90 Minuten wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und die Bandenintensität der isolierten DNA mit dem Standard verglichen.

### 2.2.3.3. Indirekte Markierung der DNA-Sonden

Die Markierung der DNA- Sonden erfolgte über eine Nick-Translation.

Hierbei wurden Nukleotide verwendet, deren Basen mit Makromolekülen gekoppelt waren, welche einen immunologischen Nachweis (Digoxigenin mit Anti-Dig-Antikörpern) oder eine Komplexbildung mit anderen Makromolekülen (Biotin mit Streptavidin) zu ihrem Nachweis gestatteten.

Die durch Zugabe von DNase I entstandenen Einzelstrangbrüche in der doppelsträngigen DNA wurden durch Polymerase I unter Verwendung von markierten Nukleotidtriphosphaten in einer In-vitro-Reparaturreaktion aufgefüllt.

Für jeden Ansatz wurden 4µl Nick-Translations-Mix (Dig od. Biotin) und eine bestimmte Menge der DNA (1µg/µl) mit Aqua bidest auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt, mit dem Vortex durchmischt und für 90 Minuten bei 15°C inkubiert. Durch die Zugabe von 1µl EDTA-Puffer wurde die Reaktion gestoppt. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei 65°C. Anschließend wurde die Sonde bei 4°C gelagert.

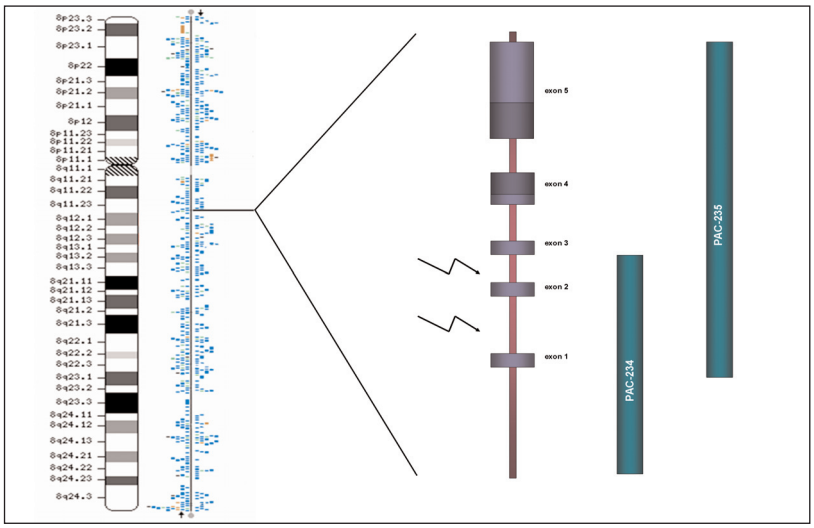


Abb. 1 Genomische Struktur von PLAG1 und Lokalisation der PAC Klone. Die Lage der Bruchpunkte sind mit Pfeilen markiert.

## 2.2.4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Zellen

### 2.2.4.1. Prä-Hybridisierung

Zum Abbau der auf den Präparaten enthaltenen RNA erfolgte zunächst eine RNase-Behandlung, bei der die Objektträger mit 200µl RNase und 200µl 4xSSC für 60 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert und anschließend 3 x 3 Minuten in 2 xSSC bei Raumtemperatur gewaschen wurden. Danach wurden die Chromosomen in einer eiskalten Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 100%) für jeweils 3 Minuten dehydriert und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 2.2.4.2. Denaturierung und Hybridisierung

Zur Denaturierung der Chromosomen wurden die Präparate 10 Minuten bei 60°C vorgewärmt und anschließend für 120 Sekunden bei 70°C in einem Gemisch aus 70% Formamid/2 x SSC inkubiert. Nach der Denaturierung wurden die Objektträger sofort in eiskaltem 2 x SSC 3 Minuten gewaschen und erneut in einer eiskalten Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 100%) dehydriert. Die Präparate wurden wieder getrocknet und für 10 Minuten bei 60°C vorgewärmt. Anschließend wurde der Hybridisierungsmix aufgetragen. Dieser setzte sich zusammen aus 150 ng markierter DNA-Sonde, 3µl ssDNA zur Blockierung möglicher DNA-Bindungsstellen auf dem Objektträger, 0,5 µl Placenta-DNA, welche die repetitiven Sequenzen im Genom abdeckt, 25µl 100%iges Formamid, 2,5µl 20x SSC, 2,5µl 20x SSPE und 10µl Dextransulfat. Dieser Hybridisierungsmix wurde vor dem Auftragen auf die Präparate mit einer Pipette durchmischt, bei 75°C für 5 Minuten denaturiert, für weitere 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Es wurden jeweils 50µl des Hybridisierungsmixes auf die Objektträger aufgebracht, die anschließend mit Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum versiegelt wurden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer.

#### 2.2.4.3. Post-Hybridisierung

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger für 15 Minuten bei 42°c im Wasserbad in 50%igem Formamid/2x SSC gewaschen. Anschließend wurden die Präparate für weitere 8 Minuten bei 42°C in 2x SSC inkubiert und bis zur Detektion in 1x PBS aufbewahrt. Zum Abblocken der unspezifischen Hintergrundfärbung wurden die Objektträger für 10 Minuten mit 100µl Trockenmilch (5%/4xSSC) in einer feuchten Kammer inkubiert. Der daraufhin aufgetragene Detektionsmix enthielt 85µl 5% NFDM/4xSSC sowie 15µl FAB-Fragmente (Anti-Dig) und 1µl Avidin (Anti-Biotin). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer wurden die Schnitte 3x 3 Minuten in 1xPBS gewaschen und 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurde eine Antifade-Lösung aufgetragen. Die Schnitte wurden mit Deckgläschen abgedeckt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Daraufhin wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### 2.2.5. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Paraffingewebe

#### 2.2.5.1. Vorbehandlung der Objektträger

Zum Entparaffinieren wurden die Objektträger zunächst bei 56°C über Nacht oder bei 80°C 30 Minuten lang erwärmt. Anschließend wurden sie 2mal in 100% Ethanol 5 Minuten gewaschen sowie weitere 5 Minuten in 100% Methanol. Nach einer 10 minütigen Lufttrocknung wurden die Schnitte 20 Minuten in ein Gemisch von 85% Ameisensäure und 0,3% Wasserstoffperoxyd getaucht, um eine Reduzierung des Hintergrundes zu erreichen. Die Ameisensäure wurde mit 0,01M HCL entfernt. Weiterhin wurden die Schnitte für jeweils 3 Minuten in 0,01M HCL in 70% Ethanol, 85% Ethanol und100% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 2.2.5.2. Prä-Hybridisierung

Die Objektträger wurden für 10 Minuten in eine auf 80°C vorgewärmte, 1M Natriumthiozyanat-Lösung gegeben und anschließend wieder für jeweils 3 Minuten in 0,01M HCL in 70% Ethanol, 85% Ethanol und 100% Ethanol gewaschen und getrocknet.

Um die Zellkerne freizulegen, wurde jeweils 100ml Pepsin auf die Schnitte gegeben. In Abhängigkeit von dem Gewebe wurden die Schnitte 20-35 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Objektträger wurden daraufhin wieder in 0,01M HCL in 70% Ethanol, 85% Ethanol und 100% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 2.2.5.3. Denaturierung und Hybridisierung

Der Hybridisierungsmix pro Objektträger (50µl für einen Objektträger) setzte sich zusammen aus jeweils 4,20µl der beiden markierten DNA-Proben (PAC 134 und PAC 135), 3,5µl COT1-DNA zur Verringerung der unspezifischen Bindungen, 10µl 100%iges Formamid, 5,0µl 20xSSC und 25µl 20%iges Dextransulfat. Nachdem der Hybridisierungsmix auf die Objektträger pipettiert wurde, wurden diese mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt.

Die Denaturierung der DNA erfolgte für 5 Minuten bei 85°C; die Hybridisierung bei 37°C über Nacht in der feuchten Kammer.

#### 2.2.5.4. Post-Hybridisierung

Die Schnitte wurden, nach Entfernen der Deckgläser, 2 Minuten in 0,4xSSC/0,3%NP40 bei 42°C gewaschen und anschließend in 1xPBS gespült. Zum Abblocken der unspezifischen Hintergrundfärbung wurden die Objektträger für 10 Minuten mit 100µl Trockenmilch (5%/4xSSC) in einer feuchten Kammer inkubiert. Der anschließend aufgetragene Detektionsmix enthielt 85µl 5% NFDM/4xSSC sowie 15µl FAB-Fragmente (Anti-Dig) und 1µl Avidin (Anti-Biotin). Diese beiden primären Antikörper sind mit einem signalgebenden System (FITC und Cy3) gekoppelt und binden an die bei der Markierung eingesetzten Antigene (Digoxygenin und Biotin). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei 37°C in der feuchten Kammer wurden die Schnitte 3x 3 Minuten in 1xPBS gewaschen und 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurde eine Antifade-Lösung, deren enthaltener Farbstoff DAPI die Chromosomen anfärbt und durch UV-Licht angeregt wird, aufgetragen. Diese Lösung vermindert zudem das Verblassen der Signale während des Mikroskopierens. Die Schnitte wurden mit Deckgläschen abgedeckt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Zur methodischen Überprüfung wurden zusätzlich an einigen Gewebeschnitten anstelle der PAC-Sonden, eine Zentromer 17/ HER-2-Sonde eingesetzt.

### 2.2.6. Immunhistochemie

#### 2.2.6.1. Immunhistochemischer Nachweis der HMGA1-, HMGA2-, CD 147- und Fra-2- Expression mit der DAB-Methode

Mit Hilfe des Mikrotoms wurden ca. 5µm-Paraffinschnitte angefertigt und in einem Wasserbad schwimmend auf APES (3-Aminopropyltriethoxysilan)- beschichtete Objektträger gezogen. Danach wurden sie 20 Minuten bei 60°C im Wärmeschrank getrocknet. Zum Entparaffinieren und Rehydrieren wurden die Schnitte zweimal für jeweils zehn Minuten in Xylol gestellt und anschließend durch die absteigende Ethanolreihe (100%, 96%) geführt.

Zur Demaskierung des Antigens wurde eine Mikrowellenvorbehandlung durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte in mikrowellengeeignete Küvetten mit Citratpuffer überführt und viermal fünf Minuten in einer Mikrowelle sprudelnd gekocht. Das Abkühlen der Schnitte erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden kurz in Aqua dest. gespült. Danach folgte die Methanolblockade zur Hemmung der endogenen Peroxidase im Gewebe. Die Schnitte wurden für 20 Minuten in einer frisch angesetzten Methanol- $H_2O_2$-Lösung inkubiert, die Flüssigkeit wurde abgegossen, und die Präparate wurden 2mal in TBS für 5 Minuten gespült.

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungen wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt. Auf jeden Objektträger wurden 100µl Normalserum des Tieres, in dem der zweite Antikörper erzeugt wurde (Schwein), in der Verdünnung 1:10 pipettiert. Die Inkubation der Schnitte erfolgte über 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur.

Für die Primärantikörperbehandlung wurden für die HMGA1- und HMGA2-Färbung die polyklonalen Antikörper gegen das menschliche HMGA1-bzw. HMGA2-Protein aus dem Kaninchen in der Verdünnung 1:100 verwendet. Das Vorgehen für die Fra2-Färbung unterschied sich lediglich in der Wahl des Primärantikörpers. Hier fand ein polyklonaler Antikörper gegen das humane Fra2-Genprodukt aus dem Kaninchen in einer Verdünnung von 1:100 Verwendung. Für die immunhistochemische Untersuchung von EMMPRIN in den Rezidiven des pleomorphen Adenoms wurde CD 147 als primärer Antikörper in der Verdünnung 1:100 verwendet.

Nachdem das Normalserum abgekippt worden war, wurden 100ml des jeweiligen Primärantikörpers auf die Präparate pipettiert. Die Inkubation der Schnitte erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank über Nacht. Anschließend wurden sie dreimal jeweils drei Minuten in TBS gewaschen.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dafür wurden Paraffinschnitte mit biotiniliertem, Schwein-Anti- Kaninchen IgG Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:200 (jeweils 100µl pro Schnitt) über 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Herstellung des ABComplexes Vectastain AP erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Diese Lösung wurde vor der Weiterverwendung für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit die Lösungen miteinander reagieren konnten.

Die Schnitte wurden dreimal drei Minuten lang mit TBS gewaschen. Der ABComplex wurde (100µl pro Schnitt) auf die Objektträger pipettiert. Inkubiert wurde wiederum in einer feuchten Kammer für 30 Minuten. Anschließend wurden die Präparate 3 x 5 Minuten in TBS gespült.

Für die Detektion (Diaminobenzidinreaktion, DAB) wurde die DAB-Gebrauchslösung nach den Angaben des Herstellers angesetzt. Die Schnitte wurden wieder in einer feuchten Kammer für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit jeweils 100µl DAB-Gebrauchslösung inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült.

Zum Gegenfärben wurden die Schnitte für 10 Sekunden in Mayers Hämalaun 1:1 mit Aqua dest. gestellt. Das Bläuen erfolgt durch Spülen der Schnitte in fließendem Leitungswasser für zwei Minuten.

Vor dem Eindeckeln wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe

geführt (jeweils zweimal zehn Sekunden 80% Ethanol, 95% Ethanol, 100% Ethanol). Dann folgte die Überführung der Präparate in Xylol und das Eindeckeln mit Eukitt.

Anschließend erfolgte mit Hilfe des Mikroskopes die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate.

Zur methodischen Überprüfung wurden Gewebeschnitte des Darms mit dem polyklonalen S 100 Antikörper als Positivkontrolle und Negativkontrollen, bei denen Antibody Diluent Lösung anstelle der primären Antikörpern verwendet wurde, eingesetzt.

### 2.2.7. Scid-Maus

Die Mäuse, deren Immunsystem genetisch ausgeschaltet ist, wurden unter sterilen Bedingungen gehalten (IVC-Rack, Techniplast) und mit sterilem Futter und Wasser (ssniff Spezialdiäten Soest) gefüttert.

Sie hatten ein Alter von 8-12 Wochen und ein Gewicht von 21-29g.

Es wurden die Zellen des 11. Rezidivs verwendet. Sie wurden zunächst in GIBCO RPMI 1640/+10% fetales Kälberserum kultiviert. Mit dem Cell-Counter & Analyser System (Schärf-Systeme) wurden die Zellen gezählt und auf ihre Vitalität überprüft.

Jede Maus bekam eine subkutane Injektion mit einer Million Tumorzellen in 200 µl Kulturmedium zwischen die Schulterblätter.

Das Gewicht des Tumors sollte bei der Entnahme 1,25g betragen. Die Wachstumsrate des Tumors wurde durch die Zunahme des Gewichtes pro Tag definiert.

In dem Fall eines Tumorwachstums wird die Maus bei Erreichen einer ausreichenden Tumorgröße getötet. Es wurde der Tumor sowie Lunge, Leber, Milz und Sternum entnommen. Der Primärtumor wird für 24 Stunden in 4%iges Formalin gegeben, anschließend mit Natriumphosphatpuffer gespült, in Alkohol dehydriert und in Paraffin eingebettet. Es werden mehrere 5µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, von denen einige mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und unter dem Mikroskop untersucht werden.

# 3. Ergebnisse

## 3.1. Histologie der Rezidive des pleomorphen Adenoms

Der Primärtumor sowie das erste, nach elf Jahren aufgetretene Rezidiv zeigen die klassischen histologischen Merkmale eines pleomorphen Adenoms.

Das zweite Rezidiv, welches fünf Jahre nach dem ersten Rezidiv auftrat, zeigt eine überwiegend myoepitheliale Differenzierung mit zum Teil zystischen Gangstrukturen und mukoider Matrix (Abb.1).

Das nach weiteren zwei Jahren folgende Rezidiv stellt sich in einer ausschließlich myoepithelialen Differenzierung dar (Abb.2).

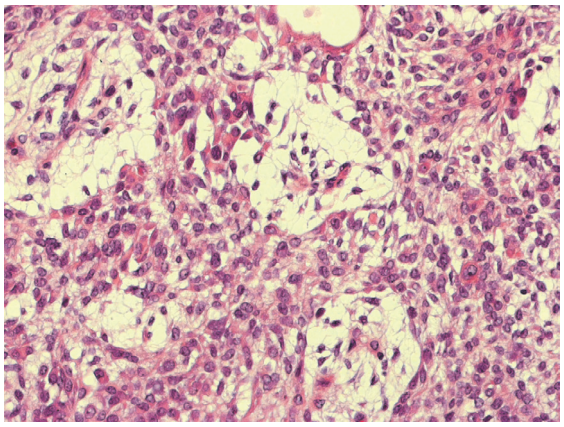

Abb.1 H&E-Färbung 2.Rezidiv (6167/87)

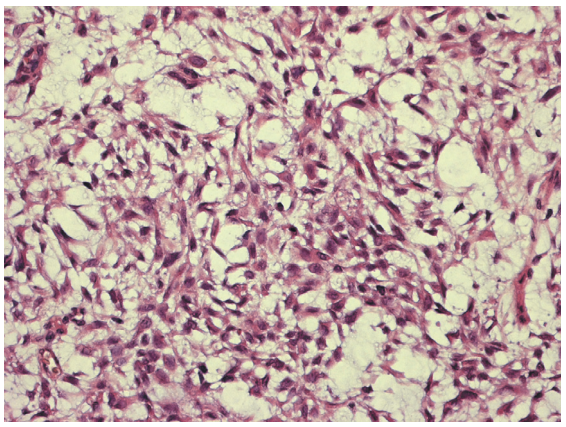

Abb.2 H&E-Färbung 3.Rezidiv (3282/89)

Weitere histologische Veränderungen sind in dem Gewebe der in den folgenden sechs, zehn und zwölf Jahren aufgetretenen Rezidive zu erkennen.

Sie sind besonders zellreich mit überwiegend myoepithelialen Zellen plasmazytoiden Types (Abb.3, Abb.4 und Abb.5).

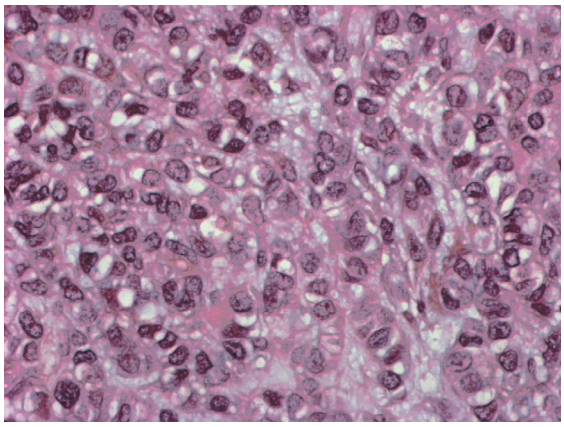

Abb.3 H&E-Färbung 4.Rezidiv (550/95)

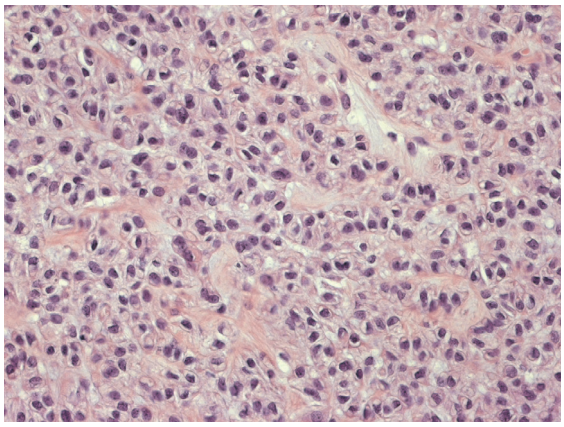

Abb.4 H&E-Färbung 6.Rezidiv (1403/00)

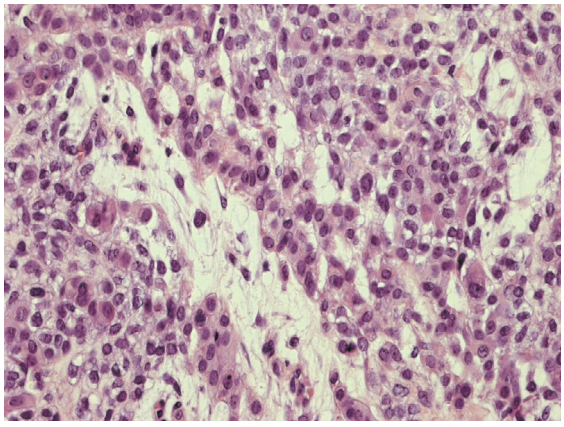

Abb.5 H&E-Färbung 8.Rezidiv (2180/02)

Im weiteren Verlauf zeigen die Rezidive eine zunehmend zellärmere, spindelzelligere Differenzierung mit nur noch teilweise auftretenden myoeoithelialen Zellen plasmazytoiden Types und einer zunehmend chondroiden Matrixdifferenzierung. Es sind histologische Merkmale eines myoepithelialen Karzinoms zu erkennen (Abb.6 und Abb.7).

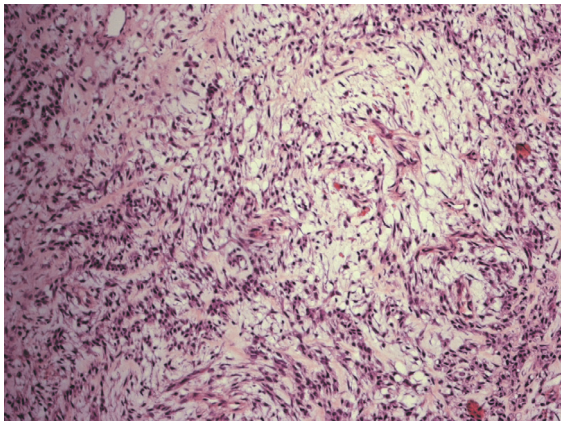

Abb.6 H&E-Färbung 12.Rezidiv (6941/03)

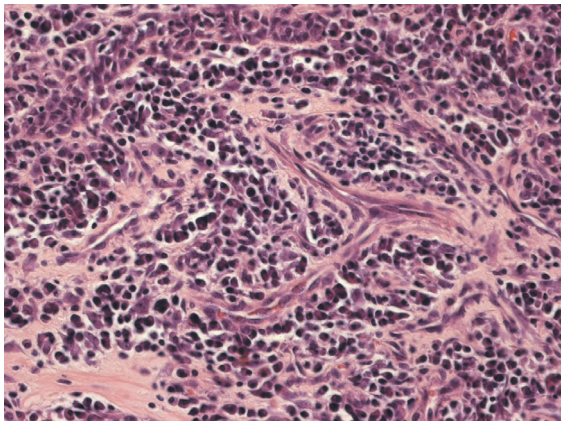

Abb.7 H&E-Färbung 14.Rezidiv (3638/04)

## 3.2. Zellkulturen

### 3.2.1. Wachstumsverhalten der Zellen

Aus dem Gewebe des elften Rezidivs, 33 Jahre nach dem ersten Auftreten des pleomorphen Adenoms, konnten die Tumorzellen isoliert und in einer Primärkultur angelegt werden.

Eine Subkultivierung dieser Zellen erfolgte, wenn sich eine konfluente Zellschicht auf dem Boden der Kulturflasche gebildet hatte (Abb. 8).

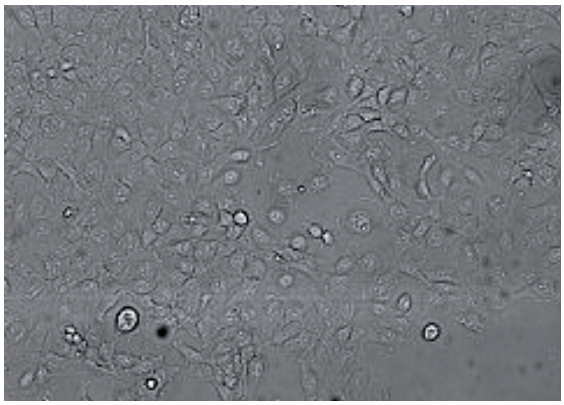

Abb.8 Kultivierte Tumorzellen

Die Zellen zeigten ein stetiges Wachstum, das anhand einer Wachstumskurve, welche die Zunahme der Zellzahl innerhalb von 24 Stunden über einen Zeitraum von zwölf Tagen demonstriert, dokumentiert wurde.  Es ist zu erkennen, dass die Zellen ab dem elften Tag in eine stationäre Phase eintraten (Abb.9).

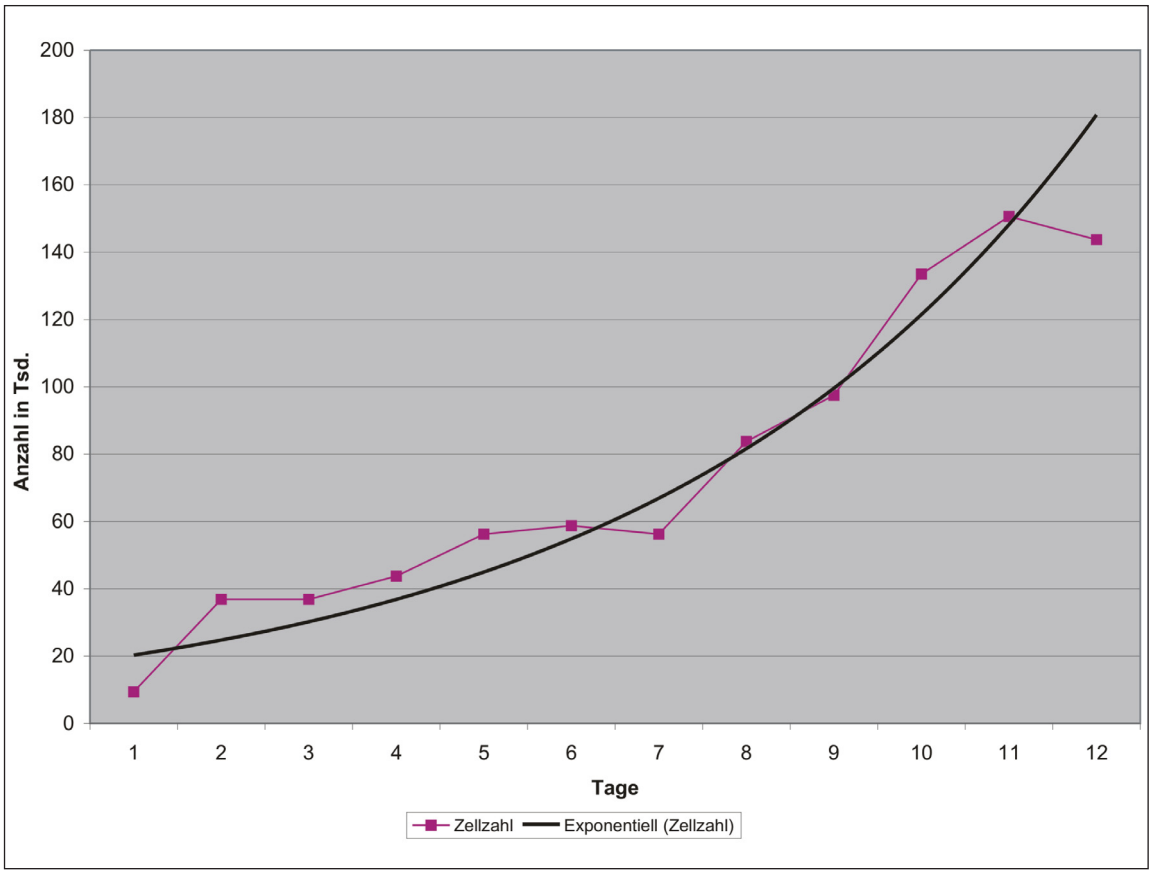


Abb.9 Wachstumskurve

### 3.2.2. Etablierung  und Charakterisierung einer Zelllinie

Bei der Subkultivierung der Zellen in Kulturflaschen kam es nach der fünften Passage  zu einer spontanen Immortalisierung der Tumorzellen, aus denen eine Zelllinie etabliert werden konnte. Zellen dieser Zelllinie des pleomorphen Adenoms wurden eingefroren und stehen für weitere Versuche und vergleichende Studien zu Verfügung.

Zur Charakterisierung dieser Zelllinie wurden an den Zellen Chromosomenpräparationen für die Erstellung eines Karyogramms durchgeführt.

Das Karyogramm zeigt, neben verschiedenen chromosomalen Veränderungen, die für pleomorphe Adenome typische Translokation t(3; 8) (Abb.10).

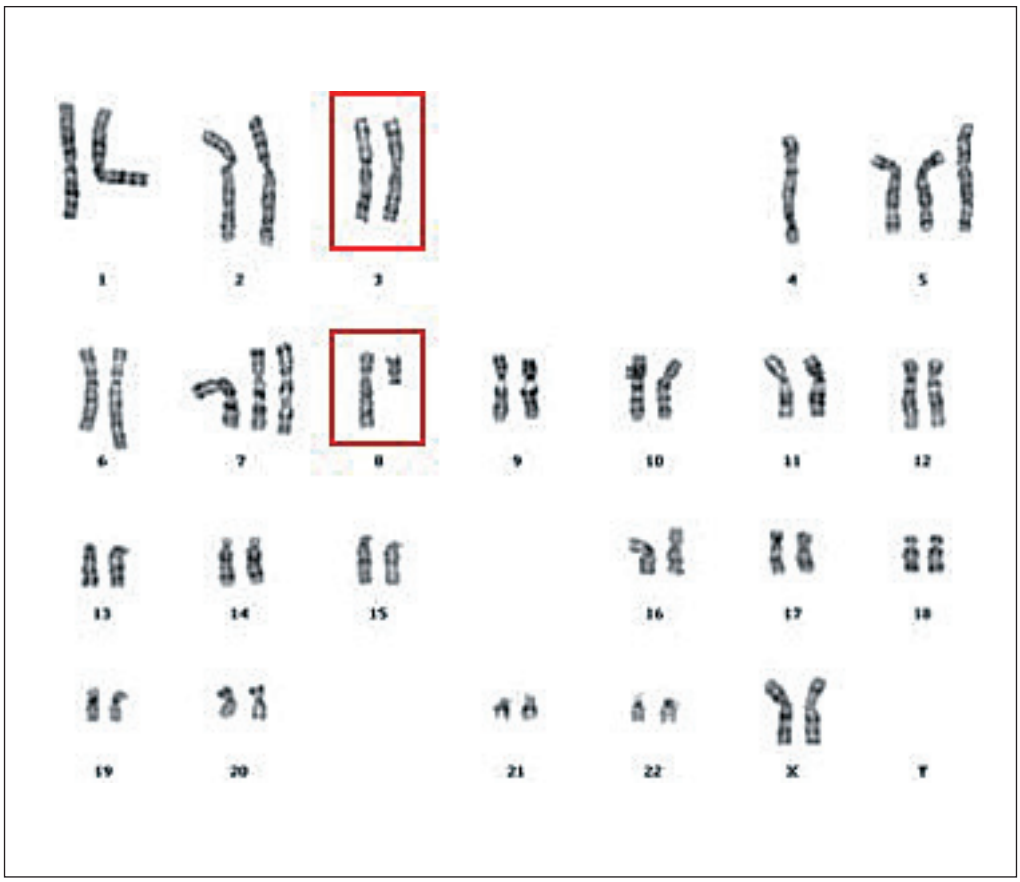

Abb.10 Karyogramm der Zelllinie mit dem Karyotyp 47, XX, der (3)t(3;8)(p13;q12) (rot markiert), -4, +5, der(5)t(3;5)(p13;q14), der(6)t(4;6)(p12;q13), +7, inv(7)(p12q31.2), del(8)(q12)

### 3.3. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

FISH-Analysen wurden an den Zellen des elften Rezidivs und an dem Paraffingewebe der aufgetretenen Rezidive durchgeführt.

#### 3.3.1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Zellen

An den Zellen dieser immortalisierten Zelllinie wurden FISH-Analysen mit den PAC-Klonen 234 und 235, die das *PLAG1*-Gen flankieren, zum Nachweis des Fusionsgens *PLAG1* durchgeführt.

Die untersuchten Zellen zeigten Veränderungen dieses Gens.

### 3.3.2. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Paraffingewebe (*PLAG1*)

An den Gewebeschnitten von mehreren Rezidiven wurden Interphase FISH-Analysen mit den PAC-Klonen 234 und 235 durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob die Rearrangierung des *PLAG1*-Gens in der Entstehung des pleomorphen Adenoms involviert ist oder ob diese Veränderung während des Krankheitsverlaufes aufgetreten ist.

Die Veränderung des *PLAG1*-Gens war ab dem achten Rezidiv nachzuvollziehen.

Die vorliegende Translokation ist durch zwei getrennte Signale und ein fusioniertes Signal zu erkennen (Abb.11 a-c).

Es ist anzunehmen, dass diese Veränderungen seit dem Auftreten des ersten Tumors bestehen, jedoch war die Interpretation früherer Gewebeschnitte schwierig, da die Signale nur sehr schwach oder nicht zu erkennen waren.

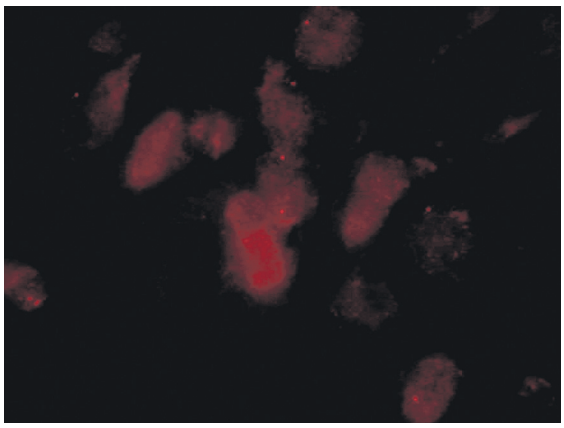

Abb.11 a Interphase FISH, PAC 234 (rot)

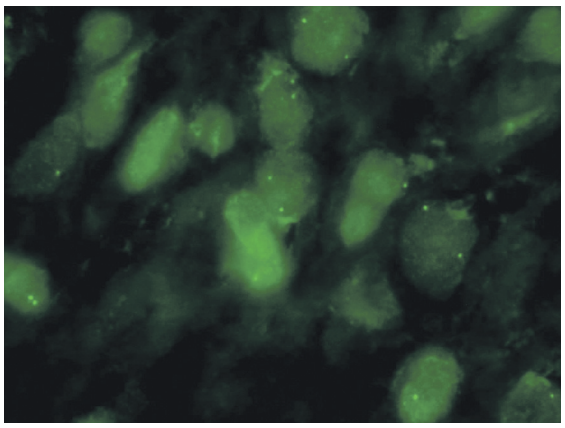

Abb.11 b Interphase FISH, PAC 235 (grün)

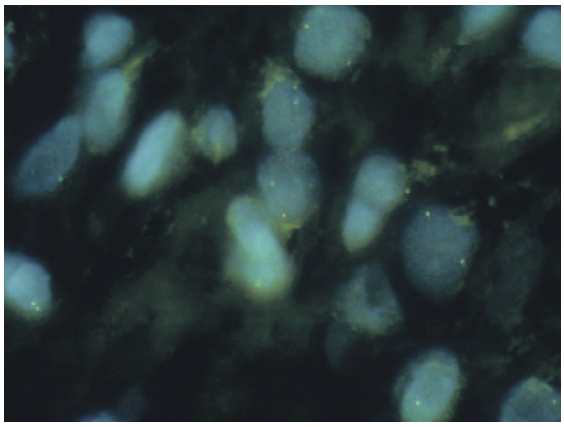

Abb.11 c Interphase FISH, PAC 234 (rot), PAC 235 (grün), Fusionsgen (gelb

### 3.3.3. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Paraffingewebe (Zentromer 17/ HER- 2)

Die Zentromer 17/HER-2-Sonde wurde als Kontrolle eingesetzt, um präparatorisch bedingte falsch-negativ Ergebnisse auszuschließen.
Dadurch konnte in den Zellen des ersten Rezidivs eine Polysomie 17 erkannt werden (Abb.12 a-c)

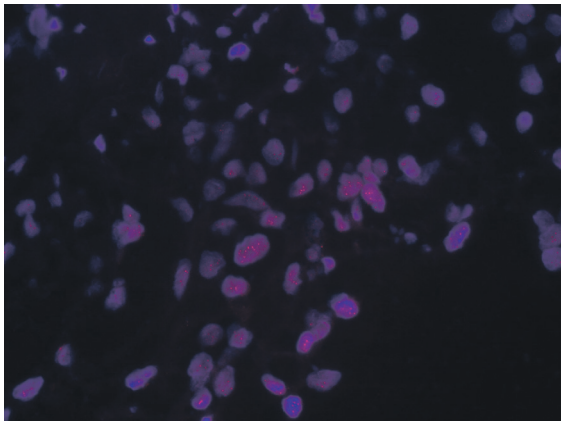

Abb.12 a Interphase FISH, HER-2-Sonde

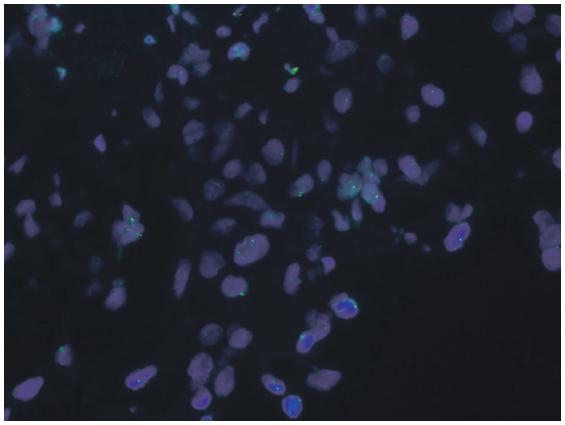

Abb.12 b Interphase FISH, Zentromer17-Sonde

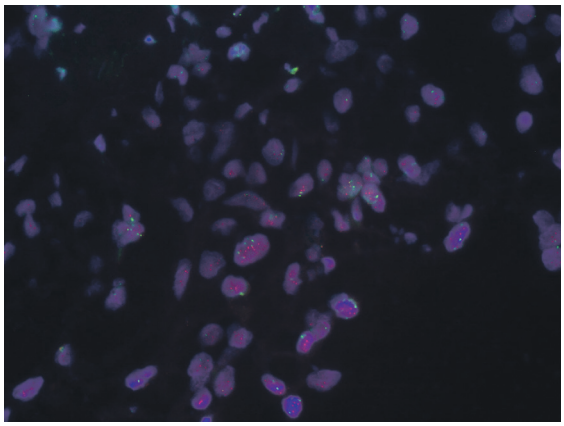

Abb.12 c Interphase FISH, HER-2-Sonde und Zentromer 17-Sonde

### 3.4. Immunhistochemische Untersuchungen

Es wurden an insgesamt neun ausgewählten paraffineingebetteten Gewebeproben der Rezidive immunhistochemische Untersuchungen mit HMGA1-, HMGA2-, CD147- und Fra-2-Antikörpern durchgeführt.

### 3.4.1. Ergebnisse zur HMGA 1-Expression

Ab dem zehnten Rezidiv war eine HMGA1-Expression in den Zellkernen des Tumors zu erkennen.

Stellenweise trat eine Begleitreaktion im angrenzenden Stroma auf (Abb.13 a, b)

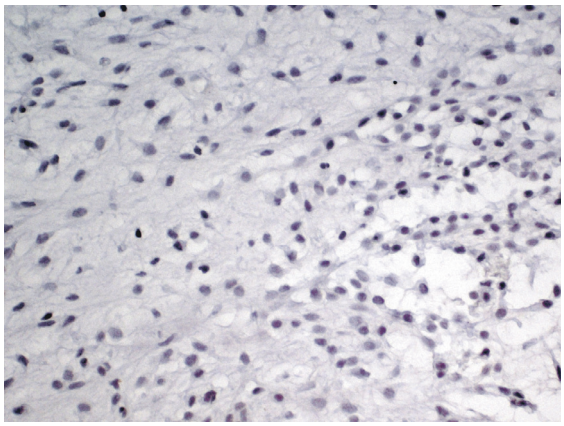

Abb.13 a positive nukleäre HMGA1-Färbung 12.Rezidiv (6941/03)

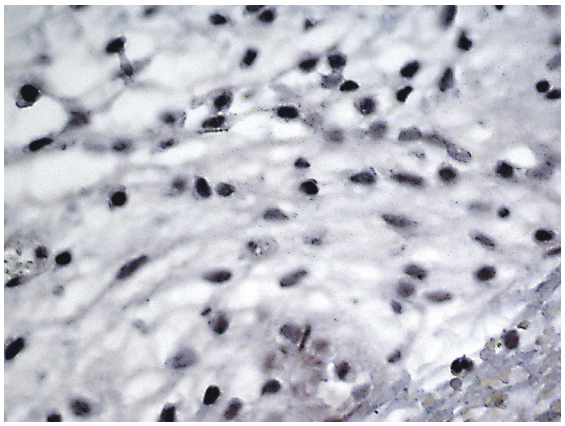

Abb.13 b positive nukleäre HMGA1-Färbung 12.Rezidiv (6941/03)

### 3.4.2. Ergebnisse zur HMGA 2-Expression

In keinem Rezidiv war eine HMGA2-Expression zu erkennen.

Stellenweise zeigte sich ebenfalls eine Begleitreaktion im umliegenden Bindegewebe.

### 3.4.3. Ergebnisse zur CD 147-Expression

Ab dem zwölften Rezidiv zeigte sich in den Tumoren eine CD 147-positive Membranfärbung (Abb.14 a, b).

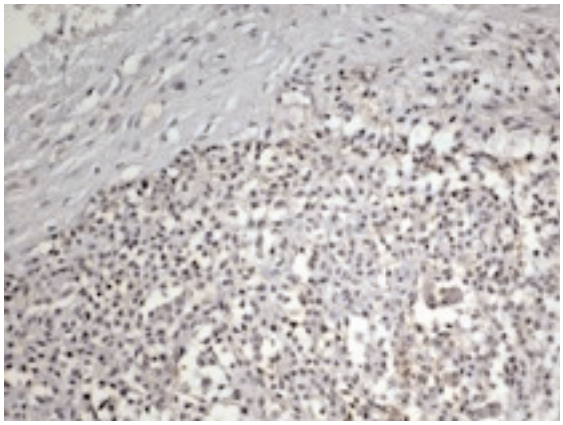

Abb.14 a positive membranäre CD147-Färbung 12.Rezidiv (6941/03)

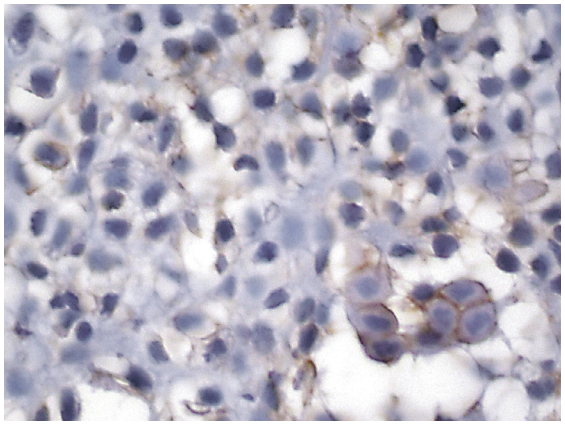

Abb.14 b positive membranäre CD147-Färbung 12.Rezidiv (6941/03)

### 3.4.4. Ergebnisse zur Fra-2-Expression

Die Tumorzellen waren in allen untersuchten Rezidiven Fra-2 negativ.

## 3.5. Überprüfung des Tumorwachstums im Scid-Maus-Modell

Die Tumorzellen des elften Rezidivs wurden einer Scid-Maus subkutan injiziert. Auch nach wiederholter Injektion entwickelte sich in diesen Mäusen kein Tumorwachstum.

# 4. Diskussion

## 4.1. Klinische Daten im Zusammenhang mit dem Auftreten von Rezidiven des pleomorphen Adenoms

Bei der Diagnosestellung des Primärtumors betrug das Alter der in dieser Studie untersuchten Patientin 37 Jahre und lag damit nur unwesentlich über dem Durchschnitt des beschriebenen Alters, welches typisch für das Auftreten eines multipel rezidivierenden pleomorphen Adenoms ist.

Das Alter der Patienten, bei denen ein pleomorphes Adenom mit mehreren Rezidiven beschrieben wurde, liegt zwischen 26,9 (Stanley et al., 1984) und 33,5 Jahren (Watkin et al., 1977). Chilla et al. (1986) nehmen an, dass Tumorzellen bei jüngeren Patienten ein stärkeres Wachstumspotential aufweisen als bei älteren Patienten.

Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen von Krolls et al. (1972), Fee et al. (1978), Maran et al. (1984), Stanley et al. (1984), Mc Gregor et al. (1988) und Myssiorek et al. (1990), die für das pleomorphe Adenom, welches normalerweise zwischen dem 5. und 6. Lebensjahrzehnt auftritt, eine Korrelation zwischen dem Alter des Patienten bei dem ersten Auftreten des Tumors und der Häufigkeit der nachfolgenden Rezidive dokumentieren. Demnach sind Patienten mit mehr als einem Rezidiv deutlich jünger (mittleres Alter: 28 Jahre zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors) als Patienten, bei denen der Tumor nur einmal rezidiviert (mittleres Alter: 35 Jahre zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors) (Laskawi et al., 1998).

Es wird aber auch ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Rezidive und der durchgeführten Operationstechnik beschrieben. Enuklierte Tumore weisen eine höhere Rezidivrate (20% - 45%) auf (Stennert, 2001), als Tumore nach einer lateralen oder totalen Parotidektomie (Rezidivrate 1% - 5%) (Douglas, 2001).

## 4.2. Histologische Merkmale einer malignen Transformation

Während der Primärtumor sowie das erste nach elf Jahren aufgetretene Rezidiv die klassischen histologischen Merkmale eines pleomorphen Adenoms aufweisen, zeigen die nach weiteren sechs Jahren aufgetretenen Rezidive eine überwiegend myoepitheliale Differenzierung. Die nach weiteren sechs, zehn und zwölf Jahren folgenden Rezidive stellen sich zellreich mit überwiegend myoepithelialen Zellen plasmazytoiden Types dar. Weitere Rezidive folgten im Ein-Jahres-Rhythmus. Sie zeigen eine zunehmend zellärmere, spindelzelligere

Differenzierung und histologische Merkmale eines myoepithelialen Karzinoms. Dieser fortschreitende Prozess der Differenzierungsänderung lässt die Entwicklung eines Karzinoms im pleomorphen Adenom vermuten.
Bekannt ist, dass eine maligne Entartung in Form eines Karzinoms im pleomorphen Adenom in 3-4 % der Fälle auftritt (Seifert, 1991).
Von Altenati et al. (2005) wurden die Zelltypen in einem pleomorphen Adenom beschrieben, welche sich maligne transformieren. In den meisten Fällen (75%) sind dies die lumenbegrenzenden, epithelialen Zellen. In 19% zeigen die entstandenen Karzinome eine epithelial-myoepitheliale Differenzierung und in 6% eine rein myoepitheliale Differenzierung.
Dennoch gibt es keine eindeutigen histologischen Merkmale, die auf ein erhöhtes Risiko einer malignen Progression in einem benignen pleomorphen Adenom hinweisen, obwohl die Kriterien, welche die benignen Anteile von den malignen in einem Karzinom im pleomorphen Adenom unterscheiden, ausführlich beschrieben sind (Auclair, 1996).

Von Cheuk und Chan wurden 2007 drei prognostisch signifikante Phasen in der Entwicklung eines Karzinoms im pleomorphen Adenom beschrieben. In der ersten Phase ersetzen Karzinomzellen mit großen atypischen Kernen die duktalen Zellen des pleomorphen Adenoms. Diese Zellen sind noch umgeben von neoplastischen myoepithelialen Zellen des vorher bestehenden pleomorphen Adenoms. Dieser Zustand kann als eine Form eines in-situ-Karzinoms ohne metastasierendes Potential angesehen werden. Die zweite Phase beschreibt ein intrakapsuläres Karzinom im pleomorphen Adenom, bei dem die malignen Zellen in das umliegende Tumorstroma invadieren, ohne die Kapsel des pleomorphen Adenoms zu durchdringen. Auch in dieser Phase besteht noch eine sehr gute Prognose bei kompletter Exzision des pleomorphen Adenoms. Karzinome im pleomorphen Adenom werden im Zustand der dritten Phase als invasiv angesehen. Die Karzinomzellen durchbrechen die fibröse Kapsel des pleomorphen Adenoms. In dieser Phase ist die Prognose abhängig von dem Ausmaß der extrakapsulären Invasion. Der Karzinomanteil kann in vielfältiger histologischer Differenzierung sowohl als adenoidzystisches Karzinom, Speichelgangkarzinom, Basalzell-adenokarzinom, Adenokarzinom, Mukoepidermoidkarzinom, adenosquamöses Karzinom und auch als myoepitheliales Karzinom vorkommen.

4.3. Etablierung und Charakterisierung einer Zelllinie

Es ist gelungen aus dem Tumorgewebe des elften Rezidivs Zellen zu kultivieren. Das Wachstumsverhalten wurde anhand einer Wachstumskurve dokumentiert, welche die Zunahme der Zellzahl innerhalb von 24 Stunden über einen Zeitraum von zwölf Tagen demonstriert.

Die Wachstumskurve zeigt ein zunächst stetig zunehmendes Wachstum der Tumorzellen. Ab dem elften Tag ist zu erkennen, dass die Zellen in eine stationäre Phase übergehen.

Bei der Subkultivierung der Zellen in Kulturflaschen kam es nach der fünften Passage zu einer spontanen Immortalisierung der Tumorzellen, aus denen die Zelllinie (MH-1) etabliert werden konnte.

Die Zellen von Speicheldrüsentumoren gelten als besonders schwer zu kultivieren. Im Durchschnitt beträgt die Lebenszeit 3,7 Passagen (Stern et al., 1990). Dies beschränkt die Möglichkeiten eine Zelllinie zu etablieren, und daher gibt es nur wenige Zelllinien, die komplexe karyotypische Veränderungen aufweisen (Bullerdiek et al., 1990; Kazmierczak et al., 1992; Fujioka et al., 1996) und für weiterführende Experimente eingesetzt werden könnten.

Primärkulturen von Speicheldrüsen wachsen in der Regel sehr langsam. Nach wenigen Passagen (<10) werden die Zellen größer, flachen ab, scheinen zu altern und sind in den meisten Fällen nicht länger zu kultivieren. (Queimado et al., 1999).

Für den Fall einer spontanen Immortalisierung ist bekannt, dass diese Zellen zuvor in eine Krise übergehen, die definiert ist als eine Phase des Stillstandes oder des stark reduzierten Wachstums (Shay et al., 1993). Anhand der Wachstumskurve lässt sich der Beginn dieser Krise bei der Zelllinie (MH-1) auf den elften Tag bestimmen.

Eine Studie von Queimado et al. (1999), bei der Zellkulturen von benignen und malignen Tumorzellen mit HPV16 transformiert wurden, um eine Immortalisierung der Zellen zu erreichen, zeigt, dass die transformierten Zellen nicht in diese kritische Phase eintraten. Nach 11-33 Tagen zeigte sich, dass die Zellen über den Monolayer hinaus wuchsen und Ansammlungen bildeten, bei denen ein Wachstum ohne eine Zellkontaktinhibition zu erkennen war. In dieser Studie wurde zudem beschrieben, dass zwei untransformierte Zelllinien von malignen Tumoren ebenfalls in einen immmortalisierten Zustand übergingen, nachdem sie zwischen der 7. und 11. Passage ein reduziertes Wachstum zeigten.

Das Karyogramm der etablierten Zelllinie (MH-1) zeigt neben der für pleomorphe Adenome charakteristischen Translokation (t (3;8)(p13;q12)) verschiedene chromosomale Veränderungen.
Über die zytogenetischen Merkmale, die charakteristischerweise bei rezidivierenden pleomorphen Adenomen vorkommen, ist nur sehr wenig bekannt.
Es lässt sich nur vermuten, dass die zusätzlichen Rearrangierungen im Zusammenhang mit der ausgeprägten Rezidivneigung und der Tendenz zur malignen Transformation dieses pleomorphen Adenoms stehen.

## 4.4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

### 4.4.1. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit *PLAG1*-spezifischen Sonden

Mittels *PLAG1*-spezischer PAC-Sonden, die das *PLAG1*-Gen flankieren, wurde an den Zellen der immortalisierten Zelllinie aus dem Tumorgewebe des elften Rezidivs die Translokation des Chromosoms 8q12 mit Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen.
Somit ist dieses pleomorphe Adenom eindeutig der ersten von den vier bereits beschriebenen zytogenetischen Subgruppen zuzuteilen.
Diese Gruppe, der pleomorphe Adenome mit einer Rearrangierung in der chromosomalen Bande 8q12 zugeordnet sind, tritt in 39% der pleomorphen Adenome mit einem veränderten Karyotyp auf (Sandros et al., 1990; Bullerdiek et al., 1993; Mark et al., 1997).
Obwohl auch für Lipoblastome chromosomale Veränderungen im Bereich der Bande 8q12 beschrieben wurden, wird das *PLAG1* enthaltene Fusionsgen bei Neoplasien der Speicheldrüse als tumorspezifisch angesehen. Es eignet sich somit als diagnostischer Marker für pleomorphe Adenome und kann durch RT-PCR oder Interphase-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung detektiert werden (Kas et al., 1997; Voz et al., 1998).
Auch hinsichtlich der zytogenetischen Befunde passt das Alter der Patientin (37 Jahre) bei dem ersten Auftreten dieses Tumors zu den Ergebnissen einer Studie von Bullerdiek et al. (1993). Hier konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem pleomorphen Adenom, welches eine *PLAG1*-Veränderung aufweist, signifikant jünger (39,3 Jahre) sind als Patienten deren pleomorphes Adenom einen normalen Karyotyp aufweist (51,1 Jahre).
Mit Hilfe dieser *PLAG1*-Sonden wurde versucht, an den vorliegenden Gewebeproben aller Rezidive eine Rearrangierung im *PLAG1*-Gen nachzuweisen. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die chromosomalen Veränderungen,

das *PLAG1*-Gen betreffend, ein frühes Ereignis in der Tumorgenese darstellen und somit evtl. direkt in die Entstehung des Tumors involviert sind, oder ob diese Veränderungen erst im weiteren Verlauf der Erkrankung aufgetreten sind.
Methodisch bedingt war die Rearrangierung im *PLAG1*-Gen erst ab dem achten Rezidiv sicher zu erkennen. Die beobachtete Abnahme in der Signalstärke scheint im Zusammenhang mit dem Alter des paraffineingebetteten Gewebes zu stehen. Als mögliche Gründe sind eine durch DNasen degradierte DNA und früher abweichende Fixierungsprotokolle, welche u. a. zu einer starken Proteinvernetzung führen, in Betracht zu ziehen. Somit konnten bei den älteren Schnitten die Tumorzellen, die Kerne und die darin befindliche DNA für die Sonden auch durch verlängerte Verdauzeiten mit Proteinasen nicht in allen Fällen verlässlich zugänglich gemacht werden. Hinzu kam, dass die bereits stark degradierte DNA von den Sonden nicht mehr oder nur teilweise erkannt wurde.
Es ist aber anzunehmen, dass diese Veränderungen bereits im Primärtumor vorhanden waren, nur war die Interpretation älterer (über 10 Jahre) Gewebeschnitte schwierig, da die Signale aus den genannten Gründen nur sehr schwach oder gar nicht zu erkennen waren. Um diesbezüglich verlässliche Ergebnisse zu erhalten, könnten bei weiterführenden Versuchen längere DNA – Sonden eingesetzt werden, die zu einer Signalverstärkung beitragen können.

4.4.2.Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit einer HER-2-Sonde in Kombination mit der Zentromer 17-Sonde

Zur Überprüfung der FISH-Analysen und zum Ausschluss von präparatorisch bedingten falsch-negativen Ergebnissen wurde eine etablierte HER-2-Sonde und die dazugehörige Zentromer 17-Sonde eingesetzt. Beide Sonden eignen sich aufgrund ihrer zuverlässigen Ergebnisse in zahlreichen Versuchsreihen als Kontrollen.

Interessanterweise ergab diese Kontroll-FISH mit der Zentromer 17-Sonde, dass in den Tumorzellen des ersten Rezidivs eine Polysomie 17 vorliegt, während das Karyogramm, das von den Zellen des elften Rezidivs erstellt wurde, keine Anomalien des Chromosoms 17 zeigte.

Die Tumorgenese wird als ein Mehrschritt-Prozess angesehen, in dem erst die Addition mehrerer Alterationen sowohl von Chromosomen, Genen und Proteinen zu einem malignen Tumor führen. Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region lassen vermuten, dass das Auftreten einer Polysomie 17 im Verlauf von einer Hyperplasie über eine Dysplasie zu einem Karzinom zunimmt (Voravud et al., 1993). Auch im adenoidzystischen Karzinom der Speicheldrüse wurde vermehrt eine Polysomie 17 gefunden (Li et al., 1995). In einer Studie von Li et al. (1997) wurden pleomorphe Adenome sowie Karzinome im pleomorphen Adenom hinsichtlich einer numerischen Veränderung des Chromosoms 17 untersucht. Daraus ergab sich, dass eine Polysomie 17 häufiger im Karzinom im pleomorphen Adenom (19,6%) als im pleomorphen Adenom (9,6%) vorliegt. Eine Monosomie des Chromosoms 17 trat hingegen in ähnlicher Verteilung im Karzinom im pleomorphen Adenom (30,8%) und im pleomorphen Adenom (29,6%) auf. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe (normales Speicheldrüsengewebe) zeigten die pleomorphen Adenome wesentlich häufiger eine Monosomie 17. Dieser Verlust von Chromosom 17 wird als ein Phänomen erachtet, das auftritt bevor es zu einer malignen Transformation des pleomorphen Adenoms kommt (Li et al., 1997).

Vor diesem Hintergrund scheint der im Verlauf der Rezidive beobachtete Verlust der Polysomie 17 zu zeigen, dass eine Selektion bestimmter Zellen, die aufgrund einer geringeren Chromosomenanzahl einen Proliferationsvorteil erhalten, vorliegt.

Der HER-2-Nachweis dient üblicherweise dem Nachweis einer Genamplifikation und wird deshalb zusammen mit der Zentromer 17- Sonde eingesetzt. Aufgrund der Regel der Dosisproportionalität für autosomale Gene, die besagt,

dass die Menge des gebildeten Genproduktes (RNA oder Protein) zur Anzahl der Genkopien angenähert proportional ist, resultiert auch im Falle einer Polysomie 17 daraus eine Erhöhung der HER-2-Genkopienzahl, und somit ist eine HER-2-Überexpression zu erwarten.
Der HER-2-Überexpression bzw. Gen-Amplifikation wird nicht nur beim Mamma-Karzinom eine Rolle bei der malignen Transformation zugesprochen (Muller et al., 1994; Rosa et al., 1996; Di Palma et al., 2005).
In einer Studie von Tapia (2007) wurde eine HER-2-Überexpression und Amplifikation u.a. auch in Karzinomen der Harnblase, des Magens, des Endometriums, der Lunge und des Ovars beschrieben.
Molekulare Studien an pleomorphen Adenomen zeigten jedoch nur selten eine Amplifikation und / oder Überexpression von HER-2 (Stenman et al., 1991; Rosa et al., 1997).

## 4.5. Immunhistochemie

### 4.5.1. HMGA1- und HMGA2-Immunhistochemie

Im Zusammenhang mit pleomorphen Adenomen wird vor allem die Expression von HMGA2 beschrieben, da eine Rearrangierung des Chromosoms 12q13-15 in 8% der pleomorphen Adenome mit einem veränderten Karyotyp auftritt (Ashar et al., 1995; Geurts et al., 1997; Geurts et al., 1998, Schonmakers et al., 1995). Der Verlust der Heterozygotie im chromosomalen Bereich 12q kann ebenfalls ein Potential zur malignen Entartung beinhalten (El-Naggar et al., 2000). Die Amplifikation und Überexpression des *HMGA2*-Gens auf Chromosom 12q13-15 stellt ein weiteres wichtiges genetisches Ereignis hinsichtlich einer malignen Transformation dar (Roijer et al., 2002).
Eine HMGA2-Expression war jedoch in den Zellkernen des Tumors nicht detektierbar.
In der Literatur werden die pleomorphen Adenome, welche durch einen veränderten Karyotyp charakterisiert sind, aufgrund der vorhandenen chromosomalen Veränderungen (8q12-Rearrangierung oder 12q13-15 -Rearrangierung) in entsprechende Subgruppen unterteilt. (Sandros et al., 1990; Bullerdiek et al., 1993; Mark et al., 1997).
Aufgrund der zytogenetischen Untersuchungen ist anzunehmen, dass ein pleomorphes Adenom entweder eine Rearrangierung im Bereich des *HMGA2*-Gens oder des *PLAG1*-Gens aufweist.

Eine HMGA1-Expression war allerdings immunhistologisch in den Zellkernen des Tumors ab dem zehnten Rezidiv nachweisbar. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen bei kolorektalen Karzinomen. Die Reaktivierung der HMGA1-Expression ist bei der Tumorgenese anscheinend ein relativ spätes Ereignis (Abe et al., 1999).
Das in dieser Arbeit untersuchte rezidivierende pleomorphe Adenom zeigt mit der späten Reaktivierung der HMGA1-Expression Ähnlichkeiten zum Ablauf der Kanzerogenese beim Kolonkarzinom.

4.5.2. CD147- und Fra-2-Immunhistochemie

Um auch den Aspekt der Tumorinvasion, ein vorrangiges Malignitätsmerkmal, zu berücksichtigen, wurden immunhistochemisch Faktoren (CD147 und Fra-2) nachgewiesen, die an diesem Prozess beteiligt sind.
Eine positive CD147-Membranfärbung zeigte sich bei den untersuchten Gewebeschnitten ab dem zwölften Rezidiv.
Diese späte CD147- Expression scheint im Zusammenhang mit der malignen Transformation des untersuchten Tumors zu stehen, da CD147 über die Aktivierung von MMP's an dem Invasions- und Metastasierungsprozess maligner Tumore beteiligt ist (Zucker et al., 2001).
In einer Studie von Riethdorf et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass bei Karzinomen der Speicheldrüsen (adenoidzystisches Karzinom, Mukoepidermoidkarzinom, undifferenzierten Karzinomen und Azinuszellkarzinomen) eine deutlich höhere Anzahl an CD 147- positiven Fällen vorliegt als bei benignen pleomorphen Adenomen der Speicheldrüsen.
Im aktuellen Fall liegt eine Verlaufsstudie vor, die diese Annahme unterstützt, dass das CD147-kodierende Gen bereits eine initiale Rolle bei der Tumorprogression spielen kann.

Für eine Fra-2-Expression waren die Tumorzellen aller Rezidive negativ.
Hier wurde vermutet, dass eine veränderte Fra-2-Expression, wie für andere Tumoren beschrieben (Milde-Langosch et al., 2004), ebenfalls mitverantwortlich für das Invasions- und Metastasierungsverhalten der Tumorzellen sein kann. Fra-2 hat, als Mitglied der Fos-Familie, die Fähigkeit, die Regulation von MMP's und weiteren Mitgliedern des proteolytischen Systems, welche an der Degradierung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix beteiligt sind, zu beeinflussen.
Die Daten einer Expressionsanalyse von Maruya et al. (2004) zeigten im Gewe-

be von pleomorphen Adenomen, im Vergleich mit normalen Gewebe von Speicheldrüsen, eine erhöhte Fra-2 Expression. In Karzinomen der Speicheldrüse stellte sich, verglichen mit dem Gewebe pleomorpher Adenome, keine erhöhte Fra-2 Expression dar.
Fra-2 zählt neben Jun und Fos auch in einer Studie von Weber et al. (2007) zu den herunterregulierten Proteinen. In dieser Studie wurden Protein-Mikroarray-Analysen zur Charakterisierung von Protein-Expressionen in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region durchgeführt. Von 83 untersuchten Proteinen zeigten 14 eine unterschiedliche Expression in den Plattenepithelkarzinomen verglichen mit normalem Epithel. Acht dieser Proteine, zu denen auch MMP-7 zählte, waren hochreguliert und sechs herunterreguliert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das regulatorische System, welches zwischen den MMP's und dem Transkriptionsaktivator AP1, der durch Zusammenlagerung von Jun und Fos gebildet wird, besteht, ausgeschaltet wird.

### 4.6. Verhalten der Tumorzellen im Scid-Maus-Modell

In einem abschließenden Experiment wurde die Agressivität/Dignität des rezidivierenden Tumors im Scid-Maus-Modell überprüft. Während die parallele Injektion von Zellen aus einem Mukoepidermoidkarzinom zu einem Tumorwachstum führte, zeigten die Zellen des Rezidivs des pleomorphen Adenoms kein Tumorwachstum.
Dieses Ergebnis zeigt, dass, obwohl an zytologischen Merkmalen ein Übergang in ein Karzinom zu erkennen ist, dieser über 30 Jahre rezidivierende Tumor, im Gegensatz zu einem Mukoepidermoidkarzinom, nicht das maligne Potential besitzt, um in einem Scid-Maus-Modell ein Tumorwachstum ausbilden zu können.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand aller Gewebeproben eines über 30 Jahre rezidivierenden pleomorphen Adenoms zelluläre und/oder genetische Veränderungen im Verlauf der Erkrankung verfolgt.
Dabei gelang es, aus den Zellen des elften Rezidivs eine Zelllinie zu etablieren. Anhand eines Karyogramms wurde die Zelllinie hinsichtlich ihrer chromosomalen Veränderungen charakterisiert. Die für pleomorphe Adenome typische t(3; 8) Translokation war neben weiteren chromosomalen Aberationen zu erkennen.
Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen an den Gewebeproben der Rezidive konnte eine Rearrangierung im *PLAG1*-Gen ab dem achten Rezidiv belegt werden. Es ist anzunehmen, dass diese Veränderungen bereits seit dem Auftreten des ersten Tumors bestanden, jedoch war die Interpretation früherer Gewebeschnitte schwierig, da die Signale nur sehr schwach waren.
Eine weitere für pleomorphe Adenome charakteristische Translokation ist die t (12q13-15), bei der das *HMGA2*-Gen involviert ist. Das Vorliegen dieser Translokation sollte über den immunhistologischen Nachweis der durch die Translokation verursachten gesteigerten Expression von HMGA2 dargestellt werden. Während des gesamten Krankheitsverlaufes war keine HMGA2-Expression zu erkennen, was darauf schließen lässt, dass sich die Veränderungen im Bereich des *HMGA2*-Gens nicht als ein weiteres Ereignis bei der malignen Transformation eines Tumors entwickeln.
Anzeichen eines malignen Phänotypes ließen sich parallel zu morphologischen Veränderungen über immunhistologischen Untersuchungen zur Expression von HMGA1 und CD 147 nachvollziehen, die ab dem zehnten und zwölften Rezidiv positiv waren. Histologisch zeigten diese Rezidive zunehmend eine myoepitheliale Differenzierung und in später auftretenden Rezidiven histologische Merkmale eines myoepithelialen Karzinoms.
Zunächst war das Auftreten einer Polysomie 17 im ersten Rezidiv überraschend, da Literaturdaten eine Polysomie 17 häufiger im Karzinom im pleomorphen Adenom beschrieben. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine Selektion von Tumorzellen im Verlauf der Erkrankung.
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich der Übergang des pleomorphen Adenoms (1971) in einen malignen Tumor im Verlauf des hier vorgestellten rezidivierenden pleomorphen Adenoms hauptsächlich an zytologischen Merkmalen zeigte, während das Invasionsverhalten zunächst (2004) unverändert war und keine Anzeichen einer Metastasierung erkennbar waren. Auch besaßen die Zellen des 11. Rezidivs nicht die Fähigkeit, in Scid-Mäusen einen Tumor auszubilden.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| ABC | Avidin-Biotin Komplex |
| AG | Antigen |
| AK | Antikörper |
| AP1 | Aktivator-Protein 1 |
| DAB | Diaminobenzidin |
| dest. | Destilliert |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat |
| EMMPRIN | Extracellular matrix metalloproteinase inducer |
| FISH | Fluoreszenz-*in-situ*-hybridisierung |
| Gl. | Glandula |
| HE | Hämatoxilin/ Eosin |
| HER-2 | Human epidermal groth factor receptor 2 |
| HMG | High mobility group |
| HMGA | High mobility group protein A |
| HMGA1 | High mobility group protein A1 |
| HMGA2 | High mobility group protein A2 |
| HPV | Humanes Papilloma Virus |
| IgG | Immunglobulin |
| M | molar |
| min | Minute |
| MMP | Matrixmetalloprotinase |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| *PLAG1* | Pleomorphic adenoma gene1 |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Rotation per minute |
| RT-PCR | Reverse-Transkription-Polymerase chain reaction |
| SSC | Saline-sodium-citrate-buffer |
| Tab | Tabelle |

## 7. Literaturverzeichnis

Abe N, Watanabe T, Sugiyama M, Uchimura H, , Chiapetta G, Fusco A, Atomi Y (1999). Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker. Cancer Res 59:1169-1174.

Abe N, Watanabe T, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Uchimura H, Fujioka Y, Chiapetta G, Fusco A, Atomi Y (2000). Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) protein. Cancer Res 60:3117-3122.

Abe N, Watanabe T, Suzuki Y, Matsumoto N, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Chiapetta G, Fusco A, Atomi Y (2003). An increased high- mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. Br. J. Cancer 89: 2104-2109.

Altemani A, Martins MT, Freitas L, Soares F, Araujo NS, Araujo VC (2005). Carcinomas ex pleomorphic adenoma (CXPA):immunprofile of the cells involved in carcinomatous progression. Histopathology 46:635.641.

Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K (1995). Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. Cell 82:57-65.

Åström AK, D´Amore ES, Sainati L, Panarello C, Morerio C, Mark J, Stenman G (2000). Evidence of involvement of the PLAG1 gene in lipoblastomas. Int J Oncol 16:1107-1110.

Åström AK, Voz ML, Kas K, Röijer E, Wedell B, Mandahl N, Van de Ven W, Mark J, Stenman G (1999). Conserved mechanism of PLAG1 Activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. Cancer Res 65:27-31.

Auclair PI, Ellis GL (1996). Atypical features in salivary gland mixed tumors: Their relationship to malignant transformation. Mod. Pathol. 9:652-657

Bandiera A, Bonifacio D, Manfioletti G, Mantovani F, Rustighi A, Zanconati F, Fusco A, Di Bonito L, and Giancotti V (1998). Expression of HMGI(Y) proteins in squamous intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix.Cancer Res 58:426-431.

Berlingieri MT, Pierantoni GM, Giancotti V, Santoro M, Fusco A (2004). Thyroid-cell transformation requires the expression of the HMGA1 proteins. Oncogene 21:2971-2980.

Berner JM, Meza- Zepeda LA, Kools PF, Forus A, Schoenmarkers EF, Van de Ven WJ, Fodstad O, and Myklebost O (1997). HMGIC, the dene for an architectural transcription factor, is amplified and rearranged in a subset of human sarcomas. Oncogene 14:2935-2941.

Bullerdiek J, Hutter KJ, Brandt G, Weinberg M, Belge G, Bartnitzke S (1990). Cytogenetic investigations on a cell line derived from a carcinoma arising in a salivary gland pleomorphic adenoma. Cancer Genet. Cytogenet. 44:253-262

Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J,Thode B, Bartnitzke S (1993). Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: Correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behaviour. Cancer Genet Cytogenet 65:27-31.

Cheuk W & Chan JK (2007). Advances in salivary gland pathology.Histopathology :1-20.

Chiapetta G, Bandiera A, Berlingieri MT, Visconti R, Manfioletti G, Battista S, Martinez- Tello FJ, Santoro M, Giancotti V, and Fusco A (1995). The expression of the high mobility group HMGI(Y) proteins correlates with the malignant phenotype of human thyroid neoplasias. Oncogene 10:1307-1314.

Chiapetta G, Manfioletti G, Pentimalli F, Abe N, Di Bonito M, Vento MT, Giuliano A, Fedele M, Viglietto G, Santoro M, Watanabe T, Giancotti V, Fusco A (2001). High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases. Int. J. Cancer 91:147-151.

Chilla R, Schneider K, Droese M (1986). Zur Rezidivneigung und malignen Entartung pleomorpher Adenome. HNO 38:467-469.

Dal Cin P, Wanschura S, Christiaens MR, Van dB, I, Moerman P, Polito P, Kazmierczak B, Bullerdiek J, and Van Den BH (1997). Hamartoma of the breast with involvement of 6p21 and rearrangement of HMGIY. Genes Chromosomes Cancer 20:90-92.

Di Palma S, Skalova A, Vanieek T, Simpson RH, Starek I, Leivo I (2005). Noninvasive (intracapsular) carcinoma ex pleomorphic adenoma: recognition of focal carcinoma by HER-2/ neu and MIB1 immunohistochemistry. Histopathology 46:144-152.

Douglas JG, Einck J, Austin-Seymour M, Koh W- J, Laramore GE (2001).Neutron radiotherapy for recurrent pleomorphic adenomas of major salivary glands. Head Neck 23:1037-1042.

El-Naggar AK, Callender D, Coombes MM, Hurr K, Luna MA, Batsakis JG (2000). Molecular genetic alteration in carcinoma ex-pleomorphic adenoma: A putative progression modell? Genes Chromosomes Cancer 27:162-168.

Fee WE, Goffinet DR, Calcaterra TC (1978). Recurrent mixed tumors of the parotid gland: results of surgical therapy. Laryngoscope 88:265-273.

Fedele M, Bandiera A, Chiapetta G, Battista S, Biglietto G, Manfioletti G, Casamassimi A, Santoro M, Giancotti V, Fusco A (1996). Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins. Cancer Res 56:1896-1901.

Fujioka M, Shimada K, Kitazawa S, Maeda S (1996). Molecular characterization of a novel cancer cell line established from a human carcinoma in pleomorphic adenoma (CaPA-4). Int J Cancer 67:204-210.

Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S (2005). EMMPRIN/ CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. Biochemie 87:361-368.

Gattas GJ, Quade BJ, Nowak RA, and Morton CC (1999). HMGIC expression in human adult and fetal tissues and in uterine leiomyomata . Genes Chromosomes cancer 25:316-322.

GeurtsJM, Schoenmakers EF, Roijer E, Astrom AK, Stenman G, Van der Ven WJ (1998).Indentification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas. Oncogene 16:865-872

GeurtsJM, Schoenmakers EF, Roijer E, Stenman G, Van der Ven WJ (1997). Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. Cancer Res 57:13-17

Goodison DW, Burr RG, Creedon AJ, Stirling RW, Morgan PR, Odell EW, Boff RG (1999).
A case of metastasising pleomorphic adenoma
Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 87(39:341-5

Henning Y, Rogalla P, Wanschura S, FreyG, Deichert U, Bartnitzke S, And Bullerdiek J (1997). HMGIC ecpressed in a uterine leiomyoma with a deletion of the long arm of chromosome 7 along with a 12q14-15 rearrangement but not in tumors showing del (7) as the sole cytogenetic abnormality. Cancer Genet Cytogenet 96:129-133.

Henriksson G, Westrin KM, Carlsöö B, Silfverswärd C (1998). Recurrent Primary Pleomorphic Adenomas of Salivary Gland Origin.Intrasurgical Rupture, Histopathologic Features, and Pseudopodia. American Cancer Society 82:617-620.

Hibbard MK, Kozakewich HP, Dal Cin P, Sciot R, Tan X, Xiao S, Fletcher JA (2000). PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. Cancer Res 60:4869-4872.

Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiek J, Hameister H (1998). The expression pattern of the Hmgic gene during development. Genes Chromosomes Cancer 112:156-160.

Hoorweg JJ, Hilgers FJ, Keuss RB, Zoetmulder FA, Loftus BM (1989). Metastasing pleomorphic adenoma: a report of three cases
Eur J Surg Oncol 24:452-5

Kas K, Voz ML, Roijer E, Åström AK, Meyen E, Stenmari G, Van de Ven WJ (1997). Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleomorphic adenomas with t(3;8)(p21;12)translocations. Nat Genet 15:170-174.

Kazmierczak B, Thode B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Schloot W (1992). Pleomorphic adenoma cells vary in their susceptibility to SV40 transformation depending on the initial karyotype. Genes, Chromosomes Cancer 5:35-39.

Kazmierczak B, Dal Cin P, Wanschura S, Borrmann L, Fusco A, Van Den Berghe H, and Bullerdiek J (1989). HMGIY is the target of 6p21.3 rearrangements in various benign mesenchymal tumors. Genes Chromosomes Cancer 23:279-285.

Kazmierczak B, Meyer- Bolte K, Tran KH, Wockel W, Breightman I, Rosigkeit J, Bartnitzke S, Bullerdiek J (1999). A high frequency of tumors with rearrangements of genes of the HMGI(Y) family in a series of 191 pulmonary chondroid hamartomas. Genes Chromosomes Cancer 26:125-133.

Krolls SO, Boyers RL (1972). Mixed tumors of salivary glands: longterm follow-up. Cancer 30:276-281.

Lam KH, Wei WI, Ho HC, Ho CM (1990). Whole organ section of mixed parotid tumors. Am J Surg 160:377-381

Laskawi R, Schott T, Schroder M (1998). Recurrent pleomorphic adenomas of the parotid gland: clinical evaluation and long-term follow-up.Br J Oral Maxillofac Surg 36:48-51.

Li X, Tsuji T, Wen S, Mimura Y, Wang Z, Sasaki K, et al. (1995).A fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis with centromere-specific DNA probes of chromosomes 3 and 17 in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas. J Oral Pathol Med 24:398-401.

Li X, Tsuji T, Wen S, Mimura Y, Wang Z, Sasaki K, Shinozaki F (1997). Detection of numeric abnormalities of chromosome 17 and p53 deletions by fluorescence in situ hybridization in pleomorphic adenomas and carcinomas in pleomorphic adenoma. Correlation with p 53 expression. Cancer 79:2314-2319.

Maran AGD, Mackenzie IJ, Stanley RE (1984). Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. Arch Otolaryngol 110:167-171.

Mark J, Dahlenfors R, Wedell B (1997). Impact of the in vitro technique used on the cytogenetic patterns in pleomorphic adenomas. Cancer Genet Cytogenet 95:9-15

Maruya S, Kim HW, Weber RS, Lee JJ, Kies M, Luna MA, Batsakis LG, El-Naggar AK (2004).Gene Expression Srceening of Salivary Gland Neoplasms. Molecular Markers of Potential Histogenetic and Clinical Significance. Journal of Molecular Diagnostics 6:180-190.

Masciullo V, Baldassarre G, Pentimalli F, Berlingieri MT, Boccia A, Chiappetta G, Palazzo J, Manfioletti G, Giancotti V, Viglietto G, Scambia G, Fusco A (2003). HMGA1 protein over- expression is a frequent feature of epithelial ovarian carcinomas. Carcinogenesis 24:1191-1198.

McGregor AD, Buurgoyne M, Tan KC (1988). Recurrent pleomorphic salivary adenoma- the relevance of age at first presentation. Br J Plast Surg 41:177-181.

Milde- Langosch K, Röder H, Andritzky B, Aslan B, Hemminger G, Brinkmann A, Bamberger CM, Löning T,Bamberger AM (2004).The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. Kluwer Academic Publishers 86:139-152.

Miller JR, Moon RT (1996). Signaltransduction through beta-catenin and specification of cell during embryogenesis. Genes Dev 10.2527-2539

Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada K, Imai K (2004). Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. Cancer Res 64:2024-2029.

Muller S, Vigneswaran N, Gansler T, Gramlich T, DeRose PB, Cohen C (1994). c-erbB-2oncoprotein expression and amplification in pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma: relationchip to prognosis. Mod. Pathol. 7:628-632.

Myssiorek D, Ruah CB, Hybels RL (1990). Recurrent pleomorphic adenomas of the parotid gland. Head Neck 12:332.336.

Nam ES, Kim DH, Cho SJ, Chae SW, Kim HY, Kim SM, Ham JJ, Shin HS, Park YE (2003).Expression of HMGI(Y) associated with malignant phenotype of human gastric tissue. Histopathology 42:466-471.

Queimado L, Lopes C, Du F, Martins C, Fonseca I, Bowcock AM, Soares J, Lovett M (1999). In vitro transformation of cell lines from human salivary gland tumors. Int J Cancer 81:793-798.

Reeves R, Nissen MS (1990). The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal protein. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. J Biol Chem 265:8573-8582.

Reimers N, Zafrakas K, Assmann V, Egen C, Riethdorf L, Riethdorf S, Berger J, Ebel S, Jänicke F, Sauter G, Pantel K. (2004). Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells. Clin Cancer Res 10:3422-3428.

Renehan A, Gleave EN, Hancock BD, Smith P, McGurk M (1996). Long-term follow-up of over 1000 patients with salivary gland tumors treated in a single centre. Br J Surg 83 :1750-1754.

Riethdorf S, Reimers N, Assman V, Kornfeld JW, Terracciano L, Sauter G, Pantel K (2006). High incidence of EMMPRIN expression in human tumors. Int J Cancer 119 :1800-1810.

Righi PD, Li YQ, Deutsch M, et al.(1994). The role of the p53 gene in the malignant transformation of pleomorphic adenomas of the parotid gland. Anticancer Res 14:2253-2257.

Roijer E, Nordkvist A, Strom AK, Ryd W, Behrendt M, Bullerdiek J, Mark J, Stenman G (2002). Translocation, deletion/ amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. Am. J. Pathol 160:433.440.

Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Henning Y, Helmke B, Bonk U, Bullerdiek J (1996). HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. Am J Pathol 149:775-779.

Rogalla P, Drechsler K, Schroeder- Babo W, Eberhardt K, and Bullerdiek J (1998). HMGI-C expression patterns in non- small lung cancer and surrounding tissue. Anticancer Res. 18:3327-3330.

Rommel B, Rogalla P, Jox A, Kalle CV, Kazmierczak B, Wolf J, and Bullerdiek J (1997). HMGI-C,a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells. Leuk Lymphoma 26:603-607.

Rosa JC, Felix A, Fonseca I, Soares J (1997). Immunoexpression of c-erbB-2 and p53 in benign and malignant salivary neoplasm with myoepithelial differentiation. J Clin Pathol 50:661-663.

Rosa JC, Fonseca I, Felix A, Soares J (1996). Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. Histopathology 28:247-252.

Sandros J, Stenman G, Mark J (1990). Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumours. Cancer Genet Cytogenet 44:153-167.

Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ (1995). Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumors. Nat Genet 10:436- 444.

Seifert G, Miehlke A, Haubrich J, Chilla R (1986). Diseas of the salivary glands.Pathology Diagnosis. Treatment. Facial nerve surgery. Thieme,Stuttgart, New York 182-194.

Seifert G, Sobin L (1991). World Health Organization histological typing of salivary gland tumours. 2nd edition. New York:Springer-Verlag NY Inc.

Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D, Van der Haegen BA (1993). E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. Oncogene 8:1407-1413.

Sornberger KS, Weremowicz S, Williams AJ, Quade BJ, Ligon AH, Pedeutour F, Vanni R, Morton CC (1999). Expression of HMGIY in three uterine leiomyomata with complex rearrangements of chromosome 6. Cancer Genet Cytogenet 114:9-16.

Stanley RE, Mackenzie IJ, Maran AGD (1984). The surgical approach to recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. Ann Acad Med Singapore 13:91-95.

Stenman G, Sandros J, Noerdkvist A, mark J, Sahlin P (1991). Expression of ERBB2 protein in benign and malignant salivary gland tunors. Genes Chromosomes Cancer 3:128-135.

Stennert E, Guntinas- Lichius O, Klussmann JP, Arnold G (2001). Histopathology of pleomorphic adenoma in the parotid gland: A prospective unselected series of 100 cases. Laryngoscope 111:2195-2200.

Stern C, Meyer K, Bartnitzke S, Schloot W , Bullerdiek J (1990). Pleomorphic adenomas with unbalanced chromosomal abnormalities have an increased in vitro lifetime. Cancer Genet Cytogenet 46:55-63.

Sun J, Hemler ME (2001). Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/ extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. Cancer Res 61:2276-2281.

Tamimi Y, Van der Poel HG, Denyn MM, Umbas R, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA (1993). Increased expression of high mobility group protein I(Y) in high grade prostatic cancer determined by in situ hybridization. Cancer Res. 53:5512-5516.

Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, et al. (2005).Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. Cancer Res 65:3193-3199.

Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G (2007). Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. Mod Pathol 20:192-198.

Voravud N, Shin DM, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN (1993). Increased polysomies of chromosomes 7 and 17 during head and neck multistage tumorigenesis.Cancer Res 53:2874-2883.

Voz ML, Åström AK, Kas K, Mark J, Stenman G, Van de Ven WJ (1998). The recurrent translocation t(5;8)(p13;q12) in pleomorphic adenomas results in upregulation of PLAG1 gene expression under control of the LIFR promoter. Oncogene 16:1409-1416.

Voz ML, Mathys J, Hensen K, et al. (2004). Microarray sceening for target genes of the proto-oncogene PLAG1. Oncogene 23(1): 179-191.

Watkin GT, Hobsley M. Influence of local surgery and radiotherapy on the natural history of pleomorphic adenomas. Br. J. Surg.1986; 73:74-76.

Webb AJ, Eveson JW (2001). Pleomorphic adenomas of the major salivary glads: a study of the capsular form in relation to surgical management. Clin Otolanryngol 26:134-142

Weber A, Hengge UR, Stricker I, Markwart A, Anhalt K, Dietz A, Wittekind C, Tannapfel A (2007). Protein microarrays for detection of biomarkers in head and neck squamous cell carcinomas. Hum Pathol 38: 228-238

Williams AJ, Powell WL, Collins T, and Morton CC (1997). HMGI(Y) expression in human uterine leiomyomata. Involvement of another high mobility group architectural factor in a benign neoplasm. Am J Pathol 150:911-918.

Wolffe AP (2001). Architectural transcription factors. Science (Wash. DC) 264:1100-1101.

Yan L, Zucker S, Toole BP (2005). Roles of the multifunctional glycoprotein, emmprin (basigin; CD147), in tumour progression. Thromb Haemost 93:199-204.

Zucker S, Hymowitz M, Rollo EE (2001). Tumorigenic potential of extracellular matrix metalloproteinase inducer. Am J Pathol 158:1921-8.

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Löning möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Röser für die ausgezeichnete wisssentschaftliche und herzliche Betreuung dieser Arbeit.

Für die Unterstützung bei der Ausführung experimenteller Arbeiten danke ich PD Dr. Gazanfer Belge und Norbert Drieschner aus dem Zentrum für Humangenetik in Bremen.

Herrn Dr. Thorsten Jäkel möchte ich für die Hilfestellungen bei der histologischen Auswertung danken.

Herrn PD Dr. Andreas Pommerening danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Fotos.

Meinem Vater Dr. Klaus Wiedhahn danke ich ganz besonders für seine Geduld, seine Zeit, sein Interesse und seine große Unterstützung für diese Arbeit.

## 9. Lebenslauf

| | |
|---|---|
| Name, Vorname: | Wiedhahn, Claudine |
| Geboren: | am 13.9.1979 in Hamburg |
| Anschrift: | Am Hampfberge 5, 21227 Bendestorf |
| | |
| 1986-1999 | Rudolf-Steiner-Schule Hamburg-Harburg |
| Juni 1999 | allgemeine Hochschulreife (Abitur) |
| April 2000 | Beginn des Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg |
| September 2003 | Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum) an der Universität Hamburg |
| Juli 2006 | Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen) an der Universität Hamburg |
| August 2006 | Zahnärztliche Approbation in Hamburg |
| August 2006 | Beginn der zahnärztlichen Assistenzzeit in einer Praxis in Buchholz i.d. Nordheide |

## 10. Erklärung

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

Hamburg, den 2.11. 2007