

Aus dem
Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. H.-K. Müller-Hermelink

**Rekurrente genetische Aberrationen von Thymomen und
Thymuskarzinomen**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Kai Wagner
aus Marbach

Würzburg, im Januar 2003

Referent: Prof. Dr. med. A. Marx

Korreferent: Prof. Dr. med. R. Gold

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Dezember 2003

Der Promovend ist Arzt im Praktikum.

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Tumorentstehung.....	1
1.2	Thymome – Definition und Klinik.....	2
1.3	Klassifikation der Thymome	4
1.4	Pathogenese der Thymome.....	9
1.5	Grundprinzipien der CGH.....	12
1.6	Fragestellungen	13
2.	Material und Methoden	14
2.1	Herkunft des untersuchten Materials.....	14
2.2	DNA-Extraktion	17
2.2.1	Paraffinmaterial.....	17
2.2.2	Frischmaterial	18
2.3	Nick Translation	18
2.4	Komparative genomische Hybridisierung.....	19
2.5	Bildaufnahme und Bildauswertung.....	21
3.	Ergebnisse	22
3.1	WHO Typ A Thymom (Medulläres Thymom)	22
3.2	WHO Typ B3 Thymom (gut differenziertes Thymuskarzinom)	22
3.3	Primäres Plattenepithelkarzinom des Thymus (WHO Typ C Thymom).....	24
3.4	Sonstige Entitäten	25
3.4.1	Mikronoduläres Thymom.....	25
3.4.2	Metaplastisches Karzinom des Thymus.....	25
3.4.3	Lymphoepitheliales Karzinom	25
3.4.4	Karzinoid des Thymus.....	25
3.4.5	Adenokarzinom	26
3.4.6	Undifferenziertes Karzinom.....	26

4.	Diskussion	27
4.1	WHO Typ A Thymome	28
4.2	WHO Typ B3 Thymome	29
4.3	WHO Typ C Thymome	33
4.4	Genetische Verwandtschaft zwischen WHO Typ B3 und primären Plattenepithelkarzinomen des Thymus.....	36
4.5	Genetische Alterationen und paraneoplastische Autoimmunphänomene	38
5.	Zusammenfassung	41
6.	Literaturangaben	42
7.	Abkürzungen	55
8.	Anhang	57
	Abbildungen	58
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Tumorentstehung

Solide Tumoren entstehen als Folge einer klonalen Dysregulation der Zellproliferation, die zu einer Immortalisation der betroffenen Zellen mit einem von äußeren regulativen Einflüssen unabhängigen, autonomen Zellwachstum führt. Hanahan und Weinberg (HANAHAN D et al., 2000) nennen sechs Veränderungen der Wachstumsregulation einer Zelle, die als entscheidend für das Entstehen maligner Tumoren betrachtet werden: Unabhängigkeit von externen, wachstumsfördernden Signalen, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Apoptoseresistenz, unbegrenzte Replikationsfähigkeit, Tumorneoangiogenese sowie die Fähigkeit zu Invasion und Metastasierung.

Nach heutigem Verständnis stellen die Grundlage für die klonale Dysregulation der Zellproliferation Veränderungen am Genom der Zelle dar, die durch genetische Instabilität in einem Mehrstufenprozess erworben werden. Derartige Veränderungen umfassen zum einen numerische chromosomale Aberrationen, die durch unbalancierten Zugewinn und Verlust von genetischem Material gekennzeichnet sind, zum anderen können durch Chromosomenbrüche strukturelle Aberrationen im Genom der Tumorzellen auftreten. Ferner kann die Integrität des Genoms auf Genebene durch Mutationen sowie Genamplifikationen gestört werden.

Die durch diese Mechanismen bedingten Veränderungen der Integrität des zellulären Genoms können letztlich zur unkontrollierten Aktivierung von wachstumsfördernden Genen (sog. Onkogene), zum Funktionsverlust von wachstumshemmenden Genen (sog. Tumorsuppressorgene) und von Genen, die den Zelltod (Apoptose) sowie die DNA-Reparatur regulieren, führen, die autonomes, neoplastisches Wachstum zur Folge haben.

Die Untersuchung des Genoms von Tumorzellen ermöglicht somit Einblicke in Genomabschnitte, die bei der Entstehung von soliden Tumoren, wie dem Thymom, von entscheidender Bedeutung sind.

1.2 Thymome – Definition und Klinik

Tumoren des Thymusepithels werden als Thymome bezeichnet. Der Thymus ist ein im Mediastinum lokalisiertes Organ des Immunsystems, das durch eine Kapsel begrenzt und in Läppchen gegliedert ist. Das Organ wird in die Thymusrinde und das Thymusmark eingeteilt. Das Thymusparenchym wird im wesentlichen durch kortikale und medulläre Thymusepithelzellen gebildet, die von zahlreichen T-Lymphozyten unterschiedlicher Entwicklungsstufen umgeben werden. (MÜLLER-HERMELINK HK et al., 1996).

Die Funktion des Thymus besteht in der Heranbildung des humanen T-Zellrepertoires (MÜLLER-HERMELINK HK et al., 1996). Aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen der T-Lymphozyten wandern in den Thymus ein und reifen unter Einfluß der kortikalen und medullären Thymusepithelzellen zu reifen, funktionstüchtigen T-Zellen heran. Neben der Restriktion der T-Zellen auf den körpereigenen MHC-Komplex (positive Selektion), findet hier auch die Elimination potentiell autoreaktiver T-Zellen statt (negative Selektion) (VON BOEHMER H, 1990; OHASI PS et al., 1990; MARRACK P et al., 1994; BEVAN MJ et al., 1994).

Der Begriff des Thymoms wurde im Jahre 1917 von Bell (BELL ET, 1917) eingeführt und bezeichnet grundsätzlich einen Tumor, der vom Thymusepithel ausgeht. Nicht verwendet wird der Begriff Thymom für Tumoren, die nicht vom Epithel des Thymus ausgehen, jedoch trotzdem im Thymus als Primärtumor auftreten, wie maligne Lymphome, Keimzelltumoren sowie Karzinoide. Dem Begriff Thymom wird häufig der des Thymuskarzinoms gegenübergestellt. Die Abgrenzung beider Begriffe ist jedoch unscharf (MÜLLER-HERMELINK HK et

al., 2000) und spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Klassifikationsschemata, auf die später eingegangen werden soll, wider (ROSAI J et al., 1999). Ein histologisches Charakteristikum der meisten Thymome besteht in der Rekapitulation der dem normalen Thymus ähnelnden Wachstumsmustern: Neben der charakteristischen neoplastischen epithelialen Komponente der Thymome zeigt deren Morphologie je nach histologischem Subtyp zusätzlich eine unterschiedlich stark ausgeprägte Beimengung an Lymphozyten, die sogenannten Thymozyten, die jedoch nicht neoplastisch sind.

Thymome treten meist erst nach dem 40. Lebensjahr auf. Beide Geschlechter sind gleichermaßen betroffen. Hauptlokalisation ist das vordere obere Mediastinum. Vereinzelt treten Thymome jedoch auch in ektopem Thymusgewebe im Bereich des Halses, der Schilddrüse oder des Lungenhilus auf (ASTER J et al., 1999). Je nach Dignität können Thymome das Mediastinum sowie angrenzende Organe infiltrieren und metastasieren. Dies spiegelt sich auch in der international gebräuchlichen klinischen Stadieneinteilung der Thymome wider, die 1981 von Masaoka eingeführt wurde (MASAOKA A et al. 1981). Im Stadium I ist der Tumor makroskopisch komplett abgekapselt und zeigt auch mikroskopisch keine Kapselinfiltration. Unter das Stadium II fallen alle Tumoren, die die Kapsel mikroskopisch oder bereits makroskopisch, das umgebende Fettgewebe oder die mediastinale Pleura infiltrieren. Im Stadium III zeigt sich eine Infiltration des Perikards, der großen Blutgefäße oder der Lunge. Eine pleurale oder perikardiale Aussaat wird als Stadium IVa, Lymphknoten- oder Fernmetastasen werden als Stadium IVb klassifiziert.

Thymome werden oft zufällig bei bildgebenden Verfahren oder bei thoraxchirurgischen Eingriffen entdeckt. Sie werden gelegentlich auch als mediastinale Raumforderungen durch lokale Verdrängung klinisch auffällig. Darüber hinaus manifestieren sich Thymome häufig durch das Auftreten von paraneoplastischen Autoimmunerkrankungen, die durch fehlgesteuerte T-Zellreifungsvorgänge unter Einfluß der neoplastischen Thymusepithelzellen bedingt sind (MÜLLER-HERMELINK HK et al., 2000). Insbesondere das

Auftreten einer Myasthenia Gravis bei Thymomen ist sehr häufig. Sie ist durch Autoantikörper charakterisiert, die vor allem gegen den Acetylcholinrezeptor gerichtet sind, so die neuromuskuläre Übertragung stören und eine progressive Muskelschwäche hervorrufen (MOSSMANN S et al., 1986; DE BAETS MH et al., 1993).

1.3 Klassifikation der Thymome

Die morphologische Vielfalt der Thymome durch die unterschiedlichen Formen der neoplastischen Epithelzellen einerseits, die ausgeprägte, variable Beimengung von Lymphozyten andererseits sowie das Bestreben, die histologische Variabilität mit dem klinischen Verhalten dieser Tumoren zu korrelieren, führte zu vielfältigen Klassifikationsversuchen, von denen die wichtigsten im Folgenden besprochen werden (siehe auch Tabelle 1). Viele bisherige Einteilungen und Namensgebungen waren sehr kontrovers und umstritten (LEVINE GD et al., 1978; MARX A et al., 1999; SUSTER S et al., 1999; KORNSTEIN MJ, 1999). Erst im Jahre 1999 wurde die allgemeingültige Klassifikation durch die WHO veröffentlicht (ROSAI J et al., 1999). Die Charakteristika der wichtigsten Klassifikationen sollen kurz dargestellt werden. Bernatz und Lattes (BERNATZ PE et al., 1961; LATTES R, 1966) orientierten sich in ihrer, lange Zeit in den USA gebräuchlichen Klassifikation am Verhältnis der Anzahl der Lymphozyten zur Anzahl und Form der Tumorzellen. Sie unterschieden ein prädominant spindelzelliges Thymom (mehr als zwei Drittel fusiforme Epithelzellen), ein prädominant lymphozytäres Thymom (mehr als zwei Drittel des Tumors Lymphozyten), ein prädominant gemischt lymphozytäres und epitheliales Thymom (Lymphozyten und Epithelzellen zu ungefähr gleichen Teilen) sowie ein prädominant epitheliales Thymom (vor allem polygonale Epithelzellen, die mindestens zwei Drittel aller Zellen des Tumors ausmachen). Die Schwierigkeit in der Reproduzierbarkeit dieser Klassifikation bestand in der Variabilität des Verhältnisses von Lymphozyten

und Epithelzellen innerhalb eines Tumors, das von Areal zu Areal sehr unterschiedlich sein kann (HARRIS NL, 1997).

Hauptkriterien der Thymomklassifikation nach Levine und Rosai (LEVINE GD et al., 1978) waren invasives Wachstum und zytologische Atypie der Tumorzellen. Unterschieden wurde zwischen benignen Thymomen, malignen Thymomen Kategorie I und II. Als benigne Thymome wurden Tumoren bezeichnet, die eine komplett umgebende Kapsel besaßen, nicht invasiv waren und keine Atypien aufwiesen. Thymome wurden als maligne Thymome der Kategorie I bezeichnet, wenn sie lokal invasiv wuchsen, aber keine oder nur minimale Atypien besaßen. Maligne Thymome der Kategorie II, auch als Thymuskarzinome bezeichnet, waren durch Atypien und Invasivität gekennzeichnet. Als problematisch erwies sich bei dieser Klassifikation die Beurteilung der Kapselinvasion wegen des gelegentlichen Fehlens einer echten Organkapsel sowie der Läppchengliederung bei vielen Thymomen. Auch die Anwendung der Klassifikation an Biopsiematerial erwies sich als problematisch. Histomorphologische Charakteristika der Tumorzellen fanden in dieser weitestgehend am Wachstumsmuster orientierten Klassifikation wenig Berücksichtigung (HARRIS NL, 1997).

Morphologie, Histogenese und klinische Gesichtspunkte waren die Kriterien bei der Klassifikation nach Marino und Müller-Hermelink (MARINO M et al., 1985) sowie der Überarbeitung durch Kirchner und Müller-Hermelink (KIRCHNER T et al., 1989, 1992). Basierend auf der morphologischen Ähnlichkeit von neoplastischen und normalen Thymusepithelien wurden Thymome histologisch in fünf Typen eingeteilt: das medulläre Thymom, das gemischte Thymom, das prädominant kortikale (organoide) Thymom, das kortikale Thymom und das gut differenzierte Thymuskarzinom (WDTC). Neu und entscheidend an dieser Klassifikation war die Berücksichtigung der Histomorphologie bei der Beurteilung der Dignität der Thymome, deren Bedeutung bei der Einschätzung des malignen Potentials durch mehrere klinisch-pathologische Studien bestätigt wurde: Medulläre Thymome zeigten die niedrigste, gutdifferenzierte Thymuskarzinome die höchste Häufigkeit invasiven Wachstums. Rezidive und Todesfälle traten am häufigsten bei kortikalen Thymomen sowie bei gut

differenzierten Thymuskarzinomen auf (PESCARMONA E et al., 1990; PESCARMONA E et al., 1990; KIRCHNER T et al., 1992; PESCARMONA E et al., 1992; KUO TT et al., 1993; QUINTANILLA-MARTINEZ L et al., 1993; QUINTANILLA-MARTINEZ L et al., 1994).

Die Bemühungen um eine international einheitliche Thymomklassifikation endeten 1999 in einer jetzt international gebräuchlichen Klassifikation der Thymome nach Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO-Klassifikation). Nach dieser Klassifikation (ROSAI J et al., 1999) werden die epithelialen Thymustumoren, unter Verwendung von Buchstaben und Zahlen, nach zwei Haupttypen unterschieden, abhängig von der Form der neoplastischen Epithelzellen. Typ A (für atrophisch) zeigt spindelförmige oder auch ovale Epithelien, während Typ B (für bioaktiv) eher dendritische oder epitheloide Formen seiner Epithelzellen aufweist. Kommen beide Formen in einem Tumor vor wird er als Typ AB bezeichnet. Typ B wird in B1, B2 und B3 unterteilt, basierend auf dem Verhältnis Epithelzellen/ Lymphozyten sowie dem Nachweis von Atypien in den neoplastischen Epithelien. Typ C (für Carcinom) beinhaltet nicht organotypische Thymustumoren, die Ähnlichkeit mit Karzinomen aufweisen, die außerhalb des Thymus auftreten.

Die genetischen Untersuchungen der vorliegenden Dissertation beschränkte sich auf die Thymomtypen WHO Typ A, Typ B3 und Typ C, die im weiteren kurz vorgestellt werden sollen.

Thymome vom WHO Typ A werden synonym auch als medullär oder spindelzellig bezeichnet. Der Tumor ist in den allermeisten Fällen kapselartig begrenzt. Histologisch erkennt man eine monotone Population von ovalen oder spindelförmigen kleinen Epithelzellen, die keine Atypien aufweisen. Nichtneoplastische Lymphozyten treten nur selten bis gar nicht auf. Die Kerne sind elongiert, die Nukleoli sind unauffällig. Der solide wachsende Tumor zeigt einen benignen Verlauf. Eine operative Therapie geht meist mit der Heilung einher. Rezidive und Metastasen sind äußerst selten. Quintanilla-Martinez (QUINTANILLA-MARTINEZ L et al., 1993) bezifferte die Häufigkeit einer Assoziation mit Myasthenia Gravis mit 25%.

Thymome vom WHO Typ B3 werden auch als epitheliale, atypische, squamoide Thymome oder auch als gut differenzierte Thymuskarzinome bezeichnet. Sie sind überwiegend aus epithelialen Zellen zusammengesetzt, die eine runde bis polygonale Form aufweisen. Unterschiedlich ausgeprägte zytologische Atypien wie kleine runde Kerne mit unauffälligen Nukleoli oder auch große unregelmäßige, hyperchromatische Kerne mit prominenten Nukleoli sind, wie auch Mitosen, vorhanden. Die neoplastischen Epithelzellen liegen zwischen unregelmäßig angeordneten fibrös-sklerotischen Bindegewebssepten. Zusätzlich tritt eine kleine Anzahl an Lymphozyten auf. B3 Thymome sind in den allermeisten Fällen invasiv. Die Rezidivfreiheit wird mit 58% in fünf Jahren und mit 46% in 10 Jahren angegeben (QUINTANILLA-MARTINEZ L et al., 1994). Die Überlebensraten betragen nach fünf Jahren 80% und nach 10 Jahren 54% (MÜLLER-HERMELINK HK et al., 1996). Die Assoziation mit der autoimmunologischen Myasthenia Gravis wird mit 40% (QUINTANILLA-MARTINEZ L et al., 1993) beziffert.

Die nach der WHO-Klassifikation zum Typ C gerechneten nicht organotypischen Plattenepithelkarzinome des Thymus weisen keine Kapsel auf. Morphologisch sind teils ausgeprägte Desmoplasien, Atypien und Nekrosen zu finden. Thymusspezifische Merkmale wie unreife Lymphozyten fehlen. Vorhandene Lymphozyten sind reif und treten gemeinsam mit Plasmazellen auf. Histologisch entsprechen diese Tumoren extrathymischen Plattenepithelkarzinomen (SHIMOSATO Y et al., 1977). Hyalines Stroma und vesikuläre Kerne sind charakteristisch (SHIMOSATO Y, 1997). Verhornung ist bei einem Teil der Plattenepithelkarzinome vorhanden. Immunhistochemisch kennzeichnend ist eine Expression von CD5 (DORFMANN DM et al., 1997; ROSAI J et al., 1999). Die Fünfjahresüberlebensrate betrug in einer Studie 33% für Kategorie II Thymome, zu denen die Plattenepithelkarzinome gezählt werden (LEWIS CR et al., 1987). Eine Assoziation mit Myasthenia Gravis besteht nicht (MÜLLER-HERMELINK HK et al., 1996).

Tabelle 1: Gegenüberstellung der klinisch-pathologischen Klassifikation nach Levine und Rosai (LEVINE GD et al., 1978), der histogenetischen Klassifikation nach Müller-Hermelink und Mitarbeitern (KIRCHNER T et al., 1989; KIRCHNER T et al., 1992; MÜLLER-HERMELINK HK et al., 1996; MÜLLER-HERMELINK HK et al., 1997) sowie der neuen WHO-Klassifikation (ROSAI J et al., 1999)

Klinisch-Pathologisch	WHO	Histologisch
Benignes Thymom	A	medullär
	AB	gemischt
Malignes Thymom (Kat.I)	B1	prädominant kortikal
	B2	kortikal
	B3	WDTC
Malignes Thymom (Kat.II)	C	Plattenepithelkarzinom (I-III)
		Basaloides Karzinom
		Mukoepidermoides Karzinom
		Lymphoepitheliomartiges Karzinom
		Klarzelliges Karzinom
		Sarkomatoides Karzinom
		Kleinzelliges/neuroendokrines Karzinom
		Anaplastisches Karzinom

Kurz erwähnt werden sollten hier auch vier weitere Entitäten, die in den Jahren 1997 und 1999 beschrieben wurden, jedoch nur teilweise Eingang in die WHO-Klassifikation gefunden haben.

Von Fällen eines niedriggradigen metaplastischen Thymuskarzinoms berichtete Yoneda (YONEDA S et al., 1999). Die Patienten zeigten keine Anzeichen von Myasthenia Gravis oder anderen Autoimmunerkrankungen sowie bislang keine Metastasierung. Suster beschrieb Fälle eines pseudosarkomatösen Thymoms sowie eines mikronodulären Thymoms mit lymphoider B-Zell-Hyperplasie, die beide einen benignen Verlauf aufwiesen und keine Assoziation mit

paraneoplastischer Myasthenia Gravis zeigten. Außerdem beschrieb er Fälle eines spindelzelligen Thymuskarzinoms, das einen hochmalignen Verlauf aufwies (SUSTER S et al., 1997,1999).

1.4 Pathogenese der Thymome

Über die Pathogenese von Thymomen ist bislang nur sehr wenig bekannt. Insbesondere genetische Aberrationen in Thymomen sind bislang nur in vereinzelten Kasuistiken, denen unterschiedlichste Thymomklassifikationen zu Grunde lagen, beschrieben worden (Tabelle 2) (VAN DEN BERGHE I et al., 2002; GOH SGN et al., 2001; SAIT SNJ et al., 2001; MIRZA I et al., 2000; SONOBE H et al., 1999; SONOBE et al.,1998; DAL CIN P et al., 1996; DAL CIN P et al., 1993; LEE AC et al., 1993; KUBONISHI I et al., 1991; KEES UR et al., 1991; KRISTOFFERSON U et al., 1989). Bei der einzigen rekurrenten genetischen Veränderung, über die in der Literatur berichtet wird, handelt es sich um eine Translokation $t(15;19)(q15;p13)$ bei einer Form eines undifferenzierten Thymuskarzinoms, das vorwiegend bei Kindern oder jungen Erwachsenen auftritt, auf Therapie nicht anspricht sowie eine nur kurze Überlebensrate aufweist (LEE AC et al., 1993; KEES UR et al., 1991; KUBONISHI I et al., 1991). Der genaue Bezug dieser Entität zum Thymus als postulierten Ausgangsort der Erkrankung bzw. zu Thymomen des Erwachsenenalters ist jedoch unklar. Auch über die molekulare Onkogenese bei epithelialen Tumoren des Thymus ist in der Literatur nur wenig bekannt. Einige Studien legten den Schluß nahe, daß Alterationen von p53, p21, bcl2 oder des EGF-Rezeptors eine pathogenetische und prognostische Relevanz haben könnten (CHEN FF et al., 1996; GILHUS NE et al., 1995; HAYASHI Y et al., 1995; PICH A et al., 1996; WEIRICH G et al., 1997; STEFANAKI K et al.,1997). Hirabayashi legt in seiner Studie nahe, daß eine Inaktivierung des CDKN2- oder des Rb-Gens eine signifikante Rolle bei der Pathogenese der Thymome spielen könnte (HIRABAYASHI H et al., 1997). Parrens weist auf

eine veränderte Expression von NGF-Rezeptoren hin, die pathogenetisch von Bedeutung sein könnten (PARRENS M et al., 1998).

Tabelle 2: Auflistung publizierter zytogenetischer Veränderungen unterschiedlicher Thymomentitäten

AUTOR	JAHR	DIAGNOSE (WHO-Klassifikation)	CYTOGENETIK
Kristofferson	1989	B1 AB	44, XY, +X, inv(2)(p25q13), del(6)(q15), -8, -16, -17 48-49, XX, +del(X)(q24), +i(5p), +?del(7)(q22), der(11)t(1;11)(q23;q25), t(11;?)(p15;?), -18, +r
Dal Cin	1993	B1(?)	46, XY, r(6)(p22-pter, q21-pter)
Van den Berghe	2002	AB	46, XY; r(6)(p2?q35?), der(21)t(6;21)(p25;q22)
Goh	2001	AB	45, XX, pseu dic(16;12)(q11;p11.2)
Sait	2001	C	t(1;8)(p13;p11)
Dal Cin	1996	A(?)	46, XX, t(15;22)(p11;q11)
Sonobe	1999	B1(?)	57, X, -Y, +i(1)(q10), +add(4)(q12) +7,+8,+9,+14,+14,+15,+16, der(17)t(9;17)(q13;p13), +20, +22[6]/46, XY[14]
Mirza	2000	A	46, XX, del (6)(p22;p25)
Sonobe	1998	TSCC	52, XY, +4,+5,+8,+12,+16, der(16)t(1;16)(q12;q12.1)x2, +17,[7]/45,X, -Y[5]/46, XY[13]
Kubonishi	1991	?	46, XX, t(15;19)(q15;p13)
Kees	1991	?	46, XX, t(15;19)(p12;q13)
Lee	1993	?	46, X, -Y, +X, t(15;19)(q15;p13)

1.5 Grundprinzipien der CGH

Die komparative genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) wurde erstmals 1992 von Kallioniemi (KALLIONIEMI A et al., 1992) beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine molekulargenetische Methode mit der Zugewinne und Verluste von genetischem Material, entsprechend numerischen chromosomalen Aberrationen eines Tumors, durch Vergleich der Tumor-DNA mit DNA aus nicht-neoplastischem Gewebe ermittelt werden können. Nach unterschiedlicher Markierung der Normal- und Tumor-DNA und Kohybridisierung auf normale humane Metaphasen können anhand des jeweiligen Signalverhältnisses Gewinne und Verluste von genetischem Material nachgewiesen werden. Nach Untersuchung mehrerer Fälle ergibt sich ein Aberrationsmuster einer Tumorentität (PETERSEN I et al., 1997). Chromosomenabschnitte, die Verluste an genetischem Material aufweisen, können hierbei Hinweise auf die Lokalisation eines in der Pathogenese des jeweiligen Tumors bedeutenden Tumorsuppressorgens geben. Amplifikationen sowie chromosomale Regionen, die einen Zugewinn an genetischem Material aufweisen, können Onkogene beinhalten, die in der Tumorgenese von Bedeutung sind.

Die CGH hat sich als rasche und umfassende genetische Screening-Methode erwiesen, die sowohl an Frisch- als auch an Paraffinmaterial angewendet werden kann. Balancierte chromosomale Veränderungen wie Inversionen oder auch Translokationen sind mit der Methode der CGH nicht darstellbar. Limitiert ist die Methode weiterhin durch die Auflösung, die je nach Autor mit 2 bis 10 Mb bei Amplifikationen sowie größer als 10 Mb bei Deletionen angegeben werden. Ausnahme hierbei sind sogenannte High-level-Amplifikationen, die je nach Amplifikationsgrad auch schon im Bereich von weniger als 1 Mb darstellbar sind (JAMES L, 1999; FOROZAN F et al., 1997; KALLIONIEMI OP et al., 1994).

1.6 Fragestellungen

Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation bestand in der Charakterisierung chromosomaler Aberrationen epithelialer Tumoren des Thymus mittels komparativer genomischer Hybridisierung. Zum einen sollte nachgewiesen werden, ob Thymome wie andere solide Neoplasien rekurrente Zugewinne und Verluste an genetischem Material aufweisen, die Rückschlüsse auf die Pathogenese der Tumoren ermöglichen; zum anderen sollte überprüft werden, ob den Thymomentitäten der aktuellen WHO-Klassifikation charakteristische und möglicherweise die jeweiligen Entitäten definierende chromosomale Veränderungen zugrunde liegen. Der Vergleich von entitätenspezifischen chromosomalen Veränderungen sollte mit dem Histogenesekonzept der Thymome korreliert werden, um mögliche Verwandtschaftsbeziehungen zwischen unterschiedlichen Thymomentitäten zu ermitteln. Insbesondere war eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung der Stellung der primären thymischen Plattenepithelkarzinome im Vergleich zu den histologisch ähnlichen, jedoch klinisch und funktionell völlig unterschiedlichen gutdifferenzierten Thymuskarzinomen. Durch die genetische Untersuchung der Thymome sollten schließlich auch Hinweise auf den Einfluß genetischer Veränderungen auf das Auftreten paraneoplastischer Autoimmunphänomene gewonnen werden. Vor allem die Myasthenia Gravis war hierbei von besonderem Interesse, da die Erkrankung bei unterschiedlichen Thymomentitäten unterschiedlich häufig in Erscheinung tritt (MARX A et al., 1999; MÜLLER-HERMELINK HK et al., 1999).

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft des untersuchten Materials

Im Rahmen dieser Dissertation wurde Gewebe von 54 Patienten untersucht. Die Gewebeproben stammten alle aus dem Einsendegut des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg und waren sowohl nach der histogenetischen Klassifikation nach Marino und Müller-Hermelink (MARINO M et al., 1985) als auch nach der WHO-Klassifikation klassifiziert worden. Voraussetzung für die Untersuchung des Materials mittels komparativer genomischer Hybridisierung war ein hoher Tumorzellgehalt. Es wurden nach mikroskopischer Sichtung nur Fälle in die Untersuchung aufgenommen, bei denen mehr als 60% der Zellen Tumorzellen entsprachen, da bei zu hohem Gehalt an nichttumörösen Zellen genetische Aberrationen in der CGH unentdeckt bleiben (WEISS MM et al., 1999). Aus diesem Grund beinhaltet diese Untersuchung keine Thymome der WHO Typen AB, B1 sowie B2.

Speziell wurden 13 Thymome vom WHO Typ A (n=13) und 23 Thymome des WHO Typs B3 (n=23) untersucht. Ferner wurden 12 Plattenepithelkarzinome des Thymus, die dem WHO Typ C (n=12) zugerechnet werden, untersucht. Zusätzlich beinhaltet diese Dissertation die Untersuchung von zwei mikronodulären Thymomen (n=2), drei metaplastischen Karzinomen (n=3), einem lymphoepithelialen Karzinom (n=1), einem Karzinosarkom (n=1), einem Adenokarzinom (n=1) sowie einem undifferenzierten Karzinom (n=1).

Bei zwei Fällen wurden zusätzlich Rezidive, bei weiteren zwei Fällen dazugehörige Metastasen untersucht.

Tabelle 3: Histologische Klassifikation und klinische Daten der 58 mittels CGH untersuchten Thymome

Entität	Nr.	Fall	Alter	Geschl	WHO-Klassifikation	Masaoka-Stadium	MG	Material
MDT	1	H 3202/ 88	65	M	A	I	k.A.	F
	2	H 2901/ 89	66	M	A	I	Ja	P
	3	H 454/ 94	74	W	A	I	k.A.	P
	4	H 24998/ 94	60	W	A	I	Nein	F
	5	E 17821/ 94	37	W	A	II	Ja	F
	6	E 1006/ 95	73	W	A	II	nein	F
	7	H 4560/ 96	57	W	A	I	k.A.	P
	8	H 7336/ 97	68	M	A	III	Nein	P
	9	E 28279/ 98	74	M	A	II	Ja	F
	10	H 788/ 99	65	M	A	I	Nein	F
	11	H 5444/ 99	71	M	A	I	k.A.	P
	12	H 4188/ 99	47	M	A	III	Nein	P
	13	H 5491/ 99	57	M	A	I	Nein	P
WDTC	14	E 9956/ 85	46	M	B3	IVb	Ja	F
	15	E 6175/ 87	48	M	B3(rezidiv)	IVb	Ja	F
	16	E 27920/ 87	45	M	B3	III	Ja	F
	17	E 27409/ 89	63	W	B3	II	k.A.	F
	18	E 27926/ 89	65	M	B3	IVb	Ja	F
	19	E 27926/ 89	65	M	B3(Metast)	IVb	Ja	F
	20	E 10585/ 90	73	W	B3	II	Ja	F
	21	E 14187/ 91	42	W	B3	k.A.	Ja	F
	22	H 3759/ 92	46	W	B3	III	Ja	P
	23	E 12830/ 92	63	M	B3	IVb	k.A.	F
	24	E 13561/ 95	29	M	B3	II	Ja	F
	25	E 11859/ 96	42	W	B3	II	Ja	F
	26	H 2846/ 97	53	W	B3	III	k.A.	P
	27	H 4361/ 97	61	M	B3	k.A.	k.A.	P
	28	E 6331/ 97	47	W	B3	II	Ja	F
	29	H 843/ 98	63	M	B3	IV	Nein	P
	30	H 6694/ 98	57	M	B3	II	Ja	P
	31	H 6829/ 98	74	W	B3	II	k.A.	P
	32	H 8615/ 98	67	W	B3	II	k.A.	P
	33	H 4550/ 99	63	M	B3	III	Ja	P
	34	H 5725/ 99	78	W	B3	IVb	Ja	P
	35	5838/ 99	74	W	B3	k.A.	Nein	P
	36	3164/ 00	71	M	B3	k.A.	k.A.	P

Entität	Nr.	Fall	Alter	Geschl	WHO-Klassifikation	Masaoka-Stadium	MG	Material
TSCC	37	E 28068/ 86	k.A.	W	C	k.A.	k.A.	F
	38	E 18357/ 91	57	W	C	III	k.A.	F
	39	E 16204/ 95	61	W	C(rezidiv)	IVa	k.A.	F
	40	H 366/ 94	57	W	C	k.A.	k.A.	P
	41	H 4309/ 96	45	M	C	III	Nein	P
	42	H 4745/ 97	67	M	C	III	Nein	P
	43	E 16402/ 97	63	M	C	II	Nein	P
	44	H 2466/ 98	73	M	C	k.A.	Nein	P
	45	H 7914/ 98	43	M	C	k.A.	k.A.	P
	46	H 1805/ 99	64	W	C	III	Nein	F
	47	H 5410/ 99	72	W	C	k.A.	Nein	P
	48	H 3344/ 00	59	M	C	IV	Nein	k.A.
Mikro-nodulär	49	H 4234/ 99	73	W		IIb	Nein	P
Mikro-nodulär	50	H 4927/ 99	76	W		I	Nein	P
Meta-plastisch	51	E 27344/ 96	44	W		IVb	Nein	P
Meta-plastisch	52	H 3362/ 99	47	W	(Metast. von 51)	IVb	Nein	P
Meta-plastisch	53	H 6712/97	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.	P
Meta-plastisch	54	H 7744/ 97	35	W		k.A.	k.A.	P
Lympho-epithelial	55	H 6320/ 99	67	M		IVb	nein	F
Karzi-no-sarkom	56	H 4759/ 92	23	M		k.A.	k.A.	F
Adeno-karzinom	57	2605/ 99	41	M		k.A.	k.A.	P
Undiff-erenziert	58	7088/ 99	50	M		k.A.	k.A.	P

Abkürzungen:

MDT= Medulläres Thymom; TSCC= Plattenepithelkarzinom des Thymus; Alter in Jahren; Geschl= Geschlecht; M= männlich; W= weiblich; MG= Myasthenia Gravis; k.A.= keine Angabe; F= Frischmaterial; P= Paraffinmaterial; Metast.= Metastase

2.2 DNA-Extraktion

2.2.1 Paraffinmaterial

Zur Extraktion von Tumor-DNA aus Paraffinmaterial wurden von den vorhandenen Gewebeblöcken zehn bis 50 Schnitte einer Dicke von 6µm angefertigt. Nach Abwiegen und Übertragen des Materials in 2ml-Eppendorftubes wurde das Material je zweimal mit 1ml Xylol sowie 1ml 100% Ethanol gewaschen, um das Paraffin aus dem Gewebe herauszulösen. Nach zweistündigem Trocknen auf dem Hitzeblock bei 50°C wurde das Gewebe für 24 h bei Raumtemperatur in 1 mol/l NaSCN (Sigma, St. Louis, USA) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Material dreifach in 1ml DNA-Isolationspuffer (bestehend aus 75 mmol/l NaCl, 0,5% Tween 20, 25 mmol/l EDTA, pH 8, alle Chemikalien erworben bei Sigma, St. Louis, USA) gewaschen. Der nun folgende Gewebeverdau wurde bei einer Temperatur von 56°C über 72 Stunden in mit Proteinase K (600µl/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzten DNA-Isolationspuffer durchgeführt. Zur Abtrennung der im verdauten Material enthaltenen Proteinreste von der DNA wurde das Material anschließend einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung unterzogen. Hierzu wurde das Material zweifach in Phenol, einmal in Tris-HCl equilibriertem Phenol/Chloroform sowie zweifach in Chloroform (jeweils Roth, Fürth) für jeweils 20 min im Invertiershaker resuspendiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 10000 U/min wurde jeweils die wässrige Phase abpipettiert. Die Fällung der DNA erfolgte bei -80°C über eine Zeit von 30 min nach Zugabe von 25µl 3 mol/l Natriumacetat (pH 5,2) sowie 1ml gekühltem 100% Ethanol. Nach einer Zentrifugation über 15 min bei 13000 U/min wurde unter Schonung des DNA-Pellets der Ethanol abpipettiert und dieser Schritt mit 70% Ethanol wiederholt. Die DNA-Pellets wurden anschließend für einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, danach in 50µl TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6, 1 mmol/l EDTA, jeweils Sigma, St. Louis, USA) resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA photometrisch gemessen.

2.2.2 Frischmaterial

Die Gewinnung des Frischmaterials begann mit dem Anfertigen von 20 bis 30 5µm-Schnitten am Mikrotom. Der Gewebeverdau fand über Nacht bei 50°C in Verdauerpuffer (100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Tris-HCl pH 8, 25 mmol/l EDTA pH 8, 0,5% SDS, alle Chemikalien Sigma, St. Louis, USA) unter Zugabe von 40µl Proteinase K (0,1 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) statt.

Die folgende DNA-Aufreinigung wurde nach der oben für Paraffinmaterial beschriebenen Phenol/Chloroform-Extraktions-Methode und der Ethanol/Natriumacetat-Präzipitation durchgeführt.

2.3 Nick Translation

Um die extrahierte Tumor- und Normal-DNA zu markieren, erfolgte eine sog. Nick Translation nach einem Standardprotokoll (LICHTER P et al.,1995). Die Tumor-DNA wurde mit Biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim), die Normal-DNA, die aus Plazentafrischgewebe einer gesunden Normalperson gewonnen wurde, mit Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim) markiert. Für einen Nick-Ansatz von 100µl (ausreichend für zwei folgende Hybridisierungen) waren 2µg Tumor- resp. Normal-DNA, 10µl NT-Puffer 10x (0.5 mol/l TRIS pH 8,0; 50mmol/l MgCl₂, 500µg/ml BSA, Sigma, St. Louis, USA), 10µl 0.1mol/l Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, USA), 10µl BioMix (Zusammensetzung für einen Ansatz von 100µl: 50µl Bio-16-dUTP; 1,2 µl 10mM dTTP, 5µl 10mM dATP; 5µl 10mM dGTP; 5µl 10mM dCTP; 33.8µl Aqua dest., alle Nukleotide jeweils Roche Diagnostics, Mannheim) resp. DigMix (Zusammensetzung für einen Ansatz von 100µl: 17 µl Dig-11-dUTP; 3,3 µl 10mM dTTP; 5µl 10mM dATP; 5µl 10mM dGTP, 5µl 10mM dCTP; 64.7µl Aqua dest., alle Nukleotide jeweils Roche Diagnostics, Mannheim), Aqua dest. sowie DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) und DNase (Roche Diagnostics, Mannheim) notwendig. Die Nick-Translation wurde für mindestens 2 Stunden im

auf 15°C gekühlten Wasserbad durchgeführt. Hierbei wurde die Menge an hinzugefügter DNase so gewählt, daß am Ende der Nick Translation DNA-Fragmente einer Länge zwischen 500 und 1000 Basenpaare vorlagen. Die Fragmentlänge wurde durch Elektrophorese auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1,5% Agarosegel kontrolliert. Betrug die Länge der Nick-Produkte mehr als 1000 Basenpaare, so erfolgte ein von der Fragmentlänge des Nick-Produktes abhängiger Nachverdau. Der Abbruch der Nick-Translation erfolgte durch Zugabe von 2µl 0,5 mol/l EDTA, 1µl 10% SDS (jeweils Sigma, St. Louis, USA) sowie durch Erhitzen der Proben auf dem Hitzeblock für 10 min auf 68°C. Um DNA-Fragmente unter 500 Basenpaare sowie nichtinkorporierte Nukleotide abzutrennen, wurde das Nick-Produkt auf eine Sephadex G50-Säule (Sigma, St. Louis, USA) aufgetragen, die zuvor viermal mit 100µl Sephadex-Säulenpuffer (10 mmol/l TrisHCl pH 8, 1 mmol/l EDTA pH 8, 0,1% SDS (jeweils Sigma, St. Louis, USA), Aqua dest.) gewaschen und bei 3000 U/min für jeweils 10 min abzentrifugiert worden war. Das eluierte Nick-Translationsprodukt wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.4 Komparative genomische Hybridisierung

Pro Hybridisierungsansatz wurden je 1µg mit Digoxin markierte Normal-DNA sowie mit Biotin markierte Tumor-DNA benötigt. Ferner wurden pro Hybridisierungsansatz 70µg Cot-1 DNA eingesetzt, um ubiquitär vorkommende hochrepetitive DNA-Sequenzen abzudecken (LICHTER P et al., 1995). Normal-DNA, Tumor-DNA und Cot-1 DNA (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden gemischt und durch Zugabe von 357µl eisgekühltes 100% Ethanol und 8,5µl 3mol/l Natriumacetat pH 5,2 präzipitiert. Nach Zentrifugation über 15 min bei 13000 U/min und 4°C wurde das DNA-Pellet in eisgekühltem 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Nach Abpipettieren des Alkohols wurde das DNA-Pellet für 12 min auf dem Hitzeblock bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden 7µl deionisiertes Formamid sowie nach einer Stunde 7µl

Hybridisierungspuffer (4x SSC, 20% Dextransulfat) hinzugefügt und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur gerüttelt und auf diese Weise aufgelöst. Die Hybridisierungsansätze wurden dann für 6 min bei 75°C denaturiert und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert.

Parallel zur Probenvorbereitung wurden die bei -20°C aufbewahrten Objektträger mit normalen humanen Metaphasen als Hybridisierungsmatrix (Vysis, Downers Grove, IL, USA) über 2 Stunden schrittweise auf 60°C erwärmt und dann bei 74°C für 3 min denaturiert. Die Denaturierungslösung bestand hierbei aus 49ml deionisiertem Formamid, 7ml 20x SSC, 7ml Natriumphosphatpuffer (0,05 mol/l Natriumdihydrogenphosphat, 0,05 mol/l Dinatriumhydrogenphosphat) sowie 7ml Aqua dest. Anschließend wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90% und 100% Ethanol) entwässert und luftgetrocknet. Nach Beschriftung der Objektträger konnten jeweils zwei Proben auf die zuvor mit einem Diamantstift markierten Hybridisierungsfelder aufgetragen werden. Nach Abdeckung mit Deckgläsern und Fixogum wurden die Objektträger über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation über Nacht wurden die Objektträger viermal über 5 min im Wasserbad bei 42°C in Waschlösung A (50% Formamid, 2x SSC, pH 7), dreimal über 5 min bei 60°C in Waschlösung B (0,1x SSC, pH 7) gewaschen. Zur optischen Visualisierung der biotin- bzw. digoxigeninmarkierten DNA-Proben wurden dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat markiertes Avidin (Vector Laboratories, Burlingame, USA) sowie mit Cy3 konjugierter Anti-Digoxigeninantikörper (Dianova, Hamburg) auf die Hybridisierungsfelder aufgetragen. Nach einer 30 min dauernden Inkubation in der feuchten Dunkelkammer bei 37°C folgte der dreimalige Waschvorgang für jeweils 5 min mit der auf 42°C erwärmten Waschlösung C (4x SSC, 0,1% Tween 20, pH 7). Zur Chromosomenbänderung erfolgt dann eine zwanzigminütige Färbung mit 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI), gefolgt von einem zweiminütigen Waschvorgang in Waschlösung D (2x SSC, 0,05% Tween 20). Die Objektträger wurden abschließend mit Antifadelösung (Vectashields, Vector Laboratories) eingedeckelt.

2.5 Bildaufnahme und Bildauswertung

Die digitale Bildauswertung wurde mit dem Programm ISIS (MetaSystems, Altlussheim) über ein angeschlossenes Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss Aalen) durchgeführt. Kriterien bei der Beurteilung der Qualität der Hybridisierung waren ein minimaler unspezifisch gefärbter Hintergrund, eine minimale Granularität der Chromosomen, helle und möglichst homogene Hybridisierungssignale über die gesamten Chromosomen sowie eine adäquate DAPI-Färbung zur Identifikation der Chromosomen (LICHTER P et al., 1995; JAMES L, 1999; KALLIONIEMI OP et al., 1994; NACHEVA EP et al., 1998; WEISS MM et al., 1999). Um DNA-Zugewinne und DNA-Verluste zu bestimmen, wurden, entsprechend dem internationalen Standard, Schwellenwerte des Fluoreszenzverhältnisses festgelegt (obere Schwelle 1,25; untere Schwelle 0,8). High-level-Amplifikationen wurden als solche gewertet, wenn der Wert mehr als 2,0 betrug oder umschriebene chromosomale Banden ein sehr starkes Fluoreszenzsignal aufwiesen. Pro Fall wurden zwischen 15 und 30 Metaphasen eingelesen.

3. Ergebnisse

3.1 WHO Typ A Thymom (Medulläres Thymom)

Insgesamt wurden 13 WHO Typ A Thymome mittels CGH untersucht. 12 der 13 Fälle wiesen weder Zugewinne noch Verluste von genetischem Material auf. Ein Fall wies einen Verlust am kurzen Arm des Chromosoms 6 auf (Fall 9) (-6p21-pter) auf (Abbildungen 1 und 4; Tabelle 4).

Tabelle 4: Chromosomale Veränderungen von WHO Typ A Thymomen

Nr.	Fall	Zugewinne	Verluste
1	H 3202/ 88	-	-
2	H 2901/ 89	-	-
3	H 454/ 94	-	-
4	H 24998/ 94	-	-
5	E 17821/ 94	-	-
6	E 1006/ 95	-	-
7	H 4560/ 96	-	-
8	H 7336/ 97	-	-
9	E 28279/ 98	-	-6p21-pter
10	H 788/ 99	-	-
11	H 5444/ 99	-	-
12	H 4188/ 99	-	-
13	H 5491/ 99	-	-

3.2 WHO Typ B3 Thymom (gut differenziertes Thymuskarzinom)

23 WHO Typ B3 Thymome wurden mittels CGH untersucht. Alle untersuchten Fälle zeigten Verluste oder Zugewinne von genetischem Material. Insgesamt fanden sich 31 Zugewinne und 26 Verluste (Abbildungen 2, 5, 6; Tabelle 5).

Rekurrente Zugewinne von genetischem Material fanden sich am langen Arm von Chromosom 1 (in 15 von 23 Fällen, entsprechend 65%), auf Chromosom

16 (in 3 von 23 Fällen, 13%) sowie am langen Arm des X-Chromosoms (in 3 von 23 Fällen, 13%). In einem Fall wurde eine High-Level-Amplifikation am kurzen Arm des Chromosoms 8 beobachtet (ampl 8p12).

Rekurrente Verluste von genetischem Material fanden sich am Chromosoms 6 (in 10 von 23 Fällen, 43%), am langen Arm von Chromosom 13 (in 6 von 23 Fällen, 26%), an Chromosom 3 (in 3 von 23 Fällen, 13%), sowie am langen Arm von Chromosom 12 (in 2 von 23 Fällen, 9%).

Beim Vergleich des Rezidivs (Fall 15) mit dem Tumor der Primärmanifestation (Fall 14) zeigten sich neben den schon beim Ersttumor vorhandenen Veränderungen (+1q sowie -6) zusätzlich DNA-Gewinne an Teilen des Chromosoms 5 (+5qcen-q21, +5p), sowie an Chromosom X (+Xq22-pter).

Tabelle 5: Chromosomale Veränderungen an WHO Typ B3 Thymomen

Nr.	Fall	Zugewinne	Verluste
14	E 9956/ 85	+1q	-6
15	E 6175/ 87	+1q, +5p, +5q cen-q21, +Xq22-qter	-6
16	E 27920/ 87	+1q22-qter, +Xq24-qter	-13q21-qter
17	E 27409/ 89	+17q	-
18	E 27926/ 89	+16	-
19	E 27926/ 89	+16	-
20	E 10585/ 90	+1q	-6
21	E 14187/ 91	+1q	-
22	H 3759/ 92	+1q, +8p12 (hl)	-6, -18q
23	E 12830/ 92	+1q, +7	-
24	E 13561/ 95	-	-13q
25	E 11859/ 96	+1q,	-6
26	H 2846/ 97	-	-13q21-qter
27	H 4361/ 97	+1q	-6
28	E 6331/ 97	+1q23-qter	-
29	H 843/ 98	+Xq21-qter, +8	-13q
30	H 6694/ 98	+1q	-6q, -12p, -12qcen-q21
31	H 6829/ 98	+1q, +8p	-6q16-q22
32	H 8615/ 98	-	-3p
33	H 4550/ 99	+1q	-3p, -3q13, -13q14-qter, -16q12-q21
34	H 5725/ 99	-	-3p12, -13q21-q31
35	5838/ 99	+1q22-qter	-6
36	3164/ 00	+1q, +9q, +14q24-qter, +15, +16	-6, -10q, -12q21-qter

3.3 Primäres Plattenepithelkarzinom des Thymus (WHO Typ C Thymom)

Auch bei der CGH-Untersuchung von 12 primär thymischen Plattenepithelkarzinomen zeigten sich in allen Fällen DNA-Gewinne und /oder -Verluste. Insgesamt fanden sich 23 Gewinne und 28 Verluste an genetischem Material (Abbildungen 3,7 und 8; Tabelle 6).

Rekurrente Zugewinne von genetischem Material fanden sich am langen Arm von Chromosom 1 (in 7 von 12 Fällen, 58%), am langen Arm des Chromosoms 17 (in 4 von 12 Fällen, 33%) und an Chromosom 5 und Chromosom 18 (jeweils in 3 von 12 Fällen, 25%).

Rekurrente Verluste von genetischem Material fanden sich am langen Arm des Chromosoms 16 (in 8 von 12 Fällen, 67%), an Chromosom 6 (in 6 von 12 Fällen, 50%), an Chromosom 3 (in 4 12 Fällen, 33%), am langen Arm des Chromosoms 13 und am kurzen Arm des Chromosoms 17 (jeweils in 3 in 12 Fällen, 25%).

In einem Fall eines primär thymischen Plattenepithelkarzinoms war der Vergleich zwischen Primärtumor und Rezidiv möglich (Fall 38 und 39); beide Fälle zeigten einen Verlust von genetischem Material auf Chromosom 3.

Tabelle 6: Chromosomale Veränderungen von primären Plattenepithelkarzinomen des Thymus

Nr.	Fall	Zugewinne	Verluste
37	E 28068/ 86	+5p, +8q	-3p13-pter, -5q15-q23, -8p
38	E 18357/ 91	-	-3
39	E 16204/ 95	-	-3
40	H 366/ 94	-	-6, -16q
41	H 4309/ 96	+1q, +17q, +18q23	-16q21-qter, -17p13
42	H 4745/ 97	+1q, +3q21-22	-2q32-q33, -3p, -9, -13cen-q31, -16q, -17p13
43	E 16402/ 97	+1q, +5, +18	-6, -13q, -16q
44	H 2466/ 98	+1q, +16p, +17q	-6, -16q
45	H 7914/ 98	-	-16q
46	H 1805/ 99	+1q, +8, +17q, +18	-6, -16q, -17p
47	H 5410/ 99	+1q, +5q33, +14q22-qter, +15,+17q	-6q
48	H 3344/ 00	+1q32-q42	-6, -13q, -16q

3.4 Sonstige Entitäten

3.4.1 Mikronoduläres Thymom

Zwei Fälle von mikronodulären Thymomen wurden mittels CGH untersucht. In beiden Fällen wurden weder Zugewinne noch Verluste von genetischem Material beobachtet (Tabelle 7).

3.4.2 Metaplastisches Karzinom des Thymus

Drei Fälle von metaplastischen Thymomen wurden mittels CGH untersucht, in einem lag zusätzlich eine Metastase vor.

Zwei Fälle zeigten keine Zugewinne oder Verluste von genetischem Material. In einem weiteren Fall wies der Primärtumor einen Verlust von genetischem Material auf Chromosom 11 (-11q23-qter) auf. Die Metastase wies zusätzlich zu dem bereits im Primärtumor nachweisbaren Verlust auf Chromosom 11 (-11q23-qter) Verluste auf den Chromosomen 15, 21 und X sowie Zugewinne auf den Chromosomen 8, 14, 19 und 20 auf (Tabelle 7).

3.4.3 Lymphoepitheliales Karzinom

Es wurde ein lymphoepitheliales Thymuskarzinom mittels CGH untersucht. Hierbei fand sich eine Zugewinn von genetischem Material auf dem langen Arm von Chromosom 1 (Tabelle 7).

3.4.4 Karzinosarkom des Thymus

Ein Fall eines primär thymischen Karzinosarkoms wurde mittels CGH untersucht. Zugewinne von genetischem Material fanden sich auf dem langen Arm von Chromosom 1 und dem kurzen Arm von Chromosom 9, Verluste auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (Tabelle 7).

3.4.5 Adenokarzinom

Als hochaberrant erwies sich ein Fall eines primär thymischen Adenokarzinoms mit Zugewinnen von genetischem Material auf den Chromosomen 5, 6, 10, 12, 16 und 17 und Verlusten auf den Chromosomen 3, 5, 6, 8, 9, 11 und 18 (Tabelle 7).

3.4.6 Undifferenziertes Karzinom

Ein Fall eines ungewöhnlichen Karzinoms (gut differenziertes Thymuskarzinom mit NEC-Differenzierung) zeigte je einen Verlust und einen Gewinn an genetischem Material (Zugewinn auf Chromosom 20, Verlust auf Chromosom 7) (Tabelle 7).

Tabelle 7: Chromosomale Veränderungen an verschiedenen seltenen primären Thymustumoren

Diagnose	Nr.	Fall	Zugewinne	Verluste
Mikronodulär	49	H 4234/ 99	-	-
Mikronodulär	50	H 4927/ 99	-	-
Metaplastisch	51	E 27344/ 96	-	-11q23-qter
Metaplastisch	52	H 3362/ 99	+8, +14q22-qter, +19, +20	-X, -11q23-qter, -15cen-q21, -21q21
Metaplastisch	53	H 6712/ 97	-	-
Metaplastisch	54	H 7744/ 97	-	-
Lymphoepithelial	55	H 6320/ 99	+1q	-
Karzinom	56	4759/ 92	+1q, +9p	-3p
Adenokarzinom	57	2605/ 99	+5q32-qter, +6p21, +10p12-pter, +12p, +16q, +17q	-3p22-pter, -3cen-p14, -3cen-q13, -5q15-q22, -6q15-qter, -8p21-p22, -9q21-qter, -9p21-q32, -11p13-p14, -18q
Undifferenziert	58	7088/ 99	+20	-7

4. Diskussion

Genetische Veränderungen in Thymomen sind bislang weitestgehend unbekannt. In der Literatur findet man lediglich Kasuistiken, in denen mittels klassischer Zytogenetik ermittelte Karyotypen von unterschiedlich klassifizierten und daher nur eingeschränkt vergleichbaren histologischen Typen von Thymomen dargestellt werden (MIRZA I et al., 2000; SONOBE H et al., 1999; SONOBE H et al., 1998; DAL CIN P et al., 1996; DAL CIN P et al., 1993; KRISTOFFERSON U et al., 1989). In diesen Arbeiten wurde bisher lediglich eine rekurrente genetische Aberration bei Thymomen beschrieben. Es handelt sich dabei um die Translokation $t(15;19)(q15;p13)$, deren Auftreten jedoch an Fälle mit relativ unüblichem Verlauf gebunden war. Die Patienten waren zwischen fünf und 22 Jahren. Außerdem zeigten sie einen aggressiven Verlauf der Erkrankung. Sie war gekennzeichnet durch eine frühe mediastinale und thorakale Ausbreitung sowie durch häufige Metastasierung. Zwei der drei Fälle waren immunhistochemisch positiv für CEA (carcinoembryonic antigen) (LEE AC et al., 1993; KEES UR et al., 1991; KUBONISHI I et al., 1991). Es stellt sich angesichts dieser Charakteristika die Frage, ob jene drei Fälle überhaupt primäre Tumoren des Thymus darstellen und einen Bezug zu den hier untersuchten Tumoren aufweisen.

Mit der Entwicklung der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) steht eine molekulargenetische Screening-Methode zur Verfügung, die eine umfassende Analyse von Zugewinnen und Verlusten des Genoms eines Tumors ermöglicht. Voraussetzung ist eine ausreichend hohe Anzahl an neoplastisch veränderten epithelialen Zellen, weshalb nur Thymome der WHO Typen A; B3 sowie C in die Untersuchung aufgenommen wurden, da diese, im Gegensatz zu den WHO Typen AB, B1 und B2, nur eine geringe bis mäßige Beimengung von nichtneoplastischen Lymphozyten besitzen.

4.1 WHO Typ A Thymome

Die Untersuchung von 13 Thymomen vom WHO Typ A zeigte nur in einem einzigen Fall eine genetische Veränderung. Dieser Fall wies eine Deletion am kurzen Arm des Chromosom 6 (rev ish dim 6p21-pter) auf. Alle anderen Fälle zeigten keine genetischen Veränderungen, die mittels CGH detektierbar waren. Diese Beobachtungen lassen drei unterschiedliche Rückschlüsse zu. Beim WHO Typ A Thymom handelt es sich in den überwiegenden Fällen um einen gutartigen Tumor, der nur äußerst selten Rezidive oder Metastasierung zeigt (QUINTANILLA-MARTINEZ L et al., 1993). Ähnliche Ergebnisse lassen sich in Publikationen finden, die über CGH-Studien an anderen gutartigen Tumoren berichten. So scheinen CGH-Untersuchungen an Lipomen, Osteochondromen, Leiomyomen und gutartigen Schwannomen sowie Fibroadenomen der Mamma die Vermutung nahelegen, daß die Benignität der Neoplasien offenbar mit dem Fehlen genetischer Aberrationen korreliert beziehungsweise mit nur wenigen solcher genetischer Aberrationen einher geht (SZYMANSKA J et al., 1997; LARRAMENDY M et al., 1997; SARLOMO-RIKALA M et al., 1998; RIED T et al., 1998).

Ursachen für das Resultat, bei CGH-Untersuchungen keine genetischen Aberrationen zu erhalten, kann einerseits sein, daß die untersuchte Neoplasie keine genetischen Aberrationen besitzt. Andererseits können Aberrationen bei WHO Typ A Thymomen zwar vorhanden sein, allerdings können diese Veränderungen eine Größe besitzen, die zu klein ist, um sie mittels CGH nachzuweisen. Die Grenzen der Auflösungsfähigkeit der CGH werden in unterschiedlichen Publikationen mit 2 bis 10 Mb bei Amplifikationen und größer als 10 Mb bei Deletionen angegeben (vgl. Kap 1.5). Da durch die CGH nur eine Detektion numerischer Translokationen mit Nettogewinnen und Nettoverlusten möglich ist, können zusätzlich nicht detektierbare strukturelle balancierte Translokationen in der Pathogenese dieser Tumoren eine Rolle spielen.

Wie bereits erwähnt, handelte es sich bei der einzigen Aberration, die bei den Untersuchungen des WHO Typ A Thymoms auftrat, um einen Verlust von genetischem Material auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6.

Interessanterweise veröffentlichten Mirza et al. eine Kasuistik über ein spindelzelliges bzw. medulläres Thymom nach der Klassifikation nach Marino und Müller-Hermelink. Die zytogenetische Untersuchung erbrachte in diesem Fall, in Analogie zu den hier berichteten Ergebnissen, eine Deletion eines Teils des kurzen Arms von Chromosom 6 (del 6p22-pter) (MIRZA I et al., 2000).

Der kurze Arm von Chromosom 6 beherbergt unter anderem die Gene für den HLA-Komplex (Human Leukocyte Antigen-Komplex). Verluste in dieser Genregion könnten bei der Pathogenese der paraneoplastischen Myasthenia Gravis eine bedeutende Rolle spielen, die in 25% der Fälle Assoziation mit Thymomen des WHO Typs A zeigt (QUINTANILLA-MARTINEZ L et al., 1993). Hier sei auf das Kap. 4.5 verwiesen, in dem näher auf diese Zusammenhänge eingegangen wird.

4.2 WHO Typ B3 Thymome

Im Gegensatz zu WHO Typ A Thymomen wiesen Thymome des Typs B3 in allen in dieser Dissertation untersuchten Fälle genetische Veränderungen auf. In allen 23 untersuchten Fällen wurden insgesamt 31 Zugewinne sowie 26 Verluste von genetischem Material beobachtet.

Häufigste Veränderung war der Zugewinn am langen Arm des Chromosoms 1 (+1q), die in 15 der 23 Fälle (65%) auftrat. Unter den bislang publizierten Karyotypen, die mittels klassischer Zytogenetik ermittelt wurden, findet sich lediglich ein Fall eines gemischt lymphozytären und epithelialen Thymoms, das ebenfalls zytogenetische Veränderungen auf Chromosom 1 aufweist (SONOBE H et al., 1999) (vgl. Tab. 2). Dieser Thymomtyp entspricht nach der WHO-Klassifikation einem Thymom des Typs B2, das histologische Verwandtschaft zu dem hier untersuchten gutdifferenzierten Thymuskarzinom, dem WHO Typ B3, zeigt (KIRCHNER T et al., 1992). Bei dem berichteten Fall ergab die klassische zytogenetische Untersuchung einen komplexen Karyotyp, der unter

anderem in Analogie zu den Befunden der hier untersuchten Serie einen Zugewinn von Chromosom 1q in Form eines Isochromosoms 1q beinhaltet. Zugewinne von genetischem Material am langen Arm von Chromosom 1 wurden in unterschiedlichen Neoplasien festgestellt. So wurden zum Beispiel rekurrente Zugewinne und Amplifikationen an unterschiedlichen Typen von Weichteilsarkomen und Osteosarkomen in den Regionen 1q21-q23 sowie 1q21-q31 festgestellt (KNUUTILA S et al., 1998). Ferner wurden sowohl bei kleinzelligen, als auch bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (LEVIN NA et al., 1994; BALSARA BR et al., 1997, PETERSEN I et al., 1997), Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals (SPEICHER MR et al., 1995), primär kutanen Melanomen (BASTIAN BC et al., 1998), duktalem In-situ-Karzinomen der Mamma (BUERGER H et al., 1999), Adenokarzinomen der Mamma (RIED T et al., 1995), Ewing-Tumoren (ARMENGOL G et al., 1997) und primären Urothelkarzinomen der Blase (KALLIONEMI A et al., 1995) Zugewinne von 1q beobachtet. Diese Ergebnisse von Zugewinnen an 1q scheinen zwar häufig, jedoch relativ unspezifisch zu sein.

In den in dieser Dissertation untersuchten Fällen von WHO Typ B3 Thymomen konnte keine exakte Bandenregion ermittelt werden, da sich der DNA-Zugewinn über große Teile von 1q erstreckte.

Verschiedene Regionen auf 1q enthalten Gene, die pro-proliferative Proteine kodieren und somit möglicherweise eine Rolle bei der Entstehung von Thymomen spielen könnten. Hierunter finden sich das Gen für den Oktamer-bindenden Transkriptionsfaktor OTF1, das Gen NTRK1, das für einen Tyrosinkinase-Rezeptor codiert, Gene der SPRR-Familie, die für kleine prolinreiche Proteine codieren und Gene aus der S100-Familie, die für calciumbindende Proteine codieren wie beispielsweise CACY und CAPL (ENGELKAMP D et al., 1993; GIBBS S et al., 1993; DRACOPOLI NC et al., 1994; MARENHOLZ I et al., 1995; STURM RA et al., 1995; WEITH A et al., 1995; ZHAO X et al., 1996). Calcyclin, ein den Zellzyklus regulierendes Protein, wird bei Melanomzelllinien verstärkt exprimiert. Das verantwortliche Gen hat seinen Locus ebenfalls auf dem langen Arm des Chromosom 1 (WETERMAN MAJ et al., 1992). In einer weiteren molekulargenetischen Studie an humanen

Sarkomen wurden die auf 1q21 lokalisierten Gene FLG, NTRK1 und SPRR3 als die am häufigsten amplifizierte Genloci beschrieben (FORUS A et al., 1996). Über die oben genannten Gene sowie deren Genprodukte ist in Zusammenhang mit der Pathogenese der Thymome bisher noch nicht berichtet worden.

Zweithäufigste Aberration, die bei der Untersuchung der Thymome vom WHO-Typ B3 auftrat, war der Verlust von Chromosom 6, der in 43% der untersuchten Fälle beobachtet wurde. Acht Fälle zeigten einen Verlust des gesamten Chromosoms, in zwei Fällen war jeweils nur der lange Arm des Chromosoms betroffen.

Es finden sich drei Publikationen, in denen Thymomfälle beschrieben sind, die ebenfalls Veränderungen an Chromosom 6 besitzen. Neben der bereits in Kap. 4.1 erwähnten und von Mirza et al. publizierten Kasuistik (MIRZA I et al., 2000) berichten Dal Cin et al. über ein gutartiges, mit einer Kapsel versehenes (benign, encapsulated) Thymom, das ein Ringchromosom 6 r(6)(p2?q2?) als einzige chromosomale Auffälligkeit aufweist (DAL CIN P et al., 1993). Dieser Typ entspricht nach der gängigen Klassifikation am ehesten einem WHO Typ B1 Thymom. Ferner publizierten Kristoffersson et al. einen Fall eines kortikalen Thymoms, welches eine enge histogenetische Verwandtschaft zum WHO Typ B3 besitzen soll (KIRCHNER T et al., 1992). Es zeigt eine Deletion an Chromosom 6 (del(6)(q15)) (KRISTOFFERSSON U et al., 1989).

Verluste von genetischem Material auf dem langen Arm von Chromosom 6 sind sehr häufig bei einer Vielzahl von Tumoren beschrieben worden. In einer umfassenden Darstellung sämtlicher bislang mittels CGH untersuchter Tumoren gehörten Verluste auf Chromosom 6q neben Verlusten von 9p und 13q zu den drei häufigsten deletierten Chromosomenregionen (KNUUTILA S et al., 1999). Im Gegensatz hierzu wurden die bei den Thymomen zusätzlich beobachteten Verluste des kurzen Arms von Chromosom 6 nur vergleichsweise selten berichtet. Sie gehören somit nicht zu häufig in soliden Tumoren deletierten chromosomalen Regionen.

Es sind mehrere Tumorsuppressorgene bekannt, deren Genlokus sich auf Chromosom 6 befindet. So ist beispielsweise der Cyclin-abhängige Kinase-

Inhibitor 1A (p21/WAF/CDKN1A) auf 6p21.2 lokalisiert (EL DEIRY WS et al., 1993). Ein weiteres potentiell Tumorsuppressorgen, LOT-1/hZAC, ist im Bereich 6q24-q25 lokalisiert (ABDOLLAHI A et al., 1997; VARRAULT A et al., 1998). Mikrosatellitenanalysestudien an Mamma- sowie Ovarialkarzinomen, Non-Hodgkin-Lymphomen und malignen Mesotheliomen zeigen weiterhin auf mehreren Regionen des langen Arms des Chromosom 6 allelische Imbalancen, die die Vermutung nahelegen, daß sich hier weitere Tumorsuppressorgene befinden (SHENG ZM et al., 1996; THEILE M et al., 1996; OFFIT K et al., 1993; ORPHANOS V et al., 1995; BELL DW et al., 1997).

Doch nicht nur hinsichtlich der Tumorphathogenese, sondern auch hinsichtlich der paraneoplastischen Autoimmunerkrankungen, die häufig mit Thymomen des Typs B3 assoziiert sind, können DNA-Verluste an Chromosom 6 von Belang sein (vgl. hierzu Kap. 4.5).

Einen weiteren rekurrenten Verlust an DNA zeigte Chromosom 13. In 26% der in dieser Dissertation untersuchten Fälle des WHO Typ B3 Thymoms war ein Verlust des langen Arms nachzuweisen. Wie 6q gehört auch 13q zu jenen Genregionen von Neoplasien, an denen sehr häufig Verluste von DNA auftreten (KNUUTILA S et al., 1999). Verschiedene Tumorsuppressorgene sind bekannt, die in dieser Genregion zu finden sind. Das Retinoblastomgen 1 (RB1, retinoblastoma 1), eines der am besten charakterisierten Tumorsuppressorgene, ist auf 13q14.3 lokalisiert. Das Genprodukt von Rb1 hat eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Zellzyklus (KAELIN WG et al., 1997). Das Rb-Gen ist bei einer Vielzahl von Tumoren deletiert, darunter Osteosarkome, Bindegewebssarkome, kleinzellige Bronchialkarzinome sowie dem Urothelkarzinom der Blase (COWELL JK et al., 1992; WEINBERG RA et al., 1991; WEINBERG RA et al., 1992). Auch an Thymomen konnte von Hirabayashi bereits eine abnorme Expression von pRB im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungen nachgewiesen werden (HIRABAYASHI H et al., 1997). Weitere auf 13q14 lokalisierte potentielle Tumorsuppressorgene sind die in Zusammenhang mit der CLL (Chronisch lymphatischen Leukämie) beschriebenen Tumorsuppressorgene LEU1 (Leukemia associated gene 1) und LEU2 (Leukemia associated gene 2) (LIU Y et al., 1997; KARHU R et al., 1997;

BENTZ M et al., 1995). BRCA2 (breast cancer 2), ein weiteres Tumorsuppressorgen, dessen Mutationen nicht nur eine erhöhte Inzidenz bei Mammakarzinomen zur Folge hat, sondern auch das Risiko für Ovarial- und Prostatakarzinome sowie des Mammakarzinoms beim Mann erhöht (TIRRKONEN M et al., 1997), ist ebenfalls auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q12.3) lokalisiert. Ein anderes potentiell Tumorsuppressorgen dieser Region, ING1 (inhibitor of growth 1), wurde auf 13q34 lokalisiert (GARKAVTSEV I et al., 1996; ZEREMSKI M et al., 1997). Veränderungen dieser Genregion wurden in Zusammenhang mit Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals nachgewiesen (MAESTRO R et al., 1996; BOCKMUHL U et al., 1996).

Ein einziger Fall eines WHO Typ B3 Thymoms zeigte bei den CGH-Untersuchungen dieser Dissertation eine High-Level-Amplifikation der Chromosomenbande 8p12. In dieser chromosomalen Region befindet sich das Gen für den Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor 1 (FGFR1, fibroblast growth factor receptor 1). Amplifikationen des FGFR1-Gens wurden bei unterschiedlichen Karzinomen, wie beispielsweise dem Mamma- sowie dem Ovarialkarzinom, festgestellt (THEILLET C et al., 1993).

4.3 WHO Typ C Thymome

Alle in dieser Dissertation untersuchten Thymome des WHO Typs C waren primäre Plattenepithelkarzinome des Thymus. Die häufigsten mittels CGH detektierten genetischen Veränderungen in diesen Tumoren bestanden in Verlusten von Chromosom 16q, 6, 3, 13q und 17p sowie Zugewinnen von 1q und 17q.

Während Verluste von Chromosom 6 und Zugewinne von Chromosom 1q auch bei WHO Typ B3 Thymomen beobachtet wurden, trat der Verlust von 16q ausschließlich bei primären Plattenepithelkarzinomen des Thymus auf: In acht von 12 Fällen (67%) wurden Verluste von 16q beobachtet.

Mehrere potentielle Tumorsuppressorgene, die sowohl bei der Tumorgenese als auch bei Tumorprogression eine Rolle spielen könnten, sind in dieser Genregion lokalisiert. Das Gen für das Zellzyklus-regulierende Protein RB2/p130 (retinoblastoma-like 2) liegt auf 16q12.2 (YEUNG RS et al., 1993). Eine veränderte Expression dieses Proteins ist sowohl mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung bei Bronchialkarzinomen (BALDI A et al., 1997) als auch mit erhöhtem Rezidivrisiko und erhöhter Letalität bei Endometriumkarzinomen assoziiert. Ein weiteres potentielles Tumorsuppressorgen auf 16q ist CMAR (16q24.3; cell matrix adhesion regulator). Eine verminderte Expression von CMAR wurde in Kolonkarzinomen (YAMAMOTO H et al., 1996) und hepatozellulären Karzinomen (YAMAMOTO H et al., 1997) nachgewiesen. Ein weiteres potentielles Tumorsuppressorgen, für das eine Rolle bei der Entstehung von Mammakarzinomen vermutet wird, ist auf Chromosom 16 lokalisiert: CTFC, ein CCCTC-bindender Faktor, dessen Genlokus auf 16q22.1 liegt (FILIPPOVA GN et al., 1998). Des Weiteren ist auf 16q auch der Gencluster der Cadherin-Familie zu finden, die für Glykoproteine codieren, die für die Interaktion zwischen Epithelzellen verantwortlich sind. Eine verminderte Expression dieser Gene wurde in Mamma- und Bronchialkarzinomen beobachtet (BERX G et al., 1995; SATO M et al., 1998). Diese potentiellen Tumorsuppressorgene wurden bisher nicht in Zusammenhang mit primären Plattenepithelkarzinomen des Thymus beobachtet. Allerdings publizierte Sonobe eine Kasuistik, in der er über ein primäres Plattenepithelkarzinom des Thymus mit komplexen chromosomalen Auffälligkeiten berichtet. Unter anderem zeigt dieses Plattenepithelkarzinom zusätzlich zu einem normal strukturierten Chromosom 16 zwei Kopien eines deletierten Chromosom 16: der(16)t(1;16)(q12;q12.1) (SONOBE H et al., 1998). Dieser Karyotyp ist mit den Ergebnissen dieser Dissertation in Einklang zu bringen, da bei den primären Plattenepithelkarzinomen des Thymus sowohl Gewinne von 1q, als auch Verluste von 16q nachgewiesen wurden. Weitere rekurrente genetische Imbalancen zeigte Chromosom 17. Zum einen wurde bei 25% der Plattenepithelkarzinome des Thymus ein Verlust des kurzen Arms 17p beobachtet, zum anderen ein Zugewinn des langen Arms 17q, der

bei 33% der Fälle auftrat. Auf 17p befindet sich der Genlocus des Tumorsuppressorgens p53, das auf 17p13 lokalisiert ist (ISOBE M et al., 1992), und dessen Inaktivierung bei zahlreichen Tumoren, darunter auch Plattenepithelkarzinome der Lunge, beschrieben ist (TAKAHASHI T et al., 1989; MARSHALL CJ, 1994). Interessanterweise berichten Stefanaki et al. über die aberrante Expression von p53-Proteinen in Thymomen, wobei allerdings kein primäres Plattenepithelkarzinom in dieser Studie analysiert wurde (STEFANAKI S et al., 1997). Hirabayashi et al. wiesen unter anderem auch bei einem Thymuskarzinom eine abnorme Expression von p53 nach (HIRABAYASHI H et al., 1997). Über Zugewinne von 17q ist ebenfalls bei unterschiedlichen Neoplasien berichtet worden. 17q beherbergt unter anderem das potentielle Onkogen ERBB2/NEU auf 17q12-q21, das für einen Wachstumsfaktorrezeptor codiert und beim Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Magenkarzinom, Adenokarzinom von Niere und Speicheldrüsen sowie Kolonkarzinomen durch Amplifikation aktiviert wird (KNUUTILA S et al., 1998).

Auch am Chromosom 3 wurden rekurrente Verluste nachgewiesen. Teilweise war das gesamte Chromosom von diesen Verlusten betroffen, teilweise nur der kurze Arm, auf dem mehrere potentielle Tumorsuppressorgene lokalisiert sind. Neben dem Tumorsuppressorgen VHL (Von Hippel-Lindau) auf 3p25-p26, dessen Genprodukt eine Rolle bei der Transkription spielt, den DNA Reparaturgenen MLH1 auf 3p21.3-p23 und XPC auf 3p25 kommt vor allem dem FHIT (fragile histidine triad) auf 3p14.2 eine besondere Bedeutung zu, denn von FHIT wurden bereits Mutationen bei Plattenepithelkarzinomen an Kopf und Hals nachgewiesen (LE BEAU MM et al., 1998; VIRGILIO L et al., 1996).

4.4 Genetische Verwandtschaft zwischen WHO Typ B3 und primären Plattenepithelkarzinomen des Thymus

Über die histogenetische Beziehung zwischen WHO Typ B3 Thymomen und primären Plattenepithelkarzinomen bestehen kontroverse Ansichten. Zu den klinischen Unterschieden beider Typen gehört die Assoziation mit Myasthenia Gravis, die charakteristisch für den WHO Typ B3 ist, während sie beim primären Plattenepithelkarzinom des Thymus nicht auftritt (Tabelle 8). Immunhistochemisch ist der Typ C durch die Expression von CD5 gekennzeichnet, während der Typ B3 Negativität für diesen Marker zeigt. Ein weiterer Unterschied besteht im Reifegrad der Lymphozyten: Während die Lymphozyten in Thymomen des WHO Typs B3 unreif sind, weisen primäre Plattenepithelkarzinome des Thymus reife Lymphozyten auf. Morphologisch sind WHO Typ B3 Thymome durch lobuläre Wachstumsmuster, vorherrschend neoplastische Epithelzellen sowie fibröses Stroma und perivaskuläre Räume gekennzeichnet, während die charakteristischen histomorphologischen Merkmale der primären Plattenepithelkarzinome des Thymus jenen Plattenepithelkarzinomen gleichen, die in anderen Organen auftreten (MARX A et al., 1999).

Vergleicht man die beobachteten genetischen Aberrationen von Thymomen des Typs B3 und den primär thymischen Plattenepithelkarzinomen, so deuten gemeinsame Aberrationen auf eine mögliche histogenetische Verwandtschaft beider Entitäten hin (Tabelle 8). Suster beschreibt 22 Fälle von primär epithelialen Neoplasien des Thymus, die sowohl Merkmale von Thymomen, als auch Merkmale von Thymuskarzinomen zeigen, wobei die Thymuskarzinome fast ausschließlich Plattenepithelkarzinome sind. Suster stellt die Vermutung an, daß es eine Art Kontinuum im Differenzierungsspektrum von Thymomen und Thymuskarzinomen geben könne (SUSTER S et al., 1996).

Obwohl keiner der untersuchten Fälle eine histologische Kombination zweier Entitäten aufwies, fanden sich Hinweise auf eine mögliche Verwandtschaft zwischen dem WHO Typ B3 Thymom und dem primär thymischen Plattenepithelkarzinom: Bei 5 Plattenepithelkarzinomen trat sowohl ein

Zugewinn von 1q als auch ein Verlust von Chromosom 6 auf. Dies sind genetische Alterationen, die auch bei einigen Fällen des Typs B3 beobachtet wurden. Auch Verluste von Chromosom 3 und 13q waren bei beiden Thymomentitäten zu finden.

Eine histogenetische Beziehung zwischen WHO Typ A und Typ B3 Thymomen scheint hingegen weniger wahrscheinlich, da keine gemeinsamen rekurrenten Aberrationen in den Untersuchungen auftraten.

Tabelle 8: Vergleichende Gegenüberstellung der WHO Typ B3 Thymome und primärer Plattenepithelkarzinome des Thymus

	WHO Typ B3 Thymom	Plattenepithelkarzinom des Thymus
Morphologie	Perivaskuläre Räume Unreife Lymphozyten	Variabel Reife Lymphozyten
Immunhistochemie	CD5-	CD5+
Myasthenia Gravis	Häufig	Nie
Genetik	+1q, -6, -13	+1q, -6, -13, -16q, -17p, -3

4.5 Genetische Alterationen und paraneoplastische Autoimmunphänomene

Wie in Kapitel 4.1 und 4.2 in Zusammenhang mit Thymomen des WHO Typs A und B3 erwähnt, könnte der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 6, auf dem sich die Gene für den HLA-Komplex befinden, auch pathogenetische Relevanz hinsichtlich des Auftretens paraneoplastischer Autoimmunerkrankungen, wie der Myasthenia Gravis, besitzen.

HLA sind jene Proteine, die auf den MHC-Loci codiert werden und die für die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten mitverantwortlich sind. T-Zellen besitzen an ihrer Oberfläche antigenspezifische Rezeptoren, sog. T-Zell-Rezeptoren (TCR). Diese sind notwendig, um spezifische Antigene bzw. Peptidanteile davon zu erkennen. Diese Antigenerkennung ist allerdings nur mit Hilfe der HLA-Moleküle möglich. Während HLA-Klasse-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen nachweisbar sind, findet man Klasse II-Moleküle vor allem auf lymphohämatopoetischen Zellen, auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und Makrophagen. Die entscheidende immunologische Funktion des Thymus ist die Heranbildung eines geeigneten T-Zell-Rezeptor-Repertoires, um Fremdartigene mit Hilfe der Selbst-MHC-Moleküle zu erkennen. Die hierzu stattfindende positive Selektion hat die Funktion eines Screeningverfahrens, das jene Zellen einem weiteren Reifungs- bzw. Differenzierungsprozess zuführt, die Fremdartigene mit Hilfe von Selbst-HLA-Molekülen erkennen. Erkennt die Vorläufer-T-Zelle gebundene und an HLA-Moleküle gekoppelte Selbstpeptide, so kommt es zur sogenannten negativen Selektion, in deren Verlauf es zur Ausschaltung dieser potentiell autoreaktiven Zellen durch Apoptose (klonale Deletion) kommt (SPENT J, 1993; PICKER LJ et al., 1993).

Eine Deletion von 6p könnte eine veränderte Expression des HLA- (Human Leukocyte Antigen) Lokus auf 6p21.3 zur Folge haben. Die Vielfalt der Expression von HLA-Molekülen auf neoplastischen Thymusepithelien wurde bisher nicht näher untersucht. Geht man davon aus, daß Thymome klonale Tumoren sind, so ist anzunehmen, daß bei einem Verlust von Chromosom 6 eines der beiden elterlichen Chromosomen betroffen ist. Legt man nun einen

kodominanten Erbgang der HLA-Gene zugrunde, so sollte es bei einer Monosomie 6 zu einer verminderten Diversität der exprimierten HLA-Moleküle auf den neoplastischen Thymusepithelien kommen.

Man kann sich nun drei verschiedene Modelle vorstellen, wie es zur Bildung von autoreaktiven T-Zellen kommen könnte: Einerseits könnte man postulieren, daß es bei einer veränderten HLA-Expression zu Veränderungen kommt, die HLA-Moleküle betreffen, die eine protektive Wirkung hinsichtlich autoimmunologischer Phänomene besitzen. Zanelli und Pugliese berichten von HLA-Molekülen, die, zusätzlich zu krankheitsfördernden HLA-Haplotypen, eine gewisse protektive Funktion gegenüber Krankheiten wie der Rheumatoiden Arthritis oder dem Insulin-abhängigen Diabetes mellitus besitzen (ZANELLI E et al., 1995; PUGLIESE A et al., 1995). So könnten also bei Thymomen mit Deletionen am Chromosom 6 jene HLA-Moleküle auf epithelialen Zellen vermindert exprimiert werden oder gar verloren gehen, die normalerweise einen Schutz vor autoimmunologischen Phänomenen bieten. Es könnte also zu einer Bildung autoreaktiver T-Zellen kommen mit der Folge autoimmuner Reaktionen wie der Myasthenia Gravis.

Alternativ könnte man sich vorstellen, daß bei einer Monosomie 6 durch Verlust eines MHC-Lokus HLA-Moleküle quantitativ vermindert exprimiert werden, die von beiden elterlichen Chromosomen stammen. Folge wäre eine Autoimmunität aufgrund einer unzureichenden Selektion bzw. Toleranz von geeigneten T-Zellen. Diese Konstellation wurde bereits bei Mäusen festgestellt, die eine reduzierte MHC-Expression auf Thymusepithelien aufwiesen (FUKUI Y et al. 1997).

Ferner könnte bei einer verminderten HLA-Expression aufgrund einer Monosomie des Chromosoms 6 eine abnorme T-Zell-Selektion auftreten, da positiv selektierte T-Zellen gegen HLA-Moleküle gerichtet sind, die auf den neoplastischen Thymusepithelien fehlen, jedoch außerhalb des Tumors auftreten. Gelangen solche T-Zellen in die Peripherie, so wäre eine Autoimmunerkrankung die Folge. Dieser Vorgang ähnelt der vermuteten Pathogenese der Myasthenia Gravis nach einer Knochenmarkstransplantation (SHERER Y et al., 1998). Fujii legt in seiner Studie zwar den Verdacht nahe,

daß es bei Thymomen wahrscheinlich nicht dazu kommt, daß T-Zellen, die gegen eigene HLA-Moleküle gerichtet sind, in die Peripherie gelangen, jedoch ist zu bedenken, daß in dieser Studie nur zwei mit Myasthenia Gravis assoziierte Thymome untersucht wurden und wohl keines davon zum Typ B, den am häufigsten mit Myasthenie assoziierten Thymomen, zu zählen war (FUJII Y et al. 1991).

Müller-Hermelink legt die Vermutung nahe, daß eine Reduktion der epithelialen MHC-Klasse II-Molekül-Expression, abnorme endogene epitheliale Antigene sowie eine veränderte Expression von co-stimulatorischen Molekülen bei WHO Typ AB und B Thymomen wesentliche Faktoren für die Entstehung einer Myasthenia Gravis darstellen. Dies führt zu einer falsch-positiven Selektion von autoreaktiven CD4+ T-Zellen mit der Folge der Myasthenia Gravis (MÜLLER-HERMELINK HK et al., 2000; MÜLLER-HERMELINK HK et al., 1997).

5. Zusammenfassung

Genetische Veränderungen von Thymomen, insbesondere rekurrente Aberrationen, sind bislang unbekannt. In dieser Dissertation wurden 13 WHO Typ A Thymome, 23 WHO Typ B3 Thymome sowie 12 primäre Plattenepithelkarzinome (WHO Typ C Thymome) sowie einige seltene Primärtumoren des Thymus mittels Komparativer genomischer Hybridisierung untersucht.

Mit Ausnahme eines einzigen Falles zeigten WHO Typ A Thymome keine chromosomalen Gewinne oder Verluste. Im Gegensatz dazu fanden sich bei allen Thymomen des Typs B3 genetische Aberrationen. Der Gewinn von 1q trat in 15 (65%), Gewinne von Chromosom 16 und Xq traten in jeweils 3 (13%) Fällen auf. Verluste fanden sich auf Chromosom 6 in 10 Fällen (43%) und an 13q in 6 Fällen (23%). Die häufigsten Gewinne bei primären Plattenepithelkarzinomen fanden sich auf 1q in 7 Fällen (58%), auf 17q in 4 Fällen (33%) und auf Chromosom 5 und 18 in jeweils 3 Fällen (25%). Rekurrente Verluste traten bei dieser Entität auf Chromosom 16q in 8 Fällen (67%), auf Chromosom 6 in 6 Fällen (50%), auf Chromosom 3 in 4 Fällen (33%) und auf den Chromosomen 13q sowie 17p in jeweils 3 Fällen (25%) auf.

Die Dissertation zeigt, daß histologisch unterschiedliche Thymome mit unterschiedlichen, rekurrenten Aberrationen assoziiert sind. WHO Typ A Thymome weisen nur vereinzelt genetische Aberrationen auf. Thymome vom WHO Typ A und Typ B3 weisen verschiedene genetische Phänotypen auf, während Thymome vom Typ B3 sowie die primären Plattenepithelkarzinome des Thymus gemeinsame genetische Aberrationen zeigen.

Neben den pathogenetischen Aspekten weist der beobachtete Verlust von Chromosom 6, auf dem sich die Genloci der HLA-Moleküle befinden, bei WHO Typ B3 Thymomen auch auf eine Rolle bei der Entstehung paraneoplastischer Autoimmunphänomene wie der Myasthenia Gravis hin.

6. Literaturangaben

1. ABDOLLAHI A, ROBERTS D, GODWIN AK, SCHULTZ DC, SONODA G, TESTA JR, HAMILTON TC: Identification of a zinc-finger gene at 6q25: a chromosomal region implicated in development of many solid tumors. *Oncogene* 1997, 14: 1973-1979
2. ARMENGOL G, TARKKANEN M, VIROLAINEN M, FORUS A, VALLE J, BOEHLING T, ASKO-SELJAVAARA S, BLOMQVIST C, ELOMAA I, KARAHARJU E, KIVIOJA AH, SIIMES MA, TUKIAINEN E, CABALLIN MR, MYKLEBOST MR, KNUUTILA S: Recurrent gains of 1q, 8, 12 in the Ewing family of tumours by Comparative Genomic Hybridization. *British Journal of Cancer* 1997, 75(10): 1403-1409
3. ASTER J, KUMAR V: Thymus. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T: *Pathologic Basis of Disease*, 6th edn., WB Saunders Company, Philadelphia, 1999, 690-693
4. BALDI A, ESPOSITO V, DE LUCA A, FU Y, MEOLI I, GIORDANO GG, CAPUTI M, BALDI F, GIORDANO A: Differential expression of Rb2/p130 and p107 in normal human tissues and in primary lung cancer. *Clinical Cancer Research* 1997, 3: 1691-1697
5. BALSARA BR, SONODA G, DU MANOIR S, SIEGFRIED JM, GABRIELSON E, TESTA JR: Comparative Genomic Hybridization Analysis detects frequent, often high-level, overrepresentation of DNA sequences at 3q, 5p, 7p, and 8q in human non-small cell lung carcinomas. *Cancer Research* 1997, 57: 2116-2120
6. BASTIAN BC, LE BOIT PE, HAMM H, BROECKER EB, PINKEL D: Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by Comparative Genomic Hybridization. *Cancer Research* 1998, 58: 2170-2175
7. BELL DW, JHANWAR SC, TESTA JR: Multiple regions of allelic loss from chromosome arm 6q in malignant mesothelioma. *Cancer Research* 1997, 57: 4057-4062
8. BELL ET: Tumors of the thymus in myasthenia gravis. *Journal of nervous and mental disorders* 1917, 45: 130-143
9. BENTZ M, HUCK K, DU MANOIR S, JOOS S, WERNER CA, FISCHER K, DÖHNER H, LICHTER P: Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995, 85: 3610-3618

10. VAN DEN BERGHE I, DEBIEC-RYCHTER M, PROOT L, HAGEMEIJER A, MICHIELSSEN P: Ring chromosome 6 may represent a cytogenetic subgroup in a benign thymoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2002, 137: 75-77
11. BERX F, CLETON-JANSEN AM, NOLLET F, DE LEEUW WJ, VAN DE VIJVER M, CORNELISSEN C, VAN ROY F: E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 1995, 14: 6107-6115
12. BEVAN MJ, HOGQUIST KA, JAMESON SC: Selecting the T cell receptor repertoire. *Science* 1994, 264: 796
13. BOCKMUEHL U, SCHWENDEL A, DIETEL M, PETERSEN I: Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research* 1996, 56: 5325-5329
14. VON BOEHMER H: Developmental biology of T cells in T cell receptor transgenic mice. *Annual Review of Immunology* 1990, 8: 531
15. BUERGER H, OTTERBACH F, SIMON R, POREMBA C, DIALLO R, DECKER T, RIETHDORF L, BRINKSCHMIDT C, DOCKHORN-DWORNICZAK B, BOECKER W: Comparative Genomic Hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast- evidence of multiple genetic pathways. *Journal of Pathology* 1999, 187: 396-402
16. CHEN FF, YAN JJ, JIN YT, SU IJ: Detection of bcl-2 and p53 in thymoma: expression of bcl-2 as a reliable marker of tumor aggressiveness. *Human Pathology* 1996, 27: 1089-1092
17. COWELL JK, HOGG A: Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1992, 64: 1-11
18. DAL CIN P, DE WOLFF-PEETERS C, DENEFFE G, FRYNS JP, VAN DEN BERGHE H: Thymoma with a t(15; 22)(p11; q11). *Cancer Genetics Cytogenetics* 1996, 89: 181-183
19. DAL CIN P, DE WOLFF-PEETERS C, ALY MS, DENEFFE G, VAN MIEGHEM W, VAN DEN BERGHE H: Ring chromosome 6 as the only change in a thymoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1993, 6: 243-244
20. DAMERON KM, VOLPERT OV, TAINSKY MA, BOUCK N: Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin 1. *Science* 1994, 265: 1582-1584
21. DE BAETS MH, VINCENT A: Myasthenia gravis. In: Bona CA, Siminovitch KA, Zanetti M, Theofilopoulos AB (Hrsg.): *The molecular*

pathology of autoimmune diseases. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 1993

22. DORFMANN DM, SHAHSAFAEI A, CHAN JKC: Thymic carcinoma, but not thymomas and carcinomas of other sites, show CD5 immunoreactivity. *American Journal of Surgical Pathology* 1997, 21(8): 936-940
23. DRACOPOLI NC, BRUNS GAP, BRODEUR GM, LANDES GM, MATISE TC, SELDIN MF, VANCE JM, WEITH A: Report of the first international workshop on human chromosome 1 mapping 1994. *Cytogenetics Cell Genetics* 1994, 67: 144-165
24. EL DEIRY WS, TOKINO T, VELCULESCU VE, LEVY DB, PARSONS R, TRENT JM, LIN D, MERCER WE, KINZLER KW, VOGELSTEIN B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993, 75: 817-825
25. ENGELKAMP D, SCHÄFER BW, MATTEI MG, ERNE P, HEIZMANN CW: Six S100 genes are clustered on human chromosome 1q21: Identification of two genes coding for the two previously unreported calcium-binding proteins S100D and S100E. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 6547-6551
26. FEDI P, TRONICK SR, AARONSON SA: Growth factors. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW, Weichselbaum RR (Hrsg.): *Cancer Medicine*, Baltimore MD: Williams and Wilkins, 1997, 41-64
27. FILIPPOVA GN, LINDBLOM AMEINCKE LJ, KLENOVA EM, NEIMAN PE, COLLINS SJ, DOGGET NA, LOBANENKOV VV: A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTFC, is localized at chromosome segment 16q22.1 within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1998, 22: 26-36
28. FORUS A, WETERMAN MAJ, GEURTS VAN KESSEL A, BERNER JM, FODSTAD Ø, MYKLBOST O: Characterisation of 1q21-22 amplifications in human sarcomas by CGH and molecular analysis. *Cytogenetics Cell Genetics* 1996, 72: 148
29. FUJII Y, OKUMURA M, INADA K, NAKAHARA K: Lymphocytes in thymomas are tolerant to self-MHC. *Cell Immunology* 1991, 137: 438-447
30. FUKUI Y, ISHIMOTO T, UTSYAMA M, GYOTOKU T, KOGA T, NAKAO K, HIROKAWA K, KATSUKI M, SASAZUKI T: Positive and negative CD4+ thymocyte selection by a single MHC/peptide ligand affected by its expression level in the thymus. *Immunity* 1997, 6: 401-410

31. GARKAVTSEV I, KAZAROV A, GUDKOV A, RIABOWOL K: Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genetics* 1996, 14: 415-420
32. GIBBS S, FIJNEMANN R, WIEGANT J, VAN KESSEL AD, VAN DE PUTTE P, BACKENDORF C: Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. *Genomics* 1993, 16: 630-637
33. GILHUS NE, JONES M, TURLEY H, GATTER KC, NAGVEKAR K, NEWSOM-DAVIS J, WILLCOX N: Oncogene proteins and proliferation antigens in thymomas: increased expression of epidermal growth factor receptor. *Journal of Clinical Pathology* 1995, 48: 447-455
34. GOH SGN, LAU LC, SIVASWAREN C, CHUAH KL, TAN PH, LAI D: Pseudodicentric (16;12)(q11;p11.2) in a type AB (mixed) thymoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001, 131: 42-47
35. HANAHAN D, WEINBERG RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000, 100: 57-70
36. HARRIS CC: p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic- an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 1996,17: 1187-1198
37. HARRIS NL: Classification of thymic epithelial neoplasms. In: *Epithelial Tumors of the Thymus. Biology, Pathology, Treatment.* Hrsg. Marx A und Müller Hermelink HK, Plenum Press, New York, 1997, 1-7
38. HAYASHI Y, ISHII N, OABYASHI C, JINNAI K, HANOIKA K, IMAI Y, ITOH H: Thymoma: tumour type related to expression of epidermal growth factor (EGF), EGF-receptor, p53, v-erb B, and ras p21. *Virchows Archiv* 1995, 426: 43-50
39. HIRABAYASHI H, FUJII Y, SAKAGUCHI M, TANAKA H, YOON HE, KOMOTO Y, INOUE M, MIYOSHI S, MATSUDA H: p16^{INK4}, pRB, p53 and cyclin D1 expression and hypermethylation of CDKN2 gene in thymoma and thymic carcinoma. *International Journal of Cancer* 1997, 73: 639-644
40. JAMES L: Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *Journal of Pathology* 1999, 187: 385-395
41. KAELIN WG Jr.: Recent insights into the function of the retinoblastoma susceptibility gene product. *Cancer Investigations* 1997, 15: 243
42. KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, CITRO G, SAUTER G, DE VRIES, KERSCHMANN R, CAROLL P, WALDMAN F: Identification of gains and

- losses of DNA sequences in primary bladder cancer by Comparative Genomic Hybridization. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1995, 12: 213-219
43. KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F, PINKEL D: Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science* 1992, 258: 818-821
 44. KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN FM, GRAY JW, PINKEL D: Optimizing Comparative Genomic Hybridization for Analysis of DNA Sequence Copy Number Changes in Solid Tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer* 1994,10: 231-243
 45. KARHU R, KNUUTILA S, KALLIONIEMI OP, SIITONEN S, AINE R, VILPO L, VILPO J: Frequent loss of the 11q14-q24 region in chronic lymphocytic leukemia. A study by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 19: 286-290
 46. KEES UR, MULCAHY MT, WILLOUGHBY ML: Intrathoracic carcinoma in an 11-year-old girl showing translocation t(15; 19). *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1991, 13: 459-464
 47. KINZLER KW, VOGELSTEIN B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996, 87: 159-170
 48. KIRCHNER T, MÜLLER-HERMELINK HK: New approaches to the diagnosis of thymic epithelial tumors. *Prognostic Surgical Pathology* 1985, 10: 167-189
 49. KIRCHNER T, SCHALKE B, BUCHWALD J, RITTER M, MARX A, MÜLLER-HERMELINK HK: Well-differentiated thymic carcinoma. An organotypical low-grade carcinoma with relationship to cortical thymoma. *American Journal of Surgical Pathology* 1992, 16: 1153-1169
 50. KNUUTILA S, AALTO Y, AUTIO K, BJÖRKQUIST AM, EL-RIFAI W, HEMMER S, HUHTA T, KETTUNTEN E, KIURU-KUHLEFELT S, LARRAMENDY ML, LUSHNIKOVA T, MONNI O, PERE H, TAPPER J, TARKKANEN M, VARIS A, WASENIUS VM, WOLF M, ZHU Y: Review: DNA Copy Number Losses in Human Neoplasms. *American Journal of Pathology* 1999, 155: 683-694
 51. KNUUTILA S, BJÖRKQUIST AM, AUTIO K, TARKKANEN M, WOLF M, MONNI O, SZYMANSKA J, LARRAMENDY ML, TAPPER J, PERE H, EL-RIFAI W, HEMMER S, WASENIUS VM, VIDGREN V, ZHU Y: DNA Copy Number Amplifications in Human Neoplasms: A Review of Comparative Genomic Hybridization Studies. *American Journal of Pathology* 1998, 152: 1107-1123

52. KORNSTEIN MJ: Thymoma Classification: My Opinion. American Journal of Clinical Pathology 1999, 112: 304-307
53. KORSMEYER SJ: Chromosomal Translocation in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. Annual Review of Immunology 1992, 10: 785-807
54. KRISTOFFERSON U, HEIM S, MAND AHL N, AKERMAN M, MITELMAN F: Multiple clonal chromosome aberrations in two thymomas. Cancer Genetics Cytogenetics 1989, 41: 93-98
55. KUBONISHI I, TAKEHARA N, IWATA J, SONOBE H, OHTSUKI Y, ABE T, MIYOSHI I: NOVEL t(15; 19)(q15; p13) chromosome abnormality in a thymic carcinoma. Cancer Research 1991, 51: 3327-3328
56. KUO TT, LO SK: Thymoma: A study of pathological classification of 71 cases with evaluation of the Müller-Hermelink system. Human Pathology 1993, 24: 766-771
57. LARRAMENDY M, VALLE J, TARKKANEN M, KIVIOJA AH, KARAHARJU E, SALMIVALLI T, ELOMAA I, KNUUTILA S: No DNA copy number changes in osteochondromas: a comparative genomic hybridization study. Cancer Genetics and Cytogenetics 1997, 97: 76-78
58. LE BEAU MM, DRABKIN H, GLOVER TW, GEMMILL R, RASSOOL FV, MC-KEITHAN TW, SMITH DI: A FHIT tumor suppressor gene ? Genes Chromosomes Cancer 1998, 21: 281-289
59. LEE AC, KWONG YL, FU KH, CHAN GCF, MA L, LAU YL: Disseminated mediastinal carcinoma with chromosomal translocation (15;19). Cancer 1993, 72: 2273-2276
60. LEVIN NA, BRZOSKA P, GUPTA N, MINNA JD, GRAY JW, CHRISTMAN MF: Identification of frequent novel genetic alterations in small cell lung carcinoma. Cancer Research 1994, 54: 5086-5091
61. LEVINE GD, ROSAI J: Thymic hyperplasia and neoplasia. A review of current concepts. Human Pathology 1978, 9: 495-515
62. LEWIS CR, MANOHARAN A: Benign thymic cysts in Hodgkin's disease: report of a case and review of published cases. Thorax 1987, 42: 633
63. LICHTER P, BENTZ M, DU MANOIR S, JOOS S: Comparative genomic hybridization. Human Chromosomes: Principles and Techniques, ed. 2. Herausgegeben von RS Verma, A Babu. New York, McGraw-Hill 1995: 191-210

64. LIU Y, CORCORAN M, RASOOL O, IVANOVA G, IBBOTSON R, GRANDER D, IYENGAR A, BARANOVA A, KASHUBA V, MERUP M, WU X, GARDINER A, MULLENBACH R, POLTARAUS A, HULTSTROM AL, JULIUSSON G, CHAPMAN R, TILLER M, COTTER F, GAHRTON G, YANKOVSKY N, ZABAROVSKY E, EINHORN S, OSCIER D: Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 1997, 15: 2463-2473
65. MAESTRO R, PICCINI S, DOGLIONI C, GASPARATTO D, VUKOSAVLJEVIC T, SULFARO S, BARZAN L, BOIOCCHI M: Chromosome 13q deletion mapping in head and neck squamous cell carcinomas: identification of two distinct regions of preferential loss. *Cancer Research* 1996, 56: 1146-1150
66. MARENHOLZ I, VOLZ A, KORGE B, RAGOUSSIS I, ZIEGLER A, MISCHKE D: A high resolution genomic restriction map and a YAC contig of the epidermal differentiation complex (EDC) on human chromosome 1q21. *Cytogenetics Cell Genetics* 1995, 72: 149
67. MARINO M, MÜLLER-HERMELINK HK: Thymoma and thymic carcinoma. Relation of thymic epithelial cells to the cortical and medullary differentiation of thymus. *Virchows Archive* 1985, 407: 119-149
68. MARRACK P, PARKER DC: A little of what you fancy. *Nature* 1004, 368: 397
69. MARX A, MÜLLER-HERMELINK HK: From basic immunobiology to the upcoming WHO-classification of tumors of the thymus. *Pathology Research and Practice* 1999, 195: 515-533
70. MARX A, MÜLLER-HERMELINK HK: Thymoma and thymic carcinoma. Letter to the Editor. *American Journal of Surgical Pathology* 1999, 23: 739-740
71. MASAOKA A, MONDEN Y, NAKAHARA K, TANIOKA T: Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer* 1981, 48: 2485-2492
72. MAXWELL PH, WIESENER MS, CHANG GW, CLIFFORD SC, VAUX, EC, COCKMAN ME, WYKOFF CC, PUGH CW, MEHER ER, RATCLIFFE PJ: The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999, 399: 271-275
73. MIRZA I, KAZIMI SN, LIGI R, BURNS J, BRAZA F: Cytogenetic Profile of a Thymoma: A case Report and Review of the Literature. *Arch Pathol Lab Med* 2000, 124: 1714-1716

74. MOSSMANN S, VINCENT A, NEWSOM-DAVIS J: Myasthenia gravis without acetylcholine-receptor antibody: a distinctive disease entity. *Lancet* 1986, 1: 116
75. MÜLLER-HERMELINK HK, MARX A, KIRCHNER T: Thymus. In: Damjanov I, Lindner J (Hrsg): *Anderson's Pathology*, 10th edn, Mosby Year-Book, St.Louis, 1996, 1218-1243
76. MÜLLER-HERMELINK HK, MARX A: Pathological aspects of malignant and benign thymic disorders. *Ann Med* 1999, 31: 5-14
77. MÜLLER-HERMELINK HK, MARX A: Thymoma. *Current Opinion in Oncology* 2000, 12: 426-433
78. MÜLLER-HERMELINK HK, WILISCH A, SCHULTZ A, MARX A: Characterization of the human thymic microenvironment: lymphoepithelial interaction in normal thymus and thymoma. *Arch Histol Cytol* 1997, 60: 9-28
79. NACHEVA EP, GRACE CD, BITTNER M, LEDBETTER DH, JENKINS RB, GREEN AR: Comparative genomic hybridization: A comparison with molecular and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 1998, 100: 93-105
80. OFFIT K, PARSA NZ, GAIDANO G, FILIPA DA, LOUIE D, PAN D, JHANWAR SC, DALLA-FAVERA R, CHAGANTI RSK: 6q deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1993, 82: 2157-2162
81. OHASI PS, PIRCHER H, BURKI K et al.: Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities. *Nature* 1990, 346: 861
82. ORPHANOS V, MCGOWN G, HEY Y, BOYLE JM, SANTIBANEZ-KOREF M: Proximal 6q, a region showing allele loss in primary breast cancer. *British Journal of Cancer* 1995, 71: 290-293
83. ORPHANOS V, MCGOWN G, HEY Y, THORNCROFT M, SANTIBANEZ-KOREF M, RUSSEL SEH, HICKEY I, ATKINSON RJ, BOYLE JM: ALLELIC imbalance of chromosome 6q in ovarian tumors. *British Journal of Cancer* 1995, 71: 666-669
84. PARRONS M, LABOUYRIE E, GROPP A, DUBUS P, CARLES D, VELLY JF, DE MASCAREL A, MERLIO JP: Expression of NGF receptors in normal and pathological human thymus. *Journal of Neuroimmunology* 1998, 85: 11-21

85. PESCARMONA E, RENDINA EA, VENUTA F, D'ARCANGELO E, PAGANI M, RICCI C et al.: Analysis of prognostic factors and clinicopathological staging of thymoma. *Annual of Thoracic Surgery* 1990, 50: 534-538
86. PESCARMONA E, RENDINA EA, VENUTA F, RICCI C, RUCO LP, BARONI CD: The prognostic implication of thymoma histologic subtype. A study of 80 consecutive cases. *American Journal of Clinical Pathology* 1990, 93: 190-195
87. PESCARMONA E, ROSATI S, RENDINA EA, VENUTA F, BARONI CD: Well-differentiated thymic carcinoma: a clinicopathological study. *Virchows Archiv (Pathological Anatomy)* 1992, 420: 179-183
88. PETERSEN I, BUJARD M, PETERSEN S, WOLF G, GOEZE A, SCHWENDEL A, LANGRECK H, GELLERT K, REICHEL M, JUST K, DU MANOIR S, CREMER T, DIETEL M, RIED T: Patterns of imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Research* 1997, 57: 2331-2335
89. PETERSEN I, PETERSEN S, BOCKMÜHL U, SCHWENDEL A, WOLF G, DIETEL M: Comparative Genomische Hybridisierung an Bronchialkarzinomen und ihrer Metastasen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 1997, 81: 297-305
90. PICH A, CHIARLE R, CHIUSA L, PONTI R, GEUNA M, PALESTRO G: p53 expression and proliferative activity predict survival in non-invasive thymomas. *International Journal of Cancer* 1996, 69: 180-183
91. PICKER LJ, SIEGELMAN MH: Lymphoid Tissue and Organs. In: Paul WE: *Fundamental Immunology*. 3rd edn., Raven Press, New York, 1993, 145-197
92. PUGLIESE A, GIANANI R, MOROMISATO R, AWDEH ZL, ALPER CA, ERLICH HA, JACKSON RA, EISENBARTH GS: HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* 1995, 44: 608-613
93. QUINTANILLA-MARTINEZ L, MÜLLER-HERMELINK HK, WILKINS EW Jr., FERRY JA, HARRIS NL: Thymoma: Morphologic subclassification correlates with invasiveness and immunohistologic features. A study of 122 cases. *Human Pathology* 1993, 24: 958-969
94. QUINTANILLA-MARTINEZ L, WILKINS EW Jr., CHOI N, EFIRD J, HUG E, HARRIS NL: Thymoma: histologic subclassification is an independent prognostic factor. *Cancer* 1994, 74: 606-617

95. RAK J, FILMUS J, FINKENZELLER G, GRUGEL S, MARME D, KERBEL RS: Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Review* 1995, 14: 263-277
96. RIED T, JUST KE, HOLTGREVE-GREZ H, DU MANOIR S, SPEICHER MR, SCHRÖCK E, LATHAM C, BLEGEN H, ZELLERBERG A, CREMER T, AUER G: Comparative genomic hybridization of formalin-fixed paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Research* 1995, 55: 5415-5423
97. ROSAI J, SOBIN LH: Histological typing of tumours of the thymus. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Heidelberg, Springer Verlag 1999, 1-65
98. SAIT SNJ, BROOKS JJ, ASHRAF M, ZHANG PJ: A novel t(1;8)(p13;p11) in a thymic carcinoma with unusual giant cell features and renal metastasis. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2001, 124: 140-143
99. SARLOMO-RIKALA M, EL-RIFAI W, LAHTINEN T, ANDERSSON LC, MIETTINEN M, KNUUTILA S: Different patterns of DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas and schwannomas. *Human Pathology* 1998, 29: 476-481
100. SATO M, MORI Y, SAKURADA A, FUJIMURA S, HORII A: The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Human Genetics* 1998, 103: 96-101
101. SHENG ZM, MARCHETTI A, BUTTITTA F, CHAMPEME MH, CAMPANI D, BISTOCCHI M, LIDEREAU R, CALLAHAN R: Multiple regions on chromosome 6q affected by loss of heterozygosity in primary human breast carcinomas. *British Journal of Cancer* 1996, 73: 144-147
102. SHERER Y, SHOENFELD Y: Autoimmune diseases and autoimmunity post-bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1998, 22: 873-881
103. SHIMOSATO Y: Thymic Carcinoma. In: *Epithelial Tumors of the Thymus. Biology, Pathology, Treatment.* Hrsg. Marx A and Müller-Hermelink HK. Plenum Press, New York, 1997, 9-15
104. SHIMOSATO Y, KEMEYA T, NAGAI K, SUEMASU K: Squamous cell carcinoma of the thymus: an analysis of eight cases. *American Journal of Surgical Pathology* 1977, 1: 109
105. SONOBE H, OHTSUKI Y, NAKAYAMA H, ASABA K, NISHIYA K, SHIMIZU K: A thymic squamous cell carcinoma with complex

- chromosome abnormalities. *Cancer Genes Cytogenetics* 1998, 103: 83-85
106. SONOBE H, TAKEUCHI T, OHTSUKI Y, TAGUCHI T, SHIMIZU K: A thymoma with clonal complex abnormalities. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1999, 110:72-74
 107. SPRENT J: T-Lymphocytes and the thymus. In: Paul WE: *Fundamental Immunology*. 3rd edn., Raven Press, New York, 1993, 75-109
 108. SPEICHER MR, HOWE C, CROTTY P, DU MANOIR S, COSTA J, WARD DC: Comparative Genomic Hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Research* 1995, 55: 1010-1013
 109. STRASSER A, HARRIS AW, BATH ML, CORY S: Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 1990, 348: 331-333
 110. STURM RA, EYRE HJ, BAKER E, SUTHERLAND GR: The human OTF1 locus which overlaps the CD3Z gene is located at 1q22-q23. *Cytogenetics Cell Genetics* 1995, 68: 231-232
 111. SUSINI T, BALDI F, HOWARD CM, BALDI A, TADDEI G, MASSI D, RAPI S, SAVINO L, MASSI G, GIORDANO A: Expression of the retinoblastoma-related gene Rb2/p130 correlates with clinical outcome in endometrial cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1998, 16: 1085-1093
 112. SUSTER S, MORAN CA: Micronodular Thymoma With Lymphoid B-cell Hyperplasia: Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of Eighteen Cases of a Distinctive Morphologic Variant of Thymic Epithelial Neoplasm. *American Journal of Surgical Pathology* 1999, 23: 955-962
 113. SUSTER S, MORAN CA: Primary Thymic Epithelial Neoplasms Showing Combined Features of Thymoma and Thymic Carcinoma: A Clinicopathologic Study of 22 Cases. *American Journal of Surgical Pathology* 1996, 20(12): 1469-1480
 114. SUSTER S, MORAN CA: Spindle Cell Thymic Carcinoma: Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of a Distinctive Variant of Primary Thymic Epithelial Neoplasm. *American Journal of Surgical Pathology* 1999, 23: 691-700
 115. SUSTER S, MORAN CA: Thymoma and thymic carcinoma (Author's answer to Letter to the Editor). *American Journal of Surgical Pathology* 1999, 23: 740-741)

116. SUSTER S, MORAN CA: Thymoma Classification. The ride of the Valkyries. *American Journal of Clinical Pathology* 1999, 112: 308-310
117. SUSTER S, MORAN CA: Thymoma with Pseudosarcomatous Stroma: Report of an Unusual Histologic Variant of Thymic Epithelial Neoplasm That May Simulate Carcinosarcoma. *American Journal of Surgical Pathology* 1997, 21: 1316-1323
118. SZYMANSKA J, VIROLAINEN M, TARKKANEN M, WIKLUND T, ASKO-SELJAVAARA S, TUKIAINEN E, ELOMAA C, KNUUTILA S: Overrepresentation of 1q21-23 and 12q13-21 in lipoma-like liposarcoma but not in benign lipomas: a comparative genomic hybridization study. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1997, 94: 14-18
119. TAKAHASHI T, NAU MM, CHIBA I, BIRRER MJ, ROSENBERG RK, VINOCOUR M, LEVITT M, PASS H, GAZDAR AF, MINNA JD: p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* 1989, 246: 491-494
120. THEILE M, SEITZ S, ARNOLD W, JANDRIG B, FREGE R, SCHLAG PM, HAENSCH W, GUSKI H, WINZER KJ, BARRETT JC, SCHERNECK SA: A defined chromosome 6 fragment (at D6S310) harbors a putative tumor suppressor gene for breast cancer. *Oncogene* 1996, 13: 677-685
121. THEILLET C, ADELAIDE J, LOUASON GFB, JACQUEMIER J, ADNANE J, LONGY M, KATSAROS D, SISMONDI P, GAUDRAY P: FGFR1 and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1993, 7: 639-644
122. VARRAULT A, CIANI E, APIOUF, BILANGES B, HOFFMAN A, PANTALONI C, BOCKAERT J, SPENGLER D, JOURNOT L: hZAC encodes a zinc finger protein with antiproliferative properties and maps to a chromosomal region often lost in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 8835-8840
123. VIRGILIO L, SHUSTER M, GOLLIN SM, VERONESE ML, OHTA M, HUEBNER K, CROCE CM: FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 9770-9775
124. WEIRICH G, SCHNEIDER P, FELLBAUM C, BRAND H, NATHRATH W, SCHOLZ M, PRAUER H, HÖFLER H: p53 alterations in thymic epithelial tumours. *Virchows Archiv* 1997, 431: 17-23
125. WEISS MM, HERMSEN MAJA, MEIJER NCT, VAN GRIEKEN, BAAK JPA, KUIPERS EJ, VAN DIEST PJ: Comparative genomic hybridization. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 1999, 52: 243-251

126. WEITH A, BRODEUR GM, BRUNS GAP, MATISE TC, MISCHKE D, NIZETIC D, SELDIN MF, VAN ROY N, VANCE J: Report of the second international workshop on human chromosome 1 mapping 1995. *Cytogenetics Cell Genetics* 1995, 72: 114-144
127. WEINBERG RA: The retinoblastoma gene and gene product. *Cancer Surveys: Tumor Suppressor Genes, the Cell Cycle and Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1992, 43-57
128. WEINBERG RA: Tumor suppressor Genes. *Science* 1991, 254: 1138-1146
129. WETERMAN MAJ, STOOPEN GM, VAN MUIJEN GNP, KUZNICKI J, RUITER DJ, BLOOMERS HPJ: Expression of calcyclin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behavior in nude mice. *Cancer Research* 1992, 52: 1291-1296
130. YAMAMOTO H, ITOH F, HINODA Y, IMAI K: Inverse association of cell adhesion regulator messenger RNA expression with metastasis in human colorectal cancer. *Cancer Research* 1996, 56: 3605-3609
131. YAMAMOTO H, ITOH F, SAKAMOTO H, NAKAJIMA Y, UNE Y, HINODA Y, IMAI K: Association of reduced cell adhesion regulator messenger RNA expression with tumor progression in human hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* 1997, 74: 251-254
132. YEUNG RS, BELL DW, TESTA JR, MAYOL X, BALDI A, GRANA X, KLINGA-LEVAN K, KNUDSON AG, GIORDANO A: The retinoblastoma-related gene, RB2, maps to human chromosome 16q12 and rat chromosome 19. *Oncogene* 1993, 8: 3465-3468
133. YONEDA S, MARX A, HEIMANN S, KIKUCHI M, MÜLLER-HERMELINK HK: Low-grade metaplastic carcinoma of the thymus. *Histopathology* 1999, 35: 19-30
134. ZANELLI E, GONZALES-GAY MA, DAVID CS: Could HLA-DRB1 be the protective locus in rheumatoid arthritis? *Immunology Today* 1995, 16: 817-825
135. ZEREMSKI M, HORRIGAN SK, GRIGORIAN IA, WESTBROOK CA, GUDKOV AV: Localization of the candidate tumor suppressor gene ING1 to human chromosome 13q34. *Somat Cell Mol Genet* 1997, 23: 233-236
136. ZHAO X, BACKENDORF C, ELDER J: Construction and mapping of a YAC/P1 contig containing the S100 and the SPRR gene clusters on human chromosomal band 1q21. *Cytogenetics Cell Genetics* 1996, 72: 154

7. Abkürzungen

ampl	Amplifikation (amplification)
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Differenzierungsmarker (cluster of differentiation)
CDKN	Cyclin abhängige Kinase (cyclin-dependent-kinase)
CEA	Carcinoembryonales Antigen (carcinoembryonic antigen)
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CMAR	cell matrix adhesion regulator
DAPI	Diamidin Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleoid acid)
DNase	Desoxyribonuclease
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
FGFR	Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor (fibroblast growth factor receptor)
FHIT	fragile histidine triade
FLG	Filaggrin

HCl	Salzsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen (human leukocyte antigen)
Mb	Megabasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
MLH	mut L Homolog
mmol	Millimol
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaSCN	Natriumthiocyanat
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
NTRK	neurotrophic tyrosine kinase receptor
RB	Retinoblastom
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SPRR	small proline rich protein
SSC	Natiumzitat (sodiumchloride sodium citrate)
TCR	T-Zell-Rezeptor (T-cell-receptor)
U	Umdrehungen
VHL	Von-Hippel-Lindau
WDTC	Gut differenziertes Thymuskarzinom (well differentiated thymic carcinoma)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
XPC	Xeroderma Pigmentosum der Komplementationsgruppe C

8. Anhang

Abb. 1 CGH-Analyse der WHO Typ A Thymome (Medulläre Thymome)

Abb. 2 CGH-Analyse der WHO Typ B3 Thymome (WDTC)

Abb. 3 CGH-Analyse primärer Plattenepithelkarzinomen des Thymus (WHO Typ C Thymom)

Abb. 4 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines WHO Typ A Thymoms

Abb. 5 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines WHO Typ B3 Thymoms

Abb. 6 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines WHO Typ C Thymoms

Abbildungen

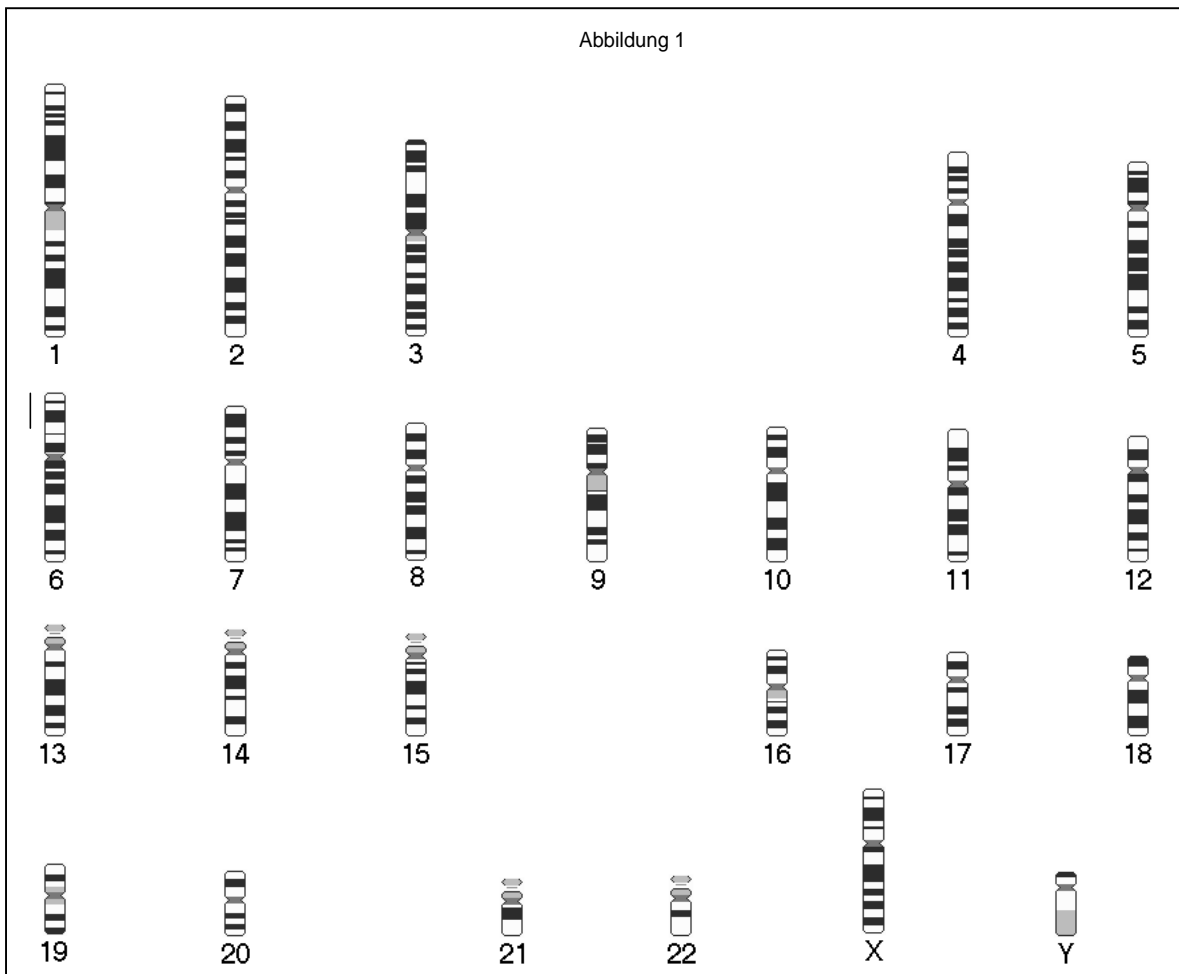


Abb. 1 CGH-Analyse der WHO Typ A Thymome (Medulläre Thymome).
Von 13 Typ A Thymomen zeigte nur ein einziger Fall einen chromosomalen Verlust auf Chromosom 6.

Strich links des Chromosomenideogramms: Verlust von chromosomalem Material

Strich rechts des Chromosomenideogramms: Zugewinn von chromosomalem Material

Dicker Strich: Genamplifikation

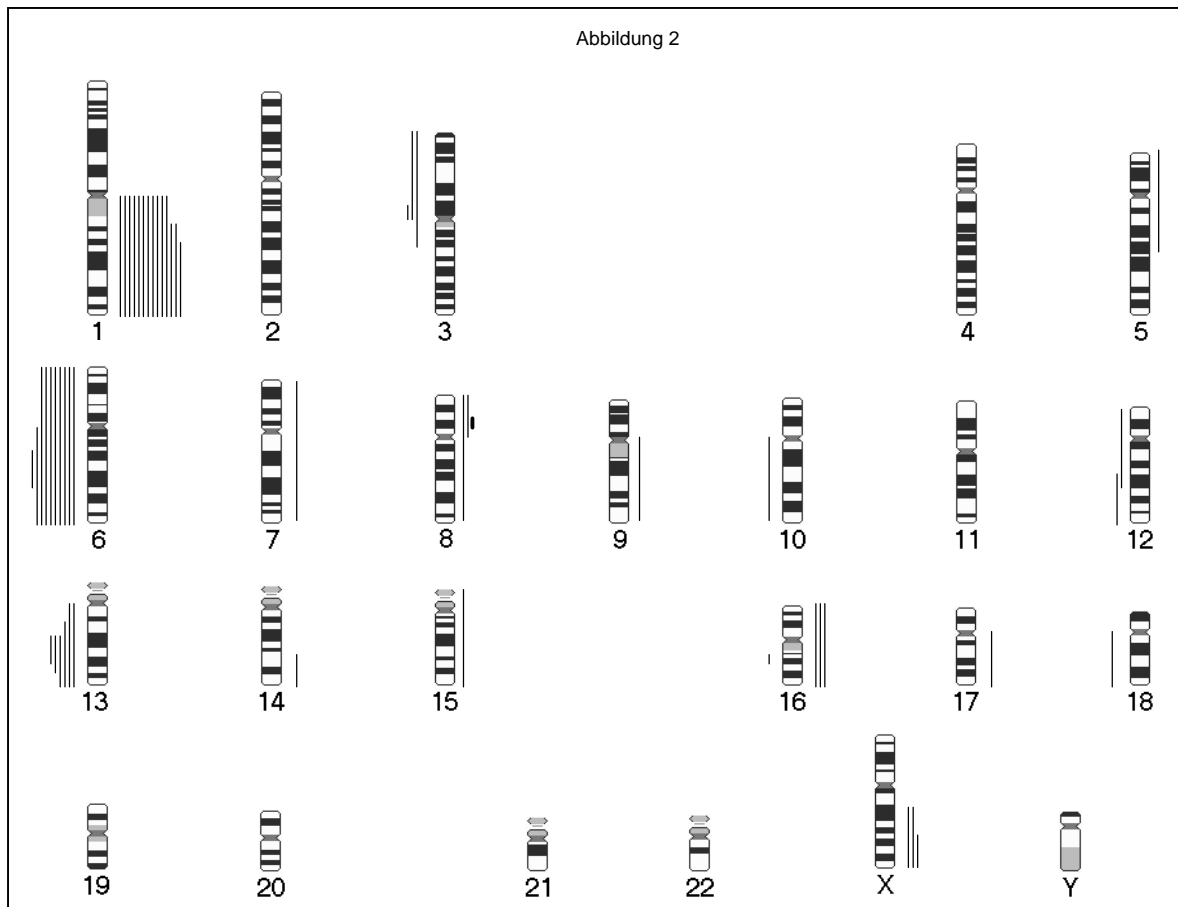


Abb. 2 CGH-Analyse der WHO Typ B3 Thymome (WDTC).

Alle 23 untersuchten WHO Typ B3 Thymome zeigten chromosomale Veränderungen wie Zugewinn auf Chromosom 1 in 15 Fällen (65%), Verlust auf Chromosom 6 in 10 (43%), auf 13q in 6 (26%) Fällen.

Strich links des Chromosomenideogramms: Verlust von chromosomalem Material

Strich rechts des Chromosomenideogramms: Zugewinn von chromosomalem Material

Dicker Strich: Genamplifikation

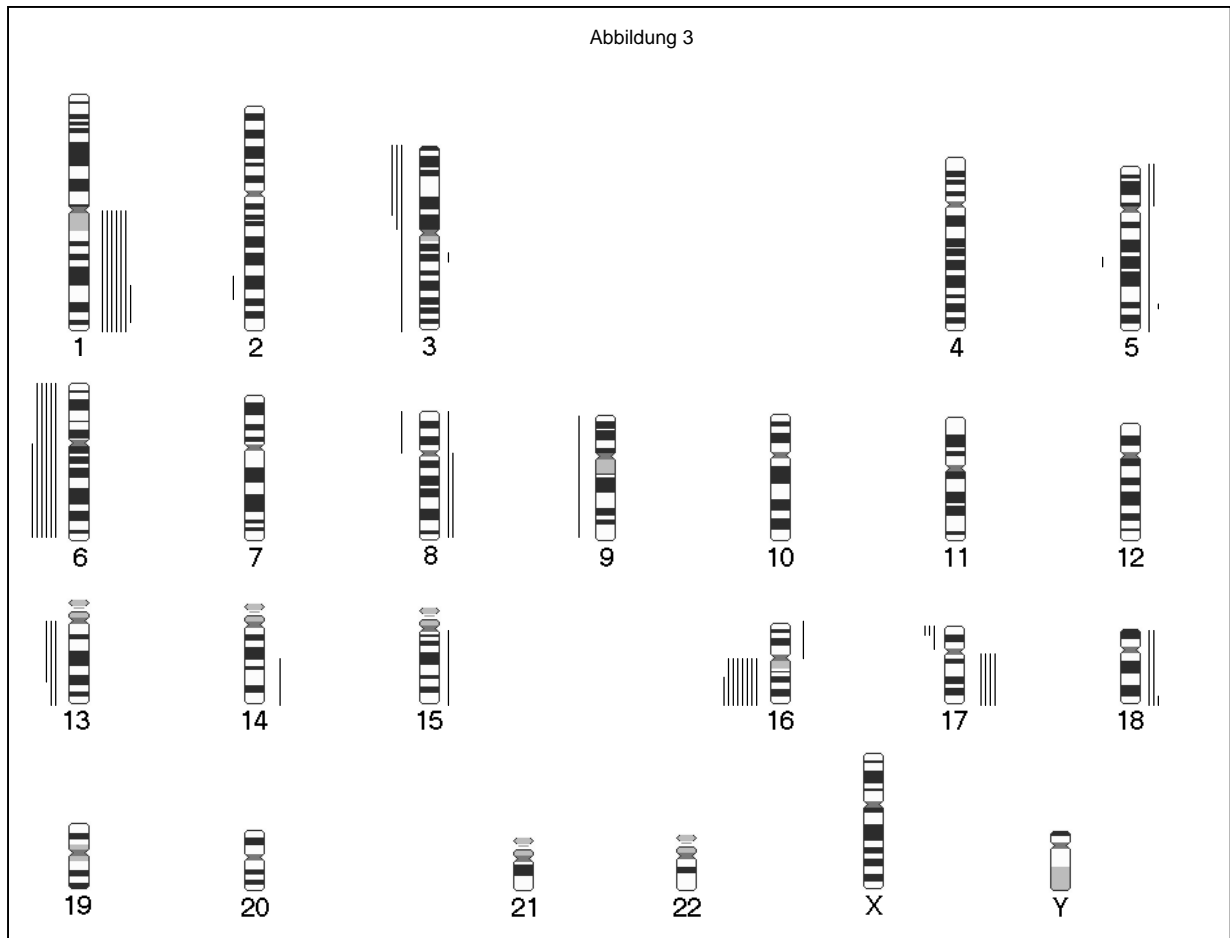


Abb. 3 CGH-Analyse primärer Plattenepithelkarzinomen des Thymus (WHO Typ C Thymom)
 Alle 12 untersuchten Fälle zeigten Verluste oder Gewinne von chromosomalem Material. Die häufigsten Zugewinne zeigten sich auf Chromosom 1 in 7 Fällen (58%) und Chromosom 17 in 4 Fällen (33%). Die häufigsten Verluste zeigten sich auf Chromosom 16q in 8 Fällen (67%), auf Chromosom 6 in 6 Fällen (50%).

Strich links des Chromosomenideogramms: Verlust von chromosomalem Material

Strich rechts des Chromosomenideogramms: Zugewinn von chromosomalem Material

Dicker Strich: Genamplifikation

Abb. 4

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der CGH eines WHO Typ A Thymoms

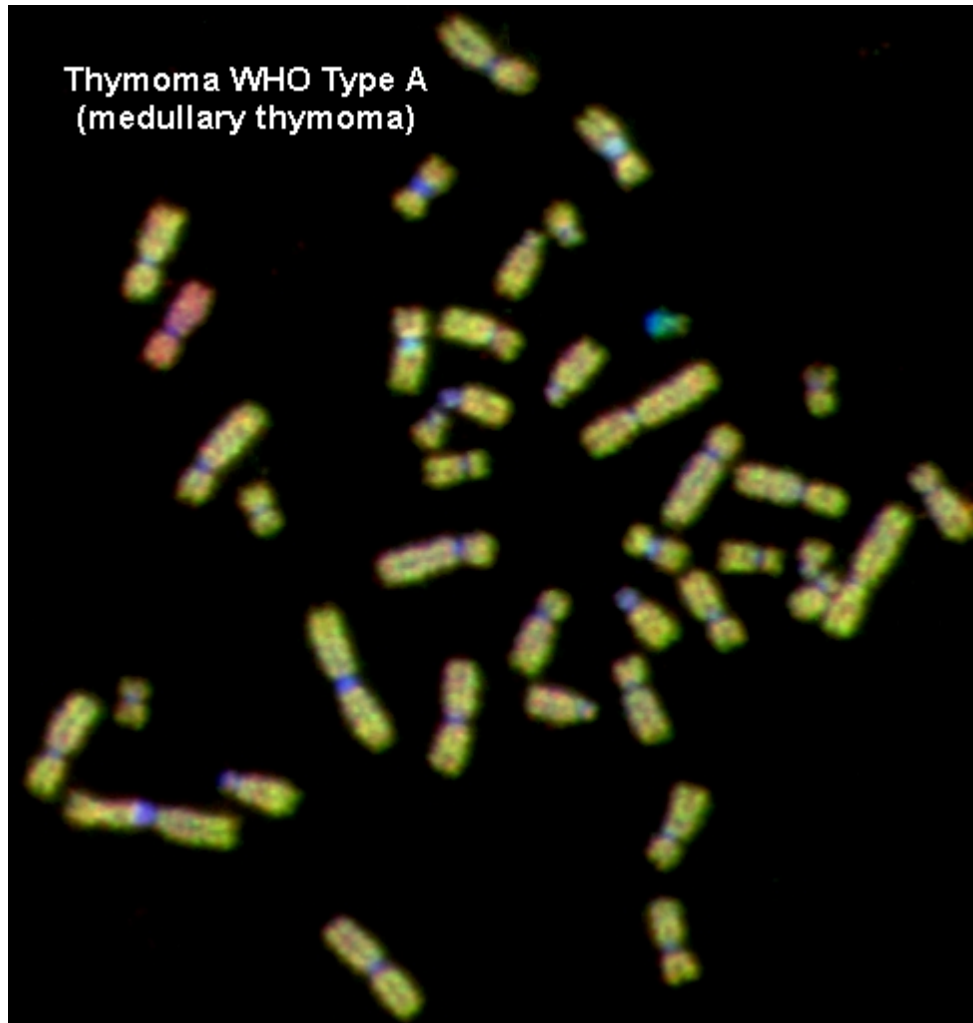


Abbildung 4 zeigt den Fall Nr. 1 (H 3202/ 88). Es wird deutlich, daß hierbei keine chromosomalen Veränderungen auftreten, was typisch ist für die abgebildete Entität.

Abb. 5

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der CGH eines WHO Typ B3 Thymoms

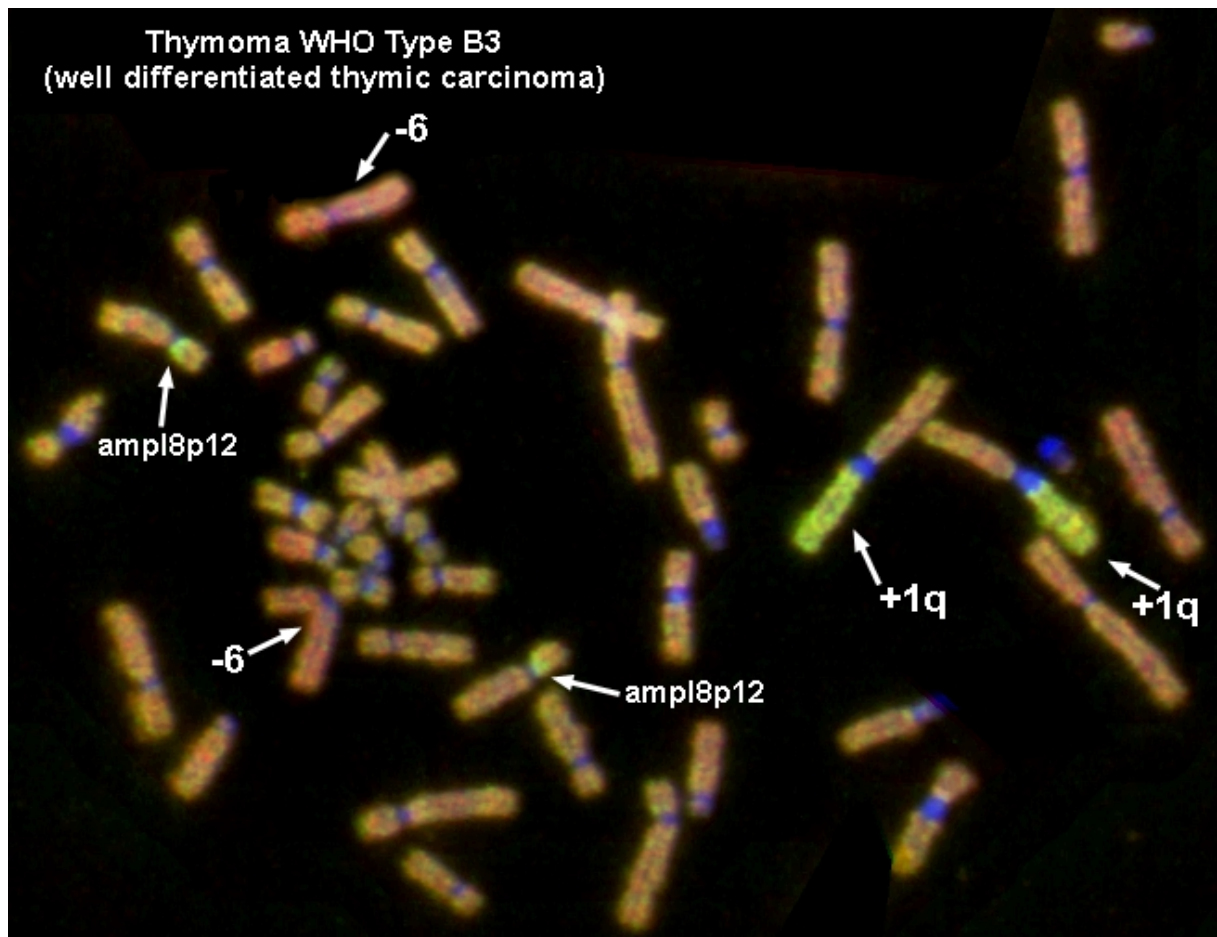


Abbildung 5 zeigt den Fall Nr. 22 (H 3759/92). Man erkennt die beschriebenen chromosomalen Veränderungen (siehe Pfeile) an der verstärkten Grünfärbung bei Zugewinn (+1q, ampl 8p12) sowie bei verstärkter Rotfärbung der Chromosomen bei Verlust von genetischem Material (-6). Der Zugewinn auf Chromosom 1q sowie der Verlust von genetischem Material auf Chromosom 6 sind typisch für WHO Typ B3 Thymome.

Abb. 6

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der CGH eines primären Plattenepithelkarzinoms des Thymus (WHO Typ C Thymom)

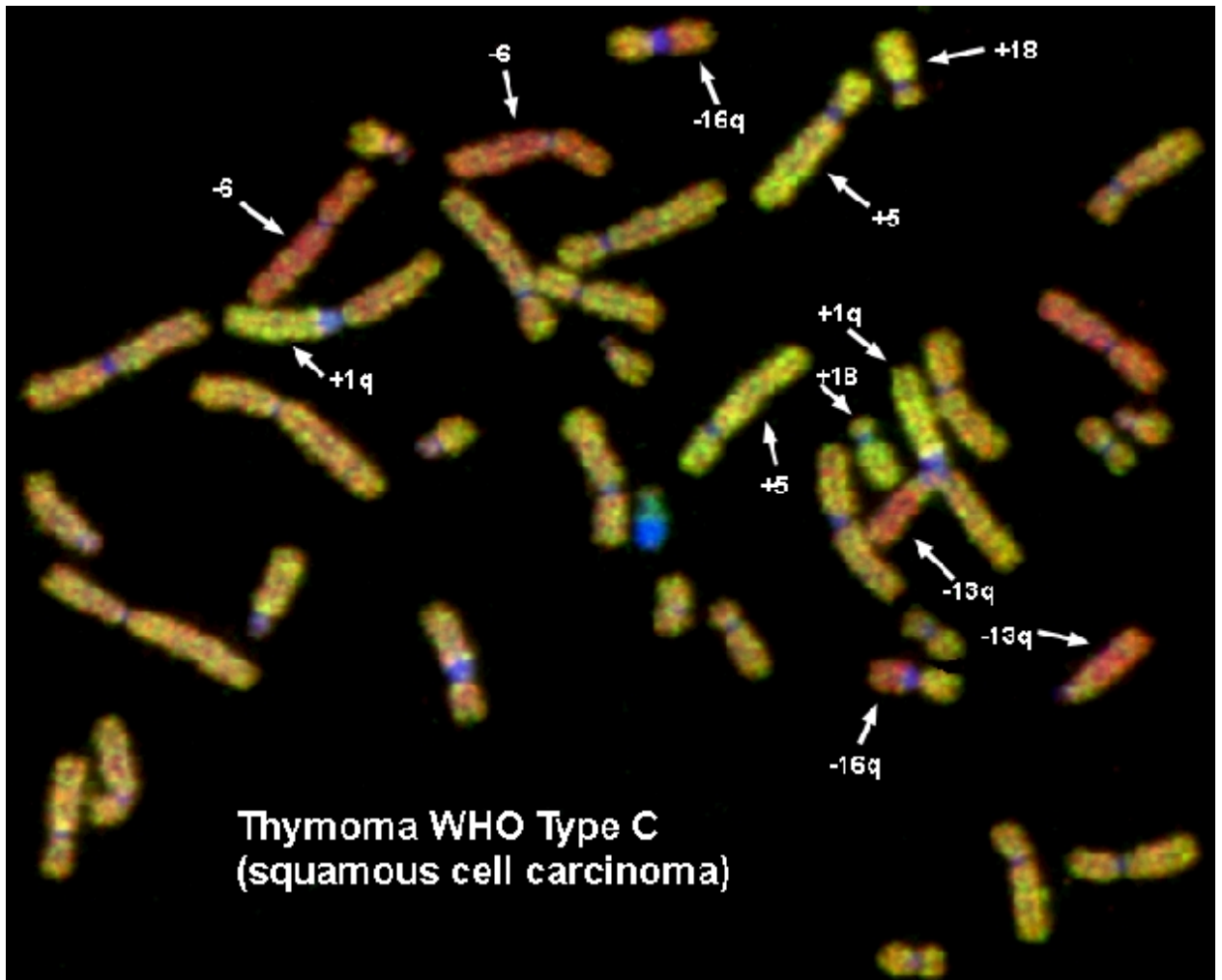


Abbildung 6 zeigt den Fall Nr. 43 (E 16402/ 97). Man erkennt die beschriebenen chromosomalen Veränderungen (siehe Pfeile) an der verstärkten Grünfärbung bei Zugewinn (+1q, +5, +18) sowie bei verstärkter Rotfärbung der Chromosomen bei Verlust von genetischem Material (-6, -13q, -16q). Diese Zugewinne und Verluste von genetischem Material sind neben anderen typisch für primäre Plattenepithelkarzinome (WHO Typ C Thymome).

Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Betreuung und Unterstützung bei der Bearbeitung möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Alexander Marx bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ralf Gold für die Übernahme des Korreferates.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Andreas Zettl, der mich anfangs in die Methodik des experimentellen Arbeitens einführte, mich dann während der gesamten Laborphase tatkräftig unterstützte und mir vor allem bei der Anfertigung des Manuskriptes mit viel Geduld zur Seite stand. Er war mir so stets eine große Hilfe.

Auch meiner Familie und allen meinen Freunden möchte ich hier nochmals für alle Unterstützung während der gesamten Studienzeit herzlich danken.

Lebenslauf

Am 16. August 1974 wurde ich als drittes Kind der Eheleute Rolf und Erika Wagner, geborene Ness, in Marbach geboren. Nach dem Besuch der Grundschule Rielingshausen wechselte ich 1985 auf das Friedrich-Schiller-Gymnasium Marbach, wo ich 1994 das Abitur ablegte.

In der Zeit von Juli 1994 bis September 1995 war ich im Rahmen meines Zivildienstes in der Krankenpflege auf der chirurgischen Abteilung des Krankenhaus Marbach tätig.

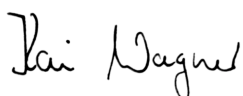
Im Sommersemester 1996 nahm ich mein Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf. Nach der Ärztlichen Vorprüfung im März 1998 legte ich im März 1999 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Danach begann ich mit meiner Dissertation am Pathologischen Institut der Universität Würzburg, bevor ich im September 2001 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ablegte.

Die Ausbildung im Praktischen Jahr absolvierte ich in der unfallchirurgischen Abteilung der Universität Würzburg, in der Abteilung für Chirurgie des Krankenhauses „Franz Tappeiner“ in Meran/ Italien, in der Abteilung für Innere Medizin des Spital Schwyz, Schweiz sowie während meines Wahlfachs Pathologie im Department of Pathology and Laboratory Medicine am Mount Sinai Hospital in Toronto/ Kanada, sowie im Pathologischen Institut der Universität Würzburg.

Am 12. November 2002 legte ich in Würzburg den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

Ab Februar 2003 bin ich als Arzt im Praktikum in der Abteilung für Innere Medizin des Klinikums Garmisch-Partenkirchen tätig.

Würzburg, im Januar 2003



Kai Wagner