

Aus der Klinik für Kinder –Onkologie, -Hämatologie und Klinische
Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Arndt Borkhardt

**Evaluation von potentiellen genetischen
Prognoseparametern in Keimzelltumoren bei
Kindern und Jugendlichen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Klaus Pierstorff

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: apl. Prof. Dr. med. Dominik T. Schneider

Korreferent: Prof. Dr. med. Peter Albers

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	II
TABELLENVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
2 MATERIAL UND METHODEN	4
2.1 MATERIAL, GERÄTE UND ZUBEHÖR	4
2.2 METHODEN.....	4
2.2.1 <i>DNA-Gewinnung</i>	4
2.2.2 <i>Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)</i>	5
2.3 STATISTIK: FALL-KONTROLL-STUDIE (MATCHED-PAIR-ANALYSE): AUSWAHLKRITERIEN.....	12
3 ERGEBNISSE	14
3.1 CHROMOSOMALE İMBALANZEN BEI VAGINALEN DOTTERSACKTUMOREN	14
3.2 CGH PROFILE IM RAHMEN DER MATCHED-PAIR PILOTSTUDIE	16
4 DISKUSSION	24
4.1 CGH-PROFILE VAGINALER DOTTERSACKTUMOREN ENTSPRECHEN DOTTERSACKTUMOREN ANDERER LOKALISATION.....	28
4.2 FÜR STATISTISCH RELEVANTE AUSSAGEN IN DER FALL-KONTROLL-STUDIE IST DIE PROBENANZAHL ZU GERING	31
5 LITERATUR	35
6 ANHANG	39

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1: HISTOLOGISCHES KONZEPT DER KEIMZELLTUMOREN NACH TEILUM.....	3
ABBILDUNG 2.1: TYPISCHES BILD EINER DNA-QUALITÄTSKONTROLLE.....	4
ABBILDUNG 2.2: DEUTLICHER ZUGEWINN (AMPLIFIKATION) VON CHROMOSOM 12P12.....	5
ABBILDUNG 2.3: GELBILD NACH NICK-TRANSLATION.....	6
ABBILDUNG 2.4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER NICK-TRANSLATION.....	6
ABBILDUNG 2.5: KONTROLLE NACH ERSTER AMPLIFIKATION.....	8
ABBILDUNG 2.6: KONTROLLE NACH THERMO SEQUENASE MARKIERUNG.....	9
ABBILDUNG 3.1: IDEOGRAMM DER VAGINALEN DOTTERSACKTUMOREN.....	15
ABBILDUNG 3.2: DAS PROFIL DER PATIENTIN V3.....	15
ABBILDUNG 3.3: SAMMELIDEOGRAMM ALLER 17 AUSGEWERTETEN TUMORPROBEN.....	16
ABBILDUNG 3.4: IDEOGRAMM DER 8 TUMOREN VON PATIENTEN 5 JAHRE UND JÜNGER.....	19
ABBILDUNG 3.5: IDEOGRAMM DER 9 TUMOREN VON PATIENTEN 6 JAHRE UND ÄLTER.....	19
ABBILDUNG 3.6: IDEOGRAMM DER 8 TUMOREN VON PATIENTEN IN ANHALTENDER ERSTREMISSION.....	20
ABBILDUNG 3.7: IDEOGRAMM DER 9 TUMOREN VON PATIENTEN, BEI DENEN EIN REZIDIV GEFUNDEN WURDE.....	20
ABBILDUNG 3.8: IDEOGRAMM DER 8 TUMOREN, NACH CHEMOTHERAPIE IN ANHALTENDER ERSTREMISSION.....	21
ABBILDUNG 3.9: IDEOGRAMM DER 5 TUMOREN, DIE NACH CHEMOTHERAPIE REZIDIERT SIND.....	21
ABBILDUNG 3.10: IDEOGRAMM DER 5 TUMOREN VON PATIENTEN ≤ 5 JAHRE IN ANHALTENDER ERSTREMISSION.....	22
ABBILDUNG 3.11: IDEOGRAMM DER 3 TUMOREN VON PATIENTEN ≤ 5 JAHRE MIT BEKANNTEM REZIDIV.....	22
ABBILDUNG 3.12: IDEOGRAMM DER 3 TUMOREN VON PATIENTEN > 5 JAHRE IN ANHALTENDER ERSTREMISSION.....	23
ABBILDUNG 3.13: IDEOGRAMM DER 6 TUMOREN VON PATIENTEN > 5 JAHRE MIT BEKANNTEM REZIDIV.....	23
ABBILDUNG 4.1: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER KEIMZELLTUMOREN VERSCHIEDENER LOKALISATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER.....	25
ABBILDUNG 4.2: CHROMOSOMALE IMBALANZEN IN KEIMZELLTUMOREN VERSCHIEDENER LOKALISATIONEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER.....	26

Tabellenverzeichnis

TABELLE 3.1: ZUGEWINNE UND VERLUSTE DER TUMORPROBEN V1 – V9.....	14
TABELLE 3.2: DARSTELLUNG ALLER CGH - ERGEBNISSE SORTIERT NACH ALTER, LOKALISATION UND OUTCOME	18
TABELLE 4.1: REZIDIVE BEI 197 PATIENTEN MIT EXTRAGONADALEN UND EXTRAKRANIALEN KEIMZELLTUMOREN DER MAKEI THERAPIEOPTIMIERUNGSSTUDIEN.....	25
TABELLE 7.1: DNA-ISOLATION	39
TABELLE 7.2: AGAROSE-GEL	39
TABELLE 7.3: CGH.....	39
TABELLE 7.4: PRIMER-LIGATION CGH.....	40
TABELLE 7.5: ULS-CGH.....	40
TABELLE 7.6: GERÄTE UND ZUBEHÖR	41

1 Einleitung

Die Tumorforschung allgemein und auch die pädiatrische Tumorforschung haben neben der Erforschung der Tumorentstehung und -entwicklung zum Ziel, prognostisch relevante Variablen zu evaluieren. Die Beurteilung der Prognose bereits bei Diagnosestellung ist einerseits wichtig für die Patienten und deren Eltern, andererseits aber auch ein wichtiger Faktor in der Planung der Behandlung im Rahmen risikoadaptierter Therapiestrategien. Bekannte prognostisch relevante Faktoren sind klinische Parameter wie z.B. die Höhe von Tumormarkern oder klinisch-pathologische Befunde wie die Tumorlokalisierung, Tumorstadium, Artdiagnose sowie histopathologische Befunde wie Differenzierungsgrad, Mitoserate und immunhistochemische Marker. Begleitende und weiterführende molekularbiologische Untersuchungen finden dabei eine zunehmende Bedeutung. Die molekularbiologische Forschung hat zum einen das Wissen um die Tumorbiologie erhöht, zum anderen aber auch die Diagnostik verbessert, eine feinere Klassifikation von Tumoren ermöglicht und letzten Endes auch zur Entdeckung prognostisch relevanter genetischer Veränderungen geführt. Ein klassisches Beispiel ist die Amplifikation des *MYCN* Onkogens bei Neuroblastomen, die mit einer ungünstigen Prognose korreliert und daher zur Therapiestratifizierung eingesetzt wird (Schwab et al. 1996; Bauer et al. 2001). Im Kindesalter auftretende Tumoren imitieren häufig unreife histologische Strukturen der Embryonalentwicklung und weisen molekularbiologisch Genexpressionsmuster auf, die auch aus dieser frühen Phase der Organogenese stammen. Dieser Beobachtung wird Rechnung getragen, indem diese Tumoren häufig als Blastome bezeichnet und als embryonale Tumoren zusammengefasst werden.

Der Zeitpunkt der Entstehung (Tumorinitiation) der embryonalen Tumoren, auch der Keimzelltumoren wird in der frühen Schwangerschaft zur Zeit der Organentwicklung vermutet im Sinne einer Störung in der Anlage und Differenzierung der Organe. Diese Hypothese wird durch die Assoziation der Tumoren mit Fehlbildungssyndromen gestützt. So besteht eine Assoziation von Neuroblastomen mit dem Wiedemann-Bewckwith Syndrom (Feinberg, 2004) oder anderen Syndromen, die auf Mutationen im *WT-1* Gen beruhen (Schumacher et al. 1997). Keimzelltumoren des Ovars sind mit Störungen der

Gonadenentwicklung assoziiert, zum Beispiel mit dem Turnersyndrom oder einer testikulären Feminisierung (Swyer-Syndrom) (Amarose et al. 1977). Das Klinefelter Syndrom ist mit einem erhöhten Risiko mediastinaler Keimzelltumoren assoziiert (Nichols et al. 1987).

Genetische Veränderungen in embryonalen Tumoren können charakteristisch und damit diagnostisch wichtig sein, es gibt aber auch andere Veränderungen, die bei verschiedenen Tumorentitäten gefunden werden, die gemeinsamen Evolutionsschritten der Tumorprogression entsprechen, wie die Deletion am kurzen Arm von Chromosom 1 (Brodeur, 1995; Zahn et al. 2006).

In der Gruppe der embryonalen Tumoren stellen die Keimzelltumoren eine besondere, weil seltene, und sehr heterogene Gruppe dar. Die Inzidenz maligner Keimzelltumoren in Deutschland beträgt 0,6 von 100.000 Kindern (Göbel et al. 2000). Die häufigsten Lokalisationen von Keimzelltumoren bei unter 15-jährigen sind die Ovarien (26%), die Steißbeinregion (24%), die Hoden (18%) und das zentrale Nervensystem (18%). Seltener sind das Mediastinum, der Retroperitonealraum (jeweils 4%) und die Vagina (2%) betroffen (Göbel et al. 2000; Schneider et al. 2004b). Entsprechend des holistischen Konzepts der Histogenese der Keimzelltumoren wird angenommen, dass diese Tumoren ihren Ursprung von einer totipotenten primordialen Keimzelle nehmen. Diese kann entweder in den Gonaden oder nach fehlerhafter Migration an extragonadalen Lokalisationen maligne entarten.

Die Keimzelltumoren werden entsprechend WHO klassifiziert. Das Germinom entspricht Tumoren mit Differenzierung des Keimepithels; im Hoden wird es als Seminom, im Ovar als Dysgerminom bezeichnet. Bei somatischer Differenzierung werden das Embryonale Karzinom, das Choriokarzinom, der Dottersacktumor und das mature und das immature Teratom unterschieden. Entsprechend der Totipotenz der Ursprungszelle kommen besonders bei Kindern gehäuft Mischtumoren vor, die verschiedene histologische Untertypen enthalten.

Zu beachten ist, dass die Keimzelltumoren bei Säuglingen und Kleinkindern epidemiologisch, histologisch und biologisch von den wesentlich häufigeren Keimzelltumoren Erwachsener zu differenzieren sind. Im Kindesalter überwiegen die extragonadalen Tumoren, ausschließlich als Teratom und Dottersacktumor. Erst nach Einsetzen der Pubertät überwiegen die gonadalen Tumoren. Hier werden klinisch die seminomatösen von den nichtseminomatösen Tumoren, die

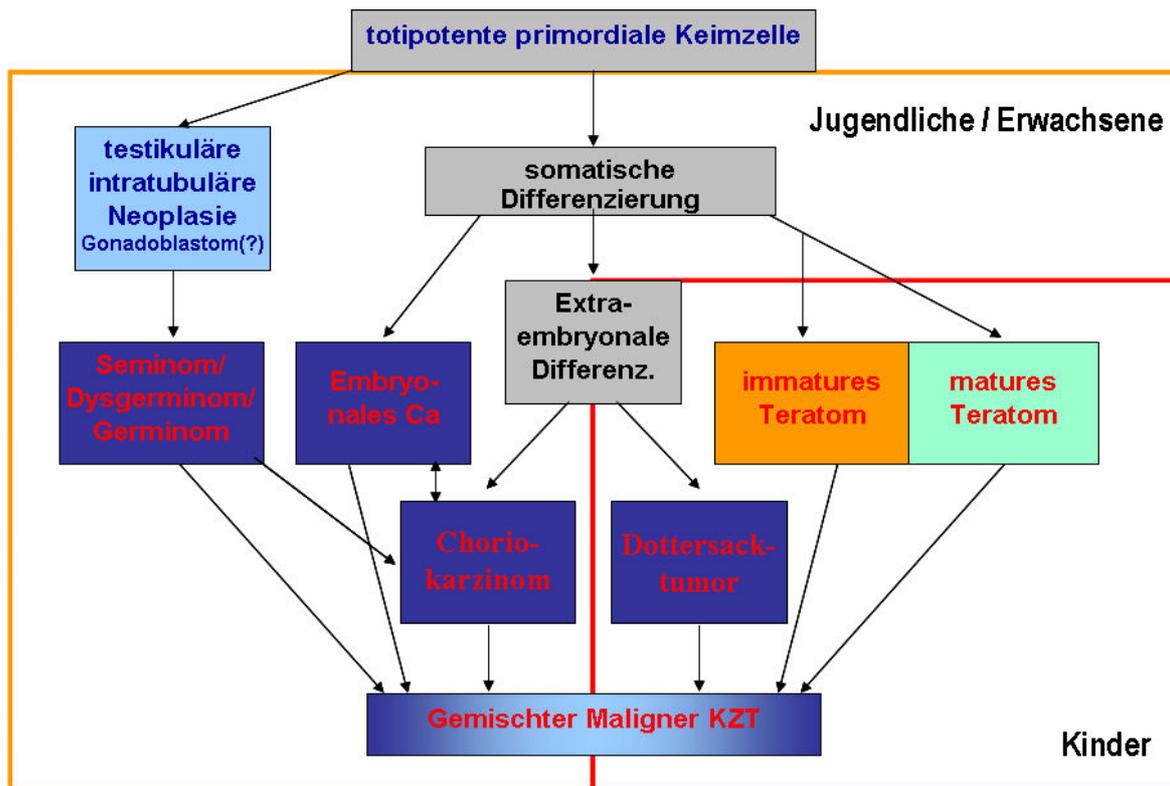


Abbildung 1.1: Histologisches Konzept der Keimzelltumoren nach Teilum

alle oben dargestellten histologischen Differenzierungsformen enthalten können unterschieden. Die ungefähre Altersverteilung und histologische Differenzierung ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist es, mittels einer molekularbiologischen Charakterisierung von Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter durch comparative genomische Hybridisierung (CGH) genetische Parameter auf ihre potentielle prognostische Relevanz zu prüfen. Dabei wird die prognostisch besonders günstige Gruppe der vaginalen Dottersacktumoren gesondert betrachtet. Darüber hinaus werden maligne Keimzelltumoren der verschiedenen Altersgruppen in einer Fall-Kontrollstudie evaluiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material, Geräte und Zubehör

Siehe Tabellen 7.1 – 7.6 im Anhang

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Gewinnung

Für die Untersuchung wurden archivierte formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Tumorstücken eingesetzt. Das Tumorgewebe wurde in fünf 10 µm dicken Schnitten von formalinfixierten Paraffinblöcken in einem 1,5 µl Eppendorf-Cap gesammelt. Die Entparaffinisierung und Rehydrierung des Gewebes erfolgte mit Xylol, einer absteigenden Ethanolreihe und destilliertem H₂O. Darauf folgte eine dreitägige Proteinase K - Digestion, wobei das entparaffinisierte Gewebepelett in 500 µl TE-9, 50 µl 20% SDS und 50 µl Proteinase K (20 mg/ml) gelöst wurde. Nach 24 h Reaktionszeit wurde das Material einmal bezüglich des Fortschrittes der enzymatischen Gewebezersetzung begutachtet. Bei noch gut sichtbaren Flocken wurden der Suspension noch mal 5-20 µl Proteinase K hinzugefügt. Nach drei Tagen folgte die Phenol-Chloroform Extraktion. In drei Schritten wurden mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und reinem Chloroform Proteine durch Denaturierung und Einlagerung in die Inter- und die organische Phase von der DNA getrennt, die sich in der wässrigen Phase sammelte. Dem schloss sich die Alkohol-Präzipitation mit 3M NaAc pH 5,2 bei -80°C für 30 min und 20 min Zentrifugation bei 13.000 rpm an. Nach zweimaligem Waschen mit 70%igem EtOH wurde das entstandene Pelett in 20 µl Lo-TE aufgenommen und bei 37°C über Nacht gelöst. Die Qualitätskontrolle geschah mittels Agarose-Gelelektrophorese, die Konzentrationsmessung mittels UV-Spektroskopie. Im

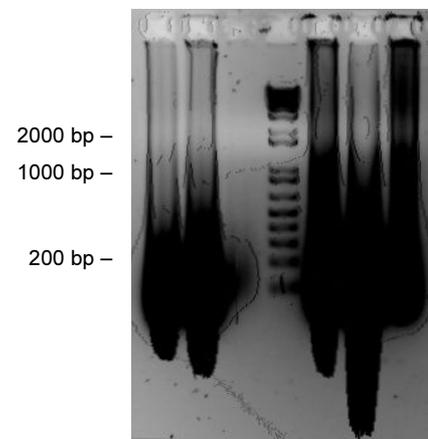


Abbildung 2.1: typisches Bild einer DNA-Qualitätskontrolle, Referenz (mittig): 1 Kb Plus DNA Ladder

Anschluss wurden noch verunreinigte Proben nach dem Protokoll „Cleanup of Genomic DNA“ aus dem QIAGEN QIAmp DNA Micro Kit gereinigt.

2.2.2 Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Um Zugewinne oder Verluste chromosomaler DNA im gesamten Tumorgenom sichtbar zu machen, hat sich die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) insbesondere bei in Paraffin archivierten Proben als Screening-Methode bewährt (Kallioniemi et al. 1992).

Die Proben-DNA wurde durch Nick-Translation, ULS oder Primer-Ligations-PCR mit grün (FITC) fluoreszierenden dUTP's markiert. Diese wurde anschließend mit einer Referenz-DNA aus männlicher Tonsille, die auf gleichem Wege rot (Texas Red) markiert wurde, gemischt und mit cot-1 DNA gefällt. Danach wurde die Probe auf einen Objektträger mit Metaphasepräparaten unauffälliger Lymphozyten hybridisiert. Nach der Hybridisierung, einer Gegenfärbung mit blau (DAPI) zur Erleichterung der Karyotypisierung, erfolgte die Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop mit entsprechenden Filtern, hochauflösender Kamera, angeschlossenem PC und dem

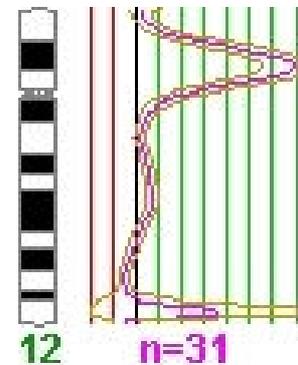


Abbildung 2.2: deutlicher Zugewinn (Amplifikation) von Chromosom 12p12

Programm Cytovision der Firma Applied Imaging. Durch dieses Programm werden die Fluoreszenzintensitäten für Probe (Grün) und Kontrolle (Rot) nach Normalisierung gegen die Gesamt-Fluoreszenzintensität pro Metaphase kalkuliert und gegeneinander in Relation gesetzt. Auf diese Weise wird nach manueller Karyotypisierung der DAPI gefärbten Chromosomen die Fluoreszenzratio für spezifische Chromosomenabschnitte ermittelt, so dass chromosomale Zugewinne und Verluste erkennbar werden (Abbildung 2.2).

Weil für eine gute Hybridisierung die Länge der DNA-Fragmente zwischen 200 und 1000 bp liegen sollte, manche Proben aber schon nach der Isolation keine ausreichend hochmolekulare DNA mehr enthielten, wurden je nach Bedarf verschiedene Markierungstechniken eingesetzt. Die einzelnen experimentellen Teilschritte werden daher im Folgenden detailliert dargestellt.

2.2.2.1 Markierungsmethoden

2.2.2.1.1 Nick-Translation

In der Nick-Translation werden die DNA-Fragmente durch eine DNase an statistisch verteilten Stellen unterbrochen. An diesen Strangbrüchen, den „nicks“, werden dann durch eine Polymerase farblich fluoreszierende dUTP's eingebaut. Bei der Proben-DNA war dieser Farbstoff FITC, bei der Referenz-DNA Texas-Red.

Die optimale Temperatur für diese Reaktion liegt bei 15°C, abgestoppt wird sie durch die Denaturierung der Enzyme bei 70°C für 10 min.

Ausreichend hochmolekulare DNA wurde durch Nick-Translation nach dem Protokoll von (Riopel et al. 1998; Perlman et al. 2000; Schneider et al. 2002) markiert. 2000-3000 ng Proben-DNA wurden mit 5 µl A4-Mix, 1 µl „Spectrum Green“ und dH₂O ad 43 µl lichtgeschützt und auf Eis zusammenpipettiert. Als letztes wurden 6 µl

DNase I/Polymerase I + 1µl Polymerase I, als Mastermix vorbereitet, zugefügt und sofort bei 15°C die Reaktion gestartet. Die Reaktionszeit wurde in Abhängigkeit

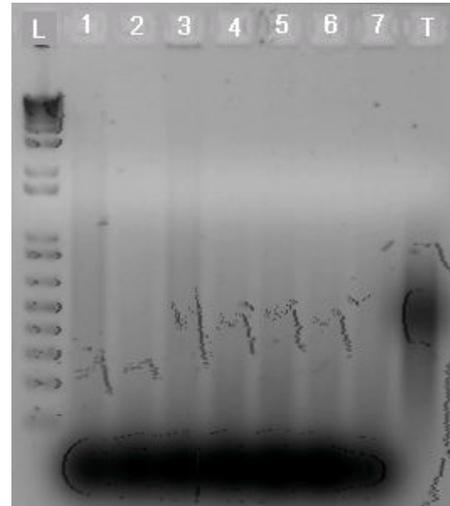


Abbildung 2.3: Bild einer Agarosegelelektrophorese nach Nick-Translation, bei den Proben 1 und 3 wurde die Reaktionszeit verlängert.

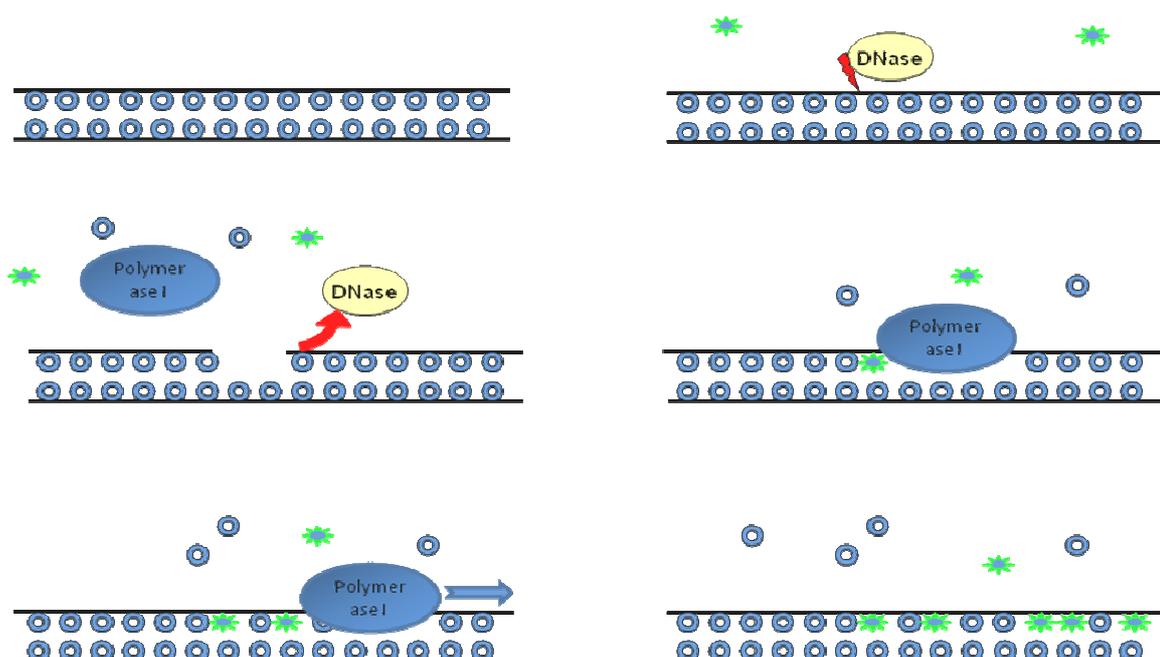


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Nick-Translation

von der mittels Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzten Menge und Länge der gewonnenen DNA gewählt, wobei das Minimum, um noch auswertbare Ergebnisse zu erzielen, 12 min war. Die Referenz-DNA, gewonnen aus einer Tonsille eines männlichen Patienten wurde entsprechend behandelt: Pro Ansatz waren es hier 3500 ng DNA, 2,5 µl A4-Mix, 0,5 µl „Spectrum Red“ und dH₂O ad 18 µl. Nach dem Zufügen von ebenfalls 6 µl DNase I/Polymerase I und 1 µl Polymerase I wurde die Referenz-DNA im ersten Durchgang eine Stunde lang „genickt“.

Gestoppt wurde die Nick-Translation bei 70°C über 10 min. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gelegt. Nach einem kurzen Abzentrifugieren wurden 5 µl Probe mit 3 µl Agarose-Laufpuffer (ALP) gemischt und mit der 1 Kb Plus DNA Ladder von Invitrogen auf ein 1,4% Agarose-Gel aufgetragen. Nach 25 min Elektrophorese bei 90 mV wurde die Fragmentlänge der DNA beurteilt. Angestrebt wurden 200-1000 bp. Bei Bedarf wurde die Nick-Translation mit neuem Enzymmix für eine kürzere Zeit neu gestartet. Die Reaktion wurde so lange wiederholt, bis die Fragmente die gewünschte Länge hatten, wobei das Ziel war, möglichst wenig neu zu inkubieren, da jedes Hinzufügen von Enzymen die DNA verdünnte.

2.2.2.1.2 ULS

Das „Universal Linkage System“ (ULS) wurde 1999 von Alers aus Rotterdam als Markierungsmethode Formalin-fixierter, in Paraffin eingebetteter DNA etabliert (Alers et al. 1999). Bei dieser Technik sind die Fluoreszenz-Marker an einen Platin-Komplex gebunden, der sich wiederum an die N7-Position von den Purinen der DNA bindet. So kommt es also nicht zu Verkürzungen der Fragmentlängen.

Da die Markierungsreaktion die DNA in Bezug auf die Länge nicht beeinflusst, wurden Proben mit Fragmentlängen über 1000 bp und die Referenz-DNA zuerst mit einer 1:5000 verdünnten DNase verdaut. Dafür wurden 8000 ng DNA mit 2 µl NP DNase Puffer, 6 µl DNase 1:5000 und dH₂O ad 20 µl bei 37°C verdaut. Die Zeit wurde nach Fragmentlänge gewählt, jedoch nicht länger als 5 min. Kontrolliert wurde der Erfolg durch Gelelektrophorese auf einem 1,4%igem Agarose-Gel mit 2 µl DNA und 2 µl ALP. Bei Fragmentlängen von 200 - 1000 bp wurde die DNA mit dem Qiagen Dye Ex Spin Kit aufgereinigt, in 30 µl EB eluiert und durch UV-Spektrometrie die Konzentration gemessen.

Für die Markierungsreaktion wurden 1000 ng DNA mit 2 µl grün, „PlatinumBright 495“ oder Cy3-ULS (Probe), oder rot, „Cy5-ULS“ (Referenz) und labelling solution

ad 20 µl 15 min bei 65°C inkubiert. Zu beachten war hier generell, dass das Verhältnis ULS zu DNA 1 U: 1 µg, bzw. 2 µl: 1 µg betragen sollte, in den 20 µl Reaktionsvolumen minimal 100 ng und maximal 10 µg DNA enthalten waren, und damit die gelöste Proben-DNA eine Mindestkonzentration von 5 ng/µl haben sollte. Das Abstoppen der Reaktion geschah durch Zufügen von PB-Puffer mit dem fünffachen Volumen des Ausgangsvolumens. Es schloss sich wieder eine Qiagen-Reinigung an, bei der die Elution in 45 µl EB vorgenommen wurde.

2.2.2.1.3 *Primer-Ligation PCR*

Die Primer-Ligation PCR wurde 1999 für den Einsatz bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und CGH etabliert (Klein et al. 1999), um CGH-Profile von einzelnen Zellen erstellen zu können. Die Methode eignet sich letztlich zur Beurteilung kleinster DNA Mengen. Das Protokoll wurde von der Arbeitsgruppe in Düsseldorf entsprechend modifiziert und optimiert.

Die DNA wird nach einer Digestion durch das Restriktionsenzym MseI mit einem MseLig-21 Primer amplifiziert und in einer zweiten PCR durch Thermo-Sequenase mit dUTP Spectrum Green oder Spectrum Red markiert, wobei wieder der Primer MseLig-21 eingesetzt wird.

Der Ansatz für den MseI-Verdau bestand aus 4 ng DNA, in 2 µl EB-Puffer gelöst, 0,5 µl „10 x buffer One-Phor-All-Plus“, 1 µl MseI (10 U/µl) und 1,5 µl HPLC. Nach drei Stunden in einem Cycler oder Wasserbad bei 37°C wurde das Restriktionsenzym nach Hinzufügen von je 0,5 µl 100 µM MseLig-21 und -12 Primern, 0,5 µl 10 x buffer „One-Phor-All-Plus“ und 1,5 µl HPLC in einem Biometra-Cycler inaktiviert, und gleichzeitig die Annealing-Reaktion gestartet, wobei der Cycler, bei 65°C startend, in Schritten von 1°C/min auf 15°C herunter kühlte. Sobald die 15°C erreicht waren, wurden je 1 µl 10mM ATP und T4-DNA-Ligase (5U/µl) zugegeben. Die Ligation lief über Nacht bei 15°C.

Zur ersten Amplifikation wurden die 10 µl umfassende Ligation in ein 0,2 ml PCR-Tube umgefüllt und mit 3 µl „High fidelity Puffer“, 2 µl 10mM dNTP's und 35,25 µl HPLC vermengt. Um den MseLig-12 Primer von seinen Bindungsstellen zu lösen, begann der erste PCR-Zyklus mit 4 min 68°C. Dann erst wurde bei konstanter Temperatur innerhalb kürzester Zeit 1 µl high fidelity Polymerase hinzugegeben

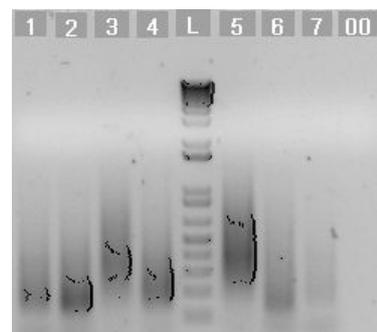


Abbildung 2.3: Kontrolle nach erster Amplifikation.

und die 3 minütige Fill-in Reaktion bei 68°C gestartet. Es folgten 10 Zyklen 94°C 40 sec, 57°C 30 sec, 68°C 75 sec und 20 Zyklen 94°C 40 sec, 57°C 30 sec, 68°C 105 sec. Die PCR wurde gestoppt bei 78°C über 5 min, wonach sich der ABI Cycler auf 4°C abkühlte und die Temperatur hielt. Im Anschluss wurden 5 µl der DNA mit 3 µl ALP auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Hier wurden Fragmentlängen von 300 – 500 bp angestrebt.

In der anschließenden Thermo Sequenase Markierung wurde 1 µl des Produktes aus der ersten Amplifikation mit 0,5 µl MseLig-21 Primer (100 µM), 1 µl dNTP-Mix (10 mM A, C, G; 8,6 mM T), 1,3 µl dUTP Spectrum Green (1 mM) bzw. Spectrum Red (0,1 mM), 3 µl 10 x Thermo Sequenase buffer, 0,4 µl Thermo Sequenase (13U) und 22,7 µl HPLC angesetzt. Der ABI-Cycler wurde programmiert auf 94°C für 1min, 15 Zyklen 94°C 40 sec, 65°C 30 sec und 72°C 90 sec und 9 Zyklen 94°C 40 sec, 65°C 30 sec und 72°C 120 sec. Die Reaktion wurde bei 72°C über 5 min beendet. Mit 10U MseI wurden anschließend bei 37°C über 2 Stunden die Primer entfernt, und mit dem Dye Ex Spin Kit von Qiagen die markierte DNA aufgereinigt. Die Kontrolle wurde wieder durch eine Gelelektrophorese auf einem 1,5%igem Agarose-Gel durchgeführt. Wenn die Banden jetzt im Gelbild deutlich sichtbar waren, konnte die DNA für die Hybridisierung gefällt werden. DNA mit Fragmentlängen über 500 bp wurde vorher noch mit 1/5000 verdünnter DNase (2 µl) je nach Länge 3 - 5 min lang bei 37°C verdaut, bis die gewünschte Länge erreicht war.

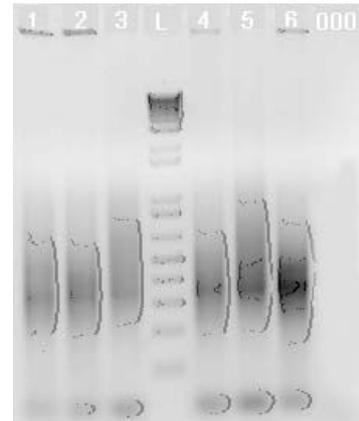


Abbildung 2.4: Kontrolle nach Thermo Sequenase Markierung

2.2.2.2 Ko-Präzipitation

Die Ausfällung der markierten DNA geschah bei allen Markierungsmethoden auf die gleiche Art. Referenz- und Proben-DNA wurden isomolar je 1000 ng mit dem 25-fachen an cot-1 DNA vermengt und dann mit einem Zehntelvolumen 3 molaren Natriumacetats pH 5,2 des bisherigen Volumens und dem 2,5 fachen Volumen eiskalten 100% Ethanols des anschließenden Volumens gefällt, indem die Ansätze 1 Stunde bei -80°C gelagert und danach 1 Stunde bei 4°C mit 13000 rpm zentrifugiert wurden. Der verbleibende Überstand wurde vorsichtig abgegossen, das Pellet 2 Mal mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, jeweils 5 min

abzentrifugiert und, nach Trocknung unter Lichtschutz bei 37°C, in 15µl MMI mindestens 1 ½ Stunden bei 37°C resuspendiert.

2.2.2.3 Hybridisierung

Hybridisiert wurde die DNA auf Objektträger der Firma Vysis mit Metaphasen unauffälliger männlicher Lymphozyten.

Begonnen wurde mit der 10 minütigen Denaturierung der Test- und Referenz-DNA bei 75°C, worauf das Preannealing zur Absättigung hochrepetitiver Sequenzen bei 37°C über 30 min folgte. Die Objektträger tauten 3 min auf und wurden dann nach 5 min in 2xSSC auf dem Schüttler 5 min bei 72°C in einer Formamidlösung denaturiert. Die Formamidlösung bestand aus 35 ml Formamid, 5 ml 20xSSC 8ml dH₂O, mit 1 M HCl titriert auf pH7 und dH₂O ad 50 ml. Wenn mehr als 2 Objektträger gleichzeitig denaturiert wurden, musste die Temperatur pro Präparat um 0,5°C erhöht werden. Die anschließende Dehydrierung erfolgte in einer eiskalten, aufsteigenden Ethanolreihe (70% - 90% - 100%) je 3 Minuten auf dem Schüttler. Nach Trocknen und Beschriften der Metaphasepräparate wurden die 15 µl Probe aufgetragen und luftblasenfrei je ein kleines Deckgläschen aufgelegt, dessen Ränder mit Fixogum abgedichtet wurden, um ein Vermischen und Austrocknen der Proben zu verhindern. In einer feuchten Kammer inkubierten die Präparate bei 37°C über 3 Nächte.

Am vierten Tag folgte die Stringenzwaschung, die nach vorsichtigem Entfernen des Fixogums, 1-2 min in 2xSSC auf dem Schüttler und vorsichtigem Abschieben der Deckgläschen in einer 2xSSC Reihe je 5 min 70°C ohne Schütteln, 37°C und Raumtemperatur mit Schütteln durchgeführt wurde. Die abschließende DAPI-Gegenfärbung war nach 30 min in einer DAPI-Färbelösung aus 5 µl DAPI und 50 ml 2xSSC abgeschlossen. Die Objektträger wurden noch dreimal mit dH₂O gespült, luftgetrocknet, mit Citifluor und einem großen Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckt und konnten dann, fertig für die Mikroskopie, bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.2.4 Auswertung

Die Proben wurden an einem Epifluoreszenzmikroskop von Zeiss mit einer hochauflösenden Kamera und angeschlossenem PC mit Hilfe der Soft- und Hardware für „high resolution“ CGH von Cytovision Inc. (Ness et al. 2002) fotografiert und ausgewertet. Jede Metaphase wurde mit einem FITC, einem

Texas Red und einem DAPI Filter aufgenommen und manuell anhand der DAPI Gegenfärbung karyotypisiert. Von jedem Fall wurden mindestens 15 Metaphasen ausgewertet, so dass nach Aussortieren überlagerter Chromosomen im Schnitt aus 25 (15 - 36) autosomalen, bzw. 13 (9 – 17) gonosomalen Chromosomen das jeweilige Profil errechnet wurde.

Durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz wurde das Rot/Grün-Verhältnis für jede einzelne Metaphase auf 1,0 normalisiert. Das Konfidenzintervall wurde auf 95% festgelegt und mit der dynamischen Standardreferenz verglichen, so dass Aberrationen ab ungefähr 5 Mb sichtbar wurden (Kirchhoff et al. 2001). Laut dieser Veröffentlichung korrespondiert die statistische Signifikanz der Ergebnisse bei dieser Methode mit einem $P < 0,05$. Die Profile wurden letztendlich mit Hilfe von Ideogrammen ausgewertet.

2.3 Statistik: Fall-Kontroll-Studie (Matched-pair-Analyse):

Auswahlkriterien

Für die Analyse der möglichen prognostischen Aussagekraft von spezifischen chromosomalen Imbalanzen wurde der Ansatz einer Fall-Kontroll-Studie (Matched-Pair- Analyse) gewählt. Dabei wird ein Indexpatient immer anhand definierter Kriterien mit einem Kontrollpatienten verglichen.

Bei der Auswahl der Patienten wurden nur maligne Keimzelltumoren berücksichtigt. Zwischen 1982 und 2004 wurden 884 Kinder und Jugendliche mit malignen ovariellen und nongonadalen Keimzelltumoren erfasst. Da in diesem Zeitraum die Therapieoptimierungsstudie für Hodentumoren MAHO noch in München geführt wurde, wurden die entsprechenden testikulären Tumoren nicht berücksichtigt. Tumoren des zentralen Nervensystems wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Erste Voraussetzung für den Einschluss in die Studie war die referenzhistopathologische Beurteilung im pathologischen Kindertumorregister in Kiel, Institut für Paedopathologie; zusätzlich musste noch Tumorgewebe in Form von Paraffinblöckchen zur Verfügung stehen. Dieses sollte zwingend prätherapeutisch gewonnen sein. Somit entfielen alle Patienten, bei denen eine klinische Diagnose aufgrund von Bildgebung und Tumormarkern erfolgt ist. Durch diese Auswahl reduzierte sich die Zahl der begutachteten Proben auf 199 Fälle.

Von allen Patienten wurden die Gewebeschnitte erneut von Professor Dr. D. Schneider histologisch begutachtet, zum Teil in Kooperation mit Professor Dr. Dr. h.c. D. Harms, dem Begründer und langjährigen Leiter des Kieler Kindertumorregisters. Proben mit weniger als 75% vitalem Tumorzellanteil oder in den Gewebeschnitten überwiegenden Teratomanteilen wurden ausgeschlossen.

Unter den 199 begutachteten Proben waren somit 151 Proben für die Fall-Kontroll-Studie geeignet. Unter diesen befanden sich 32 Patienten, die im weiteren Verlauf eine Krankheitsprogression oder ein Rezidiv erlitten haben, sowie 117 Kontrollpatienten, die in anhaltender Remission sind.

Diese wurden – wie zuvor in einer internationalen Konferenz mit den amerikanischen und britischen Arbeitsgruppen abgestimmt – in folgende Untergruppen aufgeteilt:

A: Kleinkinder bis 5 Jahre, Watch-and-Wait Strategie, keine Chemotherapie

B: Kleinkinder bis 5 Jahre, adjuvante Chemotherapie

C: Kinder und Jugendliche ab 6 Jahren, Watch-and-Wait Strategie, keine Chemotherapie

D: Kinder und Jugendliche ab 6 Jahren, adjuvante Chemotherapie

In diesen vier Gruppen erfolgte eine Paarung entsprechend Histologie, Lokalisation und Studienprotokoll (somit Chemotherapie und Behandlungszeitraum/Studiengeneration). Weitere Parameter wie z.B. das Geschlecht wurden nicht berücksichtigt.

Nach Abschluss dieser Paarung wurde die Liste der ausgewählten Proben an das histologische Labor in Kiel gegeben. Dort wurden bei im Block ausreichendem Material pro Fall 10 Schnitte in ein Eppendorf Röhrchen gegeben. Da bei einigen Blöckchen diese schon weitgehend aufgebraucht waren, reduzierte sich die Zahl der eingeschlossenen Proben letztlich auf 23 Patienten (10 Rezidivpatienten, 13 Kontrollpatienten).

Die Röhrchen wurden nachfolgend mit der Kindertumorregister Einsendenummer identifiziert. Somit bestand eine Verblindung für die biologischen Studien. Das heißt, dass eine Rückführung der Nummern zu individuellen Patienten, klinischen und Verlaufsdaten für die Mitarbeiter des Labors bis zum Abschluss der Analysen unmöglich war. Die Entblindung erfolgte durch den Studienleiter (Schneider) nach Abschluss der experimentellen Arbeiten.

3 Ergebnisse

3.1 Chromosomale Imbalanzen bei vaginalen Dottersacktumoren

Die vaginalen Dottersacktumoren sind als prognostisch sehr günstig anzusehen. Daher wurde die Gruppe der vaginalen Dottersacktumoren als klinisch gesonderte Entität mit besonders günstiger Prognose getrennt analysiert und mit Daten vorangegangener Analysen der Arbeitsgruppe verglichen.

In der Gruppe der vaginalen Dottersacktumoren wurde Tumorgewebe von 14 Patientinnen im ersten Lebensjahr untersucht. Die Tumorproben erhielten die Bezeichnung V1 bis V14. Aus den Gewebeschnitten der Proben V10 bis V14 konnten aufgrund von schlechter DNA-Qualität unabhängig vom DNA Markierungsverfahren (Nick-Translation oder ULS) keine auswertbaren Ergebnisse gewonnen werden.

In der Analyse der Tumoren V1 bis V9 fanden sich in allen Tumoren chromosomale Imbalanzen. Pro Tumor wurden im Durchschnitt 6,22 Imbalanzen gefunden bei einer Schwankungsbreite von 3 – 13. Zugewinne zeigten sich häufiger als Verluste, die häufigsten Veränderungen an den Chromosomen 1, 3, 6 und 20.

Einzeln sind die Ergebnisse in Tabelle 3.1 nach Alter aufgelistet und in einem Sammel-Ideogramm in Abbildung 3.1 zusammenfassend dargestellt. Zur Illustration ist in Abbildung 3.2 das CGH-Profil der Probe V3 dargestellt.

Tabelle 3.1: Zugewinne und Verluste der Tumorproben V1 – V9

Alter	Zugewinne	Verluste
<1 Jahr	2, 3p21-pter	1p34.2-pter, 6q21-qter
<1 Jahr	1q, 2p, 3p	16p
<1 Jahr	1q31-qter, 3p, 18p, 18q11-q12, 19p, 20, X	1p32-pter, 4, 5q11-q31, 6q21-qter, 8p22-pter, 22
<1 Jahr	1q, 3p, X	1p35-pter
<1 Jahr	1q31-qter, 3, 5q31-q34, 6q1-q21, 20	1p34.2-pter, 4, 5q11-q23, 6q22-qter, 22
<1 Jahr	1q, 3, 8	-
<1 Jahr	1q, 8q22-qter, 14, 20q	1p35-pter, 16q, 20p
<1 Jahr	2p, 3, 7p, 8, 11q14-qter	6q
<1 Jahr	1q, 2p, 7p, 18p, 20q	-

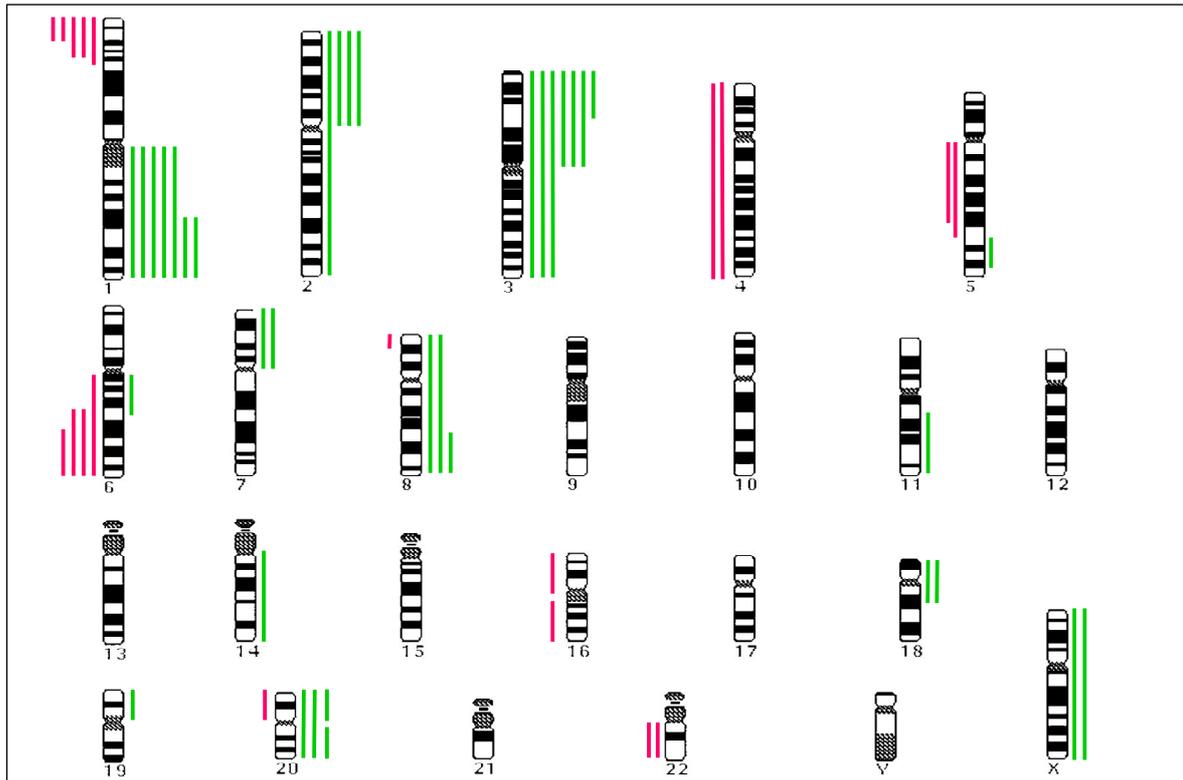


Abbildung 3.1: Ideogramm der vaginalen Dottersacktumoren (grün = Zugewinn, rot = Verlust von DNA im Tumorgewebe)

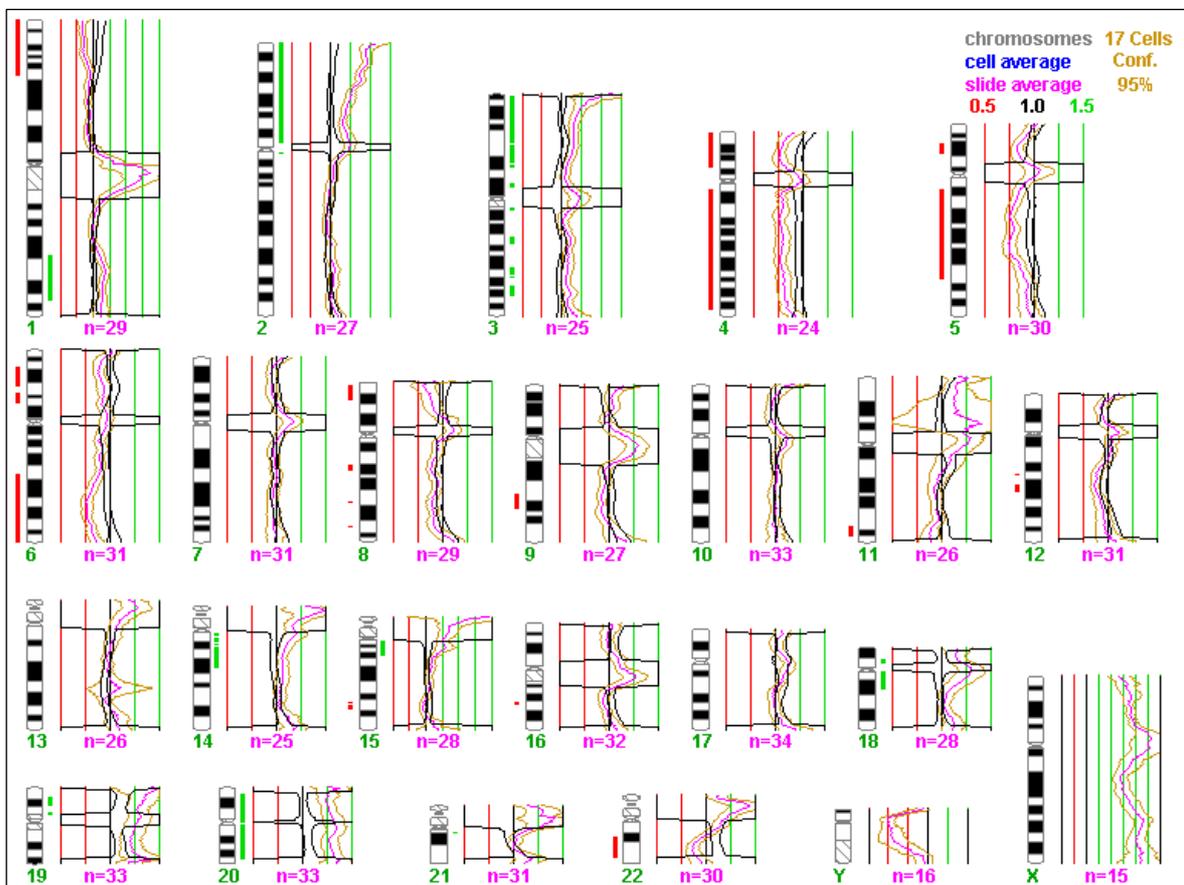


Abbildung 3.2: Das Profil der Patientin V3 zeigt Zugewinne an 1q31-qter, 3p, 18p, 18q11-q12, 19p und 20; Verluste an 1p32-pter, 4, 5q11-31, 6q21-qter, 8p22-pter und 22.

3.2 CGH Profile im Rahmen der Matched-Pair Pilotstudie

Im Rahmen dieser Pilotstudie werden Patienten, die ein Rezidiv erlitten haben, mit solchen in anhaltender Erstremission verglichen. Die Patienten sind anhand klinischer und histologischer Kriterien sowie der Therapie gepaart. In diese Pilotstudie wurden Tumorproben von 23 Patienten eingeschlossen, von denen 17 in der CGH mit genügender Qualität ausgewertet werden konnten. In 15 dieser Proben ließen sich chromosomale Imbalanzen nachweisen. Im Durchschnitt fanden sich 4,64 Imbalanzen pro Tumor bei einer Schwankungsbreite von 0 – 11 Imbalanzen pro Tumor. In Abhängigkeit vom Alter waren unterschiedliche Profile zu erkennen. So zeigten die acht Tumoren der unter fünf Jahre alten Patienten Imbalanzen an den Chromosomen 1, 3, 6 und 20. Die Gruppe der Älteren zeigt vor allem 12p-Zugewinne und ist somit vergleichbar mit testikulären Keimzelltumoren Erwachsener.

Im Folgenden sind alle Ergebnisse der in dieser Studie analysierten Tumorproben in einem Ideogramm (Abbildung 3.3) dargestellt. Anschließend werden diese einzeln in der Tabelle 3.2 nach Alter und Therapie sortiert aufgeführt. In den Abbildungen 3.4 und 3.5 sind die Proben unterteilt in acht unter 6-jährige

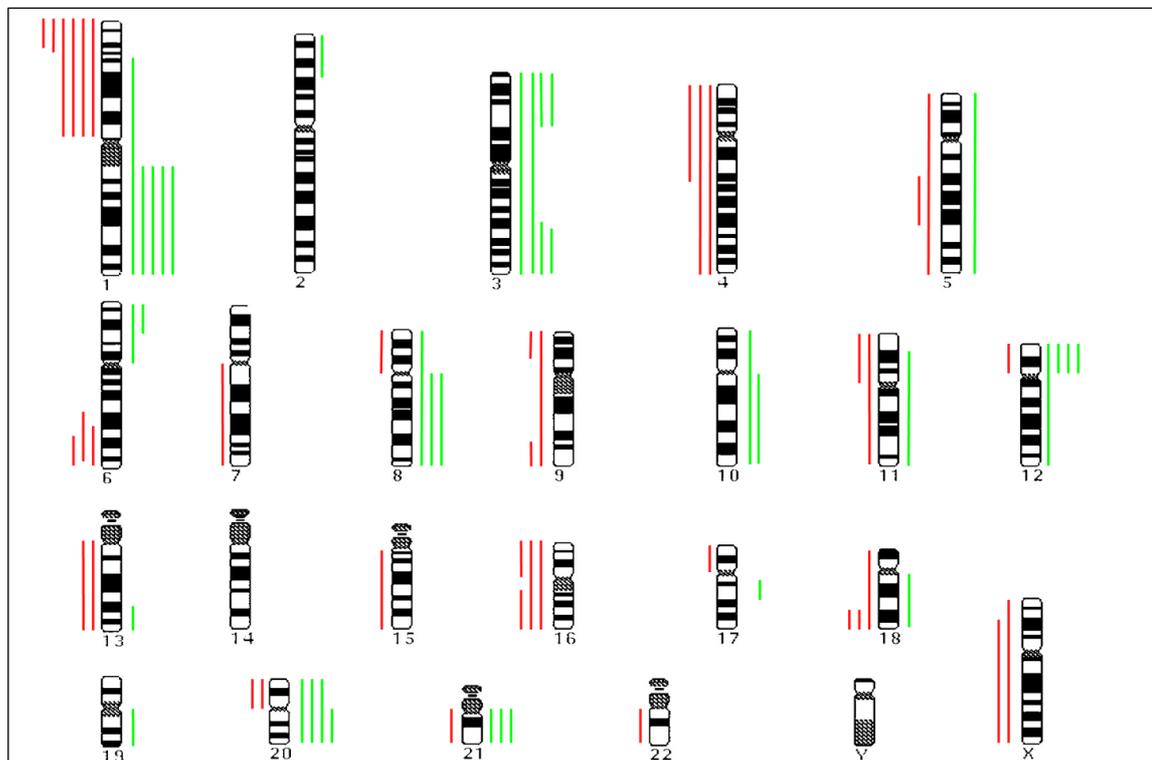


Abbildung 3.3: Sammelideogramm aller 17 ausgewerteten Tumorproben

Patienten und neun 6 Jahre alte und ältere Patienten. Die Abbildungen 3.6 und 3.7 stellen acht nicht rezidierte Tumoren neun Primärtumoren mit konsekutiven Rezidiven gegenüber. 3.8 und 3.9 unterteilen die Gruppe, die Chemotherapie erhalten hat, nach ihrem klinischen Verlauf. In den Abbildungen 3.10 – 3.13 wird das Outcome in Abhängigkeit vom Alter (≤ 5 Jahre Abb. 3.10 und 3.11; > 5 Jahre Abb. 3.12 und 3.13) gegenübergestellt.

Im Vergleich der verschiedenen Gruppen zeigen sich die bekannten altersabhängig unterschiedlichen chromosomalen Imbalancen mit Verlust von 1p und 6q sowie Zugewinn 20 in den Kleinkindern sowie einem Zugewinn 12p in den älteren Patienten. Bei Vergleich der chemotherapeutisch behandelten Kinder mit denen ohne primäre Chemotherapie, somit in geringeren Tumorstadien, zeigen sich bei insgesamt kleineren Gruppen keine erkennbaren Unterschiede. Ebenso unterscheiden sich die Tumoren ohne Folgerezidive nicht erkennbar von denen ohne späteren Rückfall. Auffällig bleibt lediglich die Beschränkung von Zugewinn 3p auf die kleine Gruppe der Tumoren bei Kleinkindern und ohne späteres Rezidiv. Bei den insgesamt kleinen Patientengruppen wurde auf eine statistische Analyse verzichtet.

Tabelle 3.2: Darstellung aller CGH - Ergebnisse sortiert nach Alter, Lokalisation und Outcome. (CCR = komplette Remission, REL = Rezidiv/Relaps, 2.CR = komplette Remission nach Rezidiv, DOD = Tod durch die Tumorerkrankung/ Dead of Disease, YST = Dottersacktumor, NS = Nichtseminom/gemischter maligner Keimzelltumor, DYS = Dysgerminom)

Alter (J)	Lokalisation	Histologie	Outcome	Zugewinne Gains	Verluste Losses
≤ 5 Jahre, watch-and-wait Strategie					
0,5	Steißbein	YST	REL/2.CR	-	-
≤ 5 Jahre, Chemotherapie					
1	Steißbein	YST	CCR	1p11-33, 1q, 3p21-ter, 3q25-ter, 6p, 13q32-ter	1p35-ter, 6q22-26, 20p
1	Steißbein	YST	CCR	2p21-ter, 6p22-ter	1p34.2-ter, 18q22-ter
1	Steißbein	YST	CCR	1q, 3p21-ter, 3q24-ter, 10, 11p11-14, 11q, 20	1p, 4, 6q24-ter, 16q
1	Steißbein	YST	CCR	18q	-
1	Steißbein	YST	Rel/DOD	1q, 20q	1p, 20p
3	Steißbein	YST	CCR	3, 5, 10q	-
3	Steißbein	YST	Rel/DOD	19q, 20	1p, 4p, 4q11-22, 5q14-23, 6q25-ter, 7q, 11p, 18
≥ 6 Jahre, watch-and-wait Strategie					
12	Ovar	NS	REL/2.CR	1q, 8, 21	1p, 4, 9, 11, 13, 15, 16, 22
17	Ovar	DYS	REL/2.CR	-	5
18	Ovar(Streak)	DYS	REL/2.CR	Y	X
≥ 6 Jahre, Chemotherapie					
7	Ovar	NS	CCR	-	13q, 12p
12	Ovar	NS	CCR	-	16p, 21
13	Ovar	NS	CCR	12p	X
13	Ovar	NS	REL/2.CR	8q, 12p	18q22-ter
16	Ovar	NS	Rel/DOD	3, 8q, 12, 20, 21	8p
16	Ovar	NS	Rel/DOD	1q, 12p-Ampl., 17q12-21, 21	9p21-ter, 9q31-34, 16, 17p, Xp11-21, Xq

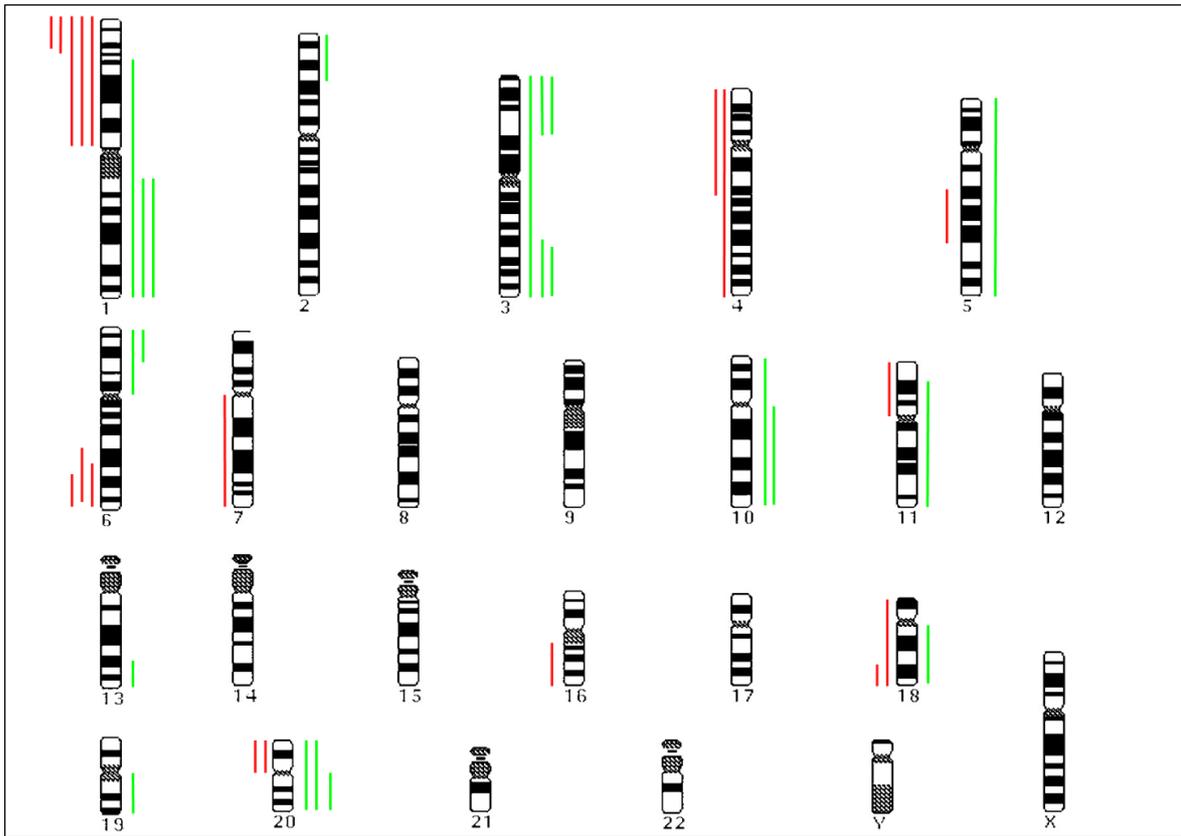


Abbildung 3.4: Ideogramm der 8 Tumoren von Patienten 5 Jahre und jünger

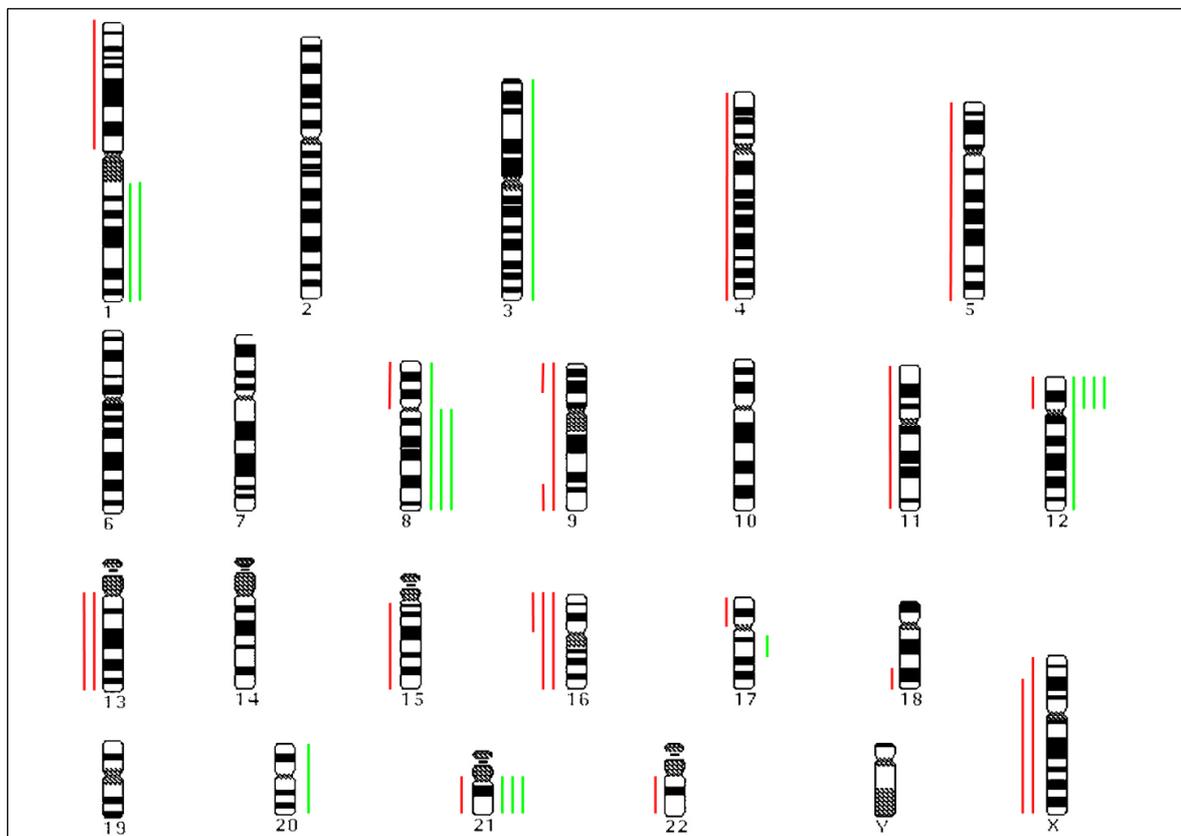


Abbildung 3.5: Ideogramm der 9 Tumoren von Patienten 6 Jahre und älter

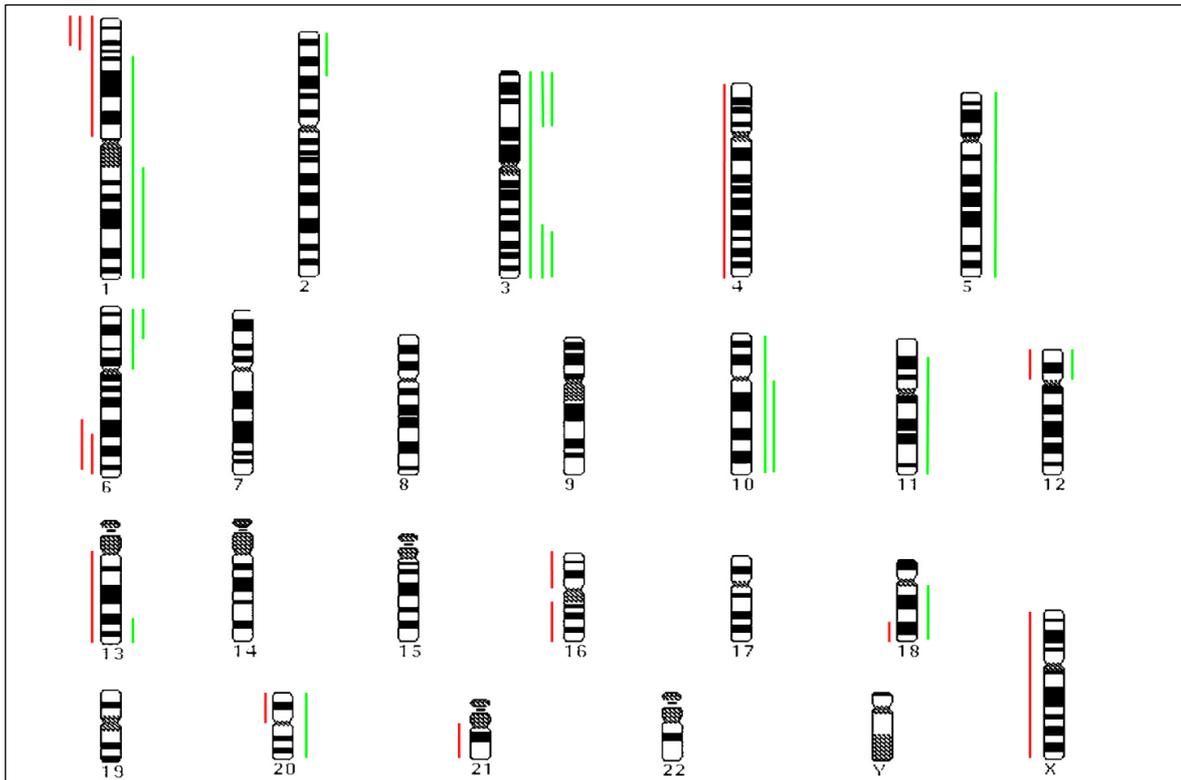


Abbildung 3.6: Ideogramm der 8 Tumoren von Patienten in anhaltender Erstremission

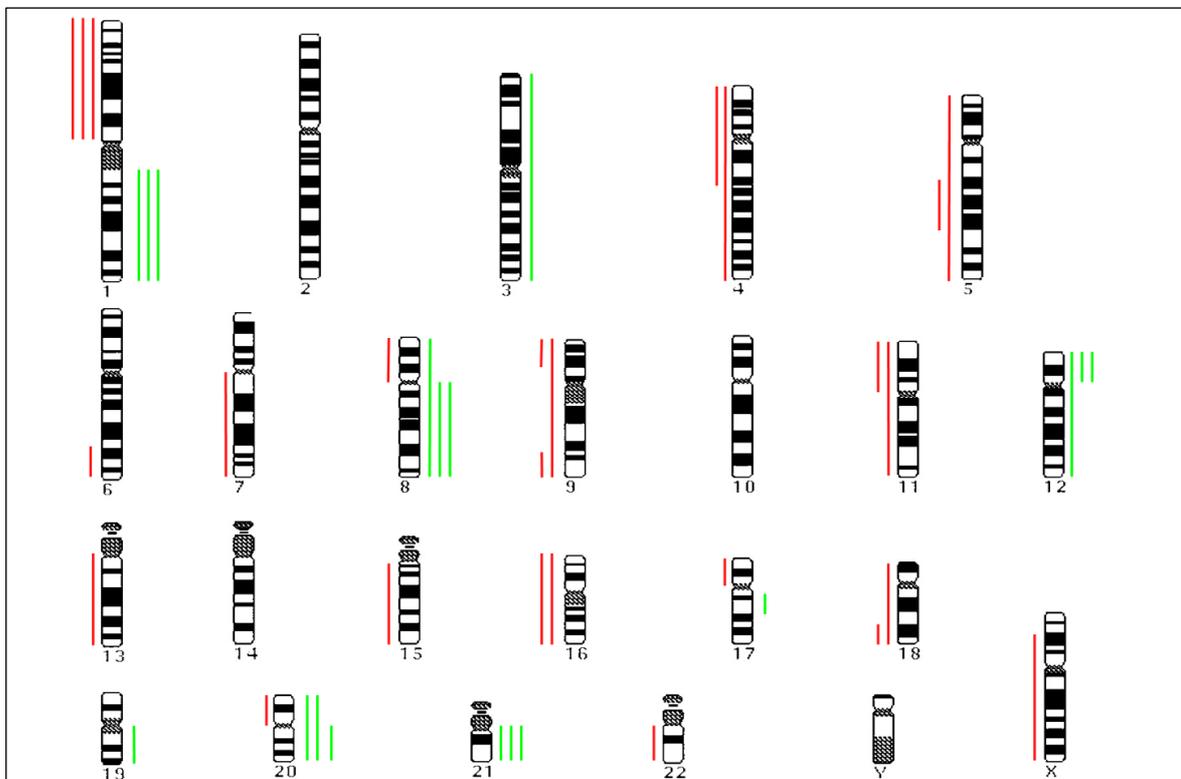


Abbildung 3.7: Ideogramm der 9 Tumoren von Patienten mit konsekutivem Rezidiv

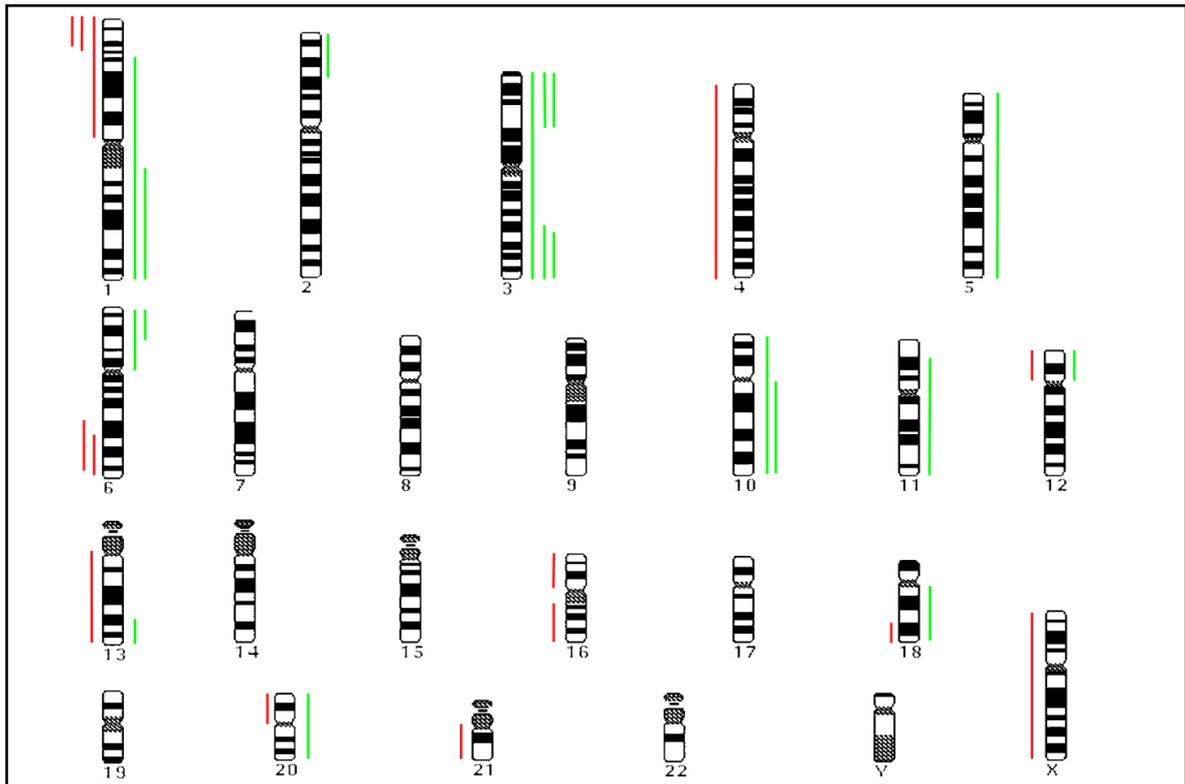


Abbildung 3.8: Ideogramm der 8 Tumoren, nach Chemotherapie in anhaltender Erstremission

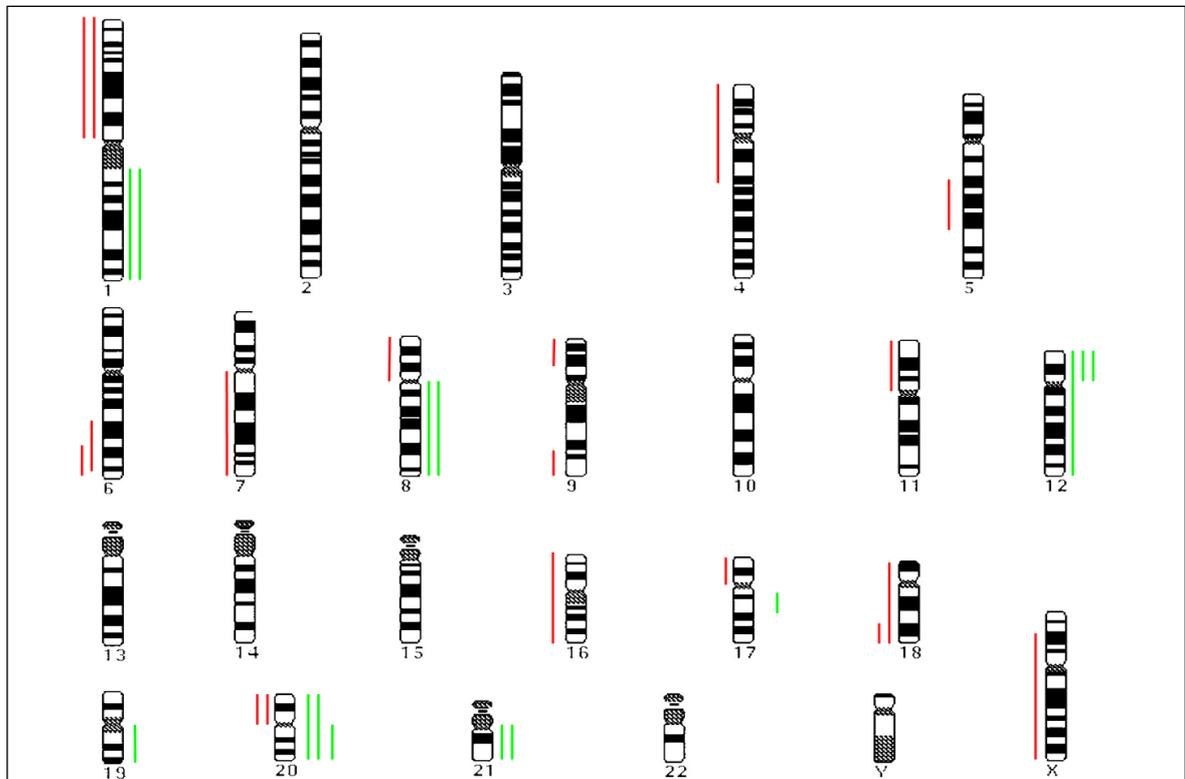


Abbildung 3.9: Ideogramm der 5 Tumoren, die nach Chemotherapie rezidiert sind

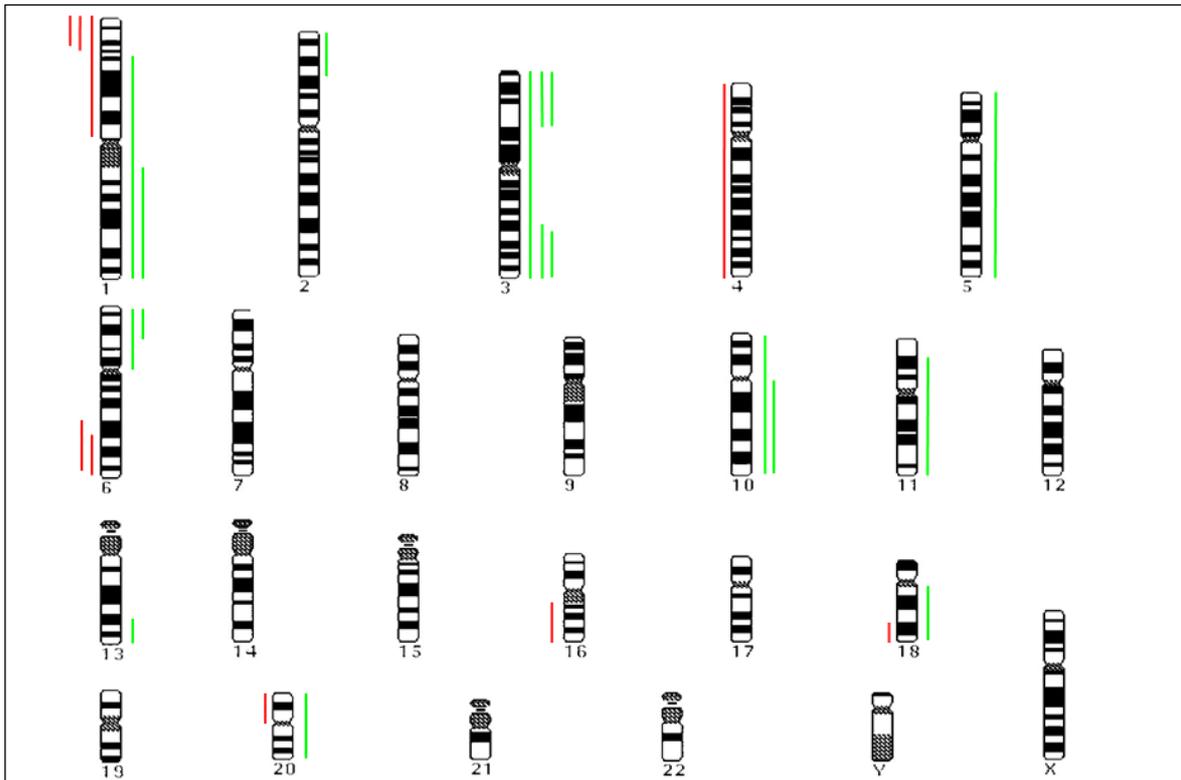


Abbildung 3.10: Ideogramm der 5 Tumoren von Patienten ≤5 Jahre in anhaltender Erstremission

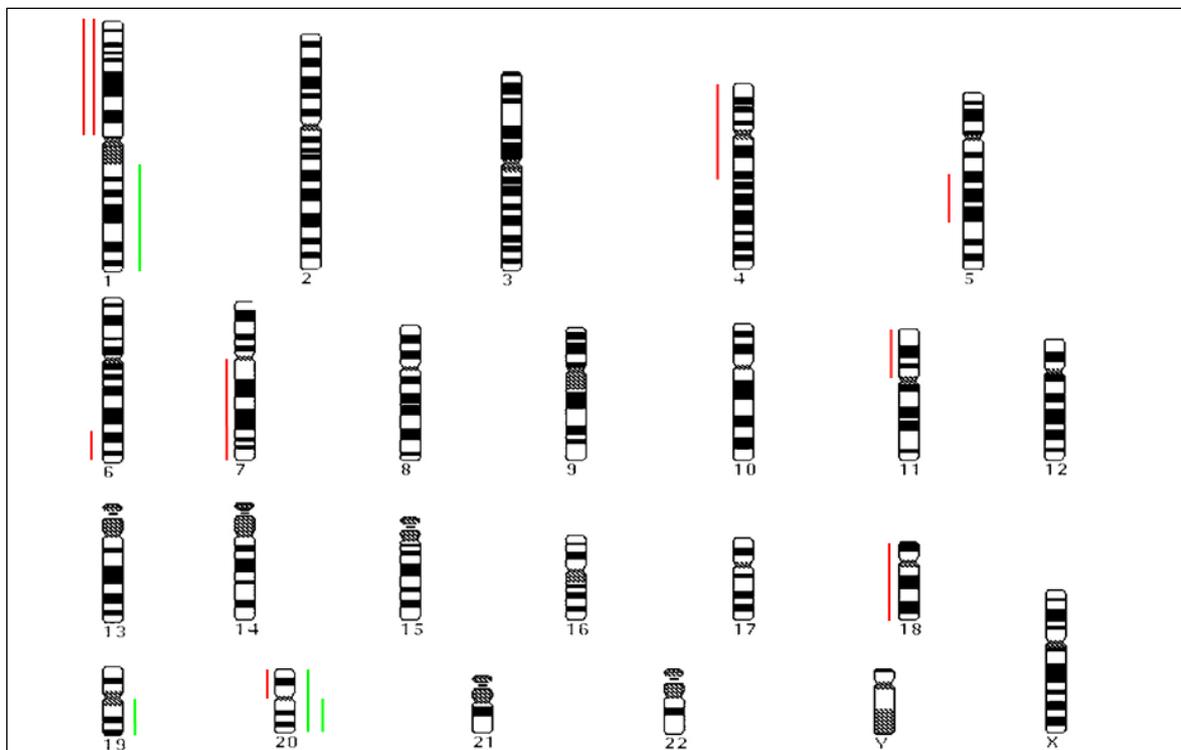


Abbildung 3.11: Ideogramm der 3 Tumoren von Patienten ≤5 Jahre mit bekanntem Rezidiv

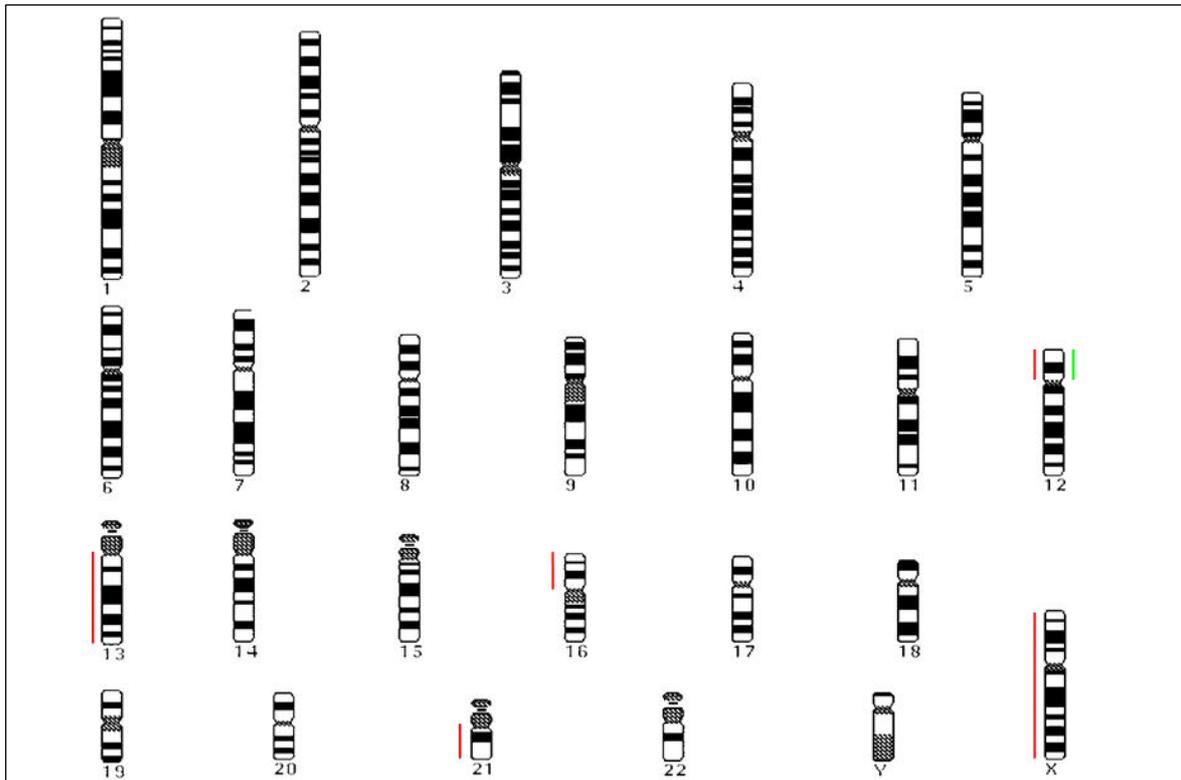


Abbildung 3.12: Ideogramm der 3 Tumoren von Patienten ≥ 6 Jahre in anhaltender Erstremission

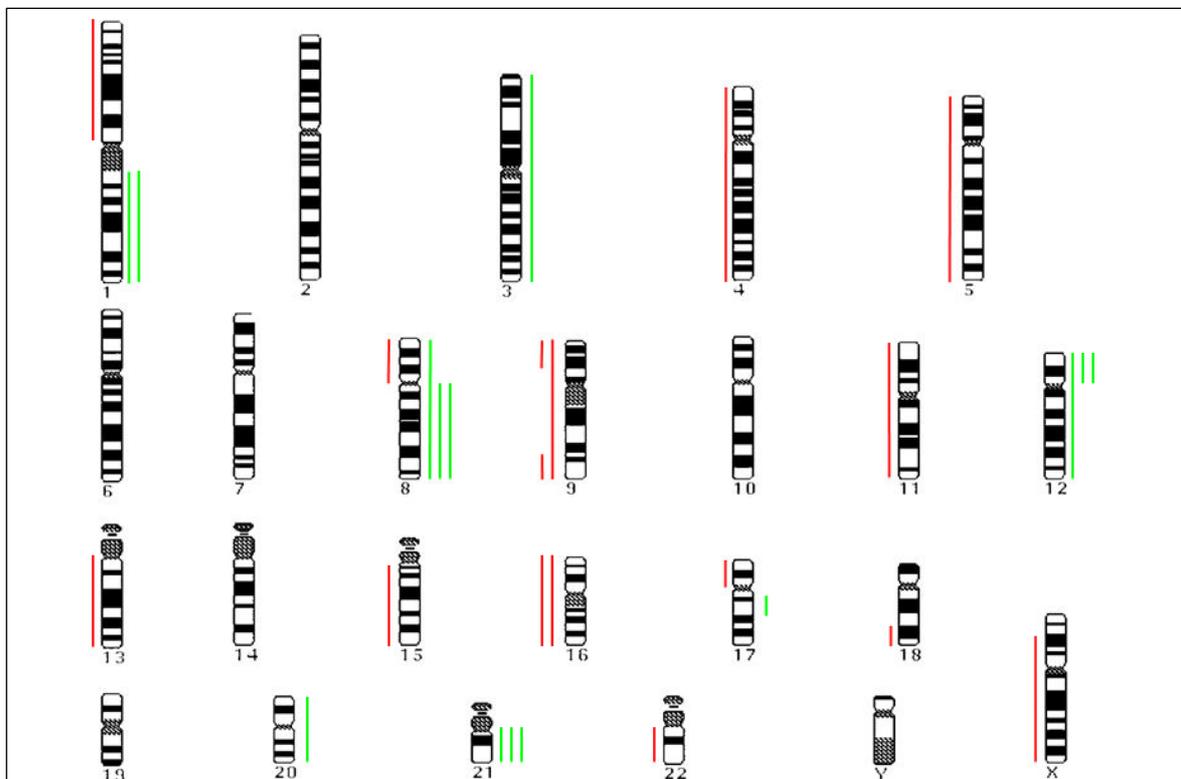


Abbildung 3.13: Ideogramm der 6 Tumoren von Patienten ≥ 6 Jahre mit bekanntem Rezidiv

4 Diskussion

Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen ist die genetische Charakterisierung von Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters. Darüber hinaus sollen genetischen Befunde mit klinischen Verlaufsdaten verglichen werden. Obwohl seit Beginn der 1980-er Jahre prospektive Therapieoptimierungsstudien bei Kindern und Jugendlichen durchgeführt werden, sind bislang keine genetischen Daten prospektiv erhoben und studienbegleitend analysiert worden. Dieses liegt im Wesentlichen darin begründet, dass bis etwa 2000 keine ausreichend großen Tumorbanken aufgebaut worden sind.

Aufgrund des Mangels an analysierbarem Tumorgewebe wurde in der vorgelegten Arbeit ein besonderer Ansatz gewählt. Zum einen wurde eine klinisch besonders günstige Untergruppe, die vaginalen Dottersacktumoren, analysiert. Zum anderen wurden maligne Tumoren der verschiedenen klinischen und therapeutischen Gruppen retrospektiv in einer Fall-Kontroll-Studie untersucht. Für diese Untersuchungen wurde archiviertes Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe aus dem Kieler Kindertumorregister eingesetzt.

Unter den Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters gehören die vaginalen Dottersacktumoren zu der prognostisch günstigsten Gruppe. So sind unter 18 Patienten der MAKEI Therapieoptimierungsstudie keine Rezidive aufgetreten und keine krankheitsbedingten Todesfälle beobachtet worden (Mauz-Körholz et al. 2000). Bemerkenswerter Weise treten diese Tumoren im Gegensatz zu Dottersacktumoren anderer Lokalisation nicht in Assoziation mit Teratomen auf und manifestieren sich ausnahmslos als reine Dottersacktumoren. Ansonsten sind die Dottersacktumoren klinisch oder histologisch allerdings nicht von Dottersacktumoren anderer Lokalisation zu unterscheiden.

Es ist zu beachten, dass bei diesen Tumoren im Gegensatz z.B. zu Steißbein- oder Mediastinaltumoren ein weniger aggressives chirurgisches Vorgehen möglich erscheint. So kann bei vaginalen Keimzelltumoren nach einer präoperativen Chemotherapie auch bei minimal invasiver und organerhaltender Chirurgie eine langfristige Krankheitsfreiheit erreicht werden (Mauz-Körholz et al. 2000). Im Gegensatz hierzu ist eine inkomplette Resektion bei Steißbein- und Mediastinaltumoren mit einer ungünstigen Prognose behaftet und stellt den

entscheidenden prognostischen Faktor dar (Schneider et al. 2000; Calaminus et al. 2003).

Aus diesen Gründen ist diese prognostisch besonders günstige Kohorte als eigene Studienpopulation getrennt analysiert worden. Die Hypothese war, dass sich diese prognostisch besonders günstigen Tumoren hinsichtlich ihrer zytogenetischen Profile von denen bei Dottersacktumoren anderer Lokalisation unterscheiden würden.

Tabelle 4.1: Rezidive bei 197 Patienten mit extragonadalen und extrakranialen Keimzelltumoren der MAKEI Therapieoptimierungsstudien *p<0.04

Tumorsitz	Patienten (n)	Rezidive (n)	Rezidive (%)
Steißbeinregion	112	24	21
Vagina	18	0	0*
Retroperitoneum	25	9	36
Mediastinum	37	9	24
Gesamt	197	42	21

Für die Analyse der Keimzelltumoren anderer Lokalisationen ist mit einer Fall-Kontroll- Studie (Matched-Pair Analyse) ein anderer statistischer Ansatz gewählt worden. Die Patienten für diese Studie wurden auf der Grundlage der Auswertung der Studienakten der MAKEI Studie sowie nach Beurteilung der histopathologischen Präparate am Kieler Kindertumorregister ausgewählt. Die

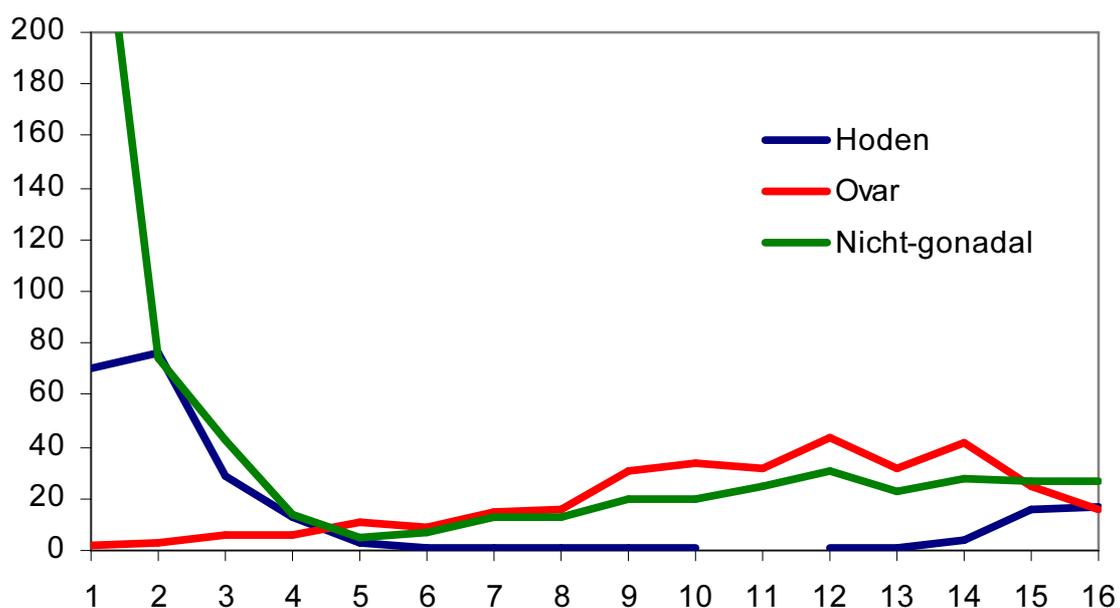


Abbildung 4.1: Häufigkeitsverteilung der Keimzelltumoren verschiedener Lokalisationen in Abhängigkeit vom Alter (Schneider et al. 2004a)

Unterscheidung entsprechend Alter erfolgte aufgrund der Vorstudien der Arbeitsgruppe, die gezeigt haben, dass sich die genetischen Profile bei malignen Keimzelltumoren in Abhängigkeit vom Alter unterschieden. Dabei zeigt sich sowohl in der Analyse der epidemiologischen Daten (Abbildung 4.1 und 4.2) als auch der genetischen Studien eine Altersgrenze, die für testikuläre und mediastinale Keimzelltumoren bei ca. zehn Jahren, bei ovarialen und ZNS Keimzelltumoren eher bei gut fünf Jahren anzusetzen ist. Daher wurde für die Fall-Kontroll-Studie eine Altersgrenze von 5 Jahren gewählt. Allerdings waren keine Patienten zwischen 5 und 9 Jahren eingeschlossen, so dass auch eine höhere Altergrenze keine Änderung ergeben hätte.

Innerhalb dieser klinischen und biologischen Untergruppen wurden daraufhin die Proben anhand der Therapiestrategie (watch-and-wait Strategie versus Chemotherapie) und der weiteren prognostisch relevanten klinischen Parameter (Stadium, Resektionsstatus etc.) gepaart. Aufgrund dieser exakten Zuordnung von Indexfällen und Kontrollen kam es jedoch zu einer erheblichen Reduktion der

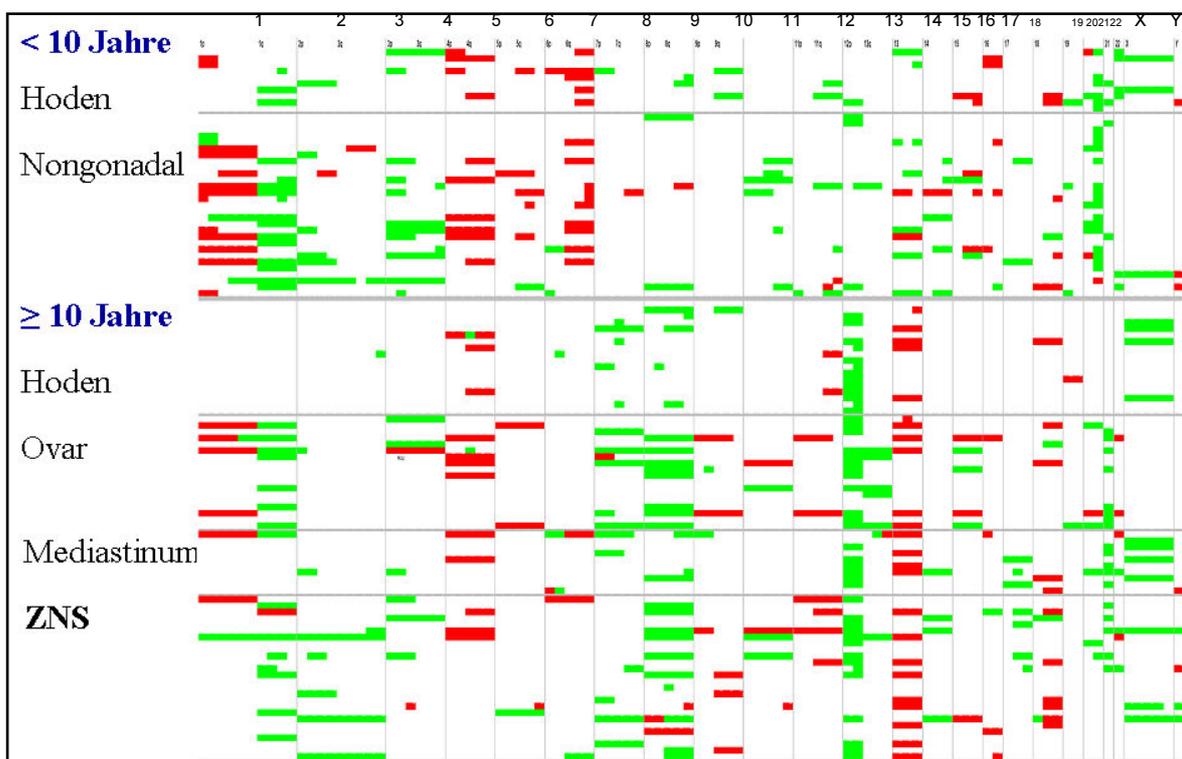


Abbildung 4.2: Chromosomale Imbalanzen in Keimzelltumoren verschiedener Lokalisationen in Abhängigkeit vom Alter. Jeder Patient entspricht einer Zeile, jede Spalte einem Chromosomenabschnitt von ca. 50 Megabasen. Zugewinne werden in grün, Deletionen in rot dargestellt (Schneider et al. 2006)

analysierbaren Tumoren in den einzelnen Untergruppen. Eine zusätzliche erhebliche Fallzahlreduktion kam dadurch zustande, dass die primären Paraffinblöckchen nicht mehr zur Verfügung standen, so dass letztlich keine sinnvolle statistische Analyse durchzuführen war. Die hier vorgestellte Analyse zeigt jedoch, dass dieser Ansatz prinzipiell erfolgreich durchführbar ist. Voraussetzung ist jedoch, dass von jedem Patienten Tumormaterial (vorzugsweise Frischgewebe, alternativ ein repräsentativer Paraffinblock) asserviert wird.

In der verbleibenden Zahl von insgesamt 14 vaginalen und 23 sonstigen Tumoren gelingt mit der CGH in einem großen Prozentsatz die genetische Charakterisierung mit Darstellung von chromosomalen Imbalancen. Dabei liegt die Erfolgsquote der CGH mit 74% über den im allgemeinen in der Literatur angegebenen Werten (in der Regel ca. 50% erfolgreiche Analysen) für die Analyse von paraffinisiertem Gewebe mit oft nur schlechter DNA Qualität und entspricht den vorangegangenen Quoten der Arbeitsgruppe (Schneider et al. 2000). Dieses Ergebnis ist Ausdruck der in der Arbeitsgruppe entwickelten Möglichkeit, auch degradierte DNA durch verschiedene Fluoreszenzmarkierungsverfahren erfolgreich zu verarbeiten.

4.1 CGH-Profile vaginaler Dottersacktumoren entsprechen Dottersacktumoren anderer Lokalisation

In dieser prognostisch sehr günstigen Gruppe der Dottersacktumoren wurden Imbalancen vor allem an den Chromosomen 1, 3, 6 und 20 gefunden. Dieses Muster entspricht im Wesentlichen dem von Dottersacktumoren an anderer Lokalisation wie Hoden, Steißbein und Mediastinum (Schneider et al. 2001; Palmer et al. 2007). Diese zeigen bei unter fünfjährigen Kindern Imbalancen vor allem an den Chromosomen 1, 6 und 20. Insofern ist mit der hier eingesetzten Methode kein erkennbarer Unterschied zwischen Keimzelltumoren der Vagina oder anderer Lokalisationen hinsichtlich ihrer chromosomalen Konstitution erkennbar.

Hinzuweisen ist auf den häufigen Zugewinn an Chromosom 3, insbesondere am kurzen Arm bei sieben von neun Tumoren. Mit neun Patienten in dieser Studie ist die Kohorte allerdings sehr klein und das Ergebnis daher nicht statistisch zu bewerten. Außerdem finden sich auch in Dottersacktumoren an anderen Lokalisationen wie z.B. mediastinalen Keimzelltumoren einige Fälle von Zugewinnen an Chromosom 3 (Schneider et al. 2001; Veltman et al. 2005). Leider stehen aber für diese Patienten keine einheitlichen klinischen Verlaufsdaten zur Verfügung, da sie in einer internationalen Studie aus Kohorten verschiedener Therapieoptimierungsstudien gepoolt wurden.

Insgesamt sind Veränderungen an Chromosom 3 bei zahlreichen Tumoren zu finden, im Kindesalter zum Beispiel auch bei Neuroblastomen (McArdle et al. 2004), im Erwachsenenalter beim Nebennierenrindenzarzinom (Stephan et al. 2008), malignem Melanom (Carless et al. 2008), kleinzelligen Bronchialkarzinom (Todd et al. 1996) und anderen (Lundin et al. 1998; Shao et al. 2002; Huang et al. 2007). In den veröffentlichten Studien wurden allerdings häufiger eine Deletion von 3p oder ein zusätzlicher Zugewinn an 3q mit prognostisch ungünstigen Tumoren in Verbindung gebracht. Das Humane-Papilloma-Virus bewirkt laut Steenbergen in den assoziierten Tumoren im Nasopharynx und am Cervix unter anderem eine Deletion 3p und einen Zugewinn 3q (Steenbergen et al. 2005). Ying stellte im Jahr 2007 einen Zusammenhang dieser Chromosom-3-Imbalancen mit Chemotherapieresistenzen bei ovarialen Karzinomen her (Ying et al. 2007).

Daraus kann man im Umkehrschluss aber nicht die Aussage formulieren, dass ein Zugewinn an 3p eine gute Prognose bedeutet.

Andererseits wurde in Mammakarzinomen eine Assoziation von Tumoren ohne Verlust an 3p13-14 und einem günstigen Krankheitsverlauf beschrieben und der Verlust eines Tumorsuppressorgen bei den ungünstigeren Tumoren vermutet (Lundin et al. 1998). Die Vermutung eines Tumorsuppressorgenes auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 wurde in ähnlicher Weise von Todd et al. 1996 in „Oncogene“ ausgesprochen. Sie postulierten, dass Klone von 3p21.3 das Tumorwachstum in kleinzelligen Bronchialkarzinomen unterdrücken (Todd et al. 1996). Hoebeeck et al. fanden 2006 eine Assoziation zwischen einem günstigen Behandlungsverlauf bei Neuroblastomen und dem biallelischen Erhalt des Von-Hippel-Lindau Gens, das auf 3p25 lokalisiert ist (Hoebeeck et al. 2006).

Tumorsuppressorgene wurden bisher anhand von Deletionen erkannt und gesucht. Ihr Fehlen oder ihre Inaktivierung z.B. durch Mutation, Deletion oder epigenetische Inaktivierung durch DNA-Methylierung ist mit dem Verlust von entscheidenden Kontrollfunktionen z.B. in der Zellzyklussteuerung und DNA Reparaturmechanismen assoziiert. Dass sie durch Amplifikation in ihrer Wirksamkeit gestärkt werden können, wurde, von Todd's Arbeit abgesehen, allerdings bislang nicht beobachtet und ergibt pathophysiologisch auch wenig Sinn. So ist eine Verstärkung einer dem physiologischen Maß entsprechenden Kontrollfunktion durch Genamplifikation bislang nicht beschrieben worden.

Die biologische Bedeutung des Zugewinnes am kurzen Arm des Chromosoms 3 in vaginalen Dottersacktumoren bleibt damit pathophysiologisch ungeklärt. Ebenso bleibt die prognostische Aussagekraft unklar, zumal auch Dottersacktumoren anderer Lokalisationen 3p-Zugewinne aufweisen (Schneider et al. 2006; Palmer et al. 2007).

Vaginale Dottersacktumoren sind eine klinisch besondere Entität wegen der guten Prognose selbst bei nicht maximaler chirurgischer Therapie. Genetisch sind sie allerdings nur durch den Zugewinn an 3p von anderen Keimzelltumoren dieser Altersgruppe unterscheidbar – wobei allerdings die insgesamt geringen Fallzahlen zu berücksichtigen sind. Es gibt ansonsten keinen Hinweis auf ein genetisches Profil, das in diesen Tumoren eine besonders günstige Prognose anzeigt. Aufgrund ihrer Besonderheit, dass sie nie mit Teratomen assoziiert sind, ist zu diskutieren, ob sie evt. einer anderen Histogenese zugrunde liegen als

Keimzelltumoren anderer Lokalisationen und sich zum Beispiel von somatischen Stammzellen und nicht von primordialen Keimzellen ableiten. Die Entsprechung der CGH Profile widerspricht allerdings deutlich dieser Hypothese; vielmehr muss eine gemeinsame Histogenese angenommen werden. In diesem Punkt könnten epigenetische Untersuchungen zum genomischen Imprinting eine weiterführende Klärung dieser Frage ermöglichen; allerdings wäre für diese Untersuchungen das Vorliegen von gefrorenem Frischgewebe die Voraussetzung.

4.2 Für statistisch relevante Aussagen in der Fall-Kontroll-Studie ist die Probenanzahl zu gering

Die Matched-Pair Pilotstudie über prognostische Hinweise in CGH-Profilen zeigt in allen Tumoren die charakteristischen altersentsprechenden chromosomalen Imbalanzen in Keimzelltumoren. So finden sich bei unter 5 (bzw. 10) Jahre alten Kindern Imbalanzen an den Chromosomen 1, 3, 6 und 20, bei Jugendlichen vor allem ein Zugewinn an 12p (Schneider et al. 2006). Eindeutige Unterschiede zwischen rezidivierten und in anhaltender Erstremission befindlichen Tumoren sind bei den kleinen analysierten Fallzahlen nicht zu erkennen. Lediglich ist auch hier ein Trend zu 3p-Zugewinnen in der prognostisch besseren Gruppe der Kleinkinder zu sehen. Angesichts der kleinen Fallzahlen kann jedoch keine Aussage über die prognostische Bedeutung getroffen werden.

Um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können, wäre prinzipiell eine größer angelegte Fall-Kontroll Studie anzustreben. Diese wäre realisierbar, wenn bereits bei Diagnose geeignete Proben und Vergleichsproben asserviert und verfügbar gemacht würden. Für dieses Ziel wäre die Gewinnung von Tumorproben somit in das Protokoll zukünftiger Therapieoptimierungsstudien aufzunehmen. Auf diese Weise würde eine prospektive Evaluation von Proben ermöglicht. Hinsichtlich dessen und der experimentellen Handhabung wäre vor allem die adäquate Probengewinnung und Verarbeitung essentiell. Bei nativ asservierten und unmittelbar schockgefrorenem Frischgewebe sind noch bessere Erfolgsquoten in der Analyse zu erreichen als in paraffinisierendem Gewebe. Aus klinischer Sicht ist jedoch zu betonen, dass die Gewinnung von initialen Tumorproben insbesondere bei Dottersacktumoren der typischen Lokalisation ethisch problematisch ist. So kann bei Kindern jenseits des 2. Lebensjahres in der Regel aufgrund der typischen Lokalisation und Bildgebung sowie des Nachweises eines erhöhten Tumormarkers AFP verlässlich die klinische Diagnose eines Dottersacktumors gestellt werden, ohne dass eine diagnostische Biopsie erforderlich ist (Schneider et al. 2000). Allerdings erlaubt es die Biopsie dann evt. Teratomanteile zu erkennen. Diese sind zwar für die Diagnosestellung und Therapieentscheidung nicht erforderlich, da sich die Wahl der Chemotherapie primär nach der Tumorkomponente mit der höchsten Malignität richtet, also nach dem durch die AFP-Erhöhung nachgewiesenen Dottersacktumor. Allerdings kann

die Kenntnis von einer Dottersacktumorkomponente hilfreich für die Beurteilung des Therapieansprechens sein. So ist bei radiologisch unzureichendem Ansprechen oder evt. einem Progress bei einem adäquaten Rückgang der AFP Spiegel von einem growing teratoma auszugehen und statt Fortsetzung der Chemotherapie eine operative Therapie zu wählen (Calaminus et al. 2009). Aufgrund dieser Erwägungen, die auch den Eltern zu erläutern sind, erscheint also die Entnahme einer diagnostischen Biopsie, auch mit dem Ziel zukünftiger biologischer Analysen gerechtfertigt. Als Zeitpunkt für die Biopsie ist die operative Anlage des zentralen Venenverweilkatheters geeignet, so dass keine zusätzliche Belastung durch weitere Narkosen erforderlich wird. Dieses Vorgehen wird auch in anderen Therapiestudien z.B. in Großbritannien und den USA gewählt.

Prinzipiell ist die Untersuchung von genetischen Parametern hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz bei embryonalen Tumoren des Kindesalters sinnvoll. Das bekannteste Beispiel ist hier das Neuroblastom, der häufigste solide Tumor des Bauchraums bei Kindern. Bei Neuroblastomen sind mittlerweile mehr als 100 verschiedene klinische und genetische Parameter mit prognostischer Relevanz bekannt. Für viele dieser Faktoren gilt aber, dass die Amplifikation des Onkogens *MYCN* von übergeordneter Bedeutung ist. So kann beispielsweise in der Gruppe der ansonsten prognostisch günstigen Neuroblastome des ersten Lebensjahres anhand der Untersuchung des *MYCN* Gens zwischen Patienten mit einer über 90%-igen und solchen mit unter 20%-iger Heilungschance unterschieden werden (Brodeur, 2003). Auch bei älteren Neuroblastompatienten definiert die Amplifikation von *MYCN* Patienten mit ungünstiger Prognose, so dass dieser Parameter alle anderen klinischen Parameter (z.B. Stadium) aussticht. Diese Patienten werden daher der höchsten Risikogruppe und somit der intensivsten Therapie zugeführt.

Im Gegensatz zu den Neuroblastomen ist die Prognose bei Keimzelltumoren des Kindesalters günstiger. Insgesamt ist bei mehr als 85% mit einer langfristigen Heilung zu rechnen (Göbel et al. 2000). Lediglich die Gruppe der jugendlichen Patienten mit metastasierten extragonadalen Keimzelltumoren ist als ungünstig anzusehen, da mit konventioneller Chemotherapie Heilungsraten unter 50% erreicht werden. Insofern ist bei Keimzelltumoren des Kindesalters nicht damit zu rechnen, dass durch genetische Analysen eine Hochrisikogruppe mit extrem ungünstiger Prognose wie z.B. bei Neuroblastomen definiert werden kann; dieses

ist allerdings für die adoleszenten Patienten wahrscheinlicher. Darüber hinaus ist die biologische Charakterisierung der Tumoren insbesondere bei Patienten im Altersbereich zwischen 5 und 15 Jahren womöglich prognostisch relevant. So ist bei einem sechsjährigen Jungen mit einem Mediastinaltumor und Nachweis einer 12p Amplifikation mit einer aggressiveren Erkrankung zu rechnen als bei einem gleich alten Mädchen ohne 12p Amplifikation aber Nachweis von Imbalanzen an Chromosom 1,6 und 20.

Auch bei prognostisch günstigen Tumoren wie den Nephroblastomen kann die genetische Untersuchung von Risikofaktoren zur Therapiestratifikation beitragen. Die Nephroblastome gehören zu den prognostisch günstigsten Tumoren des Kindesalters, und die langfristigen Heilungsraten liegen über 90% (Graf, 1996). Doch auch bei diesen Tumoren kann durch genetische Analysen, speziell der Analyse auf einen Loss of heterocycosity (LOH, Allelverlust) an Chromosom 1p und 16q eine prognostisch ungünstigere Gruppe mit einer Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 75% definiert werden (Grundy et al. 2005). Ein LOH ist allerdings ein insgesamt seltenes Ereignis und tritt bei weniger als 10% der Tumoren auf. In der aktuellen Studie der „National Wilms Tumor Study Group“ werden daher diese Untersuchungen für die Therapiestratifizierung eingesetzt und Patienten mit einem LOH einer intensiveren Therapiegruppe zugeordnet.

Vergleichbare Pilot-Untersuchungen zum LOH an Chromosom 1p sind auch an Keimzelltumoren durchgeführt worden (Zahn et al. 2006). Allerdings zeigte sich hier, dass in nahezu allen malignen Dottersacktumoren bei Kleinkindern ein LOH 1p nachweisbar war. Hingegen zeigte kein einziges Teratom einen LOH. Der einzige maligne Tumor ohne LOH in dieser Altersgruppe stammt von einem gemischten Keimzelltumor mit Dottersacktumor- und Teratomanteilen. Es ist somit zu vermuten, dass hier der LOH aufgrund des Teratomanteils verdeckt wurde. Hinsichtlich der prognostischen Wertigkeit des LOH1p bei Dottersacktumoren des Kleinkindalters ist jedoch zu konstatieren, dass dieser bei häufigem Auftreten und einer insgesamt günstigen Prognose dieser Tumoren, per se kein Indikator einer ungünstigen Prognose sein kann. Anders verhält es sich hingegen bei den malignen Keimzelltumoren der Jugendlichen. Hier wurde ein LOH 1p in weniger als 20% der Tumoren beobachtet. Zwei der drei positiven Tumoren haben ein Rezidiv entwickelt bzw. waren primär therapieresistent. Insofern erscheint hier

eine Fortführung der Analysen, vorzugsweise in einem prospektiven Ansatz begleitend zur MAKEI Therapieoptimierungsstudie gerechtfertigt.

Zusammenfassend bestätigen die in dieser Arbeit vorgestellten genetischen Analysen die bislang bekannten Daten zur chromosomalen Konstitution der Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen. Die chromosomalen Profile der vaginalen Dottersacktumoren belegen ihre histogenetische Entwicklung aus primordialen Keimzellen, analog zu Dottersacktumoren an anderen extragonadalen Lokalisationen. Auffällig bleibt eine Häufung von Zugewinnen an Chromosom 3p in Tumoren mit einem günstigen Verlauf. Eine Korrelation genetischer Daten mit klinischen Verlaufsdaten ist jedoch ansonsten nicht möglich, vor allem aufgrund der geringen Verfügbarkeit von geeignetem Analysematerial. In der vorgelegten Arbeit wird aber veranschaulicht, dass eine Fall-Kontrollstudie mit Paarung anhand klinischer und histologischer Parameter sinnvoll durchzuführen ist, wenn mit der zukünftigen Therapieoptimierungsstudie prospektiv geeignetes Tumorgewebe von allen Patienten asserviert wird.

Zusammenfassend lassen die hier vorgestellten genetischen Analysen keinen prognostischen genetischen Marker erkennen. Gleichzeitig demonstriert diese Pilotstudie jedoch die Machbarkeit solcher translationaler Studien an pädiatrischen Keimzelltumoren. Eine Fortführung und Ausweitung dieser Untersuchungen begleitend zu prospektiven Therapieoptimierungsstudien ist notwendig, insbesondere da unter der Maßgabe einer individualisierten und risikoadaptierten Therapiestrategie eine möglichst optimale Prognosebeurteilung bei Kindern mit Keimzelltumoren von essentieller Bedeutung ist.

5 Literatur

1. Alers, J.C., Rochat, J., Krijtenburg, P.J., van Dekken, H., Raap, A.K., and Rosenberg, C. 1999. Universal linkage system: an improved method for labeling archival DNA for comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes.Cancer**, 25(3): 301-305.
2. Amarose, A.P., Kyriazis, A.A., Dorus, E., and Azizi, F. 1977. Clinical, pathologic, and genetic findings in a case of 46,XY pure gonadal dysgenesis (Swyer's syndrome). **Am.J.Obstet.Gynecol.**, 127(8): 824-828.
3. Bauer, A., Savelyeva, L., Claas, A., Praml, C., Berthold, F., and Schwab, M. 2001. Smallest region of overlapping deletion in 1p36 in human neuroblastoma: a 1 Mbp cosmid and PAC contig. **Genes Chromosomes.Cancer**, 31(3): 228-239.
4. Brodeur, G.M. 1995. Genetics of embryonal tumours of childhood: retinoblastoma, Wilms' tumour and neuroblastoma. **Cancer Surv.**, 25: 67-99.
5. Brodeur, G.M. 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **Nat.Rev.Cancer**, 3(3): 203-216.
6. Calaminus, G., Schneider, D.T., Bökkerink, J.P., Gadner, H., Harms, D., Willers, R., and Göbel, U. 2003. Prognostic value of tumor size, metastases, extension into bone, and increased tumor marker in children with malignant sacrococcygeal germ cell tumors: a prospective evaluation of 71 patients treated in the German cooperative protocols Maligne Keimzelltumoren (MAKEI) 83/86 and MAKEI 89. **J Clin Oncol**, 21(5): 781-786.
7. Calaminus, G., Schneider, D.T., Weissbach, L., Schonberger, S., Okpanyi, V., Leuschner, I., Poremba, C., and Gobel, U. 2009. Survival after an antiangiogenetic therapy and surgery in a wide spread growing teratoma originating from a testicular mixed malignant germ cell tumor. **Klin.Padiatr.**, 221(3): 136-140.
8. Carless, M.A. and Griffiths, L.R. 2008. Cytogenetics of melanoma and nonmelanoma skin cancer. **Adv.Exp.Med.Biol.**, 624: 227-240.
9. Feinberg, A.P. 2004. The epigenetics of cancer etiology. **Semin.Cancer Biol.**, 14(6): 427-432.
10. Göbel, U., Schneider, D.T., Calaminus, G., Haas, R.J., Schmidt, P., and Harms, D. 2000. Germ-cell tumors in childhood and adolescence. **Ann.Oncol.**, 11(3): 263-271.
11. Graf, N. 1996. [Wilms' tumor]. **Praxis.(Bern.1994.)**, 85(23): 753-761.
12. Grundy, P.E., Breslow, N.E., Li, S., Perlman, E., Beckwith, J.B., Ritchey, M.L., Shamberger, R.C., Haase, G.M., D'Angio, G.J., Donaldson, M., Coppes, M.J., Malogolowkin, M., Shearer, P., Thomas, P.R., Macklis, R., Tomlinson, G., Huff, V., and Green, D.M. 2005. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **J Clin.Oncol.**, 23(29): 7312-7321.

13. Hoebbeck, J., Vandesompele, J., Nilsson, H., De, P.K., Van, R.N., De, S.E., Yigit, N., De, P.A., Laureys, G., Pahlman, S., and Speleman, F. 2006. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene expression level has prognostic value in neuroblastoma. *Int.J.Cancer*, 119(3): 624-629.
14. Huang, K.F., Lee, W.Y., Huang, S.C., Lin, Y.S., Kang, C.Y., Liou, C.P., and Tzeng, C.C. 2007. Chromosomal gain of 3q and loss of 11q often associated with nodal metastasis in early stage cervical squamous cell carcinoma. *J.Formos.Med.Assoc.*, 106(11): 894-902.
15. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., and Pinkel, D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258(5083): 818-821.
16. Kirchhoff, M., Rose, H., and Lundsteen, C. 2001. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J.Med.Genet.*, 38(11): 740-744.
17. Klein, C.A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J.A., Pantel, K., Speicher, M.R., and Riethmüller, G. 1999. Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96(8): 4494-4499.
18. Lundin, C. and Mertens, F. 1998. Cytogenetics of benign breast lesions. *Breast Cancer Res.Treat.*, 51(1): 1-15.
19. Mauz-Körholz, C., Harms, D., Calaminus, G., and Göbel, U. 2000. Primary chemotherapy and conservative surgery for vaginal yolk-sac tumour. Maligne Keimzelltumoren Study Group. *Lancet*, 355(9204): 625.
20. McArdle, L., McDermott, M., Purcell, R., Grehan, D., O'Meara, A., Breatnach, F., Catchpoole, D., Culhane, A.C., Jeffery, I., Gallagher, W.M., and Stallings, R.L. 2004. Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q. *Carcinogenesis*, 25(9): 1599-1609.
21. Ness, G.O., Lybaek, H., and Houge, G. 2002. Usefulness of high-resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am.J.Med.Genet.*, 113(2): 125-136.
22. Nichols, C.R., Heerema, N.A., Palmer, C., Loehrer, P.J.S., Williams, S.D., and Einhorn, L.H. 1987. Klinefelter's syndrome associated with mediastinal germ cell neoplasms. *J.Clin.Oncol.*, 5(8): 1290-1294.
23. Palmer, R.D., Foster, N.A., Vowler, S.L., Roberts, I., Thornton, C.M., Hale, J.P., Schneider, D.T., Nicholson, J.C., and Coleman, N. 2007. Malignant germ cell tumours of childhood: new associations of genomic imbalance. *Br.J Cancer*, 96(4): 667-676.
24. Perlman, E.J., Hu, J., Ho, D., Cushing, B., Lauer, S., and Castleberry, R.P. 2000. Genetic analysis of childhood endodermal sinus tumors by comparative genomic hybridization. *J.Pediatr.Hematol.Oncol.*, 22(2): 100-105.
25. Riopel, M.A., Spellerberg, A., Griffin, C.A., and Perlman, E.J. 1998. Genetic analysis of ovarian germ cell tumors by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.*, 58(14): 3105-3110.

26. Schneider,D.T., Calaminus,G., Koch,S., Teske,C., Schmidt,P., Haas,R.J., Harms,D., and Gobel,U. 2004a. Epidemiologic analysis of 1,442 children and adolescents registered in the German germ cell tumor protocols. ***Pediatr.Blood Cancer***, 42(2): 169-175.
27. Schneider,D.T., Calaminus,G., Koch,S., Teske,C., Schmidt,P., Haas,R.J., Harms,D., and Göbel,U. 2004b. Epidemiological Analysis of 1442 Children and Adolescents Registered in the German Germ Cell Tumor Protocols. ***Pediatr Blood Cancer***, 42(2): 169-175.
28. Schneider,D.T., Calaminus,G., Reinhard,H., Gutjahr,P., Kremens,B., Harms,D., and Göbel,U. 2000. Primary Mediastinal Germ Cell Tumors in Children and Adolescents: Results of the German Cooperative Protocols MAKEI 83/86, 89, and 96. ***J Clin Oncol***, 18(4): 832-839.
29. Schneider,D.T., Schuster,A.E., Fritsch,M.K., Calaminus,G., Göbel,U., Harms,D., Lauer,S., Olson,T., and Perlman,E.J. 2002. Genetic analysis of mediastinal nonseminomatous germ cell tumors in children and adolescents. ***Genes Chromosomes.Cancer***, 34(1): 115-125.
30. Schneider,D.T., Schuster,A.E., Fritsch,M.K., Calaminus,G., Harms,D., Göbel,U., and Perlman,E.J. 2001. Genetic Analysis of Childhood Germ Cell Tumors with Comparative Genomic Hybridization. ***Klin.Pädiatr.***, 213(4): 204-211.
31. Schneider,D.T., Zahn,S., Sievers,S., Alemzkour,K., Reifenberger,G., Wiestler,O.D., Calaminus,G., Göbel,U., and Perlman,E.J. 2006. Molecular genetic analysis of central nervous system germ cell tumors with comparative genomic hybridization. ***Mod.Pathol.***, 19(6): 864-873.
32. Schumacher,V., Schneider,S., Figge,A., Wildhardt,G., Harms,D., Schmidt,D., Weirich,A., Ludwig,R., and Royer-Pokora,B. 1997. Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. ***Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A***, 94(8): 3972-3977.
33. Schwab,M., Praml,C., and Amler,L.C. 1996. Genomic instability in 1p and human malignancies. ***Genes Chromosomes.Cancer***, 16(4): 211-229.
34. Shao,J.Y., Zeng,W.F., and Zeng,Y.X. 2002. [Molecular genetic progression on nasopharyngeal carcinoma]. ***Ai.Zheng.***, 21(1): 1-10.
35. Steenbergen,R.D., de,W.J., Wilting,S.M., Brink,A.A., Snijders,P.J., and Meijer,C.J. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. ***J.Clin.Virol.***, 32 Suppl 1: S25-S33.
36. Stephan,E.A., Chung,T.H., Grant,C.S., Kim,S., Von Hoff,D.D., Trent,J.M., and Demeure,M.J. 2008. Adrenocortical carcinoma survival rates correlated to genomic copy number variants. ***Mol.Cancer Ther.***, 7(2): 425-431.
37. Todd,M.C., Xiang,R.H., Garcia,D.K., Kerbacher,K.E., Moore,S.L., Hensel,C.H., Liu,P., Siciliano,M.J., Kok,K., van den,B.A., Veldhuis,P., Buys,C.H., Killary,A.M., and Naylor,S.L. 1996. An 80 Kb P1 clone from chromosome 3p21.3 suppresses tumor growth in vivo. ***Oncogene***, 13(11): 2387-2396.
38. Veltman,I., Veltman,J., Janssen,I., Hulsbergen-van de,K.C., Oosterhuis,W., Schneider,D., Stoop,H., Gillis,A., Zahn,S., Looijenga,L., Göbel,U., and van Kessel,A.G. 2005. Identification of recurrent chromosomal aberrations in

germ cell tumors of neonates and infants using genomewide array-based comparative genomic hybridization. **Genes Chromosomes.Cancer**, 43: 367-376.

39. Ying,H.C., Zhang,S.L., Jiang,T., Ouyang,L., and Lu,J. 2007. [Mechanisms of drug resistance in human ovarian carcinoma studied by comparative genomic hybridization]. **Zhonghua Yi.Xue.Za Zhi.**, 87(15): 1009-1012.
40. Zahn,S., Sievers,S., Alemazkour,K., Orb,S., Harms,D., Schulz,W.A., Calaminus,G., Göbel,U., and Schneider,D.T. 2006. Imbalances of Chromosome 1p in Pediatric and Adult Germ Cell Tumors are Caused by True Allelic Loss:a Combined Comparative Genomic Hybridization and Microsatellite Analysis. **Genes Chromosomes.Cancer**, 45: 995-1006.

6 Anhang

Tabelle 6.1: DNA-Isolation

Material	Art.-Nr., Hersteller
Xylol	X-2377, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
TE-9	Tris, EDTA, NaCl, dH ₂ O
Tris	5429.3, CARL-ROTH GmbH, Karlsruhe, D
NaCl	1.06404.1000, MERCK, Darmstadt, D
EDTA	EDS, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
20% SDS	SDS, HCl, dH ₂ O
Proteinase K	P2308, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1	P3803, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
Chloroform	1.02445.2500, MERCK, Darmstadt, D
NaAc 500g	S9513, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
Lo-TE	Tris, EDTA, dH ₂ O
EB-Puffer	QIAmp DNA Micro Kit (50)
Glycerol 100%	G-6279, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
1M Tris HCl	36970.02, Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
QIAmp DNA Micro Kit (50)	56304, Qiagen, Hilden, D

Tabelle 6.2: Agarose-Gel

Material	Art.-Nr., Hersteller
LE Agarose	840004, Biozym, Hess. Oldendorf, D
TAE 50x	Tris, Essigsäure, EDTA, dH ₂ O
ETBr	E-1510, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
2xALB	6xALB, dH ₂ O
6xALB	30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, H ₂ O
Bromphenolblau-Xylenecyanol solid mixture	18047, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
1 Kb Plus DNA Ladder	10787-018, Invitrogen, Karlsruhe, D

Tabelle 6.3: CGH

Material	Art.-Nr., Hersteller
DNA Polymerase I/DNase I	18162-016, Invitrogen, Karlsruhe, D
DNA Polymerase I	EP0042, Fermentas, St.Leon-Rot, D
Spectrum Green dUTP 50nmol	30-803200, Vysis, Wiesbaden, D
Spectrum Red dUTP 50nmol	30-803400, Vysis, Wiesbaden, D
A4-Mix	10 mM dATP, dGTP, dCTP, 1 M Tris pH7,8, 1 M MgCl ₂ , 14,3 M Mercaptoethanol, 10 mg/ml BSA
100mMdNTP Set	10297-018, Invitrogen, Karlsruhe, D
1M Tris pH 7,8	5429.3, CARL-ROTH GmbH, Karlsruhe, D
1M MgCl ₂	8.14733.0500, MERCK, Darmstadt, D
14,3 M Mercaptoethanol	M3148, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
10 mg/ml BSA	A-9647, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D

cot-1 DNA	15279-011, Invitrogen, Karlsruhe, D
NaAc 500g	S9513, SIGMA-ALDRICH, Steinheim, D
MMI	Dextran Sulfat, Formamid deionisiert, 20xSSC
Dextran Sulfat	17-3045-01, Amersham Biosciences AB (GE Healthcare), München, D
Formamid deionisiert	P040.1, CARL-ROTH GmbH, Karlsruhe, D
20xSSC	15557-036, Invitrogen, Karlsruhe, D
1M HCl	1.09057.1000, MERCK, Darmstadt, D
CGH Target Slides, Normal Metaphase	30-80-60-10, Vysis, Wiesbaden, D
Fixogum/Foto-Klebstoff	1251, Herma, Filderstadt, D
DAPI I counterstain in antifade 500µl	32-804830, Vysis, Wiesbaden, D
Citifluor	AF1, SCIENCE SERVICE, Washington D.C., USA

Tabelle 6.4: Primer-ligation CGH

Material	Art.-Nr., Hersteller
10x buffer One-Phor-All-Plus	27-0901-02, Amersham Biosciences AB (GE Healthcare), München, D
MseI (50U/µl)	R0525M, BioLabs, Frankfurt a.M., D
HPLC	1.15333.2500, MERCK, Darmstadt, D
MseLig-21 Primer (100µM)	MWG-Biotech AG, Ebersberg, D, Liste im Anhang
MseLig-12 Primer (100µM)	
ATP lithiums salt 100mM pH 7	1140965, Roche, Basel, CH
T4-DNA-Ligase (5U/µl)	M02025, BioLabs, Frankfurt a.M., D
High fidelity Puffer	12140314001, Roche, Basel, CH
100mM dNTP Set	10297-018, Invitrogen, Karlsruhe, D
10x Thermo Sequenase Puffer	93-79000, Amersham Biosciences AB (GE Healthcare), München, D
Thermo Sequenase	93-79802, Amersham Biosciences AB (GE Healthcare), München, D
DNase	70048020, Roche, Basel, CH
cot-1 DNA	15279-011, Invitrogen, Karlsruhe, D

Tabelle 6.5: ULS-CGH

Material	Art.-Nr., Hersteller
NP DNase Puffer	500mM Tris pH7,5 , 5mM MgCl , 0,5mg/ml BSA
DNase 1:5000 aus 1mg/ml	70048020, Roche, Basel, CH
QIamp DNA Micro Kit (50)	56304, Qiagen, Hilden, D
Platinum Bright 495	LK025A, KreATECH, Amsterdam, NL
Cy3-ULS / Cy5-ULS	EA-005, KreATECH, Amsterdam, NL
labelling solution	LK017A/LK008A, KreATECH, Amsterdam, NL
PB (Qiagen Purifikation Kit)	19066, Qiagen, Hilden, D
cot-1 DNA	15279-011, Invitrogen, Karlsruhe, D

Tabelle 6.6: Geräte und Zubehör

Gerät	Gerätename, Hersteller
CGH/FISH- Programm	Cytovision CV 2,8
Deckgläschen	Welabo 9802
Elektrophoresekammer	Biometra Standard Power Pack P25, Biometra
Elektrophorese-Programm	BioRad Fluor-S Multimanager Multianalyst Version 1.1, BioRad Laboratories
Eppendorfgefäß 1,5ml	Safe Lock 1,5 ml, Eppendorf-Nettele-Hinz GmbH
Eppendorfgefäß 2,0ml	Safe Lock 2,0 ml, Eppendorf-Nettele-Hinz GmbH
Filter	Zeiss
Gelkammer	Wide Mini Sub Cell GT, Bio Rad Laboratories
gestopfte Pipetten	Pipetman, Gilson
Kamera	Zeiss
Küvetten	
Mikroskop	Axioplan 2 Imaging, Zeiss
Mikrowelle	Micromat, AEG
PCR-Tubes	PCR 8-Strip Tubes, Eppendorf AG
Photometer	Bio Photometer, Eppendorf AG
Pipetten	Tip One Extended Length Filter Tips, Starlab GmbH
Pipettiergeräte	Eppendorf research
QuAmp MinElute Säule	QIAamp Min Elute Column, Quiagen
Quiagen Mikro-Kit	QIAamp DNA Micro Kit, Quiagen
Septen	Plate Septa 96-Well, Applied Biosystems
Superfrost Objektträger	Menzel Gläser, Menzel GmbH & Co KG
Thermomixer	Thermomixer 5436, Eppendorf
Tiefkühltruhe	Bio Freezer, Forma Scientific
Trockenblock	556 Trockenblock, Schleicher und Schuell
UV-Lampe	Fluor-S Multi Imager, Bio Rad Laboratories GmbH
Vortexer	Vortex- Genie 2, Scientific Industries
Waage	82047, Kern & Sohn GmbH
Zentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus
Schüttler	SM 25, Edmund Bühler, Tübingen
Inkubator 37°C	Heraeus Instruments
Wasserbad	1.) M20 Lauda 2.) Thermo Haake (DC 10)
PCR-Maschine	Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystem

Lebenslauf**Persönliche Daten**

Name: Klaus Pierstorff
Adresse: Poststraße 27
41516 Grevenbroich - Wevelinghoven
Geburtsdatum, Ort: 03.10.1977, Düsseldorf

Schullaufbahn

1984 - 1988 Gebr. Grimm Grundschule Wevelinghoven
1988 - 1995 Erasmus-Gymnasium Grevenbroich
1995 - 1997 Quirinus-Gymnasium Neuss

Ersatzdienst

1997 – 1998 Individuelle Schwerbehindertenbetreuung

Ausbildung

1999-2002 Ausbildung zum Physiotherapeuten
Dorothea C. Erleben Schule, Bad Oeynhausen
Staatsexamen 09/2002

Studium

1998-1999 Maschinenbau, RWTH Aachen
2002-2008 Humanmedizin, HHU Düsseldorf
Staatsexamen 11/2008

Approbation 27.11.2008

Beruflicher Werdegang

Seit 08.12.2008 Assistenzarzt in der Klinik für Kinder - Onkologie,
-Hämatologie und Klinische Immunologie
Universitätsklinik Düsseldorf

Zusammenfassung

In der Tumorforschung finden molekularbiologische Untersuchungen neben den klassischen prognostischen Faktoren wie der Tumorlokalisation, dem Tumorstadium, der Höhe von Tumormarkern sowie histopathologischen Befunden eine zunehmende Bedeutung. Genetische Veränderungen können zudem differentialdiagnostisch bedeutsam sein, wenn sie für einen bestimmten Tumor charakteristisch sind. Sie können aber auch entitätenübergreifend für ein gemeinsames Merkmal verschiedener Tumoren stehen, wie z.B. Veränderungen in bestimmten Tumorsignalwegen.

Die hier vorgelegte Arbeit hat das Ziel, mittels Comparativer Genomischer Hybridisierung (CGH) genetische Parameter auf ihre potentielle prognostische Relevanz in Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters zu prüfen. Dazu wurde zum einen die prognostisch besonders günstige Gruppe der seltenen vaginalen Dottersacktumoren betrachtet, zum anderen als Pilotstudie maligne Keimzelltumoren verschiedener Altersgruppen in einer Fall-Kontrollstudie Rezidiv gegen anhaltende Erstremission evaluiert.

In der Gruppe der vaginalen Dottersacktumoren konnten neun von 14 Tumorproben ausgewertet werden. Je Tumor wurden 6,22 Imbalanzen mit einer Schwankungsbreite von 3 – 13 gefunden. Zugewinne zeigten sich häufiger als Verluste, die häufigsten an den Chromosomen 1, 3, 6 und 20, vergleichbar mit Dottersacktumoren an anderer Lokalisation. In der Fall-Kontrollstudie waren 17 von 23 Proben auswertbar, davon fanden sich in 15 Tumoren chromosomale Imbalanzen. Bei einer Schwankungsbreite von 0 – 11 Imbalanzen pro Tumor lag der Mittelwert bei 4,64. Hier waren unterschiedliche Profile in Abhängigkeit vom Alter zu erkennen. Die acht Tumoren der unter fünfjährigen Patienten zeigten Imbalanzen vor allem an den Chromosomen 1, 3, 6 und 20, die Gruppe der älteren vor allem 12p-Zugewinne. Für statistisch relevante Aussagen ist die Probenanzahl zu gering.

Auffällig ist aber in der Gruppe der vaginalen Dottersacktumoren und der prognostisch günstigen Gruppe der Kleinkinder in der Fall-Kontrollstudie ein Trend zu einem Zugewinn an 3p. Für weiterführende Studien ist die Asservierung von geeigneten Proben und Vergleichsproben im besten Fall natives schockgefrorenes Frischgewebe in höherer Fallzahl essentiell.