

Aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf  
Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik für Kinder - Onkologie, - Hämatologie und Klinische Immunologie  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. A. Borkhardt

Allelverlust am kurzen Arm des Chromosoms 1 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

Sandra Jennifer Christina Orb

2008

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

Gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Dekan

Referent: PD Dr. med. D. T. Schneider

Korreferent: Prof. Dr. med. C. Poremba

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1 <i>Histologische Klassifikation von Keimzelltumoren .....</i>	6
1.2 <i>Biologie und Histogenese der Keimzelltumoren .....</i>	8
1.3 <i>Epidemiologie und Klinik der Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter .....</i>	9
1.4 <i>Bedeutung eines Allelverlustes für Tumorentstehung und Prognose .....</i>	10
1.5 <i>Therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Keimzelltumoren .....</i>	12
1.6 <i>Fragestellung und Ziel der Arbeit .....</i>	13
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
2.1 <i>Patienten .....</i>	15
2.2 <i>Methoden .....</i>	17
2.2.1 <i>LOH und Mikrosatellitenanalyse .....</i>	17
2.2.2 <i>Geräte .....</i>	18
2.2.3 <i>Reagenzien/Pufferlösungen .....</i>	18
2.2.4 <i>Gewebegewinnung .....</i>	19
2.2.5 <i>DNA Extraktion aus Vollblut .....</i>	20
2.2.6 <i>Manuelle Dissektion und DNA Extraktion aus Paraffinschnitten auf Objektträgern .....</i>	20
2.2.7 <i>DNA Extraktion aus Frischgewebe .....</i>	21
2.2.8 <i>PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR) .....</i>	21
2.2.9 <i>Mikrosatellitenanalyse .....</i>	21
2.2.10 <i>PCR- Amplifikation der polymorphen Marker auf Chromosom 1p .....</i>	23
2.2.11 <i>Automatisierte Fragmentanalyse .....</i>	24
2.2.12 <i>Quantifizierung und verwendete Schwellenwerte .....</i>	24
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>25</b>
3.1 <i>Methodenetablierung .....</i>	25
3.2 <i>Teratome im Vergleich zu Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen .....</i>	28
3.3 <i>Maligne Keimzelltumoren bei Jugendlichen und Erwachsenen im Vergleich zu malignen Keimzelltumoren bei Kindern .....</i>	29
3.4 <i>Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten .....</i>	30
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>32</b>
4.1 <i>Biologische Heterogenität von Keimzelltumoren .....</i>	32
4.2 <i>Chromosomale Veränderungen an 1p bei unterschiedlichen Tumoren .....</i>	34
4.3 <i>Untersuchungen der chromosomalen Verlustrate an 1p bei Keimzelltumoren mit Hilfe unterschiedlicher Untersuchungsmethoden .....</i>	35

4.4	<i>Vor- und Nachteile der Mikrosatellitenanalyse als Untersuchungsmethode</i> .....	37
4.5	<i>Diskussion der Untersuchungsergebnisse</i> .....	39
4.6	<i>Prognostische Relevanz der Ergebnisse</i> .....	43
4.7	<i>Ausblick</i> .....	44
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>45</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>47</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>55</b>

## **Abkürzungen**

AFP	Alpha-Feto-Protein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AWD	Aktive Erkrankung
BAX	BCL-2 associated X protein, BCL-2 assoziiertes X Protein
β-HCG	Beta Kette des humanen Choriogonadotropins
CGH	comparative genomic hybridization, komparative genomische Hybridisierung
CHC	Choriokarziom
c-kit	Rezeptor des Stammzellfaktors
CXCR-4	Rezeptor von SDF-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DOP	degenerierte Oligonukleotid-Primer
DYS	Dysgerminom
EC	Embryonales Karzinom
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FFPE	formalin fixed and paraffin embedded tissue, formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeprobe
FFT	fresh frozen tissue, nativ asservierte und tiefgefroren archivierte Gewebeprobe
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Gy	Gray
IT	Immatures Teratom
LOH	loss of heterocycosity, Verlust der Heterozygotie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
n.d.	no data, keine Information
NED	no evidence of disease, kein Hinweis auf ein Rezidiv
NED-2	kein Anhalt für ein Zweitrezidiv
OCT 3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor
Orig.	Original
PCR	Polymerase Kettenreaktion
sec	Sekunden
SDF-1	stromal cell-derived factor 1
TER	Teratom
TGF-beta	tumor growth factor beta
YST	Dottersacktumor

# **1 Einleitung**

## ***1.1 Histologische Klassifikation von Keimzelltumoren***

Die Mehrzahl der soliden Tumoren im Kindesalter gehören der Gruppe der embryonalen Tumoren an. Dieser Begriff spiegelt das Phänomen wieder, dass diese Tumoren unreife histologische Strukturen zeigen, wie sie während der Organogenese zu beobachten sind.

Embryonale Tumoren sind somit Ausdruck einer tiefgreifenden Störung der Organanlage und Differenzierung (dysontogenetischer Tumor). Für diese These spricht, dass embryonale Tumoren gehäuft in Assoziation mit Entwicklungsanomalien und Fehlbildungssyndromen auftreten.<sup>9, 27, 74, 89</sup>

Keimzelltumoren werden ebenfalls zu den embryonalen Tumoren gezählt. Besonders die ovariellen und mediastinalen Keimzelltumoren können mit Störungen der Geschlechtsentwicklung, beziehungsweise mit strukturellen und numerischen Veränderungen der Geschlechtschromosomen, assoziiert sein (testikuläre Feminisierung, Turner Syndrom, Klinefelter Syndrom).<sup>9, 26, 79, 91</sup>

Die Histologie der Keimzelltumoren ist äußerst heterogen. Die histologische Klassifikation erfolgt organbezogen entsprechend der WHO-Klassifikation für testikuläre, ovariale und zentralnervöse Tumoren. Dabei werden im Wesentlichen sechs verschiedene histologische Subentitäten unterschieden. Im Kindesalter enthalten fast die Hälfte aller Keimzelltumoren mehr als eine histologische Komponente. Weisen die Tumoren die Morphologie des Keimepithels auf, werden sie als Germinom (ZNS), beziehungsweise als Seminom (Hoden) oder Dysgerminom (Ovar) bezeichnet. Diese Tumoren zeichnen sich immunhistochemisch unter anderem durch die Expression von c-kit, dem Rezeptor des Stammzellfaktors, und des Stammzellmarkers OCT3/4 aus.

Die embryonalen Karzinome entsprechen Tumoren mit einer undifferenzierten Stammzellmorphologie. Sie exprimieren ebenfalls den Stammzellmarker OCT3/4.

Bei extraembryonaler Differenzierung entwickeln sich Dottersacktumoren (Synonym: Endodermalsinustumoren) oder Choriokarzinome. Beide zählen zu den sezernierenden Keimzelltumoren. Dottersacktumoren produzieren AFP, Choriokarzinome  $\beta$ -HCG. Choriokarzinome gelten als die malignen Korrelate des Syncytiotrophoblasten der Plazenta. Bei einer somatischen Differenzierung des Tumors können sich Teratome unterschiedlichen Reifegrades entwickeln. Dabei weisen die muren Teratome komplett ausgereifte organoide Gewebestrukturen in irregulärer Anordnung auf („histologischer Potpourri“), während sich die immatunen Teratome durch unterschiedliche Anteile von histologisch unreifem Gewebe, meist in Form von Neurotubuli, auszeichnen.

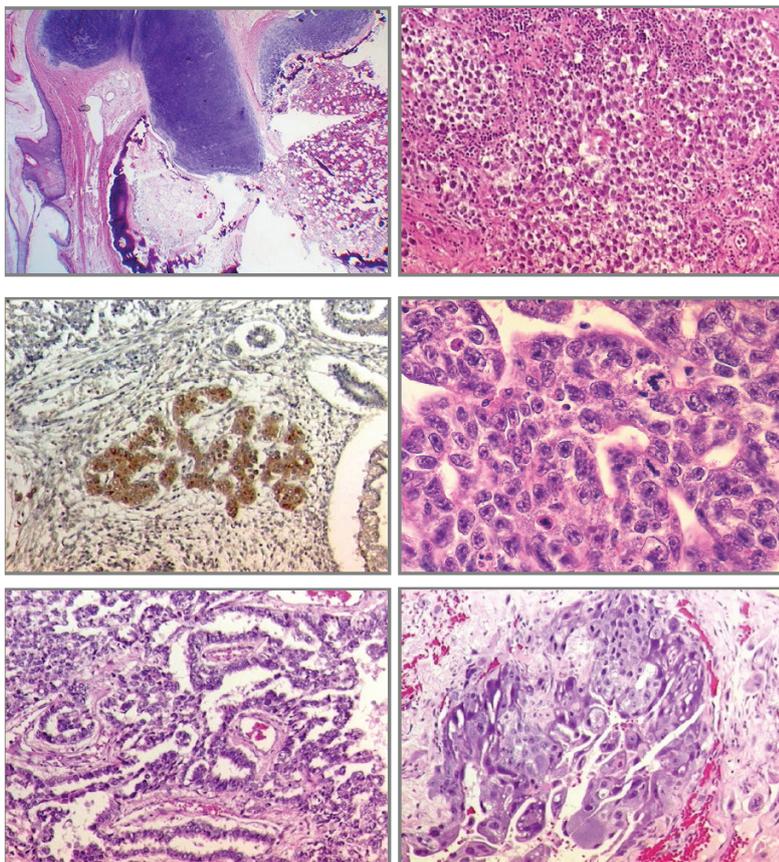


Abbildung 1: Histologische Heterogenität der Keimzelltumoren: Die linke Spalte zeigt ein reifes Teratom (oben), ein unreifes Teratom mit Dottersackmikrofoei (immunhistochemische Färbung für AFP, Mitte) und einen Dottersacktumor (unten). In der rechten Spalte sind ein Germinom (oben), ein embryonales Karzinom (Mitte) und ein Choriokarzinom (unten) dargestellt (Hämatoxillin-Eosin, Orig. Vergrößerung ca 200 x).

## 1.2 *Biologie und Histogenese der Keimzelltumoren*

Entsprechend dem holistischen Konzept der Histogenese der Keimzelltumoren nach Teilum leiten sich alle Keimzelltumoren von totipotenten primordiales Keimzellen ab (Abbildung 2).<sup>116</sup> Die primordiales Keimzellen können, abhängig vom jeweiligen Reifegrad und dem genomischen Imprinting, in histologisch unterschiedliche Keimzelltumorentitäten differenzieren.<sup>123</sup>

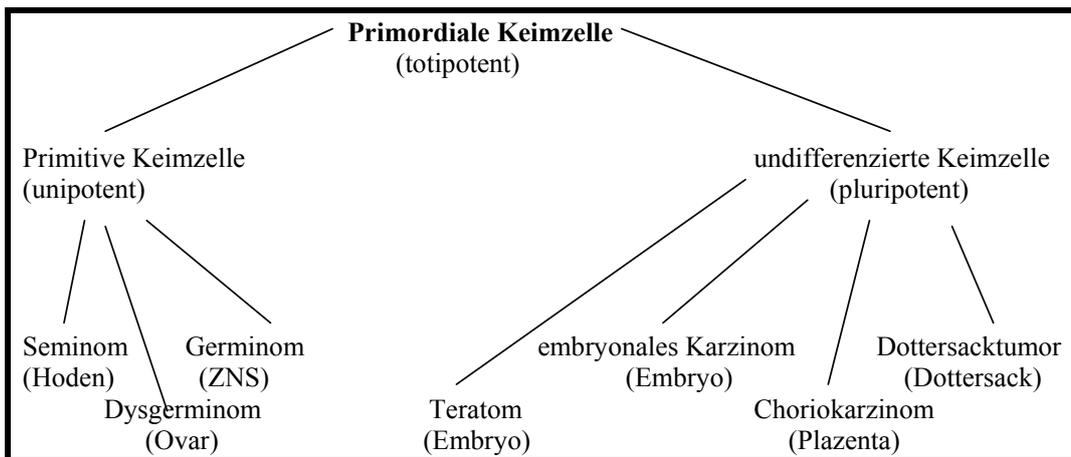


Abbildung 2: Schematische Darstellung wichtiger Differenzierungsrichtungen der primordiales Keimzelle und neoplastischer Transformationen in Anlehnung an TEILUM.<sup>116</sup>

In der frühen Embryonalentwicklung wandern die primordiales Stammzellen von der Basis der Allantois, beziehungsweise des Dottersacks, entlang der Mittellinie des Körpers zu den Gonadenanlagen<sup>72</sup>, welche sich zu dieser Zeit noch weit nach kranial erstrecken.<sup>2, 121</sup> Gesteuert wird die Migration durch Wachstumsfaktoren wie den Stammzellfaktor mit seinem Rezeptor c-kit sowie durch das Chemokin SDF-1 mit seinem Rezeptor CXCR-4.

Primordiales Keimzellen können in der Maus am 6. bis 7. Tag der Embryoentwicklung zum ersten Mal nachgewiesen werden, beim Menschen erst in der 5. bis 6. Entwicklungswoche.<sup>113</sup> Extragonadal verbliebene Keimzellen sterben durch BAX-abhängige Apoptose, da ihnen die notwendigen Wachstumsfaktoren zum Überleben fehlen.

Nach Besiedelung der Gonaden werden die Keimzellen als Gonozyten bezeichnet. Sie differenzieren sich weiter zu Oozyten und Prä-Spermatozyten.

Wie in embryonalen Stammzellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozysten gewonnen werden können, so ist auch in primordiales Keimzellen und in bestimmten Keimzelltumoren eine OCT3/4 Expression nachweisbar.<sup>66</sup>

Die Entwicklung extragonadaler Keimzelltumoren lässt sich als Störung der Keimzellmigration erklären, bei der primordiales Keimzellen die Gonadenanlage nicht bevölkern und extraembryonal persistieren.<sup>24</sup> Diese Hypothese wird unterstützt durch aktuelle Untersuchungen des genomischen Imprinting von extragonadalen Keimzelltumoren. Sie zeigen einen Imprinting-Status, welcher unreifen primordiales Keimzellen während der Migration entspricht.<sup>123</sup>

### ***1.3 Epidemiologie und Klinik der Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter***

Keimzelltumoren können sich in allen Altersgruppen entwickeln.<sup>36</sup> Im deutschen Kinderkrebsregister der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) wird der Anteil von malignen Keimzelltumoren an allen malignen Tumoren bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren mit 3-4% angegeben, es wird eine Inzidenz von 0,5 Neuerkrankungen auf 100.000 Kinder pro Jahr angenommen.<sup>52</sup>

Die detaillierte Auswertung der im Rahmen der Therapieoptimierungsstudien für Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter (MAKEI und MAHO der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie GPOH) erfassten Patienten zeigt ein zweigipfeliges Verteilungsmuster hinsichtlich der Altersverteilung. Der erste Häufigkeitsgipfel wird bei Neugeborenen und Kleinkindern beobachtet, wobei es sich oft um extragonadale Tumoren handelt. Neugeborene erkranken gehäuft an Teratomen unterschiedlichen Reifegrads.<sup>36</sup> Maligne Dottersacktumoren, meist der Steißbeinregion, überwiegen im Säuglings- und Kleinkindalter.<sup>34</sup>

Während der Pubertät findet sich ein zweiter Häufigkeitsgipfel. In dieser Altersgruppe überwiegen die gonadalen Tumoren, welche histologisch als Seminome und nicht-seminomatöse Tumoren imponieren (Dottersacktumoren, Choriokarzinome und embryonale Karzinome, zum Teil mit zusätzlicher Teratomkomponente).

Schwangerschafts-assoziierte trophoblastäre Tumoren, zystische Ovarialteratome und spermatozytische Seminome sind Keimzelltumorerkrankungen überwiegend des erwachsenen Menschen.

Ebenso findet sich in Abhängigkeit vom Alter eine unterschiedliche Geschlechtsverteilung. Bei Säuglingen mit Keimzelltumoren ist die Geschlechtsverteilung relativ ausgewogen (männlich 0,63: weiblich 1). Im Kleinkindalter bis zum Eintritt der Pubertät lässt sich eine deutliche Mädchenwendigkeit feststellen (Verhältnis 2,5:1). Nach der Pubertät verschiebt sich das Verhältnis hin zum männlichen Geschlecht.<sup>101</sup>

Keimzelltumoren können sich an verschiedenen Lokalisationen manifestieren. Die häufigsten Lokalisationen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die überwiegende Mehrzahl tritt in den Gonaden oder entlang der Mittellinie des Körpers auf.

<b>Lokalisation</b>	<b>Häufigkeit (%)</b>
Hoden	17
Ovar	29
ZNS	21
Mediastinum	4
Steißbein	19
Andere	10

Tabelle 1: Verteilung der Lokalisationen von Keimzelltumoren bei Kindern bis 15 Jahre im MAHO und MAKEI Register.<sup>100</sup>

#### **1.4 Bedeutung eines Allelverlustes für Tumorentstehung und Prognose**

Die Entstehung von Tumoren ist nach unserem heutigen Wissen durch Veränderung im Genom der Tumorzellen bedingt. Während der Tumorprogression kommt es zu einer Akkumulation zahlreicher genetischer Veränderungen. Dieser liegt ein Ungleichgewicht von

schädigenden Faktoren (zum Beispiel Strahlung, alkylierenden Substanzen) und protektiven Faktoren (Tumorsuppressorgenen) zu Grunde.

Die Bedeutung der Tumorsuppressorgene liegt unter anderem in der Erhaltung der genomischen Integrität. Bei einer zellulären Schädigung, die zu einer dauerhaften Schädigung des Genoms führt, können Tumorsuppressorgene beispielsweise eine Apoptose induzieren oder einen Zellzyklusarrest bewirken, der die Möglichkeit zur Reparatur des Schadens eröffnen und die Weitergabe von Mutationen an Tochterzellen verhindern kann.

Für den vollständigen Verlust der Funktion eines Tumorsuppressorgens ist entsprechend der ‚two-hit‘ Hypothese des Kinderarztes Knudson in der Regel die Inaktivierung beider Allele erforderlich. Diese kann eintreten, wenn beide Allele mutiert sind. Alternativ kann ein Allel in mutierter Form vorliegen, während das andere Allel deletiert ist, oder es können beide Allele deletiert sein. Eine dritte Form der Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens kann in Form einer epigenetischen Inaktivierung vorliegen. Dabei kommt es durch eine Hypermethylierung der Promoter-DNA eines Tumorsuppressorgens zu einer Inaktivierung, ohne dass Sequenzänderungen oder Deletionen vorliegen.

Der Verlust eines Allels kann durch die Untersuchung von polymorphen Mikrosatellitenmarkern dargestellt werden. Dabei sind im normalen Vergleichsgewebe für diesen polymorphen Marker zwei Allele zu unterscheiden, während im korrespondierenden Tumorgewebe nur noch ein Allel nachweisbar ist. Dieser Befund wird als Verlust der Heterozygotie (loss of heterocycosity, LOH) bezeichnet und kann gemeinsam mit einer Mutation oder Promotermethylierung des anderen Allels zu einem vollständigen Funktionsverlust eines Tumorsuppressorgens führen.

### ***1.5 Therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Keimzelltumoren***

Die Behandlung von Keimzelltumoren ist abhängig von der Tumorlokalisation, der Histologie, dem Tumorstadium und dem Alter des Patienten. Bei malignen Keimzelltumoren wird die chirurgische Tumorsektion risikostratifiziert mit einer Chemo- und gegebenenfalls einer Strahlentherapie kombiniert. Reine Teratome werden ausschließlich operativ behandelt, da sie kein metastatisches Wachstum zeigen und schlecht auf eine Radio- oder Chemotherapie ansprechen. Germinome und maligne nicht-seminomatöse Keimzelltumoren sprechen im Allgemeinen gut auf eine Chemotherapie an.

Die gebräuchlichen Chemotherapieprotokolle enthalten Carboplatin oder Cisplatin und Etoposid, die mit Ifosfamid oder Bleomycin kombiniert werden. Durch die Intensivierung der Chemotherapie ist eine Verkürzung der Chemotherapiezeit unter Beibehaltung der hohen Heilungsraten möglich geworden. Es wird angenommen, dass so die Nebenwirkungsrate und die Spätfolgen reduziert werden können.<sup>36</sup>

Aufgrund der effektiven Chemotherapie haben prognostische Faktoren wie Histologie, Tumorstadium und Lokalisation für die malignen Keimzelltumoren des Kindesalters an Bedeutung verloren. Insbesondere bei den extragonadalen Tumoren wird derzeit die komplette Resektion des Tumors als wichtigster prognostischer Parameter angesehen.<sup>36</sup>

Der Erfolg einer Strahlentherapie ist abhängig von der histologischen Differenzierung. Germinome gelten als besonders radiosensitiv.<sup>16, 36</sup> Embryonale Karzinome, Choriokarzinome und Dottersacktumoren sind weniger strahlenempfindlich als Germinome und erfordern bei entsprechender Indikation (zum Beispiel ZNS-Tumor) eine höhere Strahlendosis.<sup>15</sup>

	Histologisches Grading	Tumormarker		Sensitivität gegenüber:		
		AFP	β-HCG	Chemo-	Strahlentherapie (Gy)	
Seminom, Germinom	Maligne	-	(+)	+++	+++	(24)
Embryonales Karzinom	Maligne	-	-	+++	+	(45)
Dottersacktumor	Maligne	+++	-	+++	+	(45)
Choriokarzinom	Maligne	-	+++	+++	+	(45)
Teratom: reif unreif	Benigne	-	-	-	(+)	(54)
	Potentiell maligne	(+)	-	?	(+)	(54)

Tabelle 2: Produktion von Tumormarkern und Ansprechen auf die jeweilige Therapie in Abhängigkeit von der Histologie (nach Göbel et. al.)<sup>36</sup>

Die Heilungsrate von malignen Keimzelltumoren liegt bei Kindern über 80%.<sup>8, 67, 69, 97</sup> Beim Vergleich der Lokalisationen haben die malignen gonadalen Tumoren mit einem ereignisfreien Überleben von über 90% die beste Prognose. Zu beachten ist aber, dass mehr als die Hälfte der Tumoren an extragonadalen Lokalisationen wie der Steißbeinregion oder dem Mediastinum auftreten. Hier können auch Heilungsraten von über 80% erzielt werden. Eine vergleichbar gute Prognose haben Erwachsene mit gonadalen Keimzelltumoren. Bei Erwachsenen ist jedoch die Prognose der extragonadalen malignen nicht-seminomatösen Keimzelltumoren als eingeschränkt zu betrachten, die Heilungsrate liegt bei konventioneller Chemotherapie unter 50%.<sup>10, 32</sup> In 25% der Keimzelltumoren des Erwachsenenalters und in circa 50% der Tumoren des Kindersalters lassen sich verschiedene histologische Komponenten in den Tumoren nachweisen. Die Prognose gemischtzelliger Keimzelltumoren hängt von dem Anteil des Tumors mit dem höchsten Malignitätsgrad ab.<sup>36</sup>

### **1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Keimzelltumoren zeigen unterschiedliche epidemiologische, klinische und pathologische Merkmale, welche mit unterschiedlichen chromosomalen Aberrationen korrelieren. Postpubertäre maligne Keimzelltumoren weisen am häufigsten ein Isochromosom 12p oder eine chromosomale Amplifikation an 12p auf. Diese Veränderungen werden als pathognomonischer genetischer Marker dieser Tumoren angesehen. Seltener finden sich

Zugewinne an Chromosom 7, 8 und 21q, Verluste an Chromosom 11, 13 und 18 und einige andere weniger häufige Imbalancen. Maligne Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter zeigen Imbalancen an Chromosom 1 (chromosomale Verluste an 1p und Zugewinne an 1q), Verluste an 6q und Zugewinne an 20q, während die typischen genetischen Veränderungen der postpubertären Tumoren (Isochromosom 12p oder Amplifikationen an 12p) fehlen.<sup>123</sup>

Bemerkenswerterweise hat keine andere chromosomale Aberration als der Verlust an 1p bei Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter in unterschiedlichen Studien eine solch hohe Variationsbreite hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens gezeigt. So wurden Deletionen an 1p in einer Häufigkeit von 10% bis zu 80% berichtet.<sup>11, 12, 51, 76, 85, 86, 87, 99, 102, 111</sup>

Beispielsweise weisen Untersuchungen mittels FISH (Fluoreszenz in-situ Hybridisierung) auf eine Frequenz von mehr als 80% an chromosomalen Deletionen an 1p36 bei Dottersacktumoren hin.<sup>51, 86, 110</sup>

Zytogenetische Studien und molekulargenetische Analysen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) zeigen hingegen eine deutlich geringere Häufigkeit von chromosomalen Verlusten an 1p, die zum Teil nur bei 45% lag. Häufiger finden sich jedoch Zugewinne am langen Arm von Chromosom 1q, so dass diskutiert wird, ob die FISH-Befunde als Fehlinterpretationen aufzufassen sind.<sup>49, 87</sup>

Daher ist zu diskutieren, inwieweit die unterschiedlichen Befunde auf die verschiedenen Untersuchungsmethoden wie Mikrosatellitenanalyse, FISH, CGH oder zytogenetische Analysen zurückzuführen sind. So ist zum Beispiel der distale Bereich von 1p aus technischen Gründen mittels CGH schwierig zu evaluieren.<sup>68</sup> Außerdem ist zu beachten, dass mit einigen Methoden nur eine chromosomale Imbalance, nicht aber der Verlust eines Allels (LOH) nachgewiesen werden kann, der für die Pathophysiologie als entscheidend anzusehen ist. Diese Unterscheidung ist insbesondere relevant, da LOH an 1p bei anderen embryonalen Tumoren wie zum Beispiel Neuroblastomen oder Nephroblastomen einen wichtigen prognostischen Parameter darstellt.<sup>70</sup>

Angesichts dieser teilweise widersprüchlichen Daten, sowie der möglichen prognostischen Relevanz einer LOH an 1p36, stellt sich die Frage, wie häufig es sich bei den Imbalancen an 1p tatsächlich um eine echte LOH handelt. Außerdem ist es von Interesse, den regelhaft deletierten Bereich einzugrenzen, um auf diese Weise möglicherweise relevante Tumorsuppressorgene identifizieren zu können. Schließlich ist eine Korrelation zwischen LOH an 1p und dem klinischen Verlauf zu evaluieren, um eine mögliche prognostische Relevanz der LOH an 1p herausfinden zu können.

Für diese Untersuchung ist die biologische und klinische Heterogenität von Keimzelltumoren in Abhängigkeit vom Alter zu berücksichtigen, um eine Korrelation zwischen Histologie und LOH Befund prüfen zu können.<sup>83</sup> Aus diesem Grund, und um der biologischen Heterogenität der Keimzelltumoren gerecht zu werden, sind Keimzelltumorarten der verschiedenen klinischen und biologischen Gruppen in diese Studie eingeschlossen worden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Korrespondierende Gewebeproben aus Keimzelltumoren und Normalgewebe (Nebenhoden: in Paraffin eingebettete Proben, Blut-Leukozyten) wurden auf das Vorliegen eines Heterozygotieverlustes am Chromosom 1 untersucht. Insgesamt wurden 22 Patienten in die Studie eingeschlossen (12 männliche, 10 weibliche). Die Altersspanne reichte von 0 bis 197 Monate (Median: 68 Monate). Die Keimzelltumoren waren sowohl gonadal in Hoden (n=sechs) und Ovar (n=fünf, dabei ein Rezidiv), als auch extragonadal im Mediastinum (n=eins) und am Steißbein (n=acht) lokalisiert. Bei einem weiteren Tumor handelte es sich um ein Rezidiv eines Ovarialtumors mit Lokalisation im Perikard, bei einem weiteren Tumor um eine Lungenmetastase eines Hodentumors.

Bei 16 der 22 Tumorproben handelte es sich um nativ asserviertes und schockgefrorenes Gewebe, welches mit Unterstützung des BioCase Projektes des Kompetenznetzwerks

Pädiatrische Onkologie asserviert worden war. Die Patienten wurden entsprechend der MAHO 98, beziehungsweise der MAKEI 96 Therapieoptimierungsstudien für Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter behandelt. Vom Kindertumorregister in Kiel wurden 6 formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeprobe mit korrespondierendem Normalgewebe zur Verfügung gestellt. Alle Tumorproben wurden nach der WHO Klassifikation für Keimzelltumoren klassifiziert.<sup>77</sup> Der Reifegrad von immaturren Teratomen wurde entsprechend der Klassifikation von Gonzalez-Crussi et al. bestimmt.<sup>37</sup> Die klinischen und pathologischen Daten der Patienten sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Während der Untersuchung der Patientenproben waren keine Informationen bezüglich der Tumorart, des Alters bei Erkrankung und des Krankheitsverlaufes der jeweiligen Patienten bekannt.

Für die statistische Analyse und Präsentation wurden die Tumoren entsprechend ihrer Histologie eingeteilt in Teratome und maligne Keimzelltumoren sowie entsprechend des Alters in Tumoren des Kindesalters und des Erwachsenenalters.

Bei den 13 untersuchten Tumoren des Kindesalters handelte es sich um ein unreifes und drei reife Teratome (lokalisiert an Testis:1, Ovar:1, Steißbein:2), neun Dottersacktumoren (Lokalisation Testis:3, Steißbein:6) und zwei Mischtumoren mit Teratom- und Dottersackanteil. Die Gruppe der erwachsenen Patienten umfasste neun maligne Keimzelltumoren mit unterschiedlicher Histologie, darunter ein Choriokarzinom, ein Rezidiv eines Mischtumors aus Teratom- und Dottersackanteilen, zwei embryonale Karzinome (wobei es sich in einem Fall um eine Metastase handelte), ein reines Dysgerminom und vier gemischte maligne Keimzelltumoren (Lokalisation Ovar:4, Testis:2, Mediastinum:1, Rezidiv Perikard:1, Lungenmetastase:1).

In zwei Fällen wurden Metastasen von gonadalen Tumoren analysiert, ein ovarialer und ein testikulärer Tumor. Beide Tumoren wurden nach einer präoperativen Chemotherapie entfernt und analysiert.

Die Studie wurde im Rahmen eines von der Ethikkommission der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf begutachteten und genehmigten Forschungsprojektes durchgeführt.

Patient	Gewebe	Alter (Monate)	Geschlecht	Lokalisation	Histologie	Status
1	FFT	0	M	Steißbein	TER, YST	NED
2	FFT	0	M	Steißbein	TER	NED
3	FFPET	1	M	Testis	TER	NED
4	FFT	6	M	Testis	YST	NED
5	FFPET	9	M	Testis	YST	NED
6	FFT	14	W	Ovar	IT	NED
7	FFT	14	W	Steißbein	TER	n.d.
8	FFT	18	W	Steißbein	YST	NED
9	FFPET	20	M	Testis	YST	NED
10	FFPET	22	W	Steißbein	YST, TER	NED-2
11	FFPET	22	M	Steißbein	YST	NED
12	FFT	24	M	Steißbein	YST	NED
13	FFT	37	W	Steißbein	YST	NED
14	FFPET	94	M	Mediastinum	CHC	NED
15	FFT	114	W	Rezidiv Perikard Primär Ovar	Primärtumor YST/ TER	AWD
16	FFT	119	W	Ovar	YST, DYS, IT	NED
17	FFT	121	W	Ovar	DYS, CHC	NED
18	FFT	143	W	Ovar	IT, YST	NED
19	FFT	153	W	Ovar Rezidiv	DYS	NED-2
20	FFT	184	M	Testis	EC, CHC	NED
21	FFT	184	M	Lungenmetastase Primär Testis	EC	NED
22	FFT	197	M	Testis	EC	NED

Tabelle 3: Patientenkollektiv mit Angabe von Alter, Geschlecht, Lokalisation und Histologie des Keimzelltumors. TER, Teratom; YST, Dottersacktumor; EC, embryonales Karzinom; IT, unreifes Teratom; CHC, Choriocarcinom; DYS, Dysgerminom; FFT, nativ gefrorenes Gewebe; FFPET, Formalin fixiert; NED, no evidence of disease, kein Nachweis eines Rezidivs; n.d., no data, keine Daten; NED-2, nach Heilung eines Rezidivs kein erneutes Rezidiv; AWD, alive with disease, Patient lebt mit Erkrankung.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 LOH und Mikrosatellitenanalyse

LOH (Verlust der Heterozygotie) basiert auf der Untersuchung von polymorphen Markern des menschlichen Genoms, bei denen sich die Allele durch eine unterschiedlich lange Anzahl an kurzen repetitiven Sequenzen (short tandem repeats) unterscheiden. Hat ein Patient verschiedene Allele geerbt und ist somit für diesen Marker heterozygot, kann durch die

vergleichende Analyse des maternalen und paternalen Allels in Tumor- und Normal- DNA ein LOH für diesen Marker festgestellt oder ausgeschlossen werden.

Die LOH-Screening Methode hat sich in der Diagnostik vieler Tumoren als zuverlässig erwiesen. Sie stellt zudem bei einigen Tumoren einen wichtigen prognostischen Parameter dar. Als Beispiele sind die nicht-polypösen Kolonkarzinome sowie die Neuro- und Nephroblastome zu nennen.<sup>17,20</sup>

### **2.2.2 Geräte**

DNA Quantifizierung: Eppendorf Bio Photometer (Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge: Biofuge fresco Heraeus (Hanau, Deutschland)

PCR Gerät: Eppendorf Mastercycler gradient

Gelelektrophorese: Biorad wide mini sub cell GT (Hercules, California, USA)

Bio Rad Fluor-S Multimanager, Multi Analyst Version 1.1, Biorad

Biometra Trio heated lid/Trio Thermoblock (Göttingen, Deutschland)

Sequenzier: ABI Prism 310 Genetic Analyzer Applied Biosystem (Foster City, CA, USA)

GeneMapper 3.7 Software Applied Biosystems

### **2.2.3 Reagenzien/Pufferlösungen**

DNA Extraktion Frischgewebe: DNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

DNA Extraktion Blut: QIAamp Blood Kit (Qiagen)

DNA Extraktion Paraffingewebe: DNeasy Kit (Qiagen)

PCR: Primer: MWG Biotech (London, UK)

Mastermix: MgCl<sub>2</sub>, dNTP, Taq Polymerase (Qiagen)

Hot star Taq Polymerase (Qiagen)

Agarosegel: Längenstandard (1kb Plus, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Biozym LE Agarose (Hess, Oldendorf, Deutschland) in TAE Puffer  
(einfach) mit Ethidiumbromid (Sigma, Steinheim, Deutschland)

10 x Loading buffer (Sigma Aldrich, München)

50 fach TAE Puffer (1000 ml) enthält 242 g

Trishydroxymethylaminomethane, 57,1 ml 96% Essigsäure, 100 ml 0,5

EDTA ph 8, ad 1000 ml Aqua dest. (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe)

DOP PCR: Taq Polymerase (Roche, Mannheim)

1kb Plus-Standard (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Sequenzanalyse: HiDi-Formamid (Applied Biosystems, Foster City, CA)

GeneScan 400HD ROX Dye Standard (Applied Biosystems)

Die statistische Analyse erfolgte anhand des SPSS Software Pakets (Version 9, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Der Vergleich kategorischer Daten erfolgte mittels Chi-Quadrat Test.

#### **2.2.4 Gewebegewinnung**

Operativ gewonnenes Frischgewebe wurde in den jeweiligen Kliniken unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C asserviert. Die zentrale Archivierung erfolgte in Kooperation mit dem BioCase Projekt der Deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie<sup>29</sup> in der Tumorgewebebank der Kinderklinik in Düsseldorf. Parallel dazu oder zeitlich versetzt wurde von den Patienten EDTA antikoaguliertes Blut gewonnen. Weitere formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Tumorproben wurden vom Kieler Kindertumorregister zur Verfügung gestellt. Dabei wurden Proben ausgewählt, bei denen sowohl Tumorgewebe als auch gesundes Normalgewebe (z.B. Nebenhoden) für die Untersuchung vorhanden war.

Zur Bestimmung des Anteils an Tumorgewebe in den nativ gefrorenen beziehungsweise den formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebestücken wurden von allen Tumorproben Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte angefertigt. Bei einem Tumorzellgehalt von >80% wurde ein komplettes Gewebestück für die DNA Extraktion verwendet. Anderenfalls wurden tumoröse und nicht-tumoröse Gewebsanteile manuell voneinander disseziert.

### **2.2.5 DNA Extraktion aus Vollblut**

Die DNA Extraktion aus dem mit EDTA antikoagulierten Vollblut erfolgte gemäß den Herstellerangaben (QIAamp Blood Kit, Qiagen). 200µl Vollblut wurden mit 20 µl Protease und 200 µl Puffer AL versetzt, kurz gemischt und für 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl EtOH (100%) wurde das Gemisch auf Säulen gegeben und zentrifugiert. Die an die Säulenmembran gebundene DNA wurde zweimal mit 500 µl Puffer AW1, beziehungsweise 500µl Puffer AW2, gewaschen und danach mit 200 µl Aqua dest. eluiert. Die Proben wurden mittels UV-Spektroskopie quantifiziert und die Anwesenheit von hochmolekularer DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die gewünschte DNA Länge überprüft.

### **2.2.6 Manuelle Dissektion und DNA Extraktion aus Paraffinschnitten auf Objektträgern**

Zur Entparaffinisierung wurden die Gewebeschnitte auf Objektträgern zweimal in 50 ml Xylol entparaffinisiert und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 70%, Aqua dest.) rehydriert. Unter Verwendung eines parallelen Hämatoxyllin-Eosin gefärbten Paraffinschnittes als Vorlage wurden in dem Gewebeschnitt Areale mit Tumor- und Normalgewebe identifiziert, mit einer Rasierklinge vom Objektträger gelöst und in separate Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und das Gewebepellet getrocknet. Nach Trocknen des Gewebepellets wurden 180 µl Puffer ATL und Proteinase K (1,5 mg/ml) hinzugefügt, kurz gemischt und bis zur kompletten Lyse (circa 72 Stunden) bei 55 °C inkubiert, wobei nach 24 und 48 Stunden jeweils erneut Proteinase K hinzugegeben wurde (Proteinase K und Puffer ATL aus dem DNA Tissue kit, Quiagen).<sup>50</sup> Es folgte die DNA Extraktion nach dem DNeasy TissueKit (Qiagen).

### **2.2.7 DNA Extraktion aus Frischgewebe**

Bei Frischgewebe wurden circa 25 mg Gewebe zerkleinert und wie in 2.2.6 beschrieben mit Puffer ATL und Proteinase K für 2 Tage bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Puffer AL zugefügt und dann das Gemisch für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl EtOH (100%) wurde die Mischung auf Säulen gegeben und zentrifugiert. Die Waschschriffe und die DNA-Elution erfolgten wie in 2.2.5 beschrieben.

### **2.2.8 PCR mit degenerierten Oligonukleotid-Primern (DOP-PCR)**

Bei kleinen Gewebeprouben wurde die nach Dissektion von Paraffinschnitten gewonnene genomische DNA mittels DOP-PCR gleichmäßig amplifiziert, um eine ausreichende Menge Ausgangsmaterial zu erhalten. Zu einem PCR-Reaktionsansatz aus 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM Primer (5`CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3`, MWG) und 0,5 U Taq Polymerase wurden 10 ng Template-DNA zugefügt. Die PCR-Reaktion erfolgte über 5 min bei 95°C, gefolgt von 5 Zyklen aus 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 30°C und 1,5 min bei 72°C. Anschließend folgten 35 Zyklen aus 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 43°C, 1,5 min bei 72°C und eine finale Extension von 7 min bei 72°C.

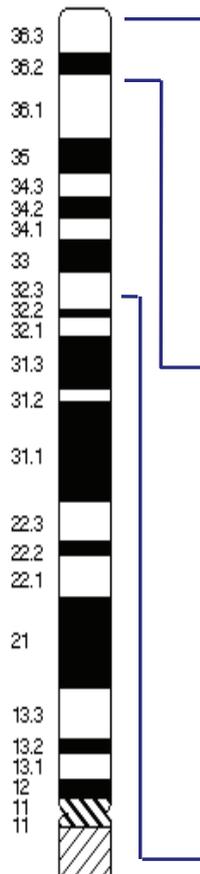
Zur Überprüfung der PCR-Effizienz wurden 5 µl PCR-Produkt mit 2 µl zweifachem Ladepuffer gemischt und in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Als Vergleichsstandard wurde der 1kb Plus-Standard (Invitrogen) verwendet.

Nach photometrischen Konzentrationsbestimmungen konnten die Proben in der LOH-PCR eingesetzt werden.

### **2.2.9 Mikrosatellitenanalyse**

Zur Bestimmung eines Heterozygotieverlustes am kurzen Arm von Chromosom 1 wurden vierzehn locusspezifische, (CA)<sub>n</sub> repetitive Mikrosatelliten-Marker mittels PCR-Amplifikation und anschließender fluoreszenzbasierter Fragmentanalyse untersucht.

11 Marker kartierten die Region von 1p36.1-1p36.3 und 3 Marker die Region von 1p32.3-1p35.2. Die Primer-Sequenzen und Marker-Lokalisationen wurden den Internet-Seiten des Human Working Drafts (<http://www.genome.ucsc.edu>, freeze Mai 2004) entnommen und sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die Marker wiesen eine durchschnittliche Distanz von 1.9 Mb distal und 10.5 Mb proximal auf. Alle forward Primer waren markiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-FAM).



	Lokalisation	Primer forward/ rewind	Größe (bp)
D1S243	1p36.33	CACACAGGCTCACATGCC GCTCCAGCGTCATGGACT	142-170
D1S468	1p36.32	AATTAACCGTTTTGGTCCT GCGACACACACTTCCC	173-191
D1S2660	1p36.32	CACACATGCACATGCAC AGTGACACCAGCAGGG	221-261
D1S2795	1p36.31	TAGTTGGATTAGACACGGC GAGACCCTGATGACTGTGG	190-224
D1S2870	1p36.31	GATCATGCCAATGCACTAT CCAGGGTGACACAGCA	190-212
D1S450	1p36.22	GCTCCAATGTCCAAGGG GGTACTCAGATGGCTGGT	243-267
D1S244	1p36.22	GAGCAGCACCGTACAAAT AGCTCCGCTCCCTGTAAT	285-296
D1S2667	1p36.22	AGCTTCAGGTCTGGGGGACA CTGGGTTTACCCTCCAGCGA	224-272
D1S507	1p36.21	AGGGGATCTTGGCACTTGG CTCTAGGGTTTCTGAAAAATGCTG	183-203
D1S2644	1p36.21	TGCAACCCACCTGAATGA TACGTGAAGTGCCAGCACA	215-231
D1S2843	1p36.12	GGGCTGGGCATTACACAAC ATCAAATTGGCTTCTCACCG	178-187
D1S247	1p35.2	CAGATGGCCCCACCTC AAGCAAAAACATTCTAGGGGTG	243-263
D1S2892	1p34.3	CCTGGGCAACATGGCAAG TGGGACCACAGAGCCACC	93-129
D1S427	1p32.3	CAGCCTGGGCCGCTTA CCTACTTATGTCTTTTGGTTGGGA	275-297

Tabelle 4: Verwendete Mikrosatelliten-Marker mit Angabe der zytogenetischen Lokalisation auf Chromosom 1, Primersequenzen und möglichen Fragmentlängen der PCR-Produkte.

### 2.2.10 PCR- Amplifikation der polymorphen Marker auf Chromosom 1p

Zu einem PCR-Reaktionsansatz aus 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,5 μM forward Primer (6'-FAM markiert, MWG), 0,5 μM reverse Primer (MWG) und 0,5 U Taq Polymerase wurden 10 ng Template-DNA hinzugefügt. Mit Aqua dest. wurde das Gemisch bis zu einem Gesamtvolumen von 20 μl aufgefüllt. Für alle Primer wurden "Touch-down"-PCR-Bedingungen gewählt, wobei die Annealing-Temperatur mit jedem Zyklus um 1°C von 63°C auf 54°C reduziert wurde. Die PCR-Reaktion umfasste 5 min bei 95°C, gefolgt von 10 Zyklen aus 30 sec bei 94°C, 30 sec bei der entsprechenden Annealingtemperatur (63°C-54°C) und 30 sec bei 72°C. Anschließend folgten 26 Zyklen aus 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 54°C, 30 sec bei 72°C und eine finale Extension von 2 min bei 72°C.

Zur Überprüfung der Fragmentlängen und der Effizienz der PCR-Amplifikation wurden 5 μl PCR-Produkt mit 2 μl zweifachem Ladepuffer versetzt und im Vergleich zu einem Längenstandard (1kb Plus, Invitrogen) im 1% Agarosegel (30 min bei 90 Volt) aufgetrennt. Für das Agarosegel wurden 2 μl Ethidiumbromid, 100 ml einfacher TAE Puffer und 1% Agarose verwendet. Die DNA wurde durch das im Gel enthaltene Ethidiumbromid sichtbar gemacht und unter UV-Licht fotografiert. Für die nachfolgende Fragmentanalyse wurde die Intensität der Banden der PCR-Produkte im Agarosegel als Maßstab der Verdünnung mit H<sub>2</sub>O für die Kapillarelektrophorese herangezogen. So wurden PCR Produkte mit starken Banden im Verhältnis 1:10 verdünnt, mit schwachen Banden hingegen unverdünnt verwendet. Ein Beispiel für den jeweils gewählten Verdünnungsfaktor ist in Abbildung 3 dargestellt.

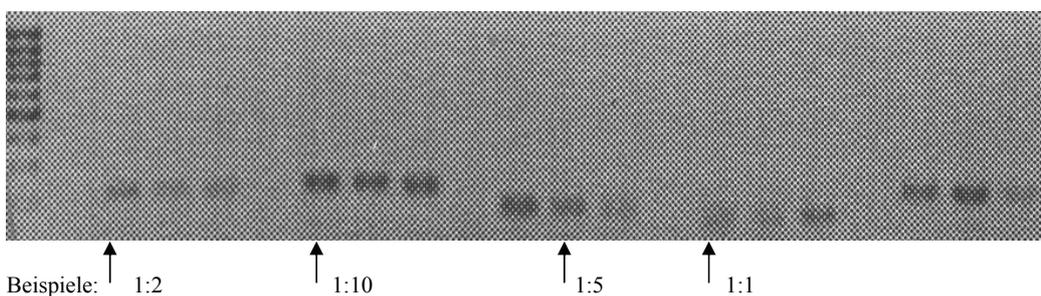


Abbildung 3: Beispiele für den Verdünnungsfaktor, abhängig von der Intensität der Banden im Agarosegel, je ausgeprägter die Bande im Gel, desto höher der Verdünnungsfaktor für die Sequenzeranalyse.

### **2.2.11 Automatisierte Fragmentanalyse**

Für die Fragmentanalyse wurden zu 12 µl HiDi-Formamid 1 µl (verdünntes) PCR-Produkt und 0,5 µl Längenstandard zugefügt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mittels Kapillar-Gelelektrophorese in einem ABI 310 Sequenzierer aufgetrennt. Die Zusammenstellung und Auswertung der Daten erfolgte mit der GeneMapper 3.7 Software. Diese generiert Informationen über die Länge und die Peakhöhe der aufgetrennten Fragmente und ermöglicht damit einen quantitativen Vergleich verschiedener Reaktionsprodukte. Der Vorteil der Kapillargelelektrophorese liegt in ihrer sehr hohen Auflösung, die Unterschiede von einem Basenpaar erkennbar werden lässt. Darüber hinaus erlaubt die entsprechende Software eine exakte Übertragung der Signalintensitäten in Zahlenwerte für die Berechnung des LOH-Index.

### **2.2.12 Quantifizierung und verwendete Schwellenwerte**

Für die Quantifizierung der Signalintensitäten kann grundsätzlich entweder die Höhe eines Kurvenausschlages (Peak) oder die Fläche unter der Kurve beurteilt werden. Dabei haben unsere Auswertungen gezeigt, dass sich zwischen beiden Berechnungsarten kein signifikanter Unterschied ergibt. Daher wurden die Analysen auf der Grundlage der jeweiligen Peak-Höhe durchgeführt. Die Daten wurden in Exeltabellen (Microsoft) zusammengetragen und der LOH-Index anhand der folgenden Formel berechnet:

$$\text{LOH}_{\text{index}} = T1/T2 / N1/N2$$

Dabei entsprechen die einzelnen Parameter den jeweiligen Peak-Höhen für das kurze und lange Allel im Tumorgewebe (T1 und T2) beziehungsweise im Normalgewebe (N1 und N2). Als Grenzwerte für das Vorliegen einer LOH im Tumorgenom wurden LOH-Indices von  $\geq 1,5$  bzw.  $\leq 0,5$  (abhängig vom Verlust des längeren oder kürzeren Allels) verwendet. Zeigte nur ein einzelner Marker einen Allelverlust, während benachbarte Marker retiniert waren, wurde die Analyse für die betreffenden Marker wiederholt. Zur Bestimmung der gesamten

Ausdehnung einer deletierten Chromosomenregion wurden sowohl die sicher deletierten Marker als auch die interstitiell gelegenen, nicht-informativen Marker innerhalb der aberranten Region berücksichtigt. Eine gepaarte Normalgewebe- und Tumorprobe wurde als aussagekräftig und analysierbar gewertet, wenn mindestens fünf Marker in der Normal-DNA Heterozygotie aufwiesen. Aufgrund mangelhafter DNA-Qualität, beziehungsweise einer nicht ausreichenden Anzahl heterozygoter Marker, mussten vier Tumoren von der Analyse ausgeschlossen werden. Diese sind entsprechend in Tabelle 3 nicht berücksichtigt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Methodenentwicklung

Die extrahierten DNA Produkte aus Normal- und Paraffingewebe wurden zunächst auf ihren DNA Gehalt geprüft, dann mit einem Testprimer mit Hilfe einer PCR amplifiziert und auf ein Agarosegel aufgetragen, um so die optimale DNA Menge für die nachfolgenden Analysen zu bestimmen. Abbildung 4 (linke Seite) zeigt exemplarisch das Ergebnis einer PCR bei Einsatz zu hoher DNA Mengen (zwischen 20-60 ng). Es zeigt sich – offensichtlich durch unspezifische Primerbindung und Amplifikation – ein DNA-Smear bis hin zu hochmolekularer DNA, der die spezifische Bande nicht erkennbar werden lässt. Die optimale DNA Menge für die PCR lag bei 10 ng (rechte Seite der Abbildung).

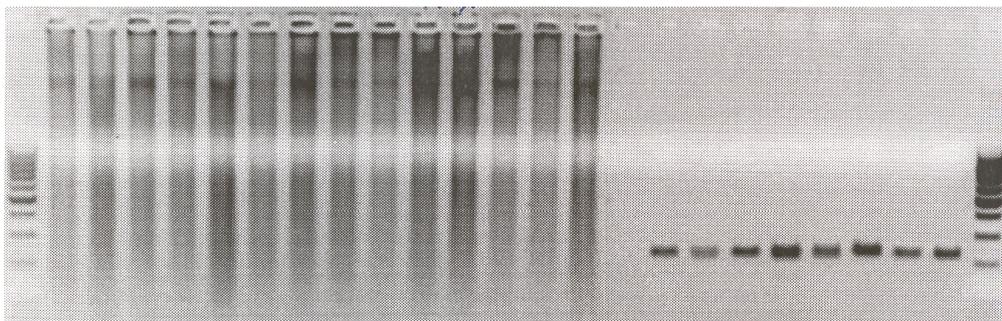


Abbildung 4: Links eine PCR mit DNA Mengen über 20ng, rechts eine PCR mit 10 ng DNA Menge.

Zur Optimierung der PCR verwendeten wir unterschiedliche Polymerasen und PCR Ansätze. Zunächst amplifizierten wir die Blut-DNA der Patienten mit dem Enzym Taq Polymerase (Mastermix, Qiagen). Für einen PCR Ansatz verwendeten wir 10 ng DNA Produkt, 10 µl Mastermix, 0,5 µM forward Primer (6'-FAM markiert, MWG) und 0,5 µM reverse Primer (MWG). Der PCR Reaktionsansatz wurde bis auf 20 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Wir testeten unterschiedliche Annealingtemperaturen zur Amplifikation der PCR Ansätze. Als Richtwert wurde dabei eine Annealingtemperatur gewählt, die 5 Grad unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer lag. Ausgehend von dieser Temperatur wurde die optimale Annealingtemperatur ausgetestet, jeweils mit einem PCR Ansatz +/-2 °C der ermittelten Temperatur.

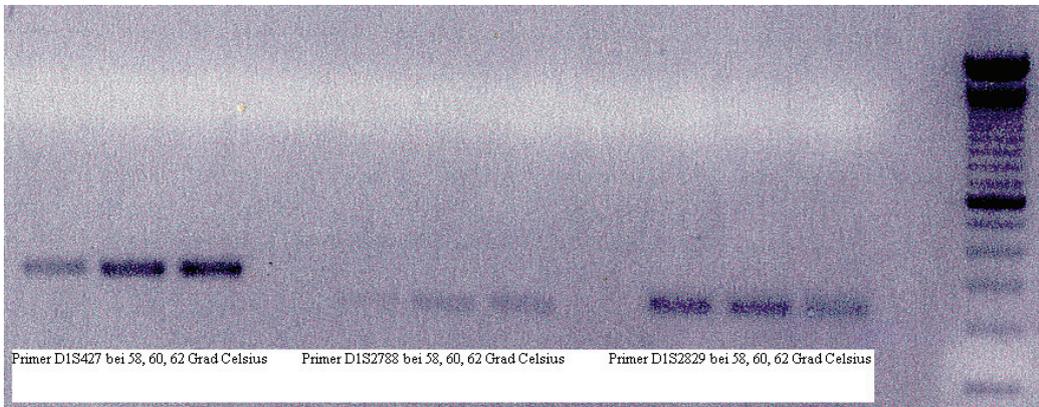


Abbildung 5: Beispiele für PCR Ergebnisse bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen.

Unter diesen PCR Bedingungen liessen sich zunächst nicht alle DNA Produkte erfolgreich amplifizieren. Das PCR Produkt wurde mit Hilfe eines Agarosegels und die gewünschte DNA Länge mit Hilfe eines Längenstandards (1kb Plus, Invitrogen) überprüft.

Zeigte sich keine Bande im Agarosegel oder aber eine Bande der falschen DNA Länge, wurde die PCR mit der Taq Polymerase der Firma Qiagen wiederholt (Beispiel siehe Abbildung 6 und 7). Hier enthielt ein PCR Reaktionsansatz 0,1 µl Polymerase, 2 µl Puffer, jeweils 1,6 µl Primer, 0,4 µl DNTP und 10 ng DNA Template. Alternativ wurde einem Reaktionsansatz die so genannte Q Solution (Quiagen, 10% des PCR Ansatzes) beigefügt und mit einem

Reaktionsansatz ohne Q Solution verglichen. Beide Reaktionsansätze wurden mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt. Weiterhin wurden verschiedene Magnesium-Konzentrationen im Reaktionsansatz verglichen.



Abbildung 6: Primer D1S243 mit Mastermix, Qiagen, Annealingtemperatur 56 °C mit verschiedenen Blut-DNA-Proben von Patienten.

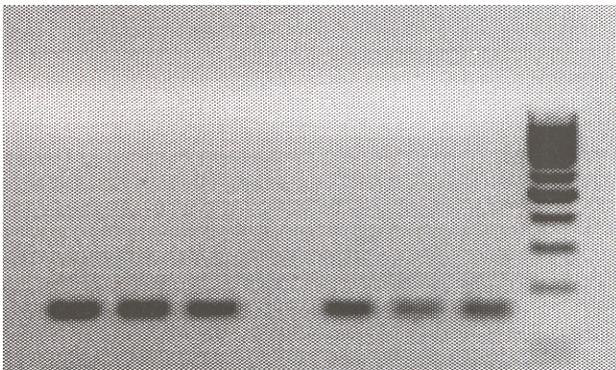


Abbildung 7: Primer D1S243 mit Hot Star Taq, Qiagen, Annealingtemperaturen 56, 58, 60 °C jeweils mit einer Blut-DNA-Probe von einem Patienten, links ohne Zusatz von Q Solution, rechts mit Zusatz von Q Solution.

Mit manchen Primern liess sich die gewünschte DNA jedoch trotz geänderter PCR-Bedingungen nicht amplifizieren. Wenn dieses bei einem Tumor für verschiedene Primerpaare zu beobachten war, so wurde eine mangelhafte DNA-Qualität angenommen und eine erneute DNA-Extraktion vorgenommen. Bei konstant ungünstigem Ergebnis wurde dieser Tumor von der Analyse ausgeschlossen.

Im Vergleich der verschiedenen PCR Bedingungen haben sich die konstantesten Ergebnisse mit der so genannten Touch-down PCR erzielen lassen. Diese Methode ermöglichte es, für

alle Primer einen einheitlichen PCR-Reaktionsansatz zu verwenden. Zu einem PCR-Reaktionsansatz fügten wir nun 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,5 µM forward Primer (6'-FAM markiert, MWG), 0,5 µM reverse Primer (MWG), 0,5 U Taq Polymerase (Qiagen) und 10 ng Template-DNA hinzu. Der Großteil der hier vorgestellten Ergebnisse ist mit dieser Methode erzielt worden.

### 3.2. *Teratome im Vergleich zu Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen*

Von den vier untersuchten Kindern mit Teratomen im Alter von 0, 1, 14 und 14 Monaten wies kein Tumor mit der hier vorgestellten Methodik einen Verlust am kurzen Arm des Chromosoms 1 auf.

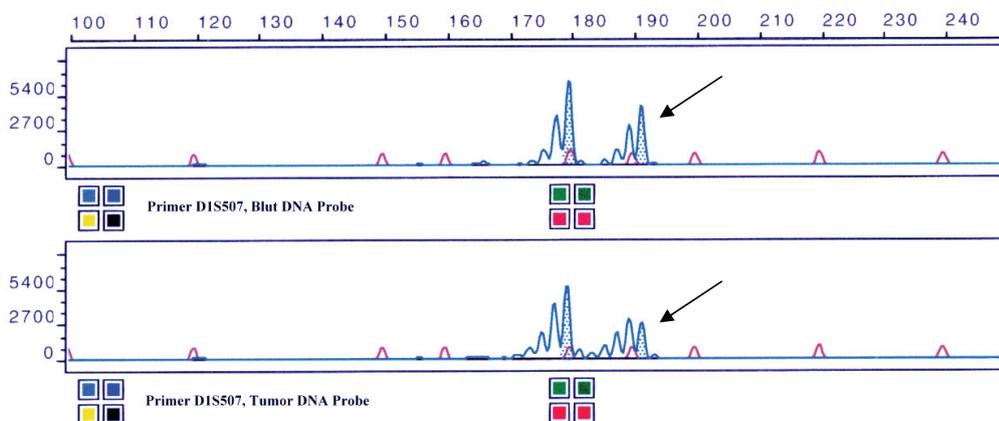


Abbildung 8: Patient mit Teratom, kein LOH. Für die quantitative Analyse wurde immer das längste PCR Produkt (in der Auftrennung am weitesten rechts) analysiert, da die kürzeren Banden aufgrund der short tandem repeats und die dadurch bedingten Lesefehler der Taq Polymerase generiert werden.

Von den malignen Keimzelltumoren bei Kindern im Alter zwischen 0 und 37 Monaten fand sich in 8 von 9 Fällen ein LOH an Chromosom 1p36 (89 %). In dem einen Fall, in dem sich keine Deletion an Chromosom 1p nachweisen ließ, handelte es sich um einen Tumor mit gemischter Histologie, bestehend aus Dottersack- und Teratomanteilen. Daher ist zu vermuten, dass selbst bei Vorliegen einer LOH im Dottersackanteil diese aufgrund der Verdünnung der DNA und dem überwiegenden Teratomanteil des Tumors nicht detektierbar war.

In der Mehrzahl der Fälle ist ein umfangreicher Teil von 1p deletiert, der mehrere subtelomere Banden, oft den gesamten kurzen Arm des Chromosoms 1, umfasst. Der gemeinsam deletierte Bereich auf Chromosom 1p aller untersuchten Patienten mit malignen Keimzelltumoren wird durch Patient Nummer 10 eingegrenzt. Somit lässt sich der Bereich auf die 1p36.1 Region bis zum terminalen Ende des Chromosoms 1p beschränken, mit einem proximalen Ende in Nachbarschaft der Marker D1S450 und D1S2870.

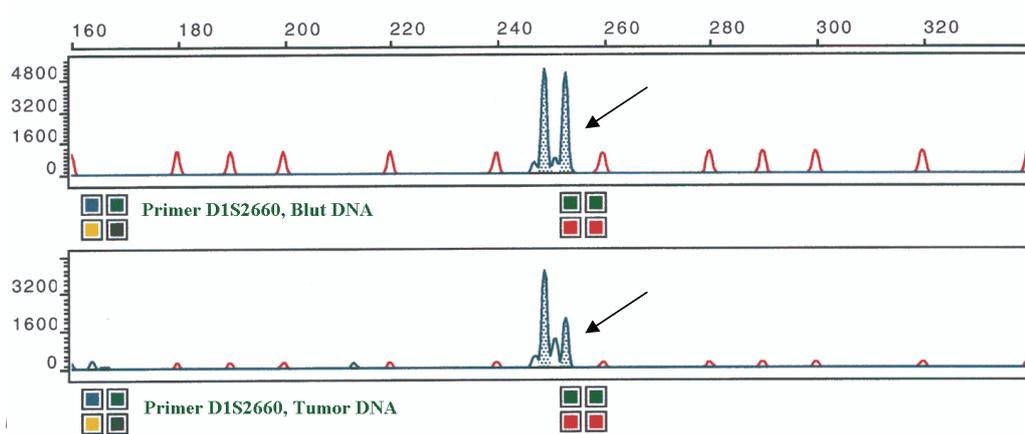


Abbildung 9: Beispiel für einen Dottersacktumor mit signifikantem LOH-Index.

### 3.3 *Maligne Keimzelltumoren bei Jugendlichen und Erwachsenen im Vergleich zu malignen Keimzelltumoren bei Kindern*

Im Gegensatz zu einer LOH Rate von 89% an Chromosom 1p36 bei malignen Keimzelltumoren bei Kindern wiesen nur zwei von neun malignen Keimzelltumoren bei Jugendlichen und Erwachsenen im Alter von 94 bis 197 Monaten ein LOH auf, was einer Rate von 22% entspricht. In der Abbildung 10 sind alle Untersuchungsergebnisse in einer tabellarischen Form dargestellt.

Beide Tumoren wiesen einen ungünstigen Krankheitsverlauf auf. Die Patientin Nummer 15 litt an einem ovarialen Keimzelltumor mit Teratom- und Dottersackanteil und entwickelte ein thorakales Rezidiv kurz nach Beendigung der Chemotherapie. Die Patientin Nummer 19 war an einem ovarialen Dysgerminom erkrankt und entwickelte nach der Tumorresektion ein peritoneales Rezidiv.

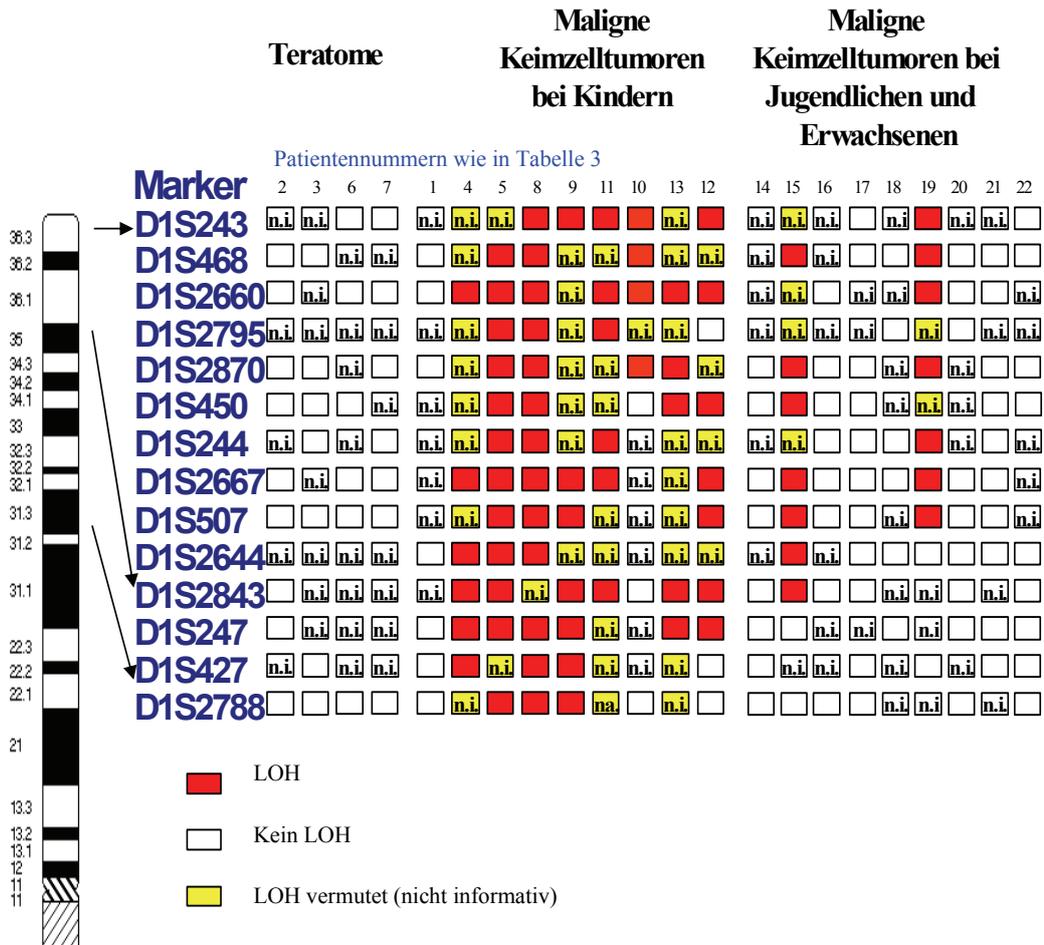


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse.

In der linken Spalte sind die untersuchten Mikrosatelliten entsprechend ihrer Lokalisation auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 aufgelistet. Die telomernahen Marker sind oben und die zentromernahen Marker unten aufgeführt. Jede Spalte entspricht einem Patienten, sortiert nach Histologie und Alter. Die Nummerierung der Patienten entspricht der Nummerierung in Tabelle 3. Ein LOH wird als rot ausgefülltes Kästchen dargestellt. Mikrosatelliten ohne Allelverlust werden durch ein weißes Kästchen symbolisiert. Nicht informative Marker in Nachbarschaft oder zwischen zwei Markern mit LOH werden als gelbe Kästchen dargestellt und als nicht informativ (n.i.) bezeichnet.

### 3.4 Korrelation mit klinischen Verlaufsdaten

Von den 22 untersuchten Patienten sind 18 nach Ersterkrankung und Heilung des

Keimzelltumors bis heute rezidivfrei. Zwei Patienten erlitten ein Rezidiv nach Behandlung

der Ersterkrankung, beide sind derzeit nach erneuter Therapie in anhaltender Zweitremission.

Ein Patient lebt aktuell unter Therapie mit einem unreifen Teratom. Von einem weiteren Patienten mit einem Teratom gibt es leider keine aktuellen Daten.

Patient	Alter (Monate)	Geschlecht	Lokalisation	Histologie	LOH 1p	Status
1	0	M	Steißbein	TER, YST	Nein	NED
2	0	M	Steißbein	TER	Nein	NED
3	1	M	Testis	TER	Nein	NED
4	6	M	Testis	YST	Ja	NED
5	9	M	Testis	YST	Ja	NED
6	14	W	Ovar	IT	Nein	NED
7	14	W	Steißbein	TER	Nein	n.d.
8	18	W	Steißbein	YST	Ja	NED
9	20	M	Testis	YST	Ja	NED
10	22	W	Steißbein	YST, TER	Ja	NED-2
11	22	M	Steißbein	YST	Ja	NED
12	24	M	Steißbein	YST	Ja	NED
13	37	W	Steißbein	YST	Ja	NED
14	94	M	Mediastinum	CHC	Nein	NED
15	114	W	Rezidiv Perikard Primär Ovar	Primärtumor YST/ TER	Ja	AWD
16	119	W	Ovar	YST, DYS, IT	Nein	NED
17	121	W	Ovar	DYS, CHC	Nein	NED
18	143	W	Ovar	IT, YST	Nein	NED
19	153	W	Ovar Rezidiv	DYS	Ja	NED-2
20	184	M	Testis	EC, CHC	Nein	NED
21	184	M	Lungenmetastase Primär Testis	EC	Nein	NED
22	197	M	Testis	EC	Nein	NED

Tabelle 4: Zusammenfassung der klinischen Daten und der Ergebnisse der LOH Analyse.

Von den achtzehn untersuchten Patienten mit Keimzelltumoren, welche bis heute rezidivfrei sind, weisen sieben (39%) ein LOH an 1p36 auf. Bei den 11 Patienten ohne LOH handelte es sich in drei Fällen um ein Teratom, in zwei Fällen um ein Teratom mit Dottersackanteil, in zwei Fällen um ein embryonales Karzinom, ein Choriokarzinom und drei gemischte Tumoren.

Von den Patienten mit Dottersacktumor und LOH an 1p36 hat nur ein Patient ein Rezidiv erlitten, alle Patienten mit Dottersacktumor leben und sind aktuell tumorfrei.

## 4. Diskussion

### 4.1 Biologische Heterogenität von Keimzelltumoren

Keimzelltumoren sind hinsichtlich ihrer klinischen, pathologischen und genetischen Eigenschaften eine äußerst heterogene Gruppe von Tumoren.

Um dieser Heterogenität gerecht zu werden, hat die WHO 2004 eine Klassifikation der testikulären Keimzelltumoren publiziert, in der aktuelle histologische, immunhistochemische und genetische Untersuchungen berücksichtigt werden.<sup>122</sup> Diese Klassifikation berücksichtigt außerdem die zystischen Ovarialteratome (sogenannten Dermoidzysten), die testikulären spermatozytischen Seminome sowie die schwangerschaftsassozierten trophoblastären Tumoren (Blasenmole, Choriocarcinoma in graviditate) als eigene Krankheitsentitäten.<sup>64, 82</sup>

Es werden fünf klinische und biologische Gruppen von Keimzelltumoren unterschieden:

#### **Typ 1: Teratome und Dottersacktumoren des Säuglings- und Kindesalters:**

Diese treten meist an extragonadalen Lokalisationen nahe der Mittellinie auf, wie zum Beispiel Steißbein, Retroperitoneum, Nacken, Hypophyse-Hypothalamus-Region oder Pinealis, seltener in den Gonaden (Testis oder Ovar). Die Tumoren zeigen einen (zumindest partiellen) Verlust des genomischen Imprinting. Teratome sind diploid und zeigen keine chromosomalen Aberrationen. Dottersacktumoren sind in der Regel aneuploid und zeigen als typische chromosomale Veränderungen Zugewinne an 1q und 20q, sowie Verluste an 1p, 4 und 6q. Diese Veränderungen sind unabhängig von der Tumorlokalisierung.<sup>76, 85, 87, 98</sup>

#### **Typ 2: Seminomatöse und nicht-seminomatöse Keimzelltumoren des Jugendlichen und**

**Erwachsenenalters:** Diese Tumoren sind meist in den Gonaden (Hoden beziehungsweise Eierstöcke) lokalisiert und machen bei Männern zwischen 20 und 40 Jahren 60% aller malignen, nicht hämatopoetischen Erkrankungen aus, in >10% der Fälle entwickeln sie sich an extragonadalen Stellen. Keimzelltumoren des Hodens werden von einigen Arbeitsgruppen zum testikulären Dysgenesiesyndrom gerechnet, welches zudem durch Kryptorchismus und

testikuläre Atrophie gekennzeichnet ist.<sup>104, 105</sup> Histologisch handelt es sich in etwa der Hälfte der Fälle um reine Seminome (medianes Alter 35 Jahre bei Diagnosestellung), seltener um maligne Nicht-Seminome (medianes Alter 25 Jahre) und reine Teratome. Maligne Nicht-Seminome sind im klinischen Verlauf meist aggressiver als Seminome, sie zeichnen sich durch eine besondere Sensitivität gegenüber Chemo- und Radiotherapie aus. In 20% der Fälle handelt es sich um Mischtumoren (zum Beispiel mit embryonalen Karzinomanteilen, Teratom-, Dottersacktumor- oder Choriokarzinomanteilen). Das genomische Imprinting ist (zumindest partiell) verloren gegangen. Besonders für die Nicht-Seminome ist ein aneuploider, di-, tri- oder tetraploider Chromosomensatz charakteristisch.<sup>58, 81, 92</sup> Die typischen chromosomalen Veränderungen der Seminome und Nicht-Seminome sind Verluste an Chromosom 4, 5, 11, 13, 18 und Y und Gewinne an 7, 8, und X. Der für diese Krankheitsentität charakteristische und pathognomonische genetische Marker ist ein Zugewinn von chromosomalem Material an 12p11-12, welcher in 80% der Fälle einem Isochromosom 12p entspricht.<sup>4, 66</sup> In den verbleibenden 20% der Tumoren ohne Isochromosom 12p zeigen die meisten eine hochgradige Amplifikationen von 12p Sequenzen, die zytogenetisch homogen angefärbten Chromosomenabschnitten (sogenannte homogeneously staining regions), zum Beispiel auf Markerchromosomen, oder double minutes entsprechen.<sup>94, 112</sup>

**Typ 3: Spermatozytische Seminome:** Diese seltenen Tumoren werden ausschließlich im Hoden diagnostiziert, meist bei älteren Männern.<sup>22, 23, 28</sup> Am häufigsten findet sich ein Zugewinn von chromosomalem Material an Chromosom 9.<sup>95</sup> Sie sind aneuploid. Als Ursprungszelle werden Spermatogonien oder Spermatozyten diskutiert, deren genomisches Imprinting bereits ein paternales Muster aufweist.

**Typ 4: Dermoidzyste:** Diese Tumorart kommt ausschließlich im Ovar vor, wird bei Kindern und Erwachsenen diagnostiziert und entspricht histologisch reifen zystischen Teratomen. Ursprungszellen sind Oogonien oder Oozyten mit maternalem Imprinting-Muster. Sie weisen einen iso-disomeren Chromosomensatz [(23X)x2] auf. Diese Tumoren können zwar eine erhebliche Größe erreichen, zeigen aber nahezu ausnahmslos einen benignen klinischen Verlauf und rezidivieren nur in seltenen Ausnahmefällen.

**Typ 5: Schwangerschafts-assoziierte trophoblastäre Tumoren:** Zu diesen werden die Blasenmole sowie das Choriocarcinoma in graviditate gerechnet. Sie treten ausschließlich in der Plazenta, beziehungsweise im Uterus, auf. Eine Blasenmole entwickelt sich aus einem unbefruchteten Ovum oder einem Spermatozoon, ist komplett paternalen Ursprungs und zeigt einen diploiden Chromosomensatz (46, XY bzw 46, XX). Das Choriocarcinoma in graviditate zeigt nicht selten einen foudroyanten und durch eine disseminiert metastatische Erkrankung charakterisierten Verlauf.

#### **4.2 Chromosomale Veränderungen an 1p bei unterschiedlichen Tumoren**

Deletionen an 1p werden für die Pathogenese vieler menschlicher Tumoren verantwortlich gemacht. In einer Studie mit 683 unterschiedlich soliden Tumoren ließ sich, abhängig von der Tumorart, ein chromosomaler Verlust am Chromosom 1p in 30-64% der Fälle nachweisen. Unter anderem wurden Mammakarzinome, Lungentumoren, endometriale und ovariale Tumoren, sowie Colonkarzinome untersucht. Verluste fanden sich hier vor allem an 1p36.3, 1p36.1, 1p35-34.3, 1p32 und 1p31.<sup>88</sup> Auch bei Hirntumoren wie Oligodendrogliomen und Astrozytomen lassen sich chromosomale Verluste an 1p nachweisen.<sup>7, 14, 33, 106</sup>

In der Gruppe der embryonalen Tumoren, zu denen unter anderem die Neuroblastome, Nephroblastome, Hepatoblastome, Medulloblastome aber auch die Dottersacktumoren gehören, werden ebenfalls gehäuft Deletion an 1p gefunden. In dieser Gruppe von Tumoren ist das Neuroblastom am eingehendsten untersucht worden. Bei ihm ist eine Deletion an 1p36

mit einer Amplifikation des MYCN-Onkogens assoziiert, kann aber auch isoliert auftreten, und korreliert mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf. Ebenso ist bei Nephroblastomen das Auftreten einer LOH 1p36 mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert.<sup>39</sup> Dieses gilt auch für solche Nephroblastome, die ansonsten der günstigeren Prognosegruppe zugerechnet werden würden.<sup>40</sup> In Hepatoblastomen ist ein LOH 1p mit dem embryonalen Subtyp korreliert, scheint aber – bei einer, im Vergleich zu anderen Studien, kleinen Fallzahl – nicht prognostisch relevant zu sein.<sup>119</sup> Ein LOH 1p scheint bei Medulloblastomen nur in seltenen Fällen vorzuliegen und ist nicht mit einer ungünstigen Prognose korreliert.<sup>124</sup>

Zusammenfassend finden sich somit Veränderungen am kurzen Arm des Chromosoms 1 in den verschiedenen embryonalen Tumoren in unterschiedlicher Häufigkeit, bei Neuro- und Nephroblastomen differenziert ein LOH an 1p die Tumoren in biologisch und prognostisch distinkte Untergruppen. Es ist zu vermuten, dass sich in dem deletierten Chromosomenabschnitt ein oder mehrere Tumorsuppressorgene befinden, die für progressionsassoziierte Veränderungen verantwortlich sind und zudem das Ansprechen der Tumoren auf die Therapie modulieren.<sup>70, 109, 115</sup>

#### ***Untersuchungen der chromosomalen Verlustrate an 1p bei Keimzelltumoren mit Hilfe unterschiedlicher Untersuchungsmethoden***

Chromosomale Verluste an 1p werden sowohl bei adoleszenten testikulären und ovariären, als auch bei präpubertären Keimzelltumoren nachgewiesen.<sup>11, 12, 76, 85, 87, 99, 102, 118</sup> Die Frequenz von chromosomalen Verlusten an 1p bei Keimzelltumoren variiert in den einzelnen Studien beträchtlich. In der bisher größten zytogenetischen Studie mit 81 Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters wird eine Deletion an 1p nur in einem von zwanzig Dottersacktumoren beschrieben, was einer Deletionsrate von 5% entspricht.<sup>11</sup> In einer anderen zytogenetischen Studie findet sich ein chromosomaler Verlust an 1p in fünf von sieben Dottersacktumoren, entsprechend einer Verlustrate von 71%.<sup>85</sup> Studien mit Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH), bei der zwei mit Hilfe verschiedener fluoreszierender Farbstoffe

markierte Sonden für Sequenzen in dem Bereich 1p36 und am Zentromer, beziehungsweise an 1q, eingesetzt werden, bestätigen die zytogenetischen Studien. Es wird eine relative Reduktion der 1p36 Signale im Vergleich zu den Signalen der Zentromer-Sonden oder 1q-Signale bei bis zu 80% der kindlichen Dottersacktumoren beschrieben.<sup>13, 51, 86, 110</sup>

Bei Analysen mit chromosomaler CGH konnten chromosomale Verluste an 1p deutlich seltener nachgewiesen werden. In einer Studie liegt die Deletionsrate um 45%, bei einer anderen Studie mit mediastinalen malignen Keimzelltumoren des Kindesalters bei 50%.<sup>87, 99</sup> In diesen CGH Studien finden sich neben Verlusten an 1p häufig Zugewinne an 1q, die zum Teil das Zentromer umfassen.<sup>99</sup>

Daher ist zu diskutieren, ob die Ergebnisse der vorangegangenen FISH-Studien aufgrund der Ergebnisse der CGH-Studien in Frage zu stellen sind, da möglicherweise eine Imbalance an Chromosom 1p fälschlicherweise im Sinne einer Deletion interpretiert werden, biologisch aber einem Zugewinn von chromosomalem Material am Zentromer und an 1q entsprechen könnte.<sup>87, 99, 123</sup> Zu beachten ist jedoch, dass die terminale Region von 1p mittels CGH aufgrund technischer Probleme nur sehr schwierig zu untersuchen ist.<sup>56</sup> Daher können Deletionen unter einer bestimmten Größe einer Detektion mit dieser Methode entgehen.<sup>123</sup>

Eine Möglichkeit, diese technischen Schwierigkeiten zu lösen, ist der Einsatz komplementärer Techniken, wie die zuletzt entwickelte ‚array CGH‘.<sup>123</sup> Bei einer Studie mit der zuletzt genannten Technik finden sich chromosomale Imbalancen an 1p bei kindlichen Dottersacktumoren in 50% der Fälle (4/8) mit einer minimal deletierten Region in dem Bereich zwischen 1p35 und dem Telomer.<sup>118</sup> Eine ergänzend zu der hier vorgestellten Mikrosatellitenanalyse durchgeführte Analyse der gleichen Tumoren mit der verbesserten chromosomalen ‚high resolution‘ CGH beschreibt in vier von fünf analysierten Dottersacktumoren einen chromosomalen Verlust an 1p mit einer gemeinsam deletierten Region im Bereich distal von 1p35. Dieser Bereich ist deckungsgleich mit den Ergebnissen

der ‚genome-wide array CGH‘ Studie und entspricht den in der hier vorgelegten Arbeit erzielten Ergebnissen.<sup>118, 123</sup>

Es ist zu beachten, dass die bisher dargestellten zyto- und molekulargenetischen Techniken ausschließlich chromosomale Imbalancen und Verluste darstellen können, nicht jedoch tatsächliche Allelverluste, die für den Funktionsausfall potentieller Tumorsuppressorgene entscheidend sind. Die Darstellung von tatsächlichen Allelverlusten gelingt mit der hier angewandten Mikrosatellitenanalyse.

Zwei zuletzt durchgeführte Mikrosatellitenanalysen zeigen ein LOH an 1p in fünf von elf und in sechs von acht untersuchten Keimzelltumoren. Bei beiden Studien sind jeweils nur zwei Mikrosatellitenmarker eingesetzt worden, so dass der deletierte Bereich auf dem Chromosom 1p nicht weiter eingegrenzt werden kann.<sup>48, 53</sup>

Insgesamt findet sich somit in Keimzelltumoren bei Einsatz verschiedener Untersuchungsmethoden eine Deletionsrate an 1p zwischen 5% und 80%, wobei diese zum Teil mit Zugewinnen an 1q korrelieren.

#### ***Vor- und Nachteile der Mikrosatellitenanalyse als Untersuchungsmethode***

Angesichts dieser diskrepanten Daten stellt sich nun die Frage nach der tatsächlichen Häufigkeit eines Allelverlustes an 1p bei Keimzelltumoren des Kindesalters. Diese Frage ist biologisch relevant, da Keimzelltumoren häufig poly- oder aneuploid sind, so dass eine chromosomale Imbalance nicht zwangsläufig mit einem Allelverlust verbunden sein muss. Dieser ist jedoch im Sinne der ‚two-hit‘ Hypothese für die Identifikation von potentiellen Tumorsuppressorgenen zu fordern.

Für die Untersuchungen von Allelverlusten an 1p wird in der hier vorgelegten Studie die Analyse von polymorphen Mikrosatellitenmarkern eingesetzt. Diese Methode hat sich in der molekularen Diagnostik von vielen Tumoren als zuverlässig erwiesen.<sup>17, 20</sup>

Mikrosatelliten entsprechen kurzen repetitiven Sequenzen, die sich über das gesamte Genom verteilt finden. Es wird angenommen, dass sich Mikrosatelliten von phylogenetisch sehr früh akquirierten, primitiven viralen Sequenzen ableiten. Da sie nicht-kodierenden Bereichen der DNA entsprechen, können eventuell auftretende Mutationen weitervererbt werden, ohne die Überlebensfähigkeit eines Organismus zu verändern. Auf diese Weise entsteht eine große Heterogenität. Diese nicht-kodierenden Bereiche liegen zwischen den Genen, aber auch innerhalb der Gene im Bereich der so genannten Introns, deren Informationen nicht in eine messenger-RNA (Boten-RNA) transkribiert und ein Protein translatiert wird.

Da Mikrosatelliten über das gesamte Genom verteilt sind, finden sie sich auch in räumlicher Nähe zu Onkogenen und/oder Tumorsuppressorgenen. Je enger die räumliche Nähe ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der nachweisbare Verlust der Heterozygotie eines Mikrosatellitenmarkers mit einem Verlust des benachbarten Gens korreliert, insbesondere wenn die auf beiden Seiten des Gens lokalisierten Marker deletiert sind. Dann kann der Verlust der kartierten Mikrosatelliten und somit der Verlust zum Beispiel eines relevanten Tumorsuppressorgens mit dem gehäuftem Auftreten von verschiedenen Tumorarten korrelieren.

Ein LOH eines spezifischen Markers lässt sich nur beurteilen, wenn der spezifische Marker in einem heterozygoten Zustand vorliegt (also ein Patient zwei unterschiedliche Allele geerbt hat), welcher durch Fragmente unterschiedlicher Größe darstellbar ist.

Im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden, wie zum Beispiel der CGH, ist als Vorteil zu nennen, dass die Mikrosatellitenanalyse nicht durch Hybridisierungsartefakte in subtelomeren Chromosomenabschnitten beeinflusst wird und man zudem einen echten Allelverlust erkennen kann. Als Nachteil ist zu erwähnen, dass sie nur in geringem Umfang dazu geeignet ist, andere chromosomale Veränderungen, wie zum Beispiel einen chromosomalen Zugewinn, zu erkennen. Somit ist die Ergänzung der LOH Analyse durch

komplementäre Untersuchungsmethoden wie die CGH sinnvoll, wie es in der Fortführung der hier vorgestellten Arbeit erfolgt ist.<sup>123</sup>

Im Gegensatz zur FISH-Technik erlaubt die Mikrosatellitenanalyse in der Regel nicht die Untersuchung auf Einzelzell-Ebene, es sei denn nach Mikrodissektion und DNA-Amplifikation. Daher kann in Tumoren mit inhomogenen Zellpopulationen ein LOH in einer Subpopulation der Tumorzellen durch Verdünnungseffekte unentdeckt bleiben. Aus diesem Grund sind bei der Auswahl der in dieser Studie untersuchten Tumoren nur Gewebeproben mit einem hohen Tumorzellanteil (>75%) berücksichtigt worden.

Die Mehrzahl der Keimzelltumoren sind poly- oder aneuploide Tumoren. Bei ihnen können chromosomale Gewinne einer Region einen Verlust der dazugehörigen homologen chromosomalen Region vortäuschen, da es im Vergleich von Normal- und Tumorgewebe zu einer Verschiebung der berechneten Ratio zwischen den beiden Allelen kommen kann. Dieses Problem kann unter anderem zum Teil dadurch minimiert werden, dass man bei Mikrosatellitenanalysen mit einem stringenten Grenzwert für das Vorliegen einer LOH arbeitet.<sup>123</sup> Daher wurden in dieser Studie stringente LOH-Indices von  $\geq 1,5$  beziehungsweise  $\leq 0,5$  (abhängig vom Verlust des längeren oder kürzeren Allels) verwendet.

Es wurden vierzehn polymorphe Mikrosatellitenmarker verwendet, um die deletierte Region auf Chromosom 1p genauer eingrenzen zu können. Durch die hohe Anzahl an Markern wurde der Bereich 1p36.1-36.3 mit einem durchschnittlichen Intervall von 1,9 Mb abgedeckt und die proximalere Region 1p13.2-35.2 mit einem Intervall von 6,9 Mb.

### ***Diskussion der Untersuchungsergebnisse***

In dieser Studie haben wir einen Allelverlust an 1p in acht von neun untersuchten malignen Dottersacktumoren des Kindesalters gefunden, entsprechend einer Verlustrate von 89%. Bei dem einzigen Dottersacktumor des Kindesalters ohne nachweisbaren LOH handelt es sich um einen Misch tumor mit einem histologisch überwiegenden Teratomanteil und nur wenigen

Anteilen an Dottersacktumor. Da Teratome fast ausschließlich einen normalen Chromosomensatz aufweisen, ist möglicherweise der Dottersacktumoranteil in der untersuchten Probe zu gering gewesen, so dass ein eventuell vorliegender LOH durch Verdünnung der Detektion entging.

Aufgrund der gewählten Untersuchungsmethode kann man bei den gefundenen Deletionen von einem wahren Allelverlust an Chromosom 1 ausgehen. Damit sind die entsprechend der ‚two-hit Hypothese‘ für die Identifikation von potentiellen Tumorsuppressorgenen geforderten Kriterien erfüllt.

Die hohe Häufigkeit der LOH an 1p lässt die besondere biologische Rolle eines Allelverlustes an 1p36 in der Pathogenese der malignen Keimzelltumoren bei Kindern erkennen und ist ein prägnanter Hinweis auf ein oder mehrere Tumorsuppressorgene in dieser Region.

Der gemeinsam deletierte Bereich erstreckt sich von 1p36.1 mit dem proximalen Ende in der Nachbarschaft der Marker D1S450 und D1S2870 bis zum terminalen Ende des Chromosoms 1p.<sup>123</sup>

Die bei Neuroblastomen regelhaft deletierte Region, welche mittlerweile auf einen Bereich kleiner als eine Megabase eingegrenzt werden konnte und mit einem prognostisch ungünstigeren klinischen Verlauf assoziiert ist, ist in der in dieser Studie bei malignen Keimzelltumoren gefundenen Region mit eingeschlossen. In dem bei Neuroblastomen deletierten Bereich wurden bisher zwei möglicherweise relevante Tumorsuppressorgene identifiziert, ein Calmodulin-bindender Transkriptionsfaktor, *CAMTA1*, in der Region 1p36.31-26.23, dem zur Zeit noch keine Relevanz bei der Tumorprogression zugeschrieben werden konnte<sup>5</sup> und das *FLJI0737* Gen.<sup>46</sup> Eine verminderte *CAMTA1* Expression korreliert in Neuroblastomen, auch unabhängig vom LOH 1p36 Status, mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf.<sup>47</sup> Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse wird ersichtlich, dass auch andere Mechanismen, wie geänderte Genexpressionsmuster, eine mögliche Relevanz für die Prognose eines Tumors haben können. Aktuelle Untersuchungen fokussieren auf einer

relevanten Koinzidenz von genetischen und epigenetischen Veränderungen am Chromosom 1p. Bis heute sind jedoch keine Mutationen gefunden worden.<sup>18</sup> In keiner bisher durchgeführten Studie ließ sich nachweisen, dass es sich bei der Entwicklung von Neuroblastomen um ein Zusammenwirken von Allelverlusten und epigenetischer Inaktivierung von Genen am Chromosom 1p handelt, so dass ein genomisches Imprinting eines Tumorsuppressors unwahrscheinlich ist.<sup>3, 19, 62</sup> In anderen Tumorentitäten, wie dem Plattenepithelkarzinom und dem Meningeom, ist hingegen eine epigenetische Inaktivierung von Genen am distalen Ende von Chromosom 1p nachgewiesen worden, so dass dieser Mechanismus auch in Keimzelltumoren zu überprüfen ist.<sup>53</sup>

Ein weiterer potentieller Tumorsuppressorgen-Kandidat für Keimzelltumoren, das Gen für den Transkriptionsfaktor *RUNX3*, ist auf Chromosom 1p36.1 lokalisiert. *RUNX3* hat eine wachstumsregulierende und Apoptose induzierende Funktion, so dass ein Verlust dieser Genfunktionen für die Tumorzellen einen Wachstums- und Überlebensvorteil darstellen kann. In einer Studie findet sich bei acht von zehn testikulären Dottersacktumoren eine Hypermethylierung von *RUNX3*, ein LOH an 1p36.1 wird in sechs von acht informativen Tumoren nachgewiesen. Bei keinem der zwölf untersuchten malignen Keimzelltumoren von erwachsenen Patienten ist eine Methylierung von *RUNX3* zu beobachten, ein LOH an 1p36.1 liegt nur in einem von sechs Tumoren vor. Eine Methylierung von *RUNX3* im Hodengewebe von gesunden Kindern ist nicht nachweisbar.<sup>53</sup> Einschränkend ist anzumerken, dass die beiden in der Studie von Kato et al.<sup>53</sup> eingesetzten Mikrosatellitenmarker den Lokus des *RUNX3* Gens nicht ausreichend gut erfassen.

Der kleinste deletierte Bereich auf Chromosom 1p lässt sich durch die hier vorgestellte LOH Studie eingrenzen auf den Bereich 1p36.1 bis zum Telomer des kurzen Arms von Chromosom 1 und wird eingegrenzt durch die Marker D1S450 und D1S2870. *RUNX3* liegt auf 1p36.1 und somit am Rande der von uns als kleinster deletierter Bereich bei allen untersuchten malignen Keimzelltumoren. Dabei ist zu beachten, dass der gemeinsam deletierte Bereich im

wesentlichen durch einen einzigen Tumor (Nr. 10) eingegrenzt wird, während bei allen anderen LOH positiven Dottersacktumoren des Kindesalters das *RUNX3* Gen im deletierten Bereich liegt. Daher ist anzunehmen, dass *RUNX3* im Regelfall innerhalb des gemeinsam deletierten Bereichs lokalisiert ist. Weiterführende Analysen der Arbeitsgruppe haben bestätigt, dass in Dottersacktumoren ein Zusammentreffen von LOH und *RUNX3* Promotermethylierung zu beobachten ist (Publikation in Vorbereitung). Allerdings zeigt sich eine nur unvollständige Methylierung mit Nachweis von methylierten und unmethylierten Promotersequenzen, so dass weiterführende Genexpressionanalysen erforderlich sind, um die biologische Relevanz der *RUNX3* Methylierung in Keimzelltumoren abschließend evaluieren zu können. Zu beachten ist ferner, dass sich der *RUNX3* Genlocus außerhalb des Genlokus befindet, welcher bei Neuroblastomen als kleinste gemeinsam deletierte Region identifiziert worden ist.

Es zeigt sich hier eine Korrelation von genetischen (LOH) und epigenetischen (Hypermethylierung) Veränderungen am *RUNX3* Gen, so dass dieses als potentieller Kandidat für ein Tumorsuppressorgen bei malignen Keimzelltumoren anzusehen ist.

Bei Mäusen ist eine Expression von *RUNX3* im Gastrointestinaltrakt, in neuronalen Ganglien und im Knorpel nachgewiesen worden. Beim Menschen hat man eine *RUNX3* Expression bisher in hämatopoetischen Zellen und in den Testes nachweisen können. Hier wird ebenfalls eine wachstumsregulierende und Apoptose induzierende Funktion angenommen.<sup>59, 60, 73</sup>

Bei Adenokarzinomen des Magens ist *RUNX3* als ein relevantes Tumorsuppressorgen identifiziert worden.<sup>61, 120</sup> Bei fehlender Expression von *RUNX3* aufgrund einer Hypermethylierung kommt es zur Hyperplasie der gastroepithelialen Zellen, diese Zellen zeigen sich vermehrt resistent gegenüber Wachstumsinhibition und Apoptose durch TGF-beta.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich in dem in dieser Studie identifizierten gemeinsam deletierten Areal mehrere potentielle Tumorsuppressorgen-Kandidaten

identifizieren lassen, welche sich in der Pathogenese anderer Tumoren als relevant herausgestellt haben. Zudem läßt sich ein Zusammenwirken von epigenetischen und genetischen Veränderungen in der Pathogenese der malignen Keimzelltumoren annehmen. Dieses Phänomen könnte somit die malignen Keimzelltumoren von Neuroblastomen und anderen embryonalen Tumoren unterscheiden, für die sich ein solcher Pathomechanismus an Chromosom 1p36 bislang nicht nachweisen ließ.

### ***Prognostische Relevanz der Ergebnisse***

Der Verlust chromosomaler Sequenzen an 1p36 ist bei Neuro- und Nephroblastomen mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert. Insofern ist zu prüfen, inwieweit Veränderungen an 1p36 auch bei Keimzelltumoren mit einem aggressiven Krankheitsverlauf und einer ungünstigen Prognose korrelieren.

Der Nachweis einer LOH an 1p36 ist bei den Keimzelltumoren des Kindesalters als Indiz für die maligne Biologie zu werten, da die reinen Teratome keine und die Dottersacktumoren hingegen nahezu regelhaft ein LOH aufweisen. Diese beiden Diagnosen sind jedoch im Allgemeinen bereits lichtmikroskopisch zu unterscheiden, problematisch bleibt lediglich die Detektion von sogenannten malignen Mikrofoci innerhalb von Teratomen, die immunhistochemisch gelingt. Insofern bietet die LOH Analyse keinen darüber hinaus gehenden Informationsgewinn.

Es ist daher zu evaluieren, ob eine LOH Analyse von malignen Dottersacktumoren des Kindesalters eine weiterführende Beurteilung der Prognose erlaubt. Diese Frage lässt sich bereits unabhängig von der Identifikation eines Tumorsuppressorgens mit Blick auf die insgesamt sehr günstige Prognose von malignen Dottersacktumoren des Kindesalters beantworten. Bei einem ereignisfreien Überleben von über 80% mit der Diagnose eines malignen Dottersacktumors und der Häufigkeit einer LOH an 1p36 von mehr als 80% ist ein prognostisch ungünstiger Einfluß einer LOH an Chromosom 1p36 auszuschließen. Die hohe

Frequenz von 1p36 Aberrationen stellt zudem einen deutlichen Unterschied im Vergleich der Dottersacktumoren zu anderen embryonalen Tumoren wie den Neuroblastomen mit Frequenzen von 25-35% dar.

Im Gegensatz zu den Tumoren des Kindesalters ist eine prognostische Relevanz einer Deletion am Chromosom 1p36 bei den malignen Keimzelltumoren des Jugend- und Erwachsenenalters nicht auszuschließen. Bei dieser Patientengruppe fand sich nur in zwei von neun Tumoren ein LOH. Zu beachten ist dabei, daß beide Patientinnen mit einer LOH an 1p36 einen ungünstigen Krankheitsverlauf mit einem Tumorrezidiv entwickelten. Insofern könnten diese Kasuistiken auf eine mögliche Korrelation mit einer ungünstigen Biologie hinweisen. Diese Beobachtung illustriert zudem erneut die grundlegenden Unterschiede in der Klinik und Biologie von Keimzelltumoren des Kindesalters im Vergleich zu denen des Erwachsenenalters.

#### *Ausblick*

Da in unserer Studie die beiden malignen Keimzelltumoren der Gruppe der Jugendlichen und Erwachsenen mit einer LOH an Chromosom 1p36 ein Tumorrezidiv mit einem ungünstigen klinischen Verlauf entwickelt haben, stellt sich die Frage nach einer möglichen prognostischen Relevanz einer LOH an 1p36 in dieser Altersgruppe. Eine prospektive Evaluation von LOH 1p36 als prognostischer Marker bei Keimzelltumoren des Jugend- und Erwachsenenalters erscheint somit gerechtfertigt.

Eine Studie mit einer größeren Patientengruppe ist erforderlich, zudem müßte ein Vergleich der Therapieeffektivität und dem klinischen Verlauf zu den chromosomalen Veränderungen hergestellt werden, um eine mögliche prognostische Relevanz evaluieren zu können.

Eine Kombination aus verschiedenen Untersuchungsmethoden wie der Mikrosatellitenanalyse mit der CGH ist sinnvoll, um tatsächliche Allelverluste von chromosomalen Zugewinnen unterscheiden zu können.<sup>123</sup> Mit einer größeren Zahl an untersuchten Mikrosatellitenmarkern

und einer größeren Patientenkohorte kann die deletierte Region besser eingegrenzt und potentielle Tumorsuppressorgene identifiziert werden. Gezielte Analysen dieser Gene auch auf Expressionsniveau würden bessere Aussagen bezüglich einer möglichen prognostischen Relevanz erlauben.

## **5 Zusammenfassung**

Vorangegangene Studien haben extrem diskrepante Untersuchungsergebnisse bezüglich der Deletion an Chromosom 1p bei Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters ergeben. Aufgrund der Beobachtung, dass Deletionen an 1p bei anderen embryonalen Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind, ist das Ziel der hier vorgelegten Studie, die Frequenz der Deletionen an Chromosom 1p bei Keimzelltumoren zu bestimmen und darüber hinaus zu untersuchen, inwieweit eine Deletion mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Für diesen Zweck wurden vier Teratome, neun maligne Dottersacktumoren bei Kindern und neun maligne Keimzelltumoren bei Jugendlichen und Erwachsenen mit 14 Mikrosatelliten am kurzen Arm des Chromosom 1 analysiert. Mit Hilfe der Touchdown PCR fanden wir im Vergleich von Normal- und Tumorgewebe in acht von neun malignen Dottersacktumoren des Kindesalters eine Deletion an Chromosom 1p. Wie erwartet fand sich in keinem der vier Teratome eine Deletion. In zwei von neun malignen Keimzelltumoren des Jugendlichen- und Erwachsenenalters fand sich ebenfalls eine Deletion an Chromosom 1p. Die bei allen positiv auf LOH 1p getesteten Keimzelltumoren gemeinsam deletierte Region lässt sich auf den Bereich von 1p36.1 bis zum terminalen Ende des Chromosoms 1p eingrenzen, mit einem proximalen Ende in Nachbarschaft der Marker D1S450 und D1S2870.

Die Deletion an Chromosom 1p ist mit einer Rate von über 80 % somit eine sehr häufig vorkommende Deletion in malignen Dottersacktumoren des Kindesalters. Diese Beobachtung spricht für das Vorhandensein eines Tumorsuppressorgens in diesem Bereich. Eine Deletion in dieser Region hat in Dottersacktumoren des Kindesalters im Gegensatz zu

anderen embryonalen Tumoren keine prognostische Relevanz, da sie nahezu regelhaft zu finden, die Prognose dieser Tumoren jedoch mit einem ereignisfreien Überleben von über 80% günstig ist.

Ob sich eine mögliche prognostische Relevanz einer LOH an 1p bei Jugendlichen oder Erwachsenen mit malignen Keimzelltumoren ergibt, ist prospektiv im Rahmen einer Therapieoptimierungsstudie zu prüfen. In zwei von neun untersuchten malignen Keimzelltumoren dieser Altersgruppe lag ein LOH an Chromosom 1p vor, in beiden Fällen kam es zu einem Rezidiv des Primärtumors und zu einem klinisch ungünstigen Verlauf.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass in den verschiedenen klinischen und histologischen Entitäten der Keimzelltumoren des Kindes- und Jugendalters ein LOH an 1p mit unterschiedlicher Häufigkeit nachweisbar ist. Bei Dottersacktumoren des Kindesalters sind weiterführende molekulargenetische Studien gerechtfertigt, um mögliche Tumorsuppressorgene zu identifizieren und die biologische Relevanz von 1p Aberrationen zu charakterisieren. Darüber hinaus sind in hier definierten Patientengruppen translationale Studien zur Evaluation der prognostischen Relevanz von 1p Aberrationen indiziert. Somit eröffnet die vorgelegte Studie Perspektiven für weiterführende biologische und prognostische Studien.

## Literaturverzeichnis

- 1) Albrecht S, Waha A, Koch A, Kraus JA, Goodyer CG, Pietsch T. Variable imprinting of H19 and IGF2 in fetal cerebellum and medulloblastoma. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* 55, 1270-1276 (1996)
- 2) Anderson R, Copeland TK, Scholer H, Heasman J, Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech. Dev* 91, 61-68 (2000)
- 3) Araki D, Uzawak K, Watanabe T, Shiiba M, Miyakawa A, Yokoe H, Tanzawa H. Frequent allelic losses on the short arm of chromosome 1 and decreased expression of the p37 gene at 1p36.3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oncol* 20: 355-360 (2002)
- 4) Atkin NB, Baker MC. Specific chromosome change, i (12p), in testicular tumours? *Lancet* 2, 1349 (1982)
- 5) Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Landanyi M. Allelic Losses at 1p36 and 19q13 in Gliomas: Correlation with Histologic Classification, Definition of a 150-kB Minimal Deleted Region on 1p36, and Evaluation of *CAMTA1* as a Candidate Tumor Suppressor Gene. *Clinical Cancer Research* 11, 1119-1128 (2/2005)
- 6) Bergthorsson JT, Agnarsson BA, Gudbartsson T, Magnusson K, Thoroddsen A, Pálsson B, Björnsson J, Stefánsson K, Gulcher J, Einarsson GV, Amundadóttir LT, Barkadóttir RB. A genome-wide study of allelic imbalance in human testicular germ cell tumors using microsatellite markers. *Cancer Genet Cytogenet* 164:1-9 (2006)
- 7) Bigner SH, Matthewews MR, Rasheed BK, et al. Molecular genetic aspects of oligodendrogliomas including analysis by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 155:375-86 (1999)
- 8) Billmire D, Vinocur C, Rescorla F, Colombani P, Cushing B, Hawkins E, London WB, Giller R, Lauer S. Malignant mediastinal germ cell tumors: an intergroup study. *J Pediatr Surg* 36:18-24 (2001)
- 9) Bjersing L, Kjellgren O. Dysgerminomas (seminomas) in genetic males with female phenotype. One case of gonadal dysgenesis and gonadoblastoma and one of testicular feminization. *Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl.* 27-37 (1977)
- 10) Bokemeyer C, Kollmannsberger C, Meisner C, Harstrick A, Beyer J, Metzner B, Hartmann JT, Schmol HJ, Einhorn L, Kanz L, Nichols C. First-line high-dose chemotherapy compared with standard dose PEB/VIP chemotherapy in patients with advanced germ cell tumors: a multivariate and matched-pair analysis. *J Clin Oncol* 17:3450-3456 (1999)
- 11) Bussey KJ, Lawce HJ, Olson SB, Arthur DC, Kalousek DK, Krailo M, Giller R, Heifetz S, Womer R, Magenis RE. Chromosome abnormalities of eighty-one pediatric germ cell tumors: sex-, age-, site-, and histopathology-related differences—a Children's Cancer Group study. *Genes Chromosomes Cancer* 25:134-146 (1999)
- 12) Bussey KJ, Lace HJ, Himoe E, Shu XO, Heereme NA, Perlman EJ, Olson SB, Magenis RE. SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development. *Genes Chromosomes Cancer* 32, 342-352 (2001)
- 13) Bussey KJ, Lawce HJ, Himoe E, Shu XO, Suijkerbuijk RF, Olson SB, Magenis RE. Chromosomes 1 and 12 abnormalities in pediatric germ cell tumors by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 125:112-118 (2001)
- 14) Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90:1473-9 (1998)
- 15) Calaminus G, Bamberg M, Baranzelli MC et al. Intracranial germ-cell tumors: A comprehensive update of the European data. *Neuropediatrics* 25:26-32 (1994)

- 16) Calaminus G, Andreussi L, Garre ML, Kortmann RD, Schober R, Göbel U. Secreting germ cell tumors of the central nervous system (CNS). First results of the cooperative German/Italian pilot study (CNS sGCT) *Klein Pädiatr* 209, 222-227 (1997)
- 17) Canzian F, Salovaara R, Hemminiki A, Kristo P, Chadwick RB, Aaltonen LA, de la Chapelle A. emiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res.* 15:56(14):3331-7 (1996)
- 18) Caren H, Ejekkar K, Fransson S, Hesson L, Latif F, Sjoberg RM, Krona C, Martinsson T. A cluster of genes located in 1p36 are down-regulated in neuroblastomas with poor prognosis, but not due to CpG island methylation. *Mol Cancer* 4:10 (2005)
- 19) Carling T, Du Y, Fang W, Correa P, Huang S. Intragenic allelic loss and promoter hypermethylation of the RIZ1 tumor suppressor gene in parathyroid tumors and pheochromocytomas. *Surgery* 134:932-939 (2003)
- 20) de la Chapelle A, Peltomaki P. Genetics of hereditary colon cancer. *Annu Rev Genet* 29 : 329-48. Review (1995)
- 21) Chaganti RSK, Rodriguez E, Mathew S. Origin of adult male mediastinal germ-cell tumors. *Lancet* 343, 1130-1132 (1994)
- 22) Chung PW, Bayley AJ, Sweet J, Jewett MA, Tew-George B, Gospodarowicz MK, Warde PR. Spermatocytic seminoma: a review. *Eur. Urol.* 45, 495-498 (2004)
- 23) Cummings O W, Ulbright TM, Eble JN, Roth LM. Spermatocytic seminoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 25, 54-59 (1994)
- 24) Dehner P. Gonadal and extragonadal germ cell neoplasia of childhood. *Hum. Pathol.* 14, 493-511 (1983)
- 25) Derenoncourt AN, Castro-Magana M, Jones KL. Mediastinal teratoma and precocious puberty in a boy with mosaic Klinefelter syndrome. *Am J Med Genet* 55: 38-42 (1995)
- 26) Dexeus FH, Logothesis CJ, Chong C, Sella A, Ogden S. Genetic abnormalities in men with germ cell tumors. *J. Urol.* 140, 80-84 (1988)
- 27) Drash A, Sherman F, Hartmann WH, Blizzard RM. A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, degenerative renal disease. *J Pediatr.* 76, 585-593 (1970)
- 28) Eble JN. Spermatocytic seminoma. *Hum. Pathol.* 25, 1035-1042 (1994)
- 29) Ernestus K, Pietsch T, Gessler M, Simon T, Hero B, Berthold F. Structure, use, and risks of biomaterial repositories of embryonal tumors. *Klin Padiatr.* 218(3) :132-8 (2006)
- 30) Feinberg P. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res.* 59, 1743s-1746s (1999)
- 31) Fujimoto Y, Monden Y, Nakahara K, Kawashima Y. Benign mediastinal teratoma associated with Klinefelter's syndrome. *Jpn J Surg* 15:221-224 (1985)
- 32) Ganjoo KN, Rieger M, Kesler KA, Sharma M, Heilman DK, Einhorn LH. Results of modern therapy for patients with mediastinal nonseminomatous germ cell tumors. *Cancer* 88:1051-1056 (2000)
- 33) Gelpi E, Ambros IM, Birner P, et al. Fluorescent in situ hybridization on isolated tumor cell nuclei: a sensitive method for 1p and 19q deletion analysis in paraffin-embedded oligodendroglial tumor specimens. *Mod Pathol* 16: 708-15 (2003)
- 34) Göbel U, Calaminus G, Teske et al. BEP/VIP in children and adolescents with amlignant non-testicular germ-cell tumors. A comparison of the results of treatment of therapy studies MAKEI 83/86 and 89P/89. *Klein Pädiatr* 205:231-40 (1993)

- 35) Göbel U, Calaminus G, Engert J, Kaatsch P, Gadner H, Bökkerink JP, Haas RJ, Waag K, Blohm ME, Dippert S, Teske C, Harms D. Teratoma in infancy and childhood. *Med. Pediatr. Onkol.* 31, 8-15 (1998)
- 36) Göbel U, Schneider DT, Calaminus G, Haas RJ, Schmidt P, Harms D. Germ cell tumors in childhood and adolescence. *Annals of Oncol* 11:263-271 (2000)
- 37) Gonzalez-Crussi F, Winkler RF, Mirkin DL. Sacrococcygeal teratomas in infants and children: relationship of histology and prognosis in 40 cases. *Arch Pathol Lab Med* 102:420-425 (1978)
- 38) Gramantieri L, Chieco P, Di Tomaso M, Masi L, Piscaglia F, Brillanti S, Gaiani S, Valgimigli M, Mazziotti A, Bolondi L. Aberrant fragile histidine triad gene transcripts in primary hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Clin Cancer Res.* 5(11): 3468-75 (1999)
- 39) Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. *Cancer Research.* 1;54(9):2331-3 (1994)
- 40) Grundy PE, Breslow NE, Li S, Perlman E, Beckwith JB, Ritchey ML, Shamberger RC, Haase GM, D'Angio GJ, Donaldson M, Coppes MJ, Malogolowkin M, Shearer P, Thomas PR, Macklis R, Tomlinson G, Huff V, Green DM; National Wilms Tumor Study Group. 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.* 10;23(29):7312-21 (2005)
- 41) van Gurp R J, Oosterhuis JW, Kalscheuer V, Mariman EC, Looijenga LH. Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 1070-1075 (1994)
- 42) Hankins R, Souza AT, Bentley RC, Patel MR, Marks JR, Igelhart JD, Jirtle RL. M6P/IGF2 receptor: a candidate breast tumor suppressor gene. *Oncogene* 12, 2003-2009 (1996)
- 43) Hartmann JT, Nichols CR, Droz JP, Horwich A, Gerl A, Fossa SD, Beyer J, Pont J, Fizazi K, Einhorn L, Kanz L, Bokemeyer C. Hematologic disorder associated with primary mediastinal non-seminomatous germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 92: 54-61 (2000)
- 44) Hasle H, Mellempgaard A, Nielsen J, Hansen J. Cancer incidence in men with Klinefelter syndrome. *Br J Cancer* 71:416-420 (1995)
- 45) Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 225-235 (2004)
- 46) Henrich KO, Claas A, Praml C, Benner A, Mollenhauer J, Poustka A, Schwab M, Westermann F. Allelic variants of *CAMTA1* and *FLJ10737* within a commonly deleted region at 1p36 in neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 43(3) :607-16 (2007)
- 47) Hogarty MD, Maris JM, White PS, Guo C, Brodeur GM. Analysis of genomic imprinting at 1p35-36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol,* 36:52-55 (2001)
- 48) Hu J, Wills M, Baker BA, Perlman EJ. Comparative genomic hybridization analysis of hepatoblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 27:196-201 (2000)
- 49) Hu J, Schuster AE, Fritsch MK, Schneider DT, Lauer S, Perlman EJ. Deletion mapping of 6q21-26 and frequency of 1p36 deletion in childhood endodermal sinus tumors by microsatellite analysis. *Oncogene* 20, 8042-8044 (2001)
- 50) Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number of comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 145:1301-1308 (1994)
- 51) Jenderny J, Koster E, Borchers O, Meyer A, Grote W, Harms D, Jänig U. Interphase cytogenetics on paraffin sections of paediatric extragonadal yolk sac tumours. *Virchows Arch* 428:53-57 (1996)

- 52) Kaatsch P, Kaletsch U, Michaelis J. Annual Report of the German Childhood Cancer Registry. 1. Mainz, Germany, Deutsches Krebsregister (www.kinderkrebsregister.de) (2002)
- 53) Kato N, Tamura G, Fukase M, Shibuya H, Motoyama T. Hypermethylation of the *RUNX 3* Gene Promoter in Testicular Yolk Sac Tumor of Infants. *American Journal of Pathology* 163, 387-391 (2003)
- 54) Kehler J et al. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep.* 5, 1078-1083 (2004)
- 55) Kim KS, Lee YI. Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 119, 143-148 (1997)
- 56) Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM, Lundsteen C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 31:163-173 (1998)
- 57) Korn WM, Oide Weghuis DE, Suijkerbijk RF, Schmidt U, Otto T, du Manoir S, Geurts van Kessel A, Harstrick A, Seeber S, Becher R. Detection of chromosomal DNA gains and losses in testicular germ cell tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 17, 78-87 (1996)
- 58) Kraggerud SM et al. DNA copy number changes in malignant ovarian germ cell tumors. *Cancer Res.* 60, 3025-3030 (2000)
- 59) Le XF, Groner Y, Kornbau SM, Gu Y, Hittelman WN, Levanon D. Hematopoietic cells through the retinoic acid receptor-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*; 274: 21651-21658 (1999)
- 60) Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am , Avivi L, Groner Y. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localisation. *Genomics* 23:425-432 (1994)
- 61) Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe H, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of *RUNX3* expression and gastric cancer. *Cell* 109: 113-124 (2002)
- 62) Lomas J, Aminoso C, Gonzalez-Gomez P, Eva AM, Arjona D, Lopez-Marin I, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Gutierrez M, Sarasa JL, Josefa BM, Rey JA. Methylation status of TP73 in meningiomas. *Cancer Genet Cytogenet* 148:148-151 (2004)
- 63) Looijenga LHJ, Rosenberg C, van Gorp RJ, Geelen E, van Echten-Arends J, de Jong B, Mosert M, Oosterhuis WJ. Comparative genomic hybridisation of microdissected samples from different stages of in the development of a seminoma. *J Pathol* 191:187-192 (2000)
- 64) Looijenga LHJ, Oosterhuis JW. Pathobiology of testicular germ cell tumours: views and news. *Analyt. Quant. Cytol. Histol* 24:263-279 (2002)
- 65) Looijenga LHJ et al. Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* 111, 161-173 (2003)
- 66) Looijenga LHJ et al. POU5F1 (OCT 3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res.* 63, 2244-2250 (2003)
- 67) Mann JR, Raafat F, Robinson K, Imeson J, Gornall P, Phillips M, Sokal M, Gray E, McKeever P, Oakhill A. UKCCSG's germ cell tumor (GCT) studies: improving outcome for children with malignant extracranial non-gonadal tumours—carboplatin, etoposide, bleomycin are effective and less toxic than previous regimens. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Med. Pediatr. Oncol.* 30, 217-227 (1998)
- 68) du Manoir S, Schrock E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T. *Cytometry* 19:27-41 (1995)

- 69) Marina NM, London WB, Luer S, Giller R, Rescorla F, Cushing B, Vonocur C, Malogolowkin MH, Castleberry RP, Womer R. Prognostic factors in children with extragonadal germ cell tumors: a pediatric intergroup study. *Med Pediatr Oncol* 35:197 (2000)
- 70) Maris JM und Matthay KK. Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* 17, 2264-2279 (1999)
- 71) Matin MM et al. Specific knockdown of Oct4 and beta<sub>2</sub>-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. *Stem Cells* 22, 659-668 (2004)
- 72) Mc Laren. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 262:1-15 (2003)
- 73) Meyers S, Lenny N, Sun W, Hiebert SW. AML2 is a potential target for transcriptional regulation by the t(8;21) and t(1;21) fusion proteins in acute leukemia. *Oncogene*; 13:303-312 (1996)
- 74) Miller RW, Jr Fraumeni JF, Manning MD. Association of Wilms' tumor with aniridia, hemihypertrophy and other congenital malformations. *N. Engl. J. Med.* 270, 922-927 (1964)
- 75) Mostert MC, Verkerk AJ, van de Pol M, Heighway J, Marynen P, Rosenberg C, van Kessel AG, van Echten J, de Jong B, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Identification of the critical region of 12 p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. *Oncogene* 16, 2617-2627 (1998)
- 76) Mostert M, Rosenberg C, Stoop H, Svhuier M, Timmer A, Oosterhuis W, Looijenga L. Comparative genomic and in situ hybridization of germ cell tumors of the infantile testis. *Lab Invest* 80, 1055-1064 (2000)
- 77) Mostofi FK, Sobin LH. Histopathological typing of testis tumors. World Health Organization, Geneva (1993)
- 78) Murty VV, Chaganti RS. A genetic perspective of male germ cell tumors. *Semin Oncol* 25:133-144 (1998)
- 79) Nichols CR, Heerema NA, Palmer C, Loehrer PJS, Williams SD, Einhorn LH. Klinefelter's syndrome associated with mediastinal germ cell neoplasm. *J Clin Oncol* 5: 1290-1294 (1987)
- 80) Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct <sup>3/4</sup> defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genet.* 24, 372-376 (2000)
- 81) Oosterhuis JW et al. Ploidy of malignant mediastinal germ-cell tumors. *Hum. Pathol.* 21, 729-732 (1990)
- 82) Oosterhuis JW, Looijenga LHJ, van Echten-Arends J, de Jong B. Chromosomal constitution and developmental potential of human germ-cell tumours and teratomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 95: 96-102 (1997)
- 83) Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Testicular germ-cell tumours in a broader perspective; *Nature Publishing Group*; 5: 210-222(2005)
- 84) Orazi A, Neiman RS, Ulbright TM, Heerema NA, John K, Nichols CR. Hematopoietic precursor cells within the yolk sac tumor component are the source of secondary hematopoietic malignancies in patients with mediastinal germ cell tumors. *Cancer* 71:3873-3881 (1993)
- 85) Perlman EJ, Cushing B, Hawkins E, Griffin CA. Cytogenetic analysis of childhood endodermal sinus tumors: a Pediatric Oncology Group study. *Pediatr. Pathol.* 14, 695-708 (1994)
- 86) Perlman EJ, Valentine MG, Griffin CA, Look AT. Deletion of 1p36 in childhood endodermal sinus tumors by two-color fluorescence in situ hybridization: a pediatric oncology group study. *Genes Chromosomes Cancer* 16:15-20(1996)
- 87) Perlman EJ, Hu J, Ho D, Cushing B, Lauer S, Castleberry RP. Cytogenetic analysis of childhood endodermal sinus tumors by comparative hybridization. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 22, 100-105 (2000)

- 88) Ragnarsson G, Eiriksdottir G, Eiriksdottir G, Johansdottir JT, Jonasson JC, Egiksson V, Ingvarsson S. Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumors: association with survival. *Br J Cancer* 1999;79:1468-74
- 89) Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 362, 747-749 (1993)
- 90) Rainier S, Dobry CJ, Feinberg AP. Loss of imprinting in hepatoblastoma. *Cancer Res* 55, 1836-1838 (1995)
- 91) Rehder and Melcher T. Dysgerminoma in Turner's syndrome. *Beitr. Pathol.* 157, 251-259 (1976)
- 92) Riopel MA, Spellerberg A, Griffin CA, Perlman EJ. Genetic analysis of ovarian germ cell tumors of the adult testis apart from i(12p). *Genes Chromosom. Cancer* 14, 133-144 (1995)
- 93) Rodriguez E, Mathew S, Reuter V, Ilson DH, Bosl GJ, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 124 prospectively ascertained male germ cell tumors. *Cancer Res.* 52, 2285-2291 (1992).
- 94) Rodriguez E et al. Molecular cytogenetic analysis of i(12p)-negative human male germ cell tumors. *Genes Chromosom. Cancer* 8, 230-236 (1993)
- 95) Rosenberg C et al. Chromosomal constitution of human spermatocytic seminomas: comparative genomic hybridization supported by conventional and interphase cytogenetics. *Genes Chromosom. Cancer* 23, 286-291 (1998).
- 96) Rosenberg C, Schut TB, Mostert M, Tanke H, Raap A, Oosterhuis JW, Looijenga L. Chromosomal gains and losses in testicular germ cell tumors of adolescents and adults investigated by a modified comparative genomic hybridization approach *Lab Invest* 79, 1447-1451 (1999)
- 97) Schneider DT, Calaminus G, Reinhard H, Gutjahr P, Kremes B, Harms D, Göbel U. Primary mediastinal germ cell tumors in children and adolescents: a result of the German cooperative protocols MAKEI 83/86, 89, and 96 *J Clin Oncol* 18:832-839 (2000)
- 98) Schneider DT et al. Multipoint imprinting analysis indicates a common precursor cell for gonadal and nongonadal pediatric germ cell tumours. *Cancer Res.* 61: 7268-7276 (2001)
- 99) Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, Calaminus G, Harms D, Göbel U, Perlman EJ. Genetic analysis of Childhood Germ Cell Tumors with Comparative Genomic Hybridization. *Klin. Pädiatr.* 213:204-211 (2001)
- 100) Schneider DT. Extragonadale Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen – Untersuchungen zur Histiogenese, Genetik und Klinik. *Habilitationschrift* (2002):11
- 101) Schneider DT, Perlman EJ, Harms D, Fritsch MK, Calaminus G, Göbel U. Mediastinal Germ Cell Tumors (MGCT) in Children and Adolescents: Age Correlates with Histological Differentiation, Genetic Profiles and Clinical Outcome. In *Germ Cell Tumours V*. Herausgeber: Harnden P, Joffe JK, Jones WG, S. 127-128 Springer, London (2002).
- 102) Schneider DT, Schuster AE, Fritsch MK, Calaminus G, Göbel U, Harms D, Lauer S, Olson T, Perlman EJ. Genetic analysis of mediastinal nonseminomatous germ cell tumors in children and adolescents. *Genes Chromosomes Cancer.* 34:115-125 (2002).
- 103) Scully RE. Gonadoblastoma: a review of 74 cases. *Cancer* 25, 1340-1356 (1970)
- 104) Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome. *Horm. Res.* 60: (Suppl. 3) 49 (2003)
- 105) Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome: new epidemiological evidence. *Int. J. Androl.* 27: 189-191 (2004)
- 106) Smith JS, Alderete B, Minn Y et al. Localizations of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene* 1999; 18:4144-52

**Kommentar [DTS1]:** Bitte die Koautoren auch bei dieser Arbeit erwähnen

- 107) De Souza T, Hankins GR, Washington MK, Orton TC, Jirtle RL. M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity. *Nat Genet.* 11, 447-449 (1995)
- 108) De Souza T, Hankins GR, Washington MK, Fine RL, Orton TC, Jirtle RL. *Oncogene* 10: 1725-1729 (1995b)
- 109) Spitz R, Hero B, Westermann F, Ernestus K, Schwab M, Berthold F. Fluorescence in situ hybridization analyses of chromosome band 1p36 in neuroblastoma detect two classes of alterations. *Genes Chromosomes Cancer.* 34(3):299-305 (2002 Jul)
- 110) Stock C, Ambros IM, Lion T, Haas OA, Zoubek A, Gedner H, Ambros PF. Detection of numerical and structural chromosome abnormalities in pediatric germ cell tumors by means of interphase cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 11, 40-50 (1994)
- 111) Stock C, Strehl S, Fink FM, Bauer S, Lion T, Kreczy A, Gadner H, Ambros PF. Isochromosome 12p and maternal loss of 1p36 in a pediatric testicular germ cell tumor. *Cancer Genet Cytogenet.* 91:95-100. (1996)
- 112) Suijkerbuijk RF et al. Overrepresentation of chromosome 12p sequences and karyotypic evolution in i(12p) negative testicular germ-cell tumors revealed by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 70, 85-93 (1993)
- 113) Surani MA. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122-128 (2001)
- 114) Talerman. *Germ Cells of the Ovary. Pathology of the Female Genital Tract.* Ed. Ancel Blaustein. 2<sup>nd</sup> edition 602-655 (1978)
- 115) Tamimi Y, Ziebart K, Desaulniers N, Dietrich K, Grundy P. Identification of a minimal region of loss on the short arm of chromosome 1 in Wilms tumor. *Genes Chromosome Cancer.* 46(4) :327-35. (2007)
- 116) Teilum G. Classification of endodermal sinus tumour (mesoblastoma vitellinum) and so-called 'embryonal carcinoma' of the ovary. *Acta Pathol Microbiol Scand* (1965); 64: 407-29
- 117) van Echten J, Timmer A, van der Veen AY, Molenaar WM, de Jong B. Infantile and adult testicular germ cell tumors. A different pathogenesis? *Cancer Genet Cytogenet* 135:57-62 (2002)
- 118) Veltman I, Velman J, Janssen I, Hulsberg-van de KC, Oosterhuis W, Schneider D, Stoop H, Gillis A, Zahn S, Looijenga L, Göbel U, van Kessel AG. 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 (2005)
- 119) von Schweinitz D, Kraus JA, Albrecht S, Koch A, Fuchs J, Pietsch T. Prognostic impact of molecular genetic alterations in hepatoblastoma. *Med Pediatr Oncol.* 38(2):104-8. (2002)
- 120) Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promotor methylation status of DAP-kinase and *RUNX3* genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci*; 94: 360-364 (2003)
- 121) Witschi E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contr. Embryol Carnegie Inst* 32, 67-80 (1948).
- 122) Woodward PJ et al. In *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of the Urinary System and Male Genital Organs* (eds. J. N. Eble, G. Sauter, J. I. Epstein, I. A. Sesterhann) 217-278 (IARC, Lyon, 2004)
- 123) Zahn S, Alemazkour K, Sievers S, Orb S, Harms D, Schulz W, Calaminus G, Göbel U, Schneider DT. Imbalances of Chromosome 1p in Pediatric and Adult Germ Cell Tumours are Caused by True Allelic Loss : a combined Comparative Genomic Hybridization and Microsatellite Analysis. *Genes Chromosomes* (2006)

- 124) Zakrzewska M, Rieske P, Debiec-Rychter M, Zakrzewski K, Polis L, Fiks T, Liberski PP. Molecular abnormalities in pediatric embryonal brain tumors--analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 1, 5, 9, 10, 11, 16, 17 and 22. *Clin Neuropathol.* 23(5):209-17(2004)
- 125) Zon R, Orazi A, Neiman RS, Nichols CR. Benign hematologic neoplasm associated with mediastinal mature teratoma in a patient with Klinefelter's syndrome: a case report. *Med Pediatr Oncol* 23: 376-379 (1994)

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Sandra Jennifer Christina Orb  
geboren am 6. Juli 1976 in Ratingen  
ledig, keine Kinder  
evangelisch

### Berufstätigkeit

---

Januar 2006 bis Januar 2007      Assistenzärztin für Psychiatrie- und Psychotherapie,  
Rheinische Landeskliniken Düsseldorf

ab Februar 2007                      Assistenzärztin für Psychiatrie- und Psychotherapie des  
Kindes- und Jugendalters, Rheinische Landeskliniken  
Essen

### Hochschulausbildung

---

Oktober 1999 bis                      Studium der Humanmedizin  
Dezember 2005                      an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf

Physikum Herbst 2001              Note: 2,66

1. Staatsexamen Frühling 2003      Note: 2

2. Staatsexamen Herbst 2004        Note: 2

3. Staatsexamen Herbst 2005        Note: 1

Gesamt:                                  Note: 1,66

### Ausbildung

---

1996-1999                              Krankenpflegeausbildung  
Universitätsklinikum Essen  
Abschluss: Krankenpflegeexamen (Note: 2,33)

### Hochschulausbildung

---

Oktober 1995 – Februar 1996      Diplom Pädagogik Studium an der Heinrich-Heine-  
Universität in Düsseldorf

### Schulausbildung

---

1982 – 1995                              Grundschule in Ratingen,  
Heinrich-Heine-Gymnasium in Mettmann  
Theodor-Heuss-Gymnasium in Ratingen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 2,3)

Ratingen, 19. März 2008