

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. Christoph Röcken)
Sektion Hämatopathologie
(Direktor: Prof. Dr. Wolfram Klapper)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**1q und 12p als prognostische Marker
kindlicher Keimzelltumoren**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Kristina Greimelmaier
aus Ludwigsburg
Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfram Klapper

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Alexander Claviez

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.12.2019

gez.:

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Gewidmet

Professor Ivo Leuschner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entstehung und Einteilung von Keimzelltumoren.....	1
1.2	Keimzelltumoren im Kindesalter	4
1.3	Fragestellung.....	7
2	Material und Methoden	10
2.1	Patientenkollektiv und Tumorproben	10
2.1.1	MAKEI Studie	12
2.2	Erstellen eines Tissue-Microarrays.....	12
2.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	14
2.3.1	FISH Protokoll	15
2.3.2	Materialien und Geräte	17
2.3.3	Reagenzien und Lösungen.....	17
2.3.4	DNA-Sonden	19
2.3.5	Mikroskopie und Auszählung	19
2.4	Kontrollkohorte.....	20
2.5	Statistische Auswertung.....	21
3	Ergebnisse	22
3.1	1q Zugewinne.....	22
3.2	12p Zugewinne.....	26
3.2.1	12p Zugewinne in gemischten Keimzelltumoren	30
3.3	Gepaarte Analyse von 1q und 12p anhand Primär- und Rezidivtumor.....	30
3.4	Korrelation der 1q und 12p Zugewinne mit dem klinischen Verlauf	31
4	Diskussion	36
4.1	Kritische Betrachtung der angewandten Methoden.....	36
4.1.1	Tissue-Microarrays	36
4.1.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	36
4.2	Fragestellung im Kontext der bisherigen Literatur.....	37
4.3	Diskussion der Ergebnisse	40
5	Zusammenfassung	44
6	Literaturverzeichnis	46

7 Anhang	50
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	50
7.2 Tabellenverzeichnis.....	51
Danksagung	52
Publikationen	53

Abkürzungsverzeichnis

ZNS	Zentrales Nervensystem
PGC	Primordial germ cell, primordiale Keimzelle
MT	Mature teratoma, reifes Teratom
IT	Immature teratoma, unreifes Teratom
YST	Yolk sac tumor, Dottersacktumor
MGCT	Mixed germ cell tumor, gemischter Keimzelltumor
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
MAKEI	Kooperative, prospektive Therapieoptimierungsstudie der GPOH für extrakranielle Keimzelltumoren im Kindes- und Jugendalter
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
TMA	Tissue-Microarray
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
OT	Objektträger
RT	Raumtemperatur
Dest. H ₂ O	Destilliertes Wasser
SSC	Saline Sodium Citrate, Salzlösung Natriumcitrat (Pufferlösung)
NaOH	Natriumhydroxid
HCl	Chlorwasserstoff
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
R0	Mikroskopisch komplette Resektion
R1	Makroskopisch komplette Resektion, mikroskopisch inkomplette Resektion

1 Einleitung

1.1 Entstehung und Einteilung von Keimzelltumoren

Keimzelltumoren sind histologisch wie klinisch äußerst heterogene Tumoren. Sie leiten sich histogenetisch von den Keimzellen ab und können ganz unterschiedliche Differenzierungsmerkmale aufweisen. Keimzelltumoren treten sowohl in den Gonaden als auch extragonadal auf und können einen benignen, ebenso wie einen hochmalignen Verlauf aufweisen. Auch das therapeutische Spektrum ist breit und reicht von chirurgischer Exzision bis hin zu Polychemotherapie [1, 2].

Zu den Keimzelltumoren zählen Teratome, Dottersacktumoren, Chorionkarzinome, embryonale Karzinome und seminomatöse Tumoren. Letztere werden je nach Lokalisation als Dysgerminome (Ovar), Germinome (ZNS) oder Seminome (Hoden) bezeichnet.

Keimzelltumoren zeigen große, zum Teil altersabhängige Unterschiede in ihrem biologischen Verhalten und können in fünf verschiedene Typen unterteilt werden (siehe Tabelle 1).

Die Unterteilung basiert auf der unterschiedlichen Altersverteilung, dem histologischen Typ, der angenommenen Ursprungszelle bzw. deren Entstehung aus einer in-situ Läsion und den genetischen Veränderungen dieser Tumoren [3].

TYP	LOKALISATION	PHÄNOTYP	ALTER	URSPRUNGSZELLE	GENOTYP
I	Hoden/Ovar/Sakral-region/ Retroperitoneum/ Mediastinum/Hals/ Mittellinie/Gehirn/ andere seltene Lokalisationen	(unreifes) Teratom/ Dottersack- tumor	Neugeborene/ Kinder	Frühe PGC/ Gonozyten	Diploid (Teratom), aneuploid (Dottersack- tumor) Zugewinne: 1q, 12(p13), 20q Verluste: 1p, 4, 6q
II	Hoden	Seminom/ nicht-semi- matös	>15 Jahre (Median 35 und 25 Jahre)	PGC/ Gonozyten	Aneuploid (+/- triploid) Zugewinne: X, 7, 8, 12p, 21 Verluste: Y, 1p, 11, 13, 18
	Ovar	Dysgerminom/ nicht-semi- matös	>4 Jahre	PGC/ Gonozyten	Aneuploid
	Dysgenetische Gonaden	Dysgerminom/ nicht-semi- matös	Kongenital	PGC/ Gonozyten	Diploid/tetraploid
	Vorderes Mediastinum	Seminom/ nicht-semi- matös	Adoleszente	PGC/ Gonozyten	Diploid/tri- tetraploid
	Gehirn (Mittellinie)	Germinom/ nicht-semi- matös	Kinder (Median 13 Jahre)	PGC/ Gonozyten	Diploid/tri- tetraploid
III	Hoden	Spermatozy- tisches Seminom	>50 Jahre	Spermatogonien/ Spermatozyten	Aneuploid Zugewinn: 9
IV	Ovar	Dermoidzyste	Kinder/ Erwachsene	Oogonien/ Oozyten	(Nahe) diploid, diploid/tetraploid, peridiploid
V	Plazenta/Uterus	Hydatiforme Mole	Reproduk- tionsphase	Leere Eizelle/ Spermatozoen	Diploid (XX und XY)

Tabelle 1: Unterteilung der Keimzelltumoren in fünf verschiedene Typen (modifiziert nach [3])

PGC: primordial germ cell, primordiale Keimzelle.

Ein Ursprung der Keimzelltumoren aus primordiales Keimzellen ist sowohl wegen der Expression bestimmter Antigene, als auch aufgrund der Molekulargenetik dieser Tumoren wahrscheinlich [3, 4]. Dieser Ursprung erklärt auch die morphologische Heterogenität der Keimzelltumoren, die als Abbild der embryologischen Entwicklung der Tumoren und auch der Tumorprogression unreifer Vorläuferzellen angesehen werden kann [5-7].

Die normale Keimzellentwicklung beginnt mit primordiales Keimzellen, die initial ein bipaternalen Imprinting aufweisen, dass sich im Laufe der Ausreifung zu Oozyten bzw. Spermatozyten zu einem uniparentalen Imprinting entwickelt. Die Typ I-Keimzelltumoren entstammen primordiales Keimzellen, die unmittelbar zu sog. pluripotenten embryonalen Keimzellen umgewandelt werden. Man nimmt an, dass diese Zellen in der Meiose arretiert sind. Die Typ II-Keimzelltumoren entstehen wahrscheinlich aus primordiales Keimzellen, die unter bestimmten Bedingungen auch in extragonadalen Lokalisationen überdauern und proliferieren können. Aus diesen Zellen entstehen seminomatöse Tumoren oder, nach genomischer Reprogrammierung zu pluripotenten embryonalen Tumorzellen, nicht-seminomatöse Tumoranteile [1, 3, 4, 6-8].

Auch histopathologisch lassen sich die Keimzelltumoren in verschiedene Gruppen einteilen: Die am unreifsten erscheinenden Formen sind die seminomatösen Tumoren. Sie bestehen aus monomorphen, unreifen Zellen, die morphologisch an unreife Keimzellen erinnern.

Nicht-seminomatöse Teratome bilden in reifer Form unterschiedlichste Gewebestrukturen aus, die sich isoliert betrachtet praktisch nicht von den vergleichbaren „normalen“ Körperstrukturen unterscheiden, in ihrer Anordnung innerhalb des Tumors aber nicht der üblichen Struktur entsprechen. Zusätzlich kann in Teratomen eine sog. Unreife auftreten. Das bedeutet, dass innerhalb verschiedener Differenzierungen, meist in der neuronalen Komponente, keine vollständige Ausreifung auftritt, sondern embryonale Stufen der Gewebeentwicklung nachweisbar bleiben [9].

Embryonale Karzinome, Dottersacktumoren und Chorionkarzinome, deren Histogenese bisher nicht sicher geklärt ist, stellen immer maligne Differenzierungsformen der Keimzelltumoren dar [10]. Diese malignen Komponenten treten häufig zusammen mit reifen Teratomdifferenzierungen innerhalb eines Tumors auf und werden dann als gemischter Keimzelltumor bezeichnet. Die genetischen Ursachen für diese intratumorale Heterogenität sind bisher nicht bekannt.

1.2 Keimzelltumoren im Kindesalter

Die Histologie der Keimzelltumoren sowie deren Lokalisation und das klinische Verhalten zeigen eine starke Assoziation mit dem Patientenalter bei Auftreten der Erkrankung.

Bei Kindern und Jugendlichen im Alter von unter 15 Jahren sind laut dem deutschen Kinderkrebsregister ca. 3% aller Malignome Keimzelltumoren [9, 11]. Das entspricht etwa einer Inzidenz von 0,3/100.000 Kindern pro Jahr, wobei die Inzidenz bei Säuglingen und Kindern unter einem Jahr am höchsten ist. Hier finden sich am häufigsten Teratome, welche auch insgesamt 50% aller kindlichen Keimzelltumoren ausmachen. Maligne Keimzelltumoren bzw. Keimzelltumorkomponenten treten bei jungen Kindern vor allem in Form von Dottersacktumoren auf [9, 12, 13].

Keimzelltumoren können sowohl in den Gonaden als auch in den Körperregionen auftreten, die der Wanderung der primordialen Keimzellen während der Embryonalperiode entsprechen [14, 15]. Bei Kindern unter 15 Jahren sind Keimzelltumoren am häufigsten im Bereich der Sakrokokzygealregion (35%) lokalisiert, gefolgt von den Gonaden, wobei ein Vorkommen in den Ovarien (25%) häufiger ist als im Hoden (20%). Weitere Lokalisationen kindlicher Keimzelltumoren sind das Mediastinum (5%), das ZNS (5%) und das Retroperitoneum (5%) sowie die Kopf-Hals-Region (3%) und die Vagina (2%) [14, 15], siehe Abbildung 1.

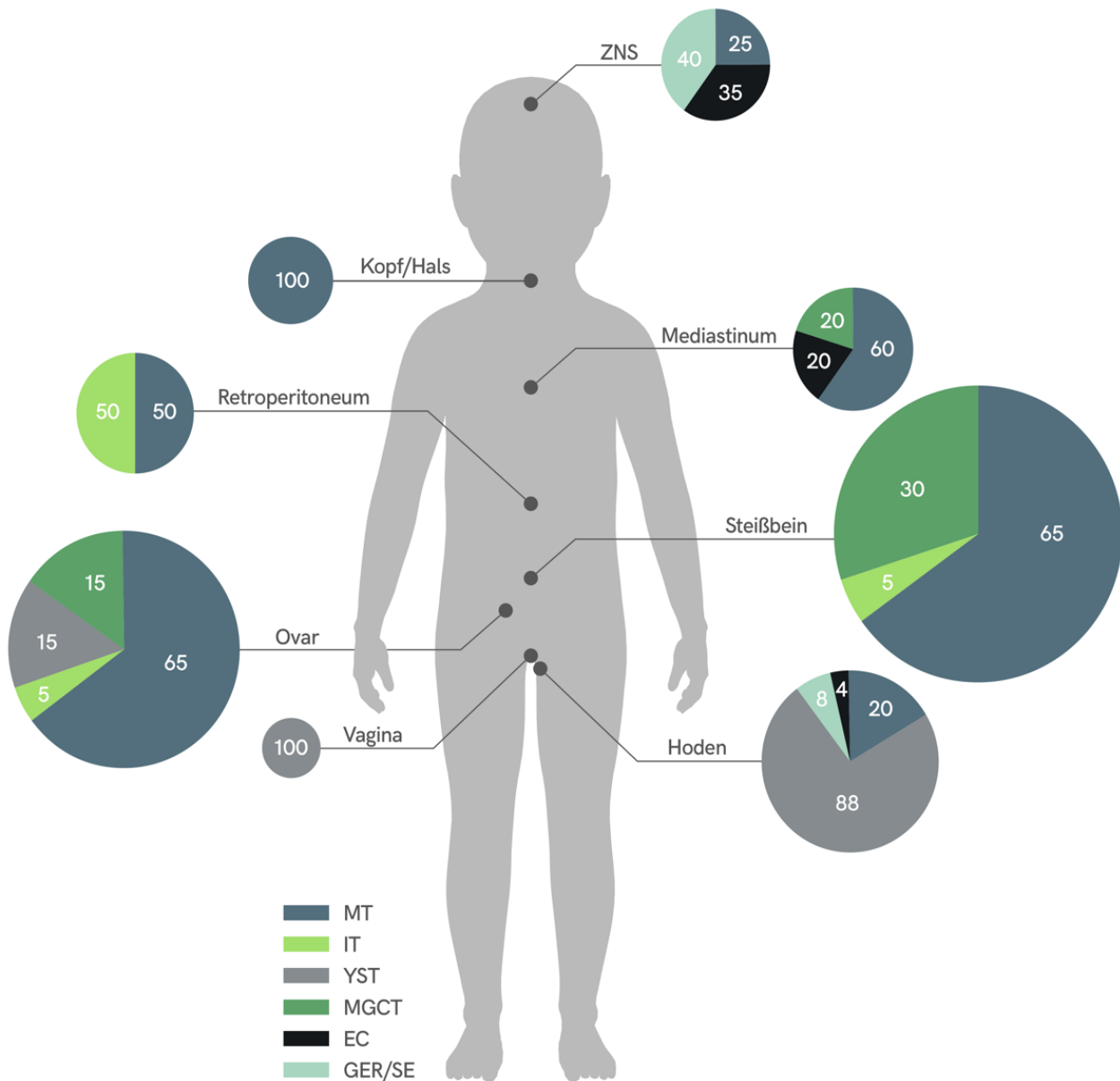


Abbildung 1: Relative Inzidenz von Keimzelltumoren bei Kindern unter 15 Jahren in Abhängigkeit ihrer Lokalisation (modifiziert nach [14])

Die Größe der Kreisdiagramme repräsentiert die relative Häufigkeit: Sakrokokzygealregion/Steißbein (35%), Ovar (25%), Hoden (20%), Mediastinum (5%) ZNS (5%), Retroperitoneum (5%), Kopf-Hals-Region (3%), Vagina (2%). Die relative Inzidenz des histologischen Typs ist jeweils im Kreisdiagramm der entsprechenden Lokalisation markiert: MT (reife Teratome) sind in blau dargestellt, IT (unreife Teratome) in hellgrün, YST (Dottersacktumoren) in grau, MGCT (gemischte Keimzelltumoren) in dunkelgrün, EC (embryonale Karzinome) in schwarz und Germinome bzw. Seminome (GER/SE) in türkis.

Auch die Geschlechterverteilung der Keimzelltumoren ist in Abhängigkeit vom Alter der Patienten unterschiedlich. In der Gruppe der 10-19jährigen Adoleszenten ist die Inzidenz bei Mädchen geringer, wohingegen die Verteilung bei den jüngeren Kindern ausgewogen ist.

Bei den nicht-gonadalen Keimzelltumoren der unter 5jährigen sind doppelt so viele Mädchen betroffen wie Jungen, während bei den älteren Kindern der Anteil der Jungen stark überwiegt. Während Teratome bei Mädchen generell häufiger sind als bei Jungen, zeigen Keimzelltumoren bei Jungen häufiger eine maligne Komponente innerhalb des Tumors [9, 12, 13, 16].

Wichtig für die Tumoren im Kindesalter sind vor allem die Typ I- und Typ II-Keimzelltumoren (siehe Tabelle 1). Typ I-Tumoren kommen überwiegend bei präpuberalen Kindern und Säuglingen vor und umfassen reife sowie unreife Teratome, deren klinischer Verlauf in den meisten Fällen gutartig ist, können allerdings auch als maligne Dottersacktumoren in Erscheinung treten. Teratome in dieser Altersgruppe zeigen meist ein normales Karyogramm ohne chromosomale Aberrationen. In kindlichen Dottersacktumoren finden sich Veränderungen im Bereich von Chromosom 1 (Verluste auf 1p, Zugewinne auf 1q), Zugewinne von 20q und Verluste im Bereich der Chromosomen 4 und 6 [17-21].

Im Gegensatz hierzu treten die Typ II-Keimzelltumoren eher nach der Pubertät im jungen Erwachsenenalter auf und zeigen häufiger ein malignes Verhalten. Histologisch umfassen die Typ II-Tumoren überwiegend Seminome des Hodens und deren Vorläuferläsionen und sehr viel seltener nicht-seminomatöse Tumoren. Bei Letzteren wird auch dann von einem malignen Potential ausgegangen, wenn es sich um reife Teratome handelt [22].

Über 80% der postpuberalen Keimzelltumoren des Hodens zeigen eine spezifische chromosomale Veränderung in Form eines Isochromosoms 12p (i(12p)). Die restlichen i(12p)-negativen Tumoren weisen häufig Amplifikationen im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 12 auf (12p Zugewinn) [23-30]. Diese genetische Aberration scheint eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines invasiven Wachstums adulter testikulärer Keimzelltumoren zu spielen [27, 31-33]. Doch auch in präpuberalen Teratomen des Hodens konnten bereits Zugewinne von 12p gefunden werden [34]. Weitere regelmäßig vorkommende Veränderungen in Typ II-Tumoren sind Zugewinne auf Chromosom 7, 8 und 21, sowie Verluste auf Chromosom 11, 13 und 18 [6, 35-37].

Der oben erwähnte zeitliche Unterschied im Auftreten der Typ II-Tumoren zwischen dem männlichen und dem weiblichen Geschlecht kann durch den unterschiedlichen Zeitpunkt der Meiose erklärt werden. Bei den Mädchen findet die Meiose schon in-utero während der 11. - 12. Schwangerschaftswoche statt, wohingegen sie bei Jungen erst während der Pubertät erfolgt. Außerdem ist die Zahl der primordialen Keimzellen im Ovar deutlich niedriger als im Hoden, sodass dies die unterschiedliche Inzidenz dieses Tumortyps zwischen Ovar und Hoden erklären könnte. Auch das mittlere Alter der klinischen Manifestation von Typ II-Keimzelltumoren ist bei Frauen niedriger als bei Männern. Im Gegensatz dazu sind die Vorläuferzellen der Typ I-Tumoren im Ovar wesentlich häufiger als im Hoden. Das könnte das häufigere Auftreten der Typ I-Tumoren bei Mädchen sowie die breitere Altersspanne beim weiblichen Geschlecht erklären [9, 12, 38, 39].

Aufgrund der Morphologie allein kann man bei einem rein teratomatös differenzierten Keimzelltumor nicht voraussagen, wie das biologische Verhalten sein wird.

Erst die Hinzuziehung des Alters und des Geschlechts des Patienten sowie der Tumorlokalisation lassen gewisse Rückschlüsse auf die wahrscheinliche Prognose zu. Das Auftreten einer Unreife im Teratom sowie das Ausmaß dieser Unreife ergeben zusätzlich die Möglichkeit, die Wahrscheinlichkeit einer bereits vorhandenen oder im Rezidiv auftretenden malignen Dottersackdifferenzierung im Tumor grob abzuschätzen [9, 11, 40]. Dies gilt allerdings nur für junge Kinder. Auch ist bisher nicht sicher, ob dieses Konzept für Jungen und Mädchen gleichermaßen gilt.

Die Problematik der Prognosebestimmung mittels der Morphologie des Tumors existiert ebenso bei teratomatösen Tumoren des Ovars. Bei Mädchen und jungen Frauen finden sich in der gleichen Lebensspanne einerseits reife Teratome (sogenannte Dermoidzysten), die sich benigne verhalten, aber auch maligne Keimzelltumoren mit reifer Teratomkomponente, die zum Teil eine sehr ungünstige Prognose haben. Es ist zu vermuten, dass die gemischten Keimzelltumoren des Ovars die Teratomanteile enthalten, die postpuberalen Keimzelltumoren des Hodens ähnlich sind, wohingegen die reinen reifen Teratome des Ovars eher einem Teil der reifen Teratome des Hodens jüngerer Knaben entsprechen [9, 11, 19, 28].

1.3 Fragestellung

Trotz des überwiegend benignen Verlaufs von teratomatösen Keimzelltumoren bei Kindern konnte im Rahmen der deutschen Keimzelltumorstudie im Kindes- und Adoleszentenalter (MAKEI) der GPOH (Gesellschaft für Onkologie und Hämatologie) gezeigt werden, dass ein Teil der Kinder mit Teratomen ein Rezidiv entwickelt. Diese Rezidive zeigten sich teils in Form eines erneuten reifen bzw. unreifen Teratoms, teils jedoch auch in Form eines malignen Keimzelltumors, im Speziellen in Form eines Dottersacktumors [5, 12, 41].

Eine sichere Zuordnung der verschiedenen Tumoren zu den einzelnen sich prognostisch sehr unterschiedlich verhaltenden Keimzelltumortypen ist also bislang nicht möglich. Ein besonderes Problem stellt außerdem die Gruppe der älteren Kinder und Adoleszenten dar. In dieser Altersgruppe ist es klinisch und morphologisch nicht sicher zu entscheiden, ob Keimzelltumoren eher spät aufgetretenen (sogenannten late-onset) Typ I-Tumoren entsprechen, die sich durchaus auch nach der Pubertät präsentieren können, oder aber frühen (sogenannten early-onset) Typ II-Tumoren [22, 42]. Folglich stellt sich die risikoadaptierte Therapieentscheidung solcher Tumoren schwierig dar, nicht zuletzt, weil das klinische Verhalten kaum vorherzusehen ist [15, 22, 43, 44].

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist, chromosomale Zugewinne des kurzen Arms von Chromosom 12 (12p), die eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Invasivität adulter Typ II-Keimzelltumoren zu spielen scheinen an einer großen Kohorte pädiatrischer Keimzelltumoren (Typ I-Tumoren) zu untersuchen [3, 28, 31, 45, 46]. Auch sollen an dieser Kohorte Zugewinne des langen Arms von Chromosom 1 (1q) hinsichtlich ihrer prognostischen Relevanz für kindliche Keimzelltumoren überprüft werden, da diese bei anderen kindlichen Tumoren (z.B. Wilms-Tumoren, pädiatrischen Hirntumoren und Lymphomen) als Marker für einen ungünstigen klinischen Verlauf gelten [47-51]. Um herauszufinden, ob außerdem ein Zusammenhang zwischen 12p bzw. 1q Zugewinnen und dem Alter und Geschlecht des Patienten sowie der Tumorlokalisation und -histologie besteht, sollen die Ergebnisse anschließend mit den klinischen Daten aus der MAKEI-Studie korreliert werden.

Die Hypothese ist, dass durch den Nachweis des für adulte Keimzelltumoren typischen Zugewinns auf Chromosom 12p oder des für andere kindliche Tumoren typischen Zugewinns auf Chromosom 1q jeweils Patienten identifiziert werden können, die Tumoren mit einem prognostisch ungünstigen Verlauf aufweisen.

Zusammenfassend lauten die Fragestellungen:

- I. Kann die bekannte genetische Veränderung adulter Keimzelltumoren (12p Zugewinn) im Hinblick auf das biologische Verhalten auf kindliche Keimzelltumoren übertragen werden?
- II. Findet sich auch bei kindlichen Keimzelltumoren mit malignem Verlauf die bisher als ungünstiger prognostischer Marker für verschiedene Tumoren im Kindesalter bekannte Veränderung (1q Zugewinn)?
- III. Gibt es einen Zusammenhang zwischen 12p bzw. 1q Zugewinn und dem Alter und Geschlecht der Patienten sowie der Tumorlokalisation und -histologie?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Tumorproben

Es wurden insgesamt 180 nicht-seminomatöse Keimzelltumoren von 177 Patienten analysiert (siehe Tabelle 2). Bei den Tumorproben handelt es sich um alle Keimzelltumoren der Jahre 2000 bis 2014 aus dem Kindertumorregister Kiel der GPOH, die verwertbares Material aufwiesen und die folgenden Einschlusskriterien erfüllten: Es musste sich histologisch um ein reifes Teratom (MT), ein unreifes Teratom (IT), einen Dottersacktumor (YST) oder einen gemischten Keimzelltumor (MGCT), in Form eines Teratoms mit Dottersacktumorkomponente, handeln und die Patienten mussten zum Zeitpunkt der Diagnose ≤ 6 Jahre oder ≥ 11 Jahre alt sein. Grund hierfür ist die anschließende Einteilung der Proben in drei verschiedene Altersgruppen. Gruppe 1 umfasst präpuberale Keimzelltumoren der 0 bis 6jährigen, Gruppe 2 umfasst Keimzelltumoren des Adoleszentenalters (11-17 Jahre), die bisher prognostisch nur schwer einzuschätzen sind und gewissermaßen eine Mittelstellung zwischen den Tumoren des Kindesalters und denen des Erwachsenenalters einnehmen sowie Gruppe 3, die adulte Keimzelltumoren von Patienten ≥ 18 Jahren beinhaltet.

Der Altersabstand zwischen den Gruppen 1 und 2 wurde gewählt, um sicherzustellen, dass sich in Gruppe 1 nur Keimzelltumoren finden, die vor Eintritt der Pubertät entstanden sind und so eine sichere Differenzierung zwischen prä- und postpuberalen Tumoren zu ermöglichen. Abbildung 2 zeigt histologische Beispiele der untersuchten Keimzelltumoren.

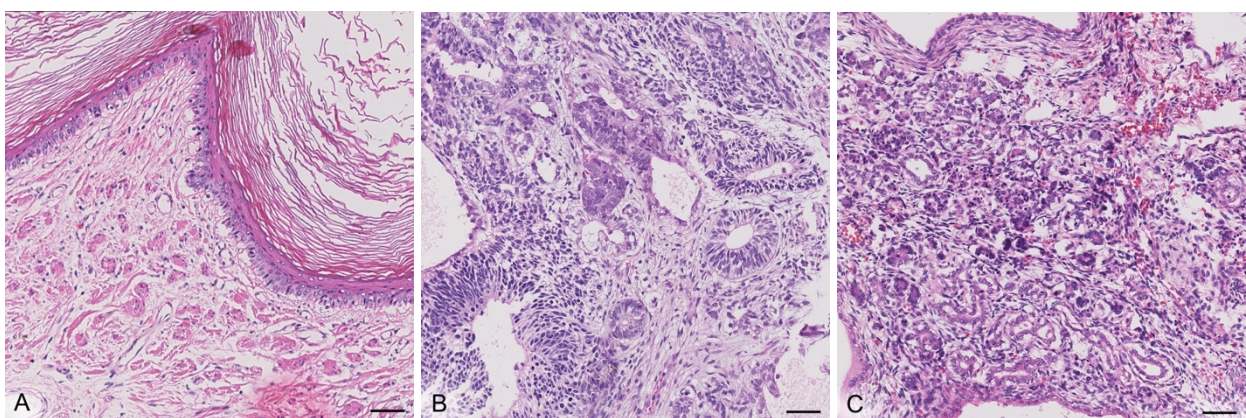


Abbildung 2: Histologische Bilder der untersuchten Keimzelltumoren

A: Reifes Teratom, B: Unreifes Teratom, C: Dottersacktumor; jeweils in H.E., Maßstabsleiste: 50 μ m.

Anzahl gesamt		177
Alter	0-6 Jahre	107
	11-17 Jahre	54
	≥ 18 Jahre	16
Geschlecht	Männlich	66
	Weiblich	111
Diagnose	MT– Reifes Teratom	115
	IT – Unreifes Teratom	10
	YST – Dottersacktumor	24
	MGCT – Gemischter Keimzelltumor	28
Lokalisation	Hoden	31
	Ovar	48
	Steißbein	45
	Mediastinum	13
	Andere ¹	40
Klinisches Ereignis im Verlauf ²	Ja	23
	Nein	92
	Keine Angabe	62

Tabelle 2: Patientenkollektiv

¹Andere Lokalisationen (in Klammern die Anzahl): Mundhöhle (4), Hals (3), Schilddrüse (1), Thoraxhöhle (4), Lunge/Pleura (1), Abdomen (4), Leber/Gallenwege (1), Kolon (2), Niere/Ureter (1), Retroperitoneum (3), Vagina (3), Rumpf/Becken (1), Wirbelsäule/Brustbein (1), Rippen/Thoraxwand (1), Gesäß/Analsbereich (3), Bein (1), multilokulär (2), keine Angabe (4).

²Als klinisches Ereignis gewertet wurden: Rezidiv, metachrone Erkrankung, Zweittumor und Tod.

2.1.1 MAKEI Studie

Die Keimzelltumor-Studie (MAKEI) der deutschen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) ist eine kooperative, prospektive Therapieoptimierungsstudie für extrakranielle Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen.

Von den insgesamt 177 Patienten, deren Tumoren in dieser Arbeit untersucht wurden, waren 115 in die MAKEI Studie eingeschlossen. Bei der Studienzentrale der MAKEI-Studie in Bonn wurden die klinischen Daten ebendieser Patienten hinsichtlich des weiteren klinischen Verlaufs erfragt. Als klinisches Ereignis gewertet wurden Rezidive, metachrone Erkrankung, die Entwicklung eines Zweittumors und Tod. Eine metachrone Erkrankung war innerhalb der Studie definiert als das zeitlich versetzte kontralaterale Auftreten desselben Tumors in paarigen Organen. Die mittlere Follow-up Zeit betrug 6 Jahre (Spanne 0-17 Jahre). Stichtag der Erfragung der klinischen Daten bei der Studienzentrale war der 20.02.2017. Von den 115 erfragten Patienten trat bei 23 (20%) im Verlauf ein klinisches Ereignis auf (siehe Tabelle 2).

Alle Patienten, die im Rahmen der MAKEI-Studie behandelt wurden, haben eine Einverständniserklärung abgegeben, die auch die Verwendung des Tumorgewebes für Forschungsprojekte im Rahmen der MAKEI-Studie umfasst. Für die MAKEI-Studie (einschließlich der Einverständniserklärung) liegt ein Ethikvotum der Universität Münster vor.

2.2 Erstellen eines Tissue-Microarrays

Vor den eigentlichen Untersuchungen wurden die Tumoren noch einmal hinsichtlich der histologischen Diagnose verifiziert, die verschiedenen Tumorkomponenten quantifiziert, sowie alle unterschiedlichen Tumorareale auf den Objektträgern markiert. Anschließend wurden aus den dazugehörigen Stellen der Tumorblöcke (Donorblöcke) Gewebezylinder entnommen. Diese Zylinder wurden in einen neuen Paraffinblock (Rezipientenblock) transferiert und entsprechend dokumentiert. Mindestens zwei Gewebezylinder wurden pro Tumor entnommen; bei histologisch heterogenen Tumoren wurden alle unterschiedlichen Gewebekomponenten jeweils durch einen Zylinder auf dem Tissue-Microarray (TMA) repräsentiert. Abbildung 3 veranschaulicht in den Punkten A – D die wesentlichen Schritte der TMA-Herstellung.

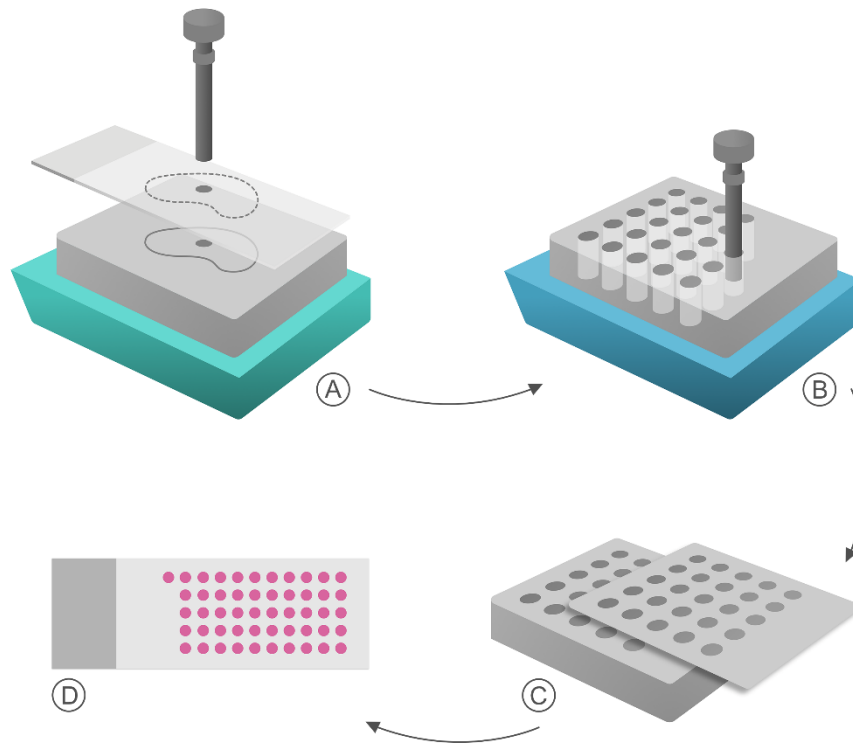


Abbildung 3: Herstellung eines Tissue-Microarrays (modifiziert nach [52])

A: Ein Gewebestück wird mithilfe des H.E.-Schnittes als Schablone und mittels eines Array-Stanzgerätes aus dem Donorblock (türkis) gewonnen. B: Über die Hohl-nadel des Stanzgerätes wird der Gewebe-zylinder in das vorgefertigte Loch eines neuen Rezipientenblocks (blau) gesetzt. Die Schritte A und B werden für jeden weiteren Tumorblock wiederholt. C und D: Mit einem Mikrotom werden von dem fertigen TMA-Block 5µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger übertragen.

Wie oben beschrieben sind TMAs Paraffin-Gewebeblöcke, die mehrere Gewebeproben verschiedener Patienten in Form kleiner, circa 0,6 mm durchmessender Stanz-zylinder enthalten (siehe Abbildung 4). So können mehrere Tumorstanzen parallel untersucht werden. Die fertigen Schnitte auf dem Objektträger wurden zur Kontrolle erneut H.E. gefärbt und mikroskopisch begutachtet, bevor weitere Schnitte des TMA-Blocks für die In-situ-Hybridisierung (s.u.) vorbereitet wurden.

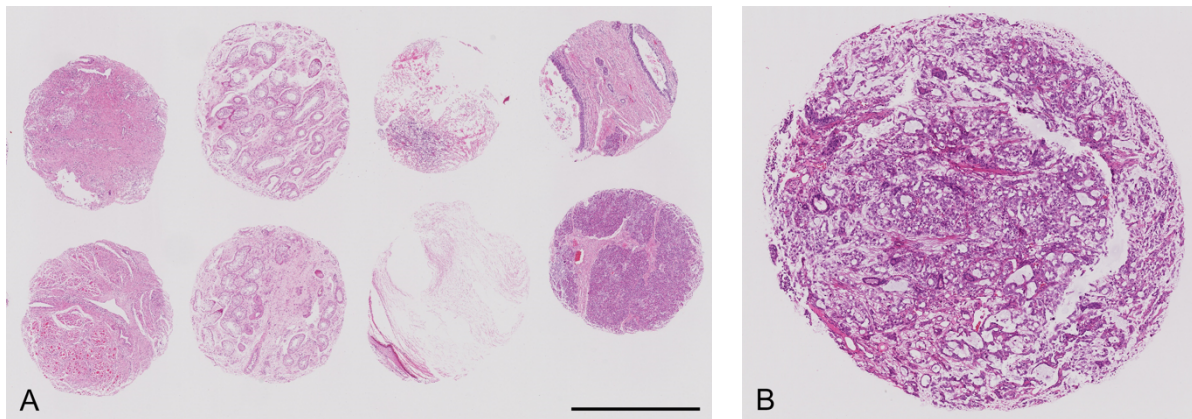


Abbildung 4: Beispiele eines Tissue-Microarrays

A: Ausschnitt eines TMA auf einem Objektträger, Maßstabsleiste 0,5 mm. B: Tumorstanze eines Dottersacktumors auf einem TMA, Durchmesser 0,6 mm. Jeweils in H.E. [TMA Scanner: SCN 400, Leica, Nussloch].

2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden DNA-Zielsequenzen mit spezifischen Sonden markiert und durch Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht. Das Verfahren beruht auf der Fähigkeit zweier einzelsträngiger Nukleinsäuren mit komplementären Basenpaaren, sich zu einem Doppelstrang zusammenzulagern. Durch Erhitzen der Gewebeschnitte denaturieren die Wasserstoffbrückenbindungen des DNA-Doppelstrangs, sodass eine einzelsträngige DNA entsteht. Nach Zugabe von speziellen Sonden, die sich zu den jeweils zu detektierenden DNA-Abschnitten komplementär verhalten und so anlagern können, entsteht durch Basenpaarung eine neue doppelsträngige Hybrid-DNA.

Bei den Sonden handelt es sich um Oligonukleotide aus modifizierten Desoxynukleotidtriphosphaten, die fluoreszierende Moleküle gebunden haben. Sie zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren (Exzitation) und wieder abzugeben (Emission). Bei der anschließenden mikroskopischen Betrachtung werden die Objekte mit UV-Licht angeregt. Filter mit speziellen Wellenlängen ermöglichen es, sich begrenzte Lichtspektren anzusehen und so spezifische Signale der Sonden zu erkennen.

Es kommen zwei verschiedene Sonden zum Einsatz: Eine Referenzsonde, z.B. für die Zentromerregion eines Chromosoms, sowie eine zweite Sonde, die an spezifische Genlokationen dieses Chromosoms bindet und mit der sich u.a. Zugewinne bestimmter Chromosomenabschnitte erfassen lassen.

In der Regel lassen sich nach Hybridisierung mit Sonden fluoreszenzmikroskopisch entsprechend dem doppelten Chromosomensatz normaler Zellen zwei Signale pro Zellkern und Sonde nachweisen. Liegt jedoch beispielsweise ein Zugewinn einer DNA-Sequenz vor, erscheinen mehr Gensignale der spezifischen Sonde als Referenzsignale der Zentromersonde. So ist es möglich durch Auszählen der Sondensignale unter dem Fluoreszenzmikroskop numerische Aberrationen zu erfassen.

2.3.1 FISH Protokoll

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die FISH zur Analyse eines Tissue-Microarrays (TMA) am Paraffinschnitt verwendet. Die FISH wird über drei aufeinanderfolgende Tage durchgeführt. An Tag 1 erfolgen die Schritte von der Entparaffinierung bis zur Hybridisierung, an Tag 3 erfolgt die DAPI-Färbung.

Tag 1

1. Entparaffinierung und Nachfixierung
 - a. OT bei RT 2x für 10 Min. in Xylol geben
 - b. OT bei RT 2x für je 2-3 Min. in absteigender Alkoholreihe waschen (2x 100% Ethanol, 1x 96% Ethanol, 1x 70% Ethanol)
 - c. OT bei RT für 2-3 Min. in dest. H₂O waschen
2. Denaturierung
 - a. OT 2x für 10 Min. in 0,1N Citrat-Puffer pH 6,0 (aufkochen bei 800 Watt in der Mikrowelle, dabei zwischendurch auffüllen, um ein Austrocknen zu verhindern)
 - b. OT 40 Min. abkühlen lassen
 - c. OT 10 Min. in dest. H₂O geben
 - d. OT 10 Min. in 100ml dest. H₂O + 0,1N HCl mit 0,01% Proteinkinase K (10µl) geben

- e. Trocknen:
 - OT 5 Min. in dest. H₂O geben
 - OT 2 – 3 Min. in absteigender Alkoholreihe waschen (100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol)
 - OT bei RT trocknen lassen

3. Hybridisierung

(Die nächsten Schritte finden im Dunkeln statt.)

- a. 5 µl Sonde auf ein Deckglas geben und auf den OT legen
- b. Deckglas mit Fixogum luftdicht abschließen und 15 Min. bei RT trocknen
- c. OT in Hybridisierungsschlitten geben und Filterstreifen befeuchten
- d. 10 Min. bei 95°C im Hybridisierungsschlitten erhitzen
- e. Über 2 Nächte bei 37°C im Hybridisierungsschlitten inkubieren

Tag 3

4. DAPI-Färbung

- a. Deckglas vom OT entfernen
- b. OT direkt in 2xSSC-Puffer geben um ein Austrocknen zu verhindern
- c. Stringentes Waschen für je 1 Min.:
 - 2x in 2xSSC bei RT
 - 1x in 2xSSC bei 72°C im Wasserbad
 - 2x in 0,5xSSC bei 72°C im Wasserbad
 - 2x in 2xSSC bei RT
 - 2x in dest. H₂O bei RT
- d. OT im Dunkeln bei RT trocknen lassen
- e. OT mit DAPI eindecken
- f. OT im Dunkeln bei +2 bis +8°C bis zur Auswertung aufbewahren

2.3.2 Materialien und Geräte

Alle verwendeten Materialien und Geräte zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
Objektträger	Leica BOND Plus Slides, 25,5 x 75,5 x 10 mm	Leica, Nussloch
Deckgläser	Menzel-Gläser 18 x 18 mm	ThermoScientific, Waltham, MA (USA)
Glasküvetten	Hellendahl, 60 x 55 x 105 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten	Pre-Cision 100-1000µl, 10-100 µl, 0,5-1 µl	Biozym, Oldendorf
	Proline 0,1-2,5 µl, 5-50 µl	Satorius, Göttingen
Pipettenspitzen	Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrowelle	HMT 812B	Bosch, Stuttgart
Wasserbad	WB 7	Memmert, Schwabach
Fixogum	-	Marabu, Tamm
Hybridisierungsschlitten	Therma brite, Statspin	Abbott Molecular
pH Meter	HI 221 Microprocessor, Calibration Ceck	Hanna Instruments, Vöhringen

Tabelle 3: *Verwendete Materialien und Geräte*

2.3.3 Reagenzien und Lösungen

Alle verwendeten Reagenzien und Lösungen, die zur FISH verwendet wurden sind im Folgenden aufgelistet. In Tabelle 4 finden sich alle kommerziellen, in Tabelle 5 alle selbst hergestellten Reagenzien und Lösungen.

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
Ethanol	Ensure	Merck, Darmstadt
Nukleasefreies Wasser	Ambion 0,2 µm filtered, autoclaved	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
NaOH	J.T. Baker 2N	Avantor Performanca Mat., Deventer (NL)
HCl	2N	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	J.T. Baker	Avantor Performanca Mat., Deventer (NL)
DAPI (4,6-Diamin-2-Phenylindoldihydrochlorid)	Vectrashield	Burlingame, CA (USA)
EDTA	Titriplex	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O)		Merck, Darmstadt
Proteinkinase K	Fermentas	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Destilliertes H ₂ O	Ampuwa Spüllösung Plastipur	Fresenius Kabi, Bad Homburg
20 x SSC (Saline Sodium Citrate) - Fertiglösung	3,0 M NaCl + 0,3 M Natriumcitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇) bei pH 7	UltraPure, Gibco Life technologies, Carlsbad CA (USA)

Tabelle 4: Fertige Reagenzien

Produkt	Beschreibung
HCl 0,1N	5ml HCl 2N + 95ml H ₂ O
0,1N Citrat-Puffer	180ml H ₂ O + 20ml 10xCitrat-Puffer
10xCitrat-Puffer	21g Citronensäure-Monohydrat + 1g EDTA in 850ml dest. H ₂ O lösen, dann pH 6 mit 2N NaOH einstellen und mit dest. H ₂ O auf 1000ml auffüllen
2xSSC-Puffer	100ml 20xSSC-Puffer + 900ml dest. H ₂ O
0,5xSSC-Puffer	25ml 20xSSC-Puffer + 975ml dest. H ₂ O

Tabelle 5: Selbst hergestellte Reagenzien

2.3.4 DNA-Sonden

Es kamen jeweils direkt markierte, kombinierte Sonden für die Chromosomen 1 und 12 zum Einsatz. Über die Sonden wurde die spezifische Genregion (1q25 bzw. 12p12.1 (KRAS)) mit grünem Fluoreszenzfarbstoff sowie die Referenzregionen (1p36 bzw. CEN12) mit rotem Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht.

Verwendete Sonden:

12p (KRAS): Zytolight, SPEC 12p/12c Probe (Zytovision, Germany)

1q: Vysis LSI 1p36/1q25 Probe (Abbott Molecular Inc., Illinois, USA)

2.3.5 Mikroskopie und Auszählung

Die mikroskopische Auszählung der FISH-Signale erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Göttingen) und drei verschiedenen Filtern (alle von Zeiss, Göttingen), um einerseits Zellkerngröße und -form (DAPI-Filter) und andererseits die zum jeweiligen Zellkern gehörigen Genlokus- und Referenzsignale (grüne und rote Fluoreszenz) getrennt voneinander beurteilen zu können:

- DAPI-Filter: Set 02 - Exzitation 358 nm, Emission 463 nm
- Grüne Fluoreszenz (Alexa 488): Set 10 - Exzitation 493 nm, Emission 520 nm
- Rote Fluoreszenz (Alexa 555): Set 20 - Exzitation 553 nm, Emission 568 nm

Die Bilder zur Ergebnisdokumentation wurden mithilfe einer Fluoreszenzkamera (Spot RT230 Slider, Meyer Diagnostic Instruments, Houston USA) erstellt.

Für jede Gewebestanze auf dem TMA wurden mindestens 50 sich nicht überlappende Zellkerne ausgezählt. Die Anzahl der grünen Gensignale der spezifischen Genloci in Relation zu den roten Gensignalen der Referenzregionen wurden errechnet. Eine Ratio von $\geq 1,3$ wurde als Zugewinn des jeweiligen Genabschnitts gewertet, da in normalem, nicht-neoplastischen Gewebe in über 99,7% der Fälle eine Ratio von $< 1,3$ zu erwarten ist [53].

Die Ergebnisse wurden durch einen zweiten, erfahrenen Untersucher (Dr. Vokuhl, Sektion für Kinderpathologie des Universitätsklinikums Kiel) verifiziert.

Abbildung 5 zeigt Beispiele der FISH-Mikroskopie.

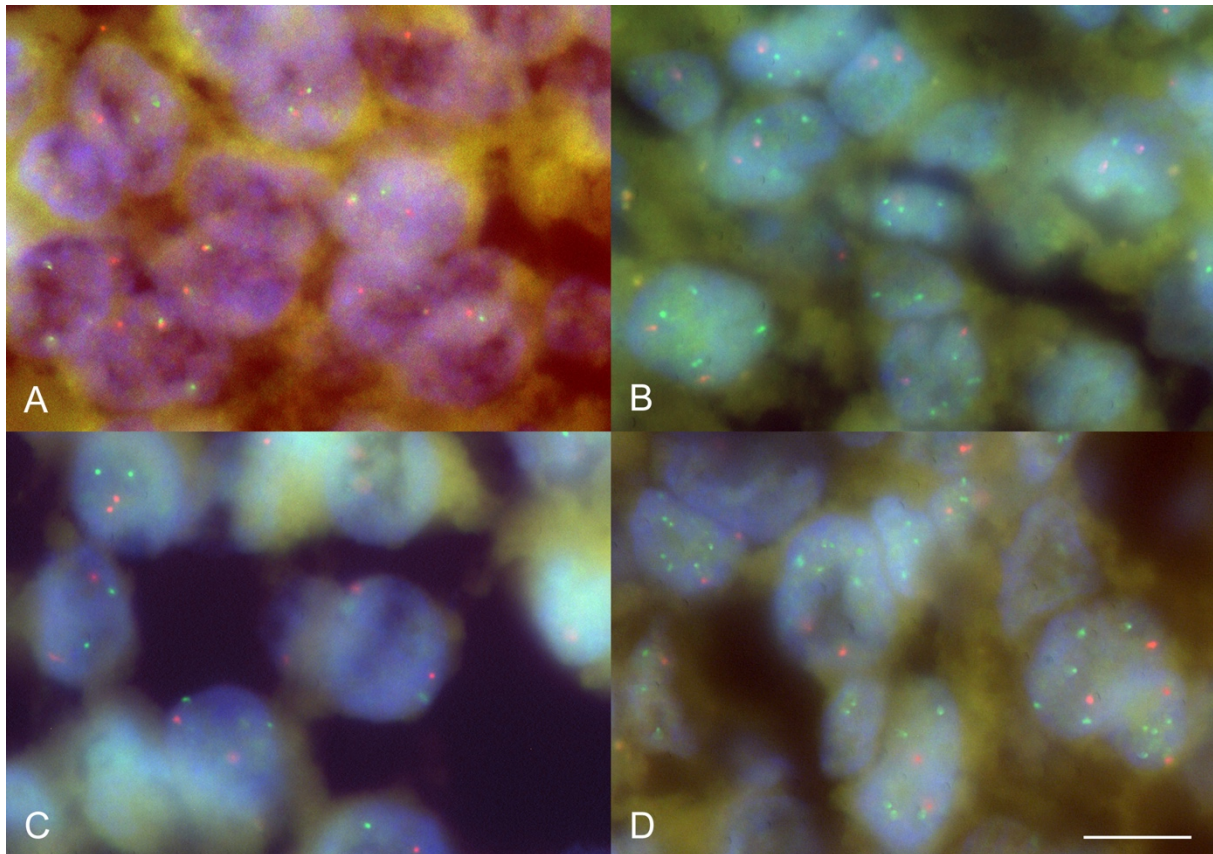


Abbildung 5: Beispiele der FISH für 1q und 12p

A: Kein Zugewinn von 1q (Ratio 1,0; reifes Teratom), B: Zugewinn von 1q (Ratio 2,0; gemischter Keimzelltumor). Das grüne Signal entspricht der 1q-, das rote Signal der 1p-Sonde.

C: Kein Zugewinn von 12p (Ratio 1,0; reifes Teratom), D: Zugewinn von 12p (Ratio 2,9; reifes Teratom). Das grüne Signal entspricht der 12p-, das rote Signal der CEN12-Sonde.

Maßstabsleiste: 10µm.

2.4 Kontrollkohorte

Zur Ergebnisevaluation und Kontrolle der Untersuchungstechnik wurde eine Kontrollkohorte aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt. Die Tumorproben stammten aus dem Zeitraum der Jahre 2008 – 2011 und umfassten 39 adulte Seminome. Auch hier ging es um die Fragestellung eines 1q bzw. 12p Zugewinns der Tumorproben.

Seminome erwachsener Männer sind Typ II-Keimzelltumoren [3], bei denen sich regelhaft ein Isochromosom 12p (i(12p)) bzw. Zugewinne im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 12 (12p) finden [23, 24, 26-28]. Ein Zugewinn auf dem langen Arm von Chromosom 1 (1q), wie ihn viele pädiatrische Tumoren aufweisen [17-20], ist hier jedoch nicht zu erwarten.

Von den 39 Tumorproben war eine Tumorprobe auch nach wiederholter Färbung nicht auswertbar. Keine der 38 übrigen Proben wies einen Zugewinn von 1q auf (0%), jedoch zeigte sich in 14 der 38 Tumoren (36,8%) ein deutlicher Zugewinn von 12p mit einer mittleren 12p/CEN12 Ratio von 1,7 (Spanne 1,3 – 3,0).

Das Ergebnis entspricht den zu erwartenden Werten für adulte Seminome und kann somit als Positivkontrolle für die nachfolgenden Untersuchungen gewertet werden.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm Prism-6 (GraphPad Software Inc., San Diego USA).

Alle Parameter wurden mittels Kontingenztabelle und dem Chi-Quadrat-Test bzw. Fisher's Exact Test auf Signifikanz untersucht, wobei ein p-Wert von <0.05 als statistisch signifikante Assoziation definiert wurde.

3 Ergebnisse

3.1 1q Zugewinne

Von den 177 Keimzelltumoren, die mittels der 1p/1q FISH-Sonde untersucht wurden, waren 143 auswertbar (80,7%). Bei 34 Tumoren konnte auch nach Wiederholung der Methodik keine Auswertbarkeit erzielt werden. Insgesamt wiesen 11 der Tumoren einen Zugewinn auf dem langen Arm von Chromosom 1 (1q) auf (7,7%). Die Zugewinne konnten jeweils im gesamten Tumorareal beobachtet werden (siehe Abbildung 6).

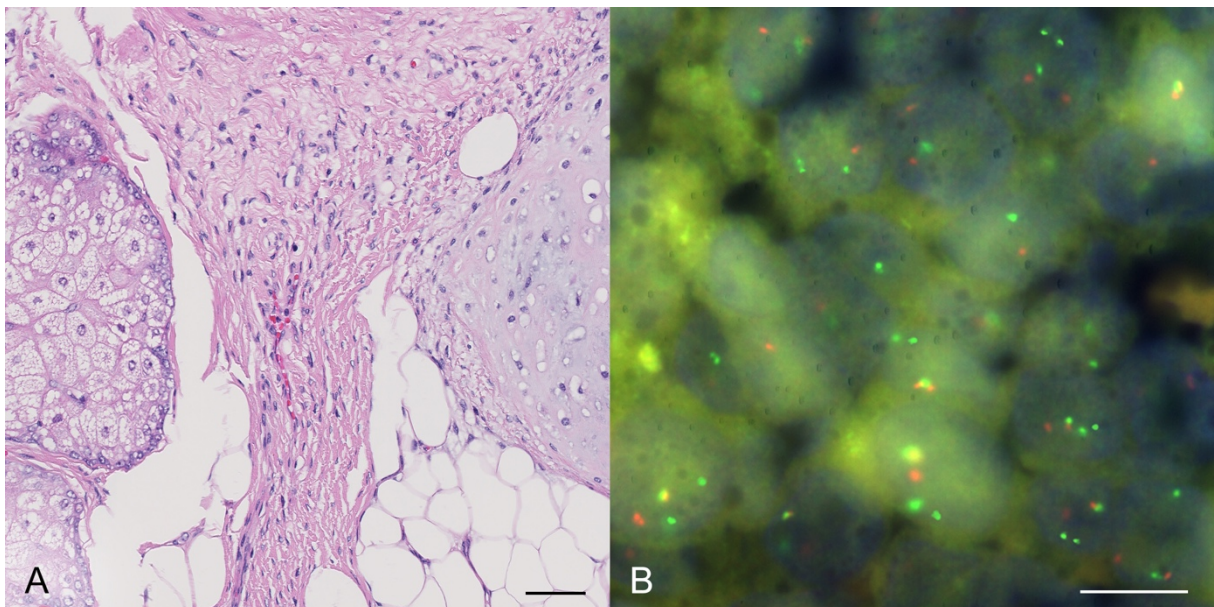


Abbildung 6: Beispiel für einen Zugewinn von 1q

A: Reifes Teratom in H.E., Maßstabsleiste: 50 μ m. B: Tumor aus A nach 1q/1p-FISH, Maßstabsleiste: 10 μ m.

Das grüne Signal entspricht der 1q-, das rote Signal der 1p-Sonde; Ratio: 1,5.

Von den 11 Keimzelltumoren mit 1q Zugewinn traten 7 (63,7%) bei männlichen und 4 (36,4%) bei weiblichen Patienten auf. Die Untersuchung der Korrelation zwischen Patientengeschlecht und 1q Zugewinn zeigte eine zufällige Verteilung ($p=0.1059$, Fisher's Exact Test, siehe Tabelle 6). Keimzelltumoren präpuberaler Patienten (≤ 6 Jahre) zeigten häufiger einen 1q Zugewinn als Tumoren in der Gruppe der Adoleszenten, in der keine 1q Zugewinne nachweisbar waren, jedoch ähnlich häufig wie die Tumoren adulter Patienten (10/81 (12,3%), 0/54 (0%) und 1/8 (12,5%), $p=0.0269$, Chi-Quadrat-Test, siehe Tabelle 6).

Auch der Zusammenhang zwischen 1q Zugewinn und Lokalisation der Tumoren ist in Tabelle 6 wiedergegeben. Zugewinne von 1q traten häufiger bei Keimzelltumoren in gonadalen (7/69, 10,1%) als extragonadalen (4/74, 5,4%) Lokalisationen auf. Jedoch war der Unterschied nicht statistisch signifikant ($p=0.3351$, Fisher's Exact Test).

Die 1q-positiven präpuberalen Tumoren waren ausschließlich Dottersacktumoren und gemischte Keimzelltumoren. Der einzige Keimzelltumor mit 1q Zugewinn aus der Gruppe der über 18jährigen hatte den histologischen Phänotyp eines reifen Teratoms und fand sich im Ovar. Bei den Jungen unter 6 Jahren fand sich vor allem in Keimzelltumoren des Hodens ein 1q Zugewinn, bei den Mädchen waren alle Lokalisationen etwa gleich häufig betroffen (siehe Tabelle 7).

Insgesamt ließen sich Zugewinne von 1q signifikant seltener in reifen Teratomen nachweisen, verglichen mit Keimzelltumoren der anderen histologischen Phänotypen (1/100, 1% und 10/43, 23,3%, $p<0.0001$, Fisher's Exact Test, siehe Tabelle 6). Die Häufigkeit von 1q Zugewinnen betrug in unreifen Teratomen 0% (0/7), in Dottersacktumoren 42,8% (6/14) und in gemischten Keimzelltumoren 18,2% (4/22). Auch dies ist in Tabelle 6 veranschaulicht. Tabelle 7 fasst die Verteilung der Keimzelltumoren mit 1q Zugewinn nach Altersgruppe und Geschlecht zusammen.

		1q gain	p-Wert
Geschlecht	Männlich	7/55 (12.7%)	0.1059 ²
	Weiblich	4/88 (4.5%)	
Alter	0-6 Jahre	10/81(12.3%)	0.0269 ³
	11-17 Jahre	0/54 (0.0%)	
	≥18 Jahre	1/8 (12.5%)	
Lokalisation	Hoden	6/27 (22.2%)	0.3551 ^{2,4}
	Ovar	1/42 (2.4%)	
	Sacrococcygeal	1/32 (3.1%)	
	Mediastinum	1/12 (8.3%)	
	Andere ¹	2/30 (6.7%)	
Histologie	MT	1/100 (1.0%)	<0.0001 ^{2,5}
	IT	0/7 (0.0%)	
	YST	6/14 (42.9%)	
	MGCT	4/22 (18.2%)	

Tabelle 6: Übersicht der 1q Zugewinne

MT: Reifes Teratom, IT: Unreifes Teratom, YST: Dottersacktumor, MGCT: Gemischter Keimzelltumor.

¹Andere Lokalisationen: Mundhöhle, Hals, Schilddrüse, Thoraxhöhle, Lunge/Pleura, Abdomen, Leber/Gallenwege, Kolon, Niere/Ureter, Retroperitoneum, Vagina, Rumpf/Becken, Wirbelsäule/Brustbein, Rippen/Thoraxwand, Gesäß/Analbereich, Bein, multilokulär oder ohne Angabe.

²Fisher's Exact Test, ³Chi-Quadrat-Test, ⁴p-Wert Berechnung erfolgte für die Werte MT vs. IT/YST/MGCT,

⁵p-Wert Berechnung erfolgte für die Werte gonadal vs. extragonadal.

			0-6 Jahre		≥ 18 Jahre	
Anzahl gesamt		11	10		1	
Geschlecht	Männlich ♂	7	7		-	
	Weiblich ♀	4	3		1	
			♂	♀	♂	♀
Diagnose	MT	1	-	-	-	1
	IT	-	-	-	-	-
	YST	6	4	2	-	-
	MGCT	4	3	1	-	-
			♂	♀	♂	♀
Lokalisation	Hoden	6	6	-	-	-
	Ovar	1	-	1	-	1
	Sacrococcygeal	1	1	-	-	-
	Mediastinum	1	-	1	-	-
	Andere ¹	2	-	2	-	-
			♂	♀	♂	♀
Klinisches Ereignis ²	Ja	-	-	-	-	-
	Nein	8	6	2	-	-
	Keine Angabe	3	1	1	-	1

Tabelle 7: 1q-positive Keimzelltumoren nach Geschlecht und Altersgruppen

MT: Reifes Teratom, IT: Unreifes Teratom, YST: Dottersacktumor, MGCT: Gemischter Keimzelltumor.

¹Andere Lokalisationen: Mundhöhle, Hals, Schilddrüse, Thoraxhöhle, Lunge/Pleura, Abdomen, Leber/Gallenwege, Kolon, Niere/Ureter, Retroperitoneum, Vagina, Rumpf/Becken, Wirbelsäule/Brustbein, Rippen/Thoraxwand, Gesäß/Anlbereich, Bein, multilokulär oder ohne Angabe.

²Als klinisches Ereignis gewertet wurden: Rezidiv, metachrone Erkrankung, Zweittumor und Tod.

3.2 12p Zugewinne

In der FISH-Analyse der 12p Zugewinne konnten von den 177 Keimzelltumoren 157 ausgewertet werden (92,4%). 20 Tumoren waren auch nach wiederholter Hybridisierung nicht auswertbar. Ein Zugewinn auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 (12p) wurde bei 29 der 157 Keimzelltumoren beobachtet (18,5%). Auch hier konnten die Zugewinne jeweils im gesamten Tumorgewebe detektiert werden (siehe Abbildung 7).

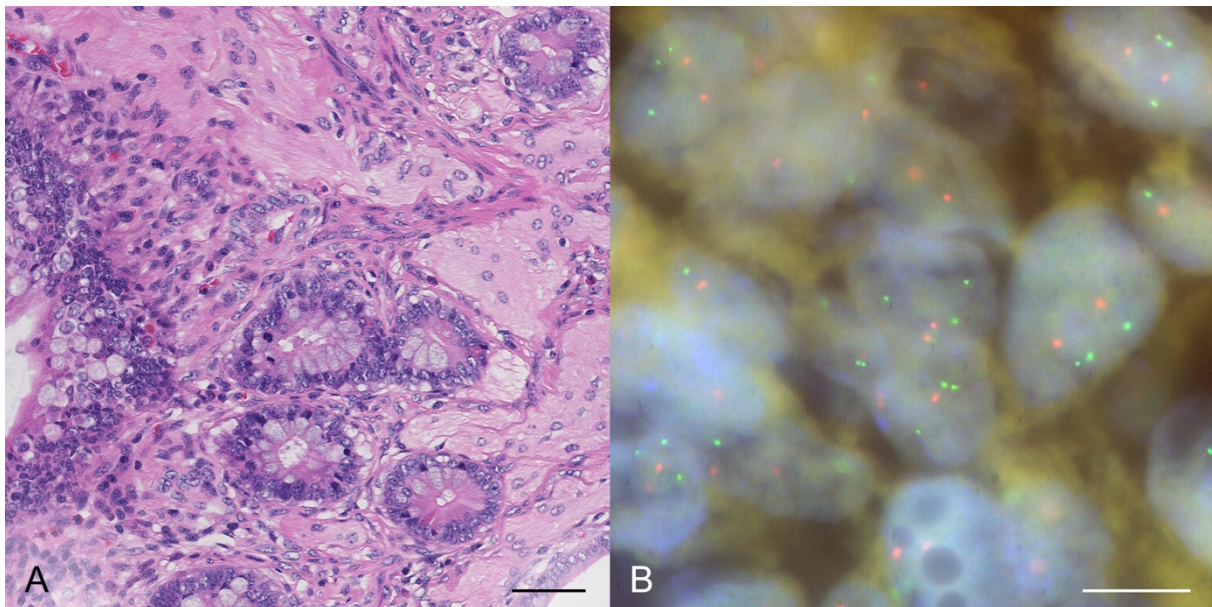


Abbildung 7: Beispiel für einen Zugewinn von 12p.

A: Reifes Teratom in H.E., Maßstabsleiste: 50µm. B: Tumor aus A nach 12p/CEN12-FISH, Maßstabsleiste: 10µm. Das grüne Signal entspricht der 12p-, das rote Signal der CEN12-Sonde; Ratio: 1,5.

Von den 29 Tumoren mit 12p Zugewinn waren 17 (58,6%) von männlichen und 12 (41,4%) von weiblichen Patienten. Männliche Patienten wiesen somit statistisch signifikant häufiger einen 12p Zugewinn auf ($p=0.0189$, Fisher's Exact Test, siehe Tabelle 8). Bei Keimzelltumoren aus der Gruppe der Adoleszenten (im Alter von 11 bis 17 Jahren) fanden sich mit statistischer Signifikanz am häufigsten 12p Zugewinne, gefolgt von der Gruppe der adulten und zuletzt der Gruppe präpuberaler Patienten (16/53 (30,2%), 2/9 (22,2%) und 11/95 (11,6%), $p=0.0191$, Chi-Quadrat-Test, siehe Tabelle 8). Die meisten Keimzelltumoren mit 12p Zugewinn waren in den Gonaden lokalisiert (20/73, 27,4%), verglichen mit extragonadalen Lokalisationen (9/84, 10,7%, $p=0.0124$, Fisher's Exact Test, siehe Tabelle 8).

Während bei den unter 6jährigen ausschließlich Jungen von einem gonadalen Befall betroffen waren, zeigte sich bei den Adoleszenten mit gonadalen 12p-positiven Tumoren eine homogene Verteilung zwischen den Geschlechtern (siehe Tabelle 9).

Insgesamt wiesen Keimzelltumoren, die als reife Teratome diagnostiziert wurden seltener einen Zugewinn von 12p auf als die übrigen Keimzelltumoren, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (15/105, 14,3% und 14/52, 26,9%, $p=0.0791$, Fisher's Exact Test, siehe Tabelle 8). Die Häufigkeit der 12p Zugewinne innerhalb der anderen Keimzelltumorphänotypen betrug für unreife Teratome 37,5% (3/8), für Dottersacktumoren 38,9% (7/18) und für gemischte Keimzelltumoren 15,4% (4/26), auch dies ist in Tabelle 8 wiedergegeben. Der größte Teil der reifen Teratome mit Zugewinn stammte aus der Gruppe der Adoleszenten. In der Gruppe der jüngeren Kinder waren die 12p-positiven Tumoren phänotypisch überwiegend Dottersacktumoren. Tabelle 9 fasst die Verteilung der Keimzelltumoren mit 12p Zugewinn nach Altersgruppe und Geschlecht zusammen.

		12p gain	p-Wert
Geschlecht	Männlich	17/60 (28.3%)	0.0189 ²
	Weiblich	12/97 (12.4%)	
Alter	0-6 Jahre	11/95 (11.6%)	0.0191 ³
	11-17 Jahre	16/53 (30.2%)	
	≥18 Jahre	2/9 (22.2%)	
Lokalisation	Hoden	13/30 (43.3%)	0.0124 ^{2,4}
	Ovar	7/43 (16.3%)	
	Sacrococcygeal	5/39 (12.8%)	
	Mediastinum	2/11 (18.2%)	
	Andere ¹	2/34 (5.9%)	
Histologie	MT	15/105 (14.3%)	0.0791 ^{2,5}
	IT	3/8 (37.5%)	
	YST	7/18 (38.9%)	
	MGCT	4/26 (15.4%)	

Tabelle 8: Übersicht der 12p Zugewinne

MT: Reifes Teratom, IT: Unreifes Teratom, YST: Dottersacktumor, MGCT: Gemischter Keimzelltumor.

¹Andere Lokalisationen: Mundhöhle, Hals, Schilddrüse, Thoraxhöhle, Lunge/Pleura, Abdomen, Leber/Gallenwege, Kolon, Niere/Ureter, Retroperitoneum, Vagina, Rumpf/Becken, Wirbelsäule/Brustbein, Rippen/Thoraxwand, Gesäß/Analsbereich, Bein, multilokulär oder ohne Angabe.

²Fisher's Exact Test, ³Chi-Quadrat-Test, ⁴p-Wert Berechnung erfolgte für die Werte MT vs. IT/YST/MGCT,

⁵p-Wert Berechnung erfolgte für die Werte gonadal vs. extragonadal.

			0-6 Jahre		11-17 Jahre		≥ 18 Jahre	
Anzahl gesamt		29	11		16		2	
Geschlecht	Männlich ♂	17	8		9		-	
	Weiblich ♀	12	3		7		2	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
Diagnose	MT	15	1	-	8	6	-	-
	IT	3	1	-	-	-	-	2
	YST	7	5	2	-	-	-	-
	MGCT	4	1	1	1	1	-	-
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
Lokalisation	Hoden	13	6	-	7	-	-	-
	Ovar	7	-	-	-	7	-	-
	Sacrococcygeal	5	2	1	-	-	-	2
	Mediastinum	2	-	-	2	-	-	-
	Andere ¹	2	-	2	-	-	-	-
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
Klinisches Ereignis ²	Ja	3	-	-	2	1	-	-
	Nein	17	6	1	7	3	-	-
	Keine Angabe	9	2	2	-	3	-	2

Tabelle 9: 12p-positive Keimzelltumoren nach Geschlecht und Altersgruppen

MT: Reifes Teratom, IT: Unreifes Teratom, YST: Dottersacktumor, MGCT: Gemischter Keimzelltumor.

¹Andere Lokalisationen: Mundhöhle, Hals, Schilddrüse, Thoraxhöhle, Lunge/Pleura, Abdomen, Leber/Gallenwege, Kolon, Niere/Ureter, Retroperitoneum, Vagina, Rumpf/Becken, Wirbelsäule/Brustbein, Rippen/Thoraxwand, Gesäß/Anlbereich, Bein, multilokulär oder ohne Angabe.

²Als klinisches Ereignis gewertet wurden: Rezidiv, metachrone Erkrankung, Zweittumor und Tod.

3.2.1 12p Zugewinne in gemischten Keimzelltumoren

Die gemischten Keimzelltumoren mit 12p Zugewinn (n=4) zeigten in allen Fällen sowohl im Teratomanteil des Tumors als auch in der malignen Dottersacktumorkomponente ein positives FISH Ergebnis. In Abbildung 8 ist die teratomatöse Komponente eines gemischten Keimzelltumors dargestellt, die einen Zugewinn von 12p zeigte, obwohl in der ausgewerteten Tumorstanze auf dem TMA kein Dottersacktumorteil vorhanden war.

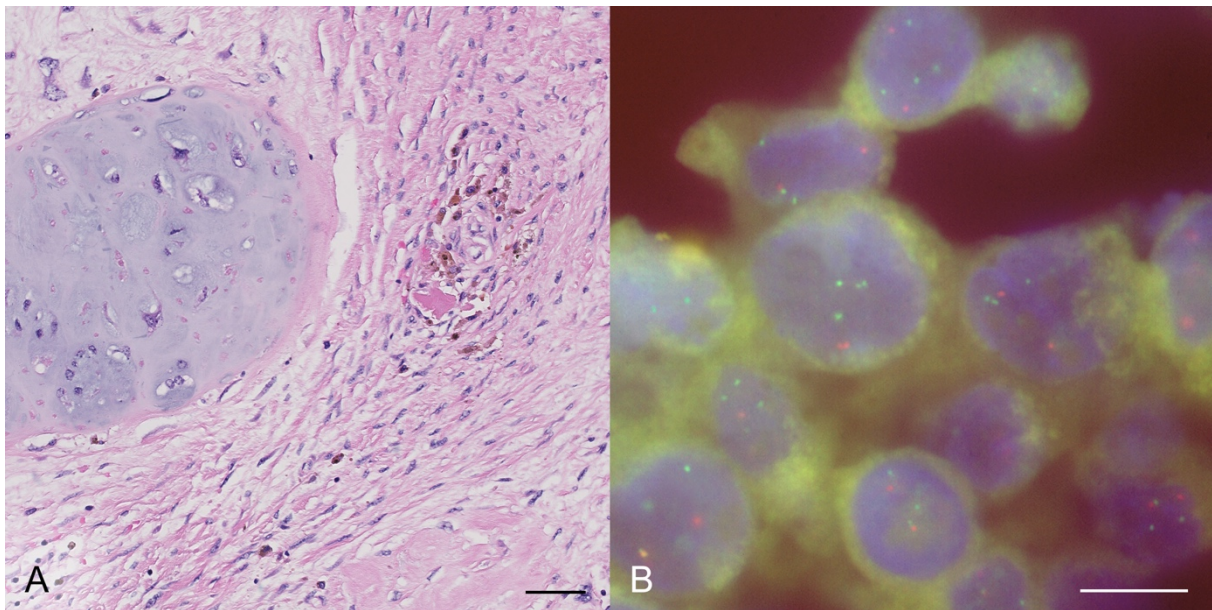


Abbildung 8: Teratomanteil eines gemischten Keimzelltumors mit Zugewinn von 12p

A: Komponente eines reifen Teratoms innerhalb eines gemischten Keimzelltumors in H.E.-Färbung, Maßstabsleiste: 50µm. B: Tumor aus A nach 12p/CEN12-FISH, Maßstabsleiste: 10µm. Das grüne Signal entspricht der 12p-, das rote Signal der CEN12-Sonde; Ratio: 2,1.

3.3 Gepaarte Analyse von 1q und 12p anhand Primär- und Rezidivtumor

Von drei Patienten lag neben dem Material der Primärtumoren auch Gewebe von später aufgetretenen Tumorrezidiven vor. Auch dieses wurde hinsichtlich der Zugewinne von 1q und 12p untersucht. Der 1q Status war in zwei Patienten mit auswertbaren Ergebnissen unverändert (siehe Tabelle 10): Kein Zugewinn sowohl im Primärtumor als auch im Tumorrezidiv. Bei einem Patienten waren die Ergebnisse der 1q-FISH trotz wiederholter Versuche nicht auszuwerten.

Auch der Status der 12p Zugewinne zeigte sich in allen drei Fällen unverändert (siehe Tabelle 10): Bei zwei Patienten waren sowohl im Primarius, als auch im Rezidivtumor Zugewinne von 12p nachzuweisen. Bei einem Patienten wiesen weder der Primärtumor noch das rezidierte Malignom einen 12p Zugewinn auf.

Patient	Tumor	1q gain	12p gain
1	Primarius	Negativ	Negativ
	Rezidiv	Negativ	Negativ
2	Primarius	Negativ	Positiv
	Rezidiv	Negativ	Positiv
3	Primarius	Nicht auswertbar	Positiv
	Rezidiv	Nicht auswertbar	Positiv

Tabelle 10: Gepaarte Analyse von Primär- und Rezidivtumor anhand Zugewinnen von 1q und 12p

3.4 Korrelation der 1q und 12p Zugewinne mit dem klinischen Verlauf

Die Ergebnisse der FISH Untersuchungen wurden mit den klinischen Daten aus der MAKEI-Studie korreliert (siehe Abschnitt 2.1.1.).

Innerhalb der Kohorte (n=115) gab es im Verlauf 24 klinische Ereignisse. 17 von 115 (14,7%) Patienten, zu denen klinische Verlaufsdaten vorlagen, erlitten ein Rezidiv. 4/115 (3,5%) entwickelten eine metachrone Erkrankung, d.h. ein zeitlich versetztes kontralaterales Auftreten desselben Tumors in paarigen Organen und 2/115 (1,7%) erkrankten im Verlauf an einem Zweittumor (Astrozytom und Medulloblastom). 2 der 17 Patienten (11,7%), die ein Rezidiv erlitten, sind daran verstorben. Es gab außerdem einen weiteren Todesfall innerhalb der Kohorte, dessen Ursache jedoch nicht näher zu eruieren war.

Um 1q und 12p Zugewinne als Biomarker für die Malignität eines Keimzelltumors zu beurteilen, wurden Rezidive und das Auftreten eines metachronen Befalls als *malignes Ereignis* gewertet. Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die Verteilung dieser malignen Ereignisse.

Anzahl gesamt		21
Geschlecht	Männlich	4
	Weiblich	17
Alter	0-6 Jahre (alle <4 Jahre)	7
	11-17 Jahre	9
	≥18 Jahre	5
Lokalisation	Hoden	2
	Ovar	9
	Sacrococcygeal	5
	Mediastinum	0
	Andere ¹	5
Histologie	MT	12
	IT	3
	YST	2
	MGCT	4

Tabelle 11: Übersicht der Tumoren mit malignem klinischen Verlauf (Rezidiv und metachroner Befall)

MT: Reifes Teratom, IT: Unreifes Teratom, YST: Dottersacktumor, MGCT: Gemischter Keimzelltumor.

¹Andere Lokalisationen: Mundhöhle, Hals, Schilddrüse, Thoraxhöhle, Lunge/Pleura, Abdomen, Leber/ Gallenwege, Kolon, Niere/Ureter, Retroperitoneum, Vagina, Rumpf/Becken, Wirbelsäule/Brustbein, Rippen/Thoraxwand, Gesäß/Anlbereich, Bein, multilokulär oder ohne Angabe.

Absolut betrachtet gab es im klinischen Verlauf 21 maligne Ereignisse, die in 12 der 21 Fälle (57,1%) im Rahmen einer Erkrankung durch ein reifes Teratom auftraten. Unreife Teratome waren in 3 von 21 Fällen (14,3%), Dottersacktumoren in 2 von 21 Fällen (9,5%) und gemischte Keimzelltumoren in 4 der 21 Fälle (19,0%) betroffen (siehe Abbildung 9).

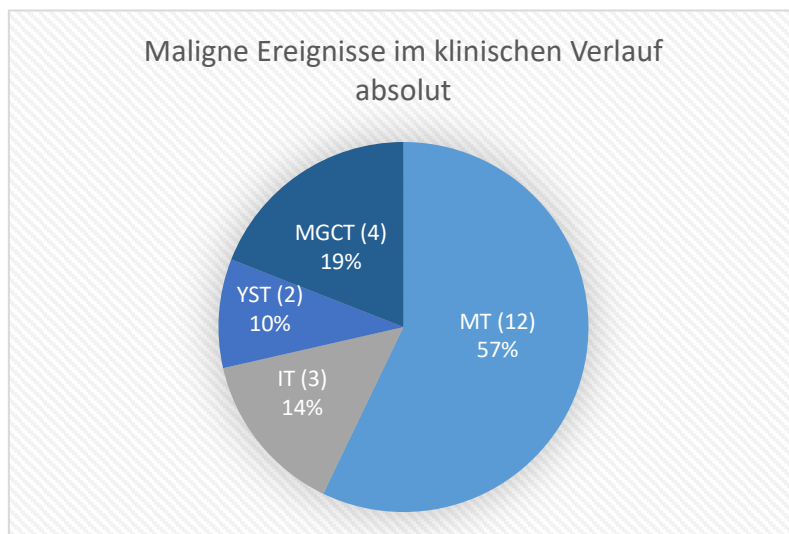


Abbildung 9: Maligne Ereignisse im klinischen Verlauf nach histologischem Typ (absolut)

Als malignes Ereignis gewertet wurden (in Klammern die Anzahl): Rezidiv (17) und metachrone Erkrankung (4). MT: Reifes Teratom, IT: Unreifes Teratom, YST: Dottersacktumor, MGCT: Gemischter Keimzelltumor.

Betrachtet man die unterschiedlichen histologischen Entitäten, zu denen klinische Verlaufsdaten vorlagen hinsichtlich des Auftretens maligner Ereignisse, ergeben sich folgende relative Zahlen: 12/72 (16,7%) der reifen Teratome, 3/3 (100%) der unreifen Teratome, 2/15 (13,3%) der Dottersacktumoren und 4/22 (18,2%) der gemischten Keimzelltumoren zeigten Rezidive oder einen metachronen Befall im Verlauf ($p=0.0037$, Chi-Quadrat-Test, siehe Abbildung 10). Die als maligne geltenden Dottersacktumoren und gemischten Keimzelltumoren (6/31) zeigten im Vergleich zu reifen und unreifen Teratomen (15/60) kein erhöhtes Auftreten maligner Ereignisse ($p=0.7981$, Fisher's Exact Test).

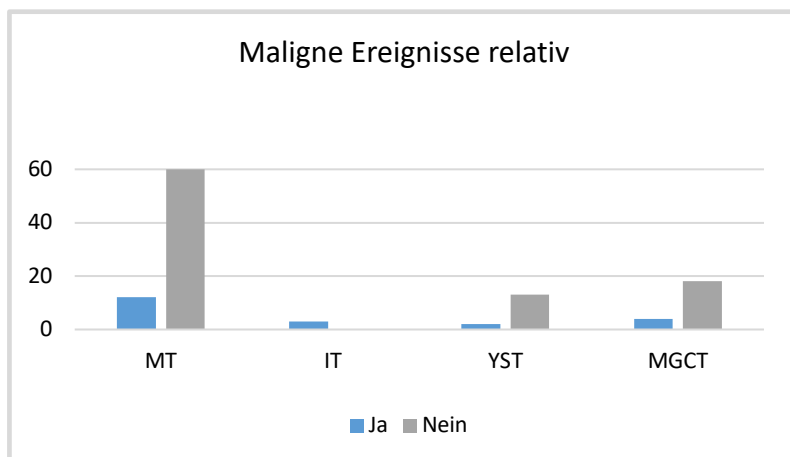


Abbildung 10: Maligne Ereignisse im klinischen Verlauf nach histologischem Typ (relativ)

Als malignes Ereignis gewertet wurden: Rezidiv und metachrone Erkrankung. MT: Reifes Teratom, IT: Unreifes Teratom, YST: Dottersacktumor, MGCT: Gemischter Keimzelltumor.

Patienten mit und ohne Zugewinne von 1q unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich des Auftretens maligner Ereignisse (0/11, 0,0% und 16/81, 19,8%, $p=0.2014$, Fisher's Exact Test, siehe Tabelle 12). Ebenso traten bei Patienten mit 12p Zugewinnen (3/20, 15,0%) ähnlich häufig maligne Ereignisse auf wie bei Patienten ohne Zugewinn (16/80, 20,0%, $p=0.7571$, Fisher's Exact Test siehe Tabelle 12).

	Malignes Ereignis ¹	p-Wert
1q gain	0/11 (0,0%)	0.2014 ²
Kein 1q gain	16/81 (19,8%)	
12p gain	3/20 (15,0%)	0.7571 ²
Kein 12p gain	16/80 (20,0%)	

Tabelle 12: Gegenüberstellung der Tumoren mit und ohne Zugewinnen sowie dem Auftreten maligner Ereignisse im Verlauf

¹Als malignes Ereignis gewertet wurden (in Klammern die Anzahl): Rezidiv (17) und metachrone Erkrankung (4). ²Fisher's Exact Test.

Bei keinem der Keimzelltumoren mit 1q Zugewinn trat im klinischen Verlauf ein malignes Ereignis auf. Drei Patienten mit 12p-positiven Tumoren hatten im Verlauf ein Rezidiv oder einen metachronen Befall. Alle dieser drei Keimzelltumoren stammten aus der Gruppe der 11-17-jährigen Patienten und waren innerhalb der Gonaden lokalisiert (siehe Tabelle 13, farbig unterlegt).

			0-6 Jahre		11-17 Jahre		≥ 18 Jahre	
Anzahl gesamt		21	7		9		5	
Geschlecht	Männlich ♂	4	2		2		-	
	Weiblich ♀	17	5		7		5	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
Diagnose	MT	12	2	2	2 ²	3 ³	-	3
	IT	3	-	1	-	1	-	1
	YST	2	-	2	-	-	-	-
	MGCT	4	-	-	-	3	-	1
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
Lokalisation	Hoden	2	-	-	2 ²	-	-	-
	Ovar	9	-	-	-	6 ³	-	3
	Sacrococcygeal	5	2	3	-	-	-	-
	Mediastinum	-	-	-	-	-	-	-
	Andere ¹	5	-	2	-	1	-	2

Tabelle 13: Übersicht der Tumoren mit malignem klinischen Verlauf nach Geschlecht und Altersgruppen

MT: Reifes Teratom, IT: Unreifes Teratom, YST: Dottersacktumor, MGCT: Gemischter Keimzelltumor.

¹Andere Lokalisationen: Mundhöhle, Hals, Schilddrüse, Thoraxhöhle, Lunge/Pleura, Abdomen, Leber/Gallenwege, Kolon, Niere/Ureter, Retroperitoneum, Vagina, Rumpf/Becken, Wirbelsäule/Brustbein, Rippen/Thoraxwand, Gesäß/Anaalbereich, Bein, multilokulär oder ohne Angabe.

²Beide Tumoren mit 12p Zugewinn. ³Davon je ein Tumor mit 12p Zugewinn.

4 Diskussion

4.1 Kritische Betrachtung der angewandten Methoden

4.1.1 Tissue-Microarrays

Der Tissue-Microarray ist ein seit vielen Jahren etabliertes Verfahren um in einem Arbeitsschritt mehrere Gewebeproben untersuchen und miteinander vergleichen zu können. Die Vorteile der TMA-Technik bestehen zum einen in der Möglichkeit, nach der Durchführung nur einer Färbung oder DNA-Hybridisierung eine große Anzahl von unterschiedlichen Tumorproben parallel evaluieren zu können. Dies bedeutet neben einem geringeren Zeitaufwand auch die Reduktion von Materialkosten, beispielsweise für DNA-Sonden. Zum anderen unterliegen alle Gewebeproben eines TMAs denselben Untersuchungsbedingungen, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit des Gewebes ermöglicht wird.

Neben den Vorteilen dieser Technik sei aber auch der Aufwand zur Vorbereitung solcher Tissue-Microarrays nicht zu unterschätzen. Alle Tumorproben müssen vor der Herstellung erneut histologisch untersucht und die für die Fragestellung relevanten Areale markiert werden. Wichtig ist hierbei, dass die Gewebestanzungen die unterschiedlichen Tumorkomponenten der Originalläsion angemessen repräsentieren. Um dies zu gewährleisten, wurden in dieser Arbeit bei homogenen Tumoren je zwei Gewebezyylinder entnommen. Bei Tumoren mit unterschiedlichen Tumorkomponenten wurde jede dieser Komponenten jeweils durch einen Zylinder auf dem TMA dargestellt. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass gestanzte Gewebeproben auch aus großen, heterogenen Tumoren eine signifikante Repräsentativität für das Ursprungsgewebe aufweisen [52, 54, 55].

4.1.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

In der Forschung sowie auch in der pathologischen Zusatzdiagnostik stellt die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eine etablierte Methode dar. Sie ist ein anerkanntes und weltweit genutztes Verfahren um relativ einfach genetische Aberrationen zu detektieren. Ein Nachteil der Methode ist die zeitlich begrenzte Auswertbarkeit der Fluoreszenzsignale nach

durchgeführter Hybridisierung. Auch ist zur Auswertung ein spezielles Fluoreszenzmikroskop nötig.

Ein weiterer Kritikpunkt könnte sein, dass die Interpretation und Auszählung der Fluoreszenzsignale vom auswertenden Untersucher abhängig ist. Um dieser Problematik entgegenzutreten, wurden in dieser Arbeit alle Ergebnisse der FISH durch einen zweiten erfahrenen Untersucher kontrolliert.

Auch besteht das Problem, dass die DNA-Sonden im Prozess der Hybridisierung nicht zwischen Tumorgewebe und dem umgebenden nicht-neoplastischen Gewebe unterscheiden. Es wurden deshalb, um falsch-negative Ergebnisse durch nicht erfasstes Tumorgewebe zu vermeiden, alle Stenzen auf dem TMA vor der Hybridisierung erneut auf H.E. gefärbten Schnitten beurteilt. So konnte sichergestellt werden, dass die FISH-Auswertung dem morphologisch zu untersuchenden Tumorgewebe entspricht.

Insgesamt konnte in zahlreichen Studien, insbesondere auch in Untersuchungen zu 12p Zugewinnen in Keimzelltumoren gezeigt werden, dass die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung eine sensitive Methode zur Detektion von genetischen Aberrationen darstellt [53, 56-59].

4.2 Fragestellung im Kontext der bisherigen Literatur

Bisher sind in der Literatur nur vergleichsweise wenige Daten zu 12p und 1q Zugewinnen bei pädiatrischen Keimzelltumoren vorhanden. Eine Literaturrecherche in Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) zu Publikationen der letzten 27 Jahre (Stand Januar 2017) erbrachte 25 Studien, in denen speziell *kindliche* Keimzelltumoren hinsichtlich Zugewinnen von 1q und 12p mit unterschiedlichen Methoden untersucht wurden. Eine Übersicht hierüber gibt Tabelle 14. Die Studie mit der bisher größten Fallzahl von n=81 stammt aus dem Jahr 1999 von Bussey et al. [18]. Die bisherigen Untersuchungen waren bezüglich der Kohorteneigenschaften wie Geschlecht, Alter und Tumorphistologie, auch aufgrund der geringen Fallzahlen, relativ unselektiv. Erst durch die konsequente Erfassung dieser äußerst seltenen Tumoren des Kindesalters in Tumorregistern wurden systematische Untersuchungen ermöglicht.

Konsens aller Studien ist, dass sich kindliche Keimzelltumoren, sei es durch ihr genetisches Profil, ihren Entwicklungsweg oder durch das klinische Verhalten, von den Keimzelltumoren adulter Patienten unterscheiden. Ebenso zeigt sich, dass ein Zugewinn von 12p sowohl vom

Alter und Geschlecht der Patienten als auch von der Tumorhistologie abhängig ist [18, 20, 60-62]. Allgemein geht man davon aus, dass Zugewinne von 12p eher bei älteren Patienten auftreten, 1q Zugewinne hingegen eher in Keimzelltumoren jüngerer Patienten oder in Tumoren gonadaler Lokalisationen zu finden sind [18, 63]. Neuere Studien legen jedoch nahe, dass 12p Zugewinne durchaus auch in präpuberalen Keimzelltumoren vorkommen [21, 34]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Unterteilung in Typ I- und Typ II-Tumoren nicht zwangsläufig vom Alter der Patienten abhängig ist und Typ I-Tumoren auch nach der Pubertät im Erwachsenenalter auftreten können [42]. Eine Studie aus dem Jahr 2017 von Emersen et al. [64] weist außerdem darauf hin, dass Zugewinne von 12p mit dem Vorkommen einer Dottersacktumorkomponente innerhalb eines gemischten Keimzelltumors assoziiert sein könnten.

<i>Autor¹</i>	<i>Jahr</i>	<i>n²</i>	<i>Kohorte³</i>	<i>Histologie</i>	<i>Zugewinne</i>
<i>Speleman[65]</i>	1990	1	w 5 J.	YST	i(12p) (1/1) ⁴⁽¹⁰⁾
<i>Perlman[66]</i>	1994	9	w/m ≤ 3 J.	YST	Kein Zugewinn ^{4,5(10)}
<i>Stock[67]</i>	1994	13	w/m 0-14 J.	GCT	i(12p) (2/13) ⁵⁽¹⁰⁾
<i>Jenderny[60]</i>	1995	7	w/m 1-17 J.	YST	Chrom. 12 (6/7) ⁵⁽¹⁰⁾
<i>Riopel[19]</i>	1998	27	w 4-28 J.	Ovarielle GCT	12p (14/19 (10/14 <15J.)), 1q (6/19) ⁶⁽⁷⁾
<i>Bussey[18]</i>	1999	81	w/m 0-18 J.	GCT	12p (7/81), 1q (8/81) ^{4,5(10)}
<i>Perlma [20]</i>	2000	16	w/m ≤ 4 J.	YST	12p (1/16), 1q (6/16) ⁵⁽⁷⁾
<i>Kraggerud[68]</i>	2000	25	w 11-15 J. (n=5), 16-70 J. (n=20)	Ovarielle GCT	12p (11/25 (2/11 <15J.)), 1q (3/25) ⁶⁽⁷⁾
<i>Mostert[62]</i>	2000	6	m 0-2 J.	Testikuläre nicht- seminomatöse GCT	12p (3/6) nur YST ^{6(9),5(9)}
<i>Bussey[61]</i>	2001	53	w/m 0-11 J.	GCT	12p (5/18) ^{4,5(9)}
<i>Schneider[17]</i>	2001	51	w/m <10 J.	GCT	12p (3/53), 1q (1/53) ^{6(7,9)}
<i>Schneider[69]</i>	2002	35	w/m < 18 J.	Mediastinale GCT	12p (6/10) 1q (6/10) ^{5(10),6(7)}
<i>Okada[70]</i>	2002	25	w/m 3-34 J.	Intrakranielle GCT	12p (5/25) ⁵⁽¹⁰⁾
<i>VanEchten[71]</i>	2002	3	m 4, 16, 26 J.	Testikuläre YST	12p (0/3) ^{4,5(10)}
<i>Veltman[63]</i>	2005	31	w/m 0-16 J.	GCT	12p (5/31 (4/31 > 5J.)), 1q (6/31) ⁶⁽¹⁰⁾

Fortsetzung auf Seite 39.

<i>Autor¹</i>	<i>Jahr</i>	<i>n²</i>	<i>Kohorte³</i>	<i>Histologie</i>	<i>Zugewinne</i>
<i>Poulos[72]</i>	2006	14	w 4-33 J.	Ovarielle GCT	12p (3/14 (2/14 <18J.)), i(12p) (5/14 (3/14 <18J.)) ⁵⁽⁸⁾
<i>Palmer[21]</i>	2007	22	w/m 0-14 J.	YST	12p (7/22) (4/14 <5 J.), 1q (10/22 (6/14 <5J.)) ⁶⁽⁷⁾
<i>Palmer[73]</i>	2008	18	w/m 0-14 J.	YST	12p (7/18)*
<i>Zhang[74]</i>	2013	25	m 12-59 J.	Testikuläre MT	12p (0/25) ⁵⁽⁸⁾
<i>Ichikawa[5]</i>	2013	28	w/m 0-14 J.	GCT	12p (6/28), 1q (8/28)*
<i>Gurda[5]</i>	2014	16	w/m 0-51 J.	Sakrokokzygeale Teratome	12p (0/13) ⁵⁽⁸⁾
<i>Oosterhuis[42]</i>	2015	4	m 16-23 J.	Testikuläre nicht- seminomatöse GCT	12p (0/4) ⁵⁽¹⁰⁾
<i>Cornejo[34]</i>	2016	11	m 0-7 J.	Testikuläre Teratome	12p (0/11), i(12p) (2/11) ⁵⁽⁸⁾
<i>Emerson[64]</i>	2017	48	m 0-8 J.	Sakrokokzygeale Teratome	i(12p) (4/48) nur YST ⁵⁽⁸⁾

Tabelle 14: Übersicht über bisherige Studien zu 1q und 12p Zugewinnen bei kindlichen Keimzelltumoren
GCT: Keimzelltumoren, verschiedene oder ohne nähere Angabe, YST: Dottersacktumoren, MT: Reife Teratome. ¹Es ist aus Gründen der Übersichtlichkeit jeweils nur der Erstautor genannt, ²n: Fallzahl, ³Kohorte: Geschlecht (w: weiblich, m: männlich) und Alter in Jahren (J.).

Methodik: ⁴G-Banded Karyotyping, ⁵(Fluoreszenz-)In-situ-Hybridisierung, ⁶(Array) Comparative Genomic Hybridization, *Andere Methodik (PCR o.a.). Cut-off-Werte (bezogen auf die jeweilige Methodik, hinter der diese in Klammern gesetzt wurden): ⁽⁷⁾Ratio 1,2, ⁽⁸⁾Ratio 1,5, ⁽⁹⁾Cut-off-Wert außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls gesunden Gewebes, ⁽¹⁰⁾andere Evaluationsweise/ keine Angabe / nichtzutreffend.

Im Hinblick auf die bisherige Studienlage sollten als Ziel dieser Arbeit chromosomale Zugewinne von 12p, die in früheren Studien eine Assoziation mit dem Alter und der Tumorphistologie zeigten und regelhaft im Erwachsenenalter auftreten [32] an einer großen Gruppe pädiatrischer und adulter Keimzelltumoren untersucht werden. Des Weiteren wurden Zugewinne von 1q, die bekannte genetische Aberrationen von Typ I-Keimzelltumoren darstellen und in anderen Tumoren des Kindesalters mit einem ungünstigen Verlauf in Verbindung gebracht werden [17, 18, 39, 47-49] an derselben Kohorte überprüft werden. Innerhalb dieser Kohorte wurden dafür Tumoren von Patienten unterschiedlichen Alters untersucht. Um zu bestimmen, ob eine Altersgrenze zwischen kindlichen Typ I- und

postpuberalen Typ II-Tumoren besteht, oder die Einteilung weniger altersabhängig ist als bisher angenommen [22, 34, 42], wurden drei Altersgruppen verwendet. Außerdem sollte eine Assoziation zwischen 1q und 12p Zugewinnen sowie Geschlecht der Patienten und Histologie sowie Lokalisation der Keimzelltumoren untersucht werden, da auch dieser Zusammenhang in früheren Studien mit kleineren Fallzahlen bereits angedeutet wurde. Zur Assoziation dieser genetischen Zugewinne in kindlichen Keimzelltumoren und dem klinischen Verlauf der Tumorerkrankung liegen bisher nur wenige Daten vor. Deshalb sollten die Ergebnisse dieser Arbeit zusätzlich mit den klinischen Verlaufsdaten der Patienten korreliert werden, um so eine Aussage zum prognostischen Potential der untersuchten chromosomalen Zugewinne treffen zu können.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Kindliche Keimzelltumoren sind aus histologischer, genetischer und klinischer Sicht sehr heterogene Tumoren. Die therapeutische Herangehensweise umfasst ein weites Spektrum, darunter chirurgische Resektion und Polychemotherapie [1, 2]. Die risikoadaptierte Therapie adoleszenter Patienten stellt eine besondere Herausforderung dar. Und auch nach erfolgreicher first-line Therapie kann es in allen Altersgruppen zu Rezidiven kommen [41, 75]. Prognostische Marker könnten bei der risikoadaptierten Therapieentscheidung eine Hilfestellung bieten. In dieser Arbeit sollten zwei genetischen Marker, Zugewinne von 1q und Zugewinne von 12p, hinsichtlich ihres prognostischen Potentials für kindliche Keimzelltumoren evaluiert werden.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumoren zeigte sich keine Assoziation zwischen 1q Zugewinnen und einem malignen klinischen Verlauf. Allerdings fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von 1q Zugewinnen und einer nicht-teratomatösen Tumorhistologie. Es waren fast ausschließlich Dottersacktumoren und gemischte Keimzelltumoren, in denen sich 1q Zugewinne nachweisen ließen. Einzig ein reifes Teratom des Ovars einer 34jährigen Patientin wies einen deutlichen 1q Zugewinn auf.

Es können die bisherigen Studien dahingehend bestätigt werden, dass auch in dieser Kohorte 1q Zugewinne vor allem bei jüngeren Kindern (unter 6 Jahren) zu finden waren. Insgesamt war der Anteil der untersuchten Keimzelltumoren mit 1q Zugewinn (8%) allerdings eher

niedrig, verglichen mit dem Vorkommen dieser genetischen Veränderungen in anderen kindlichen Tumoren. Es ist zu bedenken, dass die fehlende Assoziation eines 1q Zugewinns mit einer ungünstigen Prognose im Rahmen dieser Arbeit auch der limitierten Kohortengröße geschuldet sein könnte, obwohl diese Studie die bisher größte Fallzahl untersuchter kindlicher Keimzelltumoren aufweist.

Zugewinne von 12p zeigen sich regelhaft in Keimzelltumoren adulter Patienten und scheinen dort eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression zu spielen [7, 23, 45, 76]. Bisher wurde dies allerdings überwiegend an seminomatösen Typ II-Keimzelltumoren untersucht. Da gerade die Unterscheidung zwischen Typ I- und Typ II-Tumoren häufig Schwierigkeiten bereitet, wurde in dieser Arbeit eine Kohorte vornehmlich präpuberaler Keimzelltumoren untersucht, um 12p Zugewinne an Typ I-Keimzelltumoren zu analysieren.

Innerhalb dieser präpuberalen Altersgruppe wurden 12p Zugewinne in 11/95 (12%) der Tumoren gefunden. Dies unterstützt die Annahme neuerer Studien, dass 12p Zugewinne auch in präpuberal entstandenen Keimzelltumoren auftreten und nicht auf die Gruppe adulter Patienten beschränkt sind [34]. Das Vorhandensein von 12p Zugewinnen in pädiatrischen Keimzelltumoren spricht dafür, dass es sich bei diesen Tumoren tatsächlich um early-onset Typ II-Tumoren handelt, was ein entsprechendes Therapieregime erforderlich machen könnte. Umgekehrt wird auch die Hypothese gestärkt, dass Typ I-Tumoren ohne 12p Zugewinne im Erwachsenenalter als late-onset Tumoren auftreten können [42].

Darüber hinaus zeigte sich bei den Untersuchungen dieser Arbeit, dass 12p Zugewinne nicht nur in den gonadalen Keimzelltumoren zu finden sind, sondern auch in Tumoren extragonadaler Lokalisation auftreten. Interessanterweise ist dies auch für präpuberale Tumoren der Fall. Auch in dieser Altersgruppe fanden sich 5 extragonadale Tumoren mit 12p Zugewinn, 3 davon sakrokokzygeal und 2 von anderer, seltenerer Lokalisation entstammend. Ähnlich wie für die Zugewinne von 1q, fand sich eine Assoziation zwischen 12p Zugewinnen und einer nicht-teratomatösen Tumorhistologie. Doch obwohl gehäuft 12p Zugewinne in Dottersacktumoren auftraten, die als maligne Keimzelltumoren gelten, konnten 12p Zugewinne und maligne Ereignisse im klinischen Verlauf nicht in Zusammenhang gebracht werden. Außerdem traten Rezidive und metachrone Erkrankungen insgesamt nicht häufiger in Dottersacktumoren oder gemischten Keimzelltumoren auf als in Tumoren anderen Phänotyps. Auch reife Teratome zeigten eine im Vergleich ähnlich hohe Wahrscheinlichkeit

im Verlauf ein Rezidiv zu entwickeln. Hierbei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass reife Teratome häufig große Tumoren sind, deren chirurgische Resektion sich mitunter schwierig gestalten kann. Vor allem im Bereich des Steißbeins ist eine R0-Resektion häufig nicht möglich, sodass diese sakrokokzygealen reifen Teratome teils einen unvollständigen Resektionsstatus (R1) aufweisen, auch wenn sie histologisch als R0 klassifiziert wurden, da beispielsweise das im Tumor vorkommende Fettgewebe nicht von ortsständigem Fettgewebe unterschieden werden kann. [13, 39, 44]. Tritt dann im Verlauf an derselben Lokalisation erneut Tumorgewebe auf, lässt sich ein Rezidiv nicht von einem Tumorprogress des verbliebenen Tumorrests unterscheiden. Falsch positive Ergebnisse bei der klinischen Bestimmung der Rezidive sind also trotz sorgfältiger Untersuchung nicht ausgeschlossen.

Von drei Patienten aus der präpuberalen Gruppe und aus der Gruppe der Adoleszenten lag neben dem Material der Primärtumoren auch Gewebe der später aufgetretenen Tumorrezidive vor. Bei allen drei Tumoren handelte es sich sowohl im Primärtumor wie auch im Rezidivgewebe um reife Teratome. Interessanterweise zeigte sich der Status beider Gewebeproben hinsichtlich der 1q wie auch der 12p Zugewinne jeweils unverändert. Diese gepaarte Analyse spricht trotz kleiner Fallzahl für eine Konsistenz der Tumorgenese innerhalb reifer Teratome, wenn diese im Rezidiv ihren Phänotyp beibehalten.

Da pädiatrische Keimzelltumoren in der Regel Tumoren mit vergleichsweise großer Tumormasse sind, besteht das Risiko, dass trotz umfangreichen Samplings eine möglicherweise vorhandene maligne Keimzelltumorkomponente im histologisch aufgearbeiteten Material nicht miterfasst worden ist.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Gewebestanden der 12p-positiven gemischten Keimzelltumoren auch dann einen 12p Zugewinn, wenn kein maligner Dottersacktumoraanteil vorhanden war. Das heißt, die Zugewinne von 12p waren, wenn vorhanden, in allen untersuchten Tumorkomponenten, unabhängig von deren histologischem Phänotyp zu detektieren. Dies konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden und führt zu der Hypothese, dass ein 12p Zugewinn in gemischten Keimzelltumoren auf eine Dottersacktumorkomponente innerhalb des Tumors hindeuten kann, die sich möglicherweise im Verlauf der Erkrankung entwickelt oder aber bereits vorhanden ist und noch nicht erfasst

wurde [64]. Die Gesamtanzahl der gemischten Keimzelltumoren mit 12p Zugewinn innerhalb dieser Arbeit ist jedoch zu klein, um dahingehend eine sichere Aussage treffen zu können.

Abschließend eignen sich Zugewinne von 1q und 12p aufgrund fehlender Assoziation mit malignen Ereignissen im Verlauf eher nicht als Marker, um das klinische Verhalten kindlicher Keimzelltumoren vorauszusagen.

Allerdings könnte ein Zugewinn von 12p möglicherweise als Biomarker für eine unreife Teratom- oder Dottersacktumorkomponente innerhalb eines gemischten Keimzelltumors genutzt werden. Dies könnte eine Hilfestellung in diagnostischen Grenzfällen sein und auch zur Unterscheidung zwischen Typ I- und Typ II-Keimzelltumoren herangezogen werden.

5 Zusammenfassung

Kindliche Keimzelltumoren sind eine heterogene Gruppe von Tumoren, die sich hinsichtlich ihrer Biologie stark voneinander unterscheiden und deren klinisches Verhalten häufig schwer vorauszusagen ist. Bei adulten Keimzelltumoren ist der Zugewinn des kurzen Arms von Chromosom 12 (12p) ein ungünstiger prognostischer Marker. Ziel dieser Arbeit war es, dies an einer großen Gruppe pädiatrischer Keimzelltumoren zu überprüfen. Zugewinne auf dem langen Arm von Chromosom 1 (1q) sind bei verschiedenen Tumoren im Kindesalter mit einem ungünstigen Verlauf assoziiert und wurden ebenfalls in dieser Kohorte kindlicher Keimzelltumoren untersucht. Dazu wurden 180 nicht-seminomatöse Keimzelltumoren von insgesamt 177 Patienten aus dem Kindertumorregister der GPOH (Gesellschaft für Onkologie und Hämatologie) analysiert. Unter diesen waren 115 reife Teratome, 10 unreife Teratome, 24 Dottersacktumoren und 28 gemischte Keimzelltumoren (bestehend aus einem Dottersacktumor und einer teratomatösen Tumorkomponente), aus je drei verschiedenen Altersgruppen.

Nach der Erstellung von Tissue-Microarrays wurden an diesen Tumoren Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen durchgeführt um Zugewinne von 1q und 12p zu detektieren. Die Ergebnisse wurden mit den klinischen Verlaufsdaten der Patienten aus der deutschen Keimzelltumorstudie im Kindes- und Adoleszentenalter (MAKEI) sowie den Eigenschaften der Tumoren korreliert.

In 11 von 143 (7,7%) Keimzelltumoren, deren Material auswertbare Ergebnisse hervorbrachte, wurden Zugewinne von 1q detektiert. 29 von 157 (18,5%) auswertbaren Keimzelltumoren wiesen 12p Zugewinne auf. Patienten unter 6 Jahren zeigten häufiger einen 1q Zugewinn als ältere Patienten. 12p Zugewinne fanden sich am häufigsten bei Patienten im Alter von 11-17 Jahren. Tumoren in gonadalen Lokalisationen wiesen sowohl häufiger einen 1q als auch einen 12p Zugewinn auf, verglichen mit extragonadal lokalisierten Keimzelltumoren. Die Zugewinne von 1q und 12p waren insgesamt seltener in reifen Teratomen nachweisbar als in den anderen histologischen Keimzelltumorphänotypen. Im Verlauf der Erkrankung trat bei 20 von 155 (12,9%) Patienten ein malignes Ereignis (Rezidiv oder metachrone Erkrankung) auf. Weder Patienten mit 1q Zugewinn noch Patienten mit 12p Zugewinn zeigten ein häufigeres Auftreten solcher Ereignisse, verglichen mit Patienten ohne Zugewinne. Jedoch unterschied sich die Wahrscheinlichkeit für maligne Ereignisse je nach histologischem Subtyp des Keimzelltumors.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich Zugewinne von Chromosom 1q und 12p eher nicht als prognostische Marker eignen, um die Aggressivität von Keimzelltumoren im Kindesalter zu bewerten. Möglicherweise können sie jedoch als Biomarker für das Vorhandensein einer malignen Tumorkomponente in gemischten Keimzelltumoren oder als Hilfestellung zur Detektion eines unreifen Teratoms, Dottersacktumors oder gemischten Keimzelltumors in diagnostischen Grenzfällen genutzt werden. Um dies zu klären, müssen weitere Untersuchungen erfolgen.

6 Literaturverzeichnis

1. Rajpert-De Meyts, E., et al., *Testicular germ cell tumours*. Lancet, 2016. **387**(10029): p. 1762-74.
2. Rescorla, F.J., *Pediatric germ cell tumors*. Semin Pediatr Surg, 2012. **21**(1): p. 51-60.
3. Oosterhuis, J.W. and L.H. Looijenga, *Testicular germ-cell tumours in a broader perspective*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(3): p. 210-22.
4. Bussey, K.J., et al., *SNRPN methylation patterns in germ cell tumors as a reflection of primordial germ cell development*. Genes Chromosomes Cancer, 2001. **32**(4): p. 342-52.
5. Ichikawa, M., et al., *Meiosis error and subsequent genetic and epigenetic alterations invoke the malignant transformation of germ cell tumor*. Genes Chromosomes Cancer, 2013. **52**(3): p. 274-86.
6. Chaganti, R.S. and J. Houldsworth, *Genetics and biology of adult human male germ cell tumors*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1475-82.
7. Sheikine, Y., et al., *Molecular genetics of testicular germ cell tumors*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(2): p. 153-67.
8. Hoffner, L., et al., *Cytogenetics and origins of pediatric germ cell tumors*. Cancer Genet Cytogenet, 1994. **74**(1): p. 54-8.
9. Gobel, U., et al., *Teratomas in infancy and childhood*. Med Pediatr Oncol, 1998. **31**(1): p. 8-15.
10. Looijenga, L.H. and J.W. Oosterhuis, *Pathogenesis of testicular germ cell tumours*. Rev Reprod, 1999. **4**(2): p. 90-100.
11. Harms, D., et al., *Pathology and molecular biology of teratomas in childhood and adolescence*. Klin Padiatr, 2006. **218**(6): p. 296-302.
12. Schneider, D.T., et al., *Epidemiologic analysis of 1,442 children and adolescents registered in the German germ cell tumor protocols*. Pediatr Blood Cancer, 2004. **42**(2): p. 169-75.
13. Gobel, U., et al., *Germ-cell tumors in childhood and adolescence. GPOH MAKEI and the MAHO study groups*. Ann Oncol, 2000. **11**(3): p. 263-71.
14. Mosbech, C.H., et al., *Recent advances in understanding the etiology and pathogenesis of pediatric germ cell tumors*. J Pediatr Hematol Oncol, 2014. **36**(4): p. 263-70.
15. Pinkerton, C.R., *Malignant germ cell tumours in childhood*. Eur J Cancer, 1997. **33**(6): p. 895-901; discussion 901-2.
16. Biskup, W., et al., *Teratoma with malignant transformation: experiences of the cooperative GPOH protocols MAKEI 83/86/89/96*. Klin Padiatr, 2006. **218**(6): p. 303-8.
17. Schneider, D.T., et al., *Genetic analysis of childhood germ cell tumors with comparative genomic hybridization*. Klin Padiatr, 2001. **213**(4): p. 204-11.
18. Bussey, K.J., et al., *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, 1999. **25**(2): p. 134-46.
19. Riopel, M.A., et al., *Genetic analysis of ovarian germ cell tumors by comparative genomic hybridization*. Cancer Res, 1998. **58**(14): p. 3105-10.
20. Perlman, E.J., et al., *Genetic analysis of childhood endodermal sinus tumors by comparative genomic hybridization*. J Pediatr Hematol Oncol, 2000. **22**(2): p. 100-5.
21. Palmer, R.D., et al., *Malignant germ cell tumours of childhood: new associations of genomic imbalance*. Br J Cancer, 2007. **96**(4): p. 667-76.

22. Collinson, K., et al., *Age-related biological features of germ cell tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 2014. **53**(3): p. 215-27.
23. Rodriguez, S., et al., *Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1*. Oncogene, 2003. **22**(12): p. 1880-91.
24. Suijkerbuijk, R.F., et al., *Verification of isochromosome 12p and identification of other chromosome 12 aberrations in gonadal and extragonadal human germ cell tumors by bicolor double fluorescence in situ hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 1992. **63**(1): p. 8-16.
25. Suijkerbuijk, R.F., 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, 1993. **70**(2): p. 85-93.
26. Korn, W.M., et al., *Detection of chromosomal DNA gains and losses in testicular germ cell tumors by comparative genomic hybridization*. Genes Chromosomes Cancer, 1996. **17**(2): p. 78-87.
27. Mostert, M.C., et al., *Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults*. Oncogene, 1998. **16**(20): p. 2617-27.
28. Cheng, L., B. Lyu, and L.M. Roth, *Perspectives on testicular germ cell neoplasms*. Hum Pathol, 2017. **59**: p. 10-25.
29. Malek, N.P., et al., *Quantification of additional short arms of chromosome 12 in germ cell tumours using the polymerase chain reaction*. Eur J Cancer, 1997. **33**(9): p. 1488-94.
30. Rodriguez, E., et al., *Molecular cytogenetic analysis of i(12p)-negative human male germ cell tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 1993. **8**(4): p. 230-6.
31. Rosenberg, C., et al., *Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas*. Oncogene, 2000. **19**(51): p. 5858-62.
32. Henegariu, O., et al., *Characterization of gains, losses, and regional amplification in testicular germ cell tumor cell lines by comparative genomic hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 2004. **148**(1): p. 14-20.
33. McIntyre, A., et al., *Genes, chromosomes and the development of testicular germ cell tumors of adolescents and adults*. Genes Chromosomes Cancer, 2008. **47**(7): p. 547-57.
34. Cornejo, K.M., et al., *Chromosome 12p abnormalities and IMP3 expression in prepubertal pure testicular teratomas*. Hum Pathol, 2016. **49**: p. 54-60.
35. Kraggerud, S.M., et al., *Genome profiles of familial/bilateral and sporadic testicular germ cell tumors*. Genes Chromosomes Cancer, 2002. **34**(2): p. 168-74.
36. Mohamed, G.H., et al., *Genomic characterization of testis cancer: association of alterations with outcome of clinical stage 1 mixed germ cell nonseminomatous germ cell tumor of the testis*. Urology, 2012. **80**(2): p. 485.e1-5.
37. Honecker, F., et al., *New insights into the pathology and molecular biology of human germ cell tumors*. World J Urol, 2004. **22**(1): p. 15-24.
38. Rodriguez, E., et al., *Chromosome 12 abnormalities in malignant ovarian germ cell tumors*. Cancer Genet Cytogenet, 1995. **82**(1): p. 62-6.
39. Frazier, A.L., C. Weldon, and J. Amatruda, *Fetal and neonatal germ cell tumors*. Semin Fetal Neonatal Med, 2012. **17**(4): p. 222-30.

40. Marina, N., et al., *Prognostic factors in children with extragonadal malignant germ cell tumors: a pediatric intergroup study*. J Clin Oncol, 2006. **24**(16): p. 2544-8.
41. Gobel, U., et al., *The malignant potential of teratomas in infancy and childhood: the MAKEI experiences in non-testicular teratoma and implications for a new protocol*. Klin Padiatr, 2006. **218**(6): p. 309-14.
42. Oosterhuis, J.W., et al., *Pediatric germ cell tumors presenting beyond childhood?* Andrology, 2015. **3**(1): p. 70-7.
43. McKenney, J.K., A. Heerema-McKenney, and R.V. Rouse, *Extragenital germ cell tumors: a review with emphasis on pathologic features, clinical prognostic variables, and differential diagnostic considerations*. Adv Anat Pathol, 2007. **14**(2): p. 69-92.
44. Billmire, D.F., *Malignant germ cell tumors in childhood*. Semin Pediatr Surg, 2006. **15**(1): p. 30-6.
45. Looijenga, L.H., et al., *Role of gain of 12p in germ cell tumour development*. Apmis, 2003. **111**(1): p. 161-71; discussion 172-3.
46. Ottesen, A.M., et al., *High-resolution comparative genomic hybridization detects extra chromosome arm 12p material in most cases of carcinoma in situ adjacent to overt germ cell tumors, but not before the invasive tumor development*. Genes Chromosomes Cancer, 2003. **38**(2): p. 117-25.
47. Rajeshwari, M., et al., *Evaluation of chromosome 1q gain in intracranial ependymomas*. J Neurooncol, 2016. **127**(2): p. 271-8.
48. Cone, E.B., et al., *Biomarkers for Wilms Tumor: A Systematic Review*. J Urol, 2016. **196**(5): p. 1530-1535.
49. Chagtai, T., et al., *Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study*. J Clin Oncol, 2016. **34**(26): p. 3195-203.
50. Araki, A., et al., *Chromosome 1q gain and tenascin-C expression are candidate markers to define different risk groups in pediatric posterior fossa ependymoma*. Acta Neuropathol Commun, 2016. **4**(1): p. 88.
51. Faria, C., et al., *Pediatric brain tumors: genetics and clinical outcome*. J Neurosurg Pediatr, 2010. **5**(3): p. 263-70.
52. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
53. Wehle, D., et al., *Fluorescence in situ hybridization of 12p in germ cell tumors using a bacterial artificial chromosome clone 12p probe on paraffin-embedded tissue: clinical test validation*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. **183**(2): p. 99-104.
54. Schraml, P., et al., *Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(8): p. 1966-75.
55. Torhorst, J., et al., *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2249-56.
56. Blough, R.I., et al., *Bicolor fluorescence in situ hybridization on nuclei from formalin-fixed, paraffin-embedded testicular germ cell tumors: comparison with standard metaphase analysis*. Cancer Genet Cytogenet, 1997. **94**(2): p. 79-84.
57. Kernek, K.M., et al., *Fluorescence in situ hybridization analysis of chromosome 12p in paraffin-embedded tissue is useful for establishing germ cell origin of metastatic tumors*. Mod Pathol, 2004. **17**(11): p. 1309-13.

58. Smolarek, T.A., et al., *Identification of multiple chromosome 12 abnormalities in human testicular germ cell tumors by two-color fluorescence in situ hybridization (FISH)*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995. **14**(4): p. 252-8.
59. Rodriguez, E., et al., *Analysis of chromosome 12 aneuploidy in interphase cells from human male germ cell tumors by fluorescence in situ hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1992. **5**(1): p. 21-9.
60. Jenderny, J., et al., *Detection of chromosome aberrations in paraffin sections of seven gonadal yolk sac tumors of childhood*. *Hum Genet*, 1995. **96**(6): p. 644-50.
61. Bussey, K.J., et al., *Chromosomes 1 and 12 abnormalities in pediatric germ cell tumors by interphase fluorescence in situ hybridization*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2001. **125**(2): p. 112-8.
62. Mostert, M., et al., *Comparative genomic and in situ hybridization of germ cell tumors of the infantile testis*. *Lab Invest*, 2000. **80**(7): p. 1055-64.
63. Veltman, I., et al., *Identification of recurrent chromosomal aberrations in germ cell tumors of neonates and infants using genomewide array-based comparative genomic hybridization*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005. **43**(4): p. 367-76.
64. Emerson, R.E., et al., *Evidence of a dual histogenetic pathway of sacrococcygeal teratomas*. *Histopathology*, 2017. **70**(2): p. 290-300.
65. Speleman, F., et al., *i(12p) in a malignant ovarian tumor*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1990. **45**(1): p. 49-53.
66. Perlman, E.J., et al., *Cytogenetic analysis of childhood endodermal sinus tumors: a Pediatric Oncology Group study*. *Pediatr Pathol*, 1994. **14**(4): p. 695-708.
67. Stock, C., et al., *Detection of numerical and structural chromosome abnormalities in pediatric germ cell tumors by means of interphase cytogenetics*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994. **11**(1): p. 40-50.
68. Kraggerud, S.M., et al., *DNA copy number changes in malignant ovarian germ cell tumors*. *Cancer Res*, 2000. **60**(11): p. 3025-30.
69. Schneider, D.T., et al., *Genetic analysis of mediastinal nonseminomatous germ cell tumors in children and adolescents*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002. **34**(1): p. 115-25.
70. Okada, Y., et al., *Hypomethylated X chromosome gain and rare isochromosome 12p in diverse intracranial germ cell tumors*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002. **61**(6): p. 531-8.
71. van Echten, J., et al., *Infantile and adult testicular germ cell tumors. a different pathogenesis?* *Cancer Genet Cytogenet*, 2002. **135**(1): p. 57-62.
72. Poulos, C., et al., *Analysis of ovarian teratomas for isochromosome 12p: evidence supporting a dual histogenetic pathway for teratomatous elements*. *Mod Pathol*, 2006. **19**(6): p. 766-71.
73. Palmer, R.D., et al., *Pediatric malignant germ cell tumors show characteristic transcriptome profiles*. *Cancer Res*, 2008. **68**(11): p. 4239-47.
74. Zhang, C., et al., *Evidence supporting the existence of benign teratomas of the postpubertal testis: a clinical, histopathologic, and molecular genetic analysis of 25 cases*. *Am J Surg Pathol*, 2013. **37**(6): p. 827-35.
75. Houldsworth, J., et al., *Biology and genetics of adult male germ cell tumors*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(35): p. 5512-8.
76. Reuter, V.E., *Origins and molecular biology of testicular germ cell tumors*. *Mod Pathol*, 2005. **18 Suppl 2**: p. S51-60.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 – Relative Inzidenz von Keimzelltumoren bei Kindern unter 15 Jahren in Abhängigkeit ihrer Lokalisation
- Abb. 2 – Histologische Bilder der untersuchten Keimzelltumoren
- Abb. 3 – Herstellung eines Tissue-Microarrays
- Abb. 4 – Beispiele eines Tissue-Microarrays
- Abb. 5 – Beispiele der FISH für 1q und 12p
- Abb. 6 – Beispiel für einen Zugewinn von 1q
- Abb. 7 – Beispiel für einen Zugewinn von 12p
- Abb. 8 – Teratomanteil eines gemischten Keimzelltumors mit Zugewinn von 12p
- Abb. 9 – Maligne Ereignisse im klinischen Verlauf nach histologischem Typ (absolut)
- Abb. 10 – Maligne Ereignisse im klinischen Verlauf nach histologischem Typ (relativ)

7.2 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1 – Unterteilung der Keimzelltumoren in fünf verschiedene Typen
- Tabelle 2 – Patientenkollektiv
- Tabelle 3 – Verwendete Materialien und Geräte
- Tabelle 4 – Fertige Reagenzien
- Tabelle 5 – Selbst hergestellte Reagenzien
- Tabelle 6 – Übersicht der 1q Zugewinne
- Tabelle 7 – 1q-positive Keimzelltumoren nach Geschlecht und Altersgruppen
- Tabelle 8 – Übersicht der 12p Zugewinne
- Tabelle 9 – 12p-positive Keimzelltumoren nach Geschlecht und Altersgruppen
- Tabelle 10 – Gepaarte Analyse von Primär- und Rezidivtumor anhand Zugewinnen von
1q und 12p
- Tabelle 11 – Übersicht der Tumoren mit malignem klinischen Verlauf
- Tabelle 12 – Gegenüberstellung der Tumoren mit und ohne Zugewinnen sowie dem
Auftreten maligner Ereignisse im Verlauf
- Tabelle 13 – Übersicht der Tumoren mit malignem klinischen Verlauf nach Geschlecht und
Altersgruppen
- Tabelle 14 – Übersicht über bisherige Studien zu 1q und 12p Zugewinnen bei kindlichen
Keimzelltumoren

Danksagung

Herrn Professor Wolfram Klapper möchte ich herzlich dafür danken, dass er nach dem plötzlichen Versterben von Professor Ivo Leuschner ohne zu zögern die Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen hat. Ich bedanke mich für seine umfangreiche Hilfe bei der Umsetzung der Publikation und der Dissertation und den jederzeit möglichen uneingeschränkten Austausch.

Ein weiterer großer Dank gilt Herrn Dr. Christian Vokuhl für seine Erklärungen und die Unterstützung während der gesamten Zeit sowie für die Begleitung zum DGP-Kongress.

Frau Dr. Gabriele Calaminus und Frau Carmen Teske aus der Kinderonkologie des Universitätsklinikums Bonn sowie allen Mitwirkenden der Studienzentrale der MAKEI-Studie danke ich für die Bereitstellung der klinischen Patientendaten.

Vielen Dank auch Herrn Professor Glen Kristiansen aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn, dass er Kontrollgewebe für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Alicja Pokrzywinski und Sylvia Iversen aus dem Institut für Kinderpathologie sowie Charlotte Botz von Drahten aus dem Institut für Hämatopathologie des Universitätsklinikums Kiel für ihre Mithilfe und ihre technische Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Hendrik Dahl, unter anderem für seine Hilfe bei der grafischen Umsetzung.

Zuletzt möchte ich meine Eltern erwähnen, die mir meine Ausbildung überhaupt erst ermöglicht haben. Dafür bin ich sehr dankbar.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Greimelmaier K, Calaminus G, Kristiansen G, Vokuhl C, Klapper W.

Chromosomal gains of 12p and 1q are not associated with inferior outcome of pediatric and adolescent germ cell tumors. *Pediatric blood & cancer*. 2019: e27777.

DOI: [10.1002/pbc.27777](https://doi.org/10.1002/pbc.27777)

Greimelmaier K, Vokuhl C, Calaminus G, Klapper W, Leuschner I.

Chromosomale Zugewinne von 1q und 12p sind mit histologischem Typ und Lokalisation, aber nicht der Prognose kindlicher Keimzelltumoren assoziiert. *Pathologe*. 2018. 39 (Suppl 1): 92.

[https://doi.org/ 10.1007/ s00292- 018- 0442-x](https://doi.org/10.1007/s00292-018-0442-x)