

Aus der Abteilung Neurochirurgie
(Prof. Dr. med. V. Rohde)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Klinische und molekularzytogenetische Charakterisierung von Tumoren der Pinealisregion

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Björn Florian Böhrnsen

aus Hamburg

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatterin: PD Dr. med. A. Gutenberg

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Haase

III. Berichterstatter/in: -

Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	9
1.1 Raumforderungen und Tumoren der Pinealisregion	9
1.2 Klassifikation der Tumoren der Pinealisregion	10
1.2.1 Pineal-parenchymale Tumoren der PR	12
1.2.1.1 Pinealiszyste.....	12
1.2.1.2 Pineozytom	12
1.2.1.3 Pineoblastom.....	12
1.2.1.4 Papillärer Tumor	13
1.2.1.5 Pineal-parenchymaler Tumor intermediärer Differenzierung	13
1.2.2 Keimzelltumoren der PR	13
1.2.2.1 Epidermoidzyste	14
1.2.2.2 Germinom	14
1.2.2.3 Teratom/Dermoid.....	15
1.2.3 Heterogene Tumoren der PR	15
1.2.3.1 Plexuspapillom.....	15
1.2.3.2 Pilozytisches Astrozytom.....	15
1.2.3.3 Solid-fibröser Tumor	16
1.2.3.4 Neuroendokriner Tumor	16
1.3 Therapie der Tumoren der Pinealisregion.....	17
1.3.1 Operative Strategien	17
1.3.2 Strahlen- und chemotherapeutische Strategien.....	17
1.4 Genetik der Tumoren der Pinealisregion.....	18
1.5 Komparative genomische Hybridisierung	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Patientenkollektiv	20
2.2 Materialien und Geräte	21

2.3	Komparative Genomische Hybridisierung	22
2.3.1	Gewinnung und Aufbereitung genomischer Tumor-DNS aus Paraffinblöcken	23
2.3.2	Photometrische DNS-Konzentrationsmessung	25
2.3.3	DNS-Agarose-Gelelektrophorese	25
2.3.4	Nick-Translation	27
2.3.5	Hybridisierung	29
2.3.5.1	Vorbereitung der Metaphasenpräparate	30
2.3.5.2	Hybridisierung der Metaphasenpräparate	30
2.3.6	Indirekte Fluoreszenzfärbung	31
2.3.7	Digitale Auswertung	34
2.4	Statistische Auswertung.....	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Klinik und Pathologie der Raumforderungen der Pinealisregion.....	38
3.1.1	Untersuchte histologische Entitäten	38
3.1.2	Geschlechter und Altersverteilung.....	38
3.1.3	Klinische Symptomatik	38
3.1.4	Follow-Up und Gesamtüberleben	39
3.2	Therapie der Primärtumoren der Pinealisregion	43
3.2.1	Adjuvante Radiotherapie	43
3.2.2	Adjuvante Chemotherapie	44
3.3	Therapie von Rezidivtumoren der Pinealisregion.....	47
3.4	Molekularzytogenetische Veränderungen pineal-parenchymaler Tumoren....	48
3.4.1	Pinealiszyste	48
3.4.2	Pineozytom	48
3.4.3	Pineoblastom.....	49
3.5	Molekularzytogenetische Veränderungen pinealer Keimzelltumoren.....	50
3.5.1	Epidermoidzyste	50
3.5.2	Germinom	50
3.5.3	Teratom.....	51
3.6	Molekularzytogenetische Veränderungen heterogener Raumforderungen der Pinealisregion.....	52

3.6.1	Plexuspapillom	52
3.6.2	Pilozytisches Astrozytom	52
3.6.3	Solid-fibröser Tumor	53
3.6.4	Neuroendokriner Tumor	53
3.7	Ergebnisse der komparativen genomischen Hybridisierung	54
4	Diskussion	56
4.1	Diversität der Tumoren der Pinealisregion	56
4.1.1	Klinische Symptomatik und Diagnostik	56
4.1.2	Chirurgische Therapie	57
4.2	Molekularzytogenetik von Tumoren der Pinealisregion	59
4.2.1	Pineal-parenchymale Tumoren der PR	59
4.2.2	Keimzelltumoren der PR	60
4.2.3	Heterogene Tumoren der PR	62
4.2.3.1	Pilozytisches Astrozytom.....	62
4.2.3.2	Solid-fibröser Tumor	63
4.2.3.3	Neuroendokriner Tumor	64
4.3	Grenzen der Komparativen genomischen Hybridisierung	64
4.4	Zielgene chromosomaler Veränderungen – ein Ausblick.....	65
5	Zusammenfassung.....	67
6	Abbildungsverzeichnis	68
7	Tabellenverzeichnis.....	70
8	Literaturverzeichnis.....	72

Abkürzungsverzeichnis

AMD	Actinomycin-D-Mannitol
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Bp	Basenpaare
CCD	Charge-coupled Device
CGH	Comparative Genomic Hybridization, Komparative Genomische Hybridisierung
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase I	Desoxyribonuklease I
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EcoRI	Escherichia coli RI
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GP	Glandula pinealis
HE	Hämatoxylin-Eosin

KI	Karnofsky-Index
Mb	Megabasen
MRT	Magnetresonanztomographie
PR	Pinealisregion
Rpm	Rounds per minute
SSC	Saline Sodium Citrate
TH	Thorakalwirbel
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Raumforderungen und Tumoren der Pinealisregion

Die Glandula pinealis (GP) liegt als zirkumventrikuläres Organ in der Nähe des Hirnstammes und wird dorsal durch das Splenium corporis callosi und die Tela choroidea, ventral durch die Vierhügelplatte, rostral durch den hinteren Anteil des 3. Ventrikels und kaudal durch den Kleinhirnwurm begrenzt (Abbildung 1.1.1) (Ringertz et al. 1954). Die epithelähnlichen Zellen der GP, die Pinealocyten, lagern sich zu mikroskopischen Zellclustern und -strängen zusammen, die von einem reichen kapillaren Netzwerk umgeben werden. Die speziell differenzierten Neurone der GP haben vorwiegend endokrinologische Aufgaben. Sie produzieren das Hormon Melatonin, das unter anderem den Schlaf-Wach-Rhythmus reguliert (Krieg et al. 2012).

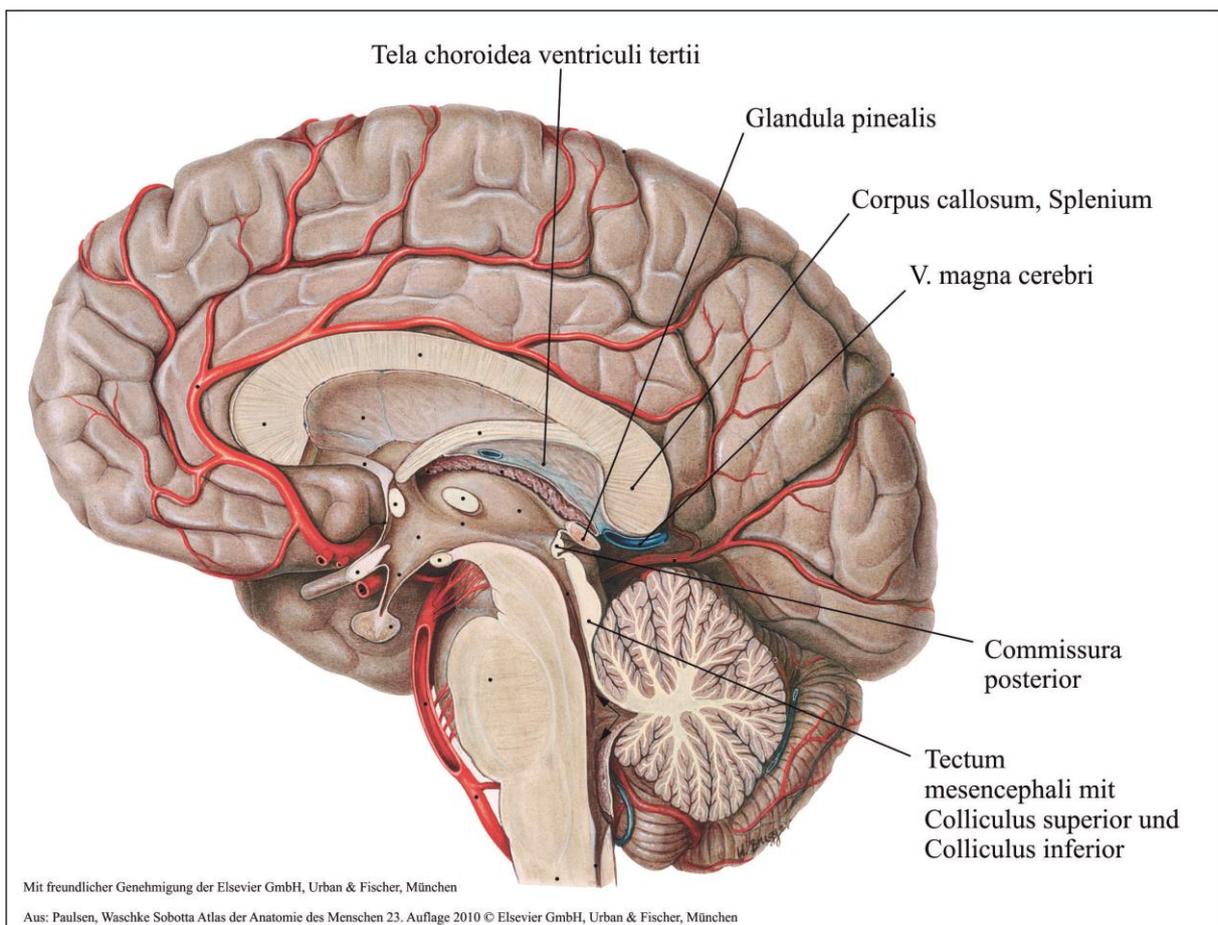


Abbildung 1.1.1: Anatomische Lage der Glandula pinealis auf der medialen Fläche des Gehirns, des Zwischenhirns und des Hirnstammes von links (Paulsen und Waschke 2010).

Tumoren und Raumforderungen in dieser Region zeigen sich gehäuft im Kindesalter und entsprechen ca. 3-8% aller kindlichen Tumoren. Im Erwachsenenalter machen sie weniger als 1% aller intrazerebralen Raumforderungen aus (Edwards et al. 1988; Regis et al. 1996; Rickert et al. 2001). Dabei entspringen nur 14-30% dieser Raumforderungen dem eigentlichen Drüsengewebe der GP (Rickert et al. 2001). Die Diagnose einer pinealen Raumforderung im fortgeschrittenen Stadium bedeutet neben einer zumeist massiv eingeschränkten Lebensqualität auch gleichsam eine äußerst schlechte Prognose für die Patienten, da die Abwesenheit der Blut-Hirn-Schranke eine schnelle Metastasierung in dieser Region ermöglicht. Therapeutisch besteht die Möglichkeit der chirurgischen Tumorentfernung und/oder Bestrahlung der Läsion. Beide Therapieformen sowie deren Kombination sind durch Komplikationen wie Gesichtsfeldeinschränkungen, Hydrozephalus, Infektion oder zerebelläre Ataxie und eine chirurgische Mortalitätsrate von bis zu 5% begleitet (Regis et al. 1996; Chibbaro et al. 2012; Pettorini et al. 2012). Durch die extra-axiale Lokalisation der GP ist ein chirurgischer Therapieversuch möglich, die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten sinkt jedoch rapide in Abhängigkeit von der Entität der pinealen Raumforderungen (Regis et al. 1996). Der größte Teil der pinealen Raumforderungen ergibt sich durch die Vielfalt unterschiedlichster histologischer Gewebe in dieser Region. Hierzu gehören unter anderem das Drüsengewebe, gliale Zellen, arachnoidale Zellen, das Ependym, sympathische Nerven sowie Reste embryonaler und ektodermaler Zellen. Die exakte Differentialdiagnostik pinealer Tumoren gestaltet sich schwierig (Rickert et al. 2001).

1.2 Klassifikation der Tumoren der Pinealisregion

Um die therapeutischen Optionen bzw. die Prognose einer Tumorerkrankung in der PR bewerten zu können, wurde die Nomenklatur der Tumoren der PR mehrfach ergänzt und erweitert. Zuletzt geschah dies 2007 in der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems (ZNS) (Louis et al. 2007). Ziel war es, eine international gültige Nomenklatur, Klassifikation und Stadieneinteilung anhand von definierten histologischen, klinischen sowie epidemiologischen Kriterien zu etablieren und bereits bestehende Klassifizierungen zu ergänzen. Zu den häufigsten Tumoren der PR zählen die pineal-parenchymatösen und die Keimzelltumoren (DeGirolami und Schmidek 1973; Kang et al. 1998). Die primären pineal-parenchymatösen Raumforderungen umfassen neben dem Pineozytom unter anderem das Pineoblastom, den papillären Tumor der PR und den pineal-

parenchymalen Tumor intermediärer Differenzierung. Die Keimzelltumoren der GP schließen u.a. die Embryonalzellkarzinome, Teratome, Dermoide und Germinome sowie die Chorionkarzinome ein. Diese können als gemischt zelluläre oder als zellspezifische Keimzelltumoren auftreten (Ng 1995; Knierim und Yamada 2003). Viele Raumforderungen dieser Region zeigen ein histomorphologisches Mischbild und eine Vielzahl unterschiedlicher Gewebe der Pinealisregion (PR). So finden sich auch seltene Entitäten wie solid-fibröse und neuroendokrine Tumoren. Maligne Tumoren können zudem eine lokale und/oder systemische Metastasierung zeigen, die mit einer schlechten Prognose einhergehen. Eine Übersicht der Raumforderungen der PR findet sich in Tabelle 1.2.1.

Tabelle 1.2.1: Raumforderungen und Tumoren der Pinealisregion

Dignität	Pineal-parenchymale Tumoren	Keimzelltumoren	Heterogene Tumoren der Pinealisregion		
			Neural	Glial	Sonstige
Benigne	Pineozytom	Dermoid	Gliale Zyste (Pinealiszyste)	Astrozytom	Meningeom
	Papillärer Tumor	Ektodermaler Sinustumor	Arachnoidale Zyste	Oligodendro-gliom	Ependymom
		Endodermaler Sinustumor	Ganglioneurom	Plexus-papillom	Solid-fibröser Tumor
Maligne	Pineoblastom	Germinom / Embryonalzell-tumor		Glioblastom	Lymphom
	Pineal-parenchymaler Tumor intermediärer Differenzierung	Teratom		Oligodendro-gliom	Neuro-endokriner Tumor
		Chorionkarzinom		Astrozytom	
Seltene Entitäten, Mischformen und Metastasen anderer Raumforderungen					

1.2.1 Pineal-parenchymale Tumoren der PR

1.2.1.1 Pinealiszyste

Pinealiszysten finden sich als benigne Raumforderungen in der PR und werden meist inzidentell im Rahmen von MRT-Untersuchungen bei ca. 10% der untersuchten Patienten beschrieben (Lacroix-Boudhrioua et al. 2011). Histologisch imponieren fibro-kollagene, zystische Hohlräume pinealer Zellschichten (Lacroix-Boudhrioua et al. 2011). Eine operative Entfernung ist nicht zwingend erforderlich jedoch können pineal-parenchymale Tumoren ebenfalls als zystische Raumforderungen imponieren (Fakhran und Escott 2008).

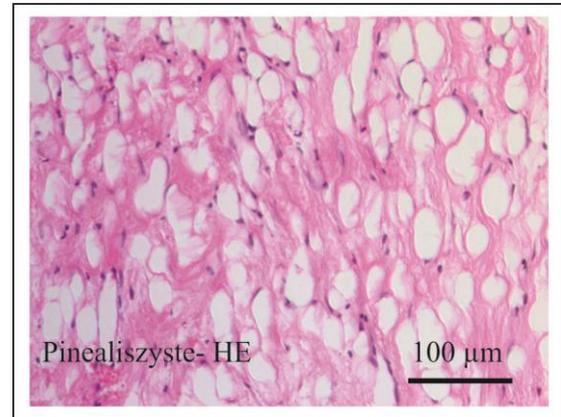


Abbildung 1.2.1: Pinealiszyste - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

1.2.1.2 Pineozytom

Bei dem Pineozytom handelt es sich um einen gut differenzierten Tumor, dessen morphologische Eigenschaften denen des pinealen Parenchyms ähneln. Es zeigen sich meist perivaskuläre neoplastische Zellen sowie Rosettenfiguren ohne Nachweis von Mitosen oder Nekrosen (Parwani et al. 2005).

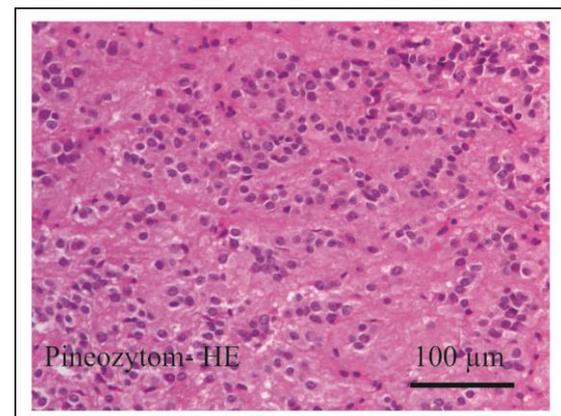


Abbildung 1.2.2: Pineozytom - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

1.2.1.3 Pineoblastom

Das Pineoblastom ist ein hochmaligner Tumor, der vorwiegend bei Kindern und jungen Erwachsenen auftritt und ein aggressives Wachstumsmuster zeigt. Mikroskopisch finden sich hyperzelluläre, dichte Cluster runder Zellen mit deutlich verschobener Kern-Plasma-Relation. Es finden sich multiple Mitosen sowie reichlich Nekrosen. Zudem zeigen sich vermehrt

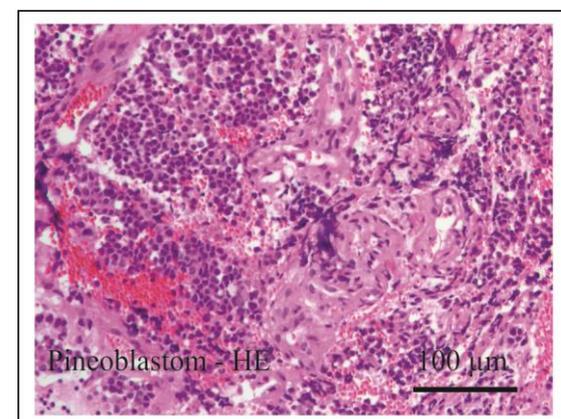


Abbildung 1.2.3: Pineoblastom - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

perivaskuläre Zellnester sowie zelluläre Ähnlichkeiten mit primitiven neuroektodermalen Tumoren (Herrick und Rubinstein 1979; Parwani et al. 2005).

1.2.1.4 Papillärer Tumor

Papilläre Tumoren der PR sind seltene neuroepitheliale Tumoren, die sich meist bei Kindern und jungen Erwachsenen manifestieren. Makroskopisch lassen sie sich nicht von Pineozytomen unterscheiden und zeigen keine Ähnlichkeit mit pineal parenchymalen Tumoren (Louis et al. 2007). Histologisch zeigen diese Raumforderungen eine papillär-epitheliale Zellstruktur. Ein möglicher zellulärer Ursprung liegt im ependymalen Gewebe des Organum subcommissurale (Jouvet et al. 2003). Das biologische Verhalten und die histologische Graduierung dieser papillären Tumoren sind jedoch nicht abschließend geklärt (Gutenberg et al. 2011).

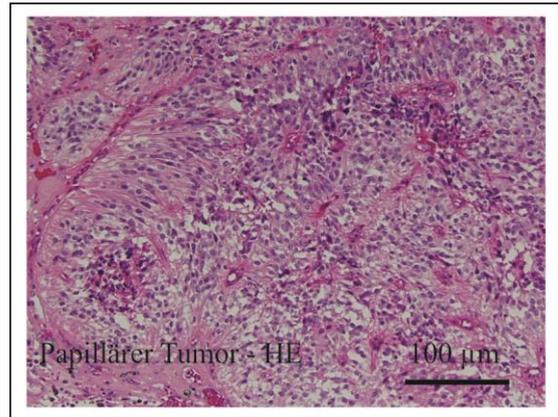


Abbildung 1.2.4: Papillärer Tumor - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

1.2.1.5 Pineal-parenchymaler Tumor intermediärer Differenzierung

Pineal parenchymale Tumoren der intermediären Differenzierung entsprechen ca. 20% aller pineal-parenchymaler Tumoren. Sie werden meist einem WHO °II bis °III zugeordnet und finden sich gehäuft bei jungen Erwachsenen. Histologisch können Gemeinsamkeiten mit Pineozytomen sowie Übergänge zum Pineoblastom beschrieben werden. Es finden sich neben Rosettenstrukturen ohne Nekrosen ebenfalls Areale gesteigerter mitotischer Aktivität mit zunehmenden nukleären Atypien (Smith et al. 2010).

1.2.2 Keimzelltumoren der PR

Die Keimzelltumoren der PR umfassen zystische Raumforderungen sowie u.a. Germinome und Teratome. Es handelt sich dabei meist um maligne Tumoren mit Metastasierung und schlechter Prognose. Therapeutische Behandlungsstrategien folgen in der Regel operativen und strahlentherapeutischen Ansätzen. Die 10-Jahres Überlebensrate der Patienten, die an

einem Germinom der PR erkranken, ist mit 87% besser als die anderer zerebraler Keimzelltumoren (Khafaga et al. 2012).

1.2.2.1 Epidermoidzyste

Epidermoidzysten ähneln in ihren Eigenschaften echten tumorösen Läsionen der PR und können zum Teil nur schwer von zystischen Pineozytomen und Astrozytomen unterschieden werden. Sie zeigen neben fokal keratinisierenden Plattenepithelzellen granulär-zystische Regionen (Parwani et al. 2005).

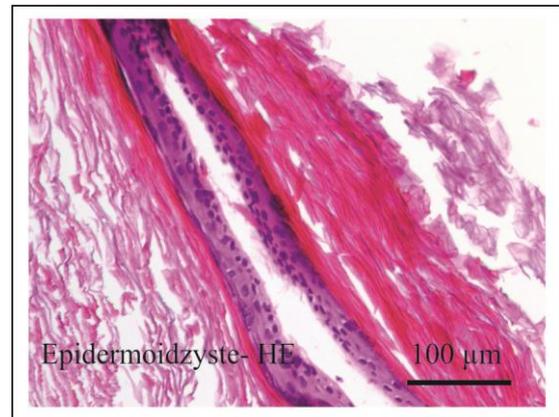


Abbildung 1.2.5: Epidermoidzyste - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

1.2.2.2 Germinom

Das Germinom zeichnet sich durch ein inhomogenes, pleomorphes Zellbild aus. Es zeigen sich polygonale, fragile, neoplastische Zellen mit runden, prominenten Nuclei. Zudem finden sich pleomorphe Zellen sowie lymphozytäre Infiltrate (Parwani et al. 2005). Auch kann in manchen Fällen eine Expression von embryonalen Tumormarkern wie z.B. alpha-Fetoprotein (AFP) oder beta-humanen Choriongonadotropin (β hCG) nachgewiesen werden (Allen et al. 2012).

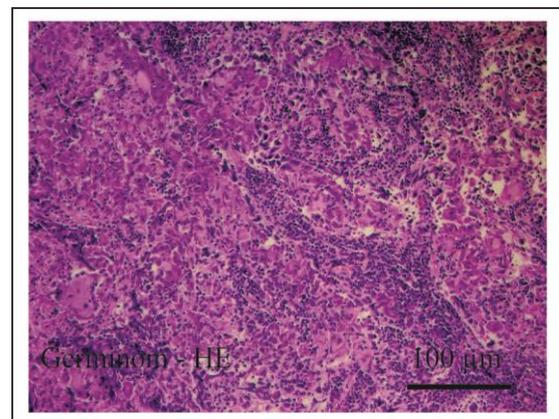


Abbildung 1.2.6: Germinom - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

1.2.2.3 Teratom/Dermoid

Teratome sind von pluripotenten Zellen ausgehende, meist aus allen drei Keimblättern bestehende Raumforderungen. Reife, adulte Teratome/Dermoide können differenziertes Gewebe bis hin zu Haaren und Zähnen enthalten. Sie wachsen meist lokal begrenzt und zeigen einen benignen Verlauf. Embryonale Teratome oder Teratokarzinome hingegen zeigen eine geringe Differenzierung und können in das umliegende Gewebe infiltrieren und metastasieren (Fevre-Montange et al. 2010; Kyritsis 2010; Behari et al. 2011).

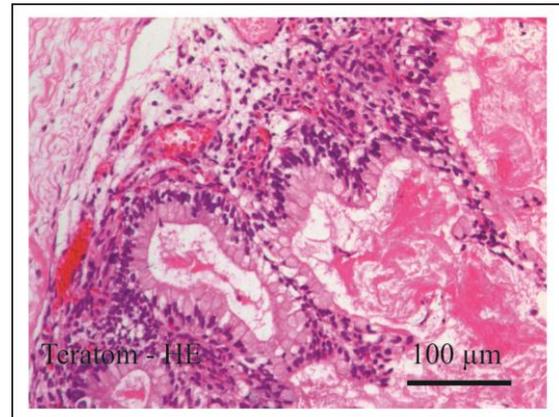


Abbildung 1.2.7: Teratom - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

1.2.3 Heterogene Tumoren der PR

1.2.3.1 Plexuspapillom

Tumoren des Plexus choroideus sind selten und entsprechen nur 0,5% aller cerebralen Raumforderungen (Carson et al. 1997; Mohindra und Savardekar 2012). Die meisten dieser Tumoren zeigen benigne Eigenschaften. In 25% der Fälle ist jedoch eine maligne Entartung möglich, so dass chirurgische Therapien notwendig werden.

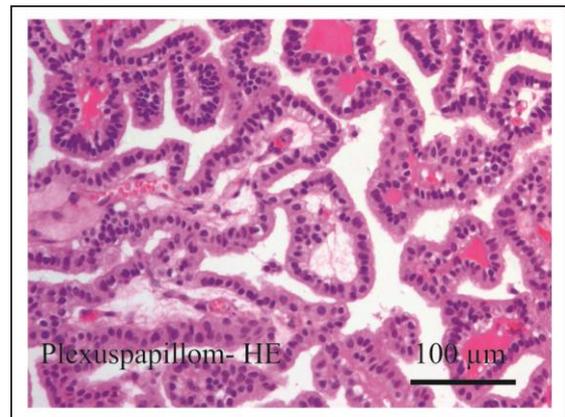


Abbildung 1.2.8: Plexuspapillom - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

1.2.3.2 Pilozytisches Astrozytom

Pilozytische Astrozytome treten meist bei jüngeren bzw. jugendlichen Patienten auf. Sie finden sich entlang der neuronalen Achse und zeigen infiltrative Eigenschaften sowie Tendenzen zur malignen Transformation (Fleming und Chi 2012; Tabrizi et al. 2012). Bei einer allgemein guten Prognose (Colin et al.

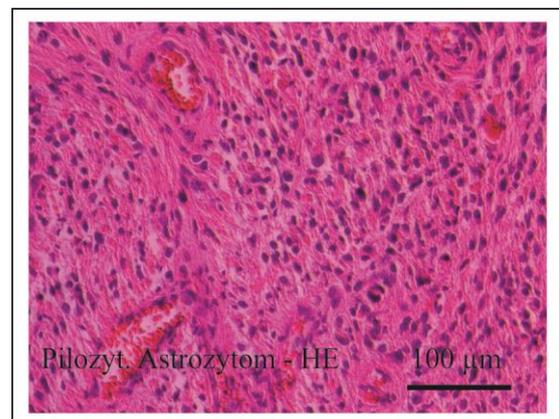


Abbildung 1.2.9: Pilozyt. Astrozytom - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

2012) zeigen diese Tumoren trotz chirurgischer und strahlentherapeutischer Therapie in einigen Fällen ein heterogenes Verhalten, so dass Rezidive möglich sind (Bucy und Thieman 1968; Pedersen und Romner 2012).

1.2.3.3 Solid-fibröser Tumor

Zerebrale, solid-fibröse Tumoren sind seltene Raumforderungen des ZNS. 2010 konnte der erste Tumor dieser Art in der PR beschrieben werden (Zhang et al. 2010). Aktuell sind weniger als 100 dieser Raumforderungen in der Literatur beschrieben (Carneiro et al. 1996; Zhang et al. 2010). Fibröse Tumoren zeigen sich u.a. CD34 positiv und werden seit 2007 in der WHO-Klassifikation zerebraler Tumoren als eigene, klinisch-pathologische Tumorentität beschrieben (Louis et al. 2007; Zhang et al. 2010).

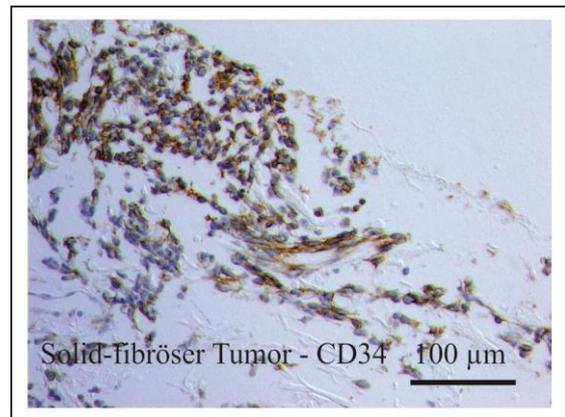


Abbildung 1.2.10: Solid-fibröser Tumor - CD34 Färbung

1.2.3.4 Neuroendokriner Tumor

2010 wurde erstmalig die Manifestation eines neuroendokrinen Tumors im Bereich der PR beschrieben (Grozinsky-Glasberg et al. 2010). Der Tumor konnte nur bioptisch gesichert werden. Klinische und molekularzytogenetische Untersuchungen dieser Tumorentität sind aktuell nicht beschrieben.

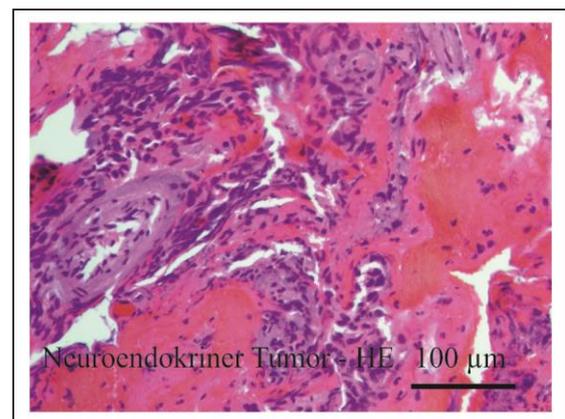


Abbildung 1.2.11: Neuroend. Tumor - Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

1.3 Therapie der Tumoren der Pinealisregion

1.3.1 Operative Strategien

Therapien von (malignen) Tumoren der PR basieren meist auf einer Kombination aus operativen und strahlentherapeutischen Ansätzen. Um eine für den Patienten optimale therapeutische Intervention zu planen, ist eine histologische Diagnostik notwendig. Eine biopsische Diagnosesicherung kann stereotaktisch oder offen operativ erfolgen (Musolino et al. 1993; Stern und Ross 1993). Technische Limitierungen der stereotaktischen Biopsie führen jedoch dazu, dass komplexe Heterogenitäten einzelner Tumoren ggf. nicht suffizient diagnostiziert werden können. So zeigt diese Methodik trotz einer geringen Mortalität von ca. 1,3% (Regis et al. 1996) diagnostische Einschränkungen gegenüber einer offenen operativ-therapeutischen Exzision.

Operative Indikationen und Methoden zur Behandlung von Tumoren der PR werden kontrovers diskutiert (Popovic und Kelly 1993; Regis et al. 1996; Hanft et al. 2011). Mikrochirurgische Techniken haben zu einer deutlichen Reduktion des operativen Risikos geführt, so dass immer häufiger die Indikation zu einer totalen oder subtotalen Entfernung einer Raumforderung gestellt wird (Clark et al. 2010; Kodaera et al. 2011; Tate et al. 2011). Die operative Mortalität liegt mit 5% jedoch immer noch über der einer stereotaktischen Biopsie (Regis et al. 1996; Chibbaro et al. 2012; Pettorini et al. 2012). Eine Indikation zur operativen Therapie stellt sich besonders bei strahlenresistenten Tumoren der PR, bei benignen, anatomisch gekapselten Raumforderungen sowie malignen Keimzelltumoren ohne Metastasierung.

1.3.2 Strahlen- und chemotherapeutische Strategien

Strahlentherapeutische Interventionen bei malignen Tumoren der PR werden unterschiedlich umgesetzt und diskutiert (Regis et al. 1996; Stoiber et al. 2010; Chowdhary et al. 2012). Germinome zeigen sich sehr strahlensensibel und können mit Erfolg strahlentherapeutisch behandelt werden (Behari et al. 2011). Bei Metastasierung von hochmalignen Tumoren entlang der neuronalen Achse ist eine Strahlentherapie mit Boosterung des Tumorbetts zu erwägen. Strahlentherapeutische Strategien bleiben jedoch nicht ohne Nebenwirkungen und können die Entstehung von zerebralen Zweitneoplasien fördern (Chowdhary et al. 2012). Sie sind daher besonders bei Kindern nur nach vorsichtiger Abwägung einzusetzen. Dies betrifft ebenfalls chemotherapeutische Behandlungsansätze. Das Ansprechen von Raumforderungen der PR auf chemotherapeutische Regime ist aktuell nur unzureichend charakterisiert und

meist individuellen Krankheitsverläufen angepasst oder folgt institutionell unterschiedlichen Protokollen (Fontana et al. 2011; Li et al. 2011; Lorenzetti et al. 2011; Khafaga et al. 2012).

1.4 Genetik der Tumoren der Pinealisregion

Da es sich bei den Tumoren der PR um seltene Krankheitsbilder handelt, ist die klinische Datenlage meist rar und ihre genetische Charakterisierung unvollständig. Der Nachweis spezifischer Genveränderungen für oder wider die Tumorigenese in der PR steht aktuell aus (Rickert et al. 2006; Sato und Kubota 2009). Chromosomale Aberrationen finden sich meist seltener in primär benignen als in malignen Raumforderungen. So zeigen z.B. Tumoren der Keimzelllinien häufiger Zugewinne der Chromosomen 12p, 8q und 1q sowie Verluste der Chromosomen 13q, 18q, 9q und 11q (Rickert et al. 2000). Dysbalancen der Chromosomen 1q, 2p, 4q, 5p, 5q, 8p, 8q, 9q, 10, 12q, 16q 19p und 22 wurden bei der Analyse unterschiedlicher Tumoren der PR beschrieben, wobei Abweichungen unter den untersuchten Tumorentitäten vorlagen (Rickert et al. 2001; Hasselblatt et al. 2006; Miller et al. 2011). Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) ermöglicht es, diese Dysbalancen zu untersuchen und genetische Abweichungen zu charakterisieren.

1.5 Komparative genomische Hybridisierung

Die CGH wurde erstmals von Kallioniemi et al. (Kallioniemi A et al. 1992) und von du Manoir et al. (du Manoir et al. 1993) beschrieben. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, genetische Veränderungen auf chromosomaler und subchromosomaler Eben zu identifizieren. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Tumor- sowie Referenz-Desoxyribonukleinsäure (DNS) wird auf normale Metaphasenchromosomen hybridisiert. Dabei kommt es zur CGH der Tumor- und Referenz-DNS an die entsprechend homologe Region der Metaphasenchromosomen. Die Verteilung und Intensität der unterschiedlich fluoreszierenden Hybridisierungen entlang der Chromosomenachse ermöglicht die Darstellung von Zugewinnen und Verlusten sowie die Charakterisierung genetischer Dysbalancen (Kallioniemi OP et al. 1994; Hermsen et al. 1996; Weiss et al. 1999). Die Qualität der CGH wird dabei durch die Qualität und Menge der Tumorzellen beeinflusst (Kallioniemi OP et al. 1994). Verunreinigte oder zu wenig Tumor-DNS kann zu falsch positiven oder negativen Ergebnissen führen. Darüber hinaus ist eine optimale Länge der bei

der Nicktranslation entstehenden DNS-Fragmente von 600 bis 2000 Basenpaare (Bp) notwendig.

Ein DNS-Zugewinn kann die Aktivierung eines Onkogens, ein DNS-Verlust dagegen die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens bedeuten. Zudem können Amplifikationen detektiert werden, in deren Gebiet Onkogene liegen könnten (Kallioniemi A et al. 1992). Eine CGH kann sowohl an frischem, gefrorenem oder paraffineingebettetem Gewebe durchgeführt werden und bietet damit eine effiziente molekularzytogenetische Methode zur Untersuchung von Tumor-DNS (Speicher et al. 1993).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Tumoren der PR entsprechen weniger als 1% aller intrazerebralen Raumforderungen. Die Diagnose dieser seltenen Erkrankung bedeutet neben einer eingeschränkten Lebensqualität gleichsam eine schlechte Prognose der Patienten. Um die therapeutischen Optionen dieser heterogenen Tumorerkrankungen bewerten zu können, ist eine genaue klinische und genetische Charakterisierung dieser Läsionen notwendig. Aktuell ist es jedoch nicht möglich, den genetischen Einfluss auf das Überleben der Patienten oder die Prädiktion für das Auftreten pinealer Raumforderungen zu beschreiben. Zudem zeigen pineale Tumoren unterschiedlicher Dignität Abweichungen chromosomaler Dysbalancen (Rickert et al. 2000; Rickert et al. 2001; Gutenberg et al. 2011). Die molekularzytogenetische Differentialdiagnostik pinealer Raumforderungen gestaltet sich daher schwierig.

Ziel dieser Arbeit war es, Tumoren der PR mit Hilfe der CGH in ihrem klinischen Zusammenhang zu charakterisieren und auszuwerten. Dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Paraffin-asservierte Gewebeproben molekularzytogenetisch untersucht und klinische Patientendaten retrospektiv ausgewertet. Zudem erfolgte eine Erhebung der aktuellen Patientensituation nach einem durchschnittlichen Zeitraum von 10 Jahren. Die Nutzung der hierfür erforderlichen Daten erfolgte nach schriftlicher Aufklärung und Einwilligung durch die Patienten oder im Falle von Kindern durch deren Erziehungsberechtigte (Informed Consent) und entsprechend den Richtlinien der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen sowie nach Prüfung durch das Ethik-Komitee der Medizinischen Fakultät (Ethikantrag Nr.: 12/11/10).

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Bei dem in dieser Dissertation untersuchten Kollektiv handelt es sich um 19 Patienten, die an einer Raumforderung im Bereich der PR erkrankten. Die Untersuchungen erfolgten nach schriftlicher Aufklärung und Einwilligung durch die Patienten (Informed Consent) und entsprechend den Richtlinien der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen sowie nach Prüfung durch das Ethik-Komitee der Medizinischen Fakultät (Ethikantrag Nr.: 12/11/10). Die untersuchten Proben bestanden dabei aus 19 in Paraffin eingebetteten und asservierten Gewebeproben. Diese wurden während der chirurgischen Therapie der Tumoren zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken gewonnen. Im Anschluss wurden die Proben für evtl. notwendige weiterführende diagnostische Zusatzuntersuchungen in der Abteilung für Neuropathologie asserviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich Untersuchungsmaterial eingesetzt, welches unabhängig von der Studie nur zu medizinisch indizierten und therapeutischen Maßnahmen entnommen wurde. Weiter Eingriffe am Menschen erfolgten nicht. Es wurde kein zusätzliches Probenmaterial entnommen. Die Patientendaten waren im Labor nicht bekannt und die Proben wurden pseudonymisiert behandelt. Eine Re-Identifizierung der betroffenen PatientInnen war nur der Studienleitung möglich. Die gewonnenen Daten und Untersuchungsergebnisse lagen für die statistische Auswertung ebenfalls in pseudonymisierter Form vor. Daten und Proben wurden ohne Namensnennung, mit Nummern codiert gespeichert. Eine Zuordnung der Daten oder Proben zu dem betroffenen Patienten war nur möglich, wenn hierfür der Schlüssel eingesetzt wurde, mit dem die Daten und Proben codiert wurden. Die personenbezogenen Unterlagen wurden geschützt und getrennt von den pseudonymisierten Daten und Proben aufbewahrt. Eine Entschlüsselung war nur durch die verantwortlichen Studienärzte möglich. Dritte erhielten keinen Einblick in die Originalunterlagen. Die verwendeten Daten und Proben wurden nicht an Dritte weitergegeben. Ein Widerruf der Einwilligungserklärung war jederzeit möglich. In diesem Falle wurden alle im Rahmen dieser Studie erhobenen personenbezogenen Daten gelöscht und Proben vernichtet.

2.2 Materialien und Geräte

Tabelle 2.2.1: Materialien und Geräte

Geräte & Materialien	Hersteller	Firmensitz
Anregungsfilter DAPI	Gentix	New Milton, UK
Anregungsfilter FITC	Gentix	New Milton, UK
Anregungsfilter TRITC/TxRed	Gentix	New Milton, UK
BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Brutschrak	Memmert	Schwabach
CCD-Kamera	Photometrics SENSYS	München
CGH-Metaphase Target Slides	Abbott Molecular	Wiesbaden
Deckgläser	Menzel-Gläser	Braunschweig
Elektrophoresekammer	Serva Elctrophoresis	Heidelberg
Feinwaage BL1500S	Sartorius	Göttingen
Fixogum	Marabu	Tamm
Hybridisierungskammer HYBrite	Vysis	Downers Grove, USA
Küvetten	Eppendorf	Hamburg
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments	Schwabach
Mikroskop Axioskop 40 FL	Carl Zeiss	Jena
Mikrotom HM 400	Microm	Volketswil, Schweiz
Objektträger	Menzel-Gläser	Braunschweig
pH-Meter CG820	Schott Geräte	Mainz
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht
Quips Karyotyping-CGH Software	Vysis	Downers Grove, USA
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg
UV-Transluminator FLX 20.M	Vilber Loumat	Eberhardzell
Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, USA
Zentrifuge Centrifuge 5417 R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf	Hamburg

Tabelle 2.2.2: Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller	Firmensitz
DNA-Polymerase I	Fermentas	St. Leon-Rot
DNase I	Roche	Mannheim
Pepsin	Sigma-Aldrich	Hamburg
Proteinase K	Roche	Mannheim

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben mit Aqua bidest. angesetzt.

2.3 Komparative Genomische Hybridisierung

Die Durchführung der CGH-Analysen erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch die Abteilung für Neuropathologie. Die Markierung der Tumor- bzw. Referenz-DNS erfolgte mit Biotin bzw. Digoxigenin (DIG) markierten Nukleotiden (Brigati et al. 1983; Komminoth 1992). Durch die Zugabe von Cot-1-DNS im Rahmen der Hybridisierungsreaktion wurde eine Bindung an repetitive Sequenzen der zu untersuchenden DNS sowie an perizentromerische und heterochromatinhaltige Regionen der Metaphasenchromosomen verhindert (Landegent et al. 1987). Nach erfolgreicher Hybridisierung der markierten DNS-Sonden wurden diese durch einen gegen Biotin oder DIG gerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörper dargestellt (Kallioniemi OP et al. 1994). Der Nachweis Biotin-konjugierter Nukleotide erfolgte mit einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Avidin-Antikörper (grün). DIG-markierte DNS-Abschnitte wurden mittels eines anti-DIG-Rhodamin-Antikörpers (rot) nachgewiesen. Die abschließende Färbung der Metaphasenchromosomen erfolgte mit Diaminophenylindol (DAPI). DAPI bindet an A⁵-T⁶-reiche Regionen und erzeugt zusammen mit einer nicht fluoreszierenden, kontrastierenden Actinomycin-D-Mannitol (AMD)-Gegenfärbung die charakteristische Q-Chromosomenbänderung (Schweizer 1976). Die markierten Chromosomen wurden im Karyogramm geordnet und die hybridisierten Metaphasen mit Hilfe einer charge-coupled device (CCD)-Kamera, spezieller Filter und entsprechender Software (Metasystem, Altlußheim, Deutschland) ausgewertet (Abbildung 2.3.1).

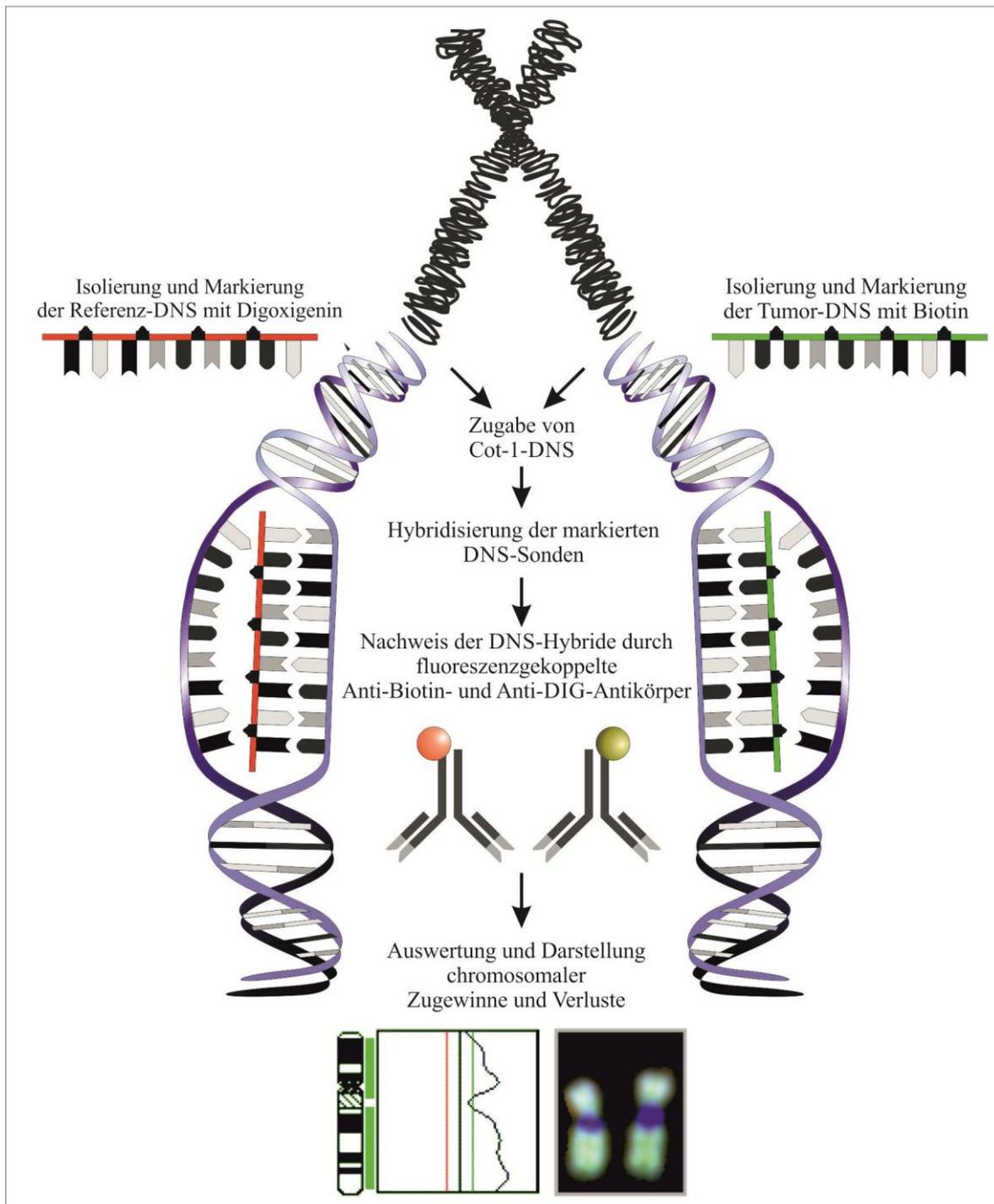


Abbildung 2.3.1: Komparative Genomische Hybridisierung (CGH).

2.3.1 Gewinnung und Aufbereitung genomischer Tumor-DNS aus Paraffinblöcken

Formalinfixierung und Paraffineinbettung erschweren die DNS-Isolierung aus Gewebeproben. Trotz häufiger Fragmentierung ist es jedoch möglich, ausreichend genetisches Material für CGH-Analysen zu isolieren (Goelz et al. 1985; Speicher et al. 1993; Isola et al. 1994).

Lösungen und Puffer

Tabelle 2.3.1: DNS-Isolierungspuffer

DNS-Isolierungspuffer		1000 ml
Tris-HCl	50 mmol/l	7,88 g
EDTA	1 mmol/l	0,37 g
Polysorbat 20	0,5% (v/v)	5 ml

Die Isolierung der Tumor-DNS erfolgte aus 10 bis 20 Paraffinschnitten der histologischen Gewebeproben, die mit Hilfe eines Mikrotoms in einer Stärke von je 10 µm angefertigt wurden. Die Schnitte wurden zunächst zweimalig für je 10 Minuten in 100% Ethanol entwässert und entparaffiniert. Im Anschluss wurden die Präparate mit 200 µl DNS-Isolierungspuffer (Tabelle 2.3.1) sowie 40 µl Proteinase K versetzt und bei 55 °C und 850 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Nach Isolierung der DNS aus den Tumorzellen erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K durch eine achtminütige Inkubation bei 95 °C. Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten mit 13.500 rpm zentrifugiert, der gewonnene Überstand für weitere Analysen isoliert und die vorbehandelte DNS-Lösung mit Hilfe des QiAmp DNA Mini Kit der Firma Qiagen aufgereinigt.

Tabelle 2.3.2: QiAmp DNA Mini Kit

Puffer		
AL-Puffer	Guadiniumchlorid	25-50%
AW1-Puffer	Guadiniumchlorid	50-100%
AW2-Puffer	Keine näheren Angaben	
AE-Puffer	Keine näheren Angaben	
ALT-Puffer	Edetinsäure	2,5-10%
	Natriumlaurylsulfat	2,5-10%

Die DNS-Aufreinigung erfolgte entsprechend den Empfehlungen des Herstellers (Tabelle 2.3.2). Zur Aufbereitung wurden 650 µl der DNS-Lösung mit 200 µl AL-Puffer bei 70 °C und 1400 rpm für 10 Minuten auf dem Thermomixer gemischt und im Anschluss für 5 Minuten mit 240 µl 100%igem Ethanol versetzt und auf die entsprechenden im Kit enthaltenen DNS-Isolationssäulen geladen. Über die Membran der Isolationssäulen erfolgte die Aufreinigung der DNS-Probe durch Zugabe von 500 µl AW1- und 500 µl AW2-Puffer.

Die abschließende Eluation der DNS erfolgte durch fünfminütige Inkubation mit 50 µl AE-Puffer und einer zweiminütigen Zentrifugation mit 10.000 rpm. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt, so dass ein Probenendvolumen von 100 µl erzielt wurde. Die Gesamt-DNS-Konzentration wurde photometrisch bei 260 und 280 nm gemessen und die Länge der DNS-Fragmente in der Gelelektrophorese bestimmt.

2.3.2 Photometrische DNS-Konzentrationsmessung

Zur Gewährleistung gleichbleibender Proben- und Referenz-DNS in den folgenden Analysen erfolgte eine photometrische DNS-Konzentrationsbestimmung. 5 µl der doppelsträngigen DNS wurden mit 95 µl Aqua ad injectionem versetzt und die DNS-Konzentration der Lösung photometrisch bestimmt. Bei neutralem oder leicht basischem pH entspricht ein Extinktionskoeffizient von 1,0 einer DNS-Konzentration von 50 µg/ml. Die Analyse der Proben erfolgte bei 260 nm und 280nm (Wilfinger et al. 1997). Als Zielwert galt ein Extinktionskoeffizient von 2,0. Die DNS-Konzentration wurde in µg/ml angegeben.

2.3.3 DNS-Agarose-Gelelektrophorese

Die Darstellung der DNS-Fragmente erfolgte im Rahmen der Gelelektrophorese und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht (Sharp et al. 1973).

Lösungen und Puffer

Tabelle 2.3.3: Molekulare Längenstandards

Molekulare Standards	Hersteller	Firmensitz
Lambda-DNA/EcoRI	Fermentas	St. Leon-Rot
pUC19 DNA/Mspl (Hpal)	Fermentas	St. Leon-Rot

Tabelle 2.3.4: TBE-Puffer

TBE-Puffer		1000ml
Tris	89 mmol/l	10,78 g
Borsäure	89 mmol/l	5,5 g
EDTA	2 mmol/l	0,58 g

Tabelle 2.3.5: Probenpuffer

Probenpuffer	6x Loading Dye Solution
Tris-HCl	10 mmol/l
Bromphenolblau	0,03%
Xylencyanol FF	0,03%
Glycerol	60%
EDTA	60 mmol/l

Tabelle 2.3.6: Ethidiumbromid-Lösung

Ethidiumbromid-Lösung		10ml
Ethidiumbromid	1 mg/l	10 mg

Tabelle 2.3.7: Gelansatz

Ethidiumbromid Gelansatz		100 ml TBE-Puffer
Agarose LE	1,5% (w/v)	1,5 g
Ethidiumbromid-Lösung		15 µl

Tabelle 2.3.8: Ethidiumbromid-Laufpuffer

Ethidiumbromid Laufpuffer		
TBE-Puffer		100 ml
Ethidiumbromid-Lösung		15 µl

Die Darstellung der DNS-Fragmente erfolgte mit Hilfe von 1,5 % Agarose-Gelen im elektrischen Feld (Tabelle 2.3.7). Die Agarose-Gele wurden mit Ethidiumbromid-Laufpuffer (Tabelle 2.3.8) überschichtet. Es wurden je 5 µl der DNS-Probe mit 3µl Probenpuffer (Tabelle 2.3.5) in einem Eppendorfgefäß gemischt und in die Geltaschen gegeben. Ein DNS-Längenstandard wurde zur Darstellung des Molekulargewichtes der DNS-Fragmente in eine separate Geltasche pipettiert. Lambda-DNA/EcoRI (Tabelle 2.3.3) diente als molekularer Längenstandard der DNS-Isolierung. Als Längenstandard der Nick-Translation wurde pUC19 DNA/Mspl (HpaII) verwendet (Tabelle 2.3.3). Die Elektrophorese erfolgte bei 80V in horizontalem Lauf über mindestens 45 min. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid in die

doppelsträngige DNA konnten die DNS-Fragmente unter Anregung mit UV-Licht dargestellt werden.

2.3.4 Nick-Translation

Die Markierung der isolierten Tumor- und Referenz-DNS erfolgte mit der von Rigby et al. beschriebenen Nick-Translation (Rigby et al. 1977). Genomische Referenz-DNS wurde mit freundlicher Unterstützung durch die Abteilung für Neuropathologie zur Verfügung gestellt. Die DNS-Doppelstränge wurden zunächst mit Hilfe der Desoxyribonuklease I (DNase I) durch Einzelstrangbrüche (nicks = engl.: Kerben) getrennt (Abbildung 2.3.2A) (Bernardi et al. 1973). Die freiliegenden 3'-Enden der DNS ermöglichen es der DNS-Polymerase I nach Entfernung der getrennten Nukleotide (Abbildung 2.3.2B), an der Bruchstelle einen neuen DNS-Strang zu synthetisieren (Kornberg et al. 1955b; Kornberg et al. 1955a; Lieberman et al. 1955). Im Rahmen dieser Polymerisationsreaktion werden unmarkierte durch zuvor markierte Nukleotide ersetzt (Abbildung 2.3.2C) (Kelly et al. 1970). Die Markierung der entsprechenden Nukleotide bzw. DNS-Sonden erfolgte durch die Integration spezifischer, an Nukleotide gebundener Markermoleküle (Brigati et al. 1983; Komminoth 1992). Die Tumor-DNS-Sonden wurden mit Biotin und die Referenz-DNS-Sonden mit DIG markiert. Die Konzentrationen von DNase I und DNS-Polymerase sowie die Reaktionszeit beeinflussen die Länge der hybridisierten DNS-Sonden (Abbildung 2.3.2D) (Kallioniemi OP et al. 1994). Um eine verstärkte Intensität und einheitliche Hybridisierung zu erreichen, wurden Fragmentlängen von 150 bis 650bp angestrebt.

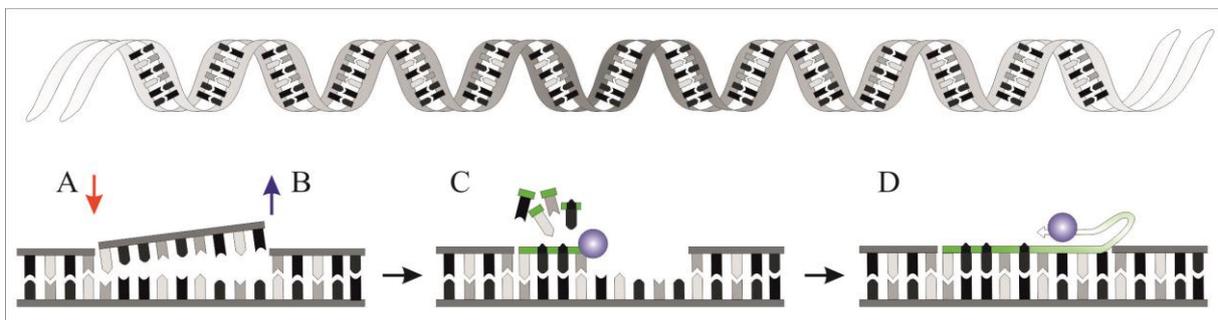


Abbildung 2.3.2: Nick-Translation.

Lösungen und Puffer

Tabelle 2.3.9: 10x Reaktionspuffer

10x Reaktionspuffer	
Tris-HCl	500 mmol/l
Magnesiumchlorid	100 mmol/l
Dithiothreitol	10 mmol/l

Tabelle 2.3.10: Nukleotide

Nukleotide	Hersteller	Firmensitz
Biotin-16-dUTP	Roche	Penzberg
DIG-11-dUTP	Roche	Penzberg
SEquencing Grade dNTP Set	Amersham Biosciences	Piscataway, USA

Zu Beginn der Nick-Translation wurden 3 µg der Tumor- bzw. Referenz-DNS in je ein auf Eis gelagertes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Probe mit 10 µl des 10x Reaktionspuffers (Tabelle 2.3.9) und je 2 µl dATP, dGTP, dCTP, 1 µl dTTP, 1 µl DNase I sowie 2 µl DNS-Polymerase I versetzt. Die Markierung der Tumor-DNS erfolgte durch 1 µl Biotin-16-dUTP. Für die Markierung der Referenz-DNS wurde die Probe mit 1 µl DIG-11-dUTP angesetzt (Tabelle 2.3.10). Abschließend wurden die Proben mit DNase freiem, sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt, gemischt, zentrifugiert und inkubiert. Die Referenz-DNS-Probe wurde für 60 min bei 15 °C, Proben der Tumor-DNS für 50 min inkubiert. Die Inkubation wurde durch Abkühlen auf -20 °C unterbrochen und die Fragmentlängen bestimmt. Bei optimaler Fragmentlänge von 150-650 bp wurden DNase I und DNS-Polymerase I durch Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) inaktiviert und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.3.5 Hybridisierung

Die Einzelstränge der DNS sind über Wasserstoffbrücken der einzelnen Basenpaare zu einer Doppelhelix verbunden (Watson und Crick 1953). Die Denaturierung des DNS-Doppelstranges durch Erhitzen führt zu einer Auflösung der Wasserstoffbrücken, so dass die Einzelstränge getrennt vorliegen (Meselson und Stahl 1958). Dieser Prozess ist durch Abkühlen der DNS-Probe reversibel. Dabei kommt es zu einer erneuten komplementären Bindung bzw. Hybridisierung der DNS-Einzelstränge (Doty et al. 1960; Marmur und Lane 1960). Die strukturelle Integrität der Chromosomen bleibt bei dieser *in-situ*-Hybridisierung erhalten (Pardue und Gall 1969). Die Hybridisierung von Biotin- oder Digoxigenin-markierter Tumor- bzw. Referenz-DNS mit entsprechend denaturierten Metaphasenchromosomen führt zu einer Markierung der entsprechenden homologen DNS-Abschnitte. Die Stabilität der so gebildeten Hybride ist unter anderem abhängig von Anion-Kation-Konzentration, pH-Wert, Temperatur sowie der Konzentration von Formamid und Dextransulfat (Schildkraut 1965; Bonner et al. 1967; Wetmur und Davidson 1968). Eine unspezifische Hybridisierung von markierten DNS-Sonden an repetitive DNS-Sequenzen des menschlichen Genoms (Jelinek und Schmid 1982; Singer 1982) kann durch die Hybridisierung dieser Sequenzen mit repetitiver Cot-1-DNS (Britten et al. 1974; Marx et al. 1976) vor Beginn der spezifischen Markierung durch Tumor- bzw. Referenz-DNS-Sonden vermieden werden (Landegent et al. 1987; Lichter et al. 1988; Pinkel et al. 1988).

Lösungen und Puffer

Tabelle 2.3.11: DNS- und Metaphasenpräparate

DNS- und Metaphasenpräparate	Hersteller	Firmensitz
Human Cot-1-DNS	Roche	Penzberg
CGH Metaphase Target Slides	Abbott Molecular	Wiesbaden

Tabelle 2.3.12: Pepsinlösung

Pepsinlösung		100ml
Pepsin	10 µg/ml	28,57 µl
HCl	1 mol/l	1 ml

Tabelle 2.3.13: 20x SSC

20x SSC		1000ml
Tri-Natriumcitrat	350 mol/l	88,29 g
Natriumchlorid	3 mol/l	175,5 g
Die Lösung wurde mit 37% HCl auf pH=7,0 eingestellt.		

Tabelle 2.3.14: Denaturierungslösung

Denaturierungslösung		50 ml
NaH ₂ PO ₄	0,5 mol/l	5 ml
20x SSC		5 ml
Aqua bidest.		5 ml
deionisiertes Formamid		35 ml
Die Lösung wurde auf pH=7,0 eingestellt.		

2.3.5.1 Vorbereitung der Metaphasenpräparate

Die Hybridisierung der markierten Tumor- bzw. Referenz-DNS erfolgte auf CGH Metaphase Target Slides (Tabelle 2.3.11). Proteine des Kernplasmas und Chromatingerüsts der Metaphasenpräparate wurden durch einen 5 minütigen Pepsinverdau in einer Hybridisierungskammer mit 100 ml Pepsinlösung (Tabelle 2.3.12) bei 37 °C im Wasserbad entfernt. Im Anschluss wurden die Target Slides für 5 Minuten in 2x SSC (Tabelle 2.3.13) gewaschen und in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 85%, und 100%) für je 5 min bei -20 °C entwässert und abschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Trennung der Wasserstoffbrücken der Metaphasen-DNS erfolgte durch Denaturierung für 2 min bei 69 °C in der im Wasserbad erwärmten Denaturierungslösung (Tabelle 2.3.14). Im Anschluss erfolgte eine erneute Dehydrierung der Präparate in aufsteigender Ethanolreihe.

2.3.5.2 Hybridisierung der Metaphasenpräparate

Die im Rahmen der Nick-Translation gewonnenen Tumor- bzw. Referenz-DNS-Sonden wurden aufgetaut und Rückstände der DNase I sowie Polymerase I durch Zugabe von 5 µl 0,5M EDTA-Lösung inaktiviert. In Vorbereitung für die Hybridisierung wurden je 67 µl der markierten Tumor- und Referenz-DNS (gegengeschlechtlich), 80 µl humane Cot-1-DNS (1mg/ml), 12 µl Natriumacetatlösung (3 mol/l) in 580 µl Ethanol 99,8 % angesetzt, gemischt

und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die DNS wurde für 30-60 Minuten bei -80 °C ausgefällt und die Proben für 45 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das DNS-Pellet durch die erneute Zugabe von 800 µl 70%-Ethanol für 45 Minuten bei 45 °C und 1400 rpm auf dem Thermomixer aufgereinigt. Die Proben wurden im Anschluss für 5 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNS-Pellet für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. In Vorbereitung für die Hybridisierung erfolgte die Denaturierung der aufgereinigten DNS-Sonden nach Resuspension des DNS-Pellets in 6 µl deionisiertem Formamid und Inkubation bei 37 °C und 1400 rpm für 60 Minuten auf dem Thermomixer. Im Anschluss wurden die Proben mit 7 µl Dextransulfat-haltigem Hybridisierungspuffer für 6 Minuten bei 78 °C denaturiert und bei 37 °C für 30 Minuten auf dem Thermomixer vorhybridisiert. Die vorbereiteten Proben wurden für 30 Sekunden bei 3500 rpm zentrifugiert und 13 µl der DNS-Sonden auf die präparierten Objektträger der Metaphasenchromosomen gegeben. Das Hybridisierungsfeld wurde mit einem Deckglas luftdicht verschlossen. Die Hybridisierung der Metaphasenchromosomen erfolgte für 3 Tage bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Im Anschluss an die dreitägige Hybridisierung erfolgte die indirekte Fluoreszenzfärbung der DNS-Präparate.

2.3.6 Indirekte Fluoreszenzfärbung

Nach erfolgreicher Hybridisierung der markierten DNS-Sonden wurden diese durch einen gegen Biotin oder DIG gerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen (Kallioniemi OP et al. 1994). Der Nachweis Biotin-konjugierter Nukleotide erfolgte mit einem FITC-Avidin Antikörper. DIG-markierte DNS-Abschnitte wurden mittels eines anti-DIG-Rhodamin-Antikörpers nachgewiesen (Brigati et al. 1983; Komminoth 1992). Die Fluoreszenzintensität der Biotin-FITC- und Rhodamin-DIG-gekoppelten Sonden ist proportional zur Menge der DNS-Hybride, so dass Veränderungen auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene quantifiziert werden konnten. Die abschließende Färbung der Metaphasenchromosomen mit DAPI und AMD ermöglichte die Darstellung des Q-Banden-Musters und Erstellung eines Karyogramms.

Lösungen und Puffer

Tabelle 2.3.15: Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate

Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate	Hersteller	Firmensitz
Anti-DIG-Rhodamin	Roche	Penzberg
FITC-Avidin DCS	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Die Anti-DIG-Rhodamin-Lösung wurde in einer Konzentration von 200 µg/ml angesetzt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.		

Tabelle 2.3.16: Waschlösung A

Waschlösung A		1000ml
Formamid	50% (v/v)	500 ml
20x SSC	10% (v/v)	100 mL
Die Lösung wurde mit HCl (5M) auf pH=7,0 eingestellt.		

Tabelle 2.3.17: Waschlösung B

Waschlösung B		1000 ml
20x SSC	10% (v/v)	100 mL
Die Lösung wurde mit HCl (1M) auf pH=7,0 eingestellt.		

Tabelle 2.3.18: Waschlösung C

Waschlösung C		1000 ml
20x SSC	80% (v/v)	800 mL
Polysorbat 20	0,1% (v/v)	1ml
Die Lösung wurde mit HCl (1M) auf pH=7,0 eingestellt.		

Tabelle 2.3.19: Blocking-Lösung

Blockinglösung		100 ml
20x SSC	5% (v/v)	20 ml
Albumin-Fraktion V	3% (v/v)	3 g
Polysorbat 20	0,1% (v/v)	0,1 ml
Die Lösung wurde mit HCl (1M) auf pH=7,0 eingestellt.		

Tabelle 2.3.20: Detektions-Lösung

Detektionslösung		1 ml
20x SSC	5% (v/v)	0,2 ml
Albumin-Fraktion V	1% (v/v)	0,01 g
Polysorbat 20	0,1% (v/v)	0,001 ml
Anti-DIG-Rhodamin-Lösung		15 µl
Anti-Biotin-FITC-Avidin DCS		5 µl
Die Lösung wurde lichtgeschützt hergestellt, für 10 min bei 37 °C und 1000 rpm auf dem Thermomixer inkubiert und im Anschluss für 3 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Lösung wurde mit HCl (1M) auf pH=7,0 eingestellt.		

Tabelle 2.3.21: DAPI-Lösung

DAPI-Lösung		1 ml
Actinomycin-D-Mannitol	50µl	12,5 µg/ml
DAPI	1µl	2,5 µg/ml
Vectorschild	1ml	1 ml

Rückstände unspezifisch hybridisierter DNS wurden durch dreimaliges Waschen der Target Slides für je fünf Minuten in Waschlösung A (Tabelle 2.3.16) und Waschlösung B (Tabelle 2.3.17) bei 42 °C entfernt. Im Anschluss erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der fluoreszenz-markierten Antikörper für 30 Minuten mit 300 µl Blocking-Lösung (Tabelle 2.3.19) bei 37 °C in der feuchten Kammer. Unter Lichtschutz wurde die Blocking-Lösung mittels Waschlösung C (Tabelle 2.3.18) entfernt und 300µl der lichtempfindlichen Detektions-Lösung (Tabelle 2.3.20) auf die Objektträger pipettiert. Die Färbung der Target Slides erfolgte für 60 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer. Im

Anschluss wurde die Detektions-Lösung entfernt und die Präparate dreimal für je 5 Minuten bei 42 °C in Waschlösung C gewaschen. Die Gegenfärbung der Chromosomen erfolgte mit 20 µl DAPI-Lösung (Tabelle 2.3.21). Die Objektträger wurden eingedeckt und 4 °C lichtgeschützt gelagert.

2.3.7 Digitale Auswertung

Die hybridisierten und fluoreszenzgefärbten Metaphasen Target Slides wurden mittels einer an das Mikroskop angeschlossenen CCD-Kamera bei 880x Vergrößerung ausgewertet. Es erfolgte die Anfertigung von je 3 monochromen Bildern mit 8bit-Farbtiefe. Die frequenzspezifische Spektralanregung der Fluoreszenzfarbstoffe führte zur Darstellung eines Dreifarbenprofils entlang der Chromosomenachse (Piper et al. 1995). Die Fluoreszenzfärbungen wurden entsprechend der Hintergrundfluoreszenz korrigiert und mit Hilfe der digitalen Bildauswertungssoftware ISIS der Firma Metasystems quantifiziert. Die dargestellten Zugewinne und Verluste sowie deren spezifischen Intensitätswerte wurden entlang der Längsachse der Chromatiden eines homologen Chromosomenpaares zu einem Intensitätsprofil integriert. Für jedes Chromosom der Metaphase konnte die Intensität von grüner zu roter Fluoreszenz in einem Ratioprofil berechnet werden. Diese wurden gemittelt und ein Schwellenwert für Verluste und Zugewinne festgelegt. Die Nulllinie eines Mittelprofils entspricht einem Verhältnis von 1:1 der grünen und roten Fluoreszenzintensität und wurde auf einen durchschnittlichen Ratioprofilwert von 1,0 eingestellt. Die Mittelung mehrerer Metaphasenprofile erlaubt eine vergleichende Analyse mehrerer Proben und ermöglicht es die Qualität der Auswertung zu verbessern, da so experimentell bedingte und unspezifische Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten heraus gemittelt werden können (Kallioniemi OP et al. 1994). Die gemittelten Ratioprofile wurden graphisch neben dem entsprechenden Chromosom dargestellt, so dass Veränderungen des Verhältnisses von roter und grüner Fluoreszenzintensität einem Abschnitt auf dem Chromosom zugeordnet werden konnten. Die Schwellenwerte für Zugewinne lagen bei einem Verhältnis von 1,15 bis 1,25 und für Verluste entsprechend bei 0,75 bis 0,85. Ab einem Ratiowert von 1,5 wurde von einer Amplifikation gesprochen. Im Einzelfall wurden Aberrationen als Zugewinne oder Verluste definiert, wenn diese Grenzen nicht erreicht wurden, aber ein eindeutiger Trend vorhanden war. Zugewinne wurden von der Software neben der schematisierten Darstellung des Chromosoms, dem Ideogramm, grün dargestellt. Verluste wurden rot markiert. Nicht bewertet wurden chromosomale Aberrationen im Bereich von Telomeren und Zentromeren,

im Bereich von heterochromatinreichen Regionen und im Bereich der p-Arme der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21 und 22). Aberrationen in den Bereichen 1p32pter, 16p, 19 und 22 wurden mit Vorsicht bewertet, da bei Kontrollexperimenten mit normaler Biotin- und DIG-markierter DNS in diesen Bereichen falsch positive Aberrationen beschrieben worden sind (Kallioniemi OP et al. 1994; Kirchhoff et al. 1998). Heterochromatinreiche Abschnitte und chromosomale Aberrationen, der X- und Y-Chromosomen wurden ebenfalls von der Bewertung ausgeschlossen (Abbildung 2.3.3, S. 36.).

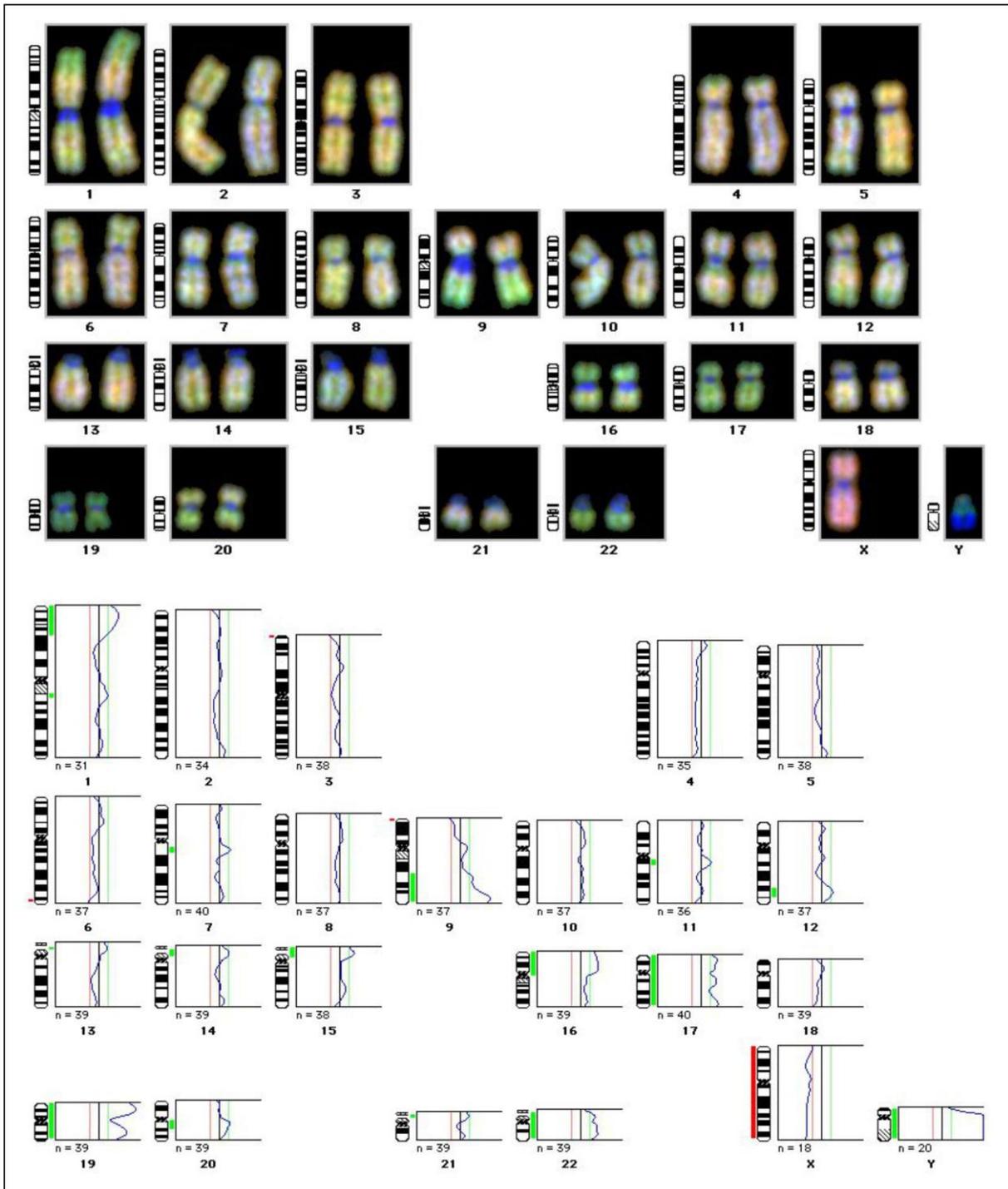


Abbildung 2.3.3: Darstellung einer CGH-Untersuchung (Patient Nr. 16) – Zugewinne sind grün dargestellt, Verluste sind rot markiert. Verluste an X- und Vermehrungen an Y-Chromosomen sind technisch bedingt.

2.4 Statistische Auswertung

Aufgrund der seltenen Erkrankung und geringen Fallzahl wurden die analysierten Daten deskriptiv dargestellt. Statistische Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Programms GraphPadPrism 5 (GraphPadSoftware Inc. USA). Es wurde eine unverbundene Normalverteilung der Ergebnisse angenommen, so dass die Berechnung statistischer Signifikanzen mit Hilfe des Student's t-Test durchgeführt wurde. Diese Ergebnisse sollten jedoch vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl immer in Korrelation zum klinischen Verlauf des Patienten betrachtet werden. Die Darstellung von Überlebenskurven erfolgte nach der Kaplan-Meier Methode. Tests zur Signifikanzprüfung konnten aufgrund der geringen Patientenzahl und der unterschiedlichen histologischen Entitäten eigentlich nicht sinnvoll durchgeführt werden, so dass die meisten Ergebnisse nur beschreibend angegeben werden können.

3 Ergebnisse

3.1 Klinik und Pathologie der Raumforderungen der Pinealisregion

3.1.1 Untersuchte histologische Entitäten

Es wurden insgesamt 19 Tumoren von 19 Patienten untersucht. Darunter waren zwei zystische Tumoren, ein Plexuspapillom, zwei pilozytische Astrozytome, zwei Pineozytome WHO °II, vier Pineoblastome WHO °IV, vier Germinome, zwei Teratome, ein solitär-fibröser Tumor sowie ein neuroendokriner Tumor der PR (Tabelle 3.1.1).

3.1.2 Geschlechter und Altersverteilung

Das Kollektiv umfasst 16 (84,2 %) männliche und 3 (15,8 %) weibliche Patienten (Abbildung 3.1.1A). Der Altersmittelwert bei Diagnosestellung (Operationszeitpunkt) lag bei Männern um $21,8 \pm 3,7$ Jahre (in einer Altersspanne von 0 bis maximal 47 Jahren) und bei Frauen um $44,7 \pm 12,4$ Jahre (in einem Intervall von 24 bis 67 Jahren) (Abbildung 3.1.1B). Vergleicht man die Mediane für das Alter beider Geschlechter, so ergibt sich für Männer mit 22 Jahren ein signifikant früheres Erkrankungsalter bei Diagnosestellung gegenüber Frauen mit 43 Jahren ($p \leq 0,05$).

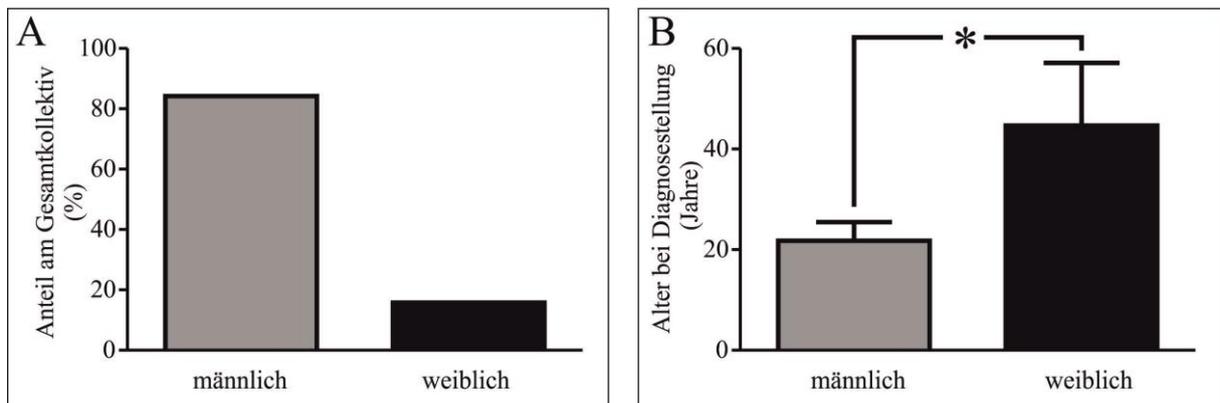


Abbildung 3.1.1: Geschlechterverteilung (%) und Alter (in Jahren) bei der Diagnosestellung von 19 Raumforderungen der PR (* = $p \leq 0,05$).

3.1.3 Klinische Symptomatik

Unspezifische klinische Symptome erschweren die frühzeitige Diagnose einer Raumforderung der PR. Am häufigsten zeigten die untersuchten Patienten mit 58% Kopfschmerzen sowie in 42% der Fälle Schwindel, Übelkeit und Erbrechen. Daneben fanden

sich aber auch Visus- und Gleichgewichtsstörungen sowie weitere Symptome, die zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Patienten führten. Zwölf der 19 untersuchten Patienten zeigten eine Kombination von zwei und mehr Symptomen (Abbildung 3.1.2). Als Ursache für die klinische Symptomatik zeigte sich bei dreizehn der in dieser Arbeit untersuchten Patienten eine beginnende obstruktive Liquorzirkulationsstörung. Die Behandlung oder Prävention eines beginnenden obstruktiven Hydrozephalus erfolgte bei diesen Patienten bereits vor der operativen Therapie durch Anlage eines ventrikulo-peritonealen Shunts oder Rickham-Reservoirs.

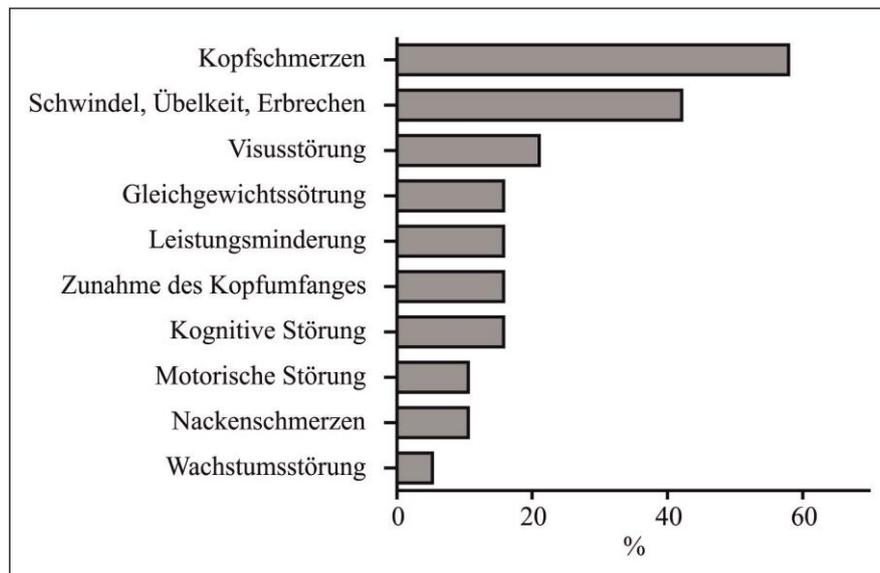


Abbildung 3.1.2: Klinische Symptomatik von Raumforderungen der PR.

3.1.4 Follow-Up und Gesamtüberleben

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, bei allen Patienten ein erfolgreiches Follow-Up über einen Zeitraum von bis zu maximal 168 Monaten zu erheben (Tabelle 3.1.1). Im Mittel lag das Follow-Up bei $102,7 \pm 10,4$ Monaten. 84,2% der in die Auswertung eingeflossenen Tumoren rezidierten nach initialer Operation nicht. 15,8% der Raumforderungen traten jedoch nach erfolgter Operation erneut auf oder zeigten einen Progress zu einer hochmalignen Form. Patienten, die an einem Tumorrezidiv erkrankten, zeigten eine reduzierte Gesamtüberlebenszeit von im Median 96 Monaten gegenüber Patienten, die kein erneutes Auftreten der Tumorerkrankung erlebten. Bei Rezidivfreiheit lag die Gesamtüberlebenszeit im Median sogar bei 120 Monaten (Abbildung 3.1.3A). Der mediane postoperative Karnofsky-Index (KI) betrug im Gesamtkollektiv 90% und unterschied sich

nicht vom KI der Patienten, die rezidivfrei blieben. Patienten, die an einem Rezidiv erkrankten, zeigten mit 60% einen deutlich reduzierten KI (Abbildung 3.1.3B).

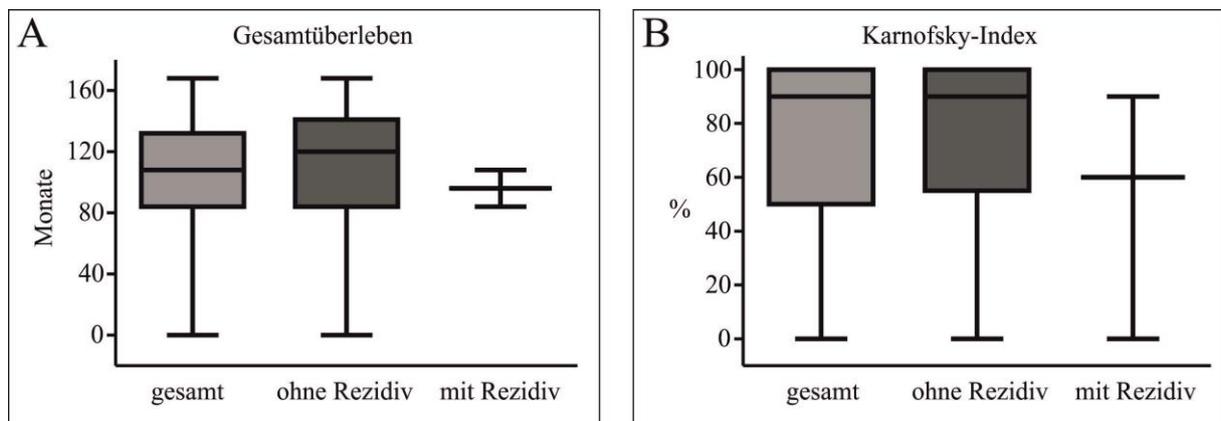


Abbildung 3.1.3: Gesamtüberleben (A) und Karnofsky-Index (B) von 19 Patienten mit einer Raumforderung der PR.

Tabelle 3.1.1: Klinische Charakteristika von 19 Patienten mit Tumoren der PR unterschiedlicher Histologie.

Pineal-parenchymale Tumoren der PR							
Nr.	Sex*	Alter (Jahre)	Histologie	Follow-Up (Monate)	Rezidiv nach (Monaten)	Status	KI** (%)
1	m	48	Pinealiszyste	144	-	lebt	100
2	m	33	Pineozytom WHO °II	132	-	lebt	100
3	w	31	Pineozytom WHO °II	84	-	lebt	90
4	m	25	Pineoblastom WHO °IV	156	-	lebt	100
5	w	55	Pineoblastom WHO °IV	34	-	verstorben / Tumor-komplikation	0
6	w	67	Pineoblastom WHO °IV	84	83,75	verstorben / Tumor- oder OP-Komplikation	0
7	m	2	Pineoblastom WHO °IV	0	-	verstorben / Tumor- oder OP-Komplikation	0

Keimzelltumoren der PR							
Nr.	Sex*	Alter (Jahre)	Histologie	Follow-Up (Monate)	Rezidiv nach (Monaten)	Status	KI** (%)
8	m	40	Epidermoidzyste	108	72	lebt	90
9	m	19	Germinom	120	-	lebt	100
10	m	28	Germinom	84	-	lebt	70
11	m	45	Germinom	168	-	lebt	100
12	m	35	Germinom	156	-	lebt	80
13	m	21	Teratom	120	-	lebt	100
14	m	13	Teratom	96	-	lebt	50
Heterogene Tumoren der PR							
Nr.	Sex*	Alter (Jahre)	Histologie	Follow-Up (Monate)	Rezidiv nach (Monaten)	Status	KI** (%)
15	m	11	Plexuspapillom	132	-	lebt	100
16	m	41	Pilozytisches Astrozytom WHO °I	120	-	lebt	100
17	m	55	Pilozytisches Astrozytom WHO °I	96	10	lebt	60
18	m	43	Solid-fibröser Tumor mit spinaler Metastase TH 12	96	-	lebt	90
19	m	41	Neuroendokriner Tumor	22	-	verstorben / Tumor-komplikation	0

* m = männlich; w = weiblich

** KI = Karnofsky-Index

Bei allen Patienten konnten zum Endzeitpunkt der Datenerhebung Angaben bzgl. des Überlebens erhoben werden (Tabelle 3.1.1). Die folgende Kaplan-Meier-Kurve zeigt unabhängig vom histologischen Tumorgrad eine Übersicht über das Gesamtüberleben aller Patienten. Vier der 19 Patienten verstarben innerhalb von 34 Monaten nach dem Auftreten oder rezidivierenden Progress des Tumors der PR. Bei zwei Patienten trat der Tod innerhalb von einer Woche postoperativ ein, so dass eine mögliche operative Komplikation als Todesursache nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Die Überlebensendpunktswahrscheinlichkeit betrug zum Endpunkt der Datenerhebung im Gesamtkollektiv 79%, im Kollektiv der Rezidivpatienten 67% (Abbildung 3.1.4).

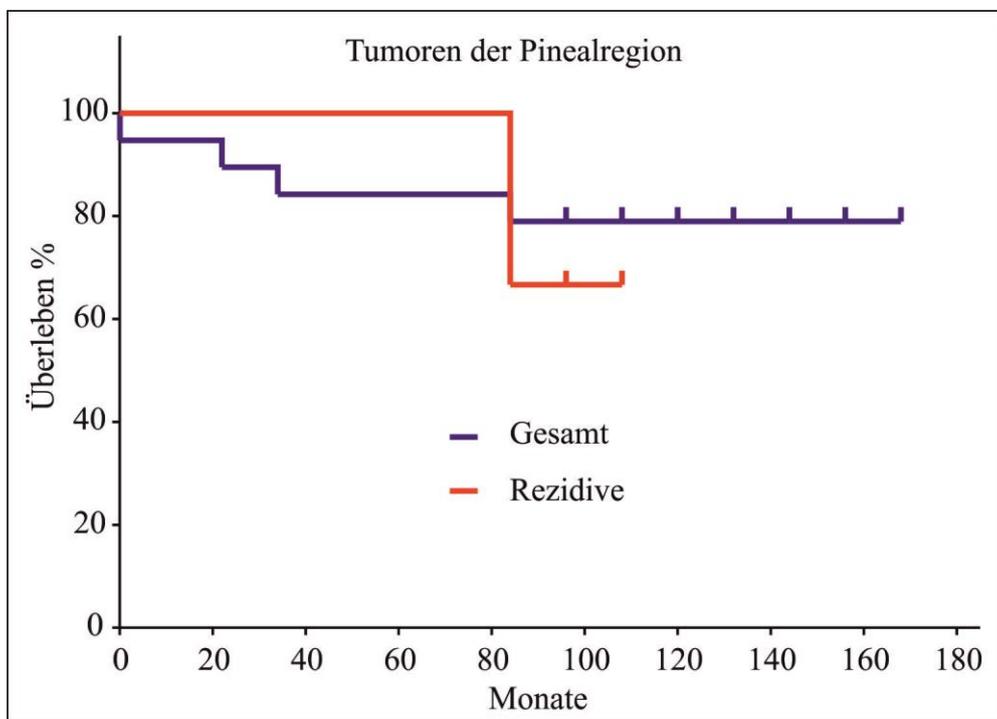


Abbildung 3.1.4: Kaplan-Meier-Analyse des Rezidiv- und Gesamtüberlebens von 19 Patienten, die an einem Tumor der PR erkrankten.

3.2 Therapie der Primärtumoren der Pinealisregion

Alle Tumoren wurden primär chirurgisch therapiert. Die operative Behandlung der untersuchten Patienten erfolgte über einen Zeitraum von mehr als 10 Jahren. Fortschritte und Innovationen der mikrochirurgischen Therapie haben in dieser Zeit zu einer Verbesserung der operativen Behandlung geführt. Eine intrazerebrale Tumorresektion kann jedoch nicht mit ausreichendem Sicherheitsabstand durchgeführt werden, ohne essentielle neuronale Strukturen zu verletzen. Daher erfolgte bei einigen Patienten postoperativ eine adjuvante Therapie.

3.2.1 Adjuvante Radiotherapie

Neun der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten erhielten eine adjuvante Strahlentherapie (Tabelle 3.2.1). Eine adjuvante Bestrahlung pilozytischer Astrozytome WHO °I ist im Allgemeinen nicht erforderlich. Bei dem Patienten Nr. 17 kam es zu einem frühen Rezidiv des Tumors, so dass man sich zur Radiotherapie entschloss. Patient Nr. 2 erkrankte an einem Pineozytom WHO °II. Der Tumor konnte nur um 40% operativ reduziert werden und zeigte dezent vermehrte Mitosen, so dass auch hier die Indikation zur adjuvanten Strahlentherapie gestellt wurde. Eine adjuvante Nachbehandlung von Patienten, die an einem malignen Pineoblastom WHO °IV erkranken, ist erforderlich. Aufgrund der Schwere dieser Erkrankung verstarben die Patienten Nr. 5, 6 und 7, ohne dass eine adjuvante Therapie durchgeführt werden konnte. Dies war nur bei Patient Nr. 4 möglich. Zudem erfolgte eine Strahlentherapie bei allen Germinompatienten, einem neuroendokrinen Karzinom sowie einem solid-fibrösen Tumor mit spinaler Metastase in Höhe des Thorakalwirbels (TH) 12. Therapeutisch erfolgten bei den bestrahlten Patienten Ganzhirnbestrahlungen mit Boosterung von 40 + 10 Gy, fraktionierte Bestrahlungen bis 35,2 Gy und Aufsättigungen der Tumorregion bis 55 Gy. Im Fall des Patienten Nr. 4 fand eine stereotaktische Radio-Jod-125-Seed-Behandlung mit 55 Gy über 90 Tage statt. Nicht bestrahlt wurden Teratome (Patienten Nr. 13 und 14). Einheitlich therapiert wurden Germinome der PR. Hier erfolgten die Bestrahlungen mit 24 Gy im Bereich des Cerebrums und der neuronalen Achse sowie eine Boosterung des Tumorbettes mit 40 Gy.

Tabelle 3.2.1: Adjuvante Radiotherapie von neun Tumoren der PR

Pineal-parenchymale Tumoren der PR				
Nr.	Sex*	Alter	Histologie	Adjuvante Radiatio
2	m	33	Pineozytom WHO °II	Cerebrum 32,5 Gy Tumorboost 18 Gy
4	m	25	Pineoblastom WHO °IV	Stereotaktisch Radio-Jod-125-Seed 55Gy
Keimzelltumoren der PR				
Nr.	Sex*	Alter	Histologie	Adjuvante Radiatio
9	m	19	Germinom	Neuronale Achse und Cerebrum 24 Gy, Tumorboost 40 Gy
10	m	28	Germinom	Neuronale Achse und Cerebrum 24 Gy, Tumorboost 40 Gy
11	m	45	Germinom	Neuronale Achse und Cerebrum 24 Gy, Tumorboost 40 Gy
12	m	35	Germinom	Neuronale Achse und Cerebrum 24 Gy, Tumorboost 40 Gy
Heterogene Tumoren der PR				
Nr.	Sex*	Alter	Histologie	Adjuvante Radiatio
17	m	55	Pilozytisches Astrozytom WHO °I	Cerebrum 40Gy Tumorboost 10Gy
18	m	43	Solid-fibröser Tumor mit spinaler Metastase TH 12	Neuronale Achse 35,2 Gy, Tumorboost 55Gy
19	m	41	Neuroendokriner Tumor	Cerebrum 40Gy, Tumorboost 10Gy

* m = männlich

3.2.2 Adjuvante Chemotherapie

Eine Chemotherapie wurde bei den Patienten Nr. 4, 17, 18 und 19 durchgeführt und erfolgte in Kombination mit einer Radiatio (Tabelle 3.2.2). Therapiert wurden das frühe Rezidiv des pilozytischen Astrozytoms WHO °I des Patienten Nr. 17, ebenso wie das maligne Pineoblastom WHO °IV des Patienten Nr. 4. Germinome hingegen zeigen sich gut strahlensensibel, so dass diese Form der Therapie bereits zu einer Tumorreduktion führen

kann. Eine ergänzende adjuvante Chemotherapie der Patienten 9, 10, 11 und 12 wurde daher nicht durchgeführt. Aufgrund der nur dezent vermehrten mitotischen Aktivität des Pineozytoms WHO °II des Patienten Nr. 2 wurde auf eine adjuvante Chemotherapie in Ergänzung zu der Bestrahlung verzichtet. Demgegenüber ist das Wachstums- und Metastasierungsverhalten von neuroendokrinen und solid-fibrösen Tumoren der PR nicht abschließend verstanden, so dass eine maligne Transformation nicht ausgeschlossen werden kann (Pizem et al. 2004; Grozinsky-Glasberg et al. 2010). Die adjuvante Radiotherapie wurde bei beiden Tumoren durch eine Chemotherapie ergänzt.

Tabelle 3.2.2: Adjuvante Chemotherapie von vier Tumoren der PR

Nr.	Sex	Alter	Histologie	Adjuvante Chemotherapie
4	m	25	Pineoblastom WHO °IV	Vincristin, CCNU, Cisplatin
17	m	55	Pilozytisches Astrozytom WHO °I	Temozolomid (1-5/28) ACNU + Chloroquin
18	m	43	Solid-fibröser Tumor mit spinaler Metastase TH 12	Vincristin, CCNU, Cisplatin
19	m	41	Neuroendokriner Tumor	Topotecan

* m = männlich

Es fand sich kein signifikanter Einfluss unterschiedlicher adjuvanter Therapieschemata auf die postoperative Gesamtüberlebensdauer. Im Median betrug diese bei Patienten, die eine Radiotherapie erhielten, 120 Monate. Eine kombinierte Radio-/ Chemotherapie führte zu einer reduzierten Gesamtüberlebensdauer von 96 Monaten (Abbildung 3.2.1A). Patienten, die mit einer kombinierten Radio-/ Chemotherapie behandelt wurden, zeigten zudem im Median einen mit 75% reduzierten KI im Vergleich zum Gesamtkollektiv. Dieser Unterschied war nicht signifikant, aber hinweisend auf eine stärkere Belastung der Patienten durch die kombinierte Radio-/ Chemotherapie im Gegensatz zur exklusiven Radiotherapie. Hier betrug der KI 90% und unterschied sich nicht vom KI des Gesamtkollektivs (Abbildung 3.2.1B).

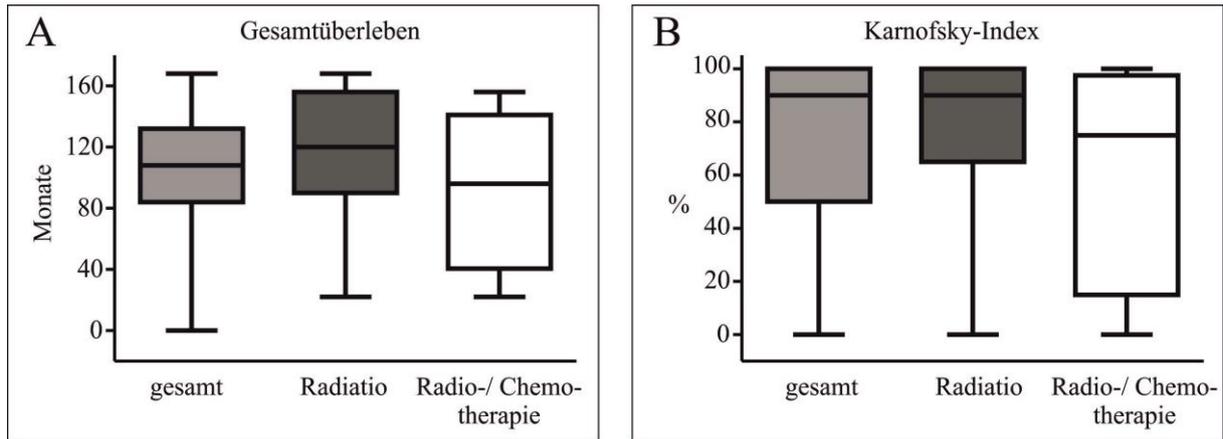


Abbildung 3.2.1: Gesamtüberleben (A) und Karnofsky-Index (B) von Patienten mit einer Raumforderung der PR unter adjuvanter Therapie

Die folgende Kaplan-Meier-Kurve gibt eine Übersicht über das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit von der adjuvanten Therapie (Abbildung 3.2.2). Die Überlebensendpunktwahrscheinlichkeit betrug zum Endpunkt der Datenerhebung im Gesamtkollektiv 79%. Im Kollektiv der Patienten, die eine Radiatio erhalten hatten, konnte diese mit 89% angegeben werden. Patienten mit kombinierter Radio-/ Chemotherapie erreichten einen Endpunkt der Überlebenswahrscheinlichkeit von 75%.

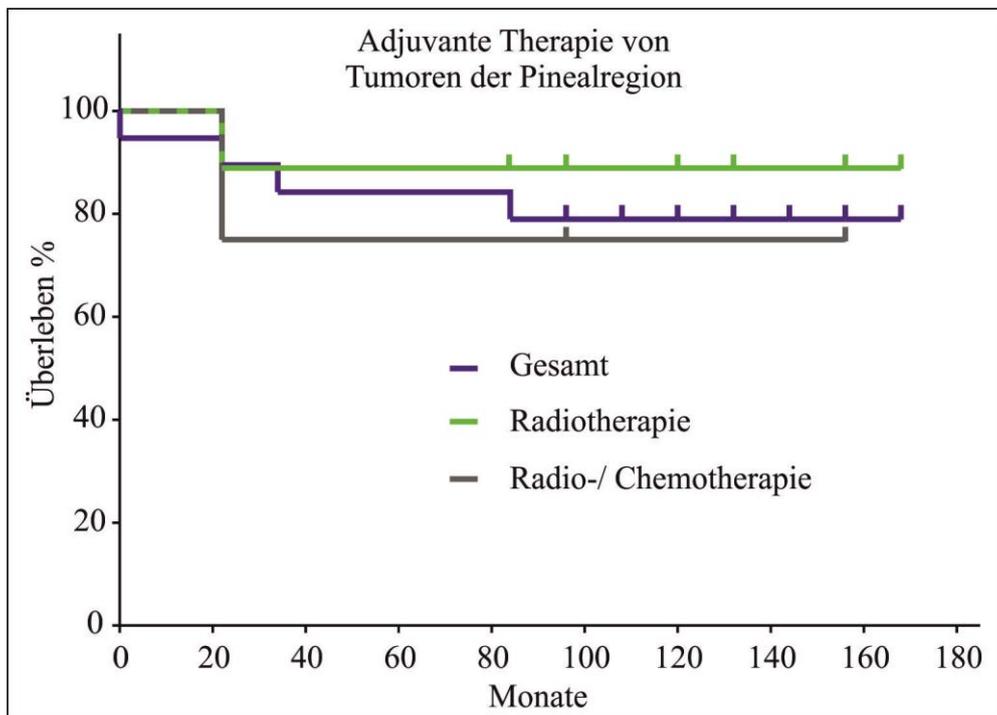


Abbildung 3.2.2: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens bei adjuvanter Therapie von Tumoren der PR.

3.3 Therapie von Rezidivtumoren der Pinealisregion

Rezidive von Raumforderungen der PR konnten bei drei Patienten in dem untersuchten Kollektiv beobachtet werden. Die Rezidivtumoren wurden erneut operativ behandelt (Tabelle 3.3.1). Eine adjuvante Therapie war nicht vorausgegangen. Die Zweitoperation hatte bei allen Patienten eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität zur Folge. Patient Nr. 17 erlitt bereits 10 Monate nach der Erstoperation ein Rezidiv des pilozytischen Astrozytoms WHO °I. Es folgte nach erneuter operativer Therapie eine Radiatio und Chemotherapie mit Temozolomid (1 Zyklus: 1-5/28). Ergänzt wurde die Therapie mit ACNU und Chloroquin. Aktuell ist es zu keinem Fortschreiten der Erkrankung gekommen. Es kam jedoch zu einem Abfall des KI um 40%. Bei den Patienten Nr. 8 und 6 kam es nach sechs und sieben Jahren zu einem erneuten Auftreten der Tumorerkrankung. Die Therapie des Rezidivs der Epidermoidzyste von Patient Nr. 8 erfolgte aufgrund der benignen Erkrankung nur chirurgisch. Die operative Intervention führte jedoch zu einem Abfall des KI um 10%. Eine weitere adjuvante Therapie schloss sich nicht an. Bei Patient Nr. 6 kam es zu einem Auftreten eines Pineoblastoms WHO °IV. Darunter verschlechterte sich der klinische Allgemeinzustand so stark, dass der Patient kurz nach der Operation verstarb. Eine Radio-/Chemotherapie konnte nicht mehr durchgeführt werden.

Tabelle 3.3.1: Rezidive von drei Tumoren der PR

Nr.	Alter	Sex*	Histologie	Rezidiv nach
6	67	w	Pineoblastom WHO °IV	83,75 Monaten
8	40	m	Epidermoidzyste	72 Monaten
17	55	m	Pilozytisches Astrozytom WHO °I	10 Monaten

* m = männlich; w = weiblich

3.4 Molekularzytogenetische Veränderungen pineal-parenchymaler Tumoren

Tabelle 3.4.1: CGH-Analyse von Patienten mit pineal-parenchymalen Tumoren der PR (+ = Zugewinne; - = Verluste).

Pineal-parenchymale Tumoren der PR					
Nr.	Histologie	Anzahl der Netto-aberrationen	Zugewinne	Verluste	Chromosomale Aberrationen
1	Pinealiszyste	3	3	0	+16p
2	Pineozytom WHO °II	17	13	4	+1p, +7p, +7q, +9p, +9q, +11q, +12p, +12q, +15q, +16p, +18p, +20q, +21q // -10p, -10q, -13q, -14q
3	Pineozytom WHO °II	0	0	0	-
4	Pineoblastom WHO °IV	6	4	2	+12p, +12q, +17p, +17q, // -20p, -20q
5	Pineoblastom WHO °IV	4	4	0	+8p, +8q, +20p, +20q
6	Pineoblastom WHO °IV	7	6	1	+1p, +9q, +12q, +16p, +17p, +17q // -13q
7	Pineoblastom WHO °IV	7	5	2	+8q, +9p, +16p, +19p, +22q // -5q, -10q

3.4.1 Pinealiszyste

CGH-Analysen pineal-parenchymaler Zysten sind nach aktuellen Informationen nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals ein Zugewinn am Chromosom 16p nachgewiesen werden (Patient Nr. 1, Tabelle 3.4.1).

3.4.2 Pineozytom

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei Patienten untersucht werden, die an einem Pineozytom WHO °II erkrankten. Nur der Patient Nr. 2 zeigte chromosomale Veränderungen in der CGH-Analyse (Tabelle 3.4.1). Es fanden sich Zugewinne der Chromosomen 1p, 7p, 7q, 9p, 9q, 11q, 12p, 12q, 15q, 16p, 18p, 20q und 21q sowie Verluste der Chromosomen 10p, 10q, 13q und 14q.

3.4.3 Pineoblastom

In der CGH-Analyse, der vier an einem Pineoblastom WHO °IV erkrankten Patienten, zeigten sich vermehrt chromosomale Zugewinne. Verluste konnten signifikant weniger nachgewiesen werden ($p \leq 0,05$). Im Durchschnitt kam es bei den Patienten zu 6,5 chromosomalen Veränderungen. Häufige genetische Zugewinne zeigten die Chromosomen 8q, 12q, 16p, 17p und 17q. Genetische Verluste der Chromosomen 5q, 10q, 13q und 20p, 20q waren nur bei 25% der Patienten zu finden (Abbildung 3.4.1).

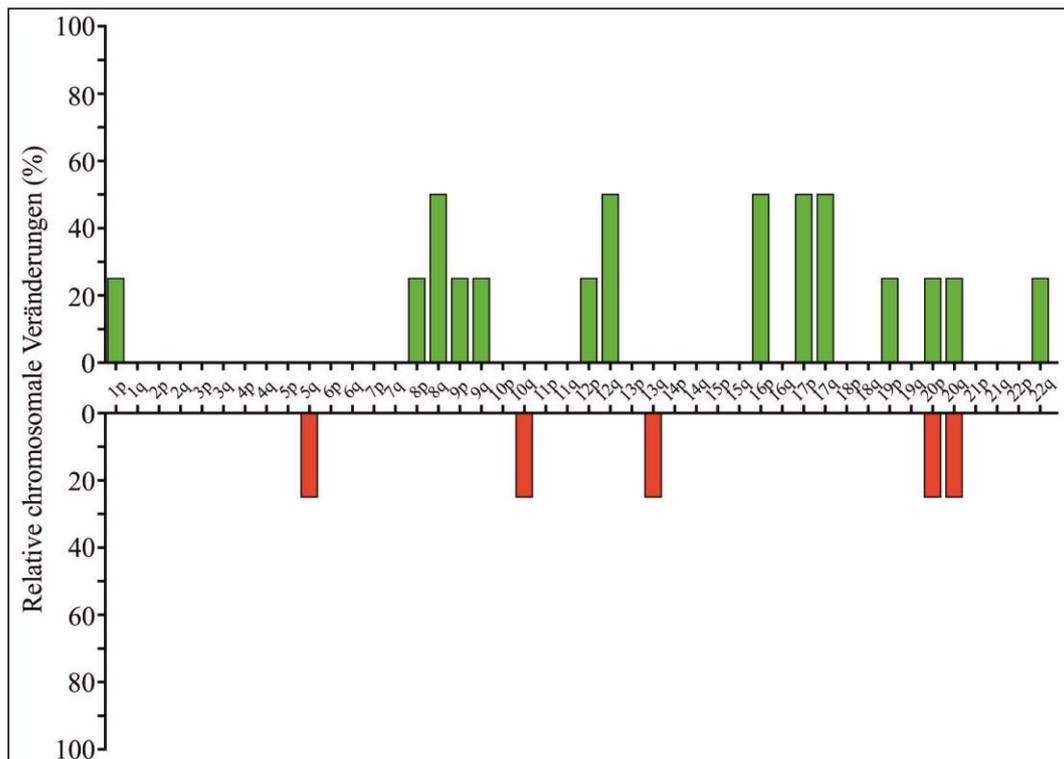


Abbildung 3.4.1: Darstellung chromosomaler Zugewinne (grün) und Verluste (rot) von vier Pineoblastomen WHO °IV der PR.

3.5 Molekularzytogenetische Veränderungen pinealer Keimzelltumoren

Tabelle 3.5.1: CGH-Analyse von Patienten mit pinealen Keimzelltumoren der PR (+ = Zugewinne; - = Verluste)

Keimzelltumoren der PR					
Nr.	Histologie	Anzahl der Netto-aberrationen	Zugewinne	Verluste	Chromosomale Aberrationen
8	Epidermoidzyste	0	0	0	-
9	Germinom	11	8	3	+1p, +9q, +12q, +16p, +17p, +17q, +20q, +22q // -3p, -7q, -9q
10	Germinom	5	2	3	+1q, +17q, // -9p, -13q, -15q
11	Germinom	8	6	2	+7p, +7q, +12q, +16p, +21q, +22q // -4p, -13p
12	Germinom	25	11	14	+1q, +7p, +7q, +10p, +12p, +12q, +14q, +17q, +19p, +20q, +21q, // -1p, -3p, -3q, -4p, -4q, -5p, -5q, -6p, -6q, -9p, -11p, -11q, -13q, -18q
14	Teratom	15	13	2	+1p, +1q, +7q, +8p, +8q, +9q, +11q, +12q, +16p, +17p, +17q, +20q, +22q // -9p, -13q

3.5.1 Epidermoidzyste

Die CGH-Untersuchung der Epidermoidzyste des Patienten Nr. 8 ergab keine chromosomalen Veränderungen (Tabelle 3.5.1).

3.5.2 Germinom

In unserem Kollektiv erkrankten vier Patienten (Nr. 9, 10, 11, 12) an einem Germinom der PR. Im Durchschnitt kam es bei den Patienten zu 12,3 chromosomalen Veränderungen. In der CGH-Analyse zeigten sich vermehrt chromosomale Zugewinne. Diese waren jedoch nicht signifikant. Häufige genetische Zugewinne zeigten mit 75% die Chromosomen 12q, und 17q. Häufige genetische Verluste zeigten sich an den Chromosomen 3p, 4p, sowie 9p und 13q (Abbildung 3.5.1).

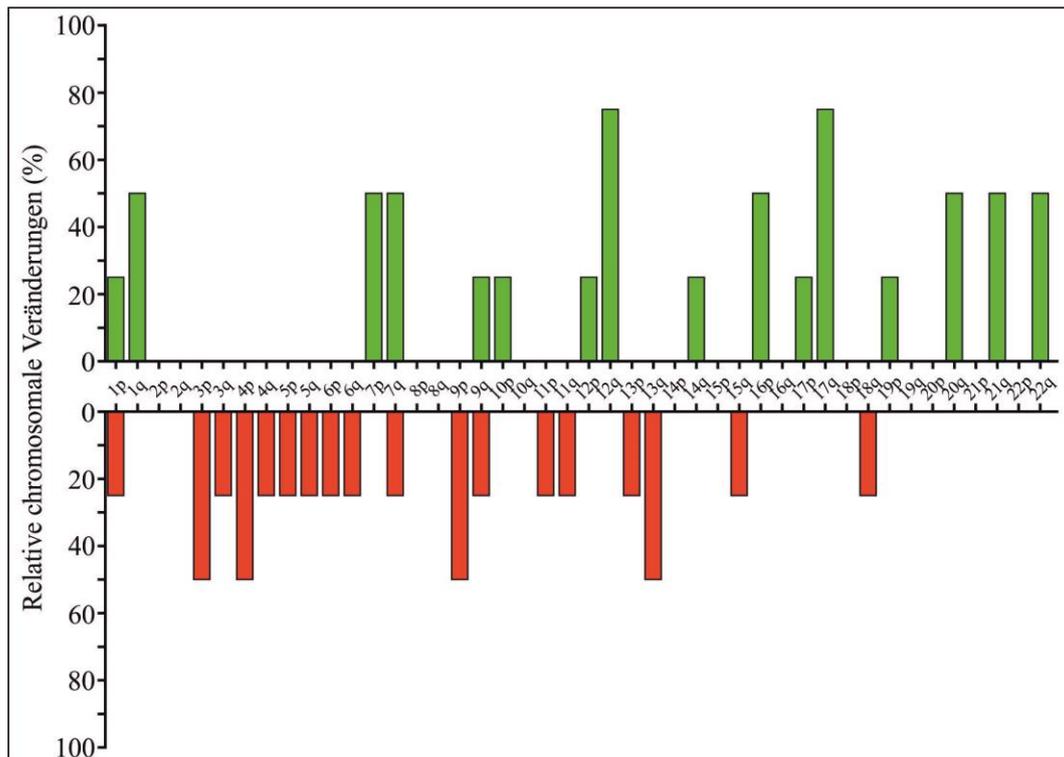


Abbildung 3.5.1: Darstellung chromosomaler Zugewinne (grün) und Verluste (rot) von vier Germinomen der PR.

3.5.3 Teratom

In unserem Kollektiv erkrankten zwei Patienten (Nr. 13 und 14) an einem Teratom der PR. Die CGH-Analyse eines Patienten war aufgrund geringen Materials nicht aussagekräftig, so dass durch die niedrigen Fallzahlen die Untersuchungen nur beschreibend anzugeben sind (Tabelle 3.5.1). Es zeigte sich ein deutliches Überwiegen der chromosomalen Zugewinne mit 13 Nettoveränderungen (1p, 1q, 7q, 8p, 8q, 9q, 11q, 12q, 16p, 17p, 17q, 20q, 22q) gegenüber zwei Verlusten an den Chromosomen 9p und 13q.

3.6 Molekularzytogenetische Veränderungen heterogener Raumforderungen der Pinealisregion

Tabelle 3.6.1: CGH-Analyse von Patienten mit heterogenen Raumforderungen der PR (+ = Zugewinne; - = Verluste)

Heterogene Tumoren der PR					
Nr.	Histologie	Anzahl der Netto-aberrationen	Zugewinne	Verluste	Chromosomale Aberrationen
15	Plexuspapillom	8	8	0	+7p, +7q, +12p, +12q, +14q, +15q, +19p, +21q
16	Pilozytisches Astrozytom WHO °I	11	11	0	+1p, +1q, +7q, +9q, +11q, +12q, +16p, +17p, +17q, +20q, +22q
17	Pilozytisches Astrozytom WHO °I	6	4	2	+7q, +16p, +17p, +17q, // -8q, -9p
18	Solid-fibröser Tumor mit spinaler Metastase TH 12	8	7	1	+7p, +7q, +9q, +16p, +17p, +17q, +22q // -13q
19	Neuroendokriner Tumor	25	12	13	+5p, +5q, +7p, +7q, +8p, +8q, +9p, +9q, +12p, +12q, +21q, +22q // -1p, -1q, -2p, -2q, -10p, -10q, -13q, -14q, -15q, -18p, -18q, -20p, -20q

3.6.1 Plexuspapillom

Die CGH-Analyse eines Plexuspapilloms von Patient Nr. 15 zeigte ausschließlich chromosomale Zugewinne. Neben Zugewinnen der Chromosomen 7, 12, 15 und 19 (Bhattacharjee et al. 1997; Grill et al. 2002) konnten Zugewinne der Chromosomen 14q und 21q beschrieben werden. Verluste konnten bei dem untersuchten Plexuspapillom nicht nachgewiesen werden.

3.6.2 Pilozytisches Astrozytom

In der CGH-Analyse des Primärtumors überwogen die chromosomalen Zugewinne (Abbildung 3.6.1). Im Durchschnitt kam es bei den Patienten zu 8,5 chromosomalen Veränderungen. Häufige genetische Zugewinne (100%) zeigten die Chromosomen 7q, 16p, 17p, 17q. Die Chromosomen 8q und 9p zeigten die häufigsten Verluste.

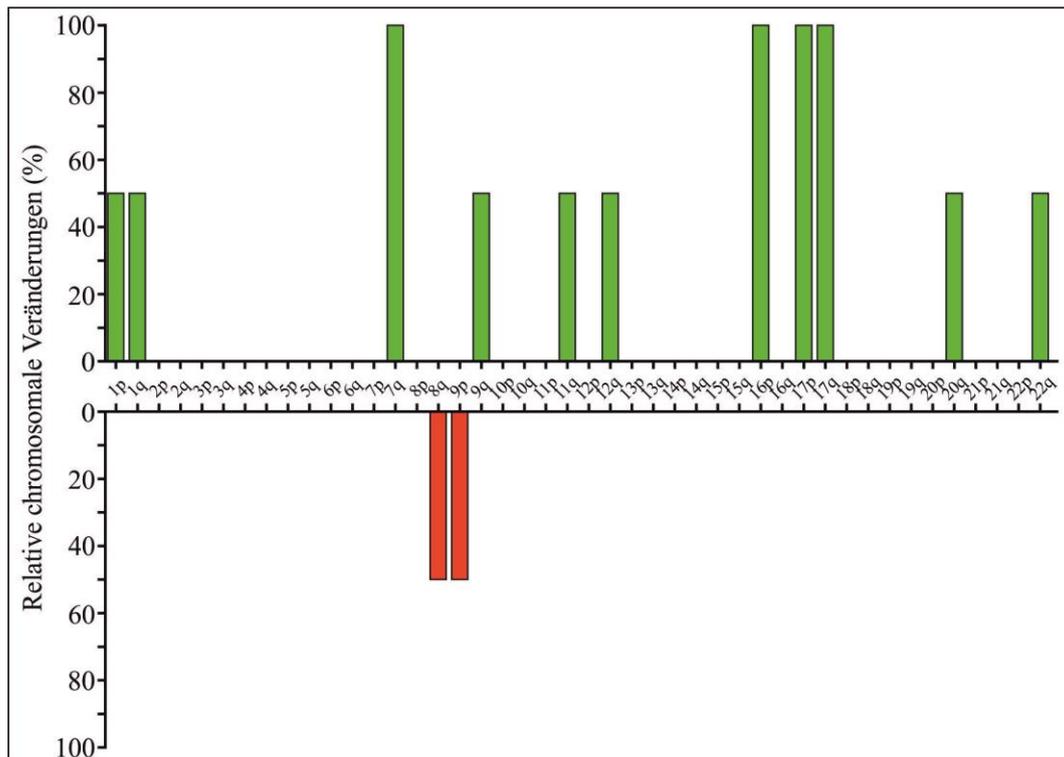


Abbildung 3.6.1: Darstellung chromosomaler Zugewinne (grün) und Verluste (rot) von zwei pilozytischen Astrozytomen WHO °I der PR.

3.6.3 Solid-fibröser Tumor

Der in dieser Arbeit untersuchte solid-fibröse Tumor der PR zeigte Zugewinne der Chromosomen 7p, 7q, 9q, 16p, 17p, 17q, 22q und Verluste am Chromosom 13q (Tabelle 3.6.1).

3.6.4 Neuroendokriner Tumor

In dem untersuchten Kollektiv erkrankte ein Patient an einem neuroendokrinen Tumor der PR. Die CGH-Analyse zeigte Zugewinne der Chromosomen 5p, 5q, 7p, 7q, 8p, 8q, 9p, 9q, 12p, 12q, 21q, 22q sowie Verluste der Chromosomen 1p, 1q, 2p, 2q, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 18p, 18q, 20p, 20q (Tabelle 3.6.1).

3.7 Ergebnisse der komparativen genomischen Hybridisierung

Von insgesamt 19 untersuchten Patienten konnten 18 CGH-Analysen aus dem Primärtumor ausgewertet werden. Bei einem Tumor (Patient Nr. 14, Teratom) gelang die CGH aufgrund von zu geringer DNS-Menge nicht. Aufgrund der geringen Fallzahl wurden keine statistischen Berechnungen auf Zusammenhänge chromosomaler Veränderungen und Überlebenszeiten durchgeführt. Im Durchschnitt ergaben sich pro Fall im Gesamtkollektiv 9 Nettochromosomenveränderungen (Abbildung 3.7.1). Die mittlere Anzahl von Zugewinnen entsprach dabei 6,4 und war signifikant höher als die Verluste mit einer mittleren Anzahl von 2,7 ($p \leq 0,05$).

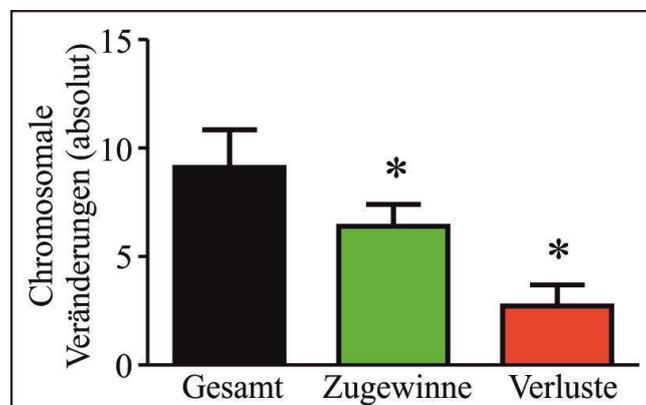


Abbildung 3.7.1: Absolute chromosomale Veränderungen von 18 Tumoren der PR (* = $p \leq 0,05$).

Am häufigsten finden sich im Kollektiv Zugewinne an den Chromosomen 7q, 9q, 12q, 16p, 17p, 17q und 22q sowie Verluste am Chromosom 13q (Abbildung 3.7.2). Molekularzytogenetisch überwiegen bei den primär pineal-parenchymalen Tumoren Zugewinne an den Chromosomen 12q und 16p. Zugewinne an den Chromosomen 17p und 17q sind im Vergleich mit den Keimzelltumoren der PR nicht so häufig zu beobachten. Diese zeigen neben den Zugewinnen der Chromosomen 12q, 16p und 17 auch Amplifikationen der Chromosomen 7q, 9q, 12q, 16p und 22q. Amplifikationen dieser Chromosomen konnten ebenfalls bei den heterogenen Tumoren der PR nachgewiesen werden. Vergleicht man die Ergebnisse der CGH unterschiedlicher Raumforderungen der PR so zeigen die Ergebnisse eine molekularzytogenetische Ähnlichkeit der Keimzelltumoren und heterogenen Tumoren der PR. Übereinstimmungen mit den primär pineal-parenchymalen Raumforderungen finden sich nur in Bezug auf die Zugewinne der Chromosomen 12q und 16p.

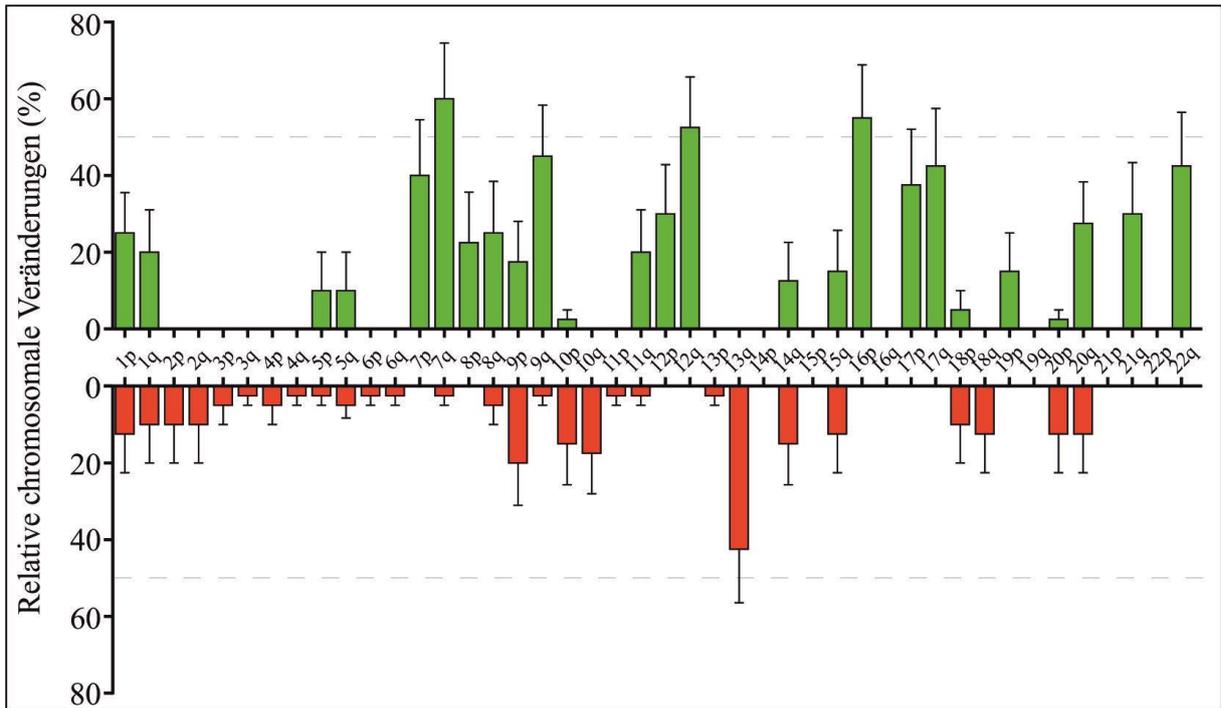


Abbildung 3.7.2: Darstellung relativer chromosomaler Veränderungen von 18 Tumoren der PR in Abhängigkeit von der chromosomalen Lokalisation. Zugewinne sind grün, Verluste sind rot dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Diversität der Tumoren der Pinealisregion

4.1.1 Klinische Symptomatik und Diagnostik

Tumoren der PR entsprechen weniger als 1% aller zerebralen Raumforderungen. Studien an größeren Patientenkollektiven sind daher schwierig und selten vollständig. Das größte Problem in der Diagnostik von Patienten mit Tumoren der PR ist, dass unspezifische klinische Symptome eine frühzeitige klinische Diagnose erschweren. Eine Raumforderung im Bereich der PR kann durch Affektion der Vierhügelplatte zu einer Blickparese bis hin zu einem Perinaud-Syndrom führen. Daneben wurden auch hypothalamische Symptome sowie Kompressionen des zerebralen Aquäduktes beschrieben (Knierim und Yamada 2003; Pollack 2012). Eine obstruktive Behinderung der Liquorzirkulation führt zu einem Hydrozephalus occlusus, dessen klinische Symptomatik sich in Abhängigkeit vom Alter des Patienten unterschiedlich äußern kann. So kann es im Säuglingsalter zu einem vergrößerten Schädelumfang kommen. Zentralnervöse Ausfallserscheinungen und Defekte im Kindesalter manifestieren sich z.B. durch Spastiken, Nystagmen oder geistige Behinderung (Behari et al. 2011). Ältere Patienten zeigen demgegenüber Symptome einer langsam progredienten Hirndrucksteigerung mit Kopfschmerzen, Hirnnervenstörungen, Stauungspapille, Übelkeit und Erbrechen (Reith und Yilmaz 2012). Bei 13 der 19 in dieser Arbeit untersuchten Patienten erfolgte eine Behandlung oder Prävention eines obstruktiven Hydrozephalus vor der operativen Therapie. Dies geschah durch Anlage eines ventrikulo-peritonealen Shunts oder Rickham-Reservoirs.

Im Bereich der PR zeigen sich unterschiedlichste Raumforderungen. Diese haben ihren Ursprung zum einen in den pinealen Geweben zum anderen jedoch in den heterogenen Strukturen des ZNS. So finden sich neben glialen Tumoren auch Meningeome, Keimzelltumoren, Ependymome und zerebrale Metastasen (Magalhaes et al. 2012). Die Tumoren zeigen oft eine heterogene histologische Struktur, so dass es häufig schwer fällt, einzelne Tumoren exakt einer Tumorentität zuzuordnen. In den letzten Jahren erfolgte daher eine mehrfache Revision und Ergänzung der histologischen Charakterisierung der Tumoren der PR. Zuletzt wurde dies 2007 und 2010 veröffentlicht und die pineal parenchymalen Tumoren intermediärer Differenzierung erst 2003 als eigene Tumorentität beschrieben (Louis et al. 2007; Roncaroli und Scheithauer 2007). Neben Bildgebung und Liquoruntersuchung ist eine histologische Sicherung der Raumforderungen erforderlich, um eine exakte Diagnose,

einhergehend mit einer Therapiestrategie und Prognosestratifizierung, zu ermöglichen. Leider ist die eindeutige Diagnose und Differentialdiagnostik dieser Raumforderungen schwierig. Neben der großen feingeweblichen Vielfalt dieser Tumoren erschwert die Tumorlokalisation den operativen Zugang (Buffenoir et al. 2008). Daher ist bei kleiner Ausdehnung dieser Tumoren oftmals keine optimale histologische Gewebesicherung möglich. Die hohe Diversität der in dieser Arbeit beschriebenen und untersuchten Raumforderungen unterstreicht die Heterogenität der Raumforderungen der PR. Es konnten Pinealiszysten, Plexuspapillome, pilozytische Astrozytome aber auch pineale Tumoren wie Pineozytome und Pineoblastome beschrieben werden. Zudem wurden Keimzelltumoren wie Epidermoidzysten, Germinome und Teratome untersucht. Die Tumoren der Patienten Nr. 18 und 19 beschreiben als solid-fibröse und neuroendokrine Tumoren sehr seltene Raumforderungen der PR.

Die genaue histologische Diagnose ist entscheidend für die Folgetherapien, da diese für den Patienten ggf. mit zusätzlichen Risiken und Komplikationen einhergehen können (Fauchon et al. 2000; Chowdhary et al. 2012). Die histologische Diagnose der Raumforderungen der PR kann darüber hinaus mit dem Erkrankungsalter korrelieren. Während Teratome und Germinome meist bei jüngeren Patienten beschrieben werden, finden sich gliale Tumoren auch bei älteren Patienten (Adamson et al. 2010; Selvanathan et al. 2012). Der Altersmittelwert des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs lag bei Männern um $21,8 \pm 3,7$ Jahre und bei Frauen um $44,7 \pm 12,4$ Jahre. Vergleicht man die Mediane für das Alter beider Geschlechter, so ergibt sich für Frauen mit 43 Jahren gegenüber Männern mit 22 Jahren ein späteres Erkrankungsalter. Der Anteil erkrankter Kinder lag jedoch nur bei 15,8% im Gesamtkollektiv. Die Heterogenität und Unsicherheit der histologischen Diagnosesicherung von Raumforderungen der PR erfordert eine alternative Charakterisierung dieser Tumoren, so dass molekularzytogenetische Analysen wegweisend sein können.

4.1.2 Chirurgische Therapie

Tumoren der PR entstehen meist im infratentoriellen Kompartiment und expandieren in den dritten Ventrikel oder die Cisterna quadrigeminalis (Behari et al. 2011). Eine optimale chirurgische Therapie der Raumforderung der PR wird durch eine genaue histologische Diagnostik ebenso wie durch die Nachbarschaft komplexer Strukturen beeinflusst (Bruce und Ogden 2004). Die bildgebende Diagnostik ist dabei von entscheidender Bedeutung, um ein optimales chirurgisches Vorgehen planen zu können. Die kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (MRT) kann erste Hinweise auf eine histologische

Charakterisierung der Raumforderung geben (Behari et al. 2011). Eine ausreichend, verlässliche Diagnose ist mit Hilfe der MRT jedoch nicht möglich (Dumrongpisutikul et al. 2012). Histologische Untersuchungen sind daher eine unumgängliche Notwendigkeit (Hoffman et al. 1994; Bruce und Ogden 2004). Die MRT-Untersuchung ermöglicht es jedoch, die Ausdehnung und Infiltration umliegender Strukturen des Hirnstammes, Ventrikelsystems oder Hypothalamus zu beurteilen und somit die Grenzen und Methodik der operativen Intervention abzuschätzen. Mögliche chirurgische Zugänge zur PR sind:

A: Infratentoriell-suprazerebellärer Zugang

Dieser median trajektorieell gelegen Zugang ermöglicht einen Zugang zur PR und vermeidet Verletzungen der superior der Läsion gelegenen venösen Strukturen. Dieser, in sitzender Position durchgeführte Eingriff, ermöglicht eine gute Übersicht und Entfernung des Tumors ohne größere neuronale Affektion der umliegenden Strukturen. Läsionen deren Wachstum und Infiltration von der Mittellinie abweichen können jedoch nur unzureichend entfernt werden und erfordern einen supratentoriellen Zugang (Bruce und Ogden 2004; Behari et al. 2010; Behari et al. 2011).

B: Okzipital-transtentorieller Zugang

Dieser chirurgische Zugang ermöglicht eine Darstellung der supra- und infratentoriellen Anteile der Raumforderung. Er erlaubt eine Entfernung von Tumoren deren Ausdehnung das tiefe Venensystem, lateral die Trigona der Seitenventrikel oder das Corpus callosum erreicht. Tumoren, deren Wachstum exzentrisch voranschreitet, können jedoch nur unvollständig entfernt werden. Eine Verletzung des Splenium corporis callosi oder des Lobus occipitalis muss unbedingt vermieden werden (Poppen und Marino 1968; Lapras et al. 1987; Behari et al. 2010).

Andere Zugänge zur PR werden als posterior-interhemisphärisch-transkallosal, anterior transkallosal, transventrikulär, transkallosal-interfornikal, lateral paramedian-infratentoriell beschrieben und meist in Sondersituationen eingesetzt (Behari et al. 2011). Postoperativ muss bei allen Techniken mit Liquorleckage, akuter oder verzögerter postoperativer Blutung gerechnet werden. Ebenso können hämorrhagische Infarkte nach Obliteration und/oder Koagulation von Brückenvenen auftreten. Eine fortgeschrittene Proliferation des Tumors kann zu einer chirurgisch nur noch schwierig beherrschbaren Situation führen, so dass stereotaktische und/oder endoskopische Biopsien erwogen werden (Popovic und Kelly 1993). Diese Methoden ermöglichen die Identifikation von Läsionen, die ggf. ein exzellentes

Ansprechen auf adjuvante Radio-/ Chemotherapien zeigen. Operationen mit erhöhter Morbidität und Mortalität können so vermieden werden. Die operativen Interventionen bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten variieren. Neben chirurgischen Therapien erfolgten stereotaktische Interventionen und/oder Kombinationen beider Therapieformen. Die Heterogenität ist bedingt durch den langen Evaluationszeitraum von bis zu 168 Monaten. Erste diagnostische und operative Eingriffe im Patientenkollektiv datieren bis in die 90er Jahre zurück und unterliegen einer ständigen Evolution und Innovation. Wurden anfänglich stereotaktische Biopsien favorisiert, erfolgen heute mit der Weiterentwicklung der mikrochirurgischen Technik neben endoskopischen auch zunehmend offene Tumorresektionen (Bruce und Ogden 2004; Pollack 2012).

4.2 Molekularzytogenetik von Tumoren der Pinealisregion

Die Karzinogenese der Raumforderungen der PR ist nicht abschließend geklärt und die geringe Prävalenz der Tumoren der PR erschwert eine genetische Analyse größerer Patientenkollektive. Mit Hilfe der CGH-Analyse ist es möglich, genomische Dysbalancen einer Raumforderung anhand der im Rahmen der Tumorresektion gewonnenen histologischen Präparate zu analysieren. DNS-Zugewinne und -Verluste können dargestellt und Replikationen oder Deletionen chromosomaler Orte entsprechender Onkogene untersucht werden (Rickert et al. 2000; Rickert et al. 2001). Tumoren der PR zeigen numerische sowie strukturelle Alterationen der Chromosomen 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 18, 21 und 22 (Rainho et al. 1992; Bello et al. 1993; Rickert et al. 2000; Rickert et al. 2001). Diese chromosomalen Veränderungen konnten ebenso in unserem Patientenkollektiv nachgewiesen werden. Darüber hinaus fanden sich auch Veränderungen der Chromosomen 4, 7, 9, 13, 15, 16, 17 und 19. Diese Vielzahl der möglichen chromosomalen Abweichungen und Veränderungen spiegelt die histologische Heterogenität der Raumforderungen der PR wider. Während die in dieser Arbeit untersuchten benignen Tumoren nur wenige chromosomale Veränderungen aufwiesen zeigten maligne Raumforderungen oftmals mehr als 10 chromosomale Veränderungen.

4.2.1 Pineal-parenchymale Tumoren der PR

Das Verhältnis von chromosomalen Zugewinnen und Verlusten von pineal-parenchymalen Tumoren wurde meist als ausgeglichen beschrieben (Rickert et al. 2001). Bei den in dieser

Arbeit untersuchten Patienten überwogen jedoch die chromosomalen Zugewinne gegenüber den genetischen Verlusten. Klassische zytogenetische Untersuchungen beschrieben für Patienten, die an einem Pineozytom erkrankten, Verluste der Chromosomen 11 und 22 sowie Deletionen des Chromosoms 12q (Rainho et al. 1992; Bello et al. 1993). Dies konnte im Rahmen dieser Studie nicht bestätigt werden. Mit Hilfe der CGH ist es möglich, die klassische G-Bänderungsanalyse der Zytogenetik mit der detaillierten Auflösung einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zu kombinieren (Gunn et al. 2007). Dies ermöglicht eine detaillierte Analyse chromosomaler Veränderungen und ergänzt klassische zytogenetische Methoden. Die in dieser Arbeit mit Hilfe der CGH untersuchten Pineozytome zeigten Zugewinne der Chromosomen 1p, 7p, 7q, 9p, 9q, 11q, 12p, 12q, 15q, 16p, 18p, 20q und 21q. Verluste betrafen die Chromosomen 10p, 10q, 13q sowie 14q. Die geringe Fallzahl erschwert eine abschließende Bewertung der Pineozytompatienten, so dass diese Ergebnisse als Einzelfallbeschreibung gewertet werden.

Pineoblastome zeigen Deletionen am Chromosom 11q (Sreekantaiah et al. 1989) sowie Veränderungen des Chromosoms 17q (Kees et al. 1998; Brown et al. 2006). Verluste des Chromosoms 17q konnten ebenso wie bei Rickert et al. nicht nachgewiesen werden (Rickert et al. 2001). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei 50% der Patienten ein Zugewinn des Chromosoms 17q. Die untersuchten Pineoblastome zeigten wie die Pineozytome einen Zugewinn des Chromosoms 12q (50%). Im Gegensatz zu den für Pineozytome beschriebenen Verlusten der Chromosomen 11 und 22 zeigten Pineoblastome jedoch Zugewinne des Chromosoms 22q. Veränderungen des Chromosoms 11 zeigten sich nicht. Es konnten neue Zugewinne der Chromosomen 8p (25%), 8q (50%), 9p (25%), 9q (25%), 12p (25%), 16p (50%), 17p (50%), 17q(50%), 19p (25%), 20p (25%) und 20q (25%) beschrieben werden. Deletionen der Chromosomen 5q, 10q, 13q, 20p und 20q (je 25%) konnten erstmals nachgewiesen werden.

4.2.2 Keimzelltumoren der PR

Intrazerebrale Keimzelltumoren sind heterogene Tumoren und ähneln den Keimzelltumoren der Gonaden oder anderer Lokalisation. Sie entsprechen ca. 0,3-3% aller zerebralen Neoplasien (Rickert et al. 2000). Ihr Ursprung ist aktuell noch nicht abschließend geklärt. Es wird angenommen, dass neben versprengten embryonalen Stammzellen auch migratorische, primordiale Keimzellen an der Tumorigenese beteiligt sein können (Sano 1999; Rickert et al. 2000). Die Keimzelltumoren der PR umfassen u.a. Germinome (40-70%) und Teratome (13-

20%) (Rickert et al. 2000) und finden sich gehäuft bei jüngeren Patienten unter 18 Jahren (Edwards et al. 1988; Rosenblum et al. 2000). Ihre Hauptlokalisation entspricht der pinealen und suprazerebellären Region (Matsutani et al. 1997; van Meir et al. 1998). Die Anzahl genetisch untersuchter, zerebraler Keimzelltumoren ist gering. Genetische Analysen extrazerebraler Keimzelltumoren beschreiben Zugewinne der Chromosomen 1 (46%), 2 (30%), 7 (53%), 8q (59%), 12p (87%) und 21 (54%). Zudem konnten Verluste der Chromosomen 4 (38%), 5 (32%), 9q (14%), 11q (35%), 13q (39%) und 18q (29%) nachgewiesen werden (Rickert et al. 2000). Mit Hilfe der CGH- Analyse primär zerebraler Keimzelltumoren konnten Zugewinne der Chromosomen 1q (20%), 8q (27%) und 12p (40%) bestätigt werden. Es konnten ebenfalls entsprechende Verluste der Chromosomen 4 (7%), 9q (20%), 11q (20%), 13q (47%) und 18q (33%) beschrieben werden (Rickert et al. 2000). Die in dieser Arbeit untersuchten primär zerebralen Keimzelltumoren zeigten ebenfalls Zugewinne der Chromosomen 1q (80%), 8q (20%) und 12p (20%). Die Zugewinne des Chromosoms 1q waren höher als durch Rickert et al. beschrieben und deuten auf eine stärkere Korrelation mit extrazerebralen Keimzelltumoren hin. Zugewinne des Chromosoms 2 konnten im Vergleich mit den extrazerebralen Keimzelltumoren jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Zugewinne der Chromosomen 7p(40%), 7q (60%) und 21q (40%) sind mit den Ergebnissen der CGH-Untersuchungen extrazerebraler Keimzelltumoren vergleichbar und damit deutlich höher als die in der Literatur beschriebenen Zugewinne von 7-13% zerebraler Keimzelltumoren (Rickert et al. 2000). In dieser Arbeit konnten zudem neue Zugewinne der Chromosomen 9q (40%), 10p (20%), 11q (20%), 14q (20%), 17p (40%), 17q (60%), 19p (20%) und 22q (60%) beschrieben werden. Besonders häufig zeigten sich Zugewinne der Chromosomen 12q (80%), 16p (60%), 20q (60%) und 22q (80%).

Genetische Verluste konnten an den Chromosomen 4p (40%), 4q (20%), 5p (20%), 5q (20%), 9q (20%), 11q (20%), 13q (60%) und 18q (20%) nachgewiesen werden. Diese waren sowohl vergleichbar mit den Ergebnissen extrazerebraler als auch zerebraler Keimzelltumoren. Die von Rickert et al. mit 7% und 0% beschriebenen Verluste der Chromosomen 4 und 5 konnten in dem untersuchten Patientenkollektiv nicht gezeigt werden. Zusätzlich konnten erstmals Verluste der Chromosomen 1p (20%), 3p (40%), 3q (20%), 6p (20%), 6q (20%), 7q (20%), 11p (20%), 13p (20%) und 15q (20%) beschrieben werden. Besonders häufig zeigten sich Verluste der Chromosomen 9p (60%) und 13q (60%). Zusammenfassend ähneln die chromosomalen Zugewinne und Verluste der untersuchten zerebralen Keimzelltumoren sowohl den extrazerebralen als auch den von Rickert et al. beschriebenen intrazerebralen Manifestationen von Keimzelltumoren und nehmen eine

Zwischenstellung ein. Es zeigen sich entsprechend den intrazerebralen Keimzelltumoren geringere Zugwinne der Chromosomen 8q und 12p, jedoch entsprechend den extrazerebralen Keimzelltumoren deutlich vermehrte Expressionen der Chromosomen 1q, 7 und 21.

4.2.3 Heterogene Tumoren der PR

4.2.3.1 Pilozytisches Astrozytom

Pilozytische Astrozytome WHO °I finden sich hauptsächlich bei Kindern (Belirgen et al. 2012). Sie sind allgemein mit einer guten Prognose verbunden (Colin et al. 2012). Eine maligne Transformation ist jedoch möglich (Kleinman et al. 1978; Auer et al. 1981). Da diese Tumoren nur einem geringen Teil der zerebralen Astrozytome entsprechen sind ausführliche genetische Studien selten (Belirgen et al. 2012). Die heterogene Studienlage erschwert eine genomische Charakterisierung dieser Tumoren (Sanoudou et al. 2000; Shlomit et al. 2000; Wiltshire et al. 2004; Wemmert et al. 2006; Belirgen et al. 2012). Darüber hinaus zeigen pilozytische Astrozytome verschiedener Lokalisationen Unterschiede in ihrem biologischen Verhalten (Belirgen et al. 2012). Untersuchungen von pilozytischen Astrozytomen unterschiedlicher Lokalisationen beschreiben chromosomale Amplifikationen und Zugwinne der Chromosomen 1p (63%), 2p (63%), 9p (63%), 9q (59,3%), 16p (63%) und 19q (55,5%). Verluste zeigen die Chromosomen 2p (40,7%), 3 (11%), 6q, 8p (63%), 9p und 16p (77,8%) (Shlomit et al. 2000; Belirgen et al. 2012). Aktuell ist es jedoch noch nicht gelungen, eine signifikante Korrelation von Tumorgenen, genomischen Veränderungen und der Ätiologie dieser Raumforderungen zu beschreiben (Szymas et al. 2000; Belirgen et al. 2012). Die in dieser Arbeit untersuchten pilozytischen Astrozytome sind nach aktuellen Informationen die ersten CGH-Untersuchungen dieser Tumorentität in der PR. In der CGH-Untersuchung finden sich vor allem chromosomale Zugwinne. Die pilozytischen Astrozytome der PR zeigen ebenfalls Amplifikationen der Chromosomen 1p und 9q. Darüber hinaus werden Korrelationen von pilozytischen Astrozytomen mit Zuggewinnen des Chromosoms 16p beschrieben (Belirgen et al. 2012). Zugwinne des Chromosoms 16p finden sich häufig in unseren Untersuchungen. Während Amplifikationen des Chromosoms 2p nicht nachgewiesen werden konnten, wurden neue Zugwinne an Chromosomen 1q, 7q, 11q, 12q, 17p, 17q, 20q, und 22q beschrieben. In Zusammenhang mit Veränderungen des Chromosoms 7q konnten BRAF-Fusionsonkogene dargestellt werden, deren prognostischer Einfluss Gegenstand aktueller Forschungen ist (Colin et al. 2012; Sadighi und Slopis 2013).

Verluste zeigten sich auf dem Chromosom 9p. Neu beschrieben werden konnten Verluste am Chromosomen 8q. Verluste an den Chromosomen 2p, 3, 6q, 8p und 16p konnten im Gegensatz zur Literatur nicht nachgewiesen werden (Shlomit et al. 2000; Belirgen et al. 2012). Dieses Ergebnis unterstreicht die Heterogenität pilozytischer Astrozytome unterschiedlicher Lokalisationen. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um diese Tumorentität und den Einfluss entsprechender Fusionsonkogene im Bereich der PR genauer zu charakterisieren.

4.2.3.2 Solid-fibröser Tumor

Zerebrale, solid-fibröse Tumoren sind seltene Raumforderungen des ZNS. Es sind weniger als 100 dieser Raumforderungen in der Literatur beschrieben (Carneiro et al. 1996; Zhang et al. 2010). 2010 konnte der erste Tumor dieser Art in der PR beschrieben werden (Zhang et al. 2010). Fibröse Tumoren zeichnen sich durch eine spindelzelluläre Histologie aus und werden seit 2007 in der WHO-Klassifikation zerebraler Tumoren als eigene, der Dura entspringende, klinisch-pathologische Tumorentität beschrieben (Challa et al. 1998; Cummings et al. 2001; Louis et al. 2007; Zhang et al. 2010). Obwohl ihr histopathologisches Verhalten nicht abschließend geklärt ist werden sie aktuell als benigne Raumforderungen klassifiziert und chirurgisch therapiert (Brunori et al. 1999; Tihan et al. 2003; Zhang et al. 2010). In einigen Fällen wurden lokale Rezidive oder Metastasierungen beschrieben (Ng et al. 2000; Ogawa et al. 2004; Pizem et al. 2004). Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patient kam es zu einer spinalen Metastasierung in dem Segment TH12, so dass im Anschluss an die operative Therapie eine Radiatio der Tumorregion und der neuronalen Achse erfolgte. Die erfolgten CGH-Analysen sind die Erstbeschreibung einer genetischen Analyse eines solid-fibrösen Tumors der PR. Der Tumor zeigte Zugewinne der Chromosomen 7p, 7q, 9q, 16p, 17p, 17q, und 22q sowie Verluste am Chromosom 13q. Zugewinne am Chromosom 7 finden sich auch in Keimzelltumoren der PR ebenso wie Verluste am Chromosom 13q (Rickert et al. 2000). Zugewinne der Chromosom 12q, wie sie für pineal-parenchymale Tumoren beschrieben werden, fanden sich ebenso wenig wie Veränderungen des Chromosoms 11 (Rainho et al. 1992; Bello et al. 1993). Der solid-fibröse Tumor zeigt so eine molekularzytogenetische Tendenz zur Übereinstimmung mit aus Keimzellen entspringenden Tumoren der PR und weniger mit primären Raumforderungen des pinealen Parenchyms.

4.2.3.3 Neuroendokriner Tumor

2010 beschrieben Grozinsky-Glasber et al. erstmalig die Manifestation eines neuroendokrinen Tumors im Bereich der PR (Grozinsky-Glasberg et al. 2010). Tumoren dieser Entität waren zuvor unbeschrieben. Der von Grozinsky-Glasber et al. beschriebene Tumor konnte nicht reseziert und nur bioptisch gesichert werden. Es war nicht möglich weiteres Tumormaterial zur histologischen und genetischen Untersuchung zu gewinnen. CGH-Untersuchungen dieser Tumorentitäten sind aktuell nicht beschrieben. Der hier untersuchte neuroendokrine Tumor der PR zeigte Zugewinne der Chromosomen 5p, 5q, 7p, 7q, 8p, 8q, 9p, 9q, 12p, 12q, 21q und 22q sowie Verluste der Chromosomen 1p, 1q, 2p, 2q, 10p, 10q, 13q, 14q, 15q, 18p, 18q, 20p und 20q. Die für Keimzelltumoren beschriebenen Zugewinne am Chromosom 7 und 21 sowie Verluste am Chromosom 13q finden sich auch bei diesen Tumoren (Rickert et al. 2000). Zudem treten die für Tumoren des pinealen Parenchyms beschriebenen Zugewinne der Chromosomen 12q und 22 auf (Rickert et al. 2001). Eine Einordnung dieses neuroendokrinen Tumors ist somit auch molekularzytogenetisch unsicher. Weiter Untersuchungen und Analysen sind notwendig, um diese Tumorentität zu charakterisieren.

4.3 Grenzen der Komparativen genomischen Hybridisierung

Komparative genomische Hybridisierungen ermöglichen die Analyse genomischer Veränderungen auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene (Kallioniemi A et al. 1992; du Manoir et al. 1993). CGH-Untersuchungen sind jedoch nicht in der Lage strukturelle Aberrationen der Chromosomen zu detektieren. Hierzu gehören balancierte Translokationen, Inversionen oder Ring-Chromosomen ebenso wenig wie Polyploidie-Analysen (Weiss et al. 1999). Zudem kann die Sensitivität einer CGH-Analyse durch Kontaminationen mit Fremdmaterial oder normaler genomischer DNS verringert werden (Hermsen et al. 1996). Aktuell kann mit der CGH-Untersuchung eine Auflösung von 2-4 Mb erreicht werden (Wan und Ma 2012). Um eine noch genauere genomische Analyse zu ermöglichen, wurden Feldanalysetechniken der CGH (Array-CGH) entwickelt. Das Konzept und die Methodik der Array-CGH entsprechen dem der klassischen CGH-Analyse. Die Analyse der Tumor-DNS erfolgt jedoch nicht mehr auf Metaphasen-Präparaten. Durch die Hybridisierung der Proben-DNS mit segmentierter, genomischer Referenz-DNS in einer Feld-Anordnung ist eine Auflösung von 100 Kb bis 1 Mb möglich (Pinkel et al. 1998). Zudem sind Oligonukleotid-Arrays möglich, um einzelne Genkopieveränderungen zu

erfassen. So können Allelverluste, Nukleotidpolymorphismen bis hin zu einzelnen Genkopieveränderungen auf submikroskopischer Ebene beschrieben werden (Dhami et al. 2005; Lockwood et al. 2006). Genomische Array-Analysen finden aktuell eine immer breitere Anwendung in der klinischen und molekularbiologischen Diagnostik zur Untersuchung von Polymorphismen, erworbenen oder angeborenen genetischen Erkrankungen sowie genetischer Normvariationen (Freeman et al. 2006; Wan und Ma 2012). Die Vielzahl der Anwendungsmöglichkeiten und Nutzung unterschiedlicher Array-Proben birgt jedoch auch die Gefahr zunehmend falsch positiver Ergebnisse. Auch Array-CGH-Analysen können durch Kontaminationen in ihrer Aussage verfälscht werden. Regionale genomische Unterschiede der Patienten können die Auswertung dieser Analysen erschweren. Darüber hinaus ist es auch mit der Array-CGH nicht möglich balancierte chromosomale Rearrangements, unbalancierte, numerische oder strukturelle Veränderungen auf submikroskopischer Ebene zu diagnostizieren und genetische Mutationen der Array-Referenz-DNS auszuschließen (Wan und Ma 2012).

4.4 Zielgene chromosomaler Veränderungen – ein Ausblick

Zugewinne des Chromosoms 17p, der in dieser Arbeit beschriebenen Pineoblastome, geben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Tumorsuppressorgens p53. Trotz unterschiedlichster Untersuchungen ist es aktuell jedoch noch nicht gelungen genetische Veränderungen pineal-parenchymaler Tumoren mit der Expression von Tumorsuppressorgenen wie p53 (Tsumanuma et al. 1995; Nozaki et al. 1998; Marcol et al. 2009), MYC oder MYCN (Kees et al. 1994; Kees et al. 1998) zu korrelieren. Veränderungen der Chromosomen 8q und 22q können die Funktion des MYC-Onkogens beeinflussen und finden sich ebenfalls bei den Untersuchungen der Pineoblastomen. Es zeigen sich zunehmende Alterationen und chromosomale Veränderungen der Raumforderungen der PR mit dem steigenden Grad der Malignität. Finden sich bei Untersuchungen von zystischen Raumforderungen oder benignen Papillomen ca. fünf chromosomale Veränderungen, so konnten bei malignen Pineoblastomen oder Keimzelltumoren oft mehr als zehn chromosomale Alterationen nachgewiesen werden. In unserem Kollektiv erkrankten vier Patienten an einem Pineoblastom WHO °IV. Alle Patienten zeigten Veränderungen des Chromosoms 17q oder 8q. Drei der Patienten verstarben. Für Patienten, die an einem hochmalignen Tumor der PR wie dem Pineoblastom erkrankten, wurden 5-Jahresüberlebensraten von 49% und 58% beschrieben (Schild et al.

1993; Schild et al. 1996). Die hier untersuchten Patientenfälle zeigten ebenfalls eine 5-Jahresüberlebensrate von 50%.

Zielgene der Tumorigenese von Keimzelltumoren können aktuell ebenfalls nicht eindeutig beschrieben werden. Neben bcl 10, das einer Veränderung des Chromosoms 1p zugeordnet wird (Lee et al. 1999), sind Korrelationen mit der Familie der RAS-Protoonkogene beschrieben. N- oder KRAS-Mutationen werden mit 15% angegeben und im Rahmen von Deletionen des Chromosoms 12p vermutet (Olie et al. 1995). Zudem konnten Genkartierungsuntersuchungen die Gene für KRAS2, JAW1 und Sox5 in Codierungsnähe nachweisen (Mostert et al. 1998). Die Expression von p53 konnte nur selten nachgewiesen werden und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen (Feng et al. 1995; Nozaki et al. 1998; Iwato et al. 2000). Genetisch-prognostische Untersuchungen extrazerebraler Keimzelltumoren beschreiben Korrelationen zwischen einer Chemotherapie-Resistenz und der Expression von TP53 (Houldsworth et al. 1998). Es wird ebenfalls eine erhöhte Chemotherapie-Resistenz von Keimzelltumoren mit Zugewinnen der Chromosomen 1q, 7q, 9q, und 20q beschrieben (Rao et al. 1998). Amplifikationen dieser Chromosomen fanden sich auch bei den in dieser Arbeit beschriebenen Keimzelltumoren der PR.

Von Tumoren, die einer histologischen Zellpopulation entsprächen, wären identische genetische Veränderungen zu erwarten. Klassische Konzepte der Tumorigenese beschreiben diese molekularzytogenetische Heterogenität der Raumforderungen der PR nur unzureichend (Berger et al. 2011) und die Seltenheit dieser Raumforderungen erschwert eine Untersuchung größerer Patientenkollektive. Untersuchungen kleiner Patientenkollektive können immer nur einen geringen Teil der Patientenpopulation abbilden. Ihre Aussagekraft bleibt daher meist auf einzelne Fallstudien beschränkt. Um therapeutische Optionen und den Einfluss genetischer Faktoren auf die Prognose des einzelnen Patienten zu evaluieren, werden in der Zukunft internationale, interdisziplinäre Multi-Center-Studien notwendig sein.

5 Zusammenfassung

Raumforderungen der PR haben ihren Ursprung zum einen in den pinealen Geweben und zum anderen in den heterogenen Strukturen des ZNS. Aufgrund ihrer anatomischen Lage im Bereich der zirkumventrikulären GP und des Hirnstammes bedeuten sie im fortgeschrittenen Stadium für die Patienten eine massiv eingeschränkte Lebensqualität bei zunehmend schlechter Prognose. Die Heterogenität dieser Tumoren stellt die Medizin jedoch vor eine große diagnostische und therapeutische Herausforderung. Entscheidend für eine optimale Therapie ist eine eindeutige Charakterisierung dieser Raumforderungen. In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, neben pineal-parenchymalen Raumforderungen und Keimzelltumoren der PR, pilozytische Astrozytome, einen solid-fibrösen und einen neuroendokrinen Tumor der PR molekularzytogenetisch zu charakterisieren.

Die Karzinogenese der Raumforderungen der PR ist nicht abschließend geklärt. Von Tumoren, die einer histologischen Zellpopulation entsprächen, wären in Regelmäßigkeit identische genetische Veränderungen zu erwarten. Die Analysen in dieser Arbeit zeigen zum einen übereinstimmende molekularzytogenetische Veränderungen der Chromosomen 7, 9, 12 und 17 mit zuvor beschriebenen Tumoren der PR. Zudem konnte erstmals eine Vielzahl neuer chromosomaler Veränderungen beschrieben werden. Diese molekulargenetische Heterogenität stellt die aktuelle Zuordnung der Raumforderungen der PR nicht in Frage, unterstreicht jedoch, dass eine weitere histologische Charakterisierung notwendig ist, um Subgruppen zu identifizieren. Sie zeigt, dass klassische Konzepte der Tumorigenese die molekularzytogenetische Heterogenität dieser Tumoren nur unzureichend beschreiben und durch progressivere Tumormodelle ergänzt werden müssen (Berger et al. 2011).

Tumoren und Raumforderungen der PR entsprechen im Kindesalter 3-8% und im Erwachsenenalter weniger als 1% aller intrazerebralen Raumforderungen (Edwards et al. 1988; Regis et al. 1996; Rickert et al. 2001), so dass Untersuchungen größerer Patientenkollektive über einen längeren Zeitraum schwierig sind. Die molekularzytogenetische Zuordnung der in dieser Arbeit untersuchten Raumforderungen unterstützt und ergänzt die Charakterisierung der Tumorentitäten. Auch wenn nur eine geringe Tumoranzahl über einen längeren Zeitraum untersucht werden konnte, so ist anzunehmen, dass es möglich sein wird, einzelnen histologischen Entitäten ein zytogenetisches Muster zuzuordnen, wenn größere Tumorkollektive der PR untersucht werden. So kann die Diagnostik erweitert und eine prognostische Bedeutung zum Wohle der Patienten erlangt werden.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.1: Anatomische Lage der Glandula pinealis	9
Abbildung 1.2.1: Pinealiszyste	12
Abbildung 1.2.2: Pineozytom.....	12
Abbildung 1.2.3: Pineoblastom	12
Abbildung 1.2.4: Papillärer Tumor	13
Abbildung 1.2.5: Epidermoidzyste.....	14
Abbildung 1.2.6: Germinom	14
Abbildung 1.2.7: Teratom	15
Abbildung 1.2.8: Plexuspapillom.....	15
Abbildung 1.2.9: Pilozyt. Astrozytom	15
Abbildung 1.2.10: Solid-fibröser Tumor.....	16
Abbildung 1.2.11: Neuroend. Tumor	16
Abbildung 2.3.1: Komparative Genomische Hybridisierung (CGH).	23
Abbildung 2.3.2: Nick-Translation.	27
Abbildung 2.3.3: CGH-Untersuchung	36
Abbildung 3.1.1: Geschlechterverteilung und Alter bei Diagnosestellung	38
Abbildung 3.1.2: Klinische Symptomatik von Raumforderungen der PR.....	39

Abbildung 3.1.3: Gesamtüberleben und Karnofsky-Index	40
Abbildung 3.1.4: Kaplan-Meier-Analyse des Rezidiv- und Gesamtüberlebens	42
Abbildung 3.2.1: Gesamtüberleben und Karnofsky-Index unter adjuvanter Therapie	46
Abbildung 3.2.2: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens bei adjuvanter Therapie	46
Abbildung 3.4.1: Chromosomale Zugewinne und Verluste von Pineoblastomen	49
Abbildung 3.5.1: Chromosomale Zugewinne und Verluste von Germinomen	51
Abbildung 3.6.1: Chromosomale Zugewinne und Verluste von piloz. Astrozytomen	53
Abbildung 3.7.1: Absolute chromosomale Veränderungen von 18 Tumoren der PR	54
Abbildung 3.7.2: Relative chromosomale Veränderungen von 18 Tumoren der PR.....	55

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.2.1: Raumforderungen und Tumoren der Pinealisregion	11
Tabelle 2.2.1: Materialien und Geräte	21
Tabelle 2.2.2: Verwendete Enzyme	22
Tabelle 2.3.1: DNS-Isolierungspuffer	24
Tabelle 2.3.2: QiAmp DNA Mini Kit	24
Tabelle 2.3.3: Molekulare Längenstandards	25
Tabelle 2.3.4: TBE-Puffer	25
Tabelle 2.3.5: Probenpuffer	26
Tabelle 2.3.6: Ethidiumbromid-Lösung	26
Tabelle 2.3.7: Gelansatz	26
Tabelle 2.3.8: Ethidiumbromid-Laufpuffer	26
Tabelle 2.3.9: 10x Reaktionspuffer	28
Tabelle 2.3.10: Nukleotide	28
Tabelle 2.3.11: DNS- und Metaphasenpräparate	29
Tabelle 2.3.12: Pepsinlösung	29
Tabelle 2.3.13: 20x SSC	30
Tabelle 2.3.14: Denaturierungslösung	30

Tabelle 2.3.15: Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate.....	32
Tabelle 2.3.16: Waschlösung A	32
Tabelle 2.3.17: Waschlösung B.....	32
Tabelle 2.3.18: Waschlösung C.....	32
Tabelle 2.3.19: Blocking-Lösung.....	33
Tabelle 2.3.20: Detektions-Lösung	33
Tabelle 2.3.21: DAPI-Lösung	33
Tabelle 3.1.1: Klinische Charakteristika von Tumoren der PR.	40
Tabelle 3.2.1: Adjuvante Radiotherapie von neun Tumoren der PR	44
Tabelle 3.2.2: Adjuvante Chemotherapie von vier Tumoren der PR.....	45
Tabelle 3.3.1: Rezidive von drei Tumoren der PR.....	47
Tabelle 3.4.1: CGH-Analyse von Patienten mit pineal-parenchymalen Tumoren der PR	48
Tabelle 3.5.1: CGH-Analyse von Patienten mit pinealen Keimzelltumoren der PR	50
Tabelle 3.6.1: CGH-Analyse von Patienten mit heterogenen Raumforderungen der PR	52

8 Literaturverzeichnis

Adamson DC, Rasheed BA, McLendon RE und Bigner DD (2010): Central nervous system. *Cancer Biomark* 9, 193-210

Allen J, Chacko J, Donahue B, Dhall G, Kretschmar C, Jakacki R, Holmes E und Pollack I (2012): Diagnostic sensitivity of serum and lumbar CSF bHCG in newly diagnosed CNS germinoma. *Pediatr Blood Cancer* epub,

Auer RN, Rice GP, Hinton GG, Amacher AL und Gilbert JJ (1981): Cerebellar astrocytoma with benign histology and malignant clinical course. Case report. *J Neurosurg* 54, 128-132

Behari S, Garg P, Jaiswal S, Nair A, Naval R und Jaiswal AK (2010): Major surgical approaches to the posterior third ventricular region: A pictorial review. *J Pediatr Neurosci* 5, 97-101

Behari S, Jaiswal S, Nair P, Garg P und Jaiswal AK (2011): Tumors of the posterior third ventricular region in pediatric patients: The Indian perspective and a review of literature. *J Pediatr Neurosci* 6, 56-71

Belirgen M, Berrak SG, Ozdag H, Bozkurt SU, Eksioglu-Demiralp E und Ozek MM (2012): Biologic tumor behavior in pilocytic astrocytomas. *Childs Nerv Syst* 28, 375-389

Bello MJ, Rey JA, de Campos JM und Kusak ME (1993): Chromosomal abnormalities in a pineocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 71, 185-186

Berger AH, Knudson AG und Pandolfi PP (2011): A continuum model for tumour suppression. *Nature* 476, 163-169

Bernardi G, Ehrlich SD und Thiery JP (1973): The specificity of deoxyribonucleases and their use in nucleotide sequence studies. *Nat New Biol* 246, 36-40

Bhattacharjee MB, Armstrong DD, Vogel H und Cooley LD (1997): Cytogenetic analysis of 120 primary pediatric brain tumors and literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 97, 39-53

Bonner J, Kung G und Bekhor I (1967): A method for the hybridization of nucleic acid molecules at low temperature. *Biochemistry* 6, 3650-3653

Brigati DJ, Myerson D, Leary JJ, Spalholz B, Travis SZ, Fong CK, Hsiung GD und Ward DC (1983): Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes. *Virology* 126, 32-50

Britten RJ, Graham DE und Neufeld BR (1974): Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods Enzymol* 29, 363-418

Brown AE, Leibundgut K, Niggli FK und Betts DR (2006): Cytogenetics of pineoblastoma: four new cases and a literature review. *Cancer Genet Cytogenet* 170, 175-179

Bruce JN und Ogden AT (2004): Surgical strategies for treating patients with pineal region tumors. *J Neurooncol* 69, 221-236

Brunori A, Cerasoli S, Donati R, Giangaspero F und Chiappetta F (1999): Solitary fibrous tumor of the meninges: two new cases and review of the literature. *Surg Neurol* 51, 636-640

Bucy PC und Thieman PW (1968): Astrocytomas of the cerebellum. A study of a series of patients operated upon over 28 years ago. *Arch Neurol* 18, 14-19

Buffenoir K, Rigoard P, Wager M, Ferrand S, Coulon A, Blanc JL, Bataille B und Listrat A (2008): Papillary tumor of the pineal region in a child: case report and review of the literature. *Childs Nerv Syst* 24, 379-384

Carneiro SS, Scheithauer BW, Nascimento AG, Hirose T und Davis DH (1996): Solitary fibrous tumor of the meninges: a lesion distinct from fibrous meningioma. A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 106, 217-224

Carson BS, Weingart JD, Guarnieri M und Fisher PG (1997): Third ventricular choroid plexus papilloma with psychosis. Case report. *J Neurosurg* 87, 103-105

Challa VR, Kilpatrick SE, Ricci P, Wilson JA und Kelly DL, Jr. (1998): Solitary fibrous tumor of the meninges. *Clin Neuropathol* 17, 73-78

Chibbaro S, Di Rocco F, Makiese O, Reiss A, Poczos P, Mirone G, Servadei F, George B, Crafa P, Polivka M, et al. (2012): Neuroendoscopic management of posterior third ventricle and pineal region tumors: technique, limitation, and possible complication avoidance. *Neurosurg Rev* 35, 331-338; discussion 338-340

Chowdhary A, Spence AM, Sales L, Rostomily RC, Rockhill JK und Silbergeld DL (2012): Radiation associated tumors following therapeutic cranial radiation. *Surg Neurol Int* 3, 48

Clark AJ, Sughrue ME, Ivan ME, Aranda D, Rutkowski MJ, Kane AJ, Chang S und Parsa AT (2010): Factors influencing overall survival rates for patients with pineocytoma. *J Neurooncol* 100, 255-260

Colin C, Padovani L, Chappe C, Mercurio S, Scavarda D, Loundou A, Frassinetti F, Andre N, Bouvier C, Korshunov A, et al. (2012): Outcome analysis of childhood pilocytic astrocytomas: a retrospective study of 148 cases at a single institution. *Neuropathol Appl Neurobiol*

Cummings TJ, Burchette JL und McLendon RE (2001): CD34 and dural fibroblasts: the relationship to solitary fibrous tumor and meningioma. *Acta Neuropathol* 102, 349-354

DeGirolami U und Schmidek H (1973): Clinicopathological study of 53 tumors of the pineal region. *J Neurosurg* 39, 455-462

Dhami P, Coffey AJ, Abbs S, Vermeesch JR, Dumanski JP, Woodward KJ, Andrews RM, Langford C und Vetrie D (2005): Exon array CGH: detection of copy-number changes at the resolution of individual exons in the human genome. *Am J Hum Genet* 76, 750-762

Doty P, Marmur J, Eigner J und Schildkraut C (1960): Strand Separation and Specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Physical Chemical Studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 46, 461-476

du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P und Cremer T (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90, 590-610

Dumrongpisutikul N, Intrapromkul J und Yousem DM (2012): Distinguishing between germinomas and pineal cell tumors on MR imaging. *Am J Neuroradiol* 33, 550-555

Edwards MS, Hudgins RJ, Wilson CB, Levin VA und Wara WM (1988): Pineal region tumors in children. *J Neurosurg* 68, 689-697

Fakhran S und Escott EJ (2008): Pineocytoma mimicking a pineal cyst on imaging: true diagnostic dilemma or a case of incomplete imaging? *Am J Neuroradiol* 29, 159-163

Fauchon F, Jouvét A, Paquis P, Saint-Pierre G, Mottolese C, Ben Hassel M, Chauveinc L, Sichez JP, Philippon J, Schlienger M, et al. (2000): Parenchymal pineal tumors: a clinicopathological study of 76 cases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46, 959-968

Feng X, Zhang S, Ichikawa T, Koga H, Washiyama K, Motoyama T und Kumanishi T (1995): Intracranial germ cell tumors: detection of p53 gene mutations by single-strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 86, 555-561

Fevre-Montange M, Vasiljevic A, Champier J und Jouvét A (2010): Histopathology of tumors of the pineal region. *Future Oncol* 6, 791-809

Fleming AJ und Chi SN (2012): Brain tumors in children. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 42, 80-103

Fontana EJ, Garvin J, Feldstein N und Anderson RC (2011): Pediatric considerations for pineal tumor management. *Neurosurg Clin N Am* 22, 395-402

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurler ME, et al. (2006): Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 16, 949-961

Goelz SE, Hamilton SR und Vogelstein B (1985): Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 130, 118-126

Grill J, Avet-Loiseau H, Lellouch-Tubiana A, Sevenet N, Terrier-Lacombe MJ, Venuat AM, Doz F, Sainte-Rose C, Kalifa C und Vassal G (2002): Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. *Cancer Genet Cytogenet* 136, 121-125

Grozinsky-Glasberg S, Fichman S und Shimon I (2010): Metastatic bronchial neuroendocrine tumor to the pineal gland: a unique manifestation of a rare disease. *Hormones (Athens)* 9, 87-91

Gunn SR, Robetorye RS und Mohammed MS (2007): Comparative genomic hybridization arrays in clinical pathology: progress and challenges. *Mol Diagn Ther* 11, 73-77

Gutenberg A, Brandis A, Hong B, Gunawan B, Enders C, Schaefer IM, Burger R, Ostertag H, Gaab M, Krauss JK, et al. (2011): Common molecular cytogenetic pathway in papillary tumors of the pineal region (PTPR). *Brain Pathol* 21, 672-677

Hanft SJ, Isaacson SR und Bruce JN (2011): Stereotactic radiosurgery for pineal region tumors. *Neurosurg Clin N Am* 22, 413-420

Hasselblatt M, Blumcke I, Jeibmann A, Rickert CH, Jouvét A, van de Nes JA, Kuchelmeister K, Brunn A, Fevre-Montange M und Paulus W (2006): Immunohistochemical profile and chromosomal imbalances in papillary tumours of the pineal region. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32, 278-283

Hermesen MA, Meijer GA, Baak JP, Joenje H und Walboomers JJ (1996): Comparative genomic hybridization: a new tool in cancer pathology. *Hum Pathol* 27, 342-349

Herrick MK und Rubinstein LJ (1979): The cytological differentiating potential of pineal parenchymal neoplasms (true pinealomas). A clinicopathological study of 28 tumours. *Brain* 102, 289-320

Hoffman HJ, Yoshida M, Becker LE, Hendrick EB und Humphreys RP (1994): Pineal region tumors in childhood. Experience at the Hospital for Sick Children. 1983. *Pediatr Neurosurg* 21, 91-103; discussion 104

Houldsworth J, Xiao H, Murty VV, Chen W, Ray B, Reuter VE, Bosl GJ und Chaganti RS (1998): Human male germ cell tumor resistance to cisplatin is linked to TP53 gene mutation. *Oncogene* 16, 2345-2349

Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S und Waldman F (1994): Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 145, 1301-1308

Iwato M, Tachibana O, Tohma Y, Nitta H, Hayashi Y und Yamashita J (2000): Molecular analysis for p53 and mdm2 in intracranial germ cell tumors. *Acta Neuropathol* 99, 21-25

Jelinek WR und Schmid CW (1982): Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu Rev Biochem* 51, 813-844

Jouvet A, Fauchon F, Liberski P, Saint-Pierre G, Didier-Bazes M, Heitzmann A, Delisle MB, Biassette HA, Vincent S, Mikol J, et al. (2003): Papillary tumor of the pineal region. *Am J Surg Pathol* 27, 505-512

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F und Pinkel D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821

Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW und Pinkel D (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 231-243

Kang JK, Jeun SS, Hong YK, Park CK, Son BC, Lee IW und Kim MC (1998): Experience with pineal region tumors. *Childs Nerv Syst* 14, 63-68

Kees UR, Biegel JA, Ford J, Ranford PR, Peroni SE, Hallam LA, Parmiter AH, Willoughby ML und Spagnolo D (1994): Enhanced MYCN expression and isochromosome 17q in pineoblastoma cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 9, 129-135

Kees UR, Spagnolo D, Hallam LA, Ford J, Ranford PR, Baker DL, Callen DF und Biegel JA (1998): A new pineoblastoma cell line, PER-480, with der(10)t(10;17), der(16)t(1;16), and

enhanced MYC expression in the absence of gene amplification. *Cancer Genet Cytogenet* 100, 159-164

Kelly RB, Cozzarelli NR, Deutscher MP, Lehman IR und Kornberg A (1970): Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. *J Biol Chem* 245, 39-45

Khafaga Y, El Weshi A, Nazmy M, Hassounah M, Alshail E, Moussa E, Allam A, Alkofide A, Jamshed A, Elhousseiny G, et al. (2012): Intracranial germ cell tumors: a single-institution experience. *Ann Saudi Med* 32, 359-365

Kirchhoff M, Gerdes T, Rose H, Maahr J, Ottesen AM und Lundsteen C (1998): Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry* 31, 163-173

Kleinman GM, Schoene WC, Walshe TM, 3rd und Richardson EP, Jr. (1978): Malignant transformation in benign cerebellar astrocytoma. Case report. *J Neurosurg* 49, 111-118

Knierim DS und Yamada S (2003): Pineal tumors and associated lesions: the effect of ethnicity on tumor type and treatment. *Pediatr Neurosurg* 38, 307-323

Kodera T, Bozinov O, Surucu O, Ulrich NH, Burkhardt JK und Bertalanffy H (2011): Neurosurgical venous considerations for tumors of the pineal region resected using the infratentorial supracerebellar approach. *J Clin Neurosci* 18, 1481-1485

Komminoth P (1992): Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. *Diagn Mol Pathol* 1, 142-150

Kornberg A, Lieberman I und Simms ES (1955a): Enzymatic synthesis of purine nucleotides. *J Biol Chem* 215, 417-427

Kornberg A, Lieberman I und Simms ES (1955b): Enzymatic synthesis and properties of 5-phosphoribosylpyrophosphate. *J Biol Chem* 215, 389-402

Krieg SM, Slawik H, Meyer B, Wiegand M und Stoffel M (2012): Sleep disturbance after pinealectomy in patients with pineocytoma WHO degrees I. *Acta Neurochir (Wien)* 154, 1399-1405

Kyritsis AP (2010): Management of primary intracranial germ cell tumors. *J Neurooncol* 96, 143-149

Lacroix-Boudhrioua V, Linglart A, Ancel PY, Falip C, Bougneres PF und Adamsbaum C (2011): Pineal cysts in children. *Insights Imaging* 2, 671-678

Landegent JE, Jansen in de Wal N, Dirks RW, Bao F und van der Ploeg M (1987): Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 77, 366-370

Lapras C, Patet JD, Mottolese C und Lapras C, Jr. (1987): Direct surgery for pineal tumors: occipital-transtentorial approach. *Prog Exp Tumor Res* 30, 268-280

Lee SH, Shin MS, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee HK, Park JY, Oh RR, Jang JJ, Park KM, et al. (1999): Point mutations and deletions of the Bcl10 gene in solid tumors and malignant lymphomas. *Cancer Res* 59, 5674-5677

Li J, Recinos PF, Orr BA, Burger PC, Jallo GI und Recinos VR (2011): Papillary tumor of the pineal region in a 15-month-old boy. *J Neurosurg Pediatr* 7, 534-538

Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L und Ward DC (1988): Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* 80, 224-234

Lieberman I, Kornberg A und Simms ES (1955): Enzymatic synthesis of nucleoside diphosphates and triphosphates. *J Biol Chem* 215, 429-440

Lockwood WW, Chari R, Chi B und Lam WL (2006): Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genetics* 14, 139-148

Lorenzetti M, Motta F, Campanella R, Bauer D, Assi A, Arienta C, Gaini SM und Caroli M (2011): Adjuvant temozolomide chemotherapy for treatment of papillary tumor of the pineal region. *World Neurosurg* 76, 160-163

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW und Kleihues P (2007): The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109

Magalhaes J, Rostad S, Foltz G, Pytel P und Rodriguez FJ (2012): Cellular pleomorphism in papillary tumors of the pineal region. *Brain Tumor Pathol* epub

Marcol W, Mander M, Grajkowska W, Malinowska-Kolodziej I, Olakowska E, Wlasczuk A und Lewin-Kowalik J (2009): Apoptotic proteins and markers of differentiation in childhood pineal parenchymal tumors: relationships and prognostic value. *Cent Eur Neurosurg* 70, 115-124

Marmur J und Lane D (1960): Strand Separation and Specific Recombination in Deoxyribonucleic Acids: Biological Studies. Proc Natl Acad Sci U S A 46, 453-461

Marx KA, Allen JR und Hearst JE (1976): Chromosomal localizations by in situ hybridization of the repetitious human DNA families and evidence of their satellite DNA equivalents. Chromosoma 59, 23-42

Matsutani M, Sano K, Takakura K, Fujimaki T, Nakamura O, Funata N und Seto T (1997): Primary intracranial germ cell tumors: a clinical analysis of 153 histologically verified cases. J Neurosurg 86, 446-455

Meselson M und Stahl FW (1958): The replication of DNA. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 23, 9-12

Miller S, Rogers HA, Lyon P, Rand V, Adamowicz-Brice M, Clifford SC, Hayden JT, Dyer S, Pfister S, Korshunov A, et al. (2011): Genome-wide molecular characterization of central nervous system primitive neuroectodermal tumor and pineoblastoma. Neuro Oncol 13, 866-879

Mohindra S und Savardekar A (2012): Management problems in a case of third ventricular choroid plexus papilloma. J Pediatr Neurosci 7, 40-42

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, et al. (1998): Identification of the critical region of 12p over-representation in testicular germ cell tumors of adolescents and adults. Oncogene 16, 2617-2627

Musolino A, Cambria S, Rizzo G und Cambria M (1993): Symptomatic cysts of the pineal gland: stereotactic diagnosis and treatment of two cases and review of the literature. Neurosurgery 32, 315-320; discussion 320-311

Ng HK (1995): Cytologic diagnosis of intracranial germinomas in smear preparations. Acta Cytol 39, 693-697

Ng HK, Choi PC, Wong CW, To KF und Poon WS (2000): Metastatic solitary fibrous tumor of the meninges. Case report. J Neurosurg 93, 490-493

Nozaki M, Tada M, Matsumoto R, Sawamura Y, Abe H und Iggo RD (1998): Rare occurrence of inactivating p53 gene mutations in primary non-astrocytic tumors of the central nervous system: reappraisal by yeast functional assay. Acta Neuropathol 95, 291-296

Ogawa K, Tada T, Takahashi S, Sugiyama N, Inaguma S, Takahashi SS und Shirai T (2004): Malignant solitary fibrous tumor of the meninges. *Virchows Arch* 444, 459-464

Olie RA, Looijenga LH, Boerrigter L, Top B, Rodenhuis S, Langeveld A, Mulder MP und Oosterhuis JW (1995): N- and KRAS mutations in primary testicular germ cell tumors: incidence and possible biological implications. *Genes Chromosomes Cancer* 12, 110-116

Pardue ML und Gall JG (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64, 600-604

Parwani AV, Baisden BL, Erozan YS, Burger PC und Ali SZ (2005): Pineal gland lesions: a cytopathologic study of 20 specimens. *Cancer* 105, 80-86

Paulsen F und Waschke J: *Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen*. 23. Auflage. Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München, 2010, 285

Pedersen CL und Romner B (2012): Current treatment of low grade astrocytoma: A review. *Clin Neurol Neurosurg* [epub](#)

Pettorini BL, Al-Mahfoud R, Jenkinson MD, Avula S, Pizer B und Mallucci C (2012): Surgical pathway and management of pineal region tumours in children. *Childs Nerv Syst* [epub](#)

Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J und Gray J (1988): Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9138-9142

Pinkel D, Segraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, et al. (1998): High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 207-211

Piper J, Rutovitz D, Sudar D, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Waldman FM, Gray JW und Pinkel D (1995): Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19, 10-26

Pizem J, Matos B und Popovic M (2004): Malignant intracranial solitary fibrous tumour with four recurrences over a 30-year period. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30, 696-701

Pollack IF (2012): Surgical options for pineal region tumors. *World Neurosurg* 77, 302-303

Popovic EA und Kelly PJ (1993): Stereotactic procedures for lesions of the pineal region. *Mayo Clin Proc* 68, 965-970

Poppen JL und Marino R, Jr. (1968): Pinealomas and tumors of the posterior portion of the third ventricle. *J Neurosurg* 28, 357-364

Rainho CA, Rogatto SR, de Moraes LC und Barbieri-Neto J (1992): Cytogenetic study of a pineocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 64, 127-132

Rao PH, Houldsworth J, Palanisamy N, Murty VV, Reuter VE, Motzer RJ, Bosl GJ und Chaganti RS (1998): Chromosomal amplification is associated with cisplatin resistance of human male germ cell tumors. *Cancer Res* 58, 4260-4263

Regis J, Bouillot P, Rouby-Volot F, Figarella-Branger D, Dufour H und Peragut JC (1996): Pineal region tumors and the role of stereotactic biopsy: review of the mortality, morbidity, and diagnostic rates in 370 cases. *Neurosurgery* 39, 907-912; discussion 912-904

Reith W und Yilmaz U (2012): Hydrozephalus und intrakranielle Hypotension. *Radiologe* 52, 821-826

Rickert CH, Simon R, Bergmann M, Dockhorn-Dworniczak B und Paulus W (2000): Comparative genomic hybridization in pineal germ cell tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 815-821

Rickert CH, Simon R, Bergmann M, Dockhorn-Dworniczak B und Paulus W (2001): Comparative genomic hybridization in pineal parenchymal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 30, 99-104

Rickert CH, Korshunov A und Paulus W (2006): Chromosomal imbalances in clear cell ependymomas. *Mod Pathol* 19, 958-962

Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C und Berg P (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113, 237-251

Ringertz N, Nordenstam H und Flyger G (1954): Tumors of the pineal region. *J Neuropathol Exp Neurol* 13, 540-561

Roncaroli F und Scheithauer BW (2007): Papillary tumor of the pineal region and spindle cell oncocytoma of the pituitary: new tumor entities in the 2007 WHO Classification. *Brain Pathol* 17, 314-318

Rosenblum M, Matsutani M und van Meir E: CNS germ cell tumours; in: *Tumours of the nervous system*; Kleihues P und Cavenee W; IARC, Lyon, 2000, 208-214

Sadighi Z und Slopis J (2013): Pilocytic Astrocytoma: A Disease With Evolving Molecular Heterogeneity. *J Child Neurol*

Sano K (1999): Pathogenesis of intracranial germ cell tumors reconsidered. *J Neurosurg* 90, 258-264

Sanoudou D, Tingby O, Ferguson-Smith MA, Collins VP und Coleman N (2000): Analysis of pilocytic astrocytoma by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 82, 1218-1222

Sato K und Kubota T (2009): Pathology of pineal parenchymal tumors. *Prog Neurol Surg* 23, 12-25

Schild SE, Scheithauer BW, Schomberg PJ, Hook CC, Kelly PJ, Frick L, Robinow JS und Buskirk SJ (1993): Pineal parenchymal tumors. Clinical, pathologic, and therapeutic aspects. *Cancer* 72, 870-880

Schild SE, Scheithauer BW, Haddock MG, Wong WW, Lyons MK, Marks LB, Norman MG und Burger PC (1996): Histologically confirmed pineal tumors and other germ cell tumors of the brain. *Cancer* 78, 2564-2571

Schildkraut C (1965): Dependence of the melting temperature of DNA on salt concentration. *Biopolymers* 3, 195-208

Schweizer D (1976): Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58, 307-324

Selvanathan SK, Hammouche S, Smethurst W, Salminen HJ und Jenkinson MD (2012): Outcome and prognostic features in adult pineoblastomas: analysis of cases from the SEER database. *Acta Neurochir (Wien)* 154, 863-869

Sharp PA, Sugden B und Sambrook J (1973): Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055-3063

Shlomit R, Ayala AG, Michal D, Ninett A, Frida S, Boleslaw G, Gad B, Gideon R und Shlomi C (2000): Gains and losses of DNA sequences in childhood brain tumors analyzed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 121, 67-72

Singer MF (1982): SINEs and LINEs: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28, 433-434

Smith AB, Rushing EJ und Smirniotopoulos JG (2010): From the archives of the AFIP: lesions of the pineal region: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 30, 2001-2020

Speicher MR, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T und Ried T (1993): Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet* 2, 1907-1914

Sreekantaiah C, Jockin H, Brecher ML und Sandberg AA (1989): Interstitial deletion of chromosome 11q in a pineoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 39, 125-131

Stern JD und Ross DA (1993): Stereotactic management of benign pineal region cysts: report of two cases. *Neurosurgery* 32, 310-314; discussion 314

Stoiber EM, Schaible B, Herfarth K, Schulz-Ertner D, Huber PE, Debus J und Oertel S (2010): Long term outcome of adolescent and adult patients with pineal parenchymal tumors treated with fractionated radiotherapy between 1982 and 2003--a single institution's experience. *Radiat Oncol* 5, 122

Szymas J, Wolf G, Petersen S und Schluns K (2000): Comparative genomic hybridisation indicate two distinct subgroups of pilocytic astrocytomas. *Neurosurgical Focus* 1-6

Tabrizi RD, Mittelbronn M, Marquardt G und Hattingen E (2012): Radiologically typical pilocytic astrocytoma with histopathological signs of atypia. *Childs Nerv Syst* epub,

Tate MC, Rutkowski MJ und Parsa AT (2011): Contemporary management of pineoblastoma. *Neurosurg Clin N Am* 22, 409-412

Tihan T, Viglione M, Rosenblum MK, Olivi A und Burger PC (2003): Solitary fibrous tumors in the central nervous system. A clinicopathologic review of 18 cases and comparison to meningeal hemangiopericytomas. *Arch Pathol Lab Med* 127, 432-439

Tsumanuma I, Sato M, Okazaki H, Tanaka R, Washiyama K, Kawasaki T und Kumanishi T (1995): The analysis of p53 tumor suppressor gene in pineal parenchymal tumors. *Noshuyo Byori* 12, 39-43

van Meir E, Oosterhuis JW und Looijenga LH: Genesis and genetics of intracranial germ cell tumors.; in: *Intracranial germ cell tumors.*; Sawamura Y, Shirato H und de Tribolet N; Wien, 1998, 45-76

Wan TS und Ma ES (2012): Molecular cytogenetics: an indispensable tool for cancer diagnosis. *Chang Gung Med J* 35, 96-110

Watson JD und Crick FH (1953): Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738

Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ und van Diest PJ (1999): Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 52, 243-251

Wemmert S, Romeike BF, Ketter R, Steudel WI, Zang KD und Urbschat S (2006): Intratumoral genetic heterogeneity in pilocytic astrocytomas revealed by CGH-analysis of microdissected tumor cells and FISH on tumor tissue sections. *Int J Oncol* 28, 353-360

Wetmur JG und Davidson N (1968): Kinetics of renaturation of DNA. *J Mol Biol* 31, 349-370

Wilfinger WW, Mackey K und Chomczynski P (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22, 474-476, 478-481

Wiltshire RN, Herndon JE, 2nd, Lloyd A, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH und McLendon RE (2004): Comparative genomic hybridization analysis of astrocytomas: prognostic and diagnostic implications. *J Mol Diagnostics* 6, 166-179

Zhang J, Cheng H, Qiao Q, Zhang JS, Wang YM, Fu X und Li Q (2010): Malignant solitary fibrous tumor arising from the pineal region: case study and literature review. *Neuropathology* 30, 294-298

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Veit Rohde, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Brück, Herrn Prof. Dr. Laszlo Füzesi, Herrn Prof. Dr. Hans-Christoph Ludwig, Frau Prof. Dr. Christine Stadelmann, Dr. Stubenrauch und bei Frau Privat-Dozentin Dr. Angelika Gutenberg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die interessante Themenstellung und die gute Einarbeitung bedanken. Mein besonderer Dank gilt ihnen aber vor allem für ihre ständige Gesprächsbereitschaft. Ebenfalls danken möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilungen für Neurochirurgie und Neuropathologie für das freundliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Privat-Dozentin Dr. Angelika Gutenberg.

Lebenslauf

Ich wurde als erstes Kind von Elke Böhrnsen und Volker Böhrnsen am 23.09.1979 in Hamburg geboren. Von 1986 bis 1990 besuchte ich die Oberstadtgrundschule in Geesthacht. Zwischen 1990 und 2000 besuchte ich das Otto-Hahn Gymnasium in Geesthacht, welches ich mit Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife abschloss. In dem Jahr 1998 wurde ich als Mitglied der „Rhode Island Honor Society for outstanding scholarship, service and leadership“ aufgenommen. Meinen Zivildienst leistete ich von 2000 bis 2001 in den Sonderpädagogischen Einrichtungen „Adelby“ in Flensburg.

Das Studium der Humanmedizin begann ich im Oktober 2001 an der Universität zu Lübeck und schloss dieses im Juni 2008 mit Bestehen der Zweiten Staatsprüfung ab. Von Juli bis Oktober 2008 arbeitete ich als „Medical Fellow“ in der Abteilung für Kinderchirurgie sowie Kiefer- und Gesichtschirurgie am „Hospital Geral, Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasilien“. In dem Jahr 2003 wurde ich als Mitglied in die „Studienstiftung des Deutschen Volkes“ aufgenommen und in dem Zeitraum von 2003 bis 2008 als Stipendiat aktiv gefördert. Von 2005 bis 2009 war ich Doktorand der interdisziplinären AG Stammzellbiologie der Medizinischen Klinik I (Prof. Dr. Kramer, Direktor: Prof. Dr. Lehnert) und des Instituts für Medizinische Molekularbiologie (Prof. Dr. Rohwedel, Direktor: Prof. Dr. Tautz) der Universität zu Lübeck. Im Jahr 2007 wurde ich aktives Mitglied der „Deutschen Gesellschaft für Stammzellforschung“. Im Jahr 2009 schloss ich meine Arbeiten in der interdisziplinären AG Stammzellbiologie mit dem Erlangen des Doktorgrads für Medizin ab. Das Studium der Zahnmedizin begann ich im Oktober 2008 an der Georg-August-Universität zu Göttingen und schloss dieses im Mai 2012 mit Bestehen der zahnärztlichen Staatsprüfung ab.

Von April 2009 bis April 2011 arbeitete ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Neurochirurgie unter Prof. Dr. Veit Rohde im Zentrum für Neurologische Medizin. Seit April 2011 arbeite ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen. Im Frühjahr 2011 begann ich in der Abteilung für Neurochirurgie mit der Arbeit zur vorliegenden Dissertation.