

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. F. HOFSTÄDTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Differenzierung der drei häufigsten Subtypen des Nierenzellkarzinoms  
anhand einer immunhistochemischen Markerkombination**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Martin Killermann

2009







AUS DEM LEHRSTUHL FÜR PATHOLOGIE  
PROF. DR. F. HOFSTÄDTER  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Differenzierung der drei häufigsten Subtypen des Nierenzellkarzinoms  
anhand einer immunhistochemischen Markerkombination**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Martin Killermann

2009



Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Arndt Hartmann

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Wolf F. Wieland

Tag der mündlichen Prüfung:

15.10.2009









# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms	1
1.2 Subtypen des Nierenzellkarzinoms und deren Häufigkeit	1
1.3 Differenzierung der Subtypen des Nierenzellkarzinoms	2
1.3.1 Makroskopischer Befund	4
1.3.2 Mikroskopischer Befund	5
1.3.3 Elektronenmikroskopischer Befund	6
1.3.4 Zytogenetik	7
1.4 TNM-Klassifikation und Differenzierungsgrade	8
1.5 Fragestellung der Arbeit	11
 <b>2. Material und Methoden</b>	 <b>13</b>
2.1 Erstellung einer Nierenzellkarzinomdatenbank	13
2.2 Zusammenstellung passender Patienten-Triplets	14
2.3 Klinische Daten der Patienten	15
2.4 Erfassung der Nachsorge-Daten der Regensburger Fälle	18
2.5 Erstellung eines <i>Tissue Micro Array</i> (TMA)	19
2.6 Immunhistochemische Färbung der TMAs	19
2.6.1 Entparaffinieren	19
2.6.2 Demaskierung der Antigene	20
2.6.3 Färben mit Blockade endogener Biotin-Aktivität	20
2.6.4 Färben ohne Blockade endogener Biotin-Aktivität	21
2.7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	22
2.7.1 Auswertungsmodalität CD 10	22
2.7.2 Auswertungsmodalität KIT	23
2.7.3 Auswertungsmodalität Parvalbumin und Vimentin	23
2.7.4 Auswertungsmodalität AMACR	23
2.7.5 Auswertungsmodalität GST- $\alpha$	23
2.7.6 Auswertungsmodalität CK 19	24
2.7.7 Auswertungsmodalität CA II	24

2.8	Statistische Auswertung	24
2.9	Aufstellung einer immunhistochemischen Markerkombination und Zuordnung der Nierenzellkarzinome zu den einzelnen Subtypen	25
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	CD 10-Expression	26
3.2	KIT-Expression	27
3.3	Parvalbumin-Expression	28
3.4	Vimentin-Expression	30
3.5	AMACR-Expression	31
3.6	GST- $\alpha$ -Expression	32
3.7	CK 19-Expression	34
3.8	CA II-Expression	36
3.8.1	Vierstufige Einteilung	36
3.8.2	Zweistufige Einteilung	37
3.9	Diagnostik der Nierenzellkarzinome anhand einer immunhistochemischen Markerkombination aus CD 10, GST- $\alpha$ , AMACR, CK 19, KIT und Parvalbumin	39
3.9.1	Hellzelliges Nierenzellkarzinom	39
3.9.2	Papilläres Nierenzellkarzinom	39
3.9.3	Chromophobes Nierenzellkarzinom	40
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	CD 10-Expression	47
4.2	KIT-Expression	48
4.3	Parvalbumin-Expression	49
4.4	Vimentin-Expression	50
4.5	AMACR-Expression	51
4.6	GST- $\alpha$ -Expression	52
4.7	CK 19-Expression	53
4.8	CA II-Expression	54
4.9	Differenzierung der Nierenzellkarzinomsubtypen durch immunhistochemische Markerkombinationen	55

4.10	Auswahl einer geeigneten Markerkombination und Anwendung auf die untersuchten Karzinome	57
4.11	Bewertung und Ausblick auf die Zukunft	61
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>75</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms**

Das Nierenzellkarzinom ist das dritthäufigste urologische Malignom nach dem Prostata- und Harnblasenkarzinom. An ihm erkranken pro Jahr in Deutschland 11.000 Menschen. Dies entspricht einem Anteil von 1-2 % aller soliden Tumoren.

Seit Jahren kann man in der Bundesrepublik eine steigende Inzidenz von Nierenzellkarzinomen beobachten. Diese beträgt momentan für Männer 17, für Frauen 7 je 100.000 Einwohner jährlich.

Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 55. und 71. Lebensjahr [43].

## **1.2 Subtypen des Nierenzellkarzinoms und deren Häufigkeit**

Das Nierenzellkarzinom stellt keine einheitliche Tumorentität dar. Stattdessen differenziert man verschiedene Subtypen, die ihren Ursprung in den Epithelien der unterschiedlichen Tubulusabschnitte haben und sich u.a. morphologisch und zytogenetisch voneinander unterscheiden. In Tabelle 1 werden die einzelnen Subtypen und ihre Häufigkeit aufgeführt.

Tabelle 1: UICC Klassifikation der Nierenzellkarzinome mit Angabe der relativen Häufigkeit der einzelnen Subtypen [68].

Subtyp des Nierenzellkarzinoms	Relative Häufigkeit
Hellzelliges Nierenzellkarzinom	ca. 70 %
Papilläres Nierenzellkarzinom	ca. 10-15 %
Chromophobes Nierenzellkarzinom	ca. 5 %
Sammelrohr-Karzinom	ca. 1 %
seltene andere Nierenzellkarzinome	ca. 1 %
Unklassifizierte Karzinome	ca. 10 %

Unter den unklassifizierten Karzinomen befinden sich beispielsweise spindelzellige Tumoren, welche keine eigene Entität darstellen, sondern durch Dedifferenzierung aus den oben genannten Subtypen hervorgehen. Dabei sind hellzellige und chromophobe Nierenzellkarzinome häufiger als papilläre mit einer sarkomatoiden Komponente assoziiert [3, 12]. Die Inzidenz dieser Dedifferenzierung beträgt laut de Peralta-Venturina et al. 8 % bei hellzelligen und 9 % bei chromophoben gegenüber 3 % bei papillären Tumoren [16].

### 1.3 Differenzierung der Subtypen des Nierenzellkarzinoms

Eine Differenzierung der einzelnen Nierenzellkarzinomsubtypen ist erforderlich. So wurde bereits oben erläutert, dass die Nierenzellkarzinomsubtypen von unterschiedlichen Zellen des Tubulussystems der Niere ihren Ausgang nehmen. Im Verlauf entstehen auch jeweils unterschiedliche genetische Veränderungen, welche weiter unten genauer erläutert werden. Vor diesem Hintergrund ist es nicht korrekt, alle Nierenzellkarzinome als eine einzige Entität zusammenzufassen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass sich Nierenzellkarzinompatienten abhängig vom Subtyp ihres Tumors bezüglich ihrer Prognose unterscheiden. Mehrere Autoren kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass chromophobe und papilläre Nierenzellkarzinome verglichen mit dem hellzelligen eine

signifikant bessere Prognose aufweisen [5, 11, 31]. In Tabelle 2 werden die 5 Jahres-Überlebensraten in Abhängigkeit vom Nierenzellkarzinomsubtyp dargestellt.

Tabelle 2: 5 Jahres-Überlebensraten in Abhängigkeit vom Subtyp des Nierenzellkarzinoms [11]

Nierenzellkarzinomsubtyp	5 Jahres-Überlebensrate
Hellzelliges Nierenzellkarzinom	69 %
Papilläres Nierenzellkarzinom	87 %
Chromophobes Nierenzellkarzinom	87 %

Einzig in einer Studie von Onishi et al. stellte sich heraus, dass das papilläre Nierenzellkarzinom eine signifikant schlechtere Überlebensrate als das chromophobe zeigt [45]. Bei den meisten anderen Autoren war das nicht der Fall.

Mitursache für den schlechteren Krankheitsverlauf von Patienten mit hellzelligem Nierenzellkarzinom dürfte das höhere metastatische Potential dieses Subtyps sein [54]. Ljungberg et al. fanden heraus, dass zum Zeitpunkt der Diagnose bereits 37 % der hellzelligen Nierenzellkarzinome Fernmetastasen gestreut hatten. Bei papillären bzw. chromophoben Nierenzellkarzinomen waren es nur 16 bzw. 8 % [31].

Ein weiterer wichtiger Grund, warum eine exakte Differenzierung erfolgen sollte, ist die Möglichkeit diese Tumoren in Zukunft eventuell subtypspezifisch oder sogar individuell je nach Patient zu therapieren. Die einzige kurative Behandlung stellt momentan die Nephrektomie, bzw. die Nierenteilresektion dar. Für weit fortgeschrittene, metastasierte Tumoren konnte jedoch bis jetzt kein Durchbruch bezüglich einer Heilung erreicht werden. Einen neuen Ansatz stellt nun die zielgerichtete Therapie mit Medikamenten dar, die gegen bestimmte bei Tumoren fehlregulierte Signalwege gerichtet sind. Da bei jedem Nierenzellkarzinomsubtyp unterschiedliche Signalwege betroffen sind, sind auch jeweils andere Wirkstoffe erforderlich. Somit ist die genaue Kenntnis des Subtyps in Zukunft wichtig für die korrekte Therapiewahl. Derzeit ist eine gezielte Therapie nur für den HIF $\alpha$ -Signalweg bei hellzelligen Nierenzellkarzinomen erhältlich. Seit 2006 besteht für metastasierte und fortgeschrittene Nierenzellkarzinome die EU-weite Zulassung für die Substanzen Sunitinib und Sorafenib, die gegen den *vascular endothelial growth factor*-Rezeptor (VEGF-R) und den *platelet derived growth factor*-Rezeptor (PDGF-R) gerichtet sind [52].



Ein Beispiel für eine zielgerichtete Therapie könnte einmal auch die Verwendung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib sein, der gegen den KIT-Signalweg gerichtet ist. Dieser ist vor allem in chromophoben, sowie in sarkomatoid entdifferenzierten Nierenzellkarzinomen betroffen [10, 48].

Im Folgenden soll ein Ausblick gegeben werden auf die Unterscheidungsmöglichkeiten der drei häufigsten Nierenzellkarzinomsubtypen vor allem im Hinblick auf Morphologie und Zytogenetik.

### 1.3.1 Makroskopischer Befund

Durch makroskopische Begutachtung der Schnittfläche eines operativ entfernten Nierentumors kann noch keine sichere Diagnose eines bestimmten Karzinomsubtyps gestellt werden. Dennoch können erste Hinweise gefunden werden.

Das hellzellige Nierenzellkarzinom stellt sich meist als solider, gelbfarbiger Tumor dar, der oft gelappt ist und sich über die Schnittfläche vorwölbt. Normalerweise ist er von einer Pseudokapsel umgeben, manchmal wird aber auch die Niere diffus infiltriert. Häufig finden sich blasse Nekroseareale und dunkle Hämorrhagien, sowie zystische Bereiche [53]. Gelegentlich kommen fokale Verkalkungen bis hin zu Verknöcherungen vor [67].

Das papilläre Nierenzellkarzinom ist gut vom restlichen Nierenparenchym abgegrenzt [53]. Meist besitzt es eine kugelige Form und wird von einer fibrösen Pseudokapsel begrenzt. Die Schnittfläche ist leicht zerbröckelnd oder eher kompakt je nach histologischem Aufbau [67]. Die Ausdehnung der Tumoren ist hoch variabel, viele sind sehr groß. Oft kommen zystische Veränderungen, sowie extensive Hämorrhagien und Nekrosen vor. Häufiger als bei den anderen Nierenzellkarzinomsubtypen finden sich Kalzifikationen und Psammomkörperchen [53].

Chromophobe Nierenzellkarzinome bestehen abhängig von der Tumorgöße aus einem oder mehreren soliden Tumorknötchen mit leicht gelappter Oberfläche. Unfixiert erscheint die Schnittfläche homogen orange. Nach Formalinfixierung ändert sie sich in

beige oder sandfarben [73]. Die Abgrenzung zum nicht-neoplastischen Gewebe ist in der Regel scharf. Es finden sich keine oder wenige Einblutungen und Nekrosen [41].

### 1.3.2 Mikroskopischer Befund

Die mikroskopische Begutachtung HE-gefärbter Schnitte des Tumors durch den Pathologen ist Routine in der Diagnostik von Nierenzellkarzinomen.

Hellzellige Nierenzellkarzinome sind aufgebaut aus Zellen mit klarem Zytoplasma, hervorgerufen durch eingelagertes Glykogen und/oder Lipide. Diese Tumoren können verschiedene Wachstumsmuster zeigen, die oft in Kombination vorliegen. Meist sind sie kompakt, aber auch tubuläre und zystische Strukturen kommen vor. Die Kerne der Zellen sind gewöhnlich rund und zentral gelegen. Sie können klein und hyperchromatisch ohne sichtbaren Nucleolus sein, oder aber groß und pleomorph mit prominenten Nucleoli. Manchmal bestehen hellzellige Nierenzellkarzinome fast vollständig aus eosinophilen granulären Zellen, die durch einen besonders hohen Gehalt an Mitochondrien gekennzeichnet sind [53]. Die Eosinophilie kann dabei diffus zytoplasmatisch oder perinukleär angeordnet sein [67].

Die Mehrzahl der papillären Nierenzellkarzinome hat eine papilläre oder tubulopapilläre Architektur. Die übrigen können kompakt oder trabekulär erscheinen. Hervorgerufen wird dies durch dicht gedrängte bzw. lange, parallel angeordnete Papillen. Bei diesem Nierenzellkarzinomsubtyp existiert eine basophile Variante aus schmalen Zellen mit blassem oder klarem Zytoplasma. Die Basophilie beruht dabei auf einer hohen Kern/Plasma-Relation. Die Kerne zeigen eher geringe bis mittlere Pleomorphie und unauffällige Nucleoli. Die Zentren der Papillen sind mit schaumigen Makrophagen ausgefüllt. Neben dieser basophilen gibt es noch eine zweite eosinophile Variante bestehend aus Zellen mit reichlich eosinophilem Zytoplasma [53]. Die Eosinophilie wird hervorgerufen durch einen besonderen Reichtum an Mitochondrien [67]. Die Kerne sind meist mittel- bis hochgradig pleomorph. Schaumige Makrophagen finden sich selten [53]. Seit 2004 wird nach WHO die basophile Variante als Typ I und die eosinophile Variante als Typ II des papillären Nierenzellkarzinoms bezeichnet.

Das chromophobe Nierenzellkarzinom zeigt überwiegend ein solides, gelegentlich auch tubuläres oder cribriformes Wachstumsmuster [67]. Meist weist es in der HE-Färbung große polygonal begrenzte Zellen mit einem fein retikulierten transparenten Zytoplasma und einer prominenten Zellmembran auf, was einen pflanzenzellähnlichen Aspekt ergibt [73]. Oftmals enthalten die Tumorzellen zwei Zellkerne. Außerdem finden sich perinukleäre Aufhellungen. Mitosen sind generell selten [41].

Neben dieser typischen Variante des chromophoben Nierenzellkarzinoms gibt es noch eine sogenannte eosinophile Variante mit eosinophilem granulärem Zytoplasma [74]. Die Zellen dieser Variante tendieren zu einer geringeren Größe als die der typischen Variante [41].

Hilfreich für die Diagnose des chromophoben Nierenzellkarzinoms ist die Färbung mit kolloidalem Eisen nach Hale [20]. Diese führt zu einer diffusen, kräftig blauen Färbung des Zytoplasmas in einem retikulären Muster [15, 65, 76]. Auch die Membranen werden verstärkt betont [67].

Zwar können auch andere Tumoren in gewissem Grade eine positive Reaktion auf die Hale-Färbung zeigen, allerdings in einem anderen Reaktionsmuster [15].

### 1.3.3 Elektronenmikroskopischer Befund

Durch die Elektronenmikroskopie lassen sich für jede der drei Subtypen charakteristische Veränderungen feststellen. Des Weiteren können Rückschlüsse auf den ursprünglichen Zelltyp, von dem die malignen Tumoren ausgingen, gezogen werden.

Hellzellige Nierenzellkarzinome zeigen lange Mikrovilli auf der Oberfläche ihrer Zellen, ähnlich dem Bürstensaum des normalen proximalen Tubulusepithels. Außerdem finden sich reichlich Lipide und Glykogen [28]. Diese können in Form von Vakuolen, bzw. Granula das gesamte Zytoplasma ausfüllen. Im Gegensatz zum Grundtyp weist die eosinophile Variante des hellzelligen Nierenzellkarzinoms einen höheren Reichtum an Zellorganellen, insbesondere Mitochondrien auf [67].

Das papilläre Nierenzellkarzinom dagegen weist verschieden große Mikrovilli auf. Das Zytoplasma ist arm an Lipiden, sowie frei von Glykogen. Wie auch beim hellzelligen Nierenzellkarzinom vermutet man beim papillären als Ursprungsort den proximalen

Tubulus [28]. Die Zellen der eosinophilen Variante sind auch beim papillären Nierenzellkarzinom dicht mit Mitochondrien angefüllt, während beim Grundtyp nur spärlich Zellorganellen vorhanden sind [67].

Chromophobe Nierenzellkarzinome zeigen elektronenmikroskopisch Verwandtschaft mit den Schaltzellen Typ b des Sammelrohrs mit zahlreichen 150-300 nm messenden Vesikeln, die z.T. mit Innenbläschen versehen sind [69]. Man vermutet, dass diese Vesikel durch Ausbuchtungen der äußeren Mitochondrienmembran entstehen und Ergebnis einer fehlerhaften Mitochondriogenese sind [77].

Des weiteren zeichnen sich chromophobe Nierenzellkarzinome durch einen hohen Gehalt an Mitochondrien aus, die besonders in der eosinophilen Variante reichlich vorhanden sind [28, 65, 77]. Außerdem zeigen sich an der Oberfläche der Tumorzellen wenige kurze und gedrungene Mikrovilli [28].

#### 1.3.4 Zytogenetik

Jeder Subtyp des Nierenzellkarzinoms weist für ihn typische chromosomale Veränderungen auf. Dieser Sachverhalt trug maßgeblich zur Entwicklung der aktuellen oben genannten Klassifikation bei.

Spezifisch für das hellzellige Nierenzellkarzinom ist ein Verlust von Chromosom 3p, der in 96% aller Tumoren dieser Entität nachgewiesen werden konnte [70]. Weitere DNA-Verluste betreffen die Chromosomenregionen 4q, 6q, 8p, 9p, 13q, 14q und Xq. Zugewinne können für 5q, 7 und 17 gefunden werden [6, 23, 38, 49].

Papilläre Nierenzellkarzinome dagegen sind gekennzeichnet durch Tri- oder Tetrasomien der Chromosomen 7 und 17, sowie durch Verluste des Y-Chromosoms bei männlichen Patienten. Seltener findet man DNA-Zugewinne in den Bereichen 12q, 16q, und 20q [8, 14].

Für das chromophobe Nierenzellkarzinom konnte in einer Vielzahl von Studien ein multipler Chromosomenverlust nachgewiesen werden. Dabei kommt es zu einer

Kombination von Monosomien der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 [9, 24, 51, 58, 66].

Nagy et al. haben in ihrer Studie von 2004 genaue Angaben über die Häufigkeit des Verlusts der besagten Chromosomen gemacht [42]. Die erhaltenen Ergebnisse zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Prozentualer Anteil der chromophoben Nierenzellkarzinome, die das entsprechende Chromosom verloren haben [42]

Chromosom	1	2	6	10	13	17	21
Verlust in %	90	90	96	86	85	90	72

Jedes chromophobe Nierenzellkarzinom zeigt den Verlust von mindestens drei der genannten Chromosomen [42].

Als weiteres Charakteristikum konnte man eine Neuordnung von mitochondrialer DNA finden, eine Eigenschaft, die das chromophobe Nierenzellkarzinom mit dem benignen renalen Onkozytom teilt [26, 27].

## 1.4 TNM-Klassifikation und Differenzierungsgrade

Alle Nierenzellkarzinome werden unabhängig vom Subtyp, wie alle anderen Karzinome auch, anhand ihrer Ausdehnung nach TNM klassifiziert. Tabelle 4 zeigt die aktuelle TNM-Klassifikation der UICC aus dem Jahr 2002.

Tabelle 4: TNM-Klassifikation der UICC von 2002 [43]

T: Primärtumor	
T0:	Kein Anhalt für Primärtumor
T1a:	Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T1b:	Tumor mehr als 4 cm, aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung
T2:	Tumor mehr als 7 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
T3a:	Tumor infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht über die Gerotafaszie hinaus
T3b:	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c:	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells
T4:	Tumor infiltriert über die Gerotafaszie hinaus
TX:	Primärtumor kann nicht beurteilt werden

N: Regionäre Lymphknoten	
N0:	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1:	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
N2:	Metastase(n) in mehr als einem regionären Lymphknoten
NX:	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

M: Fernmetastasierung	
M0:	Keine Fernmetastasen
M1:	Fernmetastasen
MX:	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

Außerdem werden alle Nierenzellkarzinome histologisch in verschiedene Differenzierungsgrade nach Fuhrman eingeteilt. Diese werden in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Differenzierungsgrade des Nierenzellkarzinoms nach Fuhrman [43]

G: Histologisches Grading	
G1:	Gut differenziert
G2:	Mäßig differenziert
G3:	Schlecht differenziert

Die Klassifizierung der Nierenzellkarzinome nach TNM und Einteilung in Differenzierungsgrade hat ihren Sinn in der Festlegung des weiteren therapeutischen Procedere, wobei soweit möglich immer die operative Entfernung des Primärtumors und evtl. vorhandener Metastasen im Vordergrund steht. Die systemische Therapie fortgeschrittener Nierenzellkarzinome ist bislang immer noch schwierig und bedarf deshalb intensiver Forschung [43]. Wie bereits oben erwähnt verspricht man sich viel von der zielgerichteten Therapie gegen die bei Tumoren gestörten Signalwege.

Außerdem lässt die Einteilung nach TNM und Differenzierungsgrade Rückschlüsse auf die Prognose der betroffenen Patienten zu.

Patienten mit organbezogenen Nierenzellkarzinomen (T1, T2) weisen eine 5 Jahres-Überlebensrate von 60-90 % auf [17, 18, 35, 50, 59, 61, 80]. Diese hängt wesentlich von der Tumorgroße ab. So konnten Green et al. 1989 zeigen, dass Patienten mit Tumoren von unter 8 cm Durchmesser eine 5 Jahres-Überlebensrate von 95 % hatten, während sie bei Tumoren über 8 cm nur noch 65% betrug [19].

Das lymphogen metastasierte Nierenzellkarzinom geht mit einer sehr schlechten Prognose einher. Verschiedene Studien ergaben 5 Jahres-Überlebensraten zwischen 11 und 17 % [18, 56, 60, 61].

Fatal ist die Prognose bei Patienten mit Fernmetastasen. Diese weisen 5 Jahres-Überlebensraten von ca. 5-10 % auf mit einer medianen Überlebenszeit von 8 Monaten [75, 79]. Eine Ausnahme bilden Patienten mit resezierbaren solitären Lungenmetastasen [62].

Die prognostische Bedeutung der Invasion von Nierenvenen und Vena cava inferior wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren vertreten die Ansicht, dass bereits mikroskopische Gefäßinvasion zu einer erhöhten Progressionsrate führt [55, 80]. In den meisten Studien zeigte sich jedoch, dass eine renale Gefäßinvasion nicht als Indikator für eine schlechte Prognose angeführt werden kann [7, 18, 59, 61]. Dies gilt auch für Thromben der Vena cava, solange diese komplett operativ entfernt wurden [21, 29, 44].

Hinter dem Staging steht das Grading an zweiter Stelle hinsichtlich der prognostischen Relevanz [82]. Es konnte eine Korrelation zwischen Grading und Tumorgröße, sowie Auftreten von Fernmetastasen und lokalen Rezidiven ermittelt werden [57, 72].

## **1.5 Fragestellung der Arbeit**

Die Bedeutung der Differenzierung der einzelnen Nierenzellkarzinomsubtypen wurde weiter oben erläutert.

Die makroskopische Begutachtung des operativ entfernten Tumors kann zwar erste Hinweise geben, eine sichere Diagnose lässt sich aber hierdurch allein nicht stellen, da die Subtypen überlappende Charakteristika aufweisen.

Durch histopathologische Befundung lassen sich die meisten Nierenzellkarzinome sicher typisieren, doch existieren von allen Haupttypen eosinophile Varianten, die einander histologisch sehr ähnlich sind. Hier benötigt man einen sehr erfahrenen Pathologen, um die richtige Diagnose zu stellen. Da aber einige Subtypen, insbesondere das chromophobe Nierenzellkarzinom relativ selten sind, ist die erforderliche Erfahrung auch über einen längeren Zeitraum schwer zu erwerben.

Das Elektronenmikroskop könnte zur Differentialdiagnose verwendet werden, doch hat dieses Verfahren den Nachteil, dass es zu arbeitsintensiv, zu langwierig und nicht jedem Pathologen zugänglich ist. Aus diesem Grund wird es praktisch nicht eingesetzt.

Als vielversprechende Alternativen verbleiben zytogenetische Untersuchungen und der Einsatz von immunhistochemischen Markern, wobei sich diese Arbeit dem zweitgenannten Ansatz zuwendet.

Bisher wurden in einer Fülle an Studien zahlreiche Immunhistochemie-Marker an Nierenzellkarzinomen angewandt. Da sich die Verwendung nur eines einzigen Markers zur Unterscheidung der Subtypen als ungeeignet erwies, ging man zur Analyse von Proteinexpressionsmustern über. Eine geeignete Markerkombination konnte jedoch noch nicht identifiziert werden. Erschwert wird die Suche durch geringe Fallzahlen bei den seltenen Entitäten.

Ziel dieser Arbeit soll es nun sein eine Kombination von immunhistochemischen Markern zu finden, die eine korrekte Einordnung der drei häufigsten Tumorvarianten, nämlich



hellzelliges, papilläres und chromophobes Nierenzellkarzinom, inklusive ihrer eosinophilen Varianten erlaubt. Dadurch soll die Differenzialdiagnose der Nierenzellkarzinomentitäten deutlich erleichtert werden. Hierfür wurden aus bisherigen Studien sieben Kandidaten mit hohem Differenzierungspotential ausgewählt. Es handelt sich hierbei um KIT, Vimentin, CK 19, Carboanhydrase II (CA II), Glutathionyl-S-Transferase alpha (GST- $\alpha$ ),  $\alpha$ -Methyl-Acyl-CoA-Racemase (AMACR), Parvalbumin und CD 10. Diese sollen an je mindestens 60 Tumoren der drei genannten Entitäten untersucht werden, die dabei als *matched pairs* angeordnet sind. Das heißt: Für jedes hellzellige Nierenzellkarzinom wird dem Kollektiv je ein papilläres und ein chromophobes hinzugefügt, das hinsichtlich Tumorstadium und Differenzierungsgrad identisch ist. Dadurch soll der zu erwartende Einfluss dieser Parameter auf die Färbemuster der untersuchten Marker ausgeschaltet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Erstellung einer Nierenzellkarzinomdatenbank

Die OP-Bücher der Klinik und Poliklinik für Urologie der Universität Regensburg am Caritas-Krankenhaus St. Josef aus den Jahren 1992 - 2003 wurden nach Patienten durchsucht, die im betroffenen Zeitraum wegen eines Nierenzellkarzinoms mittels Nephrektomie, bzw. Nierenteilresektion behandelt wurden.

Auf diese Weise konnten 759 Patienten ausfindig gemacht werden, wobei in 10 Fällen beide Nieren betroffen waren. Das Geschlechtsverhältnis männlich : weiblich betrug 1,4 : 1. Das Alter zum Operationszeitpunkt reichte von 26 - 89 Jahren mit einem Durchschnitt von 63.

Aus den Akten dieser Patienten wurden relevante Daten in eine Excel-Tabelle übertragen. Insbesondere wurden erfasst:

- persönliche Daten: Alter, Geschlecht
- Vorerkrankungen: Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Adipositas, Zweittumore
- Risikofaktoren: Nikotin, Alkohol, nichtsteroidale Antiphlogistika
- Diagnoseanlass: Zufallsbefund, Symptome
- Durchgeführte Diagnostik: Sonografie, Infusionsurogramm (IUG), CT, MRT
- pathologische Aspekte: Tumorlokalisation, TNM-Stadium, nukleäre Differenzierungsgrade, Tumorgroße, histologischer Subtyp
- OP-Daten: Nephrektomie, Nierenteilresektion, Zugangsweg, OP-Dauer
- Dauer des stationären Aufenthalts

Zum TNM-Stadium muss angemerkt werden, dass alle Fälle anhand der aktuellen TNM-Klassifikation der UICC von 2002 neu eingeteilt wurden.

Die entstandene umfangreiche Nierenzellkarzinomdatenbank soll nicht nur Ausgangspunkt dieser Arbeit sein, sondern auch in Zukunft für weitere Studien auf diesem Gebiet genutzt werden.

## 2.2 Zusammenstellung passender Patienten-Triplets

Aus der erstellten Datenbank wurden sämtliche Patienten, die aufgrund eines chromophoben Nierenzellkarzinoms behandelt wurden, ausgewählt. Dies waren 37 Fälle. Um die Anzahl an Tumoren dieser seltenen Entität zu erhöhen, wurden weitere Patienten eingeschlossen, deren Karzinome an mit der Universität Regensburg kooperierenden pathologischen Instituten archiviert waren. In Tabelle 6 wird die Herkunft und die Anzahl dieser Fälle aufgeführt.

Tabelle 6: Kooperierende pathologische Institute und Anzahl der jeweils zur Verfügung gestellten chromophoben Nierenzellkarzinome

Kooperationspartner	Anzahl der chromophoben Nierenzellkarzinome
Institut für Pathologie und Zytologie am Klinikum Deggendorf	6
Institut für Pathologie der Friedrich Schiller Universität Jena	14
Institut für klinische Pathologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz	1
Department of Pathology, University of Vermont College of Medicine, Burlington, USA	8

Insgesamt konnten so 66 chromophobe Nierenzellkarzinome zusammengetragen werden. Diesen wurden nun aus der Datenbank jeweils ein hellzelliges und ein papilläres Karzinom zugeordnet. Besonderer Wert wurde auf identische T-Stadien und Differenzierungsgrade gelegt. Die Größe der Tumoren, sowie Alter und Geschlecht der Patienten wurden soweit möglich ebenfalls berücksichtigt.

Als nächstes wurden repräsentative Schnitte und Paraffinblöcke der Nierenzellkarzinome aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Universität Regensburg akquiriert. Die Auswahl geschah anhand der Histologiescheine. Von den oben genannten Kooperationspartnern dieser Arbeit wurden bereits geeignete Blöcke und die dazugehörigen HE-Schnitte gesendet.

Alle Schnitte wurden von einem erfahrenen Uropathologen der Universität Regensburg, Herrn Prof. Dr. med. Arndt Hartmann, nach der WHO-Einteilung von 2004 nachbefundet, v.a. hinsichtlich des Tumorsubtyps. Dabei wurden auch geeignete Tumorareale auf dem Objektträger markiert.

Von den mutmaßlich chromophoben Nierenzellkarzinomen wurden zusätzlich Leerschnitte angefertigt, die am Institut für klinische Pathologie, Universitätsspital Zürich, einer Hale-Färbung unterzogen wurden, um diesen Subtyp sicher zu identifizieren.

Unklare Fälle der drei Nierenzellkarzinomentitäten wurden von Prof. Dr. med. Hartmann und Prof. Dr. med. Holger Moch, Universität Zürich, gemeinschaftlich besprochen. Dabei wurden dann die endgültigen Subtypen festgelegt.

## 2.3 Klinische Daten der Patienten

Wie bereits erwähnt wurden 66 Patienten-Triplets aus je einem hellzelligen, papillären und chromophoben Nierenzellkarzinom zusammengestellt. Das ergibt insgesamt 198 Patienten.

Das Geschlechtsverhältnis männlich : weiblich beträgt etwa 1,5 : 1 (siehe Abb. 1).

Die Geschlechtsverteilung in Abhängigkeit vom Nierenzellkarzinomsubtyp wird in Abbildung 2 dargestellt.

Abb. 1: Geschlechtsverhältnis der Nierenzellkarzinompatienten

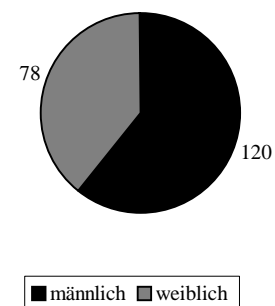
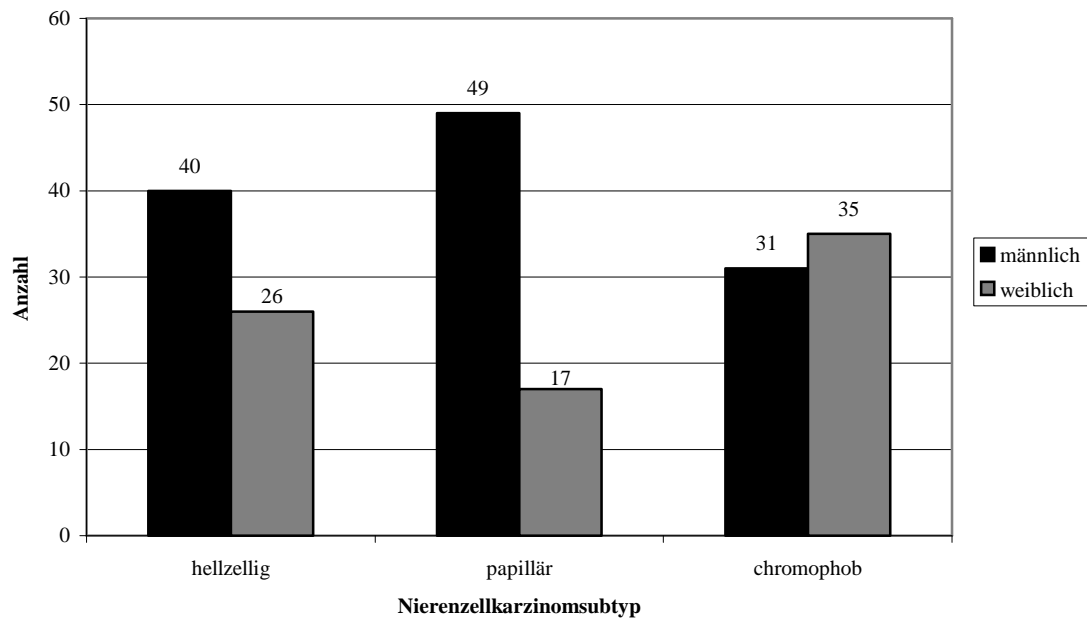
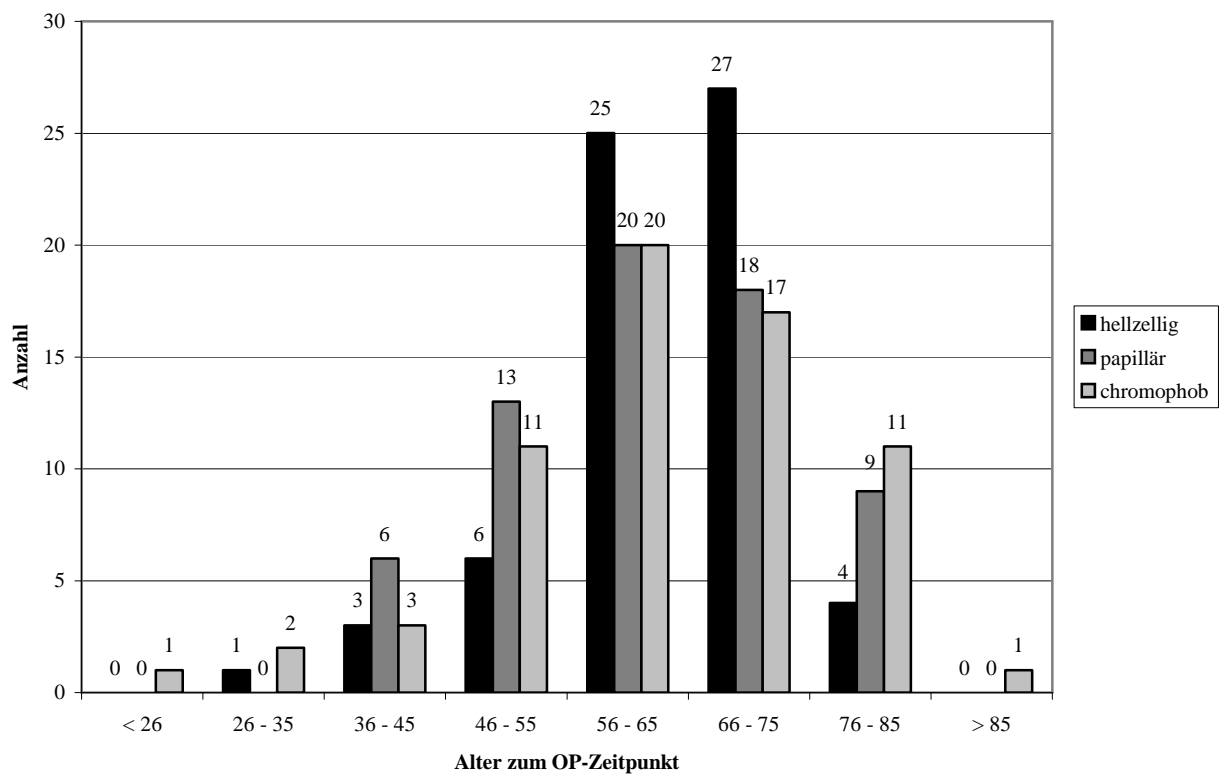


Abb. 2: Geschlechtsverteilung bezogen auf den Nierenzellkarzinomsubtyp



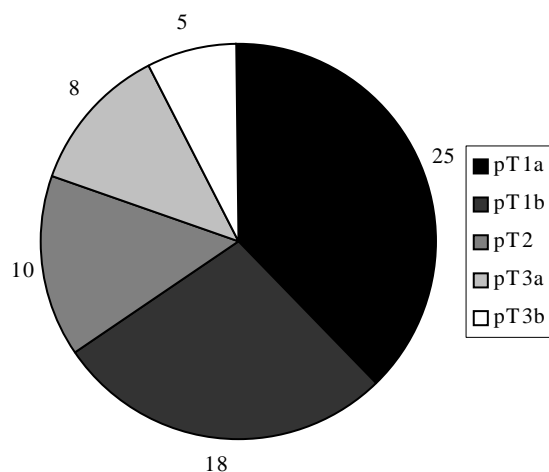
Das Durchschnittsalter der Patienten zum Operationszeitpunkt beträgt 63 Jahre mit einer Spanne von 19 - 87 Jahre. Die Verteilung auf verschiedene Altersgruppen bezogen auf den Nierenzellkarzinomsubtyp zeigt Abbildung 3. Bei allen drei Tumorentitäten war dabei das Durchschnittsalter identisch.

Abb. 3: Altersverteilung der Nierenzellkarzinome nach dem Subtyp

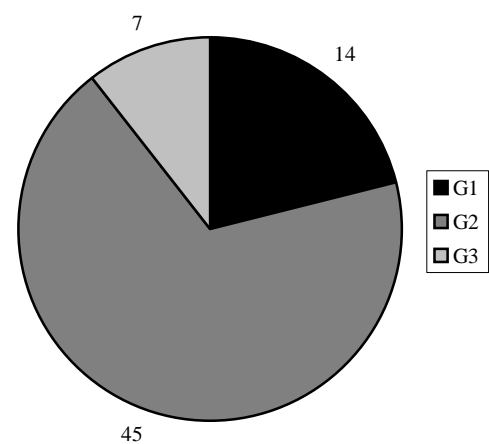


Die Karzinome je eines der 66 Triplets sind hinsichtlich des pT-Stadiums und des histologischen Differenzierungsgrades identisch. Abbildung 4 zeigt die Verteilung bzgl. des pT-Stadiums, Abbildung 5 bzgl. des Differenzierungsgrades.

**Abb. 4: Verteilung der Patiententriplets bzgl. des pT-Stadiums**



**Abb. 5: Verteilung der Patienten-Triplets bzgl. des Differenzierungsgrades**

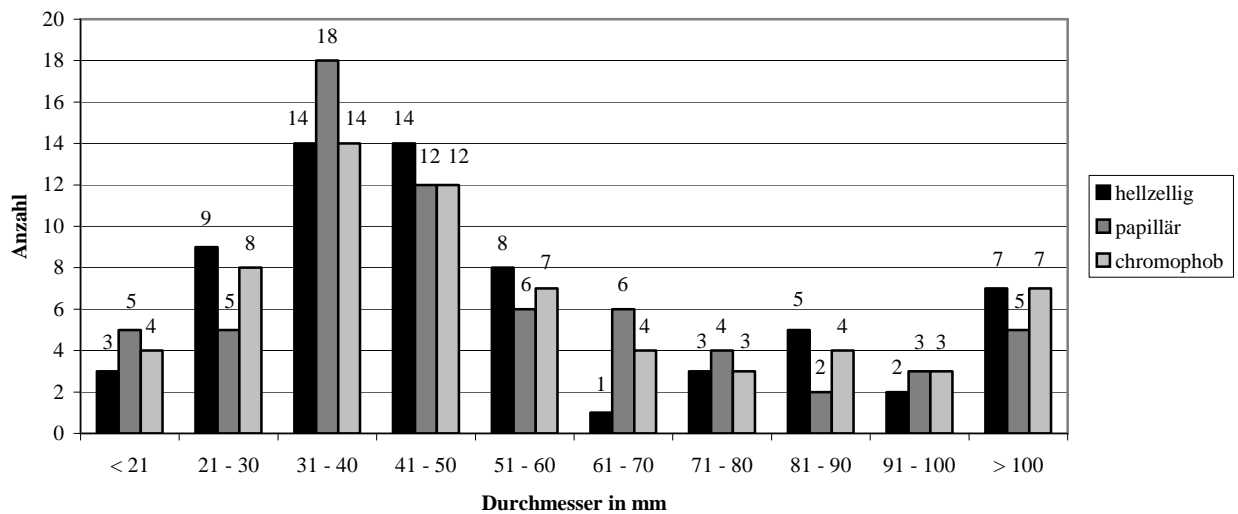


Lymphknotenmetastasen fanden sich bei sechs Patienten, je zwei von jeder Tumorentität. Bei acht Patienten waren prä-operativ Fernmetastasen diagnostiziert worden. Vier davon litten an einem papillären Nierenzellkarzinom, drei an einem hellzelligen und einer an einem chromophoben.

Die durchschnittliche Größe der 198 Nierenzellkarzinome beträgt 57 mm mit einer Spannweite von 10 - 220 mm. Die hellzelligen Nierenzellkarzinome erreichen dabei einen mittleren Durchmesser von 55 mm (10 - 120 mm), die papillären 58 mm (14 - 220 mm) und die chromophoben 59 mm (15 - 200 mm).

In Abbildung 6 wird die Verteilung der Nierenzellkarzinome in verschiedenen Größen-gruppen abhängig vom Subtyp dargestellt.

Abb. 6: Größenverteilung der Nierenzellkarzinome bzgl. des Subtyps



## 2.4 Erfassung der Nachsorge-Daten der Regensburger Fälle

Von allen in die Arbeit eingeschlossenen Patienten wurden die Nachsorge-Daten in Erfahrung gebracht. Hierbei war von besonderem Interesse, ob und ggf. in welchem Zeitraum nach der Operation ein Lokalrezidiv, bzw. Metastasen des Nierenzellkarzinoms auftraten. Bei Patienten, die bereits verstorben waren, wurde zusätzlich erfasst, ob der Tod tumorbedingt war.

Aus Gründen des US-Datenschutzes konnte von den acht Fällen aus Vermont kein *Follow up* erhoben werden. Aus Jena und Zürich wurden die benötigten Informationen geliefert. Bezüglich der Regensburger und Deggendorfer Fälle wurden zum einen Anfragen an das Tumorzentrum Regensburg gerichtet, zum anderen Kontakt mit den nachsorgenden Urologen und Hausärzten aufgenommen. In Ausnahmefällen wurden auch die Patienten selbst, bzw. bei Verstorbenen deren Angehörige befragt.

## **2.5 Erstellung eines *Tissue Micro Array* (TMA)**

Moch et al. haben den Bau von TMAs am Nierenzellkarzinom entwickelt [39]. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode übernommen. Die angezeichneten HE-Schnitte wurden als Schablonen genutzt, um auf den dazugehörigen Paraffinblöcken Areale mit Tumorgewebe zu identifizieren. Aus diesen Arealen wurden mit Hilfe einer Hohnadel bis zu vier Zylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm ausgestanzt. Die Gewebezylinder wurden anschließend in leere Paraffinblöcke, sogenannte Empfängerblöcke übertragen. Je Tumorsubtyp fanden drei Blöcke Verwendung, wobei in jeden Block maximal 30 Löcher gestanzt wurden. In diese wurden die Tumorgewebestanzungen eingebracht und unter Erwärmen fixiert. Die in Paraffin eingebetteten TMAs wurden dann wie normale Gewebeblöcke mittels Microtom geschnitten und die 5 µm dicken Schichten auf Objektträger übertragen.

## **2.6 Immunhistochemische Färbung der TMAs**

Mittels Immunhistochemie wurde die Expression acht verschiedener Antigene durch die drei Nierenzellkarzinomsubtypen untersucht: Carboanhydrase II (CA II), KIT, Parvalbumin, Vimentin,  $\alpha$ -Methyl-Acyl-CoA-Racemase (AMACR), Glutathionyl-S-Transferase  $\alpha$  (GST- $\alpha$ ), CD10 und Cytokeratin 19 (CK 19).

### **2.6.1 Entparaffinieren**

Zuerst wurde das Paraffin für 30 min. im Wasserbad bei 72 °C abgeschmolzen. Dann wurden die Schnitte wie in Tabelle 7 angegeben bei Raumtemperatur mit den folgenden Reagenzien inkubiert.



Tabelle 7: Entparaffinieren

Dauer	Reagenzien
2 x 5 min.	Xylol (Sigma)
2 x 3 min.	Ethanol 100% (Baker)
2 x 3 min.	Ethanol 95% (Baker)
2 x 3 min.	Ethanol 80% (Baker)
10 x eintauchen	Aqua dest.

## 2.6.2 Demaskierung der Antigene

Hierbei wurden die Schnitte nach Aufbringen von Citratpuffer (pH 6,02) für 30 min. in der Mikrowelle bei 95 °C erwärmt und anschließend mit Aqua dest. gespült.

## 2.6.3 Färben mit Blockade endogener Biotin-Aktivität

Die folgenden Färbungen wurden manuell unter Raumtemperatur durchgeführt. Tabelle 8 stellt das Färbeprotokoll dar.

Tabelle 8: Färbeprotokoll manuelle Färbung

Dauer	Reagentien
1 min.	Dako REAL <sup>TM</sup> Peroxidase-Blocking Solution (Dako)
5 min.	Waschpuffer APK Wash (Ventana)
30 min.	Primärantikörper (Siehe Tabelle 9)
30 min.	Dako REAL <sup>TM</sup> EnVision <sup>TM</sup> , Rabbit/Mouse (Env)“ (Dako)
5 min.	Waschpuffer APK Wash (Ventana)
10 min.	DAB+Substrat-Chromogen-Lösung (1:50), hergestellt aus 1 ml Dako REAL <sup>TM</sup> Substrate Buffer und 20 µl Dako REAL <sup>TM</sup> DAB+ Chromogen (Dako)
1 min.	Hämatoxilin (Ventana)

Zum Abschluss wurden die Objektträger mit Leitungswasser gewaschen.

Tabelle 9 zeigt die verwendeten Primärantikörper.

Tabelle 9: Primärantikörper manuelle Färbung

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Klonalität	Hersteller
CA II	Kaninchen	1:50	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
KIT	Kaninchen	1:200	polyklonal	Dako Cytomation
CD 10	Maus	1:25	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology

#### 2.6.4 Färben ohne Blockade endogener Biotin-Aktivität

Die folgenden Färbungen wurden mit dem Ventana NexES IHC-Färbeautomaten durchgeführt. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10: Färbeprotokoll Färbeautomat

Dauer	Temperatur	Reagentien
1 min.	41 °C	Waschpuffer APK Wash (Ventana)
4 min.	37 °C	I-View™ -Inhibitor (Ventana)
1 min.	41 °C	Waschpuffer APK Wash (Ventana)
[8 min.	37 °C	Protease I (Ventana). Nur bei Vimentin]
[1 min.	41 °C	Waschpuffer APK Wash (Ventana). Nur bei Vimentin]
Variabel	37 °C	Primärantikörper (Siehe Tabelle 11)
1 min.	41 °C	Waschpuffer APK Wash (Ventana)
8 min.	37 °C	I-View™ -Biotin I (Ventana)
1 min.	41 °C	Waschpuffer APK Wash (Ventana)
8 min.	37 °C	I-View™ -SA-HRP (Ventana)
1 min.	41 °C	Waschpuffer APK Wash (Ventana)
4 min.	37 °C	I-View™ -Copper (Ventana)
1 min.	41 °C	Waschpuffer APK Wash (Ventana)
4 min.	37 °C	Hämatoxinilin (Ventana)
1 min.	41 °C	Waschpuffer APK Wash (Ventana)

Tabelle 11 listet die verwendeten Primärantikörper auf.

Tabelle 11: Primärantikörper Färbeautomat

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Klonalität	Hersteller	Inkubationszeit
Vimentin	Maus	gebrauchsfertig	monoklonal	Ventana	24 min.
Parvalbumin	Kaninchen	1: 500	polyklonal	Acris Antibodies	30 min.
AMACR	Kaninchen	gebrauchsfertig	monoklonal	Ventana	32 min.
GST- $\alpha$	Kaninchen	1:50	Keine Angabe	Acris Antibodies	30 min.
CK 19	Maus	1:100	monoklonal	Progen	24 min.

## 2.7 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Unter dem Lichtmikroskop wurde jede einzelne Tumorstanze der TMAs hinsichtlich der Färbung der Tumorzellen ausgewertet. Zum einen interessierte das Färbemuster, das heißt, ob die Färbung nukleär, cytoplasmatisch oder membranös lokalisiert war. Zum anderen stellte sich die Frage, wie hoch der Anteil der gefärbten Tumorzellen war. Auch die Intensität der Färbung war von Bedeutung. Für Intensität der Färbung und Anteil der gefärbten Zellen wurde jeweils ein Punktwert vergeben, aus denen ein *Score* berechnet wurde, anhand dessen die endgültige Einteilung der Antigenexpression vorgenommen werden konnte. Jedoch musste für jedes Antigen eine individuelle Einteilung, beruhend auf Daten aus der Literatur, berücksichtigt werden, wie nachfolgend dargestellt.

### 2.7.1 Auswertungsmodalität CD 10 [47]

Je nach Intensität der membranös lokalisierten Färbung wurden 0-3 Punkte vergeben. Diese wurden multipliziert mit dem Punktwert für den Anteil der gefärbten Zellen (0: <1%, 1: 1-49%, 2: 50-80%, 3: >80%). So ergab sich ein *Score* von 0-9, wobei die Färbung bei einem *Score* von 0 als negativ, bei 1-9 als positiv gewertet wurde.

### 2.7.2 Auswertungsmodalität KIT [22]

Hier war die Färbung membranös und/oder cytoplasmatisch lokalisiert. Für die Intensität wurden 0-3 Punkte vergeben, welche mit dem Punktwert für den Anteil der gefärbten Zellen (0: 0%, 1: <10%, 2: 10-50%, 3: 51-80%, 4: >80%) addiert wurden. Der hieraus gebildete *Score* von 0-7 wurde bei einem Wert von 0-3 bzgl. der Färbung als negativ und bei einem Wert von 4-7 als positiv gesehen.

### 2.7.3 Auswertungsmodalität Parvalbumin und Vimentin [83]

Die Auswertung von Parvalbumin und Vimentin wurde identisch gehandhabt. Die Färbung war jeweils cytoplasmatisch lokalisiert. Auch hier wurden für die Intensität 0-3 Punkte vergeben und multipliziert mit dem Punktwert für den Anteil der gefärbten Zellen (0: <30%, 1:  $\geq 30$ ). Der *Score* reichte damit von 0-3. Eine Färbung wurde bei einem *Score* von 0-2 als negativ eingestuft, bei 3 als positiv.

### 2.7.4 Auswertungsmodalität AMACR [40, 78]

Auch bei AMACR wurde die cytoplasmatische Färbung mit 0-3 Punkten bewertet und mit dem Punktwert für den Anteil der gefärbten Zellen (0: <5%, 1: 5-50%, 2: > 50%) multipliziert. Aus dem resultierenden *Score* von 0-6 wurde das Ergebnis der Färbung wie folgt bewertet. 0 galt als negativ, 1 als fokal positiv und 2-6 als diffus positiv.

### 2.7.5 Auswertungsmodalität GST- $\alpha$ [13]

Bei GST- $\alpha$  war die Färbung nukleär lokalisiert. Auch hier wurde die Intensität mit 0-3 Punkten bewertet. Nach Multiplikation mit dem Punktwert für den Anteil der gefärbten Zellen (1: <30%, 2:  $\geq 30$ ) ergab sich ein *Score* von 0-6. Ein Wert von 0 galt hier als negatives Ergebnis, 1-3 als schwach positiv und 4-6 als stark positiv.

### 2.7.6 Auswertungsmodalität CK 19 [71]

Analog zu den anderen Auswertungen wurden auch hier für die Intensität 0-3 Punkte vergeben und mit dem Punktwert für den Anteil der gefärbten Zellen (0: 0%, 1: <30%, 2: 30-60%, 3: >60%) multipliziert. Der sich ergebende *Score* betrug 0-9. Bei einem Wert von 0 war die Färbung als negativ einzustufen, bei 1-3 als schwach positiv, bei 4-9 als stark positiv.

### 2.7.7 Auswertungsmodalität CA II [71]

Die Färbung war bei CA II im Cytoplasma lokalisiert. Wie schon bei den vorherigen Antigenen wurden für die Intensität 0-3 Punkte verteilt. Nach Multiplikation mit dem Punktwert für den Anteil der gefärbten Zellen (0: <25%, 1: 25-49%, 2: 50-74%, 3:  $\geq 75\%$ ) resultierte ein *Score* von 0-9. Bei CA II wurden nun zwei Ergebniseinteilungen versucht. Bei der ersten wurde 0 als negativ, 1-3 als schwach positiv, 4-6 als mittel positiv und 7-9 als stark positiv gewertet. In der zweiten war ein *Score* von 0 als negativ und 1-9 als positiv zu sehen.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung wurden in eine SPSS-Tabelle übertragen. Unterschiede der Nierenzellkarzinomsubtypen wurden anschließend mit dem Statistikprogramm SPSS 13.0 ausgewertet. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz kam der zweiseitige, exakte  $\chi^2$ -Test nach Pearson zur Anwendung. Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn  $p < 0,05$  erreicht wurde.

Außerdem wurden bei jedem einzelnen Marker Sensitivität und Spezifität für den Subtyp, der die häufigste Expression zeigte, berechnet.

## **2.9 Aufstellung einer immunhistochemischen Markerkombination und Zuordnung der Nierenzellkarzinome zu den einzelnen Subtypen**

Von den insgesamt acht immunhistochemischen Markern wurden sechs ausgewählt, die aufgrund ihrer Anfärbeergebnisse am erfolgversprechendsten zur Differenzierung zwischen den einzelnen Tumorentitäten schienen. Hierbei handelte es sich um CD 10, GST- $\alpha$ , AMACR, CK 19, KIT und Parvalbumin. Positive Expression für CD 10 und stark positive für GST- $\alpha$  wurden mit je einem Punkt für das hellzellige Nierenzellkarzinom bewertet. Diffus positive Reaktion für AMACR und stark positive für CK 19 zählten mit jeweils einem Punkt für das papilläre Nierenzellkarzinom. Eine positive Reaktion bei KIT und Parvalbumin ergab jeweils einen Punkt für das chromophobe Nierenzellkarzinom. Die untersuchten Nierenzellkarzinome wurden dann zu dem Subtyp gerechnet, für den sie die höchste Punktzahl erreichen konnten. Wurde bei zwei Subtypen die gleiche Punktzahl erzielt, so kamen differentialdiagnostisch zwei Tumorentitäten in Betracht. Zeigten die Nierenzellkarzinome keine Antigenexpression, so war auf der Basis der entwickelten Markerkombination keine Zuordnung zu einem der drei Subtypen möglich.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 CD 10-Expression

42 von 54 hellzelligen Nierenzellkarzinomen (77,8 %) zeigten ein positives Färbeverhalten bzgl. CD 10, 12 (22,2 %) ein negatives. Von 56 papillären Nierenzellkarzinomen waren 29 (51,8 %) positiv, 27 (48,2 %) negativ. Bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen waren lediglich 13 von 44 (29,5 %) als positiv einzustufen, 31 (70,5 %) dagegen als negativ. Die Unterschiede zwischen den Subtypen sind bei  $p < 0,001$  im  $\chi^2$ -Test als signifikant anzusehen. Abbildung 7 zeigt die graphische Darstellung der CD 10-Expression.

Die Sensitivität hinsichtlich der Differenzierung des hellzelligen vom chromophoben Nierenzellkarzinom betrug 77,8 % bei einer Spezifität von 70,5 %. Gegenüber dem papillären Nierenzellkarzinom lag die Spezifität bei 48,2 %.

Abb. 7: CD 10-Expression

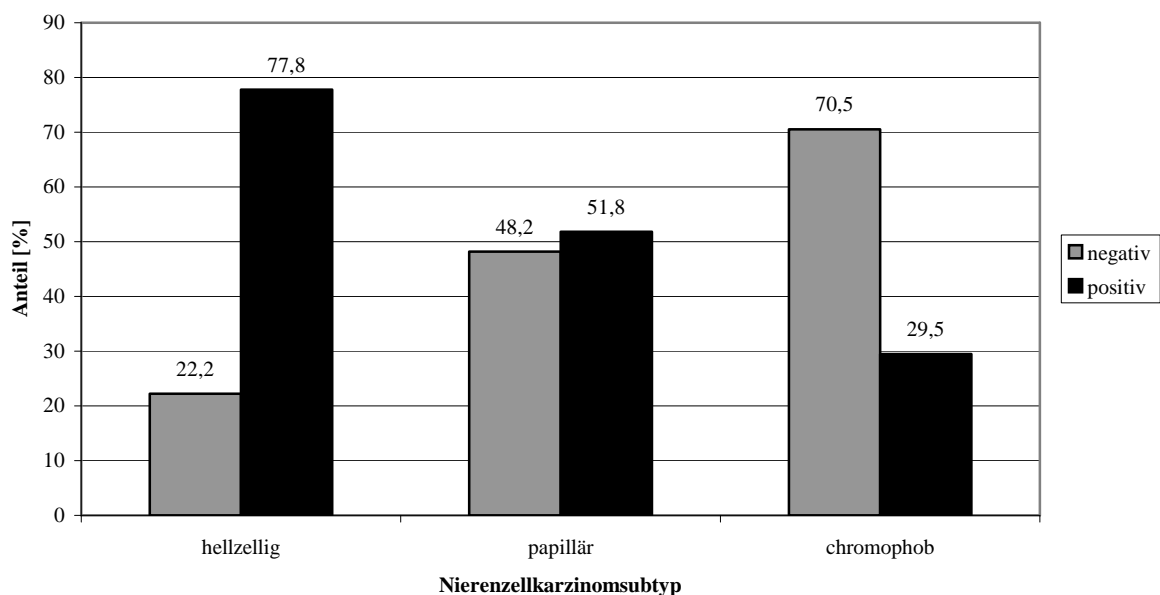


Tabelle 12: Kreuztabelle CD 10-Expression

		negativ	positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	12	42	54
	Anteil	22,2 %	77,8 %	100,0 %
papillär	Anzahl	27	29	56
	Anteil	48,2 %	51,8 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	31	13	44
	Anteil	70,5 %	29,5 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	70	84	154
	Anteil	45,5 %	54,5 %	100,0 %

### 3.2 KIT-Expression

Kein einziges von 60 hellzelligen Nierenzellkarzinomen (0 %) exprimierte KIT, alle (100 %) waren negativ. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen zeigten 3 von 63 (4,8 %) ein positives Färbeverhalten bzgl. KIT, 60 (95,2 %) erwiesen sich als negativ. 35 von 46 (76,1 %) der chromophoben Nierenzellkarzinome hingegen waren positiv, 11 (23,9 %) negativ. Im  $\chi^2$ -Test war  $p < 0,001$  und die Unterschiede zwischen den Subtypen somit signifikant. In Abbildung 8 werden die Ergebnisse der KIT-Expression graphisch dargestellt.

Die Sensitivität bzgl. des chromophoben Nierenzellkarzinoms lag bei 76,1 %, die Spezifität gegenüber dem hellzelligen bei 100 % und gegenüber dem papillären bei 95,2 %. Hellzellige und papilläre Nierenzellkarzinome zusammengekommen betrug die Spezifität noch 97,6 %.



Abb. 8: KIT-Expression

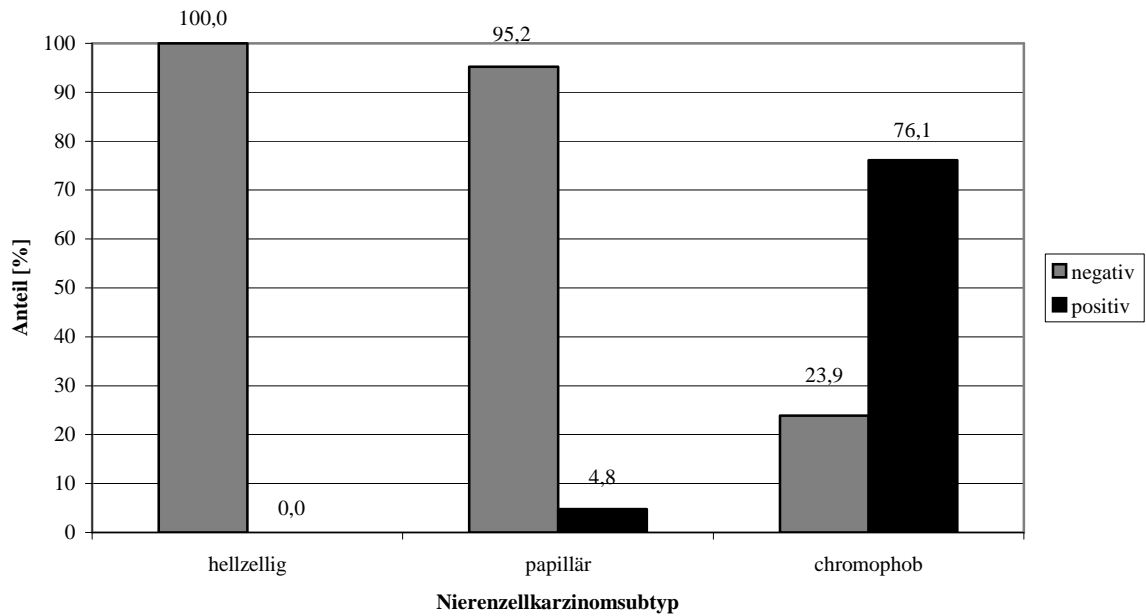


Tabelle 13: Kreuztabelle KIT-Expression

		negativ	positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	60	0	60
	Anteil	100,0 %	0,0 %	100,0 %
papillär	Anzahl	60	3	63
	Anteil	95,2 %	4,8 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	11	35	46
	Anteil	23,9 %	76,1 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	131	38	169
	Anteil	77,5 %	22,5 %	100,0 %

### 3.3 Parvalbumin-Expression

Bzgl. Parvalbumin zeigten alle 62 hellzelligen Nierenzellkarzinome (100 %) ein negatives Färbeverhalten, kein einziges (0 %) war positiv. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen waren 12 von 55 (21,8 %) als positiv einzustufen. 43 (78,2 %) waren negativ. Die chromophoben Nierenzellkarzinome hingegen waren in 35 von 45 Fällen (77,8 %) positiv, in 10 Fällen (22,2 %) negativ. Die erhaltenen Unterschiede zwischen den Subtypen sind

signifikant, da  $p < 0,001$  im  $\chi^2$ -Test ist. In Abbildung 9 werden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Sensitivität von Parvalbumin zur Differenzierung des chromophoben Nierenzellkarzinoms von den anderen beiden Subtypen betrug 77,8 %, die Spezifität 89,7 %. Gegenüber dem hellzelligen Nierenzellkarzinom alleine lag die Spezifität bei 100 %, gegenüber dem papillären Nierenzellkarzinom bei 78,2 %.

Abb. 9: Parvalbumin-Expression

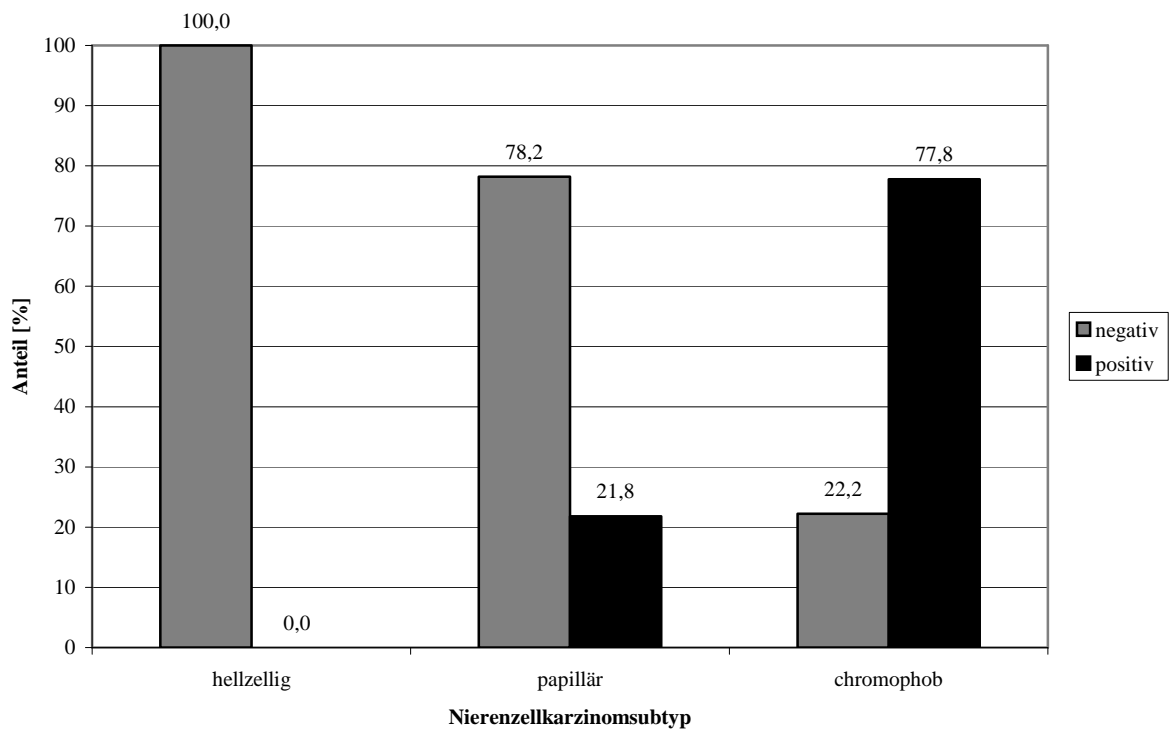


Tabelle 14: Kreuztabelle Parvalbumin-Expression

		negativ	positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	62	0	62
	Anteil	100,0 %	0,0 %	100,0 %
papillär	Anzahl	43	12	55
	Anteil	78,2 %	21,8 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	10	35	45
	Anteil	22,2 %	77,8 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	115	47	162
	Anteil	71,0 %	29,0 %	100,0 %

### 3.4 Vimentin-Expression

Von 64 hellzelligen Nierenzellkarzinomen waren 24 (37,5 %) positiv bzgl. einer Expression von Vimentin, 40 (62,5 %) negativ. Die papillären Nierenzellkarzinome zeigten in 25 von 62 Fällen (40,3 %) ein positives Ergebnis. 37 (59,7 %) waren negativ. Bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen zeigten nur 2 von 46 (4,3 %) ein positives Färbemuster, 44 (95,7 %) ein negatives. Im  $\chi^2$ -Test ergab sich ein  $p < 0,001$ , womit die Unterschiede zwischen den Subtypen als signifikant anzusehen sind. In Abbildung 10 ist die Vimentin-Expression graphisch dargestellt. Ausgehend von der Hypothese, dass Vimentin-Expression charakteristisch für ein Nicht-chromophobes Nierenzellkarzinom ist, würde die Sensitivität bei 38,8 % liegen mit einer Spezifität von 95,7 %.

Abb. 10: Vimentin-Expression

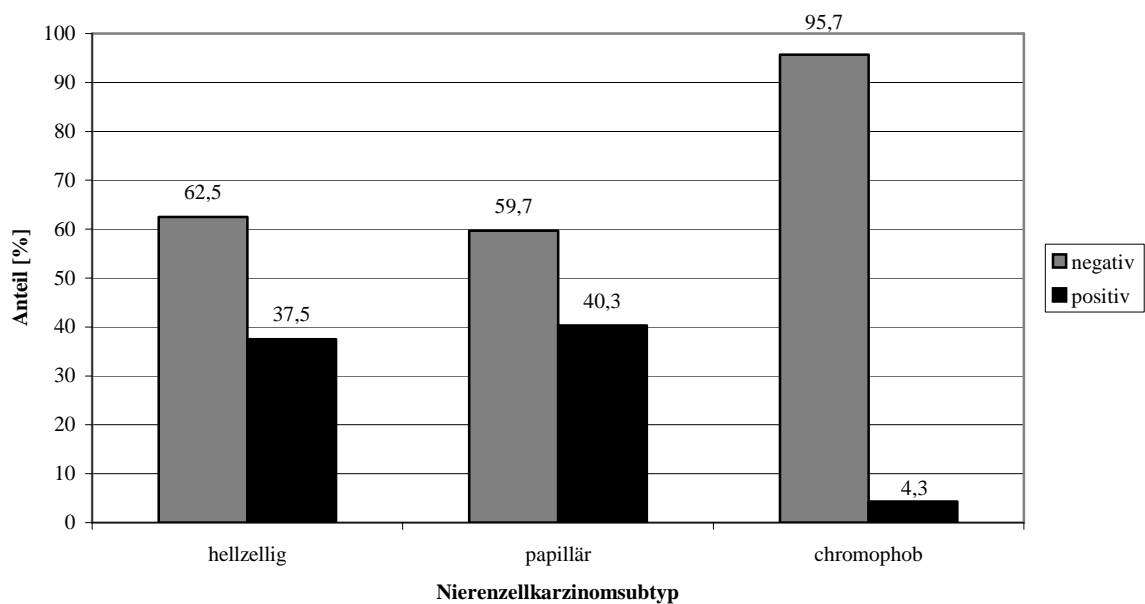


Tabelle 15: Kreuztabelle Vimentin-Expression:

		negativ	positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	40	24	64
	Anteil	62,5 %	37,5 %	100,0 %
papillär	Anzahl	37	25	62
	Anteil	59,7 %	40,3 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	44	2	46
	Anteil	95,7 %	4,3 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	121	51	172
	Anteil	70,3 %	29,7 %	100,0 %

### 3.5 AMACR-Expression

Bezogen auf die Expression von AMACR waren von 63 hellzelligen Nierenzellkarzinomen 17 (27,0 %) diffus positiv, 8 (12,7 %) fokal positiv und 38 (60,3 %) negativ gefärbt. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen zeigten 53 von 60 (88,3 %) eine diffus positive Färbung. 2 (3,3 %) waren fokal positiv, 5 (8,3 %) negativ. Unter den 43 chromophoben Nierenzellkarzinomen befanden sich 15 (34,9 %) diffus positive, 1 (2,3 %) fokal positives und 27 (62,8 %) negative. Bei  $p < 0,001$  im  $\chi^2$ -Test waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen als signifikant anzusehen. In Abbildung 11 ist die graphische Darstellung der AMACR-Expression wiedergegeben.

Ausgehend von einer diffus positiven Färbereaktion als typisch für das papilläre Nierenzellkarzinom errechnet sich eine Sensitivität von 88,3 %, sowie eine Spezifität von 73 % gegenüber dem hellzelligen und 65,1 % gegenüber dem chromophoben Nierenzellkarzinom. Nimmt man eine fokal positive Färbung als Charakteristikum für das papilläre Nierenzellkarzinom hinzu, so kommt man auf eine Sensitivität von 91,6 %, eine Spezifität von 60,3 % gegenüber dem hellzelligen und 62,8 % gegenüber dem chromophoben Nierenzellkarzinom.

Abb. 11: AMACR-Expression

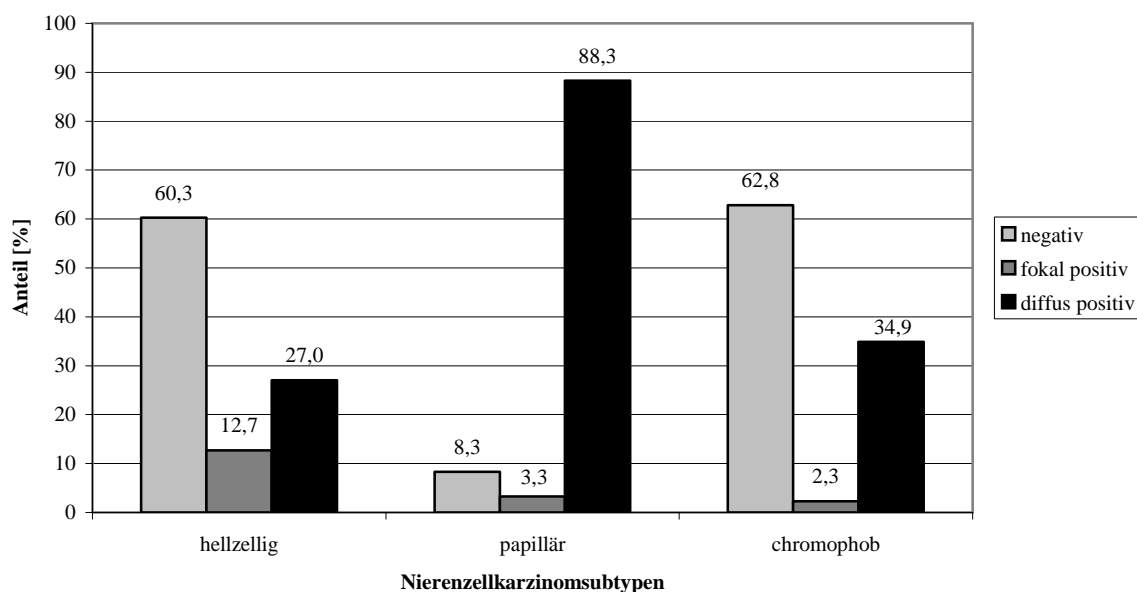


Tabelle 16: Kreuztabelle AMACR-Expression

		negativ	fokal positiv	diffus positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	38	8	17	63
	Anteil	60,3 %	12,7 %	27,0 %	100,0 %
papillär	Anzahl	5	2	53	60
	Anteil	8,3 %	3,3 %	88,3 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	27	1	15	43
	Anteil	62,8 %	2,3 %	34,9 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	70	11	85	166
	Anteil	42,2 %	6,6 %	51,2 %	100,0 %

### 3.6 GST- $\alpha$ -Expression

Von 64 hellzelligen Nierenzellkarzinomen wiesen 60 (93,7 %) eine starke GST- $\alpha$ -Expression auf. 1 (1,6 %) war schwach positiv. 3 (4,7 %) zeigten ein negatives Färbeverhalten. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen waren 26 von 59 (44,1 %) stark positiv gefärbt, 9 (15,2 %) schwach positiv und 24 (40,7 %) negativ. Die Ergebnisse bei

den chromophoben Nierenzellkarzinomen lauteten folgendermaßen: 9 von 46 (19,6 %) waren stark positiv, 6 (13,0 %) schwach positiv und 31 (67,4 %) negativ. Der  $\chi^2$ -Test ergab  $p < 0,001$ , womit die Unterschiede zwischen den Subtypen signifikant waren.

Abbildung 12 stellt die Ergebnisse der GST- $\alpha$ -Expression graphisch dar.

Bei einer stark positiven Färbereaktion als Merkmal für das hellzellige Nierenzellkarzinom, findet sich eine Sensitivität von 93,7 % bei einer Spezifität von 65,9 % gegenüber dem papillären und 80,4 % gegenüber dem chromophoben Nierenzellkarzinom. Auf 95,3 % steigt die Sensitivität, wenn auch eine schwach positive GST- $\alpha$ -Expression als charakteristisch für das hellzellige Nierenzellkarzinom gewertet wird. Dann beträgt die Spezifität gegenüber dem papillären Nierenzellkarzinom 40,7 % und gegenüber dem chromophoben 67,4 %.

**Abb. 12: GST- $\alpha$ -Expression**

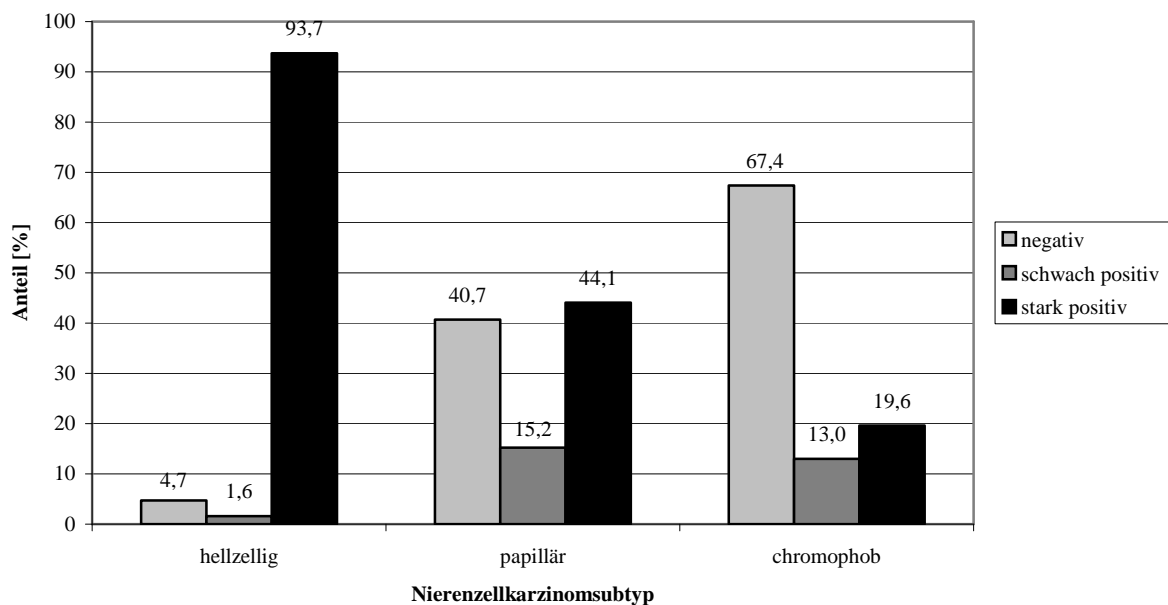


Tabelle 17: Kreuztabelle GST- $\alpha$ -Expression

		negativ	schwach positiv	stark positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	3	1	60	64
	Anteil	4,7 %	1,6 %	93,7 %	100,0 %
papillär	Anzahl	24	9	26	59
	Anteil	40,7 %	15,2 %	44,1 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	31	6	9	46
	Anteil	67,4 %	13,0 %	19,6 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	58	16	95	169
	Anteil	34,3 %	9,5 %	56,2 %	100,0 %

### 3.7 CK 19-Expression

10 von 65 (15,4 %) hellzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten eine stark positive CK 19-Expression, weitere 10 (15,4 %) eine schwach positive. 45 (69,2 %) waren negativ. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen waren 47 von 63 (74,6 %) stark positiv gefärbt. 3 (4,8 %) zeigten nur eine schwach positive CK 19-Expression, 13 (20,6 %) gar keine. Unter den 43 chromophoben Nierenzellkarzinomen waren 10 (23,2 %) stark positiv, 7 (16,3 %) schwach positiv. 26 (60,5 %) zeigten ein negatives Färbeverhalten bzgl. der CK 19-Expression. Im  $\chi^2$ -Test betrug  $p < 0,001$ . Somit sind die Unterschiede zwischen den Subtypen statistisch signifikant. Abbildung 13 liefert eine graphische Darstellung.

Wird eine stark positive Färbung als charakteristisch für das papilläre Nierenzellkarzinom angesehen, so ergibt sich eine Sensitivität von 74,6 % in Abgrenzung von den anderen beiden Tumorentitäten. Die Spezifität gegenüber dem hellzelligen Nierenzellkarzinom beträgt dann 84,6 % und gegenüber dem chromophoben 76,8 %, bzw. gegenüber beiden zusammengekommen 81,5 %. Nimmt man schwach positive Färbereaktionen als Merkmal für das papilläre Nierenzellkarzinom hinzu, so steigt die Sensitivität auf 79,4 %, bei fallender Spezifität von 69,2 % beim hellzelligen und 60,5 % beim chromophoben Nierenzellkarzinom, sowie 65,7 % bei beiden zusammen.

Abb. 13: CK 19-Expression

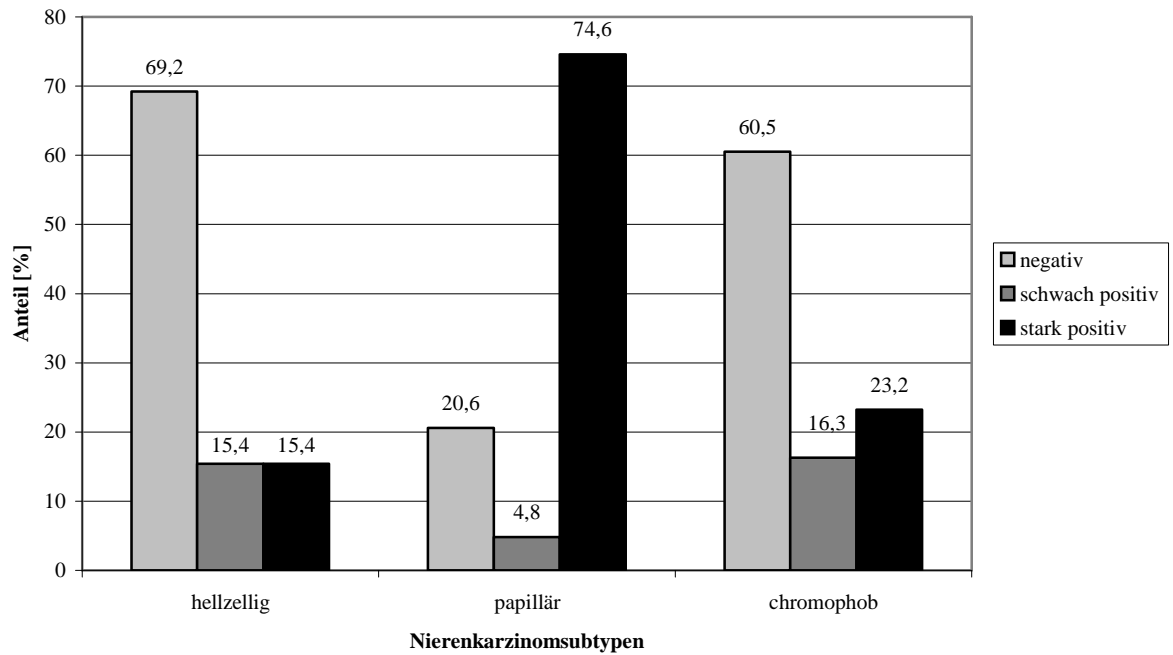


Tabelle 18: Kreuztabelle CK 19-Expression

		negativ	schwach positiv	stark positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	45	10	10	65
	Anteil	69,2 %	15,4 %	15,4 %	100,0 %
papillär	Anzahl	13	3	47	63
	Anteil	20,6 %	4,8 %	74,6 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	26	7	10	43
	Anteil	60,5 %	16,3 %	23,2 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	84	20	67	171
	Anteil	49,1 %	11,7 %	39,2 %	100,0 %



## 3.8 CA II-Expression

Bei der Bewertung der CA II-Expression durch die einzelnen Nierenkarzinomsubtypen wurden zwei verschiedene Einteilungsvarianten zur Intensität der Färbung angewandt.

### 3.8.1 Vierstufige Einteilung

Von 64 hellzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten 13 (20,3 %) keine CA II-Expression. 21 (32,8 %) waren schwach positiv, 25 (39,1 %) mittel positiv und 5 (7,8 %) stark positiv gefärbt. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen waren 11 von 58 (19,0 %) negativ. Die Färbeintensität war bei 21 (36,2 %) schwach positiv, bei 23 (39,6 %) mittel positiv und bei 3 (5,2 %) stark positiv. Von den 42 chromophoben Nierenzellkarzinomen war die CA II-Expression folgendermaßen verteilt: 3 (7,1 %) zeigten keine Färbung, 20 (47,6 %) eine schwach positive, 18 (42,9 %) eine mittel positive und 1 (2,4 %) eine stark positive. Im zweiseitigen  $\chi^2$ -Test ergab  $p=0,429$ . Somit waren die Unterschiede zwischen den Nierenzellkarzinomsubtypen nicht signifikant. Abbildung 14 stellt die CA II-Expression in der vierstufigen Einteilung dar.

Abb. 14: CA II-Expression (vierstufige Einteilung)

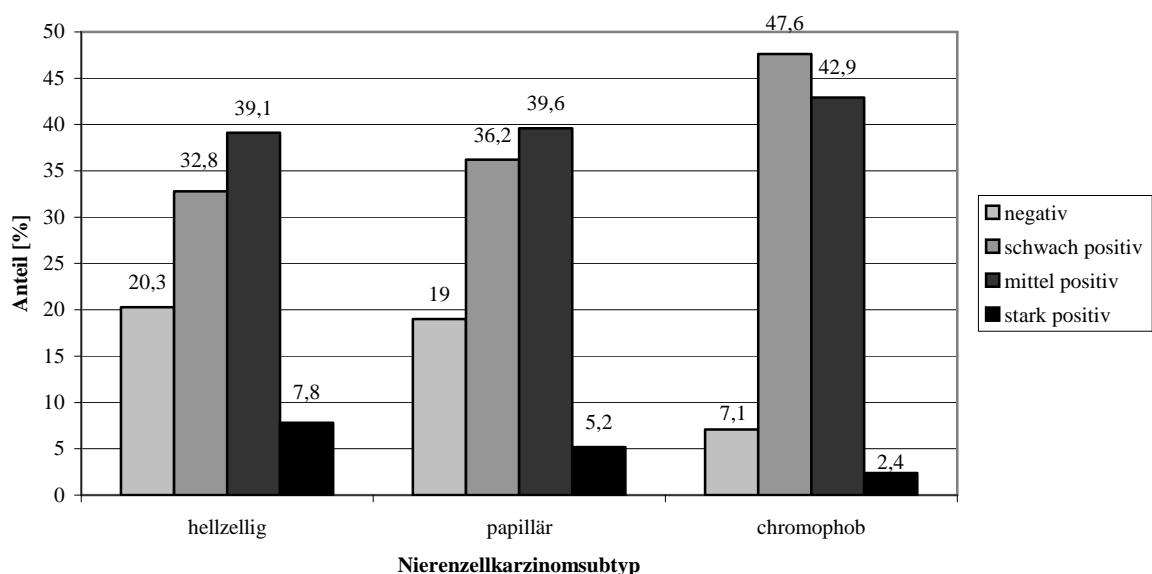


Tabelle 19: Kreuztabelle CA II-Expression (vierstufige Einteilung)

		negativ	schwach positiv	mittel positiv	stark positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	13	21	25	5	64
	Anteil	20,3 %	32,8 %	39,1 %	7,8 %	100,0 %
papillär	Anzahl	11	21	23	3	58
	Anteil	19,0 %	36,2 %	39,6 %	5,2 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	3	20	18	1	42
	Anteil	7,1 %	47,6 %	42,9 %	2,4 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	27	62	66	9	164
	Anteil	16,5 %	37,8 %	40,2 %	5,5 %	100,0 %

### 3.8.2 Zweistufige Einteilung

In der zweistufigen Einteilung wurde nur zwischen negativer und positiver CA II-Expression unterschieden. Hier waren von den 64 hellzelligen Nierenzellkarzinomen 13 (20,3 %) negativ und 51 (79,9 %) positiv. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen zeigten 11 von 58 (19,0 %) ein negatives Färbemuster, 47 (81,0 %) ein positives. Die chromophoben Nierenzellkarzinome waren in 3 von 42 Fällen (7,1 %) negativ, in 39 Fällen (92,9 %) positiv. Auch hier waren die Unterschiede zwischen den Karzinomsubtypen bei  $p=0,192$  im zweiseitigen  $\chi^2$ -Test statistisch nicht signifikant. Abbildung 15 zeigt eine graphische Darstellung der CA II-Expression in der zweistufigen Einteilung.

Abb. 15: CA II-Expression (zweistufige Einteilung)

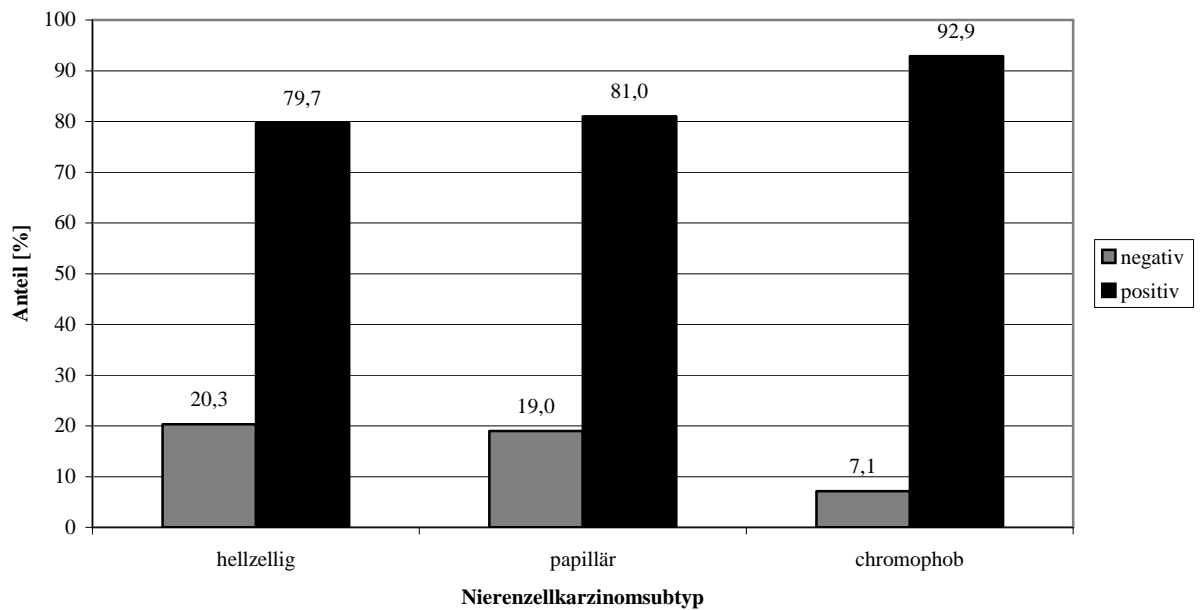


Tabelle 20: Kreuztabelle CA II-Expression (zweistufige Einteilung)

		negativ	stark positiv	Gesamt
hellzellig	Anzahl	13	51	64
	Anteil	20,3 %	79,7 %	100,0 %
papillär	Anzahl	11	47	58
	Anteil	19,0 %	81,0 %	100,0 %
chromophob	Anzahl	3	39	42
	Anteil	7,1 %	92,9 %	100,0 %
Gesamt	Anzahl	27	137	164
	Anteil	16,5 %	83,5 %	100,0 %

### **3.9 Diagnostik der Nierenzellkarzinome anhand einer immunhistochemischen Markerkombination aus CD 10, GST- $\alpha$ , AMACR, CK 19, KIT und Parvalbumin**

Anhand einer Kombination bestehend aus sechs immunhistochemischen Markern, nämlich CD 10, GST- $\alpha$ , AMACR, CK 19, KIT und Parvalbumin, wurde überprüft, wieviele der untersuchten Nierenzellkarzinome richtig ihrem jeweiligen Subtyp zugeordnet worden wären. Tabelle 21 zeigt die Punkteverteilung für die einzelnen Fälle und die resultierenden Endergebnisse anhand der Markerkombination.

#### **3.9.1 Hellzelliges Nierenzellkarzinom**

Von insgesamt 70 hellzelligen Nierenzellkarzinomen wären 72,9 % (51/70) richtig zugeordnet worden. 15,7 % (11/70) hätten differentialdiagnostisch auch als papillär in Frage kommen können. 4,3 % (3/70) würden aufgrund ihres Expressionsprofils fälschlich den papillären Nierenzellkarzinomen zugeordnet. Kein einziges der hellzelligen Nierenzellkarzinome wurde fälschlich den chromophoben Karzinomen zugeordnet. 7,1 % (5/70) zeigten keine Antigenexpression und konnten somit keiner der drei Tumorentitäten zugeordnet werden.

#### **3.9.2 Papilläres Nierenzellkarzinom**

Der Anteil der anhand der Antikörperkombination richtig diagnostizierten papillären Nierenzellkarzinome lag bei 56,7 % (38/67). Bei 14,9 % (10/67) kam anhand des Expressionsprofils auch ein hellzelliges Nierenzellkarzinom in Frage. Ebenfalls 14,9 % (10/67) wären sogar fälschlich für ein hellzelliges Karzinom gehalten worden. Bei 3 % (2/67) der papillären Nierenzellkarzinome war differentialdiagnostisch auch an ein chromophobes Karzinom zu denken. Ebenfalls 3 % (2/67) wären immunhistochemisch

falsch zu den chromophoben Nierenzellkarzinomen gerechnet worden. 7,5 % (5/67) waren aufgrund fehlender Antigenexpression keinem der drei Subtypen zuzuordnen.

### 3.9.3 Chromophobes Nierenzellkarzinom

Eine richtige Zuordnung durch die immunhistochemische Markerkombination war beim chromophoben Nierenzellkarzinom in 63,5 % (33/52) der Fälle möglich. 17,3 % (9/52) kämen differentialdiagnostisch auch als papilläres Nierenzellkarzinom in Frage. 5,8 % (3/52) waren vom Expressionsmuster her sogar als papillär anzusehen. Nur 3,8 % (2/52) der chromophoben Karzinome wäre fälschlich den hellzelligen Nierenzellkarzinomen zugeordnet worden. 9,6 % (5/52) waren aufgrund fehlender oder nicht verwertbarer Antigenexpression gar keinem Nierenkarzinomsubtyp zuzuordnen.

Tabelle 21: Punkteverteilung der einzelnen Fälle und Endergebnis anhand der Markerkombination

Tumornr.	Subtyp	CD 10	KIT	Parvalb.	AMACR	GST- $\alpha$	CK 19	Ergebnis
7	hellzell.	1	0	0	0	1	1	hellzell.
11	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
17	hellzell.	0	0	0	0	0	0	-
20	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
60	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
86	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
132	hellzell.	0	0	0	0	0	0	-
136	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
154	hellzell.	0	0	0	1	1	0	hell/pap
215	hellzell.	1	0	0	1	1	0	hellzell.
218	hellzell.	1	0	0	1	1	0	hellzell.
223	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
225	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
229	hellzell.	1	0	0	0	1	1	hellzell.
234	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
237	hellzell.	1	0	0	0	0	0	hellzell.

Tumornr.	Subtyp	CD 10	KIT	Parvalb.	AMACR	GST- $\alpha$	CK 19	Ergebnis
245	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
248	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
250	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
252	hellzell.	1	0	0	1	1	0	hellzell.
254	hellzell.	0	0	0	1	1	0	hell/pap
257	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
175	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
177	hellzell.	1	0	0	1	1	1	hell/pap
179	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
180	hellzell.	1	0	0	0	0	1	hell/pap
184	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
187	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
190	hellzell.	1	0	0	1	1	1	hell/pap
193	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
201	hellzell.	0	0	0	0	0	0	-
204	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
207	hellzell.	1	0	0	1	1	0	hellzell.
210	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
213	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
261	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
264	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
267	hellzell.	0	0	0	1	1	0	hell/pap
270	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
277	hellzell.	0	0	0	0	1	1	hell/pap
280	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
282	hellzell.	0	0	0	0	0	0	-
284	hellzell.	1	0	0	1	1	0	hellzell.
287	hellzell.	1	0	0	0	0	0	hellzell.
289	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
290	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
292	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
294	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.

Tumornr.	Subtyp	CD 10	KIT	Parvalb.	AMACR	GST- $\alpha$	CK 19	Ergebnis
301	hellzell.	0	0	0	1	1	0	hell/pap
304	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
306	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
321	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
323	hellzell.	0	0	0	1	1	1	papillär
329	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
331	hellzell.	0	0	0	1	1	0	hell/pap
335	hellzell.	1	0	0	0	1	1	hellzell.
338	hellzell.	0	0	0	1	1	0	hell/pap
346	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
349	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
360	hellzell.	0	0	0	1	0	0	papillär
389	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
391	hellzell.	1	0	0	1	0	1	papillär
393	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
397	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
399	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
401	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
407	hellzell.	0	0	0	0	1	0	hellzell.
409	hellzell.	0	0	0	0	0	0	-
411	hellzell.	1	0	0	1	1	1	hell/pap
582	hellzell.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
12	papillär	0	0	0	0	0	1	papillär
29	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär
34	papillär	1	0	0	0	0	1	pap/hell
37	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
50	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär
51	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
91	papillär	1	0	0	1	1	1	pap/hell
95	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär
99	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär
107	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär

Tumornr.	Subtyp	CD 10	KIT	Parvalb.	AMACR	GST- $\alpha$	CK 19	Ergebnis
108	papillär	0	0	0	0	0	0	-
112	papillär	1	0	0	1	1	0	hellzell.
113	papillär	0	0	0	1	1	1	papillär
146	papillär	1	0	0	1	1	1	pap/hell
152	papillär	0	0	0	0	1	0	hellzell.
174	papillär	0	0	0	1	0	0	papillär
216	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
219	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
221	papillär	0	0	0	1	1	1	papillär
224	papillär	0	0	0	1	1	0	pap/hell
227	papillär	0	0	0	0	0	0	-
230	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
235	papillär	1	0	0	1	1	1	pap/hell
238	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
240	papillär	1	0	0	1	1	1	pap/hell
246	papillär	0	0	1	1	1	1	papillär
249	papillär	0	0	0	0	0	0	-
253	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär
255	papillär	1	0	0	0	1	0	hellzell
176	papillär	0	0	0	1	1	1	papillär
178	papillär	0	0	0	1	1	1	papillär
181	papillär	1	0	0	1	1	0	hellzell
185	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
188	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
191	papillär	1	0	0	0	1	1	hellzell
196	papillär	1	0	0	1	0	0	pap/hell
202	papillär	0	1	1	1	0	1	pap/chro
203	papillär	1	1	1	1	0	1	pap/chro
205	papillär	1	0	1	1	1	1	pap/hell
211	papillär	0	0	0	1	1	1	papillär
214	papillär	0	0	1	0	0	0	chromo.
258	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär



Tumornr.	Subtyp	CD 10	KIT	Parvalb.	AMACR	GST- $\alpha$	CK 19	Ergebnis
259	papillär	1	0	1	1	0	1	papillär
262	papillär	0	0	0	1	1	1	papillär
265	papillär	0	0	0	0	0	0	-
268	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
271	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
273	papillär	0	0	1	1	0	1	papillär
275	papillär	0	0	0	0	0	0	-
278	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
281	papillär	1	0	0	1	1	0	hellzell.
285	papillär	1	0	1	1	1	1	pap/hell
291	papillär	1	0	1	1	1	1	pap/hell
295	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär
302	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär
342	papillär	0	0	0	1	1	1	papillär
390	papillär	0	0	0	0	0	1	papillär
392	papillär	0	0	1	1	0	1	papillär
394	papillär	1	0	0	1	0	1	papillär
395	papillär	1	0	0	0	1	0	hellzell
396	papillär	0	1	1	0	0	0	chromo.
398	papillär	1	0	1	1	1	0	hellzell.
400	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
402	papillär	1	0	0	1	1	0	hellzell.
408	papillär	1	0	0	1	1	0	hellzell.
410	papillär	0	0	0	1	0	0	papillär
412	papillär	0	0	0	1	0	1	papillär
21	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
33	chromo.	0	1	1	0	1	1	chromo.
55	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
66	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
67	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
90	chromo.	0	0	1	0	0	1	chro/pap
131	chromo.	1	1	1	1	0	1	chro/pap

Tumornr.	Subtyp	CD 10	KIT	Parvalb.	AMACR	GST- $\alpha$	CK 19	Ergebnis
134	chromo.	0	0	1	0	0	0	chromo.
1138	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
217	chromo.	0	1	1	1	0	1	chro/pap
220	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
228	chromo.	1	1	1	1	0	0	chromo.
233	chromo.	0	1	1	1	0	1	chro/pap
236	chromo.	1	1	0	1	1	1	papillär
239	chromo.	1	0	1	1	1	0	chro/pap
244	chromo.	0	1	1	1	0	0	chromo.
247	chromo.	0	1	1	0	1	1	chromo.
251	chromo.	0	1	1	1	0	1	chro/pap
256	chromo.	1	1	1	0	0	0	chromo.
182	chromo.	1	1	0	1	1	1	papillär
183	chromo.	0	1	0	0	0	0	chromo.
186	chromo.	0	1	0	0	0	0	chromo.
189	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
192	chromo.	0	0	0	0	0	0	-
194	chromo.	0	1	0	1	0	0	chro/pap
195	chromo.	0	0	0	0	0	0	-
200	chromo.	0	1	0	0	0	0	chromo.
209	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
212	chromo.	1	1	1	1	1	0	chromo.
260	chromo.	0	0	1	0	0	0	chromo.
263	chromo.	0	1	1	1	0	0	chromo.
266	chromo.	0	1	1	0	1	0	chromo.
269	chromo.	1	1	0	0	0	0	chromo.
272	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
274	chromo.	0	0	1	0	0	0	chromo.
276	chromo.	0	1	0	0	0	0	chromo.
279	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
286	chromo.	1	0	0	0	1	0	hellzell.
288	chromo.	0	0	1	0	0	0	chromo.

Tumornr.	Subtyp	CD 10	KIT	Parvalb.	AMACR	GST- $\alpha$	CK 19	Ergebnis
293	chromo.	0	0	0	1	0	0	papillär
296	chromo.	1	0	1	0	0	1	chro/pap
298	chromo.	0	0	1	0	0	0	chromo.
300	chromo.	0	1	0	1	1	0	chro/pap
303	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.
305	chromo.	1	0	0	0	0	0	hellzell.
307	chromo.	0	0	0	0	0	0	-
309	chromo.	1	0	1	0	0	0	chromo.
322	chromo.	0	0	0	0	0	0	-
328	chromo.	0	0	0	0	0	0	-
348	chromo.	1	1	1	0	0	0	chromo.
135	chromo.	0	1	1	1	0	0	chromo.
138	chromo.	0	1	1	0	0	0	chromo.

## 4. Diskussion

### 4.1 CD 10-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von verschiedenen Proteinen in unterschiedlichen Subtypen des Nierenzellkarzinoms zur Identifizierung von diagnostischen Markern untersucht. Dabei zeigte sich ein signifikant unterschiedliches Färbemuster der Nierenzellkarzinomsubtypen. 77,8 % der hellzelligen Nierenzellkarzinome exprimierten CD 10 im Gegensatz zu 51,8 % der papillären und 29,5 % der chromophoben. Hinsichtlich der Differenzierung zwischen hellzelligen und chromophoben Nierenzellkarzinomen könnte CD 10 hilfreich sein mit passablen Werten für Sensitivität von 77,8 % und Spezifität von 70,5 %. Da papilläre Nierenzellkarzinome ebenfalls einen relativ hohen Anteil von 51,8 % positiven Tumoren aufwiesen, ist mittels CD 10-Expression kaum zwischen diesen und hellzelligen Tumoren zu unterscheiden. In der Literatur wird übereinstimmend von einem hohen Anteil an CD 10-exprimierenden Tumoren unter den hellzelligen Nierenzellkarzinomen berichtet mit Werten zwischen 82 % und 100 % [4, 30, 33, 47, 81]. Für die papillären Karzinome ergaben sich bei allerdings niedrigeren Fallzahlen als in der vorliegenden Arbeit 59 % bis 93 % an positiv gefärbten Tumoren [4, 33, 47]. Bzgl. der chromophoben Nierenzellkarzinome jedoch fanden sich gravierende Unterschiede in der CD 10-Expression in einzelnen Arbeiten. In den meisten Fällen ergaben sich nur wenige CD 10-positive Tumore mit einem relativen Anteil zwischen 0 % und 45 % [4, 30, 33, 47]. In zwei Arbeiten wurden jedoch auch Werte von 72 % und sogar 100 % an CD 10-exprimierenden chromophoben Nierenzellkarzinomen berichtet [1, 81]. Derart gravierende Unterschiede sind wohl nur durch unterschiedliche Methoden bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbung und einen unterschiedlichen *Cut-off* bei der Bewertung in positive und negative Färbereaktion zu erklären.

## 4.2 KIT-Expression

Die KIT-Expression erbrachte ein signifikantes Ergebnis bzgl. der Färbereaktion der unterschiedlichen Nierenzellkarzinomsubtypen. 76,1 % der chromophoben Karzinome exprimierten KIT im Gegensatz zu nur 4,8 % der papillären. Bei den hellzelligen Nierenzellkarzinomen waren sogar alle 60 Tumore negativ. Somit ergeben sich eine Sensitivität von 76,1 % und eine Spezifität von 95,2 % für die Differenzierung des chromophoben gegenüber dem papillären Nierenzellkarzinom, bzw. sogar 100 % gegenüber dem hellzelligen. Hellzellige und papilläre Nierenzellkarzinome zusammengekommen würde die Spezifität immer noch 97,6 % betragen. Ein KIT-exprimierendes Nierenzellkarzinom ist somit mit hoher Wahrscheinlichkeit chromophob und ein hellzelliges Nierenzellkarzinom praktisch ausgeschlossen. Im Umkehrschluss schließt eine negative Färbung bzgl. KIT ein chromophobes Nierenzellkarzinom nicht sicher aus bei einem Anteil von immerhin 23,9 % an negativ reagierenden Tumoren in dieser Entität. Zur Differenzierung zwischen hellzelligem und papillärem Nierenzellkarzinom dagegen ist KIT ungeeignet.

KIT war in der Vergangenheit Gegenstand vieler Studien, was wohl auch daran liegt, dass wie weiter oben bereits erwähnt mit Imatinib ein Tyrosinkinase-Inhibitor gegen das Antigen KIT vorliegt. Dieser könnte ein möglicher Therapieansatz gegen fortgeschrittene KIT-exprimierende Tumoren sein. Die Ergebnisse, die in der Literatur zum Thema KIT und Nierenzellkarzinome zu finden sind, bestätigen zum größten Teil die vorliegende Arbeit. Der Anteil an KIT-positiven hellzelligen Karzinomen wird mit maximal 5,4 % angegeben [36]. In anderen Arbeiten betrug er 0 % bis 3 % [22, 30, 46, 48, 81]. Ein ähnliches Bild zeigte sich beim papillären Nierenzellkarzinom mit einem maximalen Anteil an 5 % positiv gefärbten Tumoren [22]. Ansonsten wird unisono von einer komplett negativen Reaktion der papillären Karzinome berichtet [36, 46, 48]. Der Anteil an KIT-exprimierenden chromophoben Nierenzellkarzinomen wird dagegen höher angegeben als in der vorliegenden Arbeit mit Werten zwischen 82 % und 100 % [22, 30, 36, 46, 48, 81]. Hierauf wurde von Pan et al. untersucht, ob Mutationen im Proto-Onkogen c-kit ursächlich für die Überexpression von KIT sein könnte. Mittels PCR und DNA-Sequenzierung konnten jedoch keine Mutationen in den untersuchten Exons 9, 11, 13 und 17 nachgewiesen werden [46]. Nicht unerwähnt bleiben sollte eine Studie von Miliaras et al. aus dem Jahr 2004, die immerhin 15 % hellzellige und sogar 29 % papilläre Nierenzellkarzinome mit KIT-Expression aufführt. Der Anteil an KIT-positiven

chromophoben Karzinomen dagegen wird mit lediglich 57 % angegeben [37]. Limitierend muss allerdings gesagt werden, dass hier die Fallzahlen mit nur 13 hellzelligen, 7 papillären und 7 chromophoben Karzinomen als äußerst niedrig zu bezeichnen sind. Somit ist die Aussagekraft dieser Studie als eher gering einzuschätzen und davon auszugehen, dass KIT ein vielversprechender diagnostischer Marker für das chromophobe Nierenzellkarzinom ist.

### 4.3 Parvalbumin-Expression

Statistisch signifikant fielen in der vorliegenden Arbeit die Unterschiede zwischen den Nierenzellkarzinomsubtypen bzgl. der Parvalbumin-Expression aus. Bei den chromophoben Karzinomen zeigten 77,8 % eine positive Reaktion im Gegensatz zu lediglich 21,8 % der papillären Nierenzellkarzinome. Von den hellzelligen Karzinomen waren sogar alle 62 negativ. Die Sensitivität von Parvalbumin zur Differenzierung des chromophoben Nierenzellkarzinoms von den anderen beiden Subtypen beträgt somit 77,8 % bei einer Spezifität von 89,7 %. Gegenüber dem hellzelligen Nierenzellkarzinom alleine liegt die Spezifität sogar bei 100 %. Eine Parvalbumin-Expression bei einem Tumor schließt somit ein hellzelliges Karzinom aus. Gegenüber dem papillären Nierenzellkarzinom allein liegt die Spezifität noch bei 78,2 %. Hier liegt somit ein nicht zu vernachlässigender Teil an falsch-positiven Ergebnissen vor. Nichtsdestotrotz scheint Parvalbumin ein geeigneter Marker zur Differentialdiagnose des chromophoben Nierenzellkarzinoms, insbesondere in Abgrenzung vom hellzelligen, zu sein. Auch in der Literatur war Parvalbumin bereits häufiger Gegenstand der Forschung. Übereinstimmend fanden mehrere Autoren eine sehr hohe Rate an Parvalbumin-exprimierenden Tumoren unter den chromophoben Nierenzellkarzinomen von 92 % bis 100 % [1, 2, 33, 34, 83]. Martignoni et al. berichten in zwei Arbeiten, dass sich in papillären und hellzelligen Nierenzellkarzinomen keine Expression von Parvalbumin finden ließ. Somit betrügen Sensitivität und Spezifität jeweils 100 % [33, 34]. Im Gegensatz hierzu muss eine Studie von Young et al. genannt werden, in der immerhin 22 % der hellzelligen und sogar 71 % der papillären Nierenzellkarzinome positiv bzgl. Parvalbumin reagierten [83]. Unterschiede bei Anfärbung und Auswertung der histologischen Schnitte, teils niedrige Fallzahlen und möglicherweise auch falsch

klassifizierte Nierenzellkarzinome mögen zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Tendenziell aber kann man davon ausgehen, dass Parvalbumin-Expression typisch für das chromophobe Nierenzellkarzinom ist.

## 4.4 Vimentin-Expression

Die Expression von Vimentin erbrachte hinsichtlich der drei Nierenzellkarzinomsubtypen ein signifikantes Ergebnis, dahingehend, dass 37,5 % der hellzelligen und 40,3 % der papillären Nierenzellkarzinome eine positive Färbung aufwiesen im Gegensatz zu nur 4,3 % der chromophoben Nierenzellkarzinome. Jedoch ist anzumerken, dass Vimentin nicht zur Differenzierung zwischen hellzelligem und papillärem Nierenzellkarzinom geeignet ist bei annähernd identischem Anteil positiver Tumore. Die chromophoben Nierenzellkarzinome hingegen waren bis auf zwei Ausnahmen sämtlich negativ, so dass bei positiver Vimentin-Expression eines Nierenzellkarzinoms das Vorliegen eines chromophoben wenig wahrscheinlich erscheint. Jedoch kann eine negative Vimentin-Expression ein hellzelliges oder papilläres Nierenzellkarzinom bei einem relativ hohen Anteil an negativen Tumoren (62,5 %, bzw. 59,7 %) in diesen Entitäten nicht mit letzter Sicherheit ausschließen. Aus Sicht des chromophoben Nierenzellkarzinoms ergibt sich somit eine niedrige Sensitivität von 38,8 % bei einer hohen Spezifität von 95,7 %. In einer aktuellen Arbeit von Liu et al. waren dagegen 100 % (45/45) aller hellzelligen Nierenzellkarzinome positiv im Gegensatz zu 0 % (0/22) der chromophoben, so dass sich hier eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % ergab. Papilläre Nierenzellkarzinome waren nicht Gegenstand jener Arbeit [30]. Ähnliche Ergebnisse erbrachten andere Studien mit einem Anteil von 61 % bis 87 % an positiven hellzelligen Karzinomen, 63 % bis 100 % positiven papillären Tumoren und lediglich 0 % bis 21 % an positiv gefärbten chromophoben Nierenzellkarzinomen [1, 25, 47, 64, 83]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit waren jedoch die Fallzahlen an den einzelnen Tumorentitäten geringer mit Ausnahme von 256 hellzelligen Nierenzellkarzinomen in der Studie von Pan et al. Die Unterschiede bzgl. der Ergebnisse sind möglicherweise bedingt durch unterschiedliche Modalitäten bei den immunhistochemischen Färbungen und der Auswertung derselben.

## 4.5 AMACR-Expression

Hinsichtlich der Expression von Alpha-Methyl-Acyl-CoA-Racemase waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Nierenzellkarzinomsubtypen signifikant. Besonders das papilläre Nierenzellkarzinom zeigte mit 88,3 % einen hohen Anteil an diffus positiven Tumoren. 3,3 % waren fokal positiv, lediglich 8,3 % negativ. Die hellzelligen Nierenzellkarzinome kamen auf einen Anteil von 27 % an diffus positiv und 12,7 % fokal positiv gefärbten Tumoren. 60,3 % waren negativ. Bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen wiesen 34,9 % ein diffus positives und 2,3 % ein fokal positives Färbemuster auf. 62,8 % hingegen waren negativ. Somit bietet sich AMACR als diagnostischer Marker für das papilläre Nierenzellkarzinom an. Geht man von einem diffus positiven Färbemuster als charakteristisch für das papilläre Nierenzellkarzinom aus, so ergibt sich eine Sensitivität von 88,3 % gegenüber hellzelligem, bzw. chromophobem Nierenzellkarzinom. Die Spezifität beträgt dann 73 %, bzw. 65,1 %. Will man die Sensitivität auf 91,6 % steigern, so muss man auch das fokal positive Färbemuster als Charakteristikum für das papilläre Nierenzellkarzinom ansehen. Allerdings sinkt die Spezifität gegenüber dem hellzelligen Nierenzellkarzinom dadurch unverhältnismäßig auf 60,3 % und gegenüber dem chromophoben Nierenzellkarzinom auf 62,8 %.

Zusammengenommen kann man davon ausgehen, dass eine diffus positive Färbereaktion bzgl. AMACR als starker Hinweis auf das Vorliegen eines papillären Nierenzellkarzinoms genommen werden kann. Allerdings ist ein hellzelliges, und v.a. ein chromophobes Nierenzellkarzinom damit nicht ausgeschlossen. Eine negative Reaktion auf AMACR macht ein papilläres Nierenzellkarzinom dagegen relativ unwahrscheinlich.

Ein Vergleich mit der Literatur ergibt hingegen ein eindeutigeres Bild bzgl. der Reaktivität der verschiedenen Tumorentitäten. Übereinstimmend wird von einem immens hohen Anteil an positiven papillären Nierenzellkarzinomen von 96,4 % bis 100 % berichtet. Die hellzelligen Nierenzellkarzinome nehmen eine Mittelposition ein mit 10 % bis 25 % positiven Tumoren. Unter den chromophoben Nierenzellkarzinomen war hingegen in keinem einzigen Fall eine positive Reaktion zu verzeichnen [40, 71, 78]. Hier zeigen sich doch deutliche Diskrepanzen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit, besonders was die chromophoben Nierenzellkarzinome betrifft, die hier zu 34,9 % diffus positiv reagierten. Eine mögliche Erklärung mag die Tatsache liefern, dass die Fallzahlen an chromophoben Nierenzellkarzinomen mit 6 [40], bzw. 10 [71] Exemplaren zum Teil sehr niedrig waren. Auch Unterschiede bei der Durchführung und Auswertung der Färbungen



mögen einen Ausschlag geben. Weitere Studien mit einem höheren Anteil an chromophoben Nierenzellkarzinomen sind durchaus angebracht.

## 4.6 GST- $\alpha$ -Expression

In dieser Arbeit war auch die Expression von Glutathionyl-S-Transferase  $\alpha$  (GST- $\alpha$ ) untersucht worden. Die hellzelligen Nierenzellkarzinome zeigten hierbei zu 93,7 % ein stark positives und zu 1,6 % ein schwach positives Färbemuster, wohingegen 4,7 % negativ waren. Anders bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen. Hier waren lediglich 19,6 % stark positiv und 13 % schwach positiv, sowie 67,4 % negativ. Die papillären Nierenzellkarzinome nehmen eine Mittelposition zwischen den beiden anderen Entitäten ein mit 44,1 % stark positiv und 15,2 % schwach positiv gefärbten, sowie 40,7 % negativen Tumoren. Die Unterschiede zwischen den Subtypen waren dabei signifikant. Geht man nun davon aus, dass eine stark positive Reaktion der GST- $\alpha$ -Expression charakteristisch für hellzellige Nierenzellkarzinome ist, so würde sich im Hinblick auf die Differenzierung vom chromophoben Nierenzellkarzinom eine Sensitivität von 93,7 % bei einer Spezifität von 80,4 % ergeben, was GST- $\alpha$  durchaus als geeigneten Marker zur Unterscheidung beider Entitäten erscheinen lässt. Würde man auch eine schwach positive GST- $\alpha$ -Expression als Merkmal für hellzellige Nierenzellkarzinome hinzunehmen, so würde die Sensitivität sogar auf 95,3 % zunehmen. Im Gegenzug allerdings säne die Spezifität übermäßig auf 67,4 % ab. Somit sollte nur eine stark positive GST- $\alpha$ -Expression als Charakteristikum für hellzellige Nierenzellkarzinome gewertet werden. Zur Differenzierung zwischen hellzelligen und papillären Nierenzellkarzinomen, die ebenfalls einen relativ hohen Anteil an stark positiv gefärbten Tumoren aufwiesen, ist GST- $\alpha$  dagegen nur bedingt geeignet. Geht man wieder von einer stark positiven Färbereaktion als typisch für hellzellige Nierenzellkarzinome aus, so ergibt sich bei einer Sensitivität von 93,7 % eine Spezifität von lediglich 65,9 %. Analog zu den chromophoben Nierenzellkarzinomen könnte eine Steigerung der Sensitivität auf 95,3 % bei stark sinkender Spezifität auf 40,7 % erreicht werden, wenn auch schwach positive GST- $\alpha$ -Expression als Hinweis für ein hellzelliges Nierenzellkarzinom gelten würde. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit fanden sich in der Literatur einige Studien, die GST- $\alpha$  als geeigneten Marker für das hellzellige Nierenzellkarzinom

hervorheben. Der Anteil an positiv gefärbten Tumoren war ähnlich hoch mit 82,2 % bis 91 %. Positive GST- $\alpha$ -Expression in chromophoben Nierenzellkarzinomen wurde in geringerem Ausmaß, nämlich von 0 % bis 10 % berichtet [13, 30, 71]. Papilläre Nierenzellkarzinome waren nur Gegenstand der Arbeiten von Chuang et al. und Takahashi et al. [13, 71]. Bei ersterer fanden sich 20,4 % GST- $\alpha$ -exprimierende papilläre Nierenzellkarzinome, in der zweiten dagegen waren alle papillären Tumore negativ. Besonders an der Arbeit von Takahashi et al. muss jedoch kritisiert werden, dass die Fallzahlen mit 10 Tumoren je Nierenzellkarzinomsubtyp sehr gering waren. Bzgl. der GST- $\alpha$ -Expression von papillären Nierenzellkarzinomen sind jedenfalls weitere Studien nötig, um genauere Aussagen treffen zu können.

## 4.7 CK 19-Expression

Bei der Expression von CK 19 fanden sich zwischen den Nierenzellkarzinomsubtypen statistisch signifikante Unterschiede. Die papillären Nierenzellkarzinome waren zu 74,6 % stark positiv und zu 4,8 % schwach positiv. Im Gegensatz dazu waren die hellzelligen Nierenzellkarzinome zu 15,4 % stark positiv und zu ebenfalls 15,4 % schwach positiv. Bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen zeigten 23,2 % eine starke CK 19-Expression und weitere 16,3 % eine schwache. Somit scheint CK 19 ein geeigneter diagnostischer Marker für das papilläre Nierenzellkarzinom zu sein. In der Differenzierung von den anderen beiden Tumorentitäten beträgt die Sensitivität, ausgehend von der Tatsache, dass nur eine stark positive Färbung als typisch für das papilläre Nierenzellkarzinom gilt, 74,6 %. Die Spezifität beträgt dann 81,5 %. Gegenüber dem hellzelligen Karzinom alleine würde die Spezifität mit 84,6 % höher ausfallen als gegenüber dem chromophoben Karzinom mit 76,8 %. CK 19 ist somit zur Differenzierung zwischen papillärem und hellzelligem Karzinom etwas besser geeignet als zwischen papillärem und chromophobem. In beiden Fällen sind jedoch falsch-positive und falsch-negative Befunde nicht auszuschließen. Eine Erhöhung der Sensitivität auf 79,4 % ist möglich, wenn man auch schwach positive Reaktionen als typisch für das papilläre Nierenzellkarzinom hinzunimmt. Dann sinkt allerdings die Spezifität überproportional auf 69,2 % beim hellzelligen und 60,5 % beim chromophoben Nierenzellkarzinom, bzw. auf 65,7 % beide zusammengenommen.

Zur CK 19-Expression finden sich in der Literatur eher wenige Arbeiten. Zum einen ist hier die bereits zuvor zitierte Studie von Takahashi et al. zu nennen [71]. In dieser wird propagiert, dass CK 19 vor allem als Marker für das Urothel-Karzinom geeignet scheint mit einer positiven Reaktion von 100 % dieser Tumoren. Von den Nierenzellkarzinomen zeigten nur 10 % der papillären eine CK 19-Expression, jedoch keines der hellzelligen oder chromophoben Karzinome [71]. Diese Ergebnisse decken sich keineswegs mit denen der vorliegenden Arbeit, sind jedoch aufgrund der mit zehn Exemplaren je Tumorentität niedrigen Fallzahlen auch nicht sehr aussagekräftig. Im Gegensatz dazu ist eine Arbeit von Skinnider et al. zu nennen [64]. Auch hier sind die Fallzahlen mit 15 je Nierenzellkarzinomsubtyp nicht gerade hoch. Die Ergebnisse allerdings kommen eher mit denen der vorliegenden Arbeit überein. Auch hier zeigte bevorzugt das papilläre Nierenzellkarzinom eine positive Reaktion auf CK 19, wenn auch geringer mit 67 % der Tumoren. Die chromophoben Nierenzellkarzinome waren ebenfalls nur zu einem geringeren Anteil positiv, nämlich 7 %. Annähernd Übereinstimmung herrschte bei den hellzelligen Nierenzellkarzinomen mit einem positiven Anteil von 13 % der Tumore [64]. Auch hier deutet sich somit an, dass CK 19 als diagnostischer Marker für das papilläre Nierenzellkarzinom bedeutsam sein kann.

## **4.8 CA II-Expression**

Auch die Expression von Carboanhydrase II (CA II) wurde immunhistochemisch untersucht. Die Intensität der Färbung wurde nach zwei verschiedenen Einteilungen festgelegt. In einer wurde nur in eine positive und eine negative Expression unterschieden. Hier waren 79,7 % der hellzelligen Nierenzellkarzinome positiv. Nahezu das identische Ergebnis fand sich mit 81 % bei den papillären Karzinomen. Etwas höher war die Expression unter den chromophoben Nierenzellkarzinomen mit 92,9 %. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen waren jedoch statistisch nicht signifikant. Ein zweiter Ansatz differenzierte die positive CA II-Expression weiter in drei Untergruppen. Hier waren von den hellzelligen Nierenzellkarzinomen 32,8 % schwach positiv, 39,1 % mittel positiv und 7,8 % stark positiv. Auch hier zeigten die papillären Nierenzellkarzinome ein ähnliches Verteilungsmuster mit 36,2 % schwach positiven, 39,6 % mittel positiven und 5,2 % stark positiven Tumoren. Die chromophoben Nierenzellkarzinome zeigten im

schwach und mittel positiven Bereich einen höheren Anteil im Gegensatz zum stark positiven. In Zahlen waren dies 47,6 % schwach positive, 42,9 % mittel positive und 2,4 % stark positive chromophobe Karzinome. Jedoch waren auch hier die Differenzen statistisch nicht signifikant, so dass abschließend festgestellt werden muss, dass CA II nicht zur immunhistochemischen Unterscheidung zwischen den Nierenzellkarzinomentitäten herangezogen werden kann.

CA II war bisher nur selten Gegenstand der Forschung am Nierenzellkarzinom. In der Studie von Takahashi et al. wird es jedoch als potentieller differentialdiagnostischer Marker für das chromophobe Nierenzellkarzinom ins Spiel gebracht [71]. Grund zu dieser Annahme gab eine Expression von CA II in chromophoben Nierenzellkarzinomen von 100 % im Gegensatz zu 10 % bei den papillären und 30 % bei den hellzelligen Karzinomen [71]. Bzgl. der chromophoben Nierenzellkarzinome besteht Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit. Bei den papillären und hellzelligen Karzinomen jedoch nicht. Hier war der Anteil an positiven Tumoren weit höher. Eine mögliche Erklärung der Unterschiede ist der Schwachpunkt der Studie von Takahashi et al., nämlich extrem niedrige Fallzahlen mit lediglich je zehn Exemplaren von jeder Tumorentität [71].

## **4.9 Differenzierung der Nierenzellkarzinomsubtypen durch immunhistochemische Markerkombinationen**

Wie schon in der Einleitung beschrieben handelt es sich bei den Nierenzellkarzinomsubtypen um jeweils eigene Tumorentitäten, die sich hinsichtlich ihrer Prognose unterscheiden. So haben das chromophobe und das papilläre Nierenzellkarzinom einen günstigeren Krankheitsverlauf als das hellzellige [5, 11, 31]. Mitunter ist jedoch die Differenzierung unter dem Lichtmikroskop an HE-gefärbten Schnitten, wie es Standard ist, schwierig. Insbesondere gibt es von allen drei Subtypen eine eosinophile Variante, die die Unterscheidung schwierig macht. Zytogenetik und Elektronenmikroskopie könnten hier zwar Abhilfe schaffen, doch sind diese Verfahren zeitaufwendig, kostenintensiv und stehen nicht überall zur Verfügung. Als Alternative bietet sich die Immunhistochemie an.

Sehr viele Antigene wurden auf ihre Expression in den einzelnen Nierenzellkarzinomsubtypen hin untersucht. Als sich erste vielversprechende Marker abzeichneten, versuchte man immunhistochemische Profile der einzelnen Tumorentitäten zu erstellen.

An dieser Stelle sei eine Arbeit von Skinnider und Amin erwähnt, in der die Ergebnisse einer Vielzahl an Studien zusammengefasst sind und die für nahezu alle renalen Tumoren, gutartige wie bösartige, die jeweiligen charakteristischen Expressionsprofile aufführt [63]. Zur Differenzierung zwischen hellzelligem und chromophobem Nierenzellkarzinom empfehlen die beiden Autoren Parvalbumin, KIT, Ksp cadherin, CD 10, CK 7 und Vimentin heranzuziehen. Typisch für das chromophobe Karzinom ist demnach eine Expression von Parvalbumin, KIT und Ksp-cadherin bei fehlender Vimentin-Expression. Umgekehrt verhält es sich beim hellzelligen Nierenzellkarzinom, das außerdem typischerweise eine positive Reaktion für CD 10 und eine negative für CK 7 zeigt [63]. Für das papilläre Nierenzellkarzinom gilt besonders in Abgrenzung zum Sammelrohrkarzinom und metanephritischen Adenom eine positive Reaktion für AMACR, CD 10, CK 7, EMA und RCC Ma als charakteristisch. Gleichzeitig seien sie negativ für WT-1 und CD 57 [63].

Eine andere Arbeit, die sich mit diesem Thema befasst hat, ist die von Zhou et al. [84]. Hier wird als typisches Immunoprofil für das hellzellige Nierenzellkarzinom eine positive Reaktion für CD 10, RCC Ma, EMA, Vimentin und MUC1 bei gleichzeitig fehlender Expression für CK 7, CK 20, Parvalbumin, AMACR, E-cadherin und KIT (CD 117) angeführt. Bzgl. des papillären Nierenzellkarzinoms differenzieren die Autoren zwischen Typ 1 und Typ 2, wobei beide folgendes Immunoprofil gemeinsam hätten: Positive Reaktion für CD 10, RCC Ma, LMWCK und AMACR, sowie negative Reaktion für HMWCK und CK 20. Hinzu kommt beim Typ 1 eine positive Expression von CK 7 und MUC1 im Gegensatz zu einer positiven Reaktion für E-cadherin bei Typ 2. Die Autoren weisen bereits auf die Schwierigkeit einer Differenzierung zwischen hellzelligem und papillärem Nierenzellkarzinom hin, da beide Subtypen die meisten immunhistochemischen Marker teilen. CK 7 und AMACR könnten hier hilfreich sein. Das für das chromophobe Nierenzellkarzinom typische Immunoprofil ist eine positive Expression von CK 7, EMA, MUC1, E-cadherin, KIT (CD 117) und Parvalbumin. Charakteristischerweise sind diese Karzinome CK 20, RCC Ma, CD 10, Vimentin, HMWCK und AMACR negativ. Zur Differenzierung zwischen chromophobem und hellzelligem Nierenzellkarzinom empfehlen Zhou et al. CK 7, RCC Ma, CD 10, Vimentin, KIT (CD 117), Parvalbumin und E-cadherin [84].

Hier sei noch eine Arbeit von Martignoni et al. erwähnt, die sich ebenfalls für immunhistochemische Marker zur Differentialdiagnose und auch Prognose beim Nierenzellkarzinom beschäftigt [32]. Empfohlen wird hier ein Panel aus CD 10, Parvalbumin, AMACR, CK 7 und S100A1. Die hellzelligen Nierenzellkarzinome zeichnen sich hierbei durch eine hohe Rate an CD 10- und S100A1-positiven Tumoren aus. Auch für Vimentin zeigen sie häufig eine positive Reaktion. AMACR-Expression ist seltener zu finden. Positivität für CK 7 und Parvalbumin findet sich dagegen kaum bis gar nicht. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen ist eine hohe Expression von AMACR, CD 10 und S100A1 typisch, genauso wie für Vimentin und CK 19. Chromophobe Nierenzellkarzinome zeigen typischerweise eine starke Expression von Parvalbumin und KIT, sowie für CK 7. S100A1 und AMACR werden dagegen selten bis gar nicht exprimiert [32].

## **4.10 Auswahl einer geeigneten Markerkombination und Anwendung auf die untersuchten Karzinome**

Im Gegensatz zu den meisten der oben zitierten Studien wurde in der vorliegenden Arbeit eine größere Anzahl an chromophoben Nierenzellkarzinomen eingeschlossen, nämlich 66 Tumore, von denen immerhin insgesamt 52 verwertbare Ergebnisse lieferten. Kaum eine andere Studie kommt auf derartig hohe Fallzahlen. Außerdem wurden hier Triplets aus je einem hellzelligen, papillären und chromophoben Nierenzellkarzinom gebildet, zwischen denen jeweils TNM-Stadium und Differenzierungsgrad identisch waren, um deren möglichen Einfluss auf die immunhistochemische Färbung zu nehmen. Dieses Vorgehen wurde in der Art nach Kenntnis des Autors bisher noch nicht praktiziert. Auch die Anzahl der verwendeten immunhistochemischen Marker war mit insgesamt acht relativ hoch. In der Literatur finden sich etliche Arbeiten, die nur die Expression weniger, oftmals sogar nur eines Antigens erforschten.

Betrachtet man nun die acht in der vorliegenden Arbeit untersuchten immunhistochemischen Marker, so muss man feststellen, dass Carboanhydrase II (CA II) nicht zur Differenzierung zwischen den einzelnen Nierenzellkarzinomsubtypen geeignet ist aufgrund fehlender statistisch signifikanter Unterschiede in der Expression. Eine Studie von Takahashi et al. hatte zwar behauptet, dass CA II-Expression typisch für das

chromophobe Nierenzellkarzinom sei bei allerdings sehr niedrigen Fallzahlen von zehn je Subtyp [71]. Dem ist anhand der vorliegenden Ergebnisse zu widersprechen.

Vimentin scheint als Marker für ein differentialdiagnostisches Panel auch eher ungeeignet zu sein. Zwar waren die Unterschiede bzgl. der Vimentin-Expression zwischen den drei Subtypen signifikant. Jedoch war der Anteil an Vimentin-positiven Tumoren bei hellzelligen und papillären Nierenzellkarzinomen gleich hoch bei jeweils vielen negativen Tumoren in beiden Gruppen. Lediglich die chromophoben Nierenzellkarzinome waren bis auf zwei Ausnahmen konstant negativ, so dass bei einem Vimentin-exprimierenden Tumor ein chromophobes Nierenzellkarzinom nahezu ausgeschlossen ist. Zwischen hellzelligen und papillären Nierenzellkarzinomen hingegen vermag Vimentin nicht zu differenzieren.

Verbleiben also noch sechs Antigene zur Auswahl, von denen jeweils zwei als charakteristisch für einen der drei Subtypen gelten könnten.

Glutathionyl-S-Transferase  $\alpha$  (GST- $\alpha$ ) zeigt in 93,7 % der hellzelligen Nierenzellkarzinome eine stark positive Expression im Gegensatz zu 44,1 % bei den papillären und 19,6 % der chromophoben. Als zweiter Marker für das hellzellige Nierenzellkarzinom kommt CD 10 in Frage mit einem positiven Anteil von 77,8 % in dieser Entität. Die papillären und chromophoben Nierenzellkarzinome zeigen bei diesem Marker eine häufigere Expression als dies bei GST- $\alpha$  der Fall ist mit 51,8 %, bzw. 29,5 %.

Als typische Marker für das papilläre Nierenzellkarzinom bieten sich AMACR und CK 19 an. Bei AMACR betrug der Anteil der diffus positiven papillären Nierenzellkarzinome 88,3 %. Im Gegensatz dazu waren jedoch nur 27 % der hellzelligen und 34,9 % der chromophoben Tumoren diffus positiv. Problematisch ist dennoch, dass der Anteil der nicht-papillären Karzinome, die AMACR exprimieren, relativ hoch ist und so eine fälschliche Zuordnung zu den papillären Nierenzellkarzinomen möglich ist. Für CK 19 reagierten 74,6 % der papillären Tumore stark positiv, was bedeutet, dass die Sensitivität niedriger ist als die von AMACR. Im Gegenzug ist jedoch auch der Anteil an stark positiven Tumoren mit 15,4 % bei den hellzelligen und 23,2 % bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen geringer als der bei AMACR. Somit ist die Spezifität bei der Differenzierung zwischen den einzelnen Tumorentitäten im Falle von CK 19 höher als bei AMACR. Beide Marker weisen somit Vor- und Nachteile auf, wobei in beiden Fällen mit relativ hohen Raten an falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen zu rechnen ist. Mit KIT und Parvalbumin fanden sich zwei immunhistochemische Marker mit einer hohen Expression bei den chromophoben Nierenzellkarzinomen. Bei KIT betrug sie 76,1

%, bei Parvalbumin 77,8 %. Sämtliche hellzelligen Nierenzellkarzinome hingegen waren bzgl. beider Antigene negativ, so dass KIT- oder Parvalbumin-Expression ein hellzelliges Karzinom ausschließt. Auch die papillären Nierenzellkarzinome waren größtenteils negativ. Nur 4,8 % exprimierten KIT. Bei Parvalbumin waren immerhin 21,8 % der papillären Tumoren positiv. Somit ist die Sensitivität von KIT und Parvalbumin bzgl. des chromophoben Nierenzellkarzinoms annähernd gleich hoch, die Spezifität von KIT jedoch übertrifft die von Parvalbumin, bei dem ein höherer Anteil an falsch-positiven papillären Tumoren zu erwarten ist.

Würde man nun ein Panel aus drei immunhistochemischen Markern aufstellen, für jeden Subtyp jeweils einen, so würde sich GST- $\alpha$  für das hellzellige, AMACR oder CK 19 für das papilläre und KIT für das chromophobe Nierenzellkarzinom anbieten. Eine korrekte Zuordnung zu einer der drei Tumorentitäten wäre jedoch hiermit nur in einem geringen Anteil möglich, da insbesondere KIT und CK 19 einige falsch-negative Befunde erbringen würden. Des weiteren zeigen GST- $\alpha$  und AMACR, bzw. CK 19 einen hohen Anteil an falsch-positiven Befunden.

Eine mögliche Lösung wäre ein Panel aus sechs immunhistochemischen Markern, nämlich GST- $\alpha$ , CD 10, AMACR, CK 19, KIT und Parvalbumin. Für die Expression eines jeden dieser Antigene würde jeweils ein Punkt vergeben werden. CD 10 und GST- $\alpha$  zählen dabei für das hellzellige Nierenzellkarzinom, CK 19 und AMACR für das papilläre, KIT und Parvalbumin für das chromophobe. Die Entität, die dabei die meisten Punkte auf sich vereint, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit vor. Sollten zwei Subtypen gleich viele Punkte erhalten oder alle Färbungen negativ ausfallen, so müssten weitergehende Untersuchungen im Zweifelsfall herangezogen werden, wie Elektronenmikroskopie oder Zytologie. Einen besonderen Fall stellt die Expression von KIT und/oder Parvalbumin dar, da in diesem Fall ein hellzelliges Nierenzellkarzinom ausgeschlossen ist.

Wendet man nun dieses Schema auf die in dieser Arbeit untersuchten Karzinome an, so ergibt sich folgendes Bild. 72,9 % der hellzelligen Nierenzellkarzinome wurden richtig erkannt. Bei 15,7 % kommt differentialdiagnostisch vom Expressionsmuster her auch ein papilläres Karzinom in Frage. Lediglich 4,3 % wären fälschlicherweise als papillärer Tumor eingeteilt worden. Bei 7,1 % war aufgrund komplett fehlender Antigen-Expression keine Zuordnung zu einem der drei Subtypen möglich gewesen. Auffällig ist, dass kein einziges hellzelliges Nierenzellkarzinom falsch als chromophobes Karzinom



diagnostiziert wurde. Zu erklären ist dies durch die fehlende Expression von KIT und Parvalbumin bei den hellzelligen Karzinomen.

Ein etwas anderes Bild fand sich bei den papillären Nierenzellkarzinomen. Hier wurden nur 56,7 % richtig diagnostiziert. Bei 14,9 % wäre auch ein hellzelliges Karzinom in Frage gekommen. Ebenfalls 14,9 % wären nach ihrem Expressionsschema sogar zu den hellzelligen Nierenzellkarzinomen gerechnet worden. Nicht ganz so extrem verhält es sich gegenüber dem chromophoben Nierenzellkarzinom. Jeweils 3 % kamen differentialdiagnostisch auch als chromophobes Karzinom in Frage, bzw. wären sogar falsch als chromophob diagnostiziert worden. Bei 7,5 % der papillären Karzinome war aufgrund fehlender Antigen-Expression gar keine Zuordnung möglich. Die häufigere falsche Zuordnung bei den papillären Nierenzellkarzinomen erklärt sich durch die relativ häufige Expression von eigentlich zu den anderen Entitäten gehörenden Markern, insbesondere von GST- $\alpha$  und CD 10.

Von den chromophoben Nierenzellkarzinomen dagegen wurden 63,5 % richtig zugeordnet. 17,3 % kamen ausgehend von ihrem Expressionsprofil her auch als papilläre Tumore in Frage. 5,8 % waren aufgrund der exprimierten Marker sogar fälschlich als papillär anzusehen. Immerhin 9,6 % waren wegen komplett fehlender Antigen-Expression oder nicht verwertbarer Färbung nicht zuzuordnen. Nur 3,8 % der chromophoben Nierenzellkarzinome wurden falsch als hellzellig diagnostiziert. Als problematisch erwies sich, dass die chromophoben Karzinome in einem verhältnismäßig hohen Prozentsatz „papilläre Marker“ wie AMACR und CK 19 exprimierten.

Welches Vorgehen ist nun am geeignetsten für die Praxis? Eine reine Differenzierung der einzelnen Nierenzellkarzinomsubtypen nur durch eine Kombination von immunhistochemischen Markern ist nicht sicher genug. Außerdem dürfte der routinemäßige Einsatz der Immunhistochemie auch relativ kostenintensiv sein. Deshalb sollte zuerst wie bisher die Anfertigung von Schnitten mit HE-Färbung erfolgen, die anschließend von einem Pathologen begutachtet werden. Sollte dadurch keine sichere Diagnose gestellt werden können, so ist über den zusätzlichen Einsatz von immunhistochemischen Markern nachzudenken. Ideal wäre es, wenn bereits durch den Pathologen die Auswahl auf zwei Subtypen beschränkt werden könnte. Bei der Entscheidung zwischen hellzelligem und chromophobem Nierenzellkarzinom kämen dann GST- $\alpha$ , CD 10, Parvalbumin und KIT zum Einsatz. Hier dürfte dann, wie aus dem weiter oben gesagten ersichtlich, zu einer hohen Wahrscheinlichkeit die richtige Diagnose gestellt werden. So wurde ja in der vorliegenden Arbeit kein einziges der hellzelligen

Karzinome fälschlich den chromophoben zugeordnet und lediglich 3,8 % der chromophoben falsch als hellzellig diagnostiziert. Bei der Unterscheidung zwischen chromophoben und papillären Karzinomen müssten Färbungen für KIT, Parvalbumin, CK 19 und AMACR angefertigt werden. Hier muss allerdings in höherem Maße auch mit falschen Zuordnungen zum jeweils anderen Subtyp gerechnet werden aufgrund der relativ hohen Expression von „chromophoben Markern“ beim papillären Nierenzellkarzinom und umgekehrt. Besonders schwierig jedoch ist die Differenzierung zwischen hellzelligem und papillärem Nierenzellkarzinom unter der Verwendung von Antikörpern gegen CD 10, GST- $\alpha$ , CK 19 und AMACR. Vor allem CD 10, aber auch GST- $\alpha$  werden in ziemlich hohem Maße von papillären Nierenzellkarzinomen exprimiert, so dass viele falsch als hellzellig diagnostiziert werden, bzw. keine sichere Entscheidung getroffen werden kann. Aber auch bei den hellzelligen Tumoren kamen fälschliche Einteilungen zum papillären Nierenzellkarzinom vor durch die Expression von CK 19 und AMACR. Sollte auch mittels Immunhistochemie keine sichere Entscheidung getroffen werden können, so verbleiben noch Zytogenetik und Elektronenmikroskopie, die jedoch wie bereits erwähnt kostenintensiv, zeitaufwendig und nur in Zentren verfügbar sind. Weitere immunhistochemische Marker sollten deshalb ausfindig gemacht werden, die noch besser zwischen den einzelnen Entitäten unterscheiden können. Vor allem zwischen hellzelligem und papillärem Nierenzellkarzinom gestaltete sich, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Differenzierung als schwierig.

## **4.11 Bewertung und Ausblick auf die Zukunft**

In der Zusammenfassung muss gesagt werden, dass das vorgestellte Verfahren sicherlich noch weitere Verbesserungen benötigt und sich noch in weiteren Studien bewähren muss. Weitere immunhistochemische Marker sollten identifiziert werden, die eine noch genauere und sicherere Unterscheidung der einzelnen Subtypen der Nierenzellkarzinome ermöglichen, vor allem zwischen hellzelligem und papillärem, aber auch zwischen chromophobem und papillärem Nierenzellkarzinom. Dennoch konnte anhand dieser Arbeit eine viel versprechende Grundlage für ein Antikörperbasiertes Verfahren zur Unterstützung der traditionellen Differentialdiagnose des Nierenzellkarzinoms geschaffen werden.

Ein weiteres wichtiges Problem, das es noch zu lösen gibt, muss angesprochen werden. Von immenser klinischer Bedeutung ist, dass eine Unterscheidung zwischen dem malignen Nierenzellkarzinom und dem Onkozytom ermöglicht werden muss. Dieser benigne Nierentumor ist vor allem gegenüber dem chromophoben Nierenzellkarzinom eine wichtige Differentialdiagnose. Einige Autoren haben sich bereits mit dem immunhistochemischen Profil des Onkozytoms befasst. Typischerweise exprimiert ein Großteil dieser benignen Nierentumore EMA, E-cadherin, Parvalbumin und KIT [32]. Negativ waren sie für Vimentin, CD 10 und RCC Ma [84]. Aufgrund ihrer histologischen Ähnlichkeit hat die Differenzierung des Onkozytoms vom chromophoben Nierenzellkarzinom besondere Bedeutung. Mögliche Marker wären CK 7, MOC 31 und EpCam, die vor allem von den chromophoben Nierenzellkarzinomen und weniger häufig von den Onkozytomen exprimiert werden [63]. Insgesamt ist die Differenzierung dieser beiden Tumoren weiterhin als schwierig anzusehen und weitere Anstrengungen müssen unternommen werden um dieses Problem zu lösen. Im Erfolgsfall könnte dann eine immunhistochemische Markerkombination erstellt werden, die neben den drei malignen Hauptsubtypen des Nierenzellkarzinoms auch das Onkozytom als häufigsten benignen Nierentumor erfasst. Ob auch für die vielen anderen selteneren malignen und benignen Nierenraumforderungen immunhistochemische Profile erstellt werden sollten, steht noch zur Diskussion.

## 5. Zusammenfassung

Beim Nierenzellkarzinom handelt es sich nicht um eine einzelne Tumorentität. Man unterscheidet verschiedene Subtypen, von denen die drei häufigsten in absteigender Reihenfolge das hellzellige, das papilläre und das chromophobe Nierenzellkarzinom sind. Nicht nur aus didaktischen Gründen, sondern auch weil sich diese drei Subtypen in ihrer Genese, ihrem Ursprung und vor allem in ihrer Prognose unterscheiden, ist eine exakte Zuordnung zur richtigen Entität von großer Bedeutung. Für die Zukunft spielt auch der Aspekt eine Rolle, dass fortgeschrittene metastasierte Nierenzellkarzinome durch eine zielgerichtete Therapie mit kleinmolekularen Substanzen therapiert werden können. Diese Substanzen greifen in unterschiedliche Signalwege ein, die sich von Nierenzellkarzinom-subtyp zu Subtyp unterscheiden können.

Die bisherige Differenzierung anhand gefärbter HE-Schnitte gestaltet sich manchmal als schwierig, da bei allen drei Entitäten eosinophile Varianten vorkommen, die sich schwer unterscheiden lassen. Vor allem bzgl. der Diagnose des selteneren chromophoben Nierenzellkarzinoms ist große Erfahrung seitens des untersuchenden Pathologen erforderlich, die nur mühsam zu erwerben ist.

Deshalb wurde mit Hilfe dieser Arbeit versucht eine immunhistochemische Markerkombination zu finden, die anhand charakteristischer Expressionsprofile der Nierenzellkarzinom-haupttypen eine genaue Zuordnung erlaubt.

Zu diesem Zweck wurden insgesamt 66 chromophobe Nierenzellkarzinome akquiriert, denen jeweils ein hellzelliges und ein papilläres Nierenzellkarzinom, die vom TNM-Stadium und dem Differenzierungsgrad her identisch waren, zugeteilt wurden. Aus dem Tumorgewebe wurden repräsentative Areale ausgestanzt und *Tissue Micro Arrays* (TMA) gebildet. Diese wurden mit Antikörpern gegen acht verschiedene Antigene, die aufgrund der bisherigen Literaturergebnisse als geeignete Kandidaten zur Differenzierung der Subtypen erschienen, inkubiert. Hierbei handelte es sich um CA II, KIT, Parvalbumin, Vimentin, AMACR, GST- $\alpha$ , CD 10 und CK 19. Anhand der Intensität der Färbung und Anteil der gefärbten Zellen erfolgte eine Einteilung in positive und negative Expression. Bei manchen Markern wurden auch Zwischenstufen verwendet.

Bis auf CA II ergaben sich im  $\chi^2$ -Test jeweils signifikante Ergebnisse bzgl. der unterschiedlichen Anfärbbarkeit der einzelnen Subtypen. Es stellte sich heraus, dass CD 10

mit 77,8 % positiven und GST- $\alpha$  mit 93,7 % stark positiven hellzelligen Nierenzellkarzinomen ein geeigneter Marker für diese Entität wäre. Eine positive Reaktion in 76,1% der chromophoben Nierenzellkarzinome bei KIT und 77,8 % bei Parvalbumin legte den Schluss nahe, dass es sich bei beiden um Marker für diesen Subtyp handeln könnte. Für das papilläre Karzinom waren eine diffus positive Reaktion für AMACR, nämlich in 88,3 % und eine stark positive Reaktion für CK19, und zwar in 74,6 %, charakteristisch. Vimentin fiel vor allem durch den hohen Anteil von 95,7 % negativen chromophoben Nierenzellkarzinomen auf. Aber auch hellzellige und papilläre Nierenzellkarzinome waren nur zu einem geringen Teil, nämlich 37,5 %, bzw. 40,3 % positiv.

Insgesamt deckten sich die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse weitestgehend mit denen bisher veröffentlichter Studien.

Die immunhistochemische Markerkombination aus KIT, Parvalbumin, AMACR, GST- $\alpha$ , CD 10 und CK 19 wurde anschließend daraufhin überprüft, ob eine genaue Zuordnung der in dieser Arbeit eingeschlossenen Nierenzellkarzinome möglich wäre. Hierzu wurde eine positive Expression von KIT oder Parvalbumin mit jeweils einem Punkt für das chromophobe Nierenzellkarzinom bewertet. Eine diffus positive Reaktion für AMACR oder stark positive Reaktion für CK 19 ergab jeweils einen Punkt für das papilläre Nierenzellkarzinom. Eine positive Färbung für CD 10 oder stark positive für GST- $\alpha$  wurde mit je einem Punkt für das hellzellige Karzinom gewertet. Als Endergebnis wurde die Tumorentität angenommen, die die meisten Punkte auf sich vereinigte. Bei Gleichstand kamen differentialdiagnostisch mehrere Subtypen infrage. Insgesamt konnten so 72,9 % der hellzelligen, 56,7 % der papillären und 63,5 % der chromophoben Nierenzellkarzinome zugeordnet werden. Als besonders sicher erwies sich die Differenzierung zwischen chromophobem und hellzelligem Karzinom. Kein einziges der hellzelligen wäre fälschlich den chromophoben zugeordnet worden und nur 3,8 % der chromophoben Nierenzellkarzinome waren nach dem Ergebnis der Markerkombination falsch als hellzellig anzusehen. Problematisch erschien dagegen die Unterscheidung zwischen hellzelligen und papillären auf der einen und papillären und chromophoben Karzinomen auf der anderen Seite. Hier kam es jeweils zu verhältnismäßig vielen Fehleinschätzungen.

Abschließend kann gesagt werden, dass durch die hier untersuchte Markerkombination die bisherige Diagnostik der Nierenzellkarzinome nicht ersetzt werden kann. Aber sie stellt ein Hilfsmittel dar, das vor allem in der Differenzierung zwischen hellzelligem und chromophobem Nierenzellkarzinom gute Dienste leisten kann. Weitere Anstrengungen müssen jedoch unternommen werden, um das vorgestellte Verfahren weiter zu verbessern.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Abrahams NA, MacLennan GT, Khoury JD, Ormsby AH, Tamboli P, Doglioni C, Schumacher B, Tickoo SK (2004): Chromophobe renal cell carcinoma: a comparative study of histological, immunohistochemical and ultrastructural features using high throughput tissue microarray. *Histopathology* 45: 593-602
- 2 Adley BP, Papavero V, Sugimura J, Teh BT, Yang XJ (2006): Diagnostic Value of Cytokeratin 7 and Parvalbumin in Differentiating Chromophobe Renal Cell Carcinoma from Renal Oncocytoma. *Anal Quant Cytol Histol* 28: 228-236
- 3 Akhtar M, Tulbah A, Kardar AH, Ali MA (1997): Sarcomatoid renal cell carcinoma: the chromophobe connection. *Am J Surg Pathol* 21: 1188-1195
- 4 Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, Corless CL (2000): Use of Antibodies to RCC and CD 10 in the Differential Diagnosis of Renal Neoplasms. *Am J Surg Pathol* 24: 203-210
- 5 Beck SD, Patel MI, Snyder ME, Kattan MW, Motzer RJ, Reuter VE, Russo P (2004): Effect of papillary and chromophobe cell type on disease-free survival after nephrectomy for renal cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 11: 71-77
- 6 Bissig H, Richter J, Desper R, Meier V, Schraml P, Schaffer AA, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H(1999): Evaluation of the clonal relationship between primary and metastatic renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 155: 267-274
- 7 Boxer RJ, Waisman J, Lieber MM, Mampaso FM, Skinner DG (1979): Renal carcinoma: computer analysis of 96 patients treated by nephrectomy. *J Urol* 122: 598-601
- 8 Brunelli M, Eble JN, Zhang S, Martignoni G, Cheng L (2003): Gains of chromosomes 7, 17, 12, 16, and 20 and loss of Y occur early in the evolution of papillary renal cell neoplasia: a fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 16: 1053-1059
- 9 Bugert P, Gaul C, Weber K, Herbers J, Akhtar M, Ljungberg B, Kovacs G (1997): Specific genetic changes of diagnostic importance in chromophobe renal cell carcinomas. *Lab Invest* 76: 203-208

- 10 Castillo M, Petit A, Mellado B, Palacin A, Alcover JB, Mallofre C (2004): C-kit expression in sarcomatoid renal cell carcinoma: potential therapy with imatinib. *J Urol* 171: 2176-2180
- 11 Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML (2003): Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 27: 612-624
- 12 Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Leibovich BC, Frank I, Blute ML (2004): Sarcomatoid renal cell carcinoma: an examination of underlying histologic subtype and an analysis of associations with patient outcome. *Am J Surg Pathol* 28: 435-441
- 13 Chuang S-T, Chu P, Sugimura J, Tretiakova MS, Papavero V, Wang K, Tan MH, Lin F, Teh BT, Yang XJ (2005): Overexpression of Glutathione S-Transferase  $\alpha$  in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 123: 421-429
- 14 Corless CL, Aburatani H, Fletcher JA, Housman DE, Amin MB, Weinberg DS (1996): Papillary renal cell carcinoma: quantitation of chromosomes 7 and 17 by FISH, analysis of chromosome 3p for LOH, and DNA ploidy. *Diagn Mol Pathol* 5: 53-64
- 15 DeLong W, Sakr W, Grignon D (1996): Chromophobe renal cell carcinoma: a comparative histochemical and immunohistochemical study. *J Urol Pathol* 4: 1-8
- 16 de Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, Javidan J, Stricker H, Ro JY, Amin MB (2001): Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: a study of 101 cases. *Am J Surg Pathol* 25: 275-284
- 17 Dinney CP, Awad SA, Gajewski JB, Belitsky B, Lannon SG, Mack FG, Millard OH (1992): Analysis of imaging modalities, staging systems, and prognostic indicators for renal cell carcinoma. *Urology* 39: 122-129
- 18 Golimbu M, Joshi P, Sperber A, Tessler A, Al-Askari S, Morales P (1986): Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. *Urology* 27: 291-301
- 19 Green LK, Ayala AG, Ro JY, Swanson DA, Grignon DJ, Giacco GG, Guinee VF (1989): Role of nuclear grading in Stage I renal cell carcinoma. *Urology* 34: 310-315
- 20 Hale C (1946): Histochemical demonstration of acid mucopolysaccharides in animal tissues. *Nature* 204: 745-747
- 21 Hatcher PA, Anderson EE, Paulson DF, Carson CC, Robertson JE (1991): Surgical management and prognosis of renal cell carcinoma invading the vena cava. *J Urol* 145: 20-24

- 22 Huo L, Sugimura J, Tretiakova MS, Patton KT, Gupta R, Popov B, Laskin WB, Yeldandi A, Teh BT, Yang XJ (2005): C-kit expression in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. *Hum Pathol* 36: 262-268
- 23 Jiang F, Desper R, Papadimitriou CH, Schaffer AA, Kallioniemi OP, Richter J, Schraml P, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H (2000): Construction of evolutionary tree models for renal cell carcinoma from comparative genomic hybridization data. *Cancer Res* 60: 6503-6509
- 24 Junker K, Weirich G, Amin MB, Moravek P, Hindermann W, Schubert J (2003): Genetic subtyping of renal cell carcinoma by comparative genomic hybridization. *Recent Results Cancer Res* 162: 169-175
- 25 Khoury JD, Abrahams NA, Levin HS, MacLennan GT (2002): The Utility of Epithelial Membrane Antigen and Vimentin in the Diagnosis of Chromophobe Renal Cell Carcinoma. *Ann Diagn Pathol* 6: 154-158
- 26 Kovacs A, Störkel S, Thoenes W, Kovacs G (1992): Mitochondrial and chromosomal DNA alteration in human chromophobe renal cell carcinoma. *J Pathol* 167: 273-277
- 27 Kovacs G (1993): Molecular differential pathology of renal cell tumours. *Histopathology* 22: 1-8
- 28 Krishnan B, Truong LD (2002): Renal epithelial neoplasms: the diagnostic implications of electron microscopic study in 55 cases. *Hum Pathol* 33: 68-79
- 29 Libertino JA, Zinman L, Watkins E Jr (1987): Long-term results of resection of renal cell cancer with extension into inferior vena cava. *J Urol* 137: 21-24
- 30 Liu L, Qian J, Singh H, Meiers I, Zhou X, Bostwick DG (2007): Immunohistochemical Analysis of Chromophobe Renal Cell Carcinoma, Renal Oncocytoma, and Clear Cell Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 131: 1290-1297
- 31 Ljungberg B, Alamdari FI, Stenling R, Roos G (1999): Prognostic significance of the Heidelberg classification of renal cell carcinoma. *Eur Urol* 36: 565-569
- 32 Martignoni G, Brunelli M, Gobbo S, Remo A, Ficarra V, Cossu-Rocca P, Pea M, Chilosi M, Menestrina F, Cheng L (2007): Role of Molecular Markers in Diagnosis and Prognosis of Renal Cell Carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 29: 41-49
- 33 Martignoni G, Pea M, Brunelli M, Chilosi M, Zamó A, Bertaso M, Cossu-Rocca P, Eble JN, Mikuz G, Puppa G, Badoual C, Ficarra V, Novella G, Bonetti F (2004): CD 10 is expressed in a subset of chromophobe renal cell carcinomas. *Mod Pathol* 17: 1455-1463



- 34 Martignoni G, Pea M, Chilosi M, Brunelli M, Scarpa A, Colato C, Tardanico R, Zamboni G, Bonetti F (2001): Parvalbumin is Constantly Expressed in Chromophobe Renal Carcinoma. *Mod Pathol* 14: 760-767
- 35 McNichols DW, Segura JW, DeWeerd JH (1981): Renal cell carcinoma: long-term survival and late recurrence. *J Urol* 126: 17-23
- 36 Memeo L, Jhang J, Assaad AM, Mckiernan JM, Murty VVVS, Hibshoosh H, Tong G-X, Mansukhani MM (2007): Immunohistochemical Analysis for Cytokeratin 7, KIT, and PAX2: Value in the Differential Diagnosis of Chromophobe Cell Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 127: 225-229
- 37 Miliaras D, Karasavvidou F, Papanikolaou A, Sioutopoulou D (2004): KIT expression in fetal, normal adult, and neoplastic renal tissues. *J Clin Pathol* 57: 463-466
- 38 Moch H, Presti JC Jr, Sauter G, Buchholz N, Jordan P, Mihatsch MJ, Waldmann FM (1996): Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 27-30
- 39 Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999): High-Throughput Tissue Microarray Analysis to Evaluate Genes Uncovered by cDNA Microarray Screening in Renal Cell Carcinoma. *Am J Pathol* 154: 981-986
- 40 Molinié V, Balaton A, Rotman S, Mansouri D, De Pinieux I, Homsy T, Guillou L (2005): Alpha-methyl CoA racemase expression in renal cell carcinomas. *Hum Pathol* 37: 698-703
- 41 Nagashima Y (2000): Chromophobe renal cell carcinoma: clinical, pathological and molecular biological aspects. *Pathol Int* 50: 872-878
- 42 Nagy A, Buzogany I, Kovacs G (2004): Microsatellite allelotyping differentiates chromophobe renal cell carcinomas from renal oncocytomas and identifies new genetic changes. *Histopathology* 44: 542-546
- 43 Oberneder R, Wagner H, Siebels M, Stieber P, Busch M, Weiss M (2003): Nierenzellkarzinom. In: Liedl B (Hrsg.): *Manual Urogenitale Tumoren*. 3. Auflage Zuckschwerdt Verlag, München: 79-97
- 44 O'Donohoe MK, Flanagan F, Fitzpatrick JM, Smith JM (1987): Surgical approach to inferior vena cava extension of renal carcinoma. *Br J Urol* 60: 492-496
- 45 Onishi T, Oishi Y, Goto H, Tomita M, Abe K, Sugaya S (2001): Cyst-associated renal cell carcinoma: clinicopathologic characteristics and evaluation of prognosis in 27 cases. *Int J Urol* 8: 268-274

- 46 Pan C-C, Chen PC-H, Chiang H (2004): Overexpression of KIT (CD 117) in Chromophobe Renal Cell Carcinoma and Renal Oncocytoma. *Am J Clin Pathol* 121: 878-883
- 47 Pan C-C, Chen P C-H, Ho D M-T (2004): The diagnostic utility of MOC31, BerEP4, RCC marker and CD 10 in the classification of renal cell carcinoma and renal oncocytoma: an immunohistochemical analysis of 328 cases. *Histopathology* 45: 452-459
- 48 Petit A, Castillo M, Santos M, Mellado B, Alcover JB, Mallofré C (2004): KIT Expression in Chromophobe Renal Cell Carcinoma: Comparative Immunohistochemical Analysis of KIT Expression in Different Renal Cell Neoplasms. *Am J Surg Pathol* 28: 676-678
- 49 Reutzel D, Mende M, Naumann S, Störkel S, Brenner W, Zabel B, Decker J (2001): Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 93: 221-227
- 50 Robson CJ, Churchill BM, Anderson W (1969): The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol* 101: 297-301
- 51 Rodrigo Aliaga M, Paya Garcia A, Millan Salvador JM, Hernandez Marti M, Jimenez Cruz JF (2002): Genetic study of six chromophobic renal carcinomas. *Actas Urol Esp* 26: 204-208
- 52 Rohde D (2006): „Multi-targeting drugs“ und „multi-drug targeting“ beim metastasierten Nierenzellkarzinom. *Urologe A* 45: 356-358
- 53 Roskams T, van Damme B (1999): Pathology of Renal Cell Carcinoma. In: Petrovich Z, Baert L, Brady LW(Hrsg.): *Carcinoma of the Kidney and Testis, and Rare Urologic Malignancies – Innovations in Management*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 15-23
- 54 Russo P (2001): Lokalized renal cell carcinoma. *Curr Treat options Oncol* 2: 447-455
- 55 Samma S, Yoshida K, Ozono S, Ohara S, Hayashi Y, Tabata S, Uemura H, Iwai A, Hirayama A, Hirao Y, et al. (1991): Tumor thrombus and microvascular invasion as prognostic factors in renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 21: 340-345
- 56 Sanchez de la Muela P, Zudaire J, Robles J, Rosell D, Aguera L, De Castro F, Isa W, Berian J (1991): Renal cell carcinoma – vena cava invasion and prognostic factors. *Eur Urol* 19: 284-290
- 57 Schröder J (1995): Morphologische und klinische Charakteristika operierter Nierenzellkarzinome, Inauguraldissertation, Freie Universität Berlin

- 58 Schwerdtle RF, Störkel S, Neuhaus C, Brauch H, Weidt E, Brenner W, Hohenfellner R, Huber C, Decker HJ (1996): Allelic losses at chromosomes 1p, 2p, 6p, 10p, 13q, 17p, and 21q significantly correlate with the chromophobe subtype of renal cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 2927-2930
- 59 Selli C, Hinshaw WM, Woodard BH, Paulson DF (1983): Stratification of risk factors in renal cell carcinoma. *Cancer* 52: 899-903
- 60 Siminovitch J, Montie J, Straffon R (1983): Prognostic indicators in renal adenocarcinomas. *Ibid* 128: 18-24
- 61 Skinner DG, Colvin RB, Vermillion CD, Pfister RC, Leadbetter WF (1971): Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer* 28: 1165-1177
- 62 Skinner DG, Vermillion CD, Colvin RB (1972): The surgical management of renal cell carcinoma. *J Urol* 107: 705-710
- 63 Skinnider BF, Amin MB (2005): An immunohistochemical approach to the differential diagnosis of renal tumors. *Sem Diagn Pathol* 22: 51-68
- 64 Skinnider BF, Folpe AL, Hennigar RA, Lim SD, Cohen C, Tamboli P, Young A, de Peralta-Venturina M, Amin MB (2005): Distribution of Cytokeratins and Vimentin in Adult Renal Neoplasms and Normal Renal Tissue: Potential Utility of a Cytokeratin Antibody Panel in the Differential Diagnosis of Renal Tumors. *Am J Surg Pathol* 29: 747-754
- 65 Skinnider BF, Jones EC (1999): Renal oncocytoma and chromophobe renal cell carcinoma. A comparison of colloidal iron staining and electron microscopy. *Am J Clin Pathol* 111: 796-803
- 66 Speicher MR, Schoell B, du Manoir S, Schrock E, Ried T, Cremer T, Störkel S, Kovacs A, Kovacs G (1994): Specific loss of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21 in chromophobe renal cell carcinoma revealed by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 145: 356-364
- 67 Störkel S (1993): Karzinome und Onkozytome der Niere: phänotypische Charakterisierung und prognostische Merkmale. G. Fischer, Stuttgart Jena New York, 24-57
- 68 Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K (1997): Classification of renal cell carcinoma Workgroup No.1. *Cancer* 80: 987-989

- 69 Störkel S, Steart PV, Drenckhahn D, Thoenes W (1989): The human chromophobe cell renal carcinoma: probable relation to intercalated cells of the collecting duct. *Virch Arch B* 56: 237-245
- 70 Sukosd F, Kuroda N, Beothe T, Kaur AP, Kovacs G (2003): Deletion of chromosome 3p14.2-p25 involving the VHL and FHIT genes in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Res* 63: 455-457
- 71 Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J, Backdahl J, Tretiakova M, Qian C-N, Gray SG, Knapp R, Anema J, Kahnoski R, Nicol D, Vogelzang NJ, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Teh BT (2003): Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene* 22: 6810-6818
- 72 Thoenes W, Rumpelt H, Störkel S (1990): Klassifikation der Nierenzellkarzinome und –tumoren und ihre Beziehung zum Nephron-Sammelrohrsystem. *Klein Wochenschr* 68: 1102-1111
- 73 Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ (1985): Human chromophobe cell renal carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol* 48: 207-217
- 74 Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, Moll R, Baum HP, Werner S (1988): Chromophobe cell renal carcinoma and its variants: A report of 32 cases. *J Pathol* 155: 277-287
- 75 Thrasher JB, Paulson DF (1993): prognostic factors in renal cancer. *Urol Clin N Am* 20: 247-262
- 76 Tickoo SK, Amin MB, Zarbo RJ (1998): Colloidal iron staining in renal epithelial neoplasms, including chromophobe renal cell carcinoma: emphasis on technique and patterns of staining. *Am J Surg Pathol* 22: 419-424
- 77 Tickoo SK, Lee MW, Eble JN, Amin M, Christopherson T, Zarbo RJ, Amin MB (2000): Ultrastructural observations on mitochondria and microvesicles in renal oncocytoma, chromophobe renal cell carcinoma, and eosinophilic variant of conventional (clear cell) renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 24: 1247-1256
- 78 Tretiakova MS, Sahoo S, Takahashi M, Turkyilmaz M, Vogelzang NJ, Lin F, Krausz T, Teh BT, Yang XJ (2004): Expression of Alpha-Methylacyl-CoA Racemase in Papillary Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 28: 69-76
- 79 Van Brussel JP, Mickisch GH (1999): Prognostic factors in renal cell and bladder cancer. *BJU Int* 83: 902-908

- 80 Van Poppel H, Vandendriessche H, Boel K, Mertens V, Goethuys H, Haustermans K, Van Damme B, Baert L (1997): Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 158: 45-49
- 81 Wang H-Y, Mills SE (2005): KIT and RCC Are Useful in Distinguishing Chromophobe Renal Cell Carcinoma From the Granular Variant of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 29: 640-646
- 82 Weiss LM, Gelb AB, Medeiros LJ (1995): Adult renal epithelial neoplasms. *Am J Clin Pathol* 103: 624-63
- 83 Young AN, de Oliveira Salles PG, Lim SD, Cohen C, Petros JA, Marshall FF, Neish AS, Amin MB (2003): Beta Defensin-1, Parvalbumin, and Vimentin: A Panel of Diagnostic Immunohistochemical Markers for Renal Tumors Derived From Gene Expression Profiling Studies Using cDNA Microarrays. *Am J Surg Pathol* 27: 199-205
- 84 Zhou M, Roma A, Magi-Galluzzi C (2005): The Usefulness of Immunohistochemical Markers in the Differential Diagnosis of Renal Neoplasms. *Clin Lab Med* 25: 247-257

## 7. Abkürzungsverzeichnis

AMACR	$\alpha$ -Methyl-Acyl-CoA-Racemase
CA II	Carboanhydrase II
CK	Cytokeratin
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-cadherin	<i>epithelial cadherin</i>
EMA	<i>epithelial membrane antigen</i>
EpCam	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
GST- $\alpha$	Glutathionyl-S-Transferase $\alpha$
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF $\alpha$	Hypoxie induzierter Faktor $\alpha$
HMWCK	<i>high molecular weight cytokeratin</i>
IUG	Infusionsurogramm
Ksp-cadherin	<i>Kidney specific cadherin</i>
LMWCK	<i>low molecular weight cytokeratin</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MUC1	Mucin 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF-R	<i>platelet derived growth factor-Rezeptor</i>
RCC Ma	<i>renal cell carcinoma marker</i>
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF-R	<i>vascular endothelial growth factor-Rezeptor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT-1	Wilms Tumor 1

## 8. Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg und der Klinik und Poliklinik für Urologie am Caritas-Krankenhaus St. Josef in Regensburg, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Arndt Hartmann für die Überlassung des Themas und ständige hilfsbereite Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Christine Hammerschmied, die mit ihrem unermüdlichen Einsatz an der Fertigstellung dieser Arbeit großen Anteil hat.

Ganz herzlich danke ich allen, die mir in dieser schweren Zeit den Rücken gestärkt haben. In erster Linie natürlich meiner Familie, aber auch den Kollegen und dem Pflegepersonal des Klinikum St. Marien in Amberg, vor allem der Stationen A9 und I1, die meine manchmal schlechten Launen ertragen mussten.

Für den Fall, dass ich jemanden vergessen haben könnte, möchte ich mich noch bei ..... (bitte Namen einfügen) sehr herzlich bedanken.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Killermann
Vorname	Martin
Adresse	Thurnrinnen 7 92421 Schwandorf
Geburtsdatum	26.10.1979
Geburtsort	Schwandorf
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

09/1986 – 07/1990	Grundschule Büchelkühn
09/1990 – 06/1999	Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasium Schwandorf
06/1999	Abitur (Note 1,6)

### Wehrdienst

09/1999 – 06/2000	in Dillingen an der Donau und Feldaafing
-------------------	--

### Hochschulbildung

10/2000 – 10/2006	Medizinstudium an der Universität Regensburg
09/2002	Ärztliche Vorprüfung (Note 1,00)
08/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005 – 02/2006	Erstes PJ-Tertial: Innere Medizin am Klinikum St. Marien in Amberg
02/2006 – 05/2006	Zweites PJ-Tertial: Chirurgie am Klinikum der Universität Regensburg
05/2006 – 09/2006	Drittes PJ-Tertial: Urologie am Caritas-Krankenhaus St. Josef in Regensburg



10/2006

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote der  
Ärztlichen Prüfung 1,00)

## Berufstätigkeit

seit 11/2006

Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II am Klinikum St.  
Marien in Amberg