

Aus der

Klinik für Urologie und Kinderurologie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Michael Stöckle

**Immunhistochemische Untersuchung des Ductus  
Bellini-Karzinoms zur Abgrenzung von Urothel-  
karzinomen des oberen Harntrakts und  
papillären Nierenzellkarzinomen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von: Martin Parr

geboren am: 10.01.1986 in Kaiserslautern

meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis .....	6
Abkürzungen .....	8
Zusammenfassung.....	10
Summary: Immunohistochemical distinction of collecting duct carcinomas from papillary renal cell carcinomas and urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract.....	11
1. Einleitung.....	12
1.1. Das Ductus Bellini-Karzinom.....	12
1.2. Das Urothelkarzinom des oberen Harntrakts .....	17
1.3. Das papilläre Nierenzellkarzinom.....	19
1.4. Untersuchte Proteine zur Differenzierung.....	21
1.4.1. Das p63-Protein.....	21
1.4.2. Das pax8-Protein .....	24
1.4.3. Das pVHL-Protein .....	25
1.5. Zusammenfassung der eigenen Zielsetzung .....	27
2. Material und Methoden .....	29
2.1. Material .....	29
2.1.1. Fälle .....	29
2.1.1.1. Ductus Bellini-Karzinome .....	29
2.1.1.2. Urothelkarzinome des oberen Harntrakts .....	31
2.1.1.3. Papilläre Nierenzellkarzinome.....	32
2.1.1.3.1. Papilläre Nierenzellkarzinome Typ 1.....	32
2.1.1.3.2. Papilläre Nierenzellkarzinome Typ 2 .....	34
2.1.2. Paraffingewebe und Tissue Microarrays.....	35
2.2. Methoden.....	36
2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	36
2.2.2. Immunhistochemie und ihre Auswertung.....	36
2.2.2.1. Immunhistochemie .....	36
2.2.2.2. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....	38
2.2.3. Statistische Auswertung.....	41
2.2.3.1. Vierfelder-Chi <sup>2</sup> -Test .....	41
2.2.3.2. Exakter Test nach Fisher.....	42

2.2.3.3. Mann-Whitney-U-Test.....	42
2.2.3.4. Kruskal-Wallis-Test .....	42
2.2.3.5. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert.....	42
3. Ergebnisse .....	43
3.1. Immunhistochemie der Ductus Bellini-Karzinome.....	43
3.1.1. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen und der klinisch-pathologischen Daten der DBK auf statistisch signifikante Korrelationen .....	45
3.2. Immunhistochemie der Urothelkarzinome des oberen Harntrakts.....	46
3.2.1. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen und der klinisch-pathologischen Daten der UK auf statistisch signifikante Korrelationen .....	48
3.3. Immunhistochemie der papillären Nierenzellkarzinome.....	49
3.3.1. Immunhistochemie der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 1 .....	49
3.3.1.1. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen und der klinisch-pathologischen Daten der pNZK Typ 1 auf statistisch signifikante Korrelationen .....	51
3.3.2. Immunhistochemie der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 2 .....	52
3.3.2.1. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen und der klinisch-pathologischen Daten der pNZK Typ 2 auf statistisch signifikante Korrelationen .....	54
3.4. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorentitäten.....	55
3.5. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativ prädiktiver Wert der einzelnen Antikörper für die Diagnostik und Differentialdiagnostik der verschiedenen Karzinome.....	58
4. Diskussion.....	61
4.1. Diskussion der p63-Immunhistochemie.....	64
4.2. Diskussion der pax8-Immunhistochemie .....	69
4.3. Diskussion der pVHL-Immunhistochemie .....	72
4.4. Zusammenfassende Diskussion der immunhistochemischen Ergebnisse .....	76
5. Literatur.....	79
6. Anhang.....	86
6.1 Färbeprotokoll am Färbeautomat „Ventana Benchmark XT“ .....	86
7. Publikationen und Tagungsbeiträge.....	90
8. Danksagung .....	91

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Histologische Darstellung eines DBK, HE-Färbung, 10fach-Objektiv .....	13
Abbildung 2. Histologische Darstellung eines UK des Nierenbeckens, HE-Färbung, 10fach-Objektiv..	18
Abbildung 3. Histologische Darstellung eines pNZK, HE-Färbung, 10fach-Objektiv .....	20
Abbildung 4. Schematische Darstellung der Isoformen des p63-Proteins und ihrer Homologie mit p53 .....	22
Abbildung 5. TMA-Schnitt, 2,5fach Objektiv .....	36
Abbildung 6. Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbereaktion, modifiziert nach der Herstellerbroschüre „Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit“ .....	37
Abbildung 7. Beispiel für eine negative Kontrolle an normalem Nierengewebe, 20fach Objektiv .....	37
Abbildung 8. Überblick über die Färbeintensitäten der p63-Immunhistochemie, 20fach-Objektiv ....	40
Abbildung 9. Überblick über die Färbeintensitäten der pax8-Immunhistochemie, 20fach-Objektiv...	40
Abbildung 10. Überblick über die Färbeintensitäten der pVHL-Immunhistochemie, 20fach-Objektiv	41
Abbildung 11. Überblick über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 35 Ductus Bellini-Karzinomen .....	44
Abbildung 12. Überblick über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 25 Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts .....	47
Abbildung 13. Überblick über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 54 papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 1 .....	50
Abbildung 14. Überblick über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 33 papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 2 .....	53
Abbildung 15. Überblick über die p63-Immunhistochemie der untersuchten Karzinome .....	66
Abbildung 16. Überblick über die pax8-Immunhistochemie der untersuchten Karzinome .....	70
Abbildung 17. Überblick über die pVHL-Immunhistochemie der untersuchten Karzinome .....	74
Abbildung 18. Protokoll der automatisierten immunhistochemischen Färbung am Beispiel von p63	88

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Diagnostische Kriterien für Ductus Bellini-Karzinome nach WHO, 2004.....	13
Tabelle 2. TNM-Stadien der Nierenzellkarzinome nach UICC-Definition, 2010.....	14
Tabelle 3. histopathologisches Grading der Nierenzellkarzinome nach UICC-Definition, 2010 .....	14
Tabelle 4. TNM-Stadien der UK von Nierenbecken und Harnleiter nach UICC-Definition von 2010....	19
Tabelle 5. Gradingssystem der Zellkerne von Nierenzellkarzinomen nach Fuhrman .....	21
Tabelle 6. Untersuchte Ductus Bellini-Karzinome.....	29
Tabelle 7. Häufigkeiten der klinisch-pathologischen Daten der Ductus Bellini-Karzinome .....	30
Tabelle 8. Untersuchte Urothelkarzinome des oberen Harntrakts.....	31
Tabelle 9. Häufigkeiten der klinisch-pathologischen Daten der Urothelkarzinome des oberen Harntrakts.....	31
Tabelle 10. Untersuchte papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1 .....	32
Tabelle 11. Häufigkeiten der klinisch-pathologischen Daten der pNZK vom Typ 1 .....	33
Tabelle 12. Untersuchte papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 2 .....	34
Tabelle 13. Häufigkeiten der klinisch-pathologischen Daten der pNZK vom Typ 2 .....	34
Tabelle 14. Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper .....	38
Tabelle 15. Immunreaktiver Score nach Remmele .....	39
Tabelle 16. Ductus Bellini-Karzinomfälle mit Ergebnissen der Immunhistochemie .....	43
Tabelle 17. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der DBK, MWU-Tests.....	45
Tabelle 18. Urothelkarzinomfälle des oberen Harntrakts mit Ergebnissen der Immunhistochemie ...	46
Tabelle 19. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der UK, MWU-Tests.....	48
Tabelle 20. Fälle der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 1 mit Ergebnissen der Immunhistochemie .....	49
Tabelle 21. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der pNZK Typ 1, MWU-Tests ...	51
Tabelle 22. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der pNZK Typ 1, KW-Test.....	52
Tabelle 23. Fälle der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 2 mit Ergebnissen der Immunhistochemie .....	52
Tabelle 24. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der pNZK Typ 2, MWU-Tests ...	54
Tabelle 25. Immunhistochemie DBK/UK: Chi <sup>2</sup> - und exakter Fisher-Test.....	55
Tabelle 26. Immunhistochemie DBK/pNZK Typ 2: Chi <sup>2</sup> -Test.....	56
Tabelle 27. Immunhistochemie UK/pNZK Typ 1: Chi <sup>2</sup> - und exakter Fisher-Test.....	56
Tabelle 28. Immunhistochemie UK/pNZK Typ 2: Chi <sup>2</sup> - und exakter Fisher-Test.....	57
Tabelle 29. Immunhistochemie pNZK Typ 1/Typ 2: exakter Fisher-Test.....	58

Tabelle 30. Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW von p63, pax8 und pVHL in der Differentialdiagnose von Ductus Bellini-Karzinomen.....	59
Tabelle 31. Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW von p63, pax8 und pVHL in der Differentialdiagnose von Urothelkarzinomen.....	59
Tabelle 32. Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW von p63, pax8 und pVHL in der Differentialdiagnose von papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 1 .....	60
Tabelle 33. Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW von p63, pax8 und pVHL in der Differentialdiagnose von papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 2 .....	60
Tabelle 34. Zusammenfassung der Publikationen mit immunhistochemischer Färbung von p63 .....	65
Tabelle 35. Zusammenfassung der statistischen Untersuchung der Immunhistochemie von p63 zwischen den verschiedenen Karzinomen .....	68
Tabelle 36. Zusammenfassung der Publikationen mit immunhistochemischer Färbung von pax8 .....	69
Tabelle 37. Zusammenfassung der statistischen Untersuchung der Immunhistochemie von pax8 zwischen den verschiedenen Karzinomen .....	72
Tabelle 38. Zusammenfassung der Publikationen mit immunhistochemischen Färbungen von pVHL	73
Tabelle 39. Zusammenfassung der statistischen Untersuchung der Immunhistochemie von pVHL zwischen den verschiedenen Karzinomen .....	76

## Abkürzungen

BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CD	cluster of differentiation
CGH	comparative genomic hybridization
CDC	collecting duct carcinoma
DBD	DNA-bindende Domäne
DBK	Ductus Bellini-Karzinom
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMA	epitheliales Membranantigen
FFPE	formalin fixed paraffin embedded tissue
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GLUT-1	Glucosetransporter-1
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	hypoxia-inducible factor
HL	Harnleiter
HMW-CK	high molecular weight cytokeratins
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homologue
HRE	hypoxia response elements
HRP	horseradish peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IL-2	Interleukin-2
INF- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
IRS	Immunoreaktiver Score/immunoreactive score
kNZK	klarzelliges Nierenzellkarzinom
KW-Test	Kruskal-Wallis Test
LMW-CK	low molecular weight cytokeratins
LOH	loss of heterozygosity
metDBK	metastasiertes Ductus Bellini-Karzinom
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian target of rapamycin
MVAC-Schema	Chemotherapie mit Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und cis-Platin
MWU-Test	Mann-Whitney U Test
NB	Nierenbecken
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	Oligomerisierungsdomäne
OT	Objektträger
PDGF	platelet derived growth factor
PFK-1	6-Phosphofruktokinase-1
PGK-1	Phosphoglyceratkinase-1
PNL	peanut lectin
pNZK	papilläres Nierenzellkarzinom
pp	percent positive
pVHL	Protein des von Hippel-Lindau Gens



pRCC	papillary renal cell carcinoma
RCC	renal cell carcinoma
RNA	ribonucleic acid
SAM	sterile alpha motif
SI	staining intensity
TA	Transaktivierungsdomäne
TMA	tissue microarray
UEA	Ulex europaeus agglutinin
UICC	Union internationale contre le cancer
UC	urothelial carcinoma
UK	Urothelkarzinom
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau

## Zusammenfassung

Das Ductus Bellini-Karzinom (DBK) ist ein sehr seltener maligner Tumor, der seinen Ursprung in den Sammelrohren der Niere hat. Aufgrund der Lokalisation und Histologie von Ductus Bellini-Karzinomen sind vor allem Urothelkarzinome (UK) des oberen Harntrakts und papilläre Nierenzellkarzinome (pNZK) wichtige Differentialdiagnosen. Bedeutsam ist die richtige Diagnose vor allem für die Auswahl der geeigneten Therapie, da im Falle der UK und pNZK unterschiedliche Therapieregime existieren, welche die Überlebenszeit entscheidend beeinflussen können.

Das Ziel der Arbeit war es daher, durch die Verwendung von Antikörpern gegen die Proteine p63, pax8 und pVHL die immunhistochemische Differentialdiagnostik von DBK zu evaluieren. So sollte ein spezifisches immunhistochemisches Profil herausgearbeitet werden, um zu prüfen, ob das DBK dem pNZK oder dem UK zugeordnet werden kann - mit den oben genannten Konsequenzen für die Therapie.

Insgesamt wurden 35 DBK, 25 UK des oberen Harntrakts und 87 pNZK (davon 54 vom Typ 1 und 33 vom Typ 2) mittels Immunhistochemie untersucht. p63 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der p53-Proteine und unter anderem an der Entwicklung des Urothels beteiligt. Das pax8-Protein ist ein Transkriptionsfaktor aus der pax-Familie und an der Nierenentwicklung beteiligt. pVHL ist das Produkt des von Hippel-Lindau-Gens, das eine wichtige Bedeutung in der Entstehung klarzelliger Nierenzellkarzinome hat.

Insgesamt zeigen DBK und pNZK hinsichtlich der untersuchten Antikörper eine große Ähnlichkeit. UK des oberen Harntrakts unterscheiden sich hingegen deutlich von diesen beiden Entitäten. Die DBK und pNZK zeigen überwiegend das immunhistochemische Profil p63 negativ/pax8 positiv, UK hingegen das Profil p63 positiv/pax8 negativ. In der pVHL-Immunhistochemie sind nur bei den UK einige Fälle ohne Anfärbung.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der drei Antikörper an DBK, UK des oberen Harntrakts und pNZK sind im Einklang mit der publizierten Literatur. Die vorliegende Arbeit ist allerdings die erste, die DBK mit einem Antikörper gegen pVHL untersucht. Insgesamt eignen sich von den untersuchten Antikörpern vor allem p63 und pax8 in der Differentialdiagnostik von DBK, um ein UK des oberen Harntrakts auszuschließen. DBK und pNZK lassen sich mit den eingesetzten drei Antikörpern nur schlecht voneinander abgrenzen. Daher sind wir der Meinung, dass das DBK aufgrund seines immunhistochemischen Profils eher den Nierenzellkarzinomen zuzuordnen ist, wobei es aber möglicherweise eine eigene Entität darzustellen scheint.

Um den molekularen Ursprung dieser Tumorerkrankung besser zu verstehen, sind zusätzliche größere multizentrische Untersuchungen notwendig, um diagnostische und prognostische Marker zu etablieren und neue Therapiestrategien zu entwickeln.

## **Summary:**

### **Immunohistochemical distinction of collecting duct carcinomas from papillary renal cell carcinomas and urothelial cell carcinomas of the upper urinary tract**

Collecting duct carcinomas (CDC) are very rare malignant tumors originating from the collecting ducts of the kidney. Main differential diagnoses in regard of localization and histology are urothelial cell carcinomas (UC) of the upper urinary tract and papillary renal cell carcinomas (pRCC). Diagnosis is crucial since established widely differing recommendations for adjuvant chemotherapy of UC or RCC involving fundamentally different substance classes have a significant impact upon overall survival.

The aim of this study was to evaluate the use of antibodies against proteins p63, pax8 and pVHL as immunohistochemical markers in the pathological differential diagnosis of CDC. So we aimed at detecting similarities between collecting duct and either UC or pRCC as well as possibly finding hints for new drug targets in the treatment of CDC.

A total of 35 CDC, 25 UC of the upper urinary tract and 87 pRCC (including 54 type 1 and 33 type 2 papillary renal cell carcinomas) formalin fixed paraffin embedded samples were examined by immunohistochemistry. p63 is a transcription factor, member of the p53 family, involved in the development of the urothelium. pax8 protein is a transcription factor belonging to the family of pax proteins and plays a role in kidney development. pVHL protein is the product of the von Hippel-Lindau gene which has an important function in clear cell renal cell carcinogenesis.

Overall, CDC and pRCC show a rather similar expression of the markers investigated whereas UC, on the other hand, differs significantly from both these entities. CDC and pRCC predominantly show a marker profile p63 negative/pax8 positive while UC are p63 positive/pax8 negative. In pVHL immunohistochemistry only UC are negative in some cases.

The results of the immunohistochemical staining of CDC, pRCC and UC of the upper urinary tract are consistent with the published literature. However, this study is the first that examines collecting CDC with an antibody against pVHL. Taken together, p63 and pax8 are helpful in excluding UC from the differential diagnosis of CDC, whereas CDC and pRCC cannot be differentiated definitively with the antibody panel used. However, the immunohistochemical profile of CDC rather supports association with the RCC and CDC seems to be a unique kidney tumor entity.

Further investigations of larger multi-institutional series are necessary for a better understanding of the molecular basis of this disease and could potentially lead to development of diagnostic and prognostic markers and new therapeutic strategies.

# 1. Einleitung

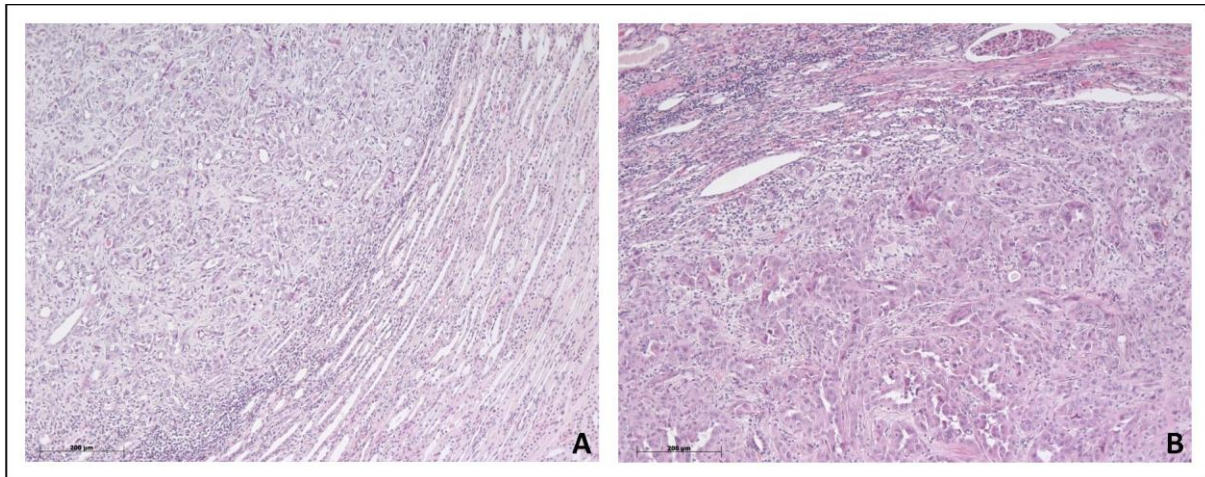
## 1.1. Das Ductus Bellini-Karzinom

Das Ductus Bellini-Karzinom (DBK, engl.: collecting duct carcinoma/CDC) ist ein sehr seltener maligner Tumor der Niere, der von den Sammelrohren (Bellini-Gängen) ausgeht (25, 54). Während Nierenzellkarzinome (NZK) etwa 2-3% aller Krebserkrankungen ausmachen, sind nur bis ca. 1% der NZK vom DBK-Typ (34, 41). Es wurden bis zum Jahr 2013 weltweit weniger als 500 Fälle beschrieben, die eine große Altersvariabilität zeigten (13-83 Jahre). Das männliche Geschlecht war mit einem Verhältnis von etwa 2:1 bevorzugt betroffen (1, 25, 98).

Über die Ätiologie des Ductus Bellini-Karzinoms ist aufgrund der geringen Prävalenz wenig bekannt (80).

Meist findet man ein Ductus Bellini-Karzinom, seinem Ursprung entsprechend, in den zentralen Markanteilen der Niere (25). Es werden Tumorgrößen zwischen einem und 18 Zentimetern beschrieben, der Median liegt, je nach Studie, bei etwa 6 Zentimetern. (1, 41, 98) Oft zeigen sich bereits bei der Diagnosestellung Lymphknotenmetastasen sowie infiltrierendes Wachstum ins perirenale Fettgewebe, was von prognostischer Bedeutung ist (34, 41, 98). Prädilektionsstellen von Fernmetastasen sind Lunge, Leber, Knochen und die Nebennieren (25).

Histologisch werden Ductus Bellini-Karzinome durch ein tubuläres oder tubulopapilläres Wachstum mit deutlichen Kernatypien charakterisiert. Das Stroma ist häufig desmoplastisch, es finden sich Nekrosen und Gefäßinvasionen (exemplarische histologische Befunde: Abb. 1). Aufgrund des Wachstumsmusters muss das papilläre Nierenzellkarzinom (pNZK) in die Differentialdiagnose mit einbezogen werden, da auch dieses Karzinom ein tubuläres oder tubulopapilläres Wachstum zeigt. Zusätzlich kommen auch hier häufig Nekrosen, Einblutungen und desmoplastisches Stroma vor (25). Ebenso ist es notwendig, ein Urothelkarzinom (UK) des Nierenbeckens oder des proximalen Harnleiters auszuschließen, da dieses in die Sammelrohre vorwachsen und so ein Ductus Bellini-Karzinom vortäuschen kann (25, 34). Darüber hinaus zeigt die Histopathologie von Urothelkarzinomen keine spezifischen Charakteristika und es existieren zahlreiche histologische Subformen, zum Beispiel glanduläre, mikropapilläre, solide und papilläre (25, 50, 74, 81, 82).



**Abbildung 1. Histologische Darstellung eines DBK, HE-Färbung, 10fach-Objektiv**

**Fall A:** In der linken Bildhälfte ist der Tumor sichtbar, rechts normales Nierengewebe. Im Tumorgewebe liegen vereinzelt normale Sammelrohre, die von Tumor ummauert sind. Peritumoral zeigt sich eine entzündliche Reaktion mit Lymphozyten. Im normalen Nierengewebe sind vor allem Teile der Markpapillen zu erkennen. **Fall B:** Auch hier stellt sich der Tumor angrenzend an nicht tumoröses Nierengewebe (oberer Bildrand) mit entzündlicher peritumoraler Reaktion dar. Das Wachstum ist schlecht differenziert mit solidem bis teilweise diffus tubulärem Muster. **Abkürzungen:** DBK= Ductus Bellini-Karzinom, HE= Hämatoxylin-Eosin

Es existieren nach der WHO-Definition von 2004 sechs Haupt- und vier Nebenkriterien zur Diagnose eines DBK (25):

**Tabelle 1. Diagnostische Kriterien für Ductus Bellini-Karzinome nach WHO, 2004 (25)**

Hauptkriterien	Nebenkriterien
Bei kleinen Tumoren Lokalisation in einer medullären Pyramide	Bei großen Tumoren eine zentrale Lokalisation
Typische Histologie mit irregulärem Aufbau der Tubuli und starken Kernatypien	Papilläre Architektur mit breiten Bindegewebsstielen und desmoplastischem Stroma
Inflammatorisches desmoplastisches Stroma mit zahlreichen Granulozyten	Starke renale, extrarenale, lymphatische und venöse Infiltration
Positive Reaktion mit Antikörpern gegen high molecular weight cytokeratins (HMW-CK)	Intratubuläre epitheliale Atypien, die an den Tumor angrenzen
Positive Reaktion mit dem Lektin Ulex europaeus agglutinin (UEA)	
Fehlen eines Urothelkarzinoms	

Neben der WHO-Definition, die nur die Histologie betrachtet, wird die TNM-Klassifikation zur klinischen Einordnung verwendet. Die Union internationale contre le cancer (UICC) klassifiziert mit dem TNM-System Tumoren unter anderem anhand folgender Variablen: Primärtumor (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M). Neben den Hauptkategorien existieren weitere: Die Lymphgefäßinvasion (L), die Veneninvasion (V), das Grading bzw. die Differenzierung (G) und der Resektionsstatus (R). Das Präfix p zeigt an, dass die Einteilung durch eine histopathologische Untersuchung am Operationsmaterial erfolgte.

Die UICC-Klassifizierung des Jahres 2010 teilt Nierenzellkarzinome wie folgt ein (107):

**Tabelle 2. TNM-Stadien der Nierenzellkarzinome nach UICC-Definition, 2010 (107)**

Stadium	Untergruppe Stadium	Definition
TX		keine Beurteilung des Primärtumors möglich
T0		kein Anhalt für einen Primärtumor
T1		auf die Niere begrenzter Tumor, ≤ 7 cm
	T1a	≤ 4 cm
	T1b	> 4 cm, aber ≤ 7 cm
T2		auf die Niere begrenzter Tumor, > 7 cm
	T2a	auf die Niere begrenzter Tumor, > 7 cm, aber ≤ 10 cm
	T2b	auf die Niere begrenzter Tumor, > 10 cm
T3		Invasion größerer Venen oder direkte Infiltration von perirenalem Gewebe, jedoch nicht der ipsilateralen Nebenniere oder über die Gerotafaszie hinaus
	T3a	makroskopische Ausbreitung in die Nierenvene oder ihre segmentalen Äste (mit muskulärer Wand) oder Infiltration des perirenalen und/oder peripelvinen Fettgewebes
	T3b	makroskopische Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells
	T3c	makroskopische Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder Infiltration der Wand der Vena cava
T4		Infiltration über die Gerotafaszie hinaus (schließt die kontinuierliche Ausbreitung in die ipsilaterale Nebenniere mit ein)
NX		keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
N0		keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
N2		Metastase(n) in mehr als einem regionären Lymphknoten
M0		keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen vorhanden

Die in Tabelle 2. erwähnten Größenangaben beziehen sich jeweils auf die größte Ausdehnung des Tumors.

Daneben wird durch die UICC das histopathologische Grading (bestimmt durch das Wachstumsmuster und die Differenzierung des Tumors im Vergleich zum Normalgewebe) wie folgt definiert (107):

**Tabelle 3. histopathologisches Grading der Nierenzellkarzinome nach UICC-Definition, 2010 (107)**

Grading	Definition
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3-G4	schlecht bzw. undifferenziert

Diagnostisch werden unter anderem Antikörper gegen high molecular weight cytokeratins (HMW-CK) wie CK19 sowie der Antikörper CK34βE12 verwendet. Auch die mögliche Reaktion mit den Lektinen Ulex europaeus agglutinin (UEA) und peanut lectin (PNL) ist relevant. Die Reaktion mit diesen Reagenzien ist meist positiv, allerdings eignen sie sich nicht zur Unterscheidung von Ductus Bellini- und Urothelkarzinomen, da eine positive Reaktion auch bei UK häufig zu beobachten ist (40, 45). Darüber hinaus kann beim DBK eine Reaktion mit Antikörpern gegen Vimentin, das Oberflächenantigen CD15 (cluster of differentiation 15) und das epitheliale Membranantigen (EMA) vorliegen (25, 90). In den letzten Jahren haben zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Proteine pax8 und p63 immunhistochemisch an Ductus Bellini- und Urothelkarzinomen untersucht. Ziel war es, ein

jeweils für den Tumor typisches immunhistochemisches Profil zu erarbeiten. Bei den Untersuchungen von Albadine et al. (2) an insgesamt 21 Ductus Bellini-Karzinomen präsentierte sich die Mehrzahl der Fälle mit dem Immunprofil p63 negativ/pax8 positiv. Carvalho et al. (18) untersuchten insgesamt sechs DBK-Fälle, wobei auch hier fast alle Tumoren positiv in der Färbung von pax8 waren, während sich in der Färbung von p63 keine Reaktion zeigte.

Klinisch kann beim DBK die klassische Trias einer Neoplasie der Niere mit Rückenschmerzen, Flankentumor und Hämaturie auffallen. Es können auch unspezifische Symptome wie Abgeschlagenheit und Fieber auftreten (75, 98). In einer großen Fallserie aus Japan (98) (n=81) hatten zum Zeitpunkt der Diagnose etwa ein Drittel der Patienten bereits Fernmetastasen und die Tumoren waren in über 97% der Fälle im Stadium T4. In einer multizentrischen Studie aus Europa (41) waren zum Zeitpunkt der Diagnose knapp 76% der Tumoren im Stadium T3, 49% der Patienten hatten Lymphknotenmetastasen und etwa 20% Fernmetastasen. Wegen der Lokalisation des Ductus Bellini-Karzinoms kann es in der Bildgebung als UK des oberen Harntraktes fehlgedeutet werden und sogar mit einer positiven Urinzytologie auffallen (25). Die Prognose des DBK ist von allen Nierenkarzinomen die schlechteste. Laut Riede et al. (80) versterben die Patienten in 90% aller Fälle innerhalb von sechs Monaten nach Diagnose, wobei nicht explizit auf die verschiedenen Stadien eingegangen wird. Tokuda et al. (98) zeigen allerdings ein krankheitsspezifisches Überleben aller 81 untersuchten Fälle von 69% nach einem, 45% nach drei, 34% nach fünf und 14% nach zehn Jahren.

Die Daten zur Therapie des Ductus Bellini-Karzinoms sind sehr heterogen: In einigen Fällen wird die operative Therapie bei kleinen, lokalisierten Tumoren als kurativ beschrieben. Fälle von metastasierten Tumoren sind mit einer Operation nicht zu heilen (58, 61). In einer der größten Fall-sammlungen von 41 Ductus Bellini-Karzinomen stellte sich die Immun- und Chemotherapie als ineffektiv heraus (41), ähnliches bestätigt eine Analyse von 81 Fällen aus Japan (98). In einzelnen Fällen wird ein partielles Ansprechen auf Sunitinib bei einem metastasierten DBK (metDBK) beschrieben (64), sowie ein 13monatiges progressionsfreies Überleben bei einem metDBK unter Sorafenib (5), während andere Publikationen keine Effektivität von Tyrosinkinaseinhibitoren bestätigen konnten (92).

Da unter anderem das Urothelkarzinom des oberen Harntrakts und das papilläre Nierenzellkarzinom wesentliche Differentialdiagnosen des Ductus Bellini-Karzinoms sind, wird in den nächsten beiden Kapiteln kurz auf diese beiden Tumorentitäten eingegangen (2, 18, 25, 83).

Am wichtigsten ist die richtige Diagnose von Nierenzell- bzw. Urothelkarzinomen für die Therapie, die sich in beiden Entitäten grundlegend voneinander unterscheidet. Goldstandard und einzige kurative Therapieoption für das NZK ist die chirurgische Tumorentfernung, die auch beim metastasierten Patienten – sofern er operabel ist – angestrebt werden sollte (31). Operationsverfahren sind die radikale Tumornephrektomie und die organerhaltende Tumorentfernung (35). Bei fortgeschrittenen

Tumorstadien sind – ggf. nach der Operation – einige systemische Therapien möglich. Da Nierenzellkarzinome als weitestgehend chemo-, hormon- und radiotherapieresistent angesehen werden, standen bis vor einigen Jahren nur die Immuntherapeutika Interleukin (IL-2) und Interferon (INF- $\alpha$ ) ggf. in Kombination mit 5-Fluoruracil zur Verfügung (31, 35, 91). Lediglich 10% bis 20% der Tumoren sprachen auf die Therapie an, was mit einer Lebenszeitverlängerung von zweieinhalb bis fünf Monaten verbunden war. Zugleich litten die Patienten unter den starken Nebenwirkungen der Therapie (35). Einen deutlichen Fortschritt in der Therapie brachten die sogenannten targeted therapies, die zielgerichteten Therapien. Zur Verfügung stehen Multikinaseinhibitoren (Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib), mammalian target of rapamycin (mTOR)-Kinaseinhibitoren (Temsirrolimus, Everolimus) und Antikörper gegen den Vascular Endothelial Growth Factor (Bevacizumab). Anhand von Risikoprofilen werden verschiedene Kombinationen der Substanzen eingesetzt, wodurch sich das progressionsfreie Überleben und z.T. auch die Überlebenszeit verlängert (31, 35, 91). Auch wenn NZK wenig strahlensensibel sind, so besteht in einer palliativen Situation dennoch die Möglichkeit einer Hochdosisstrahlentherapie (35, 91). Explizite Empfehlungen zur systemischen Therapie des Ductus Bellini-Karzinoms gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht.

Wie bei Nierenzellkarzinomen bildet auch bei Urothelkarzinomen die operative Therapie die Basis, die systemische Therapie unterscheidet sich allerdings grundlegend. Je nach Größe und Lokalisation des Tumors stehen bei Urothelkarzinomen von Nierenbecken und Harnleiter verschiedene Verfahren zur Verfügung. Goldstandard in der Therapie ist die radikale Nephroureterektomie mit der Resektion der zugehörigen Blasenmanschette des Ureters. Bei anatomischen oder funktionellen Einzelniere, beidseitigen Tumoren, schweren Begleiterkrankungen und auch bei kleinen, gut differenzierten Tumoren besteht die Möglichkeit einer endoskopischen Therapie. Diese erfolgt ureterorenoskopisch oder perkutan. Wie beim Urothelkarzinom der Harnblase besteht auch bei den UK von Nierenbecken und Ureter die Möglichkeit einer Instillationstherapie, um die Wahrscheinlichkeit von Rezidiven und Zweittumoren zu verringern. Diese erfolgt zum Beispiel mit dem Bacillus Calmette-Guérin (BCG) oder Mitomycin. Da Urothelkarzinome chemosensitive Tumoren sind, besteht die Möglichkeit einer adjuvanten oder neoadjuvanten Chemotherapie, vor allem in Fällen von metastasierten oder lokal weit fortgeschrittenen Tumoren. Nachdem die Studienlage zur systemischen Therapie von UK des oberen Harntrakts sehr begrenzt ist, stammen die Therapieschemata von denen des Blasenkarzinoms ab. Eingesetzt werden aktuell die Substanzen Gemcitabin und cis-Platin, welche besser verträglich sind als die Kombination des MVAC-Schemas (Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin, cis-Platin) (35, 78, 102).

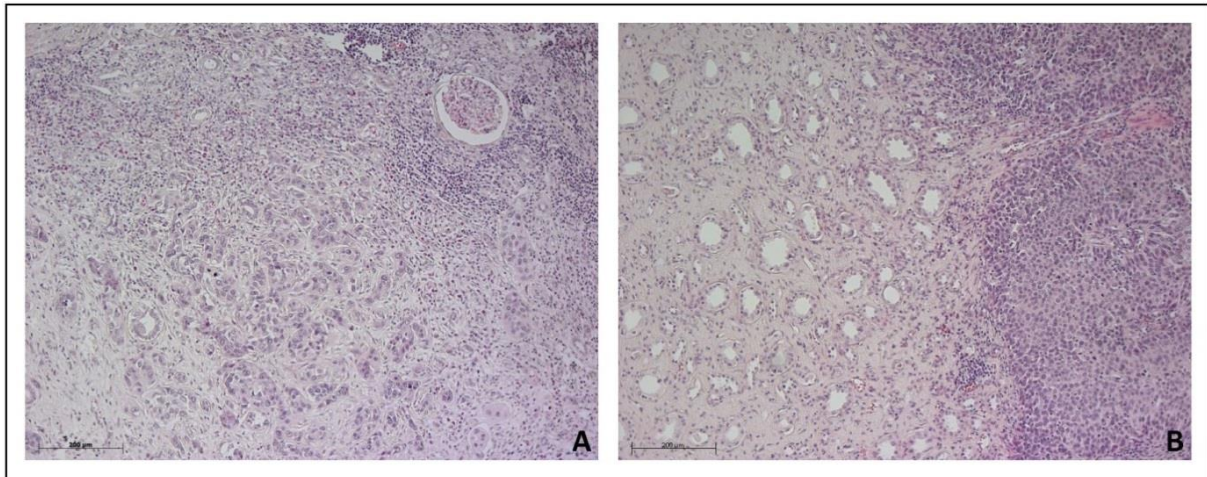
Aufgrund der Seltenheit des Ductus Bellini-Karzinoms sind wenige molekulargenetische Daten verfügbar und die molekulare Pathogenese ist nicht bekannt. In einer zytogenetischen Untersuchung an drei Fällen wurden Monosomien der Chromosomen 1, 6, 8, 14, 15 und 22 sowie eine Trisomie von



Chromosom 17 beschrieben (29). Eine weitere Studie an sechs Tumoren konnte das Auftreten von hyperdiploiden Karyotypen bestätigen, wobei auch Translokationen und Deletionen nachweisbar waren (6). Eine Loss of Heterozygosity-Studie (LOH) an sechs Fällen zeigte in drei Tumoren LOH auf den Chromosomen 8p und 13q (86). Der für klarzellige Nierenzellkarzinome (kNZK) typische Verlust auf 3p wurde in einem Fall detektiert (86). Bislang wurde in nur zwei Fällen eine umfassende genomische Analyse mittels komparativer genomischer Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridisation= CGH) durchgeführt, wobei in der ersten Studie Gewinne auf den Chromosomen 16, 20 sowie Verluste auf 1, 2, 9, 11 und 18 beobachtet wurden (104). In den publizierten zytogenetischen Studien wurden chromosomale Aberrationen nachgewiesen, was zu den Daten von Dimopoulos et al. (24) passt, die mittels DNA-Durchflußzytometrie in fünf von sechs Fällen DNA-Aneuploidien detektieren konnten. Unsere Analyse von 29 Ductus Bellini-Karzinomen (12) stellt die größte Fallserie dar, die bisher mit der CGH-Methode untersucht wurde. Insgesamt traten DNA-Verluste häufiger auf als Gewinne. Die häufigsten Verluste von chromosomalen Abschnitten betrafen 8p, 16p, 1p und 9p, wobei auch Verluste auf 10q, 11q, 20p, 15q, 20q, 6p und 17p in mehreren Fällen auftraten. Zugewinne waren vor allem auf 4q, 6q, 12q und 5q zu finden. Die durchschnittliche Häufigkeit chromosomaler Aberrationen waren 4,9 pro DBK-Fall (pT1 und pT2: 4,1/Fall; pT3 und pT4: 5,1/Fall).

## **1.2. Das Urothelkarzinom des oberen Harntrakts**

Neoplasien der ableitenden Harnwege haben ihren Ursprung überwiegend im Urothel und können somit vom Nierenbecken bis zur Harnröhre auftreten. Es gibt zahlreiche Untergruppen dieser Neoplasien, von benignen über wenig maligne bis hin zu äußerst malignen Formen. Die UK des oberen Harntrakts sind selten und schließen Nierenbecken und Harnleiter ein. Sie machen nur etwa 8% der Tumoren des Harntrakts aus. Die Inzidenz liegt bei 0,7-1,1 pro 100.000. Die Prognose von Urothelkarzinomen ist im Allgemeinen sehr stark vom Tumorstaging abhängig (25).



**Abbildung 2. Histologische Darstellung eines UK des Nierenbeckens, HE-Färbung, 10fach-Objektiv**

**Fall A:** Der größte Teil des Bildes zeigt ein solides wachsendes, wenig differenziertes Urothelkarzinom mit fibrovaskulärem Stroma und entzündlicher Randreaktion. Im oberen Teil ist angrenzendes normales Nierengewebe mit einem Glomerulum sichtbar. **Fall B:** Auch hier zeigt sich ein solider Tumor mit perivaskulär palisadenartig angeordneten Tumorzellen und peritumorale Entzündungsreaktion. Die linke Bildhälfte wird von normalem Nierengewebe aus dem Bereich des Tubulussystems eingenommen. **Abkürzungen:** UK= Urothelkarzinom, HE= Hämatoxylin-Eosin

In der Immunhistochemie sind im Rahmen der Diagnostik von Urothelkarzinomen Antikörper gegen folgende Proteine in Gebrauch: Gegen HMW-CK, p63, CK7, CK20, Thrombomodulin und gegen Uroplakin III. Allerdings ist lediglich das Uroplakin III gesichert spezifisch für die urotheliale Differenzierung (66, 89).

Zytogenetisch sind v.a. Urothelkarzinome der Harnblase untersucht, allerdings unterscheiden sie sich in ihren genetischen Alterationen nicht von UK des Nierenbeckens und des Harnleiters (25). Die genetischen Veränderungen in UK laufen stufenweise ab. Initial entsteht meist eine Deletion von Chromosom 9, bei der Progredienz zum invasiven Karzinom kommt eine Mutation von Chromosom 17 (p53-Mutation) hinzu. Wichtige Aberrationen bei invasiven Karzinomen sind des Weiteren: 1p-, 3p-, 4p-, 5q-, 8p-, 10q-, 11p-, 13q-, 18q-, 1q+, 5p+, 17q+, 20q+ ebenso wie Mutationen von Cyclin D1, Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (HRAS) und verschiedenen Mitgliedern der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Familie (25, 63, 94).

In eigenen Untersuchungen (12) an 26 Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts mit der komparativen genomischen Hybridisierung traten in einigen Fällen Amplifikationen auf 1q, 3q, 6p, 8q und 12q auf. Verluste waren am häufigsten auf 9q, 11, 13, 9p, 17, 10, 3, 8p und 16, während Zugewinne am meisten die Chromosomen 8q, 7, 1, 5, und 6 betrafen.

Die UICC klassifiziert mit dem TNM-System des Jahres 2010 Urothelkarzinome von Nierenbecken und Harnleiter wie folgt (107):

**Tabelle 4. TNM-Stadien der UK von Nierenbecken und Harnleiter nach UICC-Definition von 2010 (107)**

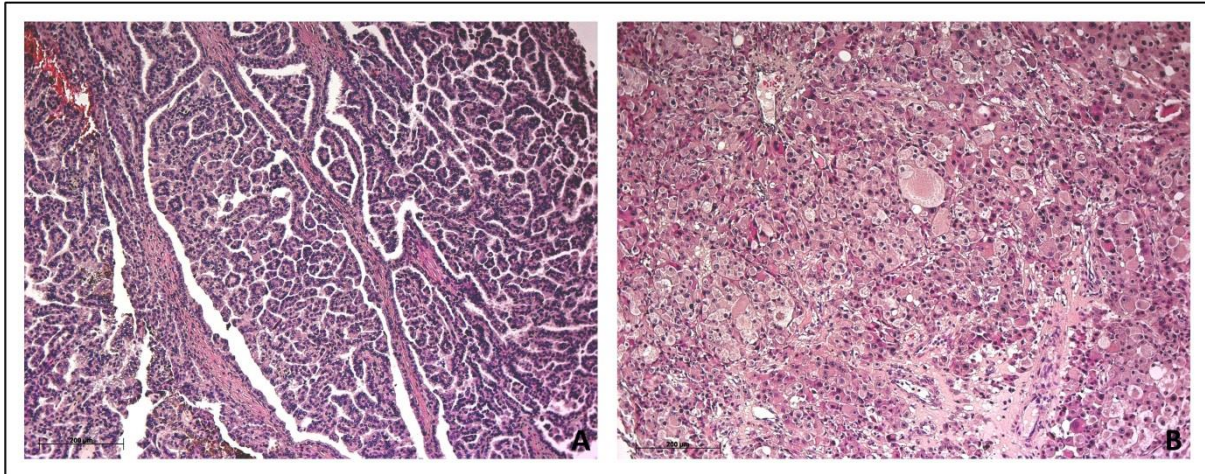
Stadium	Definition
TX	keine Beurteilung des Primärtumors möglich
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
Ta	Nichtinvasives, papilläres Karzinom
Tis	Carcinoma in situ
T1	Infiltration des subepithelialen Bindegewebes
T2	Infiltration der Muskelschicht
T3	<b>Nierenbecken:</b> Infiltration des peripelvinen Fettgewebes oder des Nierenparenchyms durch die Muskulatur hindurch
	<b>Harnleiter:</b> Infiltration des periureteralen Fettgewebes durch die Muskulatur hindurch
T4	Tumor infiltriert Nachbarorgane oder durch die Niere hindurch das perirenale Fettgewebe
NX	keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem Lymphknoten $\leq 2$ cm
N2	Metastase(n) in solitärem Lymphknoten $> 2$ cm aber $\leq 5$ cm oder in multiplen Lymphknoten $\leq 5$ cm
N3	Metastase(n) in Lymphknoten $\geq 5$ cm
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Die in Tabelle 4. erwähnten Größenangaben beziehen sich jeweils auf die größte Ausdehnung des Tumors.

Das histopathologische Grading nach dem UICC-System entspricht dem der Ductus Bellini-Karzinome (Kapitel 1.1.).

### 1.3. Das papilläre Nierenzellkarzinom

Das papilläre Nierenzellkarzinom ist ein maligner Tumor der Niere, der eine papilläre oder tubulopapilläre Architektur zeigt. Nach dem klarzelligem ist das papilläre mit 10-15 Prozent das zweithäufigste Nierenzellkarzinom und kann histologisch in die Typ 1- und die Typ 2-Karzinome eingeteilt werden. Das Typ 2-Karzinom ist seltener und zeigt eine schlechtere Prognose als das Typ 1-Karzinom (34, 36). Da die histologische Differenzierung zwischen Typ 1- und Typ 2-papillären Nierenzellkarzinomen oftmals schwierig ist, bewegen sich die Angaben über den Anteil von Typ 2-pNZK zwischen 30% und 70% (4, 44, 65, 76, 109).



**Abbildung 3. Histologische Darstellung eines pNZK, HE-Färbung, 10fach-Objektiv**

**Fall A:** papilläres Nierenzellkarzinom vom Typ 1. Sichtbar ist der klassische papilläre Aufbau. Die Tumorzellen haben ein spärliches Zytoplasma und liegen überwiegend einschichtig auf einem fibrovaskulären Kern. **Fall B:** papilläres Nierenzellkarzinom vom Typ 2. Im unteren Teil des Bildes ist normales Nieren-, im oberen Teil das tumoröse Gewebe zu sehen. Hier sind die Zellkerne dysplastischer als beim pNZK vom Typ 1 und die Zellen haben mehr eosinophiles Zytoplasma **Abkürzungen:** HE= Hämatoxylin-Eosin

Immunhistochemisch zeigt sich meist eine positive Reaktion mit low molecular weight cytoke­ratin-Antikörpern (LMW-CK), zum Beispiel CK7. Allerdings liegt diese positive Färbereaktion vor allem in Typ1-, aber nur selten in Typ2-pNZK vor (23, 25). HMW-CK-Antikörper reagieren sehr selten mit papillären Nierenzellkarzinomen (25), solche gegen Vimentin (52) und gegen CD10 häufig (8).

Folgende genetische Veränderungen sind für das papilläre Nierenzellkarzinom beschrieben: Tri- oder Tetrasomien von Chromosom 7, eine Trisomie von Chromosom 17 und der Verlust von Chromosom Y sind die häufigsten (46). Die Veränderungen hängen sowohl in sporadischen als auch in hereditären Formen mit der Aktivierung des Protoonkogens c-MET zusammen (57). Einige pNZK-Fälle haben LOH auf 3p (103). Ebenso sind Trisomien von Chromosom 12, 16 und 20 gezeigt worden, welche unter Umständen im Zusammenhang mit einer Tumorprogression stehen (46). LOH auf 9p13 ist mit einem kürzeren Überleben assoziiert (88) und Gewinne auf Chromosom 7p und 17p sind sehr viel häufiger in Typ 1-Karzinomen (85).

Die TNM-Einteilung der pNZK entspricht der des Ductus Bellini-Karzinoms und wurde in Kapitel 1.1. erläutert.

Neben dem UICC-System zum histopathologischen Grading existiert mit dem Fuhrman-Grading (28) ein weiteres System, speziell zur Klassifikation von Nierenzellkarzinomen. Es berücksichtigt die Größe des Zellkerns, sein Aussehen sowie das der Nucleoli und teilt die Zellkerne in vier Kategorien ein. Allerdings sind die Grade nach Fuhrman und dem UICC-System nicht deckungsgleich, sodass viele Arbeitsgruppen auf die Einteilung nach dem UICC-System zurückgreifen. Die Kriterien des Fuhrman-Gradings sind im Folgenden tabellarisch dargestellt:

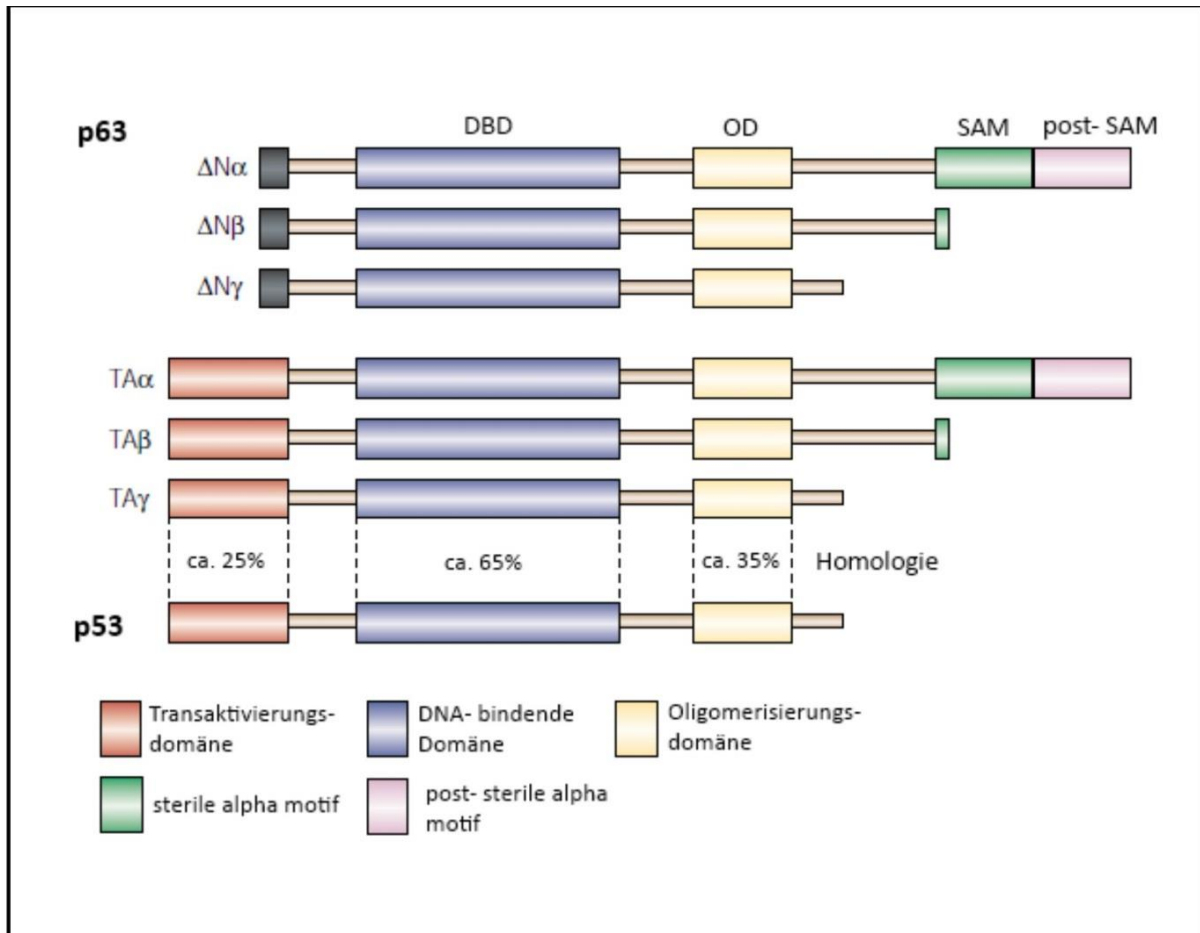
**Tabelle 5. Gradingssystem der Zellkerne von Nierenzellkarzinomen nach Fuhrman (28)**

Fuhrman- Grad	Größe Nuclei (µm)	Morphologie Nuclei	Morphologie Nucleoli (Vergrößerung)
Grad 1	≈ 10	rund, gleichförmig	unauffällig oder nicht vorhanden
Grad 2	≈ 15	leicht irreguläre Konturen	leicht irregulär bei großer Vergrößerung (400fach)
Grad 3	≈ 20	deutlich irreguläre Konturen	prominent, groß bei geringerer Vergrößerung (100fach)
Grad 4	> 20	irregulär sowie bizarr und multilobulär	groß, mit Chromatinklumpen (10fach)

## 1.4 Untersuchte Proteine zur Differenzierung

### 1.4.1. Das p63-Protein

Das p63-Gen kodiert für ein Protein, das Teil der p53-Familie ist. Diese Familie ist eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren. Das p53-Protein wird intensiv beforscht und hat aufgrund seiner Funktionen in der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose und dem Schutz vor DNA-Schäden den Namen „Wächter des Genoms“ bekommen. Es ist in über 50% aller menschlichen Karzinome mutiert (53). Ein weiteres Mitglied dieser Familie ist das p73-Protein. Trotz des weiter unten beschriebenen hohen Ausmaßes an Homologie zwischen diesen Proteinen sind neben einigen identischen auch zahlreiche verschiedene und teilweise sogar entgegengesetzte Funktionen beschrieben worden (3, 110). Neuere Studien konnten zeigen, dass p63 und p73 auch in der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Gewebe, wie p63 bei der Entstehung des Urothels und weiterer Organe, eine wichtige Rolle spielen (84, 110).



**Abbildung 4. Schematische Darstellung der Isoformen des p63-Proteins und ihrer Homologie mit p53**

Gezeigt sind die verschiedenen Isoformen des p63-Proteins, die durch alternatives Splicing entstehen. Die einzelnen Funktionen der Domänen sind, bis auf das post-sterile alpha motif der  $\alpha$ -Isoformen (post-SAM), im Text beschrieben. Das post-SAM hat unter anderem inhibitorische Kontrolle über die transaktivierenden Funktionen von  $TA\alpha$ -p63 (112). Modifizierte Abbildung nach Yang und McKeon (99). weitere **Abkürzungen**: DBD= DNA-bindende Domäne, OD= Oligomerisierungsdomäne, TA= Transaktivierungsdomäne,  $\Delta N$ = Zusatz zeigt das Fehlen der Transaktivierungsdomäne an

p53 ist auf Chromosom 17p13, p63 auf 3q27-29 und p73 auf 1p36 lokalisiert (56, 62, 111). Der grundlegende Aufbau der drei Proteine ist sehr ähnlich und setzt sich aus drei strukturellen Domänen zusammen (siehe auch Abb. 4): Einer DNA-bindenden Domäne (DBD), einer Oligomerisierungsdomäne (OD, funktionell als Tetramere) und einer Transaktivierungsdomäne (TA). p63 und p73 besitzen noch eine weitere Domäne an ihrem carboxyterminalen Ende, das sterile alpha motif (SAM), welche zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht. Alle Gene der p53-Familie führen durch alternatives Splicing und/oder unterschiedliche Promotoren zu verschiedenen Isoformen von Proteinen (3). Bei p63 entstehen über alternatives Splicing am 3'-Ende mehrere verschiedene Isoformen, während ein weiterer Promotor dazu führt, dass Isoformen entstehen, die am aminoterminalen Ende verkürzt sind und denen die TA-Domäne fehlt. Die Isoformen mit der TA-Domäne bekommen der Namenszusatz TA, solche ohne Transaktivierungsdomäne den Zusatz  $\Delta N$  (3, 27, 30). Sowohl bei p63 als auch bei p53 und p73 scheinen die  $\Delta N$ -Isoformen eine negative Dominanz über die TA-Formen zu haben (3).



Das p53-Protein hat eine herausragende Bedeutung in der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose-induktion, doch auch p63 und p73 können zur Apoptose – oft über ähnliche Mechanismen wie p53 – führen (3). Hier soll im Besonderen auf das p63-Protein eingegangen werden. Die Isoformen besitzen verschiedene Funktionen: Während TAp63, unter anderem über die Hochregulierung von Cyclin-dependent kinase inhibitors, einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirken kann, werden diese Kinaseinhibitoren durch die  $\Delta N$ -Isoform herunter reguliert. Letzteres führt dann zu einem Fortlaufen des Zellzyklus. Des Weiteren kann TAp63 die Apoptose über verschiedene Wege induzieren: Über den intrinsischen (mitochondrialen), den extrinsischen (Todesliganden) und den Endoplasmatisches Retikulum-Stress-Weg (3).

Aufgrund der Bedeutung in der Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose liegt es nahe, den Zusammenhang von p63 mit der Tumorentwicklung zu betrachten. Kontrovers diskutiert wird, ob p63 eher ein Tumorsuppressor- oder ein Onkogen ist. Verschiedene Studien sprechen dafür, dass einige Isoformen eine tumorsuppressive und andere eine onkogene Wirkung habe.

In Mammakarzinomen ist in 22-100% - je nach Quellenangabe - eine p63-Überexpression zu finden. Es handelt sich meist um spezielle, schlecht differenzierte Subtypen. Ebenso zeigen Plattenepithelkarzinome erhöhte p63-Expressionen. p63 ist für die Entwicklung der Prostata relevant und wird in der Routinediagnostik zum Nachweis normaler Basalzellen, die in konventionellen Prostatakarzinomen fehlen, verwendet. Obwohl die Mehrheit der Prostatakarzinome keine Färbung von p63 zeigt, findet sich eine positive Immunhistochemie in einigen Subtypen (30). Urothelkarzinome der Harnblase zeigen in der Regel eine Expression von p63. Dabei spielt das Protein vermutlich vor allem in der frühen Phase der Karzinogenese eine Rolle, während die Expression mit zunehmender Tumorgöße und fortgeschrittenem Stadium abnimmt. Wieder scheint das Verhältnis der Isoformen eine wichtigere Rolle zu spielen als die absolute p63-Expression (30). Die TA-Isoformen wirken eher als Tumorsuppressoren, während die  $\Delta N$ -Formen onkogen wirken (30, 73).

Die Rolle von p63 bei der Metastasierung scheint eine andere zu sein als bei der Progression von Tumoren. In verschiedenen klinischen Studien wurde beobachtet, dass unter anderem in Tumoren von Lunge, Harnblase, Kopf und Hals eine Expression von p63 mit geringerer Invasivität und Metastasierung einhergeht. Eine fehlende Expression aller Isoformen hingegen führt zu einer höheren Invasivität. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang die Rolle von p63 in der Zelladhäsion und der Epithel-Mesenchym-Transition (3, 27, 30).

p63 unterliegt wie seine verwandten Proteine p53 und p73 einer komplexen Regulation. Die Interaktion mit zahlreichen Proteinen führt häufig zu postrationalen Modifikationen, die wiederum in Veränderungen der p63-Eigenschaften münden. So kann sich die Stabilität, die Bindung an Promotoren und die Lokalisation des Proteins ändern. Wie bei zahlreichen anderen Proteinen, zum Beispiel auch im Falle von HIF-1-alpha, werden die Proteinlevel der Mitglieder der p53-Familie

durch das Ubiquitinsystem kontrolliert. Andererseits werden in manchen Fällen auch die Transkriptionsaktivitäten verändert, um die Aktivitäten zu modulieren (3, 27, 30).

Das p63-Protein wurde in zahlreichen Studien immunhistochemisch an verschiedensten Geweben und Tumoren untersucht. An dieser Stelle und im Rahmen der Diskussion soll das Augenmerk vor allem auf diejenigen Tumoren gerichtet werden, die Gegenstand dieser Arbeit waren.

In normalem Urothel wird p63 vom Nierenbecken bis zur Urethra in der basalen sowie den mittleren Zellschichten exprimiert, während es in den Deckzellen nicht nachzuweisen ist. Ab dem mittleren Anteil der Papille ist keinerlei Expression mehr in der Niere vorhanden (51, 84).

#### **1.4.2. Das pax8-Protein**

Die pax-Gene bilden eine Familie von bisher neun bekannten Genen, die alle für Transkriptionsfaktoren kodieren. Neben anderen ist auch das pax8-Gen an der Nierenentwicklung beteiligt. Die pax-Gene sind durch eine paired domain charakterisiert, die sämtlichen Mitgliedern gemein ist, weshalb sie als paired box-Gene bezeichnet werden. Diese namensgebende paired box bezeichnet eine DNA-bindende Domäne mit zwei Subdomänen. pax-Gene sind Regulatoren der Gewebe- und Organentwicklung (38, 95, 101).

Die stark konservierte paired domain der pax-Gene kodiert für 128 Aminosäuren und die Genprodukte agieren als Transkriptionsfaktoren, die somit im Zellkern lokalisiert sind (95). Weitere Strukturen der pax-Familie sind neben der paired domain die sog. homeodomain und ein Oktapeptid. Diese beiden sind nicht in allen pax-Genen zu finden und definieren innerhalb der Familie weitere Untergruppen (32, 59). Eine Subgruppe besteht aus pax2, pax5 und pax8, deren Zielorgane bzw. -gewebe das zentrale Nervensystem, die Nieren, B-Lymphozyten und die Schilddrüse sind. Störungen und Defekte jeder Subgruppe können speziellen Krankheitsbildern zugeordnet werden (49).

Die Produkte der pax-Gene binden mit ihrer paired domain an spezifische Sequenzen der DNA, allerdings ist auch die homeodomain - sofern vorhanden - dazu fähig (10, 49). Neben der Bindung von DNA besteht auch die Möglichkeit der Proteinbindung. Die pai-Domäne am N-terminalen Ende kann direkt mit der DNA interagieren, während das C-terminale Ende nicht direkt dazu fähig ist (49). Somit wird die DNA-Erkennung davon beeinflusst, welches der beiden Enden dominiert. Die Produkte von pax-Genen sind Transkriptionsfaktoren und binden an DNA-Bereiche mit transkriptionsverstärkender Wirkung (19, 100). Zu den pax-Genen mit einer Homöodomäne gehören unter anderem auch pax2 und pax8. Diese kann im Falle von pax2 und pax8 an palindromische Sequenzen der DNA binden. Das Oktapeptid, das in allen pax-Proteinen, außer in pax4 und pax6, zu finden ist, kann die Transkription inhibieren (49). Insgesamt werden pax-Proteinen folgende wichtige Eigenschaften zugeschrieben: Der Erhalt von Stammzellen durch das Verlangsamen der Ausdifferenzierung und der Schutz vor Apoptose (49).



Während pax2 auf Chromosom 10q25 lokalisiert ist, liegt pax8 auf Chromosom 2q12- q14 (93). Das pax8-Protein besteht aus 450 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 48 kDa (70). Pax2 ist ein wichtiges Gen in der Regulation der frühen Entwicklung des Urogenitalsystems und das Protein lässt sich in allen drei Stadien der Organogenese der Niere nachweisen. pax8 wird wie pax2 in allen Nierenentwicklungsstadien als Transkriptionsfaktor exprimiert, allerdings haben pax8<sup>-/-</sup>-Mäuse normale Nieren. Man erklärt dies mit der Kompensation durch pax2. Erst wenn beide Gene fehlen, kommt es zur kompletten Nierenagenesie, da unter anderem der Übergang von Mesenchym zu Epithel nicht erfolgt. Insgesamt zeigen sich redundante Funktionen von pax2 und pax8 in der Nierenentwicklung (14, 49, 67).

Antikörper gegen pax8 wurden in verschiedenen Studien verwendet, unter anderem zur Untersuchung von urologischen Tumoren. In Normalgewebe der Niere zeigten Ozcan et al. (72) eine pax8-Anfärbbarkeit in Tubulus-, aber nicht in Glomerulumzellen. In derselben Studie waren nur sehr wenige der Fälle von normalem Urothel positiv in der IHC. Einige Gewebe, die häufig eine Anfärbbarkeit von pax8 präsentieren, sind normale und neoplastische im weiblichen und männlichen Genitaltrakt, Lymphozyten und der Inselzellapparat des Pankreas. In metastasierten epithelialen Nierentumoren zeigt sich eine ähnlich hohe Reaktivität mit pax8-Antikörpern wie in nicht metastasierten Formen (72, 99).

### **1.4.3. Das pVHL-Protein**

Das Protein pVHL wird durch das Tumorsuppressorgen von Hippel-Lindau (VHL) kodiert, welches eine große Bedeutung in der Entwicklung von klarzelligem Nierenzellkarzinomen und anderen Tumoren hat. Es spielt in Nierenzellkarzinomen sowohl bei den hereditären Formen (im Rahmen der von Hippel-Lindau Erkrankung) als auch bei den sporadischen Formen eine tragende Rolle. Zahlreiche Funktionen von pVHL sind beschrieben, sehr wichtig ist seine negative Kontrolle über den Hypoxia Inducible Factor (HIF), der wiederum für die Tumorgenese bedeutsam ist (7, 9, 17, 33).

Das VHL-Gen ist auf Chromosom 3p25-26 lokalisiert. Die mRNA wird sowohl in fetalem als auch in adultem Gewebe exprimiert und ist nicht auf die bei der von Hippel-Lindau Erkrankung betroffenen Organe beschränkt. Sie kodiert für zwei verschiedene Isoformen von pVHL: pVHL30 und pVHL19, je nach Molekulargewicht. pVHL bewegt sich, gemäß seinen weiter unten beschriebenen Funktionen, zwischen Zellkern und Zytosol, allerdings ist pVHL30 vor allem im Zytosol und pVHL19 vor allem im Zellkern zu finden. Die Funktionen der beiden überlappen sich in vielen Punkten. pVHL besteht aus zwei verschiedenen Domänen, der aminoterminalen  $\beta$ - und der carboxyterminalen  $\alpha$ -Domäne (7, 17, 33). pVHL bindet an hydroxyliertes HIF- $\alpha$ . So entsteht ein Multiproteinkomplex, der HIF- $\alpha$  mittels eines Polyubiquitinanteils für das Proteasom markiert. Das 26S-Proteasom baut HIF- $\alpha$  dann ab (9,

17). Innerhalb der beiden Domänen von pVHL existieren Abschnitte, die besonders häufig von Mutationen betroffen sind (sog. Hotspots) (7).

pVHL spielt überdies eine Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose. Das Protein bindet unter anderem direkt an p53, inhibiert seine Ubiquitinierung, supprimiert seinen Export aus dem Zellkern und verstärkt seine Acetylierung sowie seine Transkriptionsaktivität. Zusätzlich erhöht pVHL die Stabilität von Bax und weiteren proapoptischen Proteinen und Genen (7, 9, 17).

Ihre überragende Bedeutung haben VHL respektive pVHL in ihrer Kontrolle über den Sauerstoff detektierenden Weg (oxygen-sensing pathway) mit ihrer Regulation von HIF. HIF ist ein Transkriptionsfaktor für Gene, die unter anderem eine zentrale Funktion in der Entwicklung von Nierentumoren haben. Auf einige Mechanismen soll im Folgenden eingegangen werden.

HIF besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Untereinheit hat die Isoformen HIF-1 $\alpha$ , HIF-2  $\alpha$  und HIF-3  $\alpha$ . Von der  $\beta$ -Untereinheit existiert nur HIF-1 $\beta$ . Die  $\beta$ -Form ist in der Zelle ständig nachweisbar, während die  $\alpha$ -Isoformen unter normoxischen Bedingungen in gesunden Zellen sehr instabil sind (9, 33). HIF-1 $\alpha$  und HIF-2  $\alpha$  besitzen mit der aminoterminalen und der carboxyterminalen jeweils zwei Domänen, mit denen sie die Transkription aktivieren können. Diese Domänen werden unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert, was eine Aktivierung der Transkription verhindert (9). pVHL ist in der Lage, an hydroxyliertes HIF- $\alpha$  zu binden und es so für die Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau im 26S-Proteasom zu markieren. Liegt in der Zelle ein hypoxischer Zustand vor, so bleibt HIF- $\alpha$  unhydroxyliert, wodurch pVHL nicht binden kann. Der Abbau durch das Proteasom bleibt somit aus und HIF- $\alpha$  akkumuliert in der Zelle (9). Sowohl HIF-1 $\alpha$  als auch HIF-2 $\alpha$  sind nun in der Lage, in den Zellkern zu gelangen, wo sie mit HIF- $\beta$  Heterodimere bilden, die dann an die sog. hypoxia response elements (HRE) der DNA binden. Dies führt letztendlich zur Aktivierung der Transkription (9). Wichtige Genprodukte sind dann unter anderem die Phosphoglyceratkinase-1 (PGK-1), die 6-Phosphofruktokinase-1 (PFK-1) sowie der Glucosetransporter-1 (GLUT-1) für den Zellstoffwechsel und die Glucoseaufnahme, der vascular endothelial growth factor (VEGF) und der platelet derived growth factor (PDGF) für die Angiogenese, die alle eine große Bedeutung in der Tumorgenese haben. Weitere relevante Wege sind die Zellproliferation und das Zellüberleben, etwa durch den epidermal growth factor receptor (EGFR), die Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM) und die pH-Kontrolle (7, 9, 33). Wie bereits erwähnt zeigen alle Patienten mit der von Hippel-Lindau Erkrankung sowie ein Großteil der sporadischen kNzK einen Funktionsverlust beider Allele des VHL-Gens (9, 17, 39, 43). So ist der beschriebene Weg der Inaktivierung von HIF- $\alpha$  auch unter normoxischen Bedingungen nicht mehr möglich.

Allerdings existieren auch einige andere Wege unabhängig von VHL, die zu einer HIF-Aktivierung führen. Ein Beispiel hierfür ist der mTOR-Signalweg (9).

Die von Hippel-Lindau Erkrankung ist eine seltene Multisystemerkrankung, die autosomal-dominant vererbt wird und mit einer Häufigkeit von etwa 1:31.000-1:85.000 auftritt (17, 77). Charakteristisch sind Zysten und Tumoren in zahlreichen Organen (7, 77). Es existieren verschiedene Klassifikationen der Erkrankung, unter anderem nach dem Phänotyp in Typ 1, 2A, 2B und 2C. So entstehen zum Beispiel bei Typ 1 keine Phäochromozytome, die aber bei Typ 2 zu finden sind (7). Insgesamt sind folgende Tumoren bei der von Hippel-Lindau Erkrankung bedeutsam: Hämangioblastome der Retina und des ZNS, Tumoren des Innenohrs, Zysten des Pankreas und der Niere. Die Zysten der Niere neigen zu einer malignen Transformation in ein kNZK. Dieses ist die häufigste Todesursache von Patienten mit der Hippel-Lindau Erkrankung (7, 17, 77, 96).

pVHL und seine Zielgene sowie die nachfolgenden Signalwege sind auch therapeutisch von großer Bedeutung, da diese von einigen der neuen targeted therapies beeinflusst werden. Wie bereits erwähnt führt HIF zu einer verstärkten Expression von VEGF, das eine Schlüsselfunktion in der Angiogenese hat. Therapeutisch wichtig ist auch der oben beschriebene mTOR-Weg. So existieren einige Pharmaka, die in diese Wege eingreifen. Der Prototyp für die Inhibitoren von mTOR ist Rapamycin (Sirolimus), weitere Medikamente sind Temsirolimus und Everolimus. Bevacizumab ist ein Antikörper gegen den Wachstumsfaktor VEGF, der ebenfalls von Sunitinib, Sorafenib, Pazopanib und Axitinib inhibiert wird (96).

Das Protein des VHL-Gens ist mit immunhistochemischen Methoden in wenigen Studien untersucht worden. Die Fallzahlen von UK sind gering und auch zum pNZK sind nur wenige Untersuchungen mit - zum Teil - sehr geringen Fallzahlen publiziert worden. DBK sind noch nicht überprüft worden.

In Normalgeweben wird pVHL laut Corless et al. (21) unter anderem in Tubulusepithelien, Glomerula und der Harnblase exprimiert. Lin et al. (55) zeigten eine positive Immunhistochemie für pVHL in den Tubulusepithelien, während die Glomerula ohne Anfärbung waren. Normales Urothel der Blase zeigte in der Hälfte der Fälle eine schwache Positivität der basalen Zellschichten.

## **1.5 Zusammenfassung der eigenen Zielsetzung**

Das Hauptziel der Untersuchung war die Erarbeitung eines immunhistochemischen Profils von Ductus Bellini-Karzinomen zur Abgrenzung von wichtigen Differentialdiagnosen. Dazu wurden Antikörper gegen die Proteine p63, pax8 und pVHL eingesetzt. Bei den Differentialdiagnosen handelt es sich vor allem um das Urothelkarzinom des oberen Harntrakts und das papilläre Nierenzellkarzinom. p63 ist für die urotheliale Differenzierung wichtig, pax8 hingegen für die Nierenentwicklung. DBK sind bisher nicht mit einem Antikörper gegen pVHL untersucht worden. Aufgrund der Bedeutung des von Hippel-Lindau Gens im Rahmen von klarzelligem NZK sollte das zugehörige Protein an DBK, UK und pNZK überprüft werden, um eventuelle Unterschiede aufzuzeigen. Zudem sollte die Frage geklärt werden,

ob das Ductus Bellini- eher den Urothel- oder den Nierenzellkarzinomen zugeordnet werden muss, um so einen Hinweis für mögliche Therapiestrategien zu erhalten, die für das DBK bisher fehlen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Fälle

Die insgesamt 35 Fälle des Ductus Bellini-Karzinoms wurden im Rahmen des Deutschen Netzwerks Nierenzelltumoren (DNNT) zentral gesammelt und von den Pathologen Herrn Prof. Dr. med. Arndt Hartmann (Leiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Erlangen) und Herrn Prof. Dr. med. Rainer Grobholz (Leiter des Instituts für Pathologie des Kantonsspitals Aarau, Schweiz) re-evalu-iert. In insgesamt 35 von 54 Fällen bestätigte sich die Diagnose eines DBK. Bei den ausgeschlossenen Fällen handelte es sich um Urothelkarzinome des Nierenbeckens, papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 2, sowie um sarkomatoide und unklassifizierte NZK.

Die papillären Nierenzellkarzinome wurden aus zehn deutschen urologischen Kliniken zusammen-getragen, zentral re-evaluert und daraus Tissue-Microarray-Blöcke (TMA-Blöcke) hergestellt (36). Ins-gesamt wurden davon in dieser Arbeit 54 pNZK vom Typ 1 und 33 vom Typ 2 untersucht.

Die insgesamt 25 Urothelkarzinome des oberen Harntrakts wurden vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Homburg (Leitung: Herr Prof. Dr. Rainer M. Bohle) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um insgesamt 15 Urothelkarzinome des Nierenbeckens und um zehn des Harnleiters.

In allen Fällen wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (formalin fixed paraffin embedded tissue, FFPE tissue) verwendet. Daneben standen - soweit zu erheben - die klinischen bzw. pathologischen Daten zur Verfügung.

#### 2.1.1.1. Ductus Bellini-Karzinome

Im Folgenden sind die untersuchten Fälle von DBK mit ihren klinisch-pathologischen Daten in tabellarischer Form dargestellt.

**Tabelle 6. Untersuchte Ductus Bellini-Karzinome**

Laufende Nummer	Alter bei OP	Geschlecht	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	UICC-Grading	R-Status
dbk-01	72		pT1	pN0	M1	3	R0
dbk-02	75		pT1a	k. A.	M1	3	R0
dbk-03	46		pT1a	pN0	M0	2	R0
dbk-04	70		pT1a	pN0	M1	3	R0
dbk-05	62		pT1b	k. A.	k. A.	3	R0
dbk-06	71		pT1b	pN0	M1	3	R0
dbk-07	68		pT1b	pN0	M1	3	R1
dbk-08	60		pT2	k. A.	M1	3	R0
dbk-09	47		pT2	k. A.	M1	4	R0
dbk-10	76		pT2	pN0	M0	3	R0
dbk-11	69		pT2	pN0	M0	4	R0
dbk-12	81		pT3a	k. A.	M1	3	R1
dbk-13	68		pT3a	pN0	M0	3	R0
dbk-14	87		pT3a	pN0	M0	3	R1
dbk-15	70		pT3a	pN0	M0	3	R0

*Tabelle 6, Teil A*

Laufende Nummer	Alter bei OP	Geschlecht	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	UICC-Grading	R-Status
dbk-16	73	♂	pT3a	pN0	M0	3	R0
dbk-17	52	♂	pT3a	pN0	M1	3	R0
dbk-18	52	♂	pT3a	pN0	M1	3	R0
dbk-19	71	♂	pT3a	pN1	M1	3	R2
dbk-20	56	♂	pT3a	pN1	M1	3	R1
dbk-21	65	♂	pT3a	pN1	M1	3	R1
dbk-22	58	♂	pT3a	pN1	M1	2	R0
dbk-23	70	♂	pT3a	pN1	M1	4	R0
dbk-24	64	♂	pT3a	pN1	M1	3	R0
dbk-25	48	♂	pT3a	pN2	M1	3	R0
dbk-26	74	♂	pT3a	pN2	M1	3	R1
dbk-27	63	♂	pT3b	pN0	M1	3	R0
dbk-28	68	♂	pT3b	pN0	M1	3	R1
dbk-29	75	♂	pT3b	pN1	M1	3	R0
dbk-30	66	♂	pT3b	pN1	M1	3	R0
dbk-31	64	♂	pT3b	pN2	M1	3	R0
dbk-32	65	♂	pT4	k. A.	k. A.	3	R1
dbk-33	43	♂	pT4	pN0	M1	3	R0
dbk-34	71	♂	pT4	pN1	M1	4	R0
dbk-35	52	♂	pT4	pN2	M1	3	R2

Tabelle 6, Teil B- Tabelle 6 zeigt die untersuchten Ductus Bellini-Karzinome mit den zugehörigen klinisch-pathologischen Daten. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, N= Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionären Lymphknoten-metastasen, N1: Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten, N2: Lymphknotenmetastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten), M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer, R= Resektionsränder (R0: Tumor nicht randbildend am Resektat, R1: Tumor mikroskopisch randbildend, R2: Tumor makroskopisch randbildend), Präfix p vor T- und N-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, k. A. = keine Angabe

**Tabelle 7. Häufigkeiten der klinisch-pathologischen Daten der Ductus Bellini-Karzinome**

Geschlecht	männlich	weiblich					
Anzahl (Prozent)	24 (68,6)	11 (31,4)					
<b>Tumorstadium</b>	pT1	pT1a	pT1b	pT2	pT3a	pT3b	pT4
Anzahl (Prozent)	1 (2,9)	3 (8,6)	3 (8,6)	4 (11,4)	15 (42,9)	5 (14,3)	4 (11,4)
<b>Lymphknotenstatus</b>	pN0	pN1	pN2	k. A.			
Anzahl (Prozent)	16 (45,7)	9 (25,7)	4 (11,4)	6 (17,1)			
<b>Metastasenstatus</b>	M0	M1	k. A.				
Anzahl (Prozent)	7 (20)	26 (74,3)	2 (5,7)				
<b>UICC-Grading</b>	Grad 2	Grad 3	Grad 4				
Anzahl (Prozent)	2 (5,7)	29 (82,9)	4 (11,4)				
<b>Resektionsränder</b>	R0	R1	R2				
Anzahl (Prozent)	25 (71,4)	8 (22,9)	2 (5,7)				

Die in der Tabelle angegebenen Prozentwerte sind auf die erste Nachkommastelle gerundet. k. A. = keine Angabe

Das DBK-Kollektiv stellte sich wie folgt dar (die im Text angegebenen Prozentwerte sind unter Ausschluss der fehlenden Werte berechnet): Die 35 untersuchten Patienten mit einem Ductus Bellini-Karzinom waren im Mittel 64,9 Jahre alt (Median 68 Jahre, Minimum 43 Jahre, Maximum 87 Jahre) und zu mehr als zwei Dritteln männlich. Höhere Tumorstadien ab pT3 waren mit 69% deutlich häufiger. Etwa die Hälfte der Patienten hatten Lymphknotenmetastasen, während ungefähr drei Viertel bereits Fernmetastasen zeigten. Der häufigste UICC-Grad war G3 mit über 80%. Die restlichen Tumoren waren vom Grad G2 bzw. G4.

### 2.1.1.2. Urothelkarzinome des oberen Harntrakts

Wie die Fälle von Ductus Bellini-Karzinomen sind auch die untersuchten Urothelkarzinom-Fälle in Tabellenform dargestellt:

**Tabelle 8. Untersuchte Urothelkarzinome des oberen Harntrakts**

Laufende Nummer	Lokalisation	Alter bei OP	Geschlecht	T-Stadium	UICC-Grading	R-Status
uk-01	NB	73	♂	pTa	2	k. A.
uk-02	NB	77	♂	pTa	2	R0
uk-03	NB	68	♂	pT1	2	R1
uk-04	NB	78	♂	pT1	2	R0
uk-05	NB	64	♂	pT3	3	R0
uk-06	NB	80	♂	pT3	2	R0
uk-07	NB	82	♂	pT3	2	R0
uk-08	NB	83	♂	pT3	2	R0
uk-09	NB	81	♂	pT3	3	R0
uk-10	NB	72	♂	pT3	2	R0
uk-11	NB	64	♂	pT3a	3	R0
uk-12	NB	75	♂	pT4	2	R1
uk-13	NB	70	♂	pT4	3	R0
uk-14	NB	69	♂	pT4	3	R0
uk-15	NB	51	♂	pT4	3	k. A.
uk-16	HL	59	♂	pTa	2	R1
uk-17	HL	80	♂	pTa	2	k. A.
uk-18	HL	64	♂	pT1	2	R0
uk-19	HL	85	♂	pT2	2	R0
uk-20	HL	80	♂	pT2	2	R0
uk-21	HL	81	♂	pT3	2	k. A.
uk-22	HL	66	♂	pT3	2	R1
uk-23	HL	52	♂	pT3	2	R0
uk-24	HL	80	♂	pT3	3	k. A.
uk-25	HL	73	♂	pT3	3	R0

Tabelle 8 zeigt die untersuchten Urothelkarzinome mit den zugehörigen klinisch-pathologischen Daten. **Abkürzungen:** NB= Nierenbecken, HL= Harnleiter, T= Tumor-Stadium, UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer, R= Resektionsränder (R0: Tumor nicht randbildend am Resektat, R1: Tumor mikroskopisch randbildend, Präfix p vor T-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, k. A.= keine Angabe, pTa= papilläres, nichtinvasives Urothelkarzinom (siehe auch Tabelle 4, S. 19)

**Tabelle 9. Häufigkeiten der klinisch-pathologischen Daten der Urothelkarzinome des oberen Harntrakts**

Geschlecht	männlich		weiblich			
	Anzahl (Prozent)	17 (68)	8 (32)			
Tumorstadium	pTa	pT1	pT2	pT3	pT3a	pT4
	Anzahl (Prozent)	4 (16)	3 (12)	2 (8)	11 (44)	1 (4)
UICC-Grading	Grad 2		Grad 3			
	Anzahl (Prozent)	17 (68)	8 (32)			
Resektionsränder	R0	R1	k. A.			
	Anzahl (Prozent)	16 (64)	4 (16)	5 (20)		

k. A.= keine Angabe, pTa= papilläres, nichtinvasives Urothelkarzinom (siehe auch Tabelle 4, S. 19)

Es wurden insgesamt 15 Urothelkarzinome des Nierenbeckens (NB) und 10 des Harnleiters (HL) untersucht, die folgenden Prozentangaben wurden unter Ausschluss der fehlenden Werte berechnet. Die Patienten mit einem Urothelkarzinom waren im Mittel 72,3 Jahre alt (Median 73 Jahre, Minimum 51 Jahre, Maximum 85 Jahre) und zu über zwei Dritteln männlich. Das häufigste Tumorstadium war pT3, insgesamt waren über 60% in einem fortgeschrittenen Tumorstadium größer als pT2. Die

Tumoren präsentierten sich im histopathologischen Grading überwiegend mit Grad 2, die restlichen waren vom Grad 3.

### 2.1.1.3. Papilläre Nierenzellkarzinome

Wie die Fälle von Ductus Bellini- und Urothelkarzinomen, sind die untersuchten papillären Nierenzellkarzinome von Typ 1 und 2 in Tabellenform dargestellt.

#### 2.1.1.3.1 Papilläre Nierenzellkarzinome Typ 1

**Tabelle 10. Untersuchte papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1**

Laufende Nummer	Alter bei OP	Geschlecht	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	UICC-Grading	Fuhrman-Grading
pnzk-I-01	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	2
pnzk-I-02	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	1	1
pnzk-I-03	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	1	1
pnzk-I-04	66	♂	k. A.	k. A.	k. A.	1	1
pnzk-I-05	61	♂	pT1	k. A.	k. A.	2	2
pnzk-I-06	37	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-07	38	♂	pT1	pN0	M0	2	2
pnzk-I-08	66	♂	pT1	pN0	M0	2	1
pnzk-I-09	69	♂	pT1	pN0	M0	1	2
pnzk-I-10	54	♂	pT1	pN0	M0	2	2
pnzk-I-11	57	♂	pT1	pN0	M0	2	2
pnzk-I-12	50	♀	pT1	pN0	M0	2	2
pnzk-I-13	57	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-14	44	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-15	69	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-16	67	♀	pT1	pN0	M0	2	2
pnzk-I-17	74	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-18	50	♂	pT1	pN0	M0	2	2
pnzk-I-19	54	♂	pT1	pN0	M0	3	2
pnzk-I-20	44	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-21	75	♂	pT1	pN0	M0	2	1
pnzk-I-22	57	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-23	66	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-24	63	♂	pT1	pN0	M0	2	1
pnzk-I-25	68	♀	pT1	pN0	M0	2	1
pnzk-I-26	55	♂	pT1	pN0	M0	1	2
pnzk-I-27	45	♂	pT1	pN0	M0	1	2
pnzk-I-28	73	♀	pT1	pN0	M0	1	2
pnzk-I-29	26	♂	pT1	pN0	M0	1	1
pnzk-I-30	64	♂	pT1	pN0	M0	2	2
pnzk-I-31	42	♀	pT1	pN0	M0	2	2
pnzk-I-32	71	♂	pT1	pN0	M1	1	2
pnzk-I-33	60	♂	pT2	k. A.	k. A.	1	1
pnzk-I-34	69	♂	pT2	k. A.	M0	2	2
pnzk-I-35	51	♂	pT2	k. A.	M1	2	2
pnzk-I-36	46	♀	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-37	60	♀	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-38	54	♂	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-39	55	♂	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-40	64	♂	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-41	70	♂	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-42	55	♂	pT2	pN0	M0	1	1
pnzk-I-43	69	♂	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-44	63	♀	pT2	pN0	M0	1	1
pnzk-I-45	68	♂	pT2	pN0	M0	2	2

Tabelle 10, Teil A



Laufende Nummer	Alter bei OP	Geschlecht	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	UICC-Grading	Fuhrman-Grading
pnzk-I-46	66	♂	pT2	pN0	M0	2	1
pnzk-I-47	62	♂	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-48	70	♂	pT2	pN0	M0	2	1
pnzk-I-49	62	♀	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-50	74	♀	pT2	pN0	M0	2	2
pnzk-I-51	54	♂	pT3	pN0	M0	1	2
pnzk-I-52	38	♂	pT3	pN0	M0	2	2
pnzk-I-53	79	♂	pT3	pN0	M0	2	2
pnzk-I-54	46	♂	pT3	pN2	M1	2	2

Tabelle 10, Teil B- Tabelle 10 zeigt die untersuchten papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 1 mit den zugehörigen klinisch-pathologischen Daten. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, N= Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1: Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten, N2: Lymphknotenmetastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten), M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer, Präfix p vor T- und N-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, k. A.= keine Angabe

**Tabelle 11. Häufigkeiten der klinisch-pathologischen Daten der pNZK vom Typ 1**

<b>Geschlecht</b>	männlich	weiblich	k. A.	
Anzahl (Prozent)	41 (75,9)	10 (18,5)	3 (5,6)	
<b>Tumorstadium</b>	pT1	pT2	pT3	k. A.
Anzahl (Prozent)	28 (51,9)	18 (33,3)	4 (7,4)	4 (7,4)
<b>Lymphknotenstatus</b>	pN0	pN2	k. A.	
Anzahl (Prozent)	45 (83,3)	1 (1,9)	8 (14,8)	
<b>Metastasenstatus</b>	M0	M1	k. A.	
Anzahl (Prozent)	45 (83,3)	3 (5,6)	6 (11,1)	
<b>UICC-Grading</b>	Grad 1	Grad 2	Grad 3	
Anzahl (Prozent)	21 (38,9)	32 (59,3)	1 (1,9)	
<b>Fuhrman-Grading</b>	Grad 1	Grad 2		
Anzahl (Prozent)	21 (38,9)	33 (61,1)		

Die in der Tabelle angegebenen Prozentwerte sind auf die erste Nachkommastelle gerundet. k. A.= keine Angabe, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom

Die klinisch-pathologischen Daten der 54 untersuchten Patienten mit einem papillären Nierenzellkarzinom vom Typ 1 stellten sich wie folgt dar (Prozentangaben im Text unter Ausschluss der fehlenden Werte berechnet): Die Erkrankten waren im Mittel 58,8 Jahre alt (Median 61 Jahre, Minimum 26 Jahre, Maximum 79 Jahre) und in ca. 80% der Fälle männlich. Deutlich über 90% hatten ein organbegrenzt Tumorstadium bis pT2 (pT1: 56%, pT2: 36%, pT3: 8%). Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen waren sehr selten. Fast alle Tumoren zeigten ein histopathologisches Grading bis G2, welches mit ≈59 % auch der häufigste Grad war (G1: ≈39%, G3: ≈2%). Im Fuhrman-Grading hatten alle Tumoren maximal Grad 2.

### 2.1.1.3.2 Papilläre Nierenzellkarzinome Typ 2

**Tabelle 12. Untersuchte papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 2**

Laufende Nummer	Alter bei OP	Geschlecht	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	UICC-Grading	Fuhrman-Grading
pnzk-II-01	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3
pnzk-II-02	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3
pnzk-II-03	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	3	4
pnzk-II-04	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3
pnzk-II-05	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3
pnzk-II-06	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3
pnzk-II-07	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	3	3
pnzk-II-08	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	3	3
pnzk-II-09	66		pT1	pN0	M0	2	3
pnzk-II-10	81		pT1	pN0	M0	2	3
pnzk-II-11	66		pT1	pN0	M0	3	3
pnzk-II-12	69		pT1	pN0	M0	2	3
pnzk-II-13	66		pT1	pN0	M0	3	3
pnzk-II-14	60		pT1	pN0	M0	2	3
pnzk-II-15	67		pT1	pN0	M0	2	3
pnzk-II-16	53		pT1	pN1	M0	2	3
pnzk-II-17	58		pT1	pN2	M0	2	3
pnzk-II-18	68		pT2	k. A.	M0	2	3
pnzk-II-19	73		pT2	pN0	M0	3	3
pnzk-II-20	77		pT2	pN0	M0	2	3
pnzk-II-21	85		pT2	pN0	M0	3	4
pnzk-II-22	40		pT2	pN0	M0	3	3
pnzk-II-23	58		pT2	pN2	M0	3	3
pnzk-II-24	75		pT3	pN0	k. A.	2	3
pnzk-II-25	80		pT3	pN0	M0	3	3
pnzk-II-26	61		pT3	pN0	M0	2	3
pnzk-II-27	63		pT3	pN0	M0	2	3
pnzk-II-28	65		pT3	pN0	M0	3	3
pnzk-II-29	72		pT3	pN0	M1	2	3
pnzk-II-30	79		pT3	pN0	M1	2	3
pnzk-II-31	50		pT3	pN1	k. A.	3	4
pnzk-II-32	68		pT3	pN1	M1	2	3
pnzk-II-33	54		pT3	pN2	M1	2	3

Tabelle 12 zeigt die untersuchten papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 2 mit den zugehörigen klinisch-pathologischen Daten. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, N= Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1: Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten, N2: Lymphknotenmetastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten), M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer, Präfix p vor T- und N-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, k. A.= fehlende Angabe

**Tabelle 13. Häufigkeiten der klinisch-pathologischen Daten der pNZK vom Typ 2**

<b>Geschlecht</b>	männlich	weiblich	k. A.	
Anzahl (Prozent)	19 (57,6)	6 (18,2)	8 (24,2)	
<b>Tumorstadium</b>	pT1	pT2	pT3	k. A.
Anzahl (Prozent)	9 (27,3)	6 (18,2)	10 (30,3)	8 (24,2)
<b>Lymphknotenstatus</b>	pN0	pN1	pN2	k. A.
Anzahl (Prozent)	18 (54,5)	3 (9,1)	3 (9,1)	9 (27,3)
<b>Metastasenstatus</b>	M0	M1	k. A.	
Anzahl (Prozent)	19 (57,6)	4 (12,1)	10 (30,3)	
<b>UICC-Grading</b>	Grad 2	Grad 3		
Anzahl (Prozent)	21 (63,6)	12 (36,4)		
<b>Fuhrman-Grading</b>	Grad 3	Grad 4		
Anzahl (Prozent)	30 (90,9)	3 (9,1)		

Die in der Tabelle angegebenen Prozentwerte sind auf die erste Nachkommastelle gerundet. k. A.= keine Angabe, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom

Zusammenfassend waren die klinisch-pathologischen Daten der 33 Patienten mit einem papillären Nierenzellkarzinom vom Typ 2 wie folgt (Prozentangaben im Text unter Ausschluss der fehlenden Angaben berechnet): Die Erkrankten waren im Mittel 66,2 Jahre alt (Median 66 Jahre, Minimum 40 Jahre, Maximum 85 Jahre) und in mehr als drei Vierteln der Fälle männlich. Das häufigste Tumorstadium war pT3 mit einem Anteil von 40%, der Rest der Tumoren hatte ein Stadium bis pT2. 25% der Fälle zeigten bereits Lymphknoten-, aber nur knapp über 17% Fernmetastasen. Etwa zwei Drittel hatten einen UICC-Grad von 2, die restlichen Fälle einen Grad von 3. Nach der Einteilung von Fuhrman wurden über 90% der Fälle mit Grad 3 eingestuft, der Rest mit Grad 4.

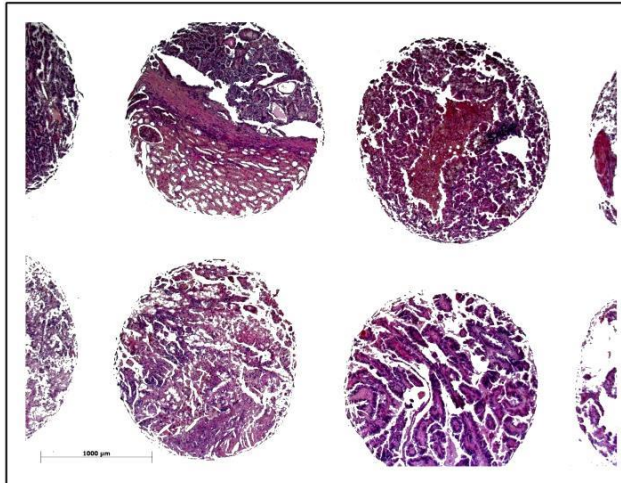
### **2.1.2. Paraffingewebe und Tissue Microarrays**

Aus den Paraffinblöcken stellte ich am Mikrotom Schnittpräparate mit einer Dicke von vier Mikrometern her und zog diese auf Superfrost Plus-Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) auf. Diese Objektträger (OT) haben eine positiv geladene Oberfläche, sodass Bindungen zwischen dem formalinfixierten Paraffingewebe und dem Glas entstehen können, die ein Abschwimmen des Schnittes während der Färbung erschweren sollen.

Die Technik, zahlreiche verschiedene Gewebe in einen Paraffinblock einzubetten, wurde von 1986 von Battifora et al. (11) erstmals publiziert und ein Jahr später von Wan et al. (105) weiterentwickelt. Die Anwendungsmöglichkeiten des TMA wurden im Laufe der Jahre immer vielfältiger, beispielsweise mit der Anwendung der Fluorescence in situ hybridization (FISH).

Im Allgemeinen wird mithilfe einer Biopsienadel eine repräsentative Probe aus dem eingebetteten Gewebestück entnommen und zusammen mit zahlreichen anderen Stenzen in einen neuen Paraffinblock eingebettet. In dieser Arbeit wurden 60 Tumorproben mit jeweils einer Stanze pro Fall in einem Array verarbeitet, sowie eine weitere Probe zur Orientierung auf dem OT. Allerdings sind mehrere Hundert Proben auf einem Schnitt möglich.

Die für diese Arbeit verwendeten TMA wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Erlangen (Direktor: Herr Prof. Dr. Arndt Hartmann) für das DNNT hergestellt. Zuerst wurden sämtliche Tumoren re-evaluiert und anhand eines HE-Schnitts ein repräsentatives Areal des Tumors ausgewählt. Anschließend wurde eine Probe mit einem Durchmesser von 1,5 mm entnommen und mit den weiteren Proben in einen neuen Block eingebettet. Nach der Erstellung der TMA wurde zuerst eine HE-Färbung angefertigt und zusammen mit den originalen Schnitten erneut bewertet, um sicherzustellen, dass der gewählte Ausschnitt möglichst repräsentativ für den Gesamttumor ist (15).



**Abbildung 5. TMA-Schnitt, 2,5fach Objektiv**

*Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines TMA-Objektträgers in der mikroskopischen Betrachtung. Sichtbar sind die im Durchmesser 1,5mm großen Stenzen verschiedener Fälle von papillären Nierenzellkarzinomen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.*

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Alle in dieser Arbeit untersuchten Tumoren habe ich nach der Herstellung von vier Mikrometer dicken histologischen Schnitten am Mikrotom zuerst mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung). Dazu wurden die OT für 30 Minuten bei 60° Grad erwärmt und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol, 100% Ethanol, 70% Ethanol, destilliertes Wasser) deparaffiniert und rehydriert. Danach wurden die OT für 10 Minuten in eine Hämalaulösung nach Mayer in einer Verdünnung von 1:5 (Merck KGaA, Darmstadt) eingestellt. Nach der Spülung mit Leitungswasser erfolgte die Differenzierung (Entfernung des überschüssigen Hämatoxylins), indem die Schnitte dreimal in 1% HCl-Alkohol-Lösung getaucht wurden, gefolgt von einer zehnmütigen Spülung unter laufendem, kaltem Leitungswasser. Anschließend wurde mit angesäuerter 1%-Eosin-Lösung (Merck KGaA) gegengefärbt, indem die OT für 45 Sekunden eingetaucht wurden. Nach der erneuten Spülung mit Leitungswasser wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Neo Mount (Merck KGaA) eingedeckt. Die HE-Färbung bringt Zellkerne blauviolett, Zytoplasma und Kollagenfasern rot und elastische Fasern ungefärbt bis leicht rosa zur Darstellung.

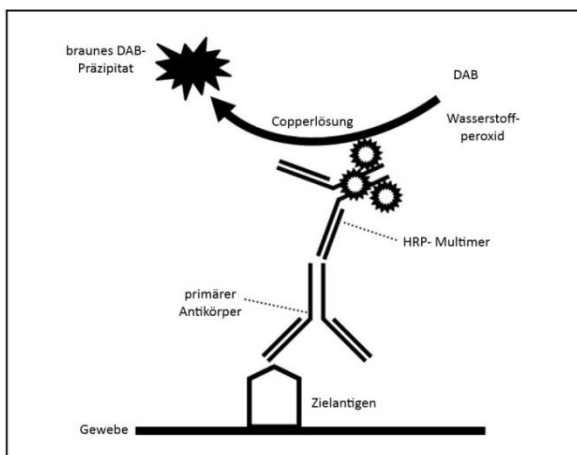
### 2.2.2. Immunhistochemie und ihre Auswertung

#### 2.2.2.1. Immunhistochemie

Die Färbung der Immunreaktion zwischen Antikörper und Antigen erfolgt mittels einer Enzym-Substrat-Reaktion, bei der farblose Chromogene in ihre farbigen Endprodukte umgewandelt werden. In dieser Arbeit verwendete ich die Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase= HRP) als katalytisches Enzym. Ihr aktives Zentrum wird von einer Hämgruppe (Hämatin) gebildet. Das Substrat der Meerrettichperoxidase ist Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), das in Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasser ( $H_2O$ ) zerfällt. Die freiwerdenden Protonen oxidieren dabei das farblose Chromogen, welches dann ein

Farbsignal abgibt. Hier wurde als Elektronendonator das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet, welches ein braunes Endprodukt bildet.

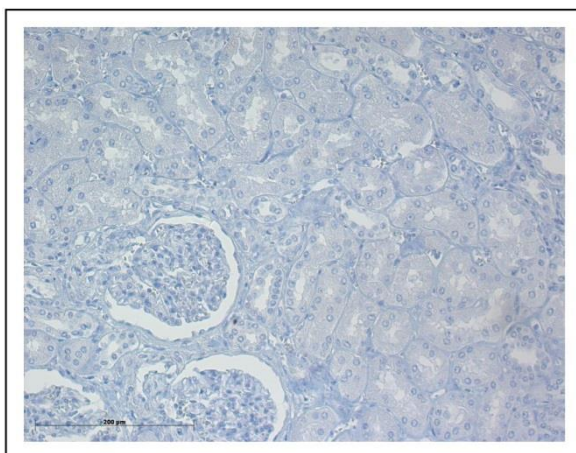
Zur Detektion wurde die sog. Zwei-Schritt indirekte Methode verwendet: Zuerst bindet ein unmarkierter (unkonjugierter) Antikörper - der Primärantikörper - gegen das gesuchte Epitop im Gewebe, anschließend bindet ein Sekundärantikörper gegen den primären. Dieser zweite Antikörper ist mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt, die später das Chromogen oxidiert. Die entstandene Färbung am Ort der Antikörperbindung lässt sich dann unter dem Lichtmikroskop semiquantitativ auswerten.



**Abbildung 6. Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbereaktion, modifiziert nach der Herstellerbroschüre „Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit“**

Abbildung 6 zeigt den schematischen Ablauf einer immunhistochemischen Färbung mit der zwei-Schritt indirekten Methode. Der primäre Antikörper bindet an das Zielantigen auf dem untersuchten Gewebe. An diesen Primärantikörper kann nun ein weiter, sekundärer Antikörper binden, der mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (HRP-Multimer). Dieses Enzym vermittelt die Reaktion, die letztlich zur Oxidation des farblosen Chromogens (DAB) führt, was mit einer braunen Farbreaktion verbunden ist. Die Copperlösung enthält Kupfersulfat und verstärkt die Färbung.

Zur Untersuchung der verschiedenen Tumorentitäten mit der Methode der Immunhistochemie wurde ein Färbeautomat der Firma Ventana (Ventana Medical Systems, Inc., USA), Typ „Benchmark XT“ verwendet und die Detektion erfolgte mit dem „ultraView Universal DAB Detection Kit“ desselben Herstellers. Die Färbung habe ich anhand eines standardisierten Protokolls (siehe Anhang) durchgeführt. Vor der automatisierten Färbung titrierte ich die Antikörper, um einen Anhaltspunkt für die beste Verdünnung und den optimalen Kompromiss zwischen spezifischer Färbung und unspezifischer Hintergrundfärbung zu finden. Diesen Arbeitsschritt verifizierte ich dann in einem Testlauf mit dem Automaten. In jedem Färbegang wurde eine negative Kontrolle parallel mitverarbeitet, die nach exakt demselben Protokoll bearbeitet wurde, allerdings ohne einen Primärantikörper zu verwenden.

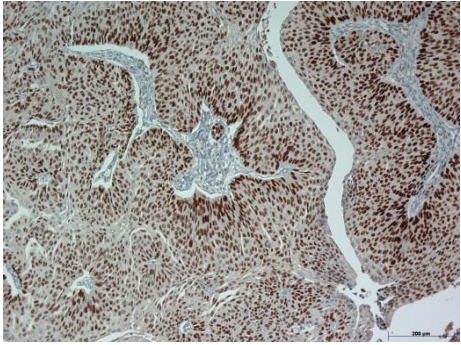
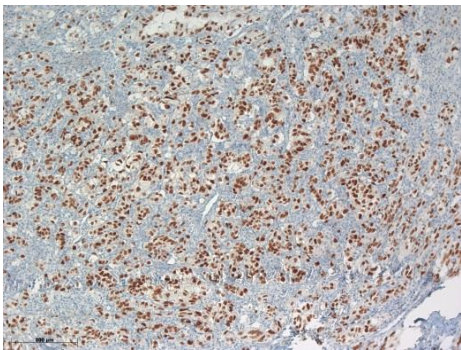
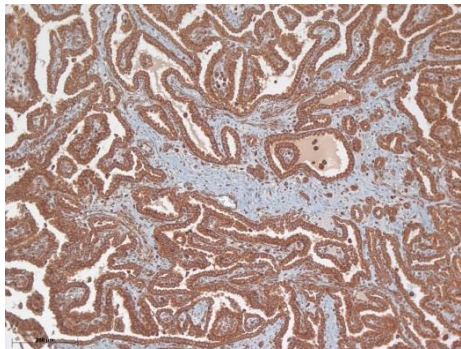


**Abbildung 7. Beispiel für eine negative Kontrolle an normalem Nierengewebe, 20fach Objektiv**

Die Abbildung zeigt einen histologischen Ausschnitt aus der Nierenrinde mit Glomerula und dem tubulären Konvolut.

Im Folgenden sind die verwendeten Antikörper tabellarisch dargestellt.

**Tabelle 14. Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Erläuterung	Immunhistochemische Färbung
p63-Antikörper Monoclonal Mouse Anti- Human, Clone 4A4	Dako, Dänemark	Das p63-Protein ist ein Transkriptionsfaktor aus der p53-Familie. Das Immunogen ist laut Hersteller das aminoterminalende des humanen $\Delta$ Np63-Proteins (Aminosäuren 1-205). Die Verdünnung betrug 1:100.	
pax8-Antikörper, Polyclonal Rabbit, Anti- Human u.a.	ProteinTech Group, USA	pax8 ist ein zur pax-Gruppe gehörendes Gen, einer Familie von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren, die unter anderem in der Entwicklung der Niere eine wichtige Rolle spielen. Das Immunogen ist laut Hersteller das pax8-Fusionsprotein ag0306 (Aminosäuren 1-212). Die Verdünnung betrug 1:200.	
pVHL-Antikörper, Monoclonal Mouse, Anti- Human u.a., Clone Ig33	Thermo Fisher Scientific, USA	Das VHL-Protein (pVHL) ist ein Produkt des von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-gens, das auf Chromosom 3p25 lokalisiert ist. Der verwendete Antikörper detektiert laut Herstellerinformation das 30 kDa große pVHL30, das Epitop sind die Aminosäuren 1-54. Das Immunogen ist ein rekombinantes Eiweiß, das die Aminosäuren 1-213 des humanen VHL enthält. Die Verdünnung betrug 1:100.	

Die Verdünnung der Antikörper wurde jeweils nach Titration und Bewertung von Signal und Hintergrund festgelegt. Folgende Karzinome sind in der jeweiligen Zeile mit einer positiven immunhistochemischen Färbung exemplarisch dargestellt: p63-Antikörper: Urothelkarzinom, pax8-Antikörper: Ductus Bellini-Karzinom, pVHL-Antikörper: papilläres Nierenzellkarzinom. Alle drei Bilder wurden mit einem 10fach-vergrößernden Objektiv aufgenommen.

### 2.2.2.2. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wertete ich semiquantitativ in Anlehnung an den Immunreaktiven Score (IRS) aus, der 1987 von Remmele et al. entwickelt wurde. Ursprünglich war der IRS dazu gedacht, die immunhistochemische Färbung von Progesteron- und Östrogenrezeptoren besser quantifizieren zu können (79).



Der IRS ist ein Produkt, das aus folgenden Multiplikatoren entsteht: Zum einen der Färbeintensität (staining intensity, SI), die Werte von 0-3 annehmen kann, und dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellen an der gesamten Tumorzellmasse (percent positive, pp) mit möglichen Werten von 0-4. Daraus ergeben sich definierte Produkte, denen dann jeweils zur Verdeutlichung ein Färbeergebnis - negativ sowie schwach, mäßig und stark positiv - zugeordnet wird.

In dieser Arbeit wurde der Score wie folgt verwendet:

**Tabelle 15. Immunreaktiver Score nach Remmele (79)**

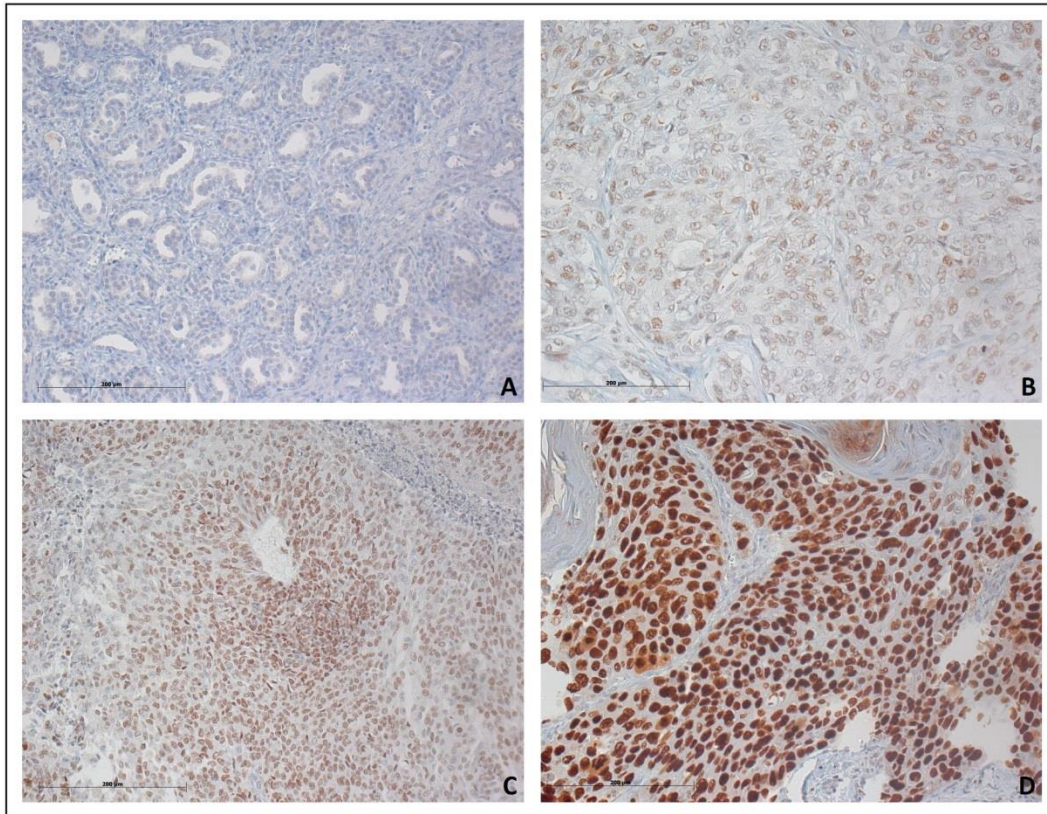
Percent Positive, PP	Staining Intensity, SI	Immunoreactive Score, IRS	IHC-Gruppe
0= keine Färbung	0= keine Färbung	0/ 1= negative Immunhistochemie	-
1= ≤25% positive Tumorzellen	1= geringe Färbeintensität	2/ 3= schwach positive Immunhistochemie	+
2= >25 und ≤50% positive Tumorzellen	2= mittlere Färbeintensität	4/ 6= mäßig positive Immunhistochemie	++
3= >50 und ≤75% positive Tumorzellen	3= hohe Färbeintensität	8/ 9/ 12= stark positive Immunhistochemie	+++
4= ≥75% positive Tumorzellen			

Die Tabelle zeigt die Berechnung des Immunreaktiven Scores (IRS) aus den immunhistochemischen Färbungen. Das Produkt aus PP und SI führt zum IRS. Diesen Variablen können zum besseren Verständnis Gruppen zugeordnet werden, die mit den Symbolen – (negative IHC), + (schwach positive IHC), ++ (mäßig positive IHC) und +++ (stark positive IHC) gekennzeichnet sind.

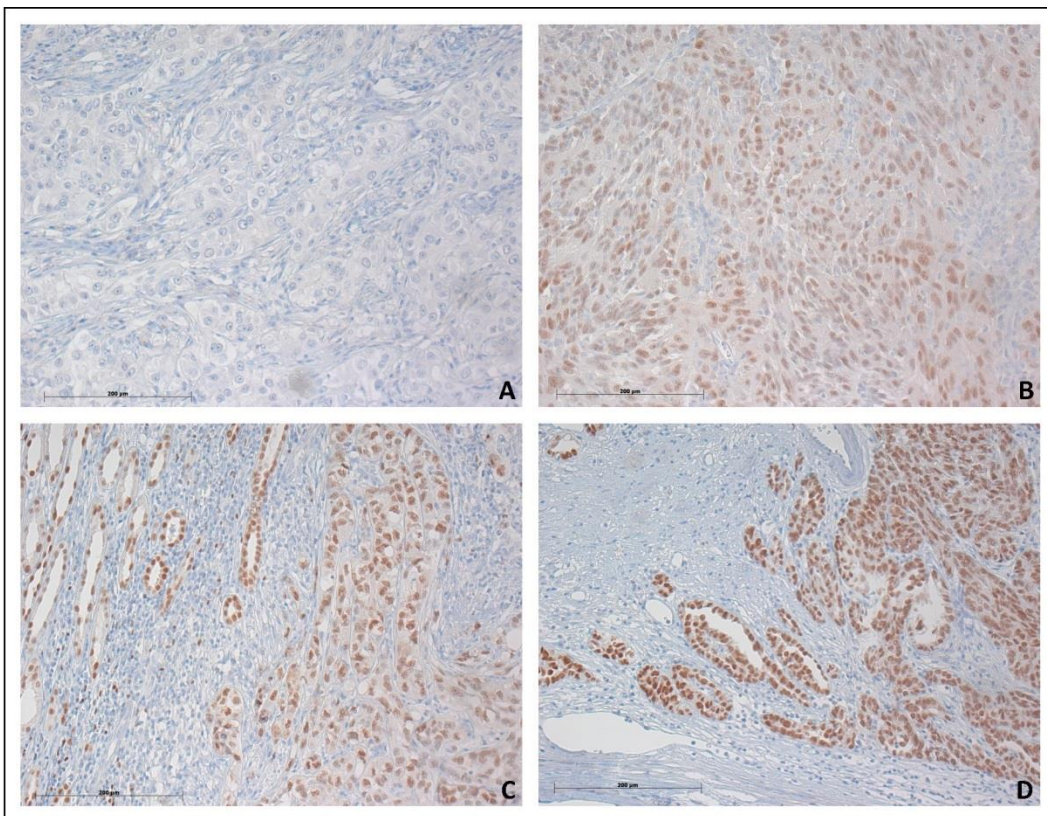
Sind in einem immunhistochemisch gefärbten histologischen Schnitt beispielsweise ca. 40 Prozent aller Tumorzellen positiv gefärbt und ist die Färbeintensität dabei hoch, so erhält man einen PP-Wert von zwei und einen SI-Wert von drei. Das Produkt dieser Werte führt dann zu einem immunreaktiven Score von sechs, was einer mäßig positiven Immunhistochemie (abgekürzt mit ++)

entspricht. Da es für den klinischen Alltag nicht immer sinnvoll erscheint, die positiven Ergebnisse der Immunhistochemie in drei untergeordnete Kategorien (schwach, mäßig und stark positiv) weiter zu unterteilen, wurden für einige Untersuchungen lediglich zwei Gruppen betrachtet. In der einen Gruppe wurden alle Karzinome mit einer positiven Immunhistochemie zusammengefasst (IRS 2-12 bzw. schwach, mäßig und stark positive), die andere Gruppe bildeten die negativen. Es ist jeweils erwähnt, welche Einteilung verwendet wurde.

Die Photodokumentation und Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop Axioskop 40, der Kamera AxioCam MRc 5 und der Software AxioVision (Version 4.8.2.0) der Firma Zeiss (Oberkochen).

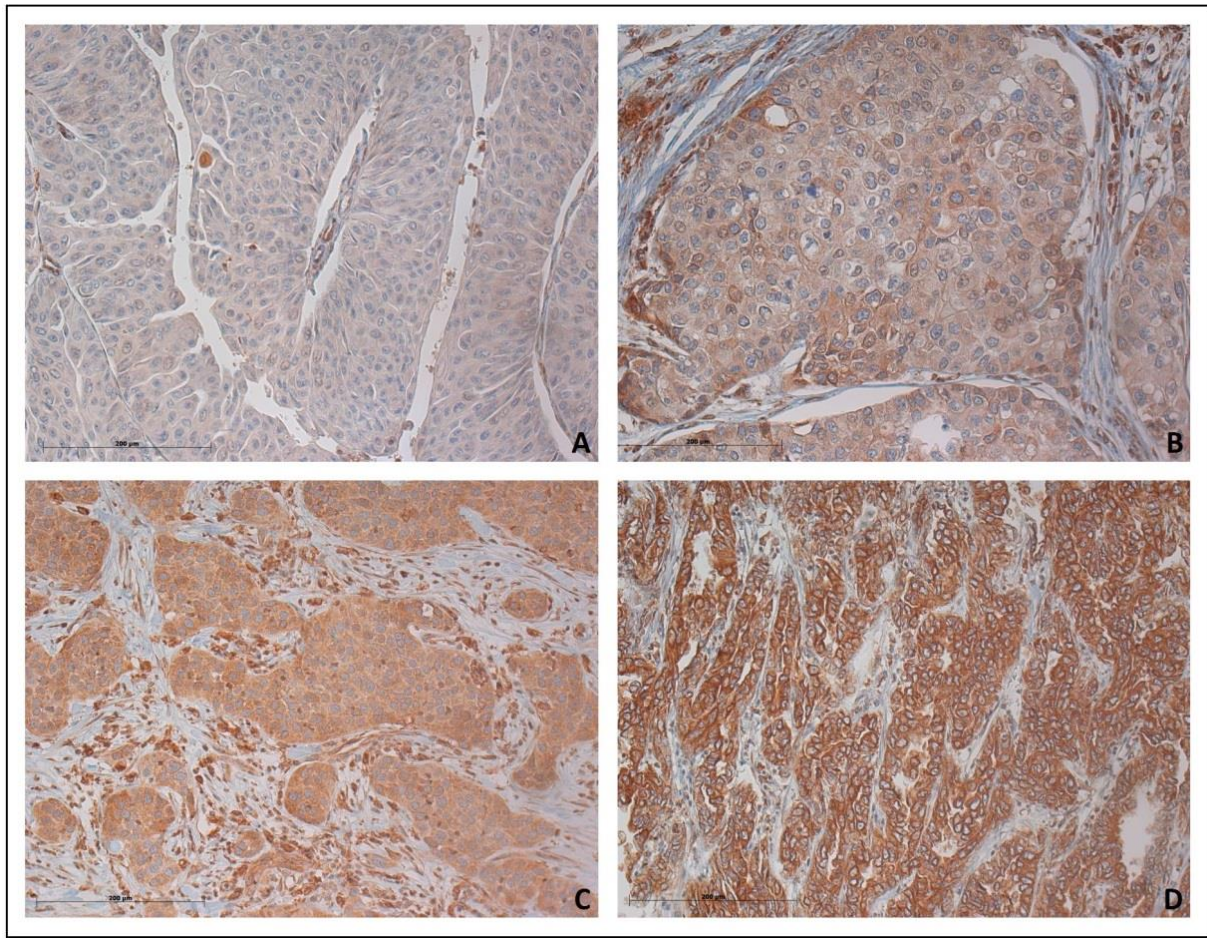


**Abbildung 8. Überblick über die Färbeintensitäten der p63-Immunhistochemie, 20fach-Objektiv**  
**(A)** papilläres Nierenzellkarzinom vom Typ 1, negative Immunhistochemie **(B)** Ductus Bellini-Karzinom, geringe Färbeintensität in der IHC **(C)** Urothelkarzinom, mittlere Färbeintensität **(D)** Urothelkarzinom, hohe Färbeintensität



**Abbildung 9. Überblick über die Färbeintensitäten der pax8-Immunhistochemie, 20fach-Objektiv**  
**(A)** Ductus Bellini-Karzinom, negative Immunhistochemie **(B)** Ductus Bellini-Karzinom, geringe Färbeintensität in der IHC **(C)** Ductus Bellini-Karzinom, mittlere Färbeintensität **(D)** Ductus Bellini-Karzinom, hohe Färbeintensität





**Abbildung 10. Überblick über die Färbeintensitäten der pVHL-Immunhistochemie, 20fach-Objektiv**  
**(A)** Urothelkarzinom, negative Immunhistochemie **(B)** Urothelkarzinom, geringe Färbeintensität in der Immunhistochemie  
**(C)** Urothelkarzinom, mittlere Färbeintensität **(D)** Ductus Bellini-Karzinom, hohe Färbeintensität

### 2.2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Daten führte ich mit dem Programm *IBM SPSS Statistics Version 19* aus, wobei ich p-Werte von  $<0,05$  als statistisch signifikant bewertete. Es wurde stets - soweit nicht anders erwähnt - die exakte, zweiseitige Signifikanz verwendet. Im folgenden Abschnitt werden die angewandten Signifikanztests in kurzer Form erläutert.

#### 2.2.3.1. Vierfelder-Chi<sup>2</sup>-Test

Der Vierfelder-Chi<sup>2</sup>-Test wird zur Analyse von Häufigkeitsunterschieden zwischen zwei Stichproben oder zwei Alternativmerkmalen verwendet, die in einer 2x2-Kreuztabelle dargestellt werden. Er ist bei jeder Merkmalsart und jedem Skalenniveau einsetzbar. Folgende Testvoraussetzungen sind allerdings zu beachten: Maximal 20% der erwarteten Häufigkeiten im Test sollten zwischen 1 und 5 sein, zugleich darf keine der beobachteten Häufigkeiten  $<1$  sein. Als Alternative bietet sich sonst der exakte Test nach Fisher an, der auch bei geringeren Häufigkeiten zulässig ist (13, 106).

### **2.2.3.2. Exakter Test nach Fisher**

Sind die Testvoraussetzungen für den Chi<sup>2</sup>-Test nicht erfüllt, kann der exakte Test nach Fisher verwendet werden. Er testet wie der Chi<sup>2</sup>-Test auf die Unabhängigkeit innerhalb einer Kontingenztafel und es sind ebenso alle Skalenniveaus und Merkmalsarten zulässig (13, 106).

### **2.2.3.3. Mann-Whitney-U-Test**

Der U-Test nach Mann und Whitney (MWU-Test) ist ein nicht parametrischer Test aus der Gruppe der Rangsummentests. Hier werden nicht die originalen Messwerte, sondern diesen zugeordnete Rangzahlen berechnet, wodurch sich auch ordinale Merkmale analysieren lassen. Lediglich die Verteilungen der Variablen sollten sich ähneln. Der MWU-Test vergleicht dann in zwei unabhängigen Stichproben die Mediane miteinander (13, 106).

### **2.2.3.4. Kruskal-Wallis-Test**

Der Kruskal-Wallis-Test (KW-Test) ist wie der MWU-Test ein Rangsummentest, der für mehrere unverbundene Stichproben erweitert wurde. So lassen sich mehrere Stichproben im Hinblick auf ihre zentrale Tendenz miteinander vergleichen. Wie beim MWU müssen die Daten nicht normalverteilt sein, die Merkmalsverteilungen sollen lediglich formgleich sein (13, 106).

### **2.2.3.5. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert**

Die Sensitivität und Spezifität eines Antikörpers ist in der Diagnostik von Bedeutung. Die Sensitivität gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Test bei einer kranken Person mit einem positiven Ergebnis reagiert, während die Spezifität für die Wahrscheinlichkeit steht, mit der ein nicht erkrankter ein negatives Testergebnis hat. Die Sensitivität berechnet sich aus der Anzahl erkrankter Personen mit positivem Testergebnis, geteilt durch die Anzahl aller erkrankten Personen, also auch denjenigen, die ein negatives Testergebnis haben. Die Spezifität wiederum erhält man, wenn man die Anzahl der negativ getesteten Gesunden durch die Anzahl aller Gesunden teilt.

Für die tägliche Routine sind allerdings der positive und der negative prädiktive Wert (PPW und NPW) noch wichtiger. Aus dem PPW lässt sich die Wahrscheinlichkeit ablesen, bei der eine Person bei einem positiven Testergebnis auch wirklich erkrankt ist, während der NPW die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der eine Person mit negativem Testergebnis gesund ist. Der PPW berechnet sich aus der Anzahl der Kranken mit positivem Testergebnis durch die Anzahl aller positiv getesteten Personen, also auch den gesunden mit einem falsch positiven Ergebnis. Beim NPW wird die Anzahl der negativ getesteten Gesunden durch die Anzahl aller negativ getesteten geteilt (13, 106).

### 3. Ergebnisse

Zur immunhistochemischen Untersuchung von p63, pax8 und pVHL standen insgesamt 35 Ductus Bellini-, 25 Urothel- und 87 papilläre Nierenzellkarzinomfälle in Form von Paraffingewebe zur Verfügung, die darüber hinaus HE-gefärbt wurden. Während die pNZK als TMA vorlagen, wurden bei den UK und DBK die Tumorblöcke aus der Standarddiagnostik verwendet. Waren einzelne klinisch-pathologische Daten nicht zu ermitteln, so ist dies in den Tabellen mit „keine Angabe (k. A.)“ gekennzeichnet. Die Färbung wurde nach einem standardisierten Färbeprotokoll (siehe Anhang) an 4 Mikrometer dicken Paraffinschnitten durchgeführt.

#### 3.1. Immunhistochemie der Ductus Bellini-Karzinome

Tabelle 16. Ductus Bellini-Karzinomfälle mit Ergebnissen der Immunhistochemie

Laufende Nummer	Alter bei OP	Geschlecht	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	UICC-Grading	R-Status	p63-IRS	p63-Gruppe	pax8-IRS	pax8-Gruppe	pVHL-IRS	pVHL-Gruppe
dbk-01	72	♂	pT1	pN0	M1	3	R0	12	+++	0	-	8	+++
dbk-02	75	♂	pT1a	k. A.	M1	3	R0	0	-	2	+	12	+++
dbk-03	46	♂	pT1a	pN0	M0	2	R0	0	-	12	+++	8	+++
dbk-04	70	♀	pT1a	pN0	M1	3	R0	0	-	8	+++	12	+++
dbk-05	62	♂	pT1b	k. A.	k. A.	3	R0	0	-	4	++	8	+++
dbk-06	71	♂	pT1b	pN0	M1	3	R0	0	-	8	+++	8	+++
dbk-07	68	♂	pT1b	pN0	M1	3	R1	12	+++	0	-	12	+++
dbk-08	60	♂	pT2	k. A.	M1	3	R0	0	-	8	+++	12	+++
dbk-09	47	♂	pT2	k. A.	M1	4	R0	0	-	8	+++	8	+++
dbk-10	76	♂	pT2	pN0	M0	3	R0	0	-	12	+++	8	+++
dbk-11	69	♂	pT2	pN0	M0	4	R0	0	-	8	+++	4	++
dbk-12	81	♀	pT3a	k. A.	M1	3	R1	0	-	0	-	8	+++
dbk-13	68	♀	pT3a	pN0	M0	3	R0	12	+++	0	-	k. A.	k. A.
dbk-14	87	♀	pT3a	pN0	M0	3	R1	6	++	0	-	12	+++
dbk-15	70	♂	pT3a	pN0	M0	3	R0	0	-	8	+++	12	+++
dbk-16	73	♂	pT3a	pN0	M0	3	R0	4	++	8	+++	8	+++
dbk-17	52	♂	pT3a	pN0	M1	3	R0	0	-	8	+++	12	+++
dbk-18	52	♂	pT3a	pN0	M1	3	R0	0	-	8	+++	12	+++
dbk-19	71	♀	pT3a	pN1	M1	3	R2	0	-	8	+++	12	+++
dbk-20	56	♀	pT3a	pN1	M1	3	R1	0	-	12	+++	12	+++
dbk-21	65	♂	pT3a	pN1	M1	3	R1	0	-	8	+++	12	+++
dbk-22	58	♂	pT3a	pN1	M1	2	R0	0	-	8	+++	12	+++
dbk-23	70	♂	pT3a	pN1	M1	4	R0	0	-	3	+	12	+++
dbk-24	64	♂	pT3a	pN1	M1	3	R0	0	-	4	++	12	+++
dbk-25	48	♂	pT3a	pN2	M1	3	R0	12	+++	0	-	4	++
dbk-26	74	♂	pT3a	pN2	M1	3	R1	12	+++	0	-	8	+++
dbk-27	63	♀	pT3b	pN0	M1	3	R0	0	-	3	+	12	+++
dbk-28	68	♀	pT3b	pN0	M1	3	R1	4	++	0	-	8	+++
dbk-29	75	♀	pT3b	pN1	M1	3	R0	0	-	12	+++	12	+++
dbk-30	66	♂	pT3b	pN1	M1	3	R0	0	-	0	-	12	+++
dbk-31	64	♂	pT3b	pN2	M1	3	R0	12	+++	0	-	8	+++
dbk-32	65	♂	pT4	k. A.	k. A.	3	R1	8	+++	0	-	4	++
dbk-33	43	♂	pT4	pN0	M1	3	R0	0	-	8	+++	8	+++
dbk-34	71	♀	pT4	pN1	M1	4	R0	6	++	4	++	8	+++
dbk-35	52	♀	pT4	pN2	M1	3	R2	0	-	8	+++	8	+++

Die Tabelle zeigt die erhobenen klinisch-pathologischen Daten der DBK-Fälle und die zugehörigen Ergebnisse der Immunhistochemie. Neben dem Immunreaktiven Score wird die Einteilung der Ergebnisse in vier Subgruppen (negativ -/ schwach +, mäßig ++, stark positiv +++) dargestellt. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, N= Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1: Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten, N2: Lymphknotenmetastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten), M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer, R= Resektionsränder (R0: Tumor nicht randbildend am Resektat, R1: Tumor mikroskopisch randbildend, R2: Tumor makroskopisch randbildend), IRS: Immunreaktiver Score, Präfix p vor T- und N-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, k. A. = keine Angabe

Um einen besseren Überblick zu gewährleisten, sind im Folgenden die ermittelten Häufigkeiten der Immunhistochemie in graphischer Form dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse sowohl in der differenzierteren Auswertung mit den Gruppen „negativ, schwach/mäßig/stark positiv“ auf der linken Seite, als auch in der praktisch orientierteren Form auf der rechten Seite, wo die positiven Ergebnisse zu einer einzigen Gruppe zusammengefasst wurden (siehe auch Kap. 2.2.2.2.: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen).

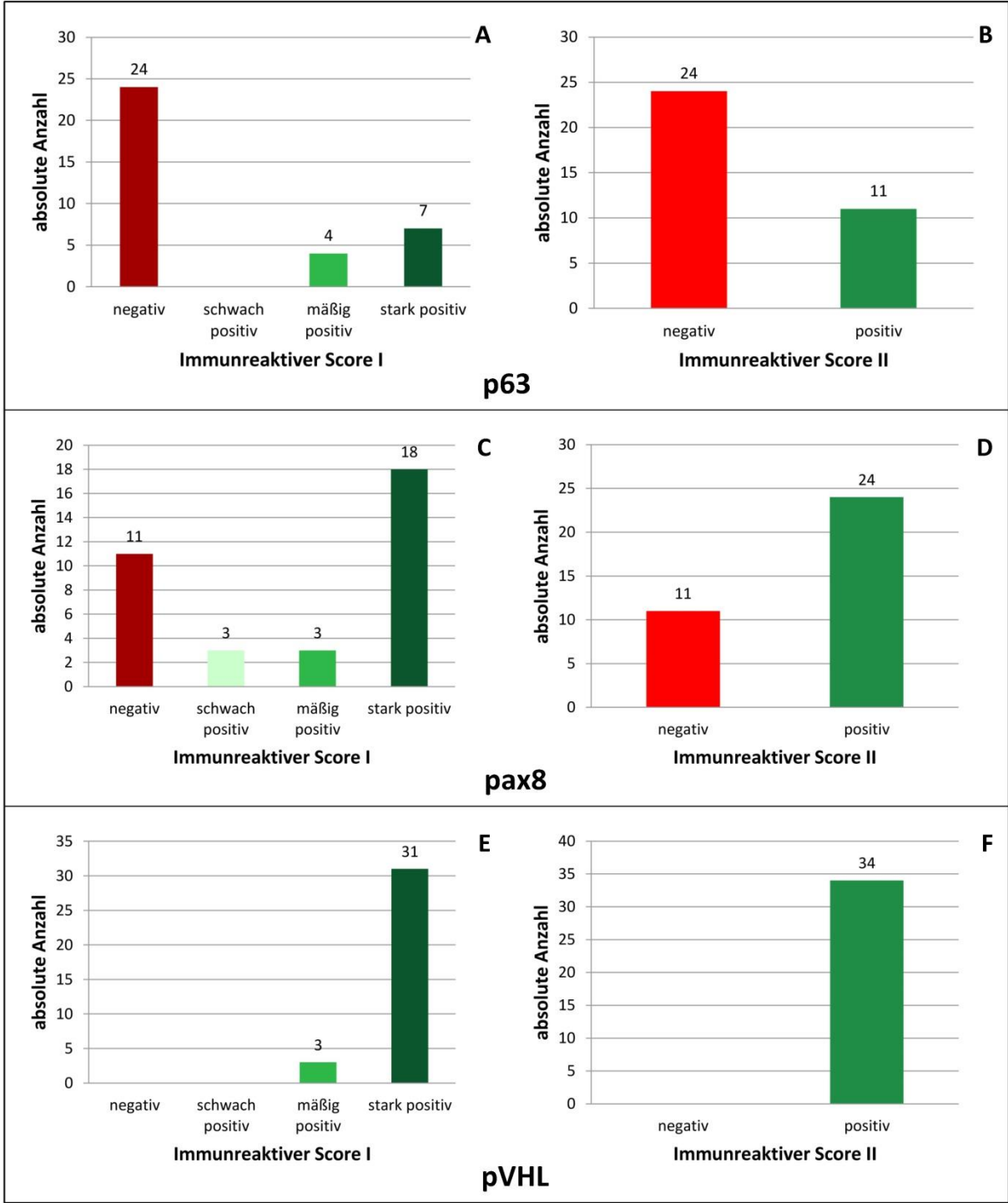


Abbildung 11. Überblick über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 35 Ductus Bellini-Karzinomen, Erläuterungen siehe nächste Seite

Die **Abbildungen A, C und E** zeigen jeweils die Ergebnisse der Immunhistochemie mit der Einteilung in vier Subgruppen (negativ (Rot) bzw. schwach, mäßig und stark positiv (Hell- bis Dunkelgrün)), während die **Abbildungen B, D und F** die Ergebnisse lediglich mit den Gruppen negativ (Rot) bzw. positiv (Grün) darstellen. **A und B:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Ductus Bellini-Karzinomen (DBK) mit dem Antikörper gegen p63 **C und D:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der DBK mit dem Antikörper gegen pax8 **E und F:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der DBK mit dem Antikörper gegen pVHL (ein fehlender Wert)

In der Immunhistochemie für p63 zeigten ca. 69% der Ductus Bellini-Karzinome keine Anfärbbarkeit von p63, jedoch waren etwa 11% mäßig bzw. 20% stark positiv. Anders verhielt sich die immunhistochemische Färbung von pax8: Insgesamt waren fast 69% der DBK positiv, davon über 51% stark und jeweils etwa 9% schwach bzw. mäßig positiv. Eindeutig war die Immunhistochemie der DBK für pVHL, wo alle Tumoren positiv waren. Davon waren über 91% stark positiv gefärbt.

### 3.1.1. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen und der klinisch-pathologischen Daten der DBK auf statistisch signifikante Korrelationen

Um Korrelationen zwischen den klinisch-pathologischen Daten und der Immunhistochemie zu überprüfen, wurden diese für die Variablen Geschlecht, T-, N- und M-Stadium in zwei Gruppen eingeteilt. Um auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu testen, wurde der U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Da sich der MWU-Test für stetige Merkmale eignet, wurde für die Ergebnisse der Immunhistochemie der Immunreaktive Score als Parameter benutzt. Aufgrund der sehr geringen Größe einiger Subgruppen wurde auf eine Unterteilung für den MWU-Test beim UICC-Grad verzichtet. Die Ergebnisse der Tests sind im Folgenden tabellarisch dargestellt.

**Tabelle 17. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der DBK, MWU-Tests**

	Gruppe A	Anzahl	Gruppe B	Anzahl	Gesamtanzahl (fehlende Angaben)	p-Wert für p63-IRS
<b>Geschlecht</b>	männlich	24	weiblich	11	35 (0)	p=0,948
<b>T-Stadium</b>	<pT3	11	≥pT3	24	35 (0)	p=0,425
<b>N-Stadium</b>	pN0	16	pN1/ pN2	13	29 (6)	p=0,939
<b>M-Stadium</b>	M0	7	M1	26	33 (2)	p=0,625
						<b>p-Wert für pax8-IRS</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	24	weiblich	11	35 (0)	p=0,908
<b>T-Stadium</b>	<pT3	11	≥pT3	24	35 (0)	p=0,262
<b>N-Stadium</b>	pN0	16	pN1/ pN2	13	29 (6)	p=0,804
<b>M-Stadium</b>	M0	7	M1	26	33 (2)	p=0,320
						<b>p-Wert für pVHL-IRS</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	24	weiblich	10	34 (1)	p=0,408
<b>T-Stadium</b>	<pT3	11	≥pT3	23	34 (1)	p=0,350
<b>N-Stadium</b>	pN0	15	pN1/ pN2	13	28 (7)	p=0,633
<b>M-Stadium</b>	M0	6	M1	26	32 (3)	p=0,275

Tabelle 17 zeigt die Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests (MWU) auf signifikante Korrelationen zwischen Geschlecht, UICC-Einteilungen und den IRS-Werten der DBK für die immunhistochemische Färbung von p63, pax8 und pVHL. Neben der Definition der Gruppen ist die Gruppengröße ersichtlich. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, N= Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1: Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten, N2: Lymphknotenmetastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten), M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), Präfix p vor T- und N-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, IRS: Immunreaktiver Score

Wie aus Tabelle 17 zu entnehmen ist, sind in keiner der untersuchten Subgruppen signifikante Unterschiede bezüglich des IRS-Werts zu finden.

Zur Untersuchung der UICC-Grade (Subgruppen: Grad 2, 3 und 4) wurde anstatt des MWU-Tests der Kruskal-Wallis-Test verwendet, allerdings waren hier keine signifikanten Unterschiede auszumachen und das Ergebnis ist nicht in tabellarischer Form dargestellt.

### 3.2. Immunhistochemie der Urothelkarzinome des oberen Harntrakts

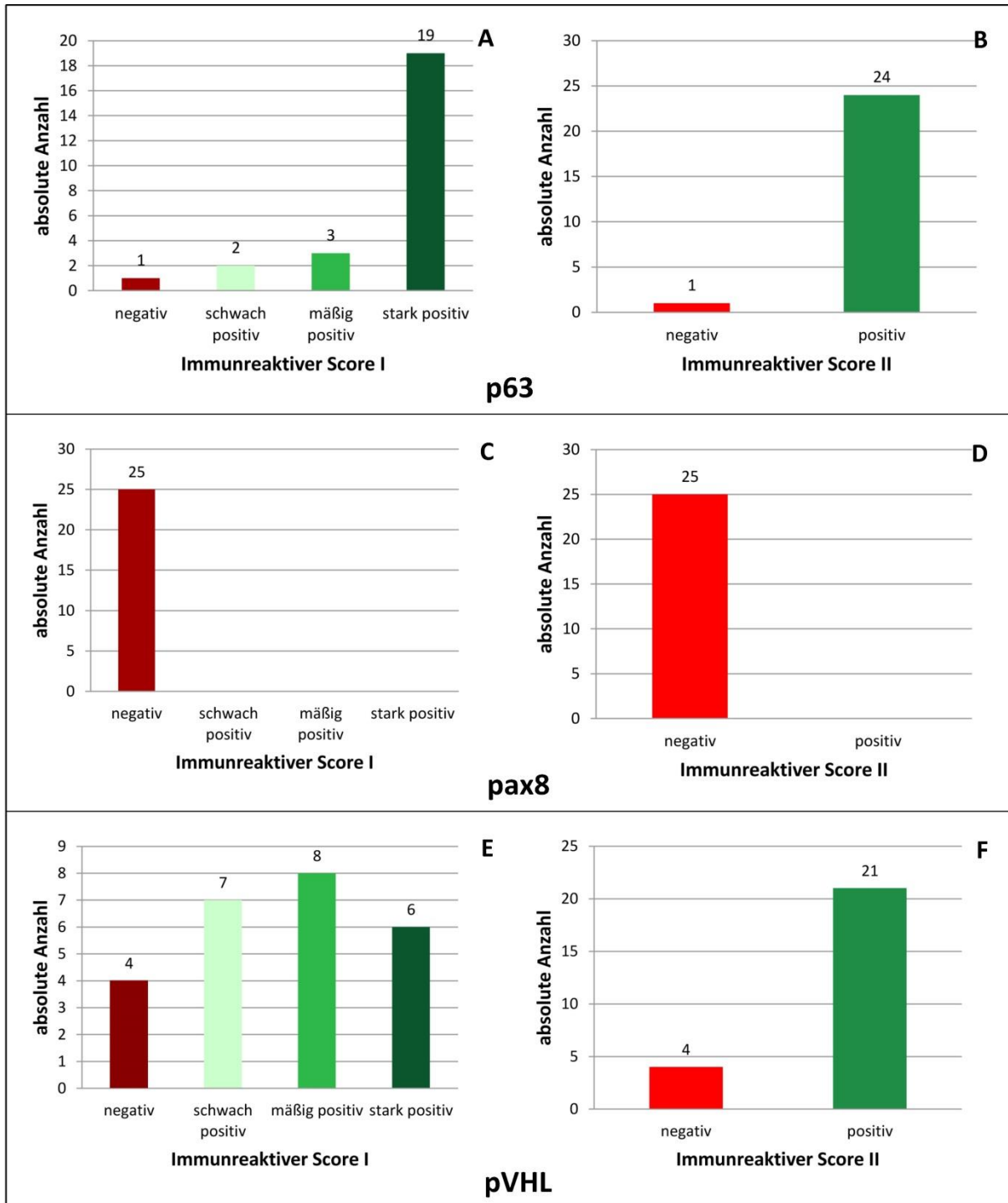
Tabelle 18. Urothelkarzinomfälle des oberen Harntrakts mit Ergebnissen der Immunhistochemie

Laufende Nummer	Lokalisation	Alter bei OP	Geschlecht	T-Stadium	UICC-Grading	R-Status	p63-IRS	p63-Gruppe	pax8-IRS	pax8-Gruppe	pVHL-IRS	pVHL-Gruppe
uk-01	NB	73	♂	pTa	2	k. A.	8	+++	0	-	6	++
uk-02	NB	77	♂	pTa	2	R0	12	+++	0	-	3	+
uk-03	NB	68	♀	pT1	2	R1	8	+++	0	-	6	++
uk-04	NB	78	♂	pT1	2	R0	8	+++	0	-	8	+++
uk-05	NB	64	♂	pT3	3	R0	2	+	0	-	4	++
uk-06	NB	80	♂	pT3	2	R0	6	++	0	-	4	++
uk-07	NB	82	♀	pT3	2	R0	8	+++	0	-	6	++
uk-08	NB	83	♀	pT3	2	R0	12	+++	0	-	0	-
uk-09	NB	81	♀	pT3	3	R0	1	-	0	-	4	++
uk-10	NB	72	♂	pT3	2	R0	6	++	0	-	12	+++
uk-11	NB	64	♀	pT3a	3	R0	8	+++	0	-	3	+
uk-12	NB	75	♀	pT4	2	R1	12	+++	0	-	3	+
uk-13	NB	70	♂	pT4	3	R0	8	+++	0	-	8	+++
uk-14	NB	69	♂	pT4	3	R0	6	++	0	-	1	-
uk-15	NB	51	♂	pT4	3	k. A.	8	+++	0	-	6	++
uk-16	HL	59	♂	pTa	2	R1	12	+++	0	-	3	+
uk-17	HL	80	♀	pTa	2	k. A.	8	+++	0	-	4	++
uk-18	HL	64	♂	pT1	2	R0	12	+++	1	-	8	+++
uk-19	HL	85	♂	pT2	2	R0	12	+++	0	-	0	-
uk-20	HL	80	♀	pT2	2	R0	12	+++	0	-	9	+++
uk-21	HL	81	♂	pT3	2	k. A.	8	+++	0	-	2	+
uk-22	HL	66	♂	pT3	2	R1	12	+++	0	-	8	+++
uk-23	HL	52	♂	pT3	2	R0	2	+	0	-	2	+
uk-24	HL	80	♂	pT3	3	k. A.	8	+++	0	-	3	+
uk-25	HL	73	♂	pT3	3	R0	9	+++	0	-	1	-

Die Tabelle zeigt die erhobenen klinisch-pathologischen Daten der UK-Fälle und die zugehörigen Ergebnisse der Immunhistochemie. Die Abkürzungen NB und HL stehen für Nierenbecken respektive Harnleiter. Neben dem Immunreaktiven Score wird die Einteilung der Ergebnisse in vier Subgruppen (negativ/ schwach, mäßig, stark positiv) dargestellt. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer, R= Resektionsränder (R0: Tumor nicht randbildend am Resektat, R1: Tumor mikroskopisch randbildend), IRS: Immunreaktiver Score, Präfix p vor T-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, k. A. = keine Angabe, pTa= papilläres, nichtinvasives Urothelkarzinom (siehe auch Tabelle 4, S. 19)



Wie bei den Fällen des Ductus Bellini-Karzinoms sind für die Urothelkarzinome im Folgenden ebenfalls die Häufigkeiten der Immunhistochemie in graphischer Form dargestellt.



**Abbildung 12. Überblick über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 25 Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts**

Die **Abbildungen A, C und E** zeigen jeweils die Ergebnisse der Immunhistochemie mit der Einteilung in vier Subgruppen (negativ (Rot) bzw. schwach, mäßig und stark positiv (Hell- bis Dunkelgrün)), während die **Abbildungen B, D und F** die Ergebnisse lediglich mit den Gruppen negativ (Rot) bzw. positiv (Grün) darstellen (siehe Kapitel 2.2.3.2., Auswertung der immunhisto-chemischen Färbungen). **A und B:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der Urothelkarzinomen (UK) mit dem Antikörper gegen p63 **C und D:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der UK mit dem Antikörper gegen pax8 **E und F:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der UK mit dem Antikörper gegen pVHL

In der immunhistochemischen Färbung von p63 war lediglich ein Urothelkarzinom negativ, wobei die positiv gefärbten Tumoren zum größten Teil stark positiv waren. Die IHC für pax8 war mit ausschließlich negativ gefärbten Karzinomen eindeutig, während die Färbung von pVHL ein heterogenes Ergebnis lieferte. Hier waren 16% der Urothelkarzinome negativ und die verschiedenen positiven Kategorien traten mit ähnlichen Häufigkeiten auf.

### 3.2.1. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen und der klinisch-pathologischen Daten der UK auf statistisch signifikante Korrelationen

Die Urothelkarzinome des oberen Harntrakts wurden auf signifikante Korrelationen zwischen den klinisch-pathologischen Daten und den immunhistochemischen Färbungen untersucht. Da sowohl UK des Nierenbeckens als auch des Harnleiters in der Gruppe vertreten waren, wurde zuerst mit dem MWU-Test überprüft, ob sich die beiden Subgruppen hinsichtlich ihrer IRS unterscheiden, was nicht der Fall war. Die Ergebnisse sind nicht explizit dargestellt. Somit wurden alle UK in einer Gruppe zusammengefasst. Da alle Tumoren in der pax8-Färbung negativ waren, wurde hier auf einen MWU-Test verzichtet.

**Tabelle 19. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der UK, MWU-Tests**

	Gruppe A	Anzahl	Gruppe B	Anzahl	Gesamtanzahl (fehlende Angaben)	p-Wert für p63-IRS
<b>Geschlecht</b>	männlich	17	weiblich	8	25 (0)	p=0,689
<b>T-Stadium</b>	<pT3	9	≥pT3	16	25 (0)	<b>p=0,028 Gruppe A&gt;B</b>
<b>UICC-Grad</b>	G2	17	G3	8	25 (0)	<b>p=0,057 Gruppe A&gt;B</b>
						<b>p-Wert für pVHL-IRS</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	17	weiblich	8	25 (0)	p=0,943
<b>T-Stadium</b>	<pT3	9	≥pT3	16	25 (0)	p=0,320
<b>UICC-Grad</b>	G2	17	G3	8	25 (0)	<b>p=0,465</b>

Tabelle 19 zeigt die Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests (MWU) auf signifikante Korrelationen zwischen Geschlecht, UICC-Einteilungen der UK und den IRS-Werten für die immunhistochemische Färbung von p63 und pVHL. Neben der Definition der Gruppen ist die Gruppengröße ersichtlich. p-Werte, die eine Signifikanz oder eine deutliche Tendenz zeigen, sind hervorgehoben. Zusätzlich ist in diesen Fällen dargestellt, in welcher Gruppe der IRS höhere Werte hat. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer, Präfix p vor T-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, IRS: Immunreaktiver Score

Somit ergeben sich signifikante Unterschiede bei der IHC für p63 in den Subgruppen des Tumorstadiums. In den höheren Tumorstadien ab pT3 sind die IRS-Werte signifikant niedriger als in den Stadien bis pT2 (p= 0,028). Ähnlich verhält es sich mit den UICC-Graden, allerdings wird keine statistische Signifikanz erreicht. Die besser differenzierten Tumoren mit Grad 2 zeigten tendenziell höhere IRS-Werte für p63 als die schlechter differenzierten Tumoren von Grad 3 (p= 0,057).

In der immunhistochemischen Färbung von pVHL zeigten sich in den Subgruppen der Urothelkarzinome keine signifikanten Unterschiede bezüglich des IRS-Werts.



### 3.3. Immunhistochemie der papillären Nierenzellkarzinome

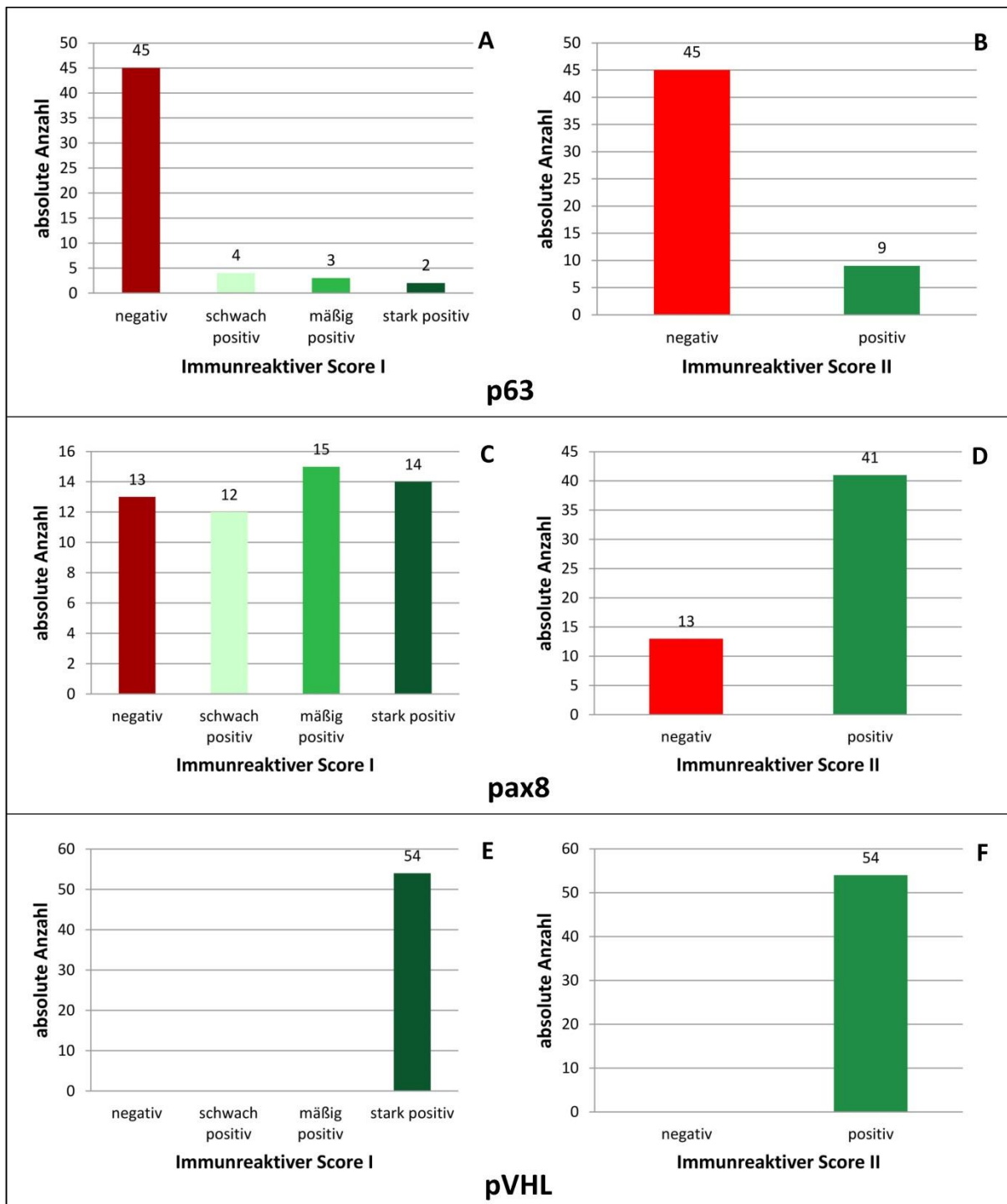
#### 3.3.1. Immunhistochemie der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 1

Tabelle 20. Fälle der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 1 mit Ergebnissen der Immunhistochemie

Laufende Nummer	Alter bei OP	Ge-schlecht	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	UICC-Grading	Fuhrman-Grading	p63-IRS	p63-Gruppe	pax8-IRS	pax8-Gruppe	pVHL-IRS	pVHL-Gruppe
pnzk-I-01	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	2	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-02	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	1	1	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-03	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	1	1	2	+	8	+++	12	+++
pnzk-I-04	66	♂	k. A.	k. A.	k. A.	1	1	4	++	8	+++	12	+++
pnzk-I-05	61	♂	pT1	k. A.	k. A.	2	2	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-06	37	♂	pT1	pN0	M0	1	1	2	+	8	+++	12	+++
pnzk-I-07	38	♂	pT1	pN0	M0	2	2	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-08	66	♂	pT1	pN0	M0	2	1	1	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-09	69	♂	pT1	pN0	M0	1	2	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-10	54	♂	pT1	pN0	M0	2	2	0	-	0	-	8	+++
pnzk-I-11	57	♂	pT1	pN0	M0	2	2	0	-	2	+	12	+++
pnzk-I-12	50	♂	pT1	pN0	M0	2	2	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-13	57	♂	pT1	pN0	M0	1	1	0	-	0	-	12	+++
pnzk-I-14	44	♂	pT1	pN0	M0	1	1	0	-	2	+	12	+++
pnzk-I-15	69	♂	pT1	pN0	M0	1	1	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-16	67	♂	pT1	pN0	M0	2	2	0	-	0	-	8	+++
pnzk-I-17	74	♂	pT1	pN0	M0	1	1	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-18	50	♂	pT1	pN0	M0	2	2	1	-	4	++	8	+++
pnzk-I-19	54	♂	pT1	pN0	M0	3	2	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-20	44	♂	pT1	pN0	M0	1	1	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-21	75	♂	pT1	pN0	M0	2	1	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-22	57	♂	pT1	pN0	M0	1	1	8	+++	0	-	12	+++
pnzk-I-23	66	♂	pT1	pN0	M0	1	1	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-24	63	♂	pT1	pN0	M0	2	1	8	+++	8	+++	12	+++
pnzk-I-25	68	♂	pT1	pN0	M0	2	1	0	-	4	++	8	+++
pnzk-I-26	55	♂	pT1	pN0	M0	1	2	0	-	0	-	12	+++
pnzk-I-27	45	♂	pT1	pN0	M0	1	2	0	-	4	++	8	+++
pnzk-I-28	73	♂	pT1	pN0	M0	1	2	4	++	4	++	12	+++
pnzk-I-29	26	♂	pT1	pN0	M0	1	1	2	+	8	+++	12	+++
pnzk-I-30	64	♂	pT1	pN0	M0	2	2	0	-	3	+	8	+++
pnzk-I-31	42	♂	pT1	pN0	M0	2	2	4	++	4	++	12	+++
pnzk-I-32	71	♂	pT1	pN0	M1	1	2	0	-	2	+	12	+++
pnzk-I-33	60	♂	pT2	k. A.	k. A.	1	1	0	-	0	-	12	+++
pnzk-I-34	69	♂	pT2	k. A.	M0	2	2	0	-	2	+	8	+++
pnzk-I-35	51	♂	pT2	k. A.	M1	2	2	0	-	0	-	12	+++
pnzk-I-36	46	♂	pT2	pN0	M0	2	2	1	-	3	+	12	+++
pnzk-I-37	60	♂	pT2	pN0	M0	2	2	0	-	0	-	12	+++
pnzk-I-38	54	♂	pT2	pN0	M0	2	2	0	-	2	+	12	+++
pnzk-I-39	55	♂	pT2	pN0	M0	2	2	0	-	2	+	8	+++
pnzk-I-40	64	♂	pT2	pN0	M0	2	2	0	-	0	-	12	+++
pnzk-I-41	70	♂	pT2	pN0	M0	2	2	1	-	2	+	8	+++
pnzk-I-42	55	♂	pT2	pN0	M0	1	1	0	-	0	-	8	+++
pnzk-I-43	69	♂	pT2	pN0	M0	2	2	0	-	2	+	8	+++
pnzk-I-44	63	♂	pT2	pN0	M0	1	1	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-45	68	♂	pT2	pN0	M0	2	2	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-46	66	♂	pT2	pN0	M0	2	1	1	-	4	++	12	+++
pnzk-I-47	62	♂	pT2	pN0	M0	2	2	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-I-48	70	♂	pT2	pN0	M0	2	1	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-49	62	♂	pT2	pN0	M0	2	2	1	-	2	+	8	+++
pnzk-I-50	74	♂	pT2	pN0	M0	2	2	3	+	0	-	8	+++
pnzk-I-51	54	♂	pT3	pN0	M0	1	2	0	-	4	++	12	+++
pnzk-I-52	38	♂	pT3	pN0	M0	2	2	1	-	0	-	12	+++
pnzk-I-53	79	♂	pT3	pN0	M0	2	2	0	-	0	-	12	+++
pnzk-I-54	46	♂	pT3	pN2	M1	2	2	0	-	2	+	8	+++

Die Tabelle zeigt die erhobenen klinisch-pathologischen Daten der pNZK-Fälle vom Typ 1 und die zugehörigen Ergebnisse der Immunhistochemie. Neben dem IRS wird die Einteilung der Ergebnisse in vier Subgruppen (negativ/ schwach, mäßig, stark positiv) dargestellt. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, N= Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1: Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten, N2: Lymphknotenmetastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten), M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer), IRS= Immunreaktiver Score, Präfix p vor T- und N-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, k. A. = keine Angabe

Um einen besseren Überblick zu gewährleisten, sind im Folgenden die ermittelten Häufigkeiten der Immunhistochemie in graphischer Form dargestellt.



**Abbildung 13. Überblick über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 54 papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 1**

Die **Abbildungen A, C und E** zeigen jeweils die Ergebnisse der Immunhistochemie mit der Einteilung in vier Subgruppen (negativ (Rot) bzw. schwach, mäßig und stark positiv (Hell- bis Dunkelgrün)), während die **Abbildungen B, D und F** die Ergebnisse lediglich mit den Gruppen negativ (Rot) bzw. positiv (Grün) darstellen (siehe Kapitel 2.2.3.2., Auswertung der immunhisto-chemischen Färbungen). **A und B:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 1 (pNZK Typ 1) mit dem Antikörper gegen p63 **C und D:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der pNZK Typ 1 mit dem Antikörper gegen pax8 **E und F:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der pNZK Typ 1 mit dem Antikörper gegen pVHL

Die Immunhistochemie für p63 war zu über 83% negativ, die positiven Fälle waren dabei eher schwach bis mäßig gefärbt. Ein heterogenes Bild bot die IHC für pax8: Hier traten alle Kategorien mit ähnlichen Häufigkeiten auf, wobei insgesamt ≈24 % der Fälle negativ waren. In der pVHL-IHC färbten sich alle Tumoren stark positiv.

### 3.3.1.1. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen und der klinisch-pathologischen Daten der pNZK Typ 1 auf statistisch signifikante Korrelationen

Analog zu den Ductus Bellini- und Urothelkarzinomen wurden auch die pNZK Typ 1 statistisch untersucht, um mögliche signifikante Korrelationen zwischen den klinisch-pathologischen und den experimentellen Daten zu finden. Als Tests wurden sowohl der MWU- als auch der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Letzterer wurde eingesetzt, wenn die Einteilung einer Variablen in lediglich zwei Subgruppen keine ausreichenden Fallzahlen ergab. Die Anzahl der Fälle in den einzelnen Untergruppen des N-Status und des UICC-Gradings waren so gering, dass ganz auf einen statistischen Test verzichtet wurde. Die Ergebnisse der Immunhistochemie wurden durch den IRS repräsentiert.

**Tabelle 21. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der pNZK Typ 1, MWU-Tests**

	Gruppe A	Anzahl	Gruppe B	Anzahl	Gesamtanzahl (fehlende Angaben)	p-Wert für p63-IRS
<b>Geschlecht</b>	männlich	41	weiblich	10	51 (3)	<i>p=0,084 Gruppe A&lt;B</i>
<b>M-Stadium</b>	M0	45	M1	3	48 (6)	<i>p=0,505</i>
<b>Fuhrman-Grad</b>	Grad 1	21	Grad 2	33	54 (0)	<i>p=0,198 Gruppe A&gt;B</i>
						<b>p-Wert für pax8-IRS</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	41	weiblich	10	51 (3)	<i>p=0,633</i>
<b>M-Stadium</b>	M0	45	M1	3	48 (6)	<i>p=0,191 Gruppe A&gt;B</i>
<b>Fuhrman-Grad</b>	Grad 1	21	Grad 2	33	54 (0)	<i>p=0,020 Gruppe A&gt;B</i>
						<b>p-Wert für pVHL-IRS</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	41	weiblich	10	51 (3)	<i>p=0,432</i>
<b>M-Stadium</b>	M0	45	M1	3	48 (6)	<i>p=1,000</i>
<b>Fuhrman-Grad</b>	Grad 1	21	Grad 2	33	54 (0)	<i>p=0,054 Gruppe A&gt;B</i>

Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests (MWU) auf signifikante Korrelationen zwischen Geschlecht, Metastasen-Status, Fuhrman-Grad und den IRS-Werten für die immunhistochemische Färbung von p63, pax8 und pVHL. Neben der Definition der Gruppen ist die Gruppengröße ersichtlich. p-Werte, die eine Signifikanz oder eine deutliche Tendenz zeigen, sind hervorgehoben. Zusätzlich ist in diesen Fällen dargestellt, in welcher Gruppe der IRS höhere Werte hat. **Abkürzungen:** M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), IRS: Immunreaktiver Score

Signifikante Unterschiede ergaben sich lediglich beim Fuhrman-Grad zwischen Grad 1 und 2 in der immunhistochemischen Färbung von pax8. Hier wurden in der Subgruppe von Grad 1 höhere immunreaktive Scores erreicht, als in der Gruppe von Grad 2 ( $p=0,02$ ). Deutliche Tendenzen für einen Unterschied ergaben sich bei folgenden Tests, ohne dass eine Signifikanz erreicht wurde: In der p63-IHC neigten Tumoren von weiblichen Patienten zu höheren IRS als die von männlichen ( $p=0,084$ ). In der pVHL-IHC waren die IRS in der Gruppe der Tumoren mit Fuhrman-Grad 1 eher höher als in der Gruppe mit Grad 2 ( $p=0,054$ ). Eine leichte Tendenz zu unterschiedlichen IRS zeigte sich in der p63-IHC zwischen der Gruppe mit Fuhrman-Grad 1 und der mit Grad 2. In der Grad 1-Gruppe waren die p63-

Scores etwas höher ( $p=0,198$ ). Ebenso hatten Tumoren ohne Fernmetastasen geringfügig höhere pax8-Scores, als die Patienten im M1-Stadium ( $p=0,191$ ).

**Tabelle 22. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der pNZK Typ 1, KW-Test**

	Gruppe A	Anzahl	Gruppe B	Anzahl	Gruppe C	Anzahl	Gesamtanzahl (fehlende Angaben)	p-Wert für p63-IRS
<b>T-Stadium</b>	pT1	28	pT2	18	pT3	4	50 (4)	$p=0,863$
								<b>p-Wert für pax8-IRS</b>
<b>T-Stadium</b>	pT1	28	pT2	18	pT3	4	50 (4)	$p=0,009$ Gruppe A>B>C
								<b>p-Wert für pVHL-IRS</b>
<b>T-Stadium</b>	pT1	28	pT2	18	pT3	4	50 (4)	$p=0,577$

Tabelle 22 zeigt den Kruskal-Wallis-Test (KW) auf signifikante Unterschiede bezüglich der IRS-Werte von p63, pax8 und pVHL zwischen den verschiedenen pT-Stadien der pNZK Typ 1-Tumoren. **Abkürzungen:** . T= Tumor-Stadium, IRS: Immunreaktiver Score

Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich, dass die IRS-Werte für pax8 in den verschiedenen pT-Stadien signifikant unterschiedlich sind: Mit steigendem Tumorstadium fallen die Werte des IRS ab ( $p=0,009$ ).

### 3.3.2. Immunhistochemie der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 2

**Tabelle 23. Fälle der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 2 mit Ergebnissen der Immunhistochemie**

Laufende Nummer	Alter bei OP	Ge- schlecht	T- Stadium	N- Stadium	M- Stadium	UICC- Grading	Fuhrman- Grading	p63- IRS	p63- Gruppe	pax8- IRS	pax8- Gruppe	pVHL- IRS	pVHL- Gruppe
pnzk-II-01	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-02	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-II-03	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	3	4	0	-	0	-	12	+++
pnzk-II-04	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3	0	-	0	-	8	+++
pnzk-II-05	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3	0	-	4	++	8	+++
pnzk-II-06	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	2	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-07	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	3	3	k. A.	k. A.	2	+	12	+++
pnzk-II-08	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	k. A.	3	3	0	-	0	-	12	+++
pnzk-II-09	66	♂	pT1	pN0	M0	2	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-10	81	♀	pT1	pN0	M0	2	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-11	66	♂	pT1	pN0	M0	3	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-12	69	♂	pT1	pN0	M0	2	3	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-II-13	66	♂	pT1	pN0	M0	3	3	0	-	0	-	12	+++
pnzk-II-14	60	♂	pT1	pN0	M0	2	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-15	67	♀	pT1	pN0	M0	2	3	0	-	0	-	8	+++
pnzk-II-16	53	♂	pT1	pN1	M0	2	3	0	-	3	+	4	++
pnzk-II-17	58	♂	pT1	pN2	M0	2	3	0	-	4	++	8	+++
pnzk-II-18	68	♂	pT2	k. A.	M0	2	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-19	73	♀	pT2	pN0	M0	3	3	0	-	0	-	12	+++
pnzk-II-20	77	♂	pT2	pN0	M0	2	3	0	-	8	+++	12	+++
pnzk-II-21	85	♂	pT2	pN0	M0	3	4	0	-	0	-	12	+++
pnzk-II-22	40	♂	pT2	pN0	M0	3	3	0	-	0	-	8	+++
pnzk-II-23	58	♂	pT2	pN2	M0	3	3	0	-	0	-	8	+++
pnzk-II-24	75	♂	pT3	pN0	k. A.	2	3	0	-	0	-	8	+++
pnzk-II-25	80	♀	pT3	pN0	M0	3	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-26	61	♂	pT3	pN0	M0	2	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-27	63	♂	pT3	pN0	M0	2	3	0	-	0	-	8	+++
pnzk-II-28	65	♂	pT3	pN0	M0	3	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-29	72	♂	pT3	pN0	M1	2	3	0	-	0	-	12	+++
pnzk-II-30	79	♀	pT3	pN0	M1	2	3	0	-	4	++	12	+++
pnzk-II-31	50	♂	pT3	pN1	k. A.	3	4	k. A.	k. A.	2	+	12	+++
pnzk-II-32	68	♂	pT3	pN1	M1	2	3	0	-	2	+	12	+++
pnzk-II-33	54	♀	pT3	pN2	M1	2	3	0	-	0	-	12	+++

Erläuterungen siehe nächste Seite

Die Tabelle zeigt die erhobenen klinisch-pathologischen Daten der pNZK-Fälle vom Typ 2 und die zugehörigen Ergebnisse der Immunhistochemie. Neben dem Immunreaktiven Score wird die Einteilung der Ergebnisse in vier Subgruppen (negativ/schwach, mäßig, stark positiv) dargestellt. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, N= Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1: Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten, N2: Lymphknotenmetastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten), M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer), IRS: Immunreaktiver Score, Präfix p vor T- und N-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, k. A. = keine Angabe

Um einen besseren Überblick zu gewährleisten, sind im Folgenden die ermittelten Häufigkeiten der Immunhistochemie in graphischer Form dargestellt.

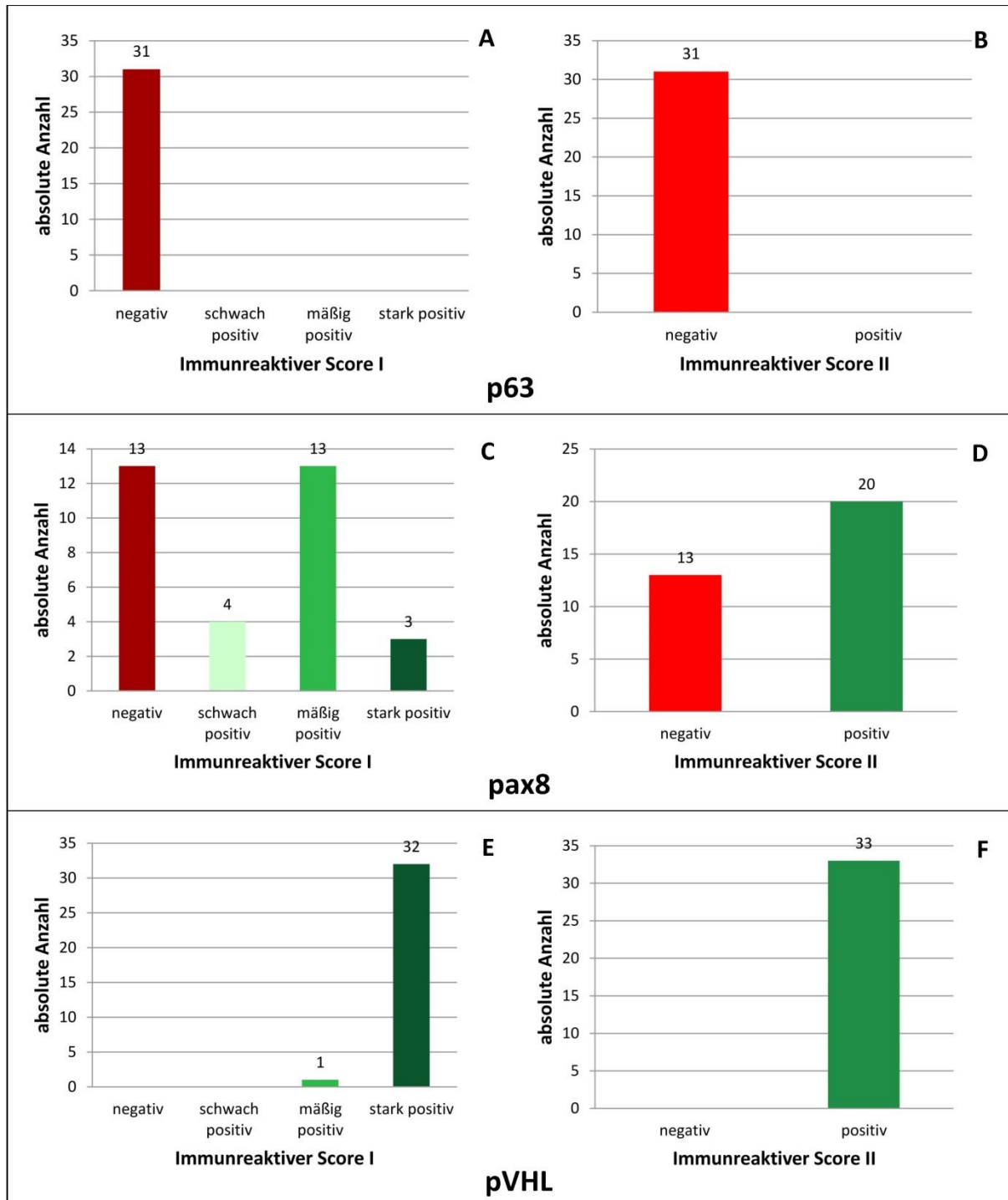


Abbildung 14. Überblick über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an insgesamt 33 papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 2, Erläuterungen siehe nächste Seite

Die **Abbildungen A, C und E** zeigen jeweils die Ergebnisse der Immunhistochemie mit der Einteilung in vier Subgruppen (negativ (Rot) bzw. schwach, mäßig und stark positiv (Hell- bis Dunkelgrün)), während die **Abbildungen B, D und F** die Ergebnisse lediglich mit den Gruppen negativ (Rot) bzw. positiv (Grün) darstellen (siehe Kapitel 2.2.3.2., Auswertung der immunhistochemischen Färbungen). **A und B:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 2 (pNZK Typ 2) mit dem Antikörper gegen p63 (zwei fehlende Werte) **C und D:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der pNZK Typ 2 mit dem Antikörper gegen pax8 **E und F:** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung der pNZK Typ 2 mit dem Antikörper gegen pVHL

Alle pNZK vom Typ 2 waren negativ in der IHC für p63 (zwei fehlende Werte). In der immunhistochemischen Färbung von pax8 zeigte sich ein gemischtes Bild, wobei insgesamt ≈39 % der Fälle negativ waren, aber ebenso viele mäßig positiv. Die Färbung für pVHL war zu fast 97% stark positiv, negative Resultate traten nicht auf.

### 3.3.2.1. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen und der klinisch-pathologischen Daten der pNZK Typ 2 auf statistisch signifikante Korrelationen

Wie bei den anderen Karzinomarten erfolgte auch bei den pNZK Typ 2 eine Untersuchung auf statistisch signifikante Korrelationen zwischen den klinisch-pathologischen und den experimentellen Daten, letztere repräsentiert durch den IRS. Es wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Da kein pNZK Typ 2 eine Färbung von p63 zeigte, wurde diese IHC nicht untersucht.

**Tabelle 24. Immunreaktiver Score und klinisch-pathologische Daten der pNZK Typ 2, MWU-Tests**

	Gruppe A	Anzahl	Gruppe B	Anzahl	Gesamtanzahl (fehlende Angaben)	p-Wert für pax8-IRS
<b>Geschlecht</b>	männlich	19	weiblich	6	25 (8)	p=0,791
<b>T-Stadium</b>	<pT3	15	≥pT3	10	25 (8)	p=0,503
<b>N-Stadium</b>	pN0	18	pN1/pN2	6	24 (9)	p=0,491
<b>M-Stadium</b>	M0	19	M1	4	23 (10)	p=0,384
<b>Fuhrman-Grad</b>	Grad 3	30	Grad 4	3	33 (0)	p=0,155 Gruppe A>B
<b>UICC-Grad</b>	G2	21	G3	12	33 (0)	p=0,034 Gruppe A>B
						<b>p-Wert für pVHL-IRS</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	19	weiblich	6	25 (8)	p=0,589
<b>T-Stadium</b>	<pT3	15	≥pT3	10	25 (8)	p=0,579
<b>N-Stadium</b>	pN0	18	pN1/pN2	6	24 (9)	p=0,206
<b>M-Stadium</b>	M0	19	M1	4	23 (10)	p=0,386
<b>Fuhrman-Grad</b>	Grad 3	30	Grad 4	3	33 (0)	p=0,545
<b>UICC-Grad</b>	G2	21	G3	12	33 (0)	p=0,385

Tabelle 24 zeigt die Ergebnisse der Mann-Whitney-U-Tests (MWU) auf signifikante Korrelationen zwischen Geschlecht, T-Stadium, Lymphknoten- und Metastasen-Status, Fuhrman- und UICC-Grad und den IRS-Werten für die immunhistochemische Färbung von p63, pax8 und pVHL. Neben der Definition der Gruppen ist die Gruppengröße ersichtlich. p-Werte, die eine Signifikanz oder eine deutliche Tendenz zeigen, sind hervorgehoben. Zusätzlich ist in diesen Fällen dargestellt, in welcher Gruppe der IRS höhere Werte hat. **Abkürzungen:** T= Tumor-Stadium, N= Lymphknotenmetastasen (N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1: Lymphknotenmetastasen in einem regionären Lymphknoten, N2: Lymphknotenmetastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten), M= Metastasierung (M0: keine Fernmetastasen, M1: Fernmetastasierung), UICC-Grading= histopathologisches Grading nach der Union internationale contre le cancer, Präfix p vor T- und N-Stadium= Einteilung nach histopathologischer Untersuchung, IRS: Immunreaktiver Score

Signifikante Unterschiede zwischen den Subgruppen bezüglich des IRS ergaben sich lediglich beim UICC-Grad in der pax8-Färbung. Schlechter differenzierte Tumoren vom UICC-Grad 3 hatten signifikant geringere IRS-Werte als die besser differenzierten vom Grad 2 (p= 0,034). Ähnlich verhielten sich die IRS-Werte in Bezug auf die Fuhrman-Grade, allerdings waren hier die Unterschiede nicht signifikant, sondern zeigten lediglich eine Tendenz (p=0,155).

### 3.4. Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorentitäten

Um mögliche signifikante Unterschiede in den IRS-Werten zwischen den einzelnen Tumorentitäten zu finden, wurden diese mit verschiedenen statistischen Tests untersucht: Zum einem mit dem Chi<sup>2</sup>-Test nach Pearson und mit dem exakten Test nach Fisher. Letzterer wurde verwendet, wenn mindestens eine Zelle eine erwartete Häufigkeit von weniger als fünf hatte. Da eine Unterteilung der Ergebnisse der IHC in vier Subgruppen (negativ/ schwach, mäßig und stark positiv) für praktische Zwecke wie die Diagnostik wenig geeignet scheint, erfolgte lediglich eine Unterteilung in positiv und negativ. In der Gruppe der positiven IHC-Ergebnisse waren somit schwach, mäßig und stark angefärbte Tumoren zusammengefasst. In Tabellenform sind nur signifikante Ergebnisse dargestellt, die weiteren Tests sind im Text erläutert.

**Tabelle 25. Immunhistochemie DBK/UK: Chi<sup>2</sup>- und exakter Fisher-Test**

			p63		Gesamt (fehlende Werte)
			p63 -	p63 +	
Karzinomart	DBK	Anzahl	24	11	35 (0)
		%	68,6%	31,4%	100%
	UK	Anzahl	1	24	25 (0)
		%	4,0%	96,0%	100%
Gesamt		Anzahl	25	35	60 (0)
<i>Chi-Quadrat Test nach Pearson: p&lt;0,001</i>					
			pax8		Gesamt (fehlende Werte)
			pax8 -	pax8 +	
Karzinomart	DBK	Anzahl	11	24	35 (0)
		%	31,4%	68,6%	100%
	UK	Anzahl	25	0	25 (0)
		%	100%	0%	100%
Gesamt		Anzahl	36	24	60 (0)
<i>Chi-Quadrat Test nach Pearson: p&lt;0,001</i>					
			pVHL		Gesamt (fehlende Werte)
			pVHL -	pVHL +	
Karzinomart	DBK	Anzahl	0	34	34 (1)
		%	0%	100%	100%
	UK	Anzahl	4	21	25 (0)
		%	16,0%	84,0%	100%
Gesamt		Anzahl	4	55	59 (1)
<i>Exakter Test nach Fisher: p=0,028</i>					

Tabelle 25 zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie mit den Gruppen positiv und negativ für Ductus Bellini-Karzinom (DBK) und Urothelkarzinom (UK) sowie deren statistische Untersuchung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test für die Färbungen von p63 und pax8, bzw. dem exakten Fisher-Test für pVHL. Die ermittelten p-Werte sind unterhalb der jeweiligen Kreuztabelle dargestellt.

**Tabelle 26. Immunhistochemie DBK/pNZK Typ 2: Chi<sup>2</sup>-Test**

			p63		Gesamt (fehlende Werte)
			p63 -	p63 +	
Karzinomart	DBK	Anzahl	24	11	35 (0)
		%	68,6%	31,4%	100%
	pNZK Typ 2	Anzahl	31	0	31 (2)
		%	100%	0%	100%
Gesamt		Anzahl	55	11	66 (2)

*Chi-Quadrat Test nach Pearson: p<0,001*

Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie mit den Gruppen positiv und negativ für Ductus Bellini-Karzinome (DBK) und papilläre Nierenzellkarzinome Typ 2 (pNZK Typ 2) sowie deren statistische Untersuchung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test für die Färbung von p63. Die ermittelten p-Werte sind unterhalb der jeweiligen Kreuztabelle dargestellt.

Wie aus Tabelle 25 ersichtlich, unterscheiden sich Ductus Bellini- und Urothelkarzinome in allen 3 Färbungen signifikant. DBK sind in ca. 69% der Fälle negativ für p63, UK zu weit über 90% positiv, wodurch im Chi<sup>2</sup>-Test ein hochsignifikanter Unterschied mit einem p-Wert von <0,001 entsteht. Umgekehrt sind die Verhältnisse für pax8: Während alle UK in der Färbung negativ sind, zeigen knapp 69% der Ductus Bellini-Karzinome eine positive Färbung (p< 0,001 im Chi<sup>2</sup>-Test). Die Unterschiede in der IHC von pVHL sind nicht so deutlich wie in den beiden anderen Fällen, aber dennoch signifikant: Während alle DBK positiv für pVHL sind, zeigen von den Urothelkarzinomen lediglich 84% eine positive IHC. Somit ergibt sich für den exakten Test nach Fisher ein p-Wert von 0,028.

Ein weiterer signifikanter Unterschied in der p63-IHC ist zwischen den Ductus Bellini- und den papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 2 auszumachen, wo alle pNZK Typ 2 negativ für p63 sind, von den DBK aber lediglich ca. 69% (p< 0,001 im Chi<sup>2</sup>-Test).

Die IHC der Ductus Bellini- und der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 1 weist in keiner Färbung signifikante Unterschiede auf, ebenso nicht die Färbungen von pax8 und pVHL im Vergleich von DBK und pNZK Typ 2, weshalb diese Ergebnisse nicht dargestellt sind.

**Tabelle 27. Immunhistochemie UK/pNZK Typ 1: Chi<sup>2</sup>- und exakter Fisher-Test**

			p63		Gesamt (fehlende Werte)
			p63 -	p63 +	
Karzinomart	UK	Anzahl	1	24	25 (0)
		%	4,0%	96,0%	100%
	pNZK Typ 1	Anzahl	45	9	54 (0)
		%	83,3%	16,7%	100%
Gesamt		Anzahl	46	33	79 (0)

*Chi-Quadrat Test nach Pearson: p<0,001*

			pax8		Gesamt (fehlende Werte)
			pax8 -	pax8 +	
Karzinomart	UK	Anzahl	25	0	25 (0)
		%	100%	0%	100%
	pNZK Typ 1	Anzahl	13	41	54 (0)
		%	24,1%	75,9%	100%
Gesamt		Anzahl	38	41	79 (0)

*Chi-Quadrat Test nach Pearson: p<0,001*

Tabelle 27, Teil A



			pVHL		Gesamt (fehlende Werte)
			pVHL -	pVHL +	
Karzinomart	UK	Anzahl	4	21	25 (0)
		%	16,0%	84,0%	100%
	pNZK Typ 1	Anzahl	0	54	54 (0)
		%	0%	100%	100%
Gesamt		Anzahl	4	75	79 (0)

Exakter Test nach Fisher:  $p=0,008$

Tabelle 27, Teil B- Tabelle 26 zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie mit den Gruppen positiv und negativ für Urothelkarzinome (UK) und papilläre Nierenzellkarzinome Typ 1 (pNZK Typ 1) sowie deren statistische Untersuchung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test für die Färbungen von p63 und pax8 und mit dem exakten Test nach Fisher für pVHL. Die ermittelten p-Werte sind unterhalb der jeweiligen Kreuztabelle dargestellt.

Die UK und die pNZK vom Typ 1 unterscheiden sich in allen drei verschiedenen immunhistochemischen Färbungen hochsignifikant voneinander. Während bei den UK fast alle Tumoren p63-positiv sind (96%), zeigen lediglich etwa 17% der pNZK Typ 1 eine positive p63-IHC, wodurch sich ein p-Wert von  $<0,001$  im Chi<sup>2</sup>-Test ergibt. In der pax8-Färbung sind alle UK negativ, wohingegen etwa 76% der pNZK Typ 1 positiv sind. Somit zeigt auch hier der Chi<sup>2</sup>-Test einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ). Signifikant weichen auch die pVHL-Werte zwischen den beiden Tumorentitäten voneinander ab: Bei den pNZK Typ 1 gibt es keine pVHL-negativen Fälle, während im Falle der UK 16% der Tumoren negativ sind ( $p = 0,008$  im exakten Fisher-Test).

**Tabelle 28. Immunhistochemie UK/pNZK Typ 2: Chi<sup>2</sup>- und exakter Fisher-Test**

			p63		Gesamt (fehlende Werte)
			p63 -	p63 +	
Karzinomart	UK	Anzahl	1	24	25 (0)
		%	4,0%	96,0%	100%
	pNZK Typ 2	Anzahl	31	0	31 (2)
		%	100%	0%	100%
Gesamt		Anzahl	32	24	56 (2)

Chi-Quadrat Test nach Pearson:  $p < 0,001$

			pax8		Gesamt (fehlende Werte)
			pax8 -	pax8 +	
Karzinomart	UK	Anzahl	25	0	25 (0)
		%	100%	0%	100%
	pNZK Typ 2	Anzahl	13	20	33 (0)
		%	39,4%	60,6%	100%
Gesamt		Anzahl	38	20	58 (0)

Chi-Quadrat Test nach Pearson:  $p < 0,001$

			pVHL		Gesamt (fehlende Werte)
			pVHL -	pVHL +	
Karzinomart	UK	Anzahl	4	21	25 (0)
		%	16,0%	84,0%	100%
	pNZK Typ 2	Anzahl	0	33	33 (0)
		%	0%	100%	100%
Gesamt		Anzahl	4	54	58 (0)

Exakter Test nach Fisher:  $p=0,030$

Tabelle 28 zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie mit den Gruppen positiv und negativ für Urothelkarzinome (UK) und papillären Nierenzellkarzinomen Typ 1 (pNZK Typ 1) sowie deren statistische Untersuchung mit dem Chi<sup>2</sup>-Test für die Färbungen von p63 und pax8 und mit dem exakten Test nach Fisher für pVHL. Die ermittelten p-Werte sind unterhalb der jeweiligen Kreuztabelle dargestellt.

Analog zu den pNZK Typ 1 unterscheiden sich auch die Typ 2-pNZK in allen drei immunhistochemischen Färbungen signifikant von den UK. Fast alle UK sind p63-positiv (96%), wohingegen alle pNZK Typ 2 p63-negativ sind, sodass sich ein p-Wert von  $<0,001$  im  $\chi^2$ -Test ergibt. Anders stellt sich die pax8-IHC dar: Hier sind alle UK pax8-negativ, bei den pNZK Typ 2 sind es ungefähr 39% ( $p < 0,001$  im  $\chi^2$ -Test). Alle pNZK Typ 2 sind pVHL-positiv, bei den UK sind es 84%. Obwohl dieser Unterschied im Vergleich zur pax8- und p63-IHC geringer ist, führt er trotzdem zu einem p-Wert von 0,030 im exakten Test nach Fisher.

**Tabelle 29. Immunhistochemie pNZK Typ 1/Typ 2: exakter Fisher-Test**

			p63		Gesamt (fehlende Werte)
			p63 -	p63 +	
Karzinomart	pNZK Typ 1	Anzahl	45	9	54 (0)
		%	83,3%	16,7%	100%
	pNZK Typ 2	Anzahl	31	0	31 (2)
		%	100%	0%	100%
Gesamt		Anzahl	76	9	85 (2)

*Exakter Test nach Fisher:  $p=0,023$*

*Tabelle 29 zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie mit den Gruppen positiv und negativ für die beiden Typen des papillären Nierenzellkarzinoms (pNZK) Typen sowie deren statistische Untersuchung mit dem exakten Test nach Fisher für pVHL. Der ermittelte p-Wert ist unterhalb der Kreuztabelle dargestellt.*

Wie Tabelle 29 zeigt, sind die beiden Subtypen des papillären Nierenzellkarzinoms in der p63-IHC signifikant unterschiedlich: Alle pNZK Typ 2 sind p63-negativ, wohingegen bei den Typ 1-Karzinomen immerhin knapp 17% positiv sind. Somit errechnet sich im exakten Fisher-Test ein p-Wert von 0,023. Nicht dargestellt sind Tests der immunhistochemischen Färbungen von pax8 und pVHL, da sich hier die Subtypen des pNZK nicht signifikant unterscheiden.

### **3.5. Sensitivität, Spezifität, positiver und negativ prädiktiver Wert der einzelnen Antikörper für die Diagnostik und Differentialdiagnostik der verschiedenen Karzinome**

Wie in Kapitel 2.2.3.5. erläutert, sind Sensitivität und Spezifität sowie PPW und NPW in der Diagnostik von wichtiger Bedeutung. Interessant sind in diesem Zusammenhang vor allem PPW und NPW, da sie angeben, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Person mit einem positiven Testergebnis auch wirklich krank bzw. bei einem negativen Testergebnis tatsächlich gesund ist. Da die feinere Unterteilung der positiven Immunhistochemie in schwach, mäßig und stark positiv für die tägliche Praxis wenig sinnvoll erscheint, wurden diese Kategorien zu einer einzigen zusammengefasst. So unterteilen sich die Ergebnisse der IHC in die Gruppen negative und positive IHC.

Da in dieser Arbeit die Antikörper nicht im Vergleich zu gesunden Geweben, sondern zu anderen Tumoren untersucht wurden, ergeben sich einige Besonderheiten. Bei der Berechnung der Sensitivität eines Antikörpers in der Diagnostik der einzelnen Karzinome wurde die häufigere Kategorie als das richtige Testergebnis gewertet. Beispielsweise zeigen alle Ductus Bellini-Karzinome

eine positive Immunhistochemie für pVHL, eine positive pVHL-Färbung wurde also als richtig positives Testergebnis definiert. Anders verhält es sich aber etwa bei den UK, wo alle Fälle eine negative IHC für pax8 aufweisen, wodurch eine pax8-negative IHC als richtig positives Ergebnis definiert wurde. Die Spezifität, der PPW und der NPW lassen sich bei den durchgeführten Untersuchungen nur im Vergleich mit den anderen Karzinomarten und nicht mit einem gesunden Menschen berechnen. Die verglichene Karzinomart ist jeweils in der Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 30. Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW von p63, pax8 und pVHL in der Differentialdiagnose von Ductus Bellini-Karzinomen**

Untersuchtes Karzinom	Antikörper	charakteristische Färbung	Sensitivität	Differentialdiagnose: DBK vs.	Spezifität	PPW	NPW
DBK	p63	negative IHC	68,6%	UK	96,0%	96,0%	68,6%
				pNZK Typ 1	16,7%	34,8%	45,0%
				pNZK Typ 2	0,0%	43,6%	0,0%
				UK, pNZK Typ 1 und 2	30,0%	23,8%	75,0%
				pNZK Typ 1 und 2	10,6%	24,0%	45,0%
DBK	pax8	positive IHC	68,6%	UK	100,0%	100,0%	69,4%
				pNZK Typ 1	24,1%	36,9%	54,2%
				pNZK Typ 2	39,4%	54,5%	54,2%
				UK, pNZK Typ 1 und 2	45,5%	28,2%	82,3%
				pNZK Typ 1 und 2	29,9%	28,2%	70,3%
DBK	pVHL	positive IHC	100,0%	UK	16,0%	61,8%	100,0%
				pNZK Typ 1	0,0%	38,6%	-
				pNZK Typ 2	0,0%	50,7%	-
				UK, pNZK Typ 1 und 2	3,6%	23,9%	100,0%
				pNZK Typ 1 und 2	0,0%	28,1%	-

**Tabelle 31. Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW von p63, pax8 und pVHL in der Differentialdiagnose von Urothelkarzinomen**

Untersuchtes Karzinom	Antikörper	charakteristische Färbung	Sensitivität	Differentialdiagnose: UK vs.	Spezifität	PPW	NPW
UK	p63	positive IHC	96,0%	DBK	68,6%	68,6%	96,0%
				pNZK Typ 1	83,3%	72,7%	97,8%
				pNZK Typ 2	100,0%	100,0%	96,9%
				DBK, pNZK Typ 1 und 2	83,3%	54,5%	99,0%
				pNZK Typ 1 und 2	89,4%	72,7%	98,7%
UK	pax8	negative IHC	100,0%	DBK	68,6%	69,4%	100,0%
				pNZK Typ 1	75,9%	65,8%	100,0%
				pNZK Typ 2	60,6%	65,8%	100,0%
				DBK, pNZK Typ 1 und 2	69,7%	40,3%	100,0%
				pNZK Typ 1 und 2	70,1%	49,0%	100,0%
UK	pVHL	positive IHC	84,0%	DBK	0,0%	38,2%	0,0%
				pNZK Typ 1	0,0%	28,0%	0,0%
				pNZK Typ 2	0,0%	38,9%	0,0%
				DBK, pNZK Typ 1 und 2	0,0%	14,8%	0,0%
				pNZK Typ 1 und 2	0,0%	19,4%	0,0%

**Tabelle 32. Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW von p63, pax8 und pVHL in der Differentialdiagnose von papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 1**

Untersuchtes Karzinom	Antikörper	charakteristische Färbung	Sensitivität	Differentialdiagnose: pNZK Typ1 vs.	Spezifität	PPW	NPW
pNZK Typ 1	p63	negative IHC	83,3%	DBK	31,4%	65,2%	55,0%
				UK	96,0%	97,8%	72,7%
				pNZK Typ 2	0,0%	59,2%	0,0%
				DBK, UK und pNZK Typ 2	38,5%	44,6%	79,5%
				DBK und pNZK Typ 2	16,7%	45,0%	55,0%
pNZK Typ 1	pax8	positive IHC	75,9%	DBK	31,4%	63,1%	45,8%
				UK	100,0%	100,0%	65,8%
				pNZK Typ 2	39,4%	67,2%	50,0%
				DBK, UK und pNZK Typ 2	52,7%	48,2%	79,0%
				DBK und pNZK Typ 2	35,3%	48,2%	64,9%
pNZK Typ 1	pVHL	positive IHC	100,0%	DBK	0,0%	61,4%	-
				UK	16,0%	72,0%	100,0%
				pNZK Typ 2	0,0%	62,1%	-
				DBK, UK und pNZK Typ 2	4,3%	38,0%	100,0%
				DBK und pNZK Typ 2	0,0%	44,6%	-

**Tabelle 33. Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW von p63, pax8 und pVHL in der Differentialdiagnose von papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 2**

Untersuchtes Karzinom	Antikörper	charakteristische Färbung	Sensitivität	Differentialdiagnose: pNZK Typ 2 vs.	Spezifität	PPW	NPW
pNZK Typ 2	p63	negative IHC	100,0%	DBK	31,4%	56,4%	100,0%
				UK	96,0%	96,9%	100,0%
				pNZK Typ 1	16,7%	40,8%	100,0%
				DBK, UK und pNZK Typ 1	38,6%	30,7%	100,0%
				DBK und pNZK Typ 1	22,5%	31,0%	100,0%
pNZK Typ 2	pax8	positive IHC	60,6%	DBK	31,4%	45,5%	45,8%
				UK	100,0%	100,0%	65,8%
				pNZK Typ 1	24,1%	32,8%	50,0%
				DBK, UK und pNZK Typ 1	43,0%	23,5%	79,0%
				DBK und pNZK Typ 1	27,0%	23,5%	64,9%
pNZK Typ 2	pVHL	positive IHC	100,0%	DBK	0,0%	49,3%	-
				UK	16,0%	61,1%	100,0%
				pNZK Typ 1	0,0%	37,9%	-
				DBK, UK und pNZK Typ 1	3,5%	23,2%	100,0%
				DBK und pNZK Typ 1	0,0%	27,3%	-

Die Tabellen 30-33 zeigen die Sensitivitäten, Spezifitäten, PPW und NPW der untersuchten Antikörper für die verschiedenen Tumorentitäten. In der dritten Spalte ist jeweils die häufigste Ausprägung der Färbung angegeben die als positives Testergebnis für das jeweilige Karzinom gewertet und mit der auch die Sensitivität errechnet wurde. In der Spalte „Differentialdiagnose“ lässt sich ablesen, mit welcher Tumorart bzw. welchen Tumorarten das Karzinom in der Berechnung der Werte verglichen wurde. Bei den fehlenden Angaben in den Tabellen („-“) war eine Berechnung der Werte nicht möglich. Abkürzungen: IHC= Immunhistochemie, DBK= Ductus Bellini-Karzinom, UK= Urothelkarzinom, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom, PPW= positiver prädiktiver Wert, NPW= negativer prädiktiver Wert

Die Aussagekraft und Bedeutung der errechneten Werte für die Sensitivität und Spezifität sowie für die prädiktiven Werte werden im Rahmen der Diskussion (Kapitel 4.) erörtert.

## 4. Diskussion

Karzinome der zentralen Nierenregion und des Nierenbeckens stellen besondere Herausforderungen an die Diagnostik, da sich aus der richtigen Diagnose relevante Konsequenzen für die Therapie und Prognose des Patienten ergeben. Wichtige Differentialdiagnosen sind unter anderem das Ductus Bellini-Karzinom, Urothelkarzinome des oberen Harntrakts und papilläre Nierenzellkarzinome (18, 25, 34). Das zeigt auch eine der größten Studien zum Ductus Bellini-Karzinom aus Japan: Nach der erneuten Klassifizierung von 120 vermeintlichen DBK wurden lediglich 81 als solche bestätigt. Von den 39 ausgeschlossenen Fällen wurden immerhin 17 Tumoren als pNZK und 11 als UK bewertet (98). Bei der Re-Evaluation der vorliegenden Fallserie wurden ebenfalls zahlreiche Tumoren ausgeschlossen, die ursprünglich als DBK klassifiziert waren. Dabei handelte es sich um Urothelkarzinome des oberen Harntrakts, papilläre Nierenzellkarzinome, sowie um sarkomatoide und unklassifizierte NZK. Aus diesem Grund wurden Urothelkarzinome des oberen Harntrakts und papilläre Nierenzellkarzinome in dieser Arbeit mit dem Ductus Bellini-Karzinom verglichen und nicht das klarzellige Nierenzellkarzinom ausgewählt, obwohl es im Vergleich zum papillären NZK das deutlich häufigere Karzinom ist. Die Differentialdiagnose zwischen Ductus Bellini- und klarzelligem Nierenzellkarzinom ist aber erheblich seltener.

Ductus Bellini-Karzinome sind sehr seltene Tumoren, die von den Sammelrohren ausgehen und somit meist in den zentralen Markanteilen der Niere zu finden sind. In der Histologie präsentieren sich DBK mit tubulärem oder tubulopapillärem Wachstum sowie häufig mit desmoplastischem Stroma. Nekrosen und Einblutungen innerhalb des Tumors sind nicht selten (25). Zum Zeitpunkt der Diagnose sind die Tumoren oft weit fortgeschritten (34, 41, 98). In der histopathologischen Diagnostik werden Antikörper gegen HMW-CK sowie die Histochemie mit dem Lektin UEA empfohlen. Studien zeigen aber einen begrenzten Nutzen dieser Reagenzien (40, 45). Weitere mögliche diagnostische Antikörper richten sich unter anderem gegen Vimentin, CD15, EMA, pax8 und p63 (25, 90). Zwei Arbeiten konnten den Nutzen von pax8 und p63 in der Differentialdiagnostik von Ductus Bellini- und Urothelkarzinomen belegen (2, 18). Der Ausschluss eines UK ist ein Hauptkriterium in der Diagnostik von DBK (25). Zur Therapie von DBK (abgesehen von der Operation) gibt es keine Empfehlungen und die vorhandenen Daten sind sehr heterogen und teilweise auch widersprüchlich, ebenso wie die Aussagen zur Prognose (5, 41, 58, 61, 64, 92, 98). Tendenziell sind die Überlebenszeiten aber kurz (80, 98).

Auch UK des oberen Harntrakts sind selten. Sie machen lediglich etwa 8% aller Karzinome des Harntrakts aus (25). Ihre Morphologie in der Mikroskopie ist sehr heterogen, da zahlreiche histologische Subformen existieren. So kann das Wachstum zum Beispiel mikropapillär, papillär oder glandulär sein und so die Differentialdiagnostik zu DBK und pNZK erschweren. Zusätzlich wachsen UK des Nierenbeckens gelegentlich in die Sammelrohre vor (25, 34, 50, 74, 82). Antikörper in der immunhistochemischen Diagnostik von UK richten sich unter anderem gegen HMW-CK, p63, CK7, CK20,

Thrombomodulin und Uroplakin III, wobei nur letzterer spezifisch für eine urotheliale Differenzierung ist (66, 89). In der Therapie von UK sind neben der Operation einige Zytostatika im Einsatz, wie etwa cis-Platin oder Gemcitabin. Die Empfehlungen für die Therapie von UK des oberen Harntrakts entstanden aus den Erfahrungen mit den Substanzen bei UK der Harnblase (35, 78, 102). Die Überlebenszeit der Patienten ist im Allgemeinen stark vom Tumorstaging abhängig (25).

Papilläre Nierenzellkarzinome sind deutlich häufiger als Ductus Bellini-Karzinome oder Urothelkarzinome des oberen Harntrakts. Insgesamt sind ca. 10-15% aller NZK vom papillären Typ (25). Die mikroskopische und makroskopische Morphologie kann den beiden zuvor genannten stark ähneln: Das Wachstum ist tubulär bis tubulopapillär mit Nekrosen, Einblutungen und desmoplastischem Stroma (25). Es werden in der Immunhistochemie Antikörper gegen LMW-CK, HMW-CK, Vimentin und CD10 eingesetzt (8, 23, 25, 52). Die operative Therapie bildet den Goldstandard, heute sind in der adjuvanten oder palliativen Behandlung die sog. targeted therapies möglich. Hierbei handelt es sich um Kinaseinhibitoren und Antikörper (31, 35, 91). Die Prognose ist vom histologischen Subtyp abhängig.

Aufgrund der heterogenen Daten zum Ductus Bellini-Karzinome, was die Diagnostik, Therapie und Prognose betrifft, wird von einigen Autoren diskutiert, ob es eher den Nierenzell- oder den Urothelkarzinomen zuzuordnen ist. Beispielsweise untersuchten Albadine et al. (2) DBK und UK immunhistochemisch, unter anderem mittels eines Antikörpers gegen den Transkriptionsfaktor pax8. Alle untersuchten Ductus Bellini-Karzinome (n=21) waren positiv für pax8, von den UK (n=34) sehr wenige. Diese Ergebnisse sprächen gegen einen gemeinsamen embryologischen Ursprung der beiden Tumoren. Anderer Meinung sind Orsola et al. (71): Aufgrund der Histologie, des klinischen Verlaufs und der Immunhistochemie von zwei Fällen ordnen sie das DBK eher den Urothelkarzinomen zu. Zu beachten ist hier allerdings die sehr geringe Fallzahl. Als weiteren Punkt führen sie unter anderem an, dass Aberrationen von Chromosom 1q sowohl in DBK als auch in UK beschrieben sind. Auch spräche die Effektivität von Chemotherapeutika in einzelnen Fällen eher für eine Beziehung von Ductus Bellini- und Urothelkarzinomen als für einen gemeinsamen Ursprung von Nierenzellkarzinomen und DBK. Andererseits existieren auch Fallberichte, die von einer Effektivität von targeted therapies beim DBK sprechen (5, 64). Diese Medikamente sind in der Therapie von Nierenzellkarzinomen, nicht aber bei Urothelkarzinomen im Einsatz.

Unabhängig von der Zuordnung des Ductus Bellini-Karzinoms zu den Nierenzell- oder den Urothelkarzinomen ist die Etablierung von diagnostischen Markern zur Abgrenzung von DBK gegenüber pNZK und UK wichtig, da für die beiden letzteren Tumorarten unterschiedliche Therapieregime Anwendung finden. Zielsetzung dieser Arbeit war es somit, mögliche Antikörper für die pathologische Routinediagnostik zu evaluieren und so die Differentialdiagnose zwischen den drei Entitäten zu erleichtern, sodass die Patienten einer optimalen Therapie zugeführt werden können.

Das untersuchte Kollektiv der Ductus Bellini-Karzinome umfasste insgesamt 35 Patienten, wobei die Fälle aus acht Kliniken in Deutschland und Österreich gesammelt und von zwei erfahrenen Uro-pathologen re-evaluiert wurden. Die im Absatz folgenden Prozentangaben wurden unter Ausschluss der fehlenden Werte berechnet: Die Patienten mit einem Ductus Bellini-Karzinom waren im Mittel knapp 65 Jahre alt, die älteste Patientin war 87, der jüngste Patient 43 Jahre alt. Das männliche Geschlecht war mit einem Verhältnis von etwa 2:1 bevorzugt betroffen. Fortgeschrittene Tumorstadien ab pT3 waren mit fast 70% deutlich häufiger als organbegrenzte Formen. Lymphknoten- und Fernmetastasen waren häufig bzw. sehr häufig. Im histopathologischen Grading nach UICC-Kriterien zeigten fast alle Tumoren einen Grad von mindestens G3.

Da das Ductus Bellini-Karzinom, wie bereits erörtert, ein sehr seltenes Karzinom ist, war es nicht möglich, eine ausreichend große Serie aus der Pathologie der Universitätsklinik Homburg zu sammeln. Die relativ große Fallzahl von 35 Tumoren ließ sich nur durch eine Kooperation mit anderen Kliniken und Universitäten (im Rahmen des Deutschen Netzwerks Nierenzelltumoren) realisieren, wie auch in anderen Studien mit größerer Fallzahl zum DBK (1, 41, 60, 98). Da die Fälle retrospektiv erhoben wurden, konnte kein einheitliches Protokoll für die Fixierung und Weiterverarbeitung des Tumormaterials angewendet werden. Es ist zu vermuten, dass hier Unterschiede zwischen den Kliniken bestehen und über die Auswirkung auf die Ergebnisse kann nur spekuliert werden. Darüber hinaus stammt das älteste Tumorpräparat aus dem Jahre 1990.

Ebenso muss berücksichtigt werden, dass die Ductus Bellini- und Urothelkarzinome des oberen Harntrakts als klassische Tumorblöcke vorlagen, die papillären Nierenzellkarzinome allerdings als TMA. Vorteile des TMA-Verfahrens sind die gute und schnelle Möglichkeit, Tumoren, auch unterschiedlicher Entitäten, in einem Gesichtsfeld unter dem Mikroskop miteinander zu vergleichen. Des Weiteren erlaubt die TMA-Technik einen weitaus höheren Durchsatz bei geringerem Einsatz von Reagenzien als die konventionelle IHC-Technik. Ist allerdings die Stanze des Ursprungsgewebes nicht repräsentativ, so wird die Auswertung des TMA verfälscht, da hier naturgemäß nicht der Blick auf den kompletten Schnitt möglich ist. Die TMA-Schnitte wurden in dieser Arbeit allerdings nach Anfertigung erneut mit den originalen, kompletten HE-Schnitten der einzelnen Tumoren verglichen, um sicherzustellen, dass die Stanze möglichst repräsentativ ist. Dennoch ist die Vergleichbarkeit zwischen konventionellen und TMA-Schnitten eingeschränkt. Die zwei verwendeten TMA-Blöcke umfassten jeweils 60 Fälle pro Block. Es wurden allerdings nur insgesamt 87 Fälle von papillären Nierenzellkarzinomen untersucht, da ein Teil der Stanzen bei den Experimenten von den Objektträgern abschwamm. Einige weitere Tumoren konnten bei der erneuten Klassifizierung weder dem Typ 1-, noch dem Typ 2-pNZK sicher zugeordnet werden. Diese Fälle wurden deshalb ausgeschlossen. Dennoch bleibt die Fallzahl, verglichen mit anderen Studien zum DBK, ausreichend hoch (18, 21, 37, 51, 55, 72, 87, 99). Ein Vorteil der vorliegenden Untersuchung ist auch, dass zwischen den

Karzinomen vom Typ 1 und 2 unterschieden wurde. Dies ist bei einigen der genannten Studien nicht der Fall. Wie sich in dieser Arbeit zeigte, unterscheiden sie sich zumindest in der p63-IHC signifikant und sollten demnach getrennt betrachtet werden.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Fallserie ist, dass sämtliche Ductus Bellini-Karzinome durch zwei Pathologen re-evaluiert wurden und nicht lediglich als DBK diagnostizierte Fälle aus den Klinikdatenbanken übernommen wurden, wie es bei zumindest zwei großen Studien zum DBK der Fall ist (1, 108). Wie bereits erläutert wurde die Diagnose Ductus Bellini-Karzinom in der vorliegenden Fallserie lediglich in etwa zwei Dritteln der Fälle bestätigt. Auch bei Tokuda et al. (98) wurden nach Re-Evaluierung von 120 Fällen nur 81 Fälle als DBK klassifiziert, was gut zur vorliegenden Serie passt. Dennoch sind Fehldiagnosen trotz sorgfältiger Prüfung nicht auszuschließen.

Die Immunhistochemie selbst unterliegt ebenfalls einigen möglichen Fehlerquellen. So können auf der Ebene der Fixierung, der Antigendemaskierung, der Umgebungsbedingungen und der Lagerung Unterschiede bestehen, um nur einige Beispiele zu nennen. In dieser Arbeit wurden die immunhistochemischen Färbungen mit einem Färbeautomaten (Firma Ventana, USA, Modell: Benchmark XT) durchgeführt. Solche Automaten verarbeiten die histologischen Schnitte streng nach voreingestellten Protokollen, die etwa die Inkubationszeiten der Reagenzien und die Temperaturen genau spezifizieren. Demnach sollten Reproduzier- und Vergleichbarkeit der automatisiert gefärbten Tumorproben deutlich höher sein als bei von Hand gefärbten Schnitten. Das ist gerade beim Vergleich größerer Fallserien hilfreich und erhöht die Aussagekraft der Ergebnisse. Die Auswertung immunhistochemischer Färbungen erfolgt aktuell in der klinischen Praxis größtenteils mit dem Mikroskop ohne weitere technische Hilfsmittel. Durch die Verwendung von Einteilungen wie dem Immunreaktiven Score wird versucht, die Vergleichbarkeit der Färbungen zu erhöhen. Dennoch müssen die Ergebnisse als semiquantitativ betrachtet werden. Sind beispielsweise 25% der Tumorzellen auf einem Objektträger mit geringer Intensität positiv gefärbt, so würde das Ergebnis (nach der Einteilung in dieser Arbeit) als negative Färbung gewertet. Sind es hingegen 26% gefärbte Zellen geringer Intensität, so wäre das Färbeergebnis schwach positiv. Eine genaue Auszählung der Tumorzellen ist aber im Rahmen von Studien wie dieser nur sehr schwer zu realisieren.

#### **4.1. Diskussion der p63-Immunhistochemie**

Das p63-Protein ist ein Transkriptionsfaktor aus der p53-Familie. Seine Bedeutung hat es unter anderem in der Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose, sowie in der Entwicklung und Differenzierung verschiedener Gewebearten, wie etwa dem Urothel. Es existieren verschiedene Isoformen des Proteins, deren Funktionen teilweise stark unterschiedlich bis entgegengesetzt sind. So werden p63 sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Wirkungen zugeschrieben (3, 27, 84, 110).



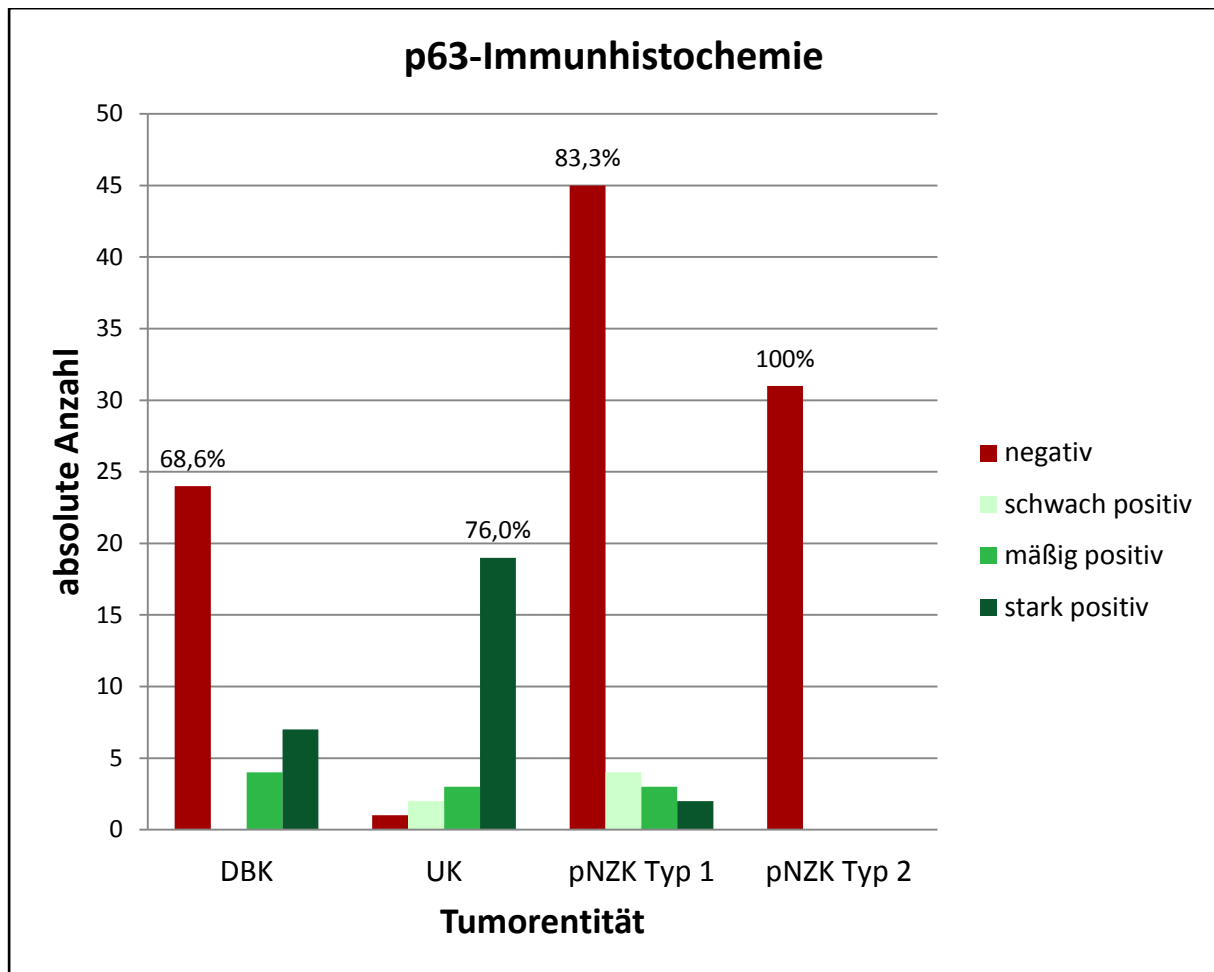
Die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen das p63-Protein ist in normalem und neoplastischem Urothel überwiegend positiv. Im Nierengewebe hingegen ist das p63-Protein nicht nachweisbar, weshalb ein p63-Antikörper im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.

Der für die Immunhistochemie verwendete Antikörper gegen p63 (Monoclonal Mouse, Anti-Human, Clone 4A4, Dako, Dänemark) richtet sich laut den Herstellerinformationen gegen das aminoterminele Ende der  $\Delta$ Np63-Isoform (Aminosäuren 1-205). Es ist im Rahmen der Immunhistochemie nicht untersucht worden, ob der Antikörper mit den verschiedenen Isoformen von p63 reagiert, also auch mit den TAp63-Formen. Lediglich mit der Western Blot-Technik wurde gezeigt, dass der Antikörper verschiedene Isoformen erkennt (TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\gamma$ ,  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , und  $\Delta$ Np63 $\gamma$ ) (111). Die Befunde der Western Blot Untersuchungen sowie die Tatsache, dass den  $\Delta$ Np63-Formen die TA-Domäne fehlt, ihr sonstiger Aufbau den TA-Isoformen aber sehr stark ähnelt, machen es wahrscheinlich, dass auch in der Immunhistochemie der Antikörper mit den verschiedenen Isoformen von p63 reagiert.

**Tabelle 34. Zusammenfassung der Publikationen mit immunhistochemischer Färbung von p63**

Arbeitsgruppe	Typ/Besonderheiten	Fallzahl	Negativität für p63	p63-Antikörper, Hersteller
Carvalho et al., 2012	invasive UK des Nierenbeckens und des oberen Harntrakts	18	0%	Thermo Scientific (USA) Clone 4A4
Albadine et al., 2010	invasive UK des oberen Harntrakts, high grade	34	3%	Neomarkers (USA), monoclonal mouse Ab-4
Buza et al., 2010	UK der Harnblase, high grade	16	19%	Dako (Dänemark), monoclonal, Clone 4A4
Kunju et al., 2006	UK, high grade	36	8%	Labvision (USA), Clone 4A4
Compérat et al., 2006	UK der Harnblase, pTa	56	0%	Dako, monoclonal, Clone 4A4
	dto, pT1	45	0%	
	dto, pT2	57	0%	
Zigeuner et al., 2004	UK des oberen Harntrakts, pT1	22	0%	Neomarkers, monoclonal mouse Ab-4
	dto, pT2	9	0%	
	dto, pT3	22	9%	
	dto, G2	28	0%	
	dto, G3	25	8%	
Carvalho et al., 2012	pNZK	18	100%	Thermo Scientific, Clone 4A4
Langner et al., 2003	pNZK	20	100%	Neomarkers, monoclonal mouse Ab-4
Albadine et al., 2010	DBK	21	86%	Neomarkers, monoclonal mouse Ab-4
Carvalho et al., 2012	DBK	6	100%	Thermo Scientific, Clone 4A4

Tabelle 34 zeigt die Studien (2, 16, 18, 20, 47, 51, 113), in denen die Expression von p63 mittels Immunhistochemie an Urothelkarzinomen (UK), papillären Nierenzellkarzinomen (pNZK) und Ductus Bellini-Karzinomen (DBK) untersucht wurde.



**Abbildung 15. Überblick über die p63-Immunhistochemie der untersuchten Karzinome**

Die Abbildung fasst die Ergebnisse der immunhistochemischen p63-Färbung der verschiedenen untersuchten Tumorentitäten zusammen. Insgesamt wurden 35 Ductus Bellini-, 25 Urothel- und 54 papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1 bzw. 31 vom Typ 2 mit einem Antikörper gegen das p63-Protein untersucht. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die häufigste Färbekategorie innerhalb der Tumorentität. **Abkürzungen:** DBK= Ductus Bellini-Karzinom, UK= Urothelkarzinom, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom

Die 35 untersuchten Ductus Bellini-Karzinome waren in der Immunhistochemie für p63 zu über zwei Dritteln negativ (n=24), vier waren mäßig und sieben stark positiv. Zwei Arbeitsgruppen haben sich ebenfalls mit der Immunhistochemie von p63 in Ductus Bellini-Karzinomen beschäftigt (Tab. 34): Bei Albadine et al. (2) waren die meisten der DBK negativ in der p63-Färbung, bei Carvalho et al. (18) waren es alle. Die Werte der vorliegenden Arbeit weichen zwar zu geringeren Werten hin ab, der Trend zu einer fehlenden p63-Expression in Ductus Bellini-Karzinomen ist dennoch deutlich. Zu beachten ist allerdings, dass die Auswertung immunhistochemischer Färbungen immer als semi-quantitativ zu betrachten ist. So können sich die Ergebnisse der Auswertung zwischen zwei verschiedenen Untersuchern, aber auch bei demselben Untersucher zu verschiedenen Zeitpunkten erheblich unterscheiden (Inter- bzw. Intraobserver-Variabilität). Ebenso werden häufig, wie auch in diesen Arbeiten, verschiedene Scores zur histologischen Auswertung verwendet werden. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass die verwendeten Antikörper sich häufig unterscheiden. In der statistischen Überprüfung einer möglichen Korrelation zwischen dem Immunreaktiven Score und

den zu Verfügung stehenden klinisch-pathologischen Daten war in keiner Kategorie ein statistisch signifikanter Zusammenhang zu finden. Die Sensitivität einer negativen p63-IHC für ein Ductus Bellini-Karzinom ist mäßig. Allerdings muss in diesem Zusammenhang beachtet werden, dass in der Differentialdiagnose mittels Immunhistochemie selten ein einziger Wert die definitive Diagnose liefert, sondern dass i.d.R. auch die übrigen Befunde wie Histologie, Klinik und weitere immunhistochemische Färbungen mit in die Entscheidung einfließen. Somit kann die p63-IHC auch beim DBK einen wertvollen Hinweis liefern, zumal in der Differentialdiagnose zwischen Ductus Bellini- und Urothelkarzinom die Spezifität für ein DBK im Falle einer negativen p63-IHC sehr gut ist (Kapitel 3.5., Tabelle 30).

Die 25 Urothelkarzinome des oberen Harntrakts waren fast alle positiv in der p63-IHC, lediglich ein Fall zeigte keine Anfärbung von p63. Die meisten positiven Fälle waren zudem stark positiv gefärbt. Diese Befunde sind im Einklang mit der verfügbaren Literatur zu diesem Thema (Tab 34). In der statistischen Auswertung korrelierte die p63-IHC signifikant mit dem Tumorstadium: Fortgeschrittene Stadien ab pT3 zeigten eine geringere Expression von p63 als solche bis einschließlich pT2 ( $p=0,028$ ). Eine deutliche Tendenz ( $p=0,057$ ) zu geringeren IRS-Werten zeigte sich auch in geringer differenzierten Tumoren vom Grad 3 im Gegensatz zu denen vom Grad 2. Diese Befunde passen zu den Aussagen von Graziano et al. (30). In ihrer Übersichtsarbeit beschreiben sie, gestützt auf mehrere Publikationen, dass in Urothelkarzinomen der Harnblase die Expression von p63 mit höherem Tumorstadium und zunehmender Größe abnimmt. Die Sensitivität einer positiven p63-IHC für ein UK des oberen Harntrakts ist sehr gut. Auch die Spezifitäten in der Differentialdiagnose zu den papillären Nierenzellkarzinomen sind gut. Der negative prädiktive Wert liegt in der Differentialdiagnose zwischen UK und den restlichen untersuchten Karzinomen in dieser Arbeit jeweils deutlich über 95%. Eine negative Immunhistochemie für p63 macht ein Urothelkarzinom somit unwahrscheinlich (Kapitel 3.5., Tabelle 31).

54 papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1 wurden untersucht. Sie waren überwiegend negativ in der p63-Färbung und die meisten der positiven Fälle waren schwach bis mäßig positiv. Bei Carvalho et al. (18) sowie Langner et al. (51) waren alle Fälle negativ, wobei die geringeren Fallzahlen ( $n=18$  bzw. 21) zu beachten sind. Des Weiteren wurden von Carvalho et al. nur pNZK vom Typ 2 untersucht, während von Langner et al. keine Aussage zum histologischen Subtyp des pNZK getroffen wird. Signifikante Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen Daten und der p63-IHC ergaben sich für die pNZK Typ 2 nicht. Die geringfügig höheren Werte des p63-IRS bei weiblichen Patienten sowie bei Tumoren vom Fuhrman-Grad 1 im Gegensatz zu Grad 2 bleiben ebenfalls ohne statistische Signifikanz. Einen Zusammenhang zwischen Tumorstadium und p63-Expression wie beim UK zeigte sich nicht. Die Sensitivität einer negativen p63-IHC für ein pNZK Typ 1 ist gut, während die Spezifität lediglich in der Abgrenzung zum Urothelkarzinom sehr gut ist. Darüber hinaus liegt der PPW einer

negativen p63-Immunhistochemie für ein papilläres Nierenzellkarzinom vom Typ 1 in der Differentialdiagnose zum Urothelkarzinom bei fast 100%, was p63 in dieser Konstellation zu einem guten Diagnostikum macht (siehe auch Kapitel 3.5., Tabelle 32).

Von den 33 untersuchten pNZK Typ 2 konnten in der p63-IHC lediglich 31 ausgewertet werden, da zwei Stenzen auf dem TMA-Schnitt während der Färbung abschwammen. Die restlichen Fälle zeigten alle einen IRS-Wert von null (=negative IHC), weshalb eine statistische Untersuchung auf Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen und der Expression von p63 nicht zielführend war. Die verfügbaren Publikationen zur immunhistochemischen Untersuchung von p63 an pNZK decken sich mit diesen Ergebnissen (siehe Absatz zum pNZK Typ 1). Die Sensitivität einer negativen p63-Immunhistochemie ist herausragend, während die Spezifität nur in der Abgrenzung zum Urothelkarzinom sehr gut ist. Mit einem NPW von 100% ist ein papilläres Nierenzellkarzinom vom Typ 2 bei einer positiven p63-Immunhistochemie ausgeschlossen, wodurch diese Färbung in der Diagnostik sehr nützlich sein kann (siehe auch Kapitel 3.5., Tabelle 33).

**Tabelle 35. Zusammenfassung der statistischen Untersuchung der Immunhistochemie von p63 zwischen den verschiedenen Karzinomen**

Karzinom 1	häufigste Färbekategorie	Karzinom 2	häufigste Färbekategorie	p-Wert	Test
DBK	negativ (68,6 %)	UK	positiv (96 %)	<b>&lt;0,001</b>	Chi-Quadrat-Test
DBK	negativ (68,6 %)	pNZK Typ 1	negativ (83,3 %)	0,124	Chi-Quadrat-Test
DBK	negativ (68,6 %)	pNZK Typ 2	negativ (100 %)	<b>&lt;0,001</b>	Chi-Quadrat-Test
UK	positiv (96 %)	pNZK Typ 1	negativ (83,3 %)	<b>&lt;0,001</b>	Chi-Quadrat-Test
UK	positiv (96 %)	pNZK Typ 2	negativ (100 %)	<b>&lt;0,001</b>	Chi-Quadrat-Test
pNZK Typ 1	negativ (83,3 %)	pNZK Typ 2	negativ (100 %)	<b>0,023</b>	exakter Fisher-Test

Die Tabelle fasst die Ergebnisse aus Kapitel 3.4. zusammen, in dem die verschiedenen Karzinome bezüglich ihrer Expression von p63 mittels einer Kreuztabelle verglichen wurden. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben. **Abkürzungen:** DBK= Ductus Bellini-Karzinom, UK= Urothelkarzinom, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom

Betrachtet man die p63-Immunhistochemie, so unterscheiden sich nur Ductus Bellini- und papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1 bezüglich ihrer Expression von p63 nicht statistisch signifikant voneinander (Tab 35). Allerdings sind die Unterschiede, trotz ihrer Signifikanz, nicht groß genug, um sich in allen Fällen in ausreichenden Spezifitäten sowie negativen und positiven prädiktiven Werten niederzuschlagen. Dies ist nur in der Abgrenzung von Urothel- gegenüber Ductus Bellini- und papillären Nierenzellkarzinomen der Fall (siehe Kapitel 3.5.). Die Immunhistochemie von p63 ordnet die Ductus Bellini- demnach eher den Nierenzellkarzinomen zu, wie es auch unter anderem von Albadine et al. (2) postuliert wurde.

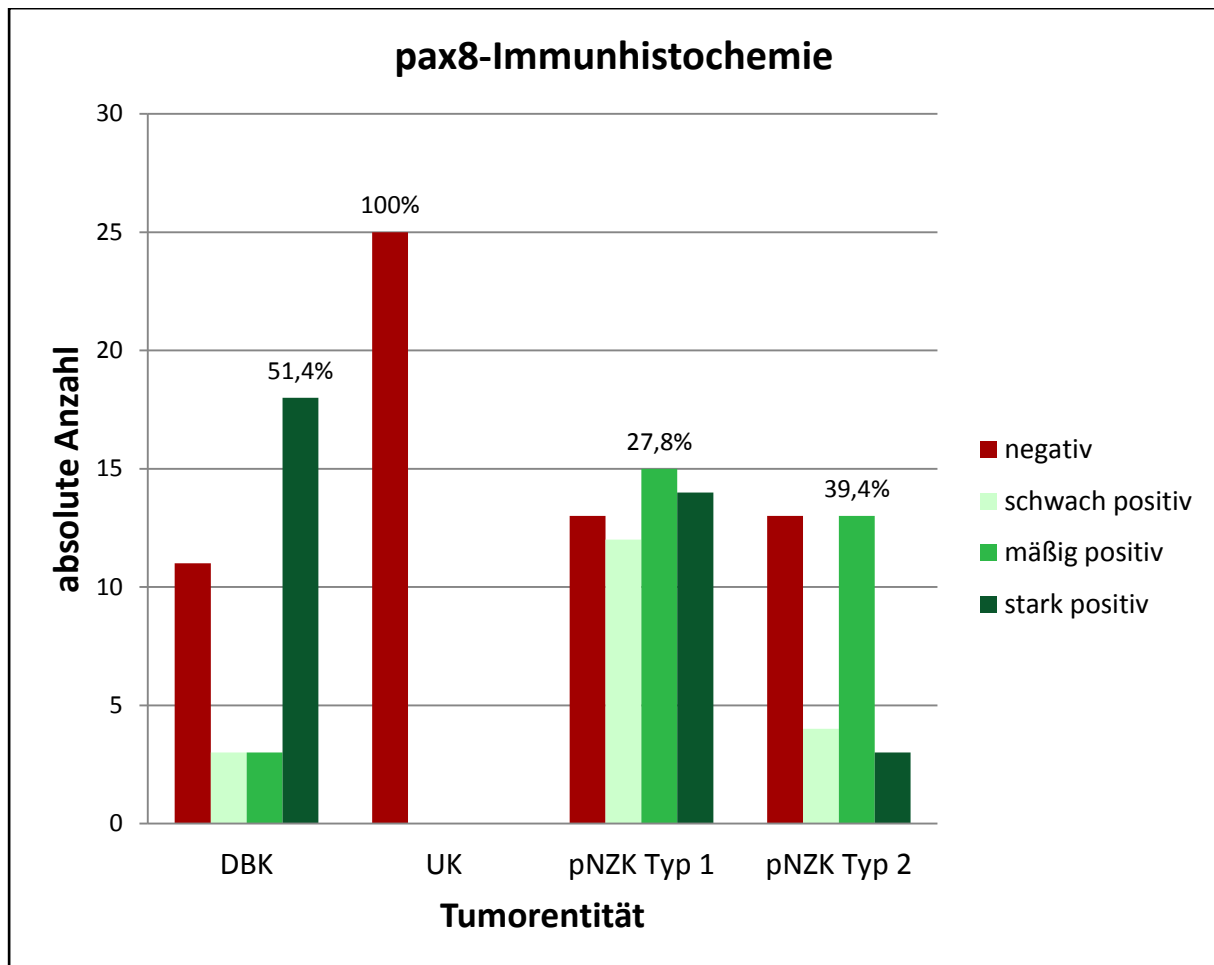
## 4.2. Diskussion der pax8-Immunhistochemie

Pax8 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie der pax-Gene. Die Gene dieser Familie sind Regulatoren der Gewebe- und Organentwicklung (38, 95, 101). Je nach Zielorganen lassen sich verschiedene Subgruppen innerhalb der Genfamilie definieren, eine Gruppe bilden pax2, pax5 und pax8. Ihre Erfolgsorgane sind das zentrale Nervensystem, die B-Lymphozyten, Schilddrüse und Niere (49). So liegt es nahe, unter anderem Tumoren der Niere immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen pax8 zu untersuchen. In einer großen Serie von 189 Fällen normalen Nierengewebes exprimierten alle Proben in der Immunhistochemie pax8 in den Tubuluszellen (72).

**Tabelle 36. Zusammenfassung der Publikationen mit immunhistochemischer Färbung von pax8**

Arbeitsgruppe	Typ/Besonderheiten	Fallzahl	Negativität für pax8	pax8-Antikörper, Hersteller
Carvalho et al., 2012	invasive UK des Nierenbeckens und des oberen Harntrakts	18	83%	Proteintech Group (USA), polyclonal
Ozcan et al., 2011	UK des Nierenbeckens	13	100%	Proteintech Group, polyclonal
	UK der Harnblase	20	100%	Proteintech Group, polyclonal
Albadine et al., 2010	invasive UK des oberen Harntrakts, high grade	34	91%	Proteintech Group, polyclonal
Tong et al., 2009	UK des Nierenbeckens	17	76%	Proteintech Group, polyclonal
	UK des Harnleiters	2	100%	
	UK der Harnblase	40	100%	
Hu et al., 2012	pNZK	57	5%	Biocare Medical (USA), mouse monoclonal
Carvalho et al., 2012	pNZK	18	22%	Proteintech Group, polyclonal
Ozcan et al., 2011	pNZK	38	0%	Proteintech Group, polyclonal
Tong et al., 2009	pNZK	21	10%	Proteintech Group, polyclonal
Carvalho et al., 2012	DBK	6	17%	Proteintech Group, polyclonal
Ozcan et al., 2011	DBK	7	29%	Proteintech Group, polyclonal
Albadine et al., 2010	DBK	21	0%	Proteintech Group, polyclonal

Tabelle 36 zeigt die Studien (2, 18, 37, 72, 99), in denen die Expression von pax8 mittels Immunhistochemie an Urothelkarzinomen (UK), papillären Nierenzellkarzinomen (pNZK) und Ductus Bellini-Karzinomen (DBK) untersucht wurde.



**Abbildung 16. Überblick über die pax8-Immunhistochemie der untersuchten Karzinome**

Die Abbildung fasst die Ergebnisse der immunhistochemischen pax8-Färbung der verschiedenen untersuchten Tumorentitäten zusammen. Insgesamt wurden 35 Ductus Bellini-, 25 Urothel- und 54 papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1 bzw. 33 vom Typ 2 mit einem Antikörper gegen das pax8-Protein untersucht. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die häufigste Färbekategorie innerhalb der Tumorentität. **Abkürzungen:** DBK= Ductus Bellini-Karzinom, UK= Urothelkarzinom, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom

Die 35 Ductus Bellini-Karzinome waren zu über zwei Dritteln positiv in der pax8-IHC, wobei sie überwiegend eine starke Anfärbung zeigten. Es sind drei vergleichbare Publikationen verfügbar (siehe Tabelle 36.). Die Zahlen in dieser Arbeit sind zwar etwas geringer, bestätigen aber die verfügbare Literatur. In der statistischen Untersuchung der pax8-IHC und der klinisch-pathologischen Daten auf mögliche Korrelationen zeigten sich keine signifikanten Korrelationen (Kapitel 3.1.1.). Die Sensitivität einer positiven pax8-IHC für ein Ductus Bellini-Karzinom liegt bei 68,6% und ist damit ähnlich hilfreich wie eine negative p63-Färbung. Die Spezifität und der PPW in der Differentialdiagnose zwischen Ductus Bellini- und Urothelkarzinom sind exzellent, pax8-Antikörper sind bei dieser Fragestellung also sehr nützlich, während sie bei der DD zwischen Ductus Bellini- und papillären Nierenzellkarzinomen nicht ausreichend sind (Kapitel 3.5.).

Alle 25 Urothelkarzinome des oberen Harntrakts zeigten eine negative IHC für pax8, was mit den Literaturdaten übereinstimmt (Tab. 36). Da in der vorliegenden Untersuchung alle Tumoren pax8-negativ waren (24 Tumoren mit IRS= 0, einer mit IRS= 1), wurde auf eine statistische Untersuchung

zwischen pax8-IRS und klinisch-pathologischen Daten verzichtet. Die Sensitivität einer negativen pax8-Färbung für ein Urothelkarzinom des oberen Harntrakts ist hervorragend. Im Falle einer positiven pax8-IHC ist ein Urothelkarzinom in der DD gegenüber Ductus Bellini- und papillären NZK ausgeschlossen.

Die 54 papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 1 waren zu ca. drei Vierteln positiv in der immunhistochemischen Färbung von pax8, wobei die Kategorien schwach, mäßig und stark positiv ähnlich häufig vertreten waren. 13 Fälle waren negativ. In der Literatur finden sich ähnliche Werte, auch wenn der Anteil positiver pNZK Typ 1-Fälle höher ist (Tab 36). Allerdings unterscheiden lediglich Tong et al. (99) zwischen papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 1 und 2, was die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit einschränkt. Mit dem MWU-Test wurden die klinisch-pathologischen Daten der pNZK Typ 1 und der pax8-IRS untersucht. Im Gegensatz zu den Tumoren mit Fuhrman-Grad 2 (n= 33) hatten die Tumoren mit Grad 1 (n= 21) signifikant höhere Werte im IRS (p= 0,02). Tendenziell waren die IRS-Werte in nicht-metastasierten Tumoren etwas höher als in metastasierten, allerdings nicht signifikant (Kapitel 3.3.1.1.). Die Sensitivität einer pax8-positiven Färbung liegt bei etwa 76%, was pax8 in diesem Zusammenhang zu einem hilfreichen, aber nicht überragenden Diagnostikum macht. In der Differentialdiagnostik von papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 1 und Urothelkarzinomen sind die Spezifität und der PPW einer positiven immunhistochemischen Färbung von pax8 exzellent. Zur Unterscheidung von pNZK Typ 1 und Ductus Bellini- sowie papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 2 sind Antikörper gegen pax8 ungeeignet.

Das Ergebnis der pax8-IHC der 33 pNZK Typ 2 ist sehr heterogen: Ungefähr 61% der Fälle waren pax8-positiv, die meisten mäßig positiv. Wie schon weiter oben beschrieben, werden häufig nicht die verschiedenen Subtypen des pNZK unterschieden, obwohl diese histologisch und auch klinisch verschieden sind. (34, 36) Lediglich Tong et al. (99) sowie Carvalho et al. (18) betrachten explizit die pNZK vom Typ 2. Die beobachteten Werte in dieser Arbeit sind somit geringer, bestätigen aber die verfügbaren Daten aus der Literatur (Tab. 36). In der statistischen Überprüfung waren die pax8-IRS-Werte von pNZK Typ 2 mit UICC-Grad 2 (n= 21) signifikant höher als die der Tumoren mit Grad 3 (n= 12) (p= 0,034). Eine Tendenz zu höheren pax8-Werten bei geringerem Fuhrman-Grad zeigte sich ähnlich den pNZK Typ 1 zwar auch bei den pNZK Typ 2, war aber nicht signifikant. Dabei sind aber auch die sehr unterschiedlich großen Gruppen zu beachten: 30 Karzinome waren vom Fuhrman-Grad 3, aber lediglich drei vom Grad 4. Insgesamt zeigt sich somit, dass sowohl pNZK vom Typ 2 als vom Typ 1 höhere IRS-Werte in der pax8-Immunhistochemie haben, wenn sie besser differenziert sind. Allerdings muss beachtet werden, dass die Signifikanz bei den Typ 1-Karzinomen mit dem Fuhrman-Grad berechnet wurde, bei den Typ 2-Karzinomen jedoch mit dem UICC-Grad. Diese beiden Einteilungen für das histopathologische Grading sind nicht direkt miteinander vergleichbar, jedoch zeigen sie jeweils mit zunehmendem Grad eine schlechtere Differenzierung des Tumors an.

Die Sensitivität einer positiven pax8-Färbung für ein pNZK Typ 2 ist relativ gering und die Färbung sollte demnach nur ergänzend zu anderen Informationen verwendet werden. Wiederum ist pax8 aber sehr hilfreich in der Differentialdiagnose zum Urothelkarzinom, nicht aber zu pNZK vom Typ 1 oder DBK.

**Tabelle 37. Zusammenfassung der statistischen Untersuchung der Immunhistochemie von pax8 zwischen den verschiedenen Karzinomen**

Karzinom 1	häufigste Färbekategorie	Karzinom 2	häufigste Färbekategorie	p-Wert	Test
DBK	positiv (68,8 %)	UK	negativ (100 %)	<b>&lt;0,001</b>	Chi-Quadrat-Test
DBK	positiv (68,8 %)	pNZK Typ 1	positiv (75,9 %)	0,472	Chi-Quadrat-Test
DBK	positiv (68,8 %)	pNZK Typ 2	positiv (60,6 %)	0,613	Chi-Quadrat-Test
UK	negativ (100 %)	pNZK Typ 1	positiv (75,9 %)	<b>&lt;0,001</b>	Chi-Quadrat-Test
UK	negativ (100 %)	pNZK Typ 2	positiv (60,6 %)	<b>&lt;0,001</b>	Chi-Quadrat-Test
pNZK Typ 1	positiv (75,9 %)	pNZK Typ 2	positiv (60,6 %)	0,152	Chi-Quadrat-Test

Die Tabelle fasst die Ergebnisse aus Kapitel 3.4. zusammen, in dem die verschiedenen Karzinome bezüglich ihrer Expression von pax8 mittels einer Kreuztabelle verglichen wurden. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben. **Abkürzungen:** DBK= Ductus Bellini-Karzinom, UK= Urothelkarzinom, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom

Wie Tab. 37 zeigt, unterscheidet sich in der IHC für pax8 lediglich das Urothelkarzinom vom Ductus Bellini- sowie den papillären Nierenzellkarzinomen. Fasst man die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von pax8 zusammen, so fallen folgende Punkte auf: Die pax8-Immunhistochemie eignet sich zum Ausschluss von UK, da hier ein eindeutiges Profil vorliegt. Ductus Bellini- und papilläre Nierenzellkarzinome lassen sich mit Antikörpern gegen pax8 nicht differenzieren, da sich die Ergebnisse ihrer IHC stark ähneln. Wie bei der IHC von p63 ähneln auch in diesem Zusammenhang das Ductus Bellini- somit eher den papillären Nierenzellkarzinomen, als dem Urothelkarzinom. Auffallend ist die hohe Anzahl pax8-negativer Karzinome der Niere. Immerhin sind es ≈31% der DBK, ≈24% der pNZK Typ 1 und ≈39% der pNZK Typ 2, weshalb auf diesen Umstand in der abschließenden Diskussion der immunhistochemischen Ergebnisse eingegangen wird.

### 4.3. Diskussion der pVHL-Immunhistochemie

Das von Hippel-Lindau-Gen kodiert für das Protein pVHL, das zahlreiche und komplexe Funktionen hat. Es beeinflusst unter anderem zelluläre Mikrotubuli (9, 17, 22, 68), den Aufbau der ECM (9, 17, 26, 48, 69, 97) sowie Zellzyklus und Apoptose (7, 9, 17). Eine weitere wichtige Bedeutung hat pVHL in der Kontrolle der hypoxia-inducible factors und somit des oxygen-sensing pathways. Bei einem Funktionsverlust beider Allele des VHL-Gens entfällt die negative Kontrolle von pVHL über die hypoxia-inducible factors. So entstehen letztendlich zahlreiche Genprodukte (wie beispielsweise PGK-1, GLUT-1, VEGF, PDGF, EGFR), die eine wichtige Bedeutung in der Tumorgenese haben (7, 9, 33). Der Funktionsverlust beider Allele ist der zentrale pathophysiologische Mechanismus in der Entstehung der von Hippel-Lindau Erkrankung, bei der häufig klarzellige Nierenzellkarzinome

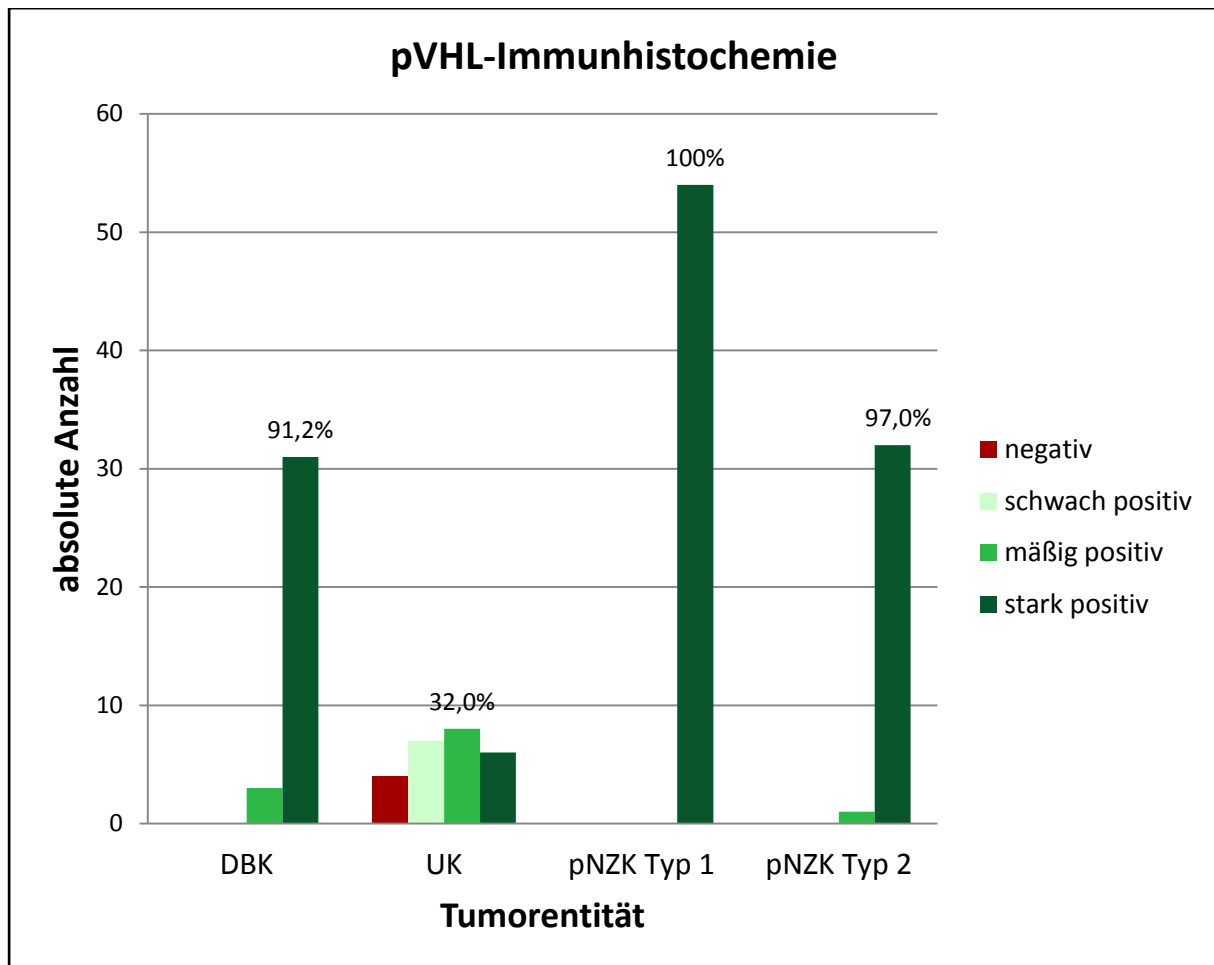


aufzutreten. Dieser Verlust ist allerdings auch bei den sporadischen kNZK sehr häufig (9, 17, 39, 42). Es existieren wenige Studien, in denen pVHL mit immunhistochemischen Methoden untersucht wurde, diese werden weiter unten im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse besprochen (siehe auch Tab. 38).

**Tabelle 38. Zusammenfassung der Publikationen mit immunhistochemischen Färbungen von pVHL**

Arbeitsgruppe	Typ/ Besonderheiten	Fallzahl	Negativität für pVHL	Expression bei Positivität	pVHL-Antikörper, Hersteller
Lin et. Al., 2008	invasive UK der Harnblase	10	100%		Santa Cruz (USA), Anti-pVHL, rabbit polyclonal
Corless et al., 1996	UK der Harnblase	keine Angabe	0%	nur zytosolische Expression	Corless et. Al, Ig32, gegen ein Glutathion-S- Transferase-pVHL- Fusionsprotein
Lin et. Al., 2008	pNZK	57	0%	nur zytosolisch und membranös	Santa Cruz (USA), Anti-pVHL, rabbit polyclonal
Schraml et al., 2003	pNZK	62	32%	24% nukleär, 44% zytosolisch und nukleär	Schraml et al., Anti-pVHL30 und Anti-pVHL19
	pNZK	62	12%	nur zytosolische Expression	Neomarkers (USA), Anti- pVHL30, Ig33
Corless et al., 1996	pNZK	2	0%	nur zytosolische Expression	Corless et. Al, Ig32, gegen ein Glutathion-S- Transferase-pVHL- Fusionsprotein

Tabelle 38 zeigt die Studien (21, 55, 87), in denen die Expression von pVHL mittels Immunhistochemie an papillären Nierenzellkarzinomen (pNZK) und Urothelkarzinomen (UK) untersucht wurde.



**Abbildung 17. Überblick über die pVHL-Immunhistochemie der untersuchten Karzinome**

Die Abbildung fasst die Ergebnisse der immunhistochemischen pVHL-Färbung der verschiedenen untersuchten Tumorentitäten zusammen. Insgesamt wurden 34 Ductus Bellini-, 25 Urothel- und 54 papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1 bzw. 31 vom Typ 2 mit einem Antikörper gegen das pVHL-Protein untersucht. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf die häufigste Färbekategorie innerhalb der Tumorentität. **Abkürzungen:** DBK= Ductus Bellini-Karzinom, UK= Urothelkarzinom, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom

Es wurden 35 Ductus Bellini-Karzinome untersucht. Ein Fall konnte nicht ausgewertet werden, da die Färbung von pVHL nach der von p63 und pax8 durchgeführt wurde und nicht mehr ausreichend Gewebe auf dem Tumorblock vorhanden war. Weitere Blöcke dieses Falls standen leider nicht zur Verfügung. Von den verbleibenden 34 Fällen waren alle positiv in der pVHL-IHC, davon fast alle stark positiv. Aufgrund dieses eindeutigen Ergebnisses waren keine signifikanten Korrelationen zwischen den IRS-Werten und den klinisch-pathologischen Daten im MWU-Test zu finden. Da die vorliegende Untersuchung von pVHL mittels Immunhistochemie an Ductus Bellini-Karzinomen die erste ist, sind keine Daten zum Vergleich verfügbar. Die Sensitivität der pVHL-Färbung ist somit exzellent, ebenso wie der negative prädiktive Wert. Antikörper gegen pVHL sind demnach gut zur Diagnostik von DBK geeignet, da eine fehlende Anfärbung von pVHL ein Ductus Bellini-Karzinom unwahrscheinlich macht.

Von den 25 untersuchten UK des oberen Harntrakts waren 21 positiv für pVHL. Die Daten aus verfügbaren Publikationen sind inkonsistent (Tab. 38): Bei Lin et al. (55) waren alle der zehn untersuchten UK der Harnblase in der Immunhistochemie negativ für pVHL, bei Corless et al. (21) hingegen

alle positiv (keine Angabe der Fallzahl). Zu beachten ist auch hier, dass unter anderem verschiedene Antikörper verwendet wurden und dass von einer positiven pVHL-Immunhistochemie nicht auf die Integrität des VHL-Gens geschlossen werden darf, genauso wenig wie auf die des Proteins. Die Immunhistochemie ist keine funktionelle Untersuchung, es werden lediglich bestimmte Aminosäuresequenzen eines Proteins nachgewiesen. Über Funktion und Aufbau des restlichen Proteins lässt sich somit keine Aussage treffen. Schraml et al. (87) konnten zeigen, dass LOH auf dem Locus des VHL-Gens nicht mit der Expression von pVHL in der Immunhistochemie korreliert. Ein Großteil ihrer untersuchten klarzelliger Nierenzellkarzinome mit nachgewiesenem VHL-Funktionsverlust war in der IHC pVHL-positiv. Sie vermuten, dass durch den Antikörper auch mutierte und verkürzte Formen von pVHL nachgewiesen werden, denn der Funktionsverlust des VHL-Gens beruhe nicht zwangsläufig auf einer kompletten Deletion. Auch Mechanismen wie Mutationen und Hypermethylierung seien zu beachten. Leider kann alleine anhand der IHC aus den genannten Gründen keine Aussage getroffen werden, ob es sich bei den pVHL-negativen UK-Fällen um einen Verlust von pVHL handelt. Wie Lin et al. (55) schreiben, sei es auch denkbar, dass die pVHL-Level unterhalb der Nachweisgrenze lägen oder die Halbwertszeit des Proteins zu kurz sei. Signifikante Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen Daten und dem pVHL-IRS-Wert waren nicht zu finden. Mit 84% ist die Sensitivität der immunhistochemischen pVHL-Färbung für ein UK des oberen Harntrakts relativ gut, jedoch sind weder die Spezifität, noch die prädiktiven Werte in der Differentialdiagnostik ausreichend (siehe Kapitel 3.5.). Es wurden ferner 54 papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1 mit dem Antikörper gegen pVHL immunhistochemisch untersucht, wobei alle Tumoren stark positiv waren, was gut zu den Untersuchungen von Corless et al. (21) und Lin et al. (55) passt (Tab. 38). In diesen Arbeiten waren ebenfalls sämtliche pNZK positiv für pVHL, wobei es die geringe Fallzahl ( $n=2$ ) bei Corless et al. zu beachten gilt. Schraml et al. (87) verwendeten zwei verschiedene Antikörper gegen pVHL. Mit einem kommerziell erhältlichen monoklonalen Mausantikörper färbten sich die meisten der pNZK an, mit einem eigenen Antikörper der Arbeitsgruppe etwa zwei Drittel. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass immunhistochemische Studien mit verschiedenen Antikörpern gegen dasselbe Protein nur begrenzt vergleichbar sind. Des Weiteren unterteilten keine der genannten Studien die pNZK in ihre histologischen Subtypen. In der Untersuchung des pVHL-IRS-Werts und der klinisch-pathologischen Daten waren keine statistisch signifikanten Korrelationen zu finden, folgende Tendenz zeichnete sich aber ab: Die 33 Tumoren vom Fuhrman-Grad 2 hatten eher höhere IRS-Werte als die 21 Tumoren vom Grad 1 ( $p=0,054$ ). Leider existieren dazu keine vergleichbaren Untersuchungen und über die Relevanz kann nur spekuliert werden. Da alle pNZK Typ 1 pVHL-positiv waren, ergeben sich ausgezeichnete Werte für die Sensitivität und den negativen prädiktiven Wert. Eine fehlende Anfärbung in der Immunhistochemie für pVHL macht ein papilläres Nierenzellkarzinom sehr unwahrscheinlich.

Insgesamt wurden 33 Fälle von papillären Nierenzellkarzinomen vom Typ 2 untersucht, von denen alle positiv in der pVHL-IHC waren. Praktisch alle Fälle waren zudem stark angefärbt. Vergleichbare Studien sind bereits weiter oben im Rahmen der pNZK Typ 1 behandelt, da in keiner Publikation die beiden Subtypen gesondert betrachtet wurden. Ebenso wie bei den anderen untersuchten Tumor-entitäten korrelierte keiner der klinisch-pathologischen Parameter der pNZK Typ 2 signifikant mit der Immunhistochemie von pVHL. Die Sensitivität von pVHL in der Diagnostik von pNZK Typ 2 ist hervorragend, ebenso wie der NPW. Somit macht auch hier eine fehlende Anfärbbarkeit mit einem pVHL-Antikörper diese Entität sehr unwahrscheinlich.

**Tabelle 39. Zusammenfassung der statistischen Untersuchung der Immunhistochemie von pVHL zwischen den verschiedenen Karzinomen**

Karzinom 1	häufigste Färbekategorie	Karzinom 2	häufigste Färbekategorie	p-Wert	Test
DBK	positiv (100 %)	UK	positiv (84 %)	<b>0,028</b>	exakter Fisher-Test
DBK	positiv (100 %)	pNZK Typ 1	positiv (100 %)	---	---
DBK	positiv (100 %)	pNZK Typ 2	positiv (100 %)	---	---
UK	positiv (84 %)	pNZK Typ 1	positiv (100 %)	<b>0,008</b>	exakter Fisher-Test
UK	positiv (84 %)	pNZK Typ 2	positiv (100 %)	<b>0,03</b>	exakter Fisher-Test
pNZK Typ 1	positiv (100 %)	pNZK Typ 2	positiv (100 %)	---	---

Die Tabelle fasst die Ergebnisse aus Kapitel 3.4. zusammen, in dem die verschiedenen Karzinome bezüglich ihrer Expression von pVHL mittels einer Kreuztabelle verglichen wurden. Signifikante p-Werte sind hervorgehoben. In drei Fällen war eine Berechnung nicht möglich, da jeweils alle Fälle eine positive Immunhistochemie zeigten. **Abkürzungen:** DBK= Ductus Bellini-Karzinom, UK= Urothelkarzinom, pNZK= papilläres Nierenzellkarzinom

Betrachtet man die verschiedenen Profile der untersuchten Tumoren in der pVHL-IHC, so lässt sich nur das Urothelkarzinom des oberen Harntrakts vom Ductus Bellini- und den papillären Nierenzellkarzinomen abgrenzen (Tab. 39). Die PPW der pVHL-Immunhistochemie sind in allen Karzinomen unzureichend, die NPW für die Ductus Bellini- und die papillären Nierenzellkarzinome allerdings sehr gut. Hinweisend können demnach lediglich negative Ergebnisse in der pVHL-IHC sein, da sie sowohl Ductus Bellini- als auch papilläre Nierenzellkarzinome unwahrscheinlich machen. Das könnte Antikörper gegen pVHL zu einem Diagnostikum machen, zum Beispiel in der Differentialdiagnostik von Metastasen. Diese Indikation wurde allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

#### 4.4. Zusammenfassende Diskussion der immunhistochemischen Ergebnisse

Insgesamt zeigten sich bei der Auswertung der Immunhistochemie von insgesamt 35 Ductus Bellini-, 25 Urothel- und 87 papillären Nierenzellkarzinomen einige Auffälligkeiten.

Von den 35 Ductus Bellini-Karzinomen waren jeweils elf Karzinome positiv in der p63- bzw. negativ in der pax8-Färbung, davon neun Fälle gleichzeitig p63-positiv und pax8-negativ. Dieser Umstand ist insofern bemerkenswert, als dieses Profil etwa von Albadine et al. (2) als charakteristisch für ein Urothelkarzinom angesehen wird. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten sich praktisch alle UK p63-positiv und pax8-negativ. Bei den papillären Nierenzellkarzinomen trat das Profil pax8-negativ und

p63-positiv nur in zwei von 87 Fällen auf. Die oben erwähnten neun pax8-negativen und p63-positiven Ductus Bellini-Karzinome waren bezüglich ihrer klinisch-pathologischen Daten sehr heterogen: Das Alter reichte von 48 bis 87 Jahre und es handelte sich um sechs Männer bzw. drei Frauen. Ca. 78% zeigten ein Tumorstadium von mindestens pT3. Bei einer fehlenden Angabe hatten fünf Patienten keine Lymphknotenmetastasen, drei waren hingegen im Stadium pN2. Sechs Patienten hatten Fernmetastasen (ebenfalls eine fehlende Angabe). Alle Tumoren hatten im UICC-Grading den Grad 3. Insgesamt zeigen diese neun Fälle jedoch keine richtungsweisenden Gemeinsamkeiten, die sie deutlich von den anderen DBK abgrenzen würden. Eine mögliche Erklärung ist, dass es sich bei den Fällen um fehldiagnostizierte Urothelkarzinome handelt. Dieser Umstand ist denkbar, sind doch die meisten Tumoren weit fortgeschritten und alle schlecht differenziert. Allerdings wurden die Ductus Bellini-Karzinome von zwei erfahrenen Pathologen re-evaluiert. Letztendlich ist die Tatsache, dass die neun DBK ein UK-Profil in der IHC zeigen, mit den vorliegenden Daten nicht zu erklären. Weitergehende Untersuchungen sind dazu nötig.

Neun papilläre Nierenzellkarzinome vom Typ 1 waren positiv in der p63-Färbung. Bedeutsame Unterschiede zu den anderen Typ 1-Karzinomen traten aber nicht auf, sodass dieser Umstand im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht geklärt werden kann. Ebenso waren 13 pNZK Typ 1 negativ in der pax8-IHC, obwohl dieses Protein als nierenspezifischer Transkriptionsfaktor angesehen wird. Auch hier waren die klinisch-pathologischen Daten denen der pax8-positiven Karzinome sehr ähnlich. Darüber hinaus war ein beträchtlicher Anteil der papillären Nierenzellkarzinome vom Typ 2 negativ in der pax8-IHC, es waren immer ca. 39% der 33 Fälle, wobei sich wieder die pax8-positiven und die negativen pNZK Typ 2 in den klinisch-pathologischen Parametern nicht auffällig unterschieden. Demnach trat sowohl bei den Ductus Bellini- als auch bei den papillären Nierenzellkarzinomen eine relevante Anzahl von Fällen auf, die in der Immunhistochemie keine Anfärbung von pax8 zeigten. Wie bereits weiter oben erörtert wurde, ist ein fehlender Nachweis eines Proteins in der IHC in keinem Fall mit einer Deletion oder einem Funktionsverlust des zugehörigen Gens gleichzusetzen. Es gilt auch die Halbwertszeit des Proteins zu bedenken, ebenso wie die Frage, ob das Protein in der adulten, tumorösen Niere konstitutiv exprimiert wird.

Betrachtet man die immunhistochemischen Profile von p63, pax8 und pVHL der Ductus Bellini-, Urothel- und papillären Nierenzellkarzinome zusammen, so ist das DBK eher den Nierenzellkarzinomen (repräsentiert durch die pNZK) zuzuordnen. Die Expression von p63 und pax8 unterscheidet sich zwischen Ductus Bellini- und Urothelkarzinomen des oberen Harntrakts sehr deutlich, weniger eindeutig ist es bei der Expression von pVHL. Insgesamt eignen sich von den untersuchten Antikörpern somit vor allem p63 und pax8 in der Differentialdiagnostik von Ductus Bellini-Karzinomen, um ein mögliches Urothelkarzinom auszuschließen. DBK und pNZK lassen sich mit den drei untersuchten Antikörpern nur schlecht voneinander abgrenzen, hierzu sind weitere

Untersuchungen mit erweiterten Antikörperpanels nötig. Ob das immunhistochemische Profil von Ductus Bellini- auch den anderen Nierenzellkarzinomen (wie klarzelligen oder chromophoben) ähnelt, kann diese Arbeit nicht beantworten und bedarf weiterer Untersuchungen. In unseren Analysen (12) von DBK mit der CGH-Methode bestätigte sich die Hypothese, dass es sich bei Ductus Bellini- und Urothelkarzinomen um unterschiedliche Entitäten handelt. Auf zytogenetischer Ebene unterschieden sich die beiden Tumoren deutlich. Allerdings fanden sich in DBK auch keine charakteristischen Aberrationen von klarzelligen oder papillären Nierenzellkarzinomen. Somit ordnen unsere immunhistochemischen Untersuchungen das Ductus Bellini-Karzinom den Nierenzellkarzinomen zu. Die Ergebnisse der CGH legen zusätzlich nahe, dass es sich beim DBK um eine eigene Entität innerhalb der Nierenzellkarzinome handelt.

Wie bereits mehrfach in dieser Arbeit erwähnt wurde, ist kein etabliertes Therapieprotokoll für Ductus Bellini-Karzinome verfügbar. Es wird diskutiert, ob, neben der Operation, eher die adjuvanten Therapien des Urothel- oder des Nierenzellkarzinoms zum Einsatz kommen sollten. Da auch diese Arbeit die Ductus Bellini- den Nierenzellkarzinomen zuordnet, erscheint es sinnvoll, die aktuellen targeted therapies des NZK auch im Rahmen des DBK genaueren prospektiven Untersuchungen zu unterziehen. Hierbei ist auch zu überlegen, ob vermeintliche Fälle von Ductus Bellini-Karzinomen, die in der Immunhistochemie das charakteristische Profil von Urothelkarzinomen aufweisen (siehe oben), nicht wie ein Urothelkarzinom therapiert werden sollten.

## 5. Literatur

1. Abern MR, Tsivian M, Polascik TJ, Coogan CL (2012) Characteristics and outcomes of tumors arising from the distal nephron. *Urology* 80:140-146
2. Albadine R, Schultz L, Illei P, Ertoy D, Hicks J, Sharma R, Epstein JI, Netto GJ (2010) PAX8 (+)/p63 (-) immunostaining pattern in renal collecting duct carcinoma (CDC): a useful immunoprofile in the differential diagnosis of CDC versus urothelial carcinoma of upper urinary tract. *The American Journal of Surgical Pathology* 34:965-969
3. Allocati N, Di Ilio C, De Laurenzi V (2012) P63/p73 in the Control of Cell Cycle and Cell Death. *Experimental cell research* 318:1285-1290
4. Amin MB, Corless CL, Renshaw AA, Tickoo SK, Kubus J, Schultz DS (1997) Papillary (chromophil) renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 62 cases. *The American Journal of Surgical Pathology* 21:621-635
5. Ansari J, Fatima A, Chaudhri S, Bhatt RI, Wallace M, James ND (2009) Sorafenib induces therapeutic response in a patient with metastatic collecting duct carcinoma of kidney. *Onkologie* 32:44-46
6. Antonelli A, Portesi E, Cozzoli A, Zanotelli T, Tardanico R, Balzarini P, Grigolato PG, Cosciani Cunico S (2003) The collecting duct carcinoma of the kidney: a cytogenetical study. *European urology* 43:680-685
7. Arjumand W and Sultana S (2012) Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 33:9-16
8. Avery AK, Beckstead J, Renshaw AA, Corless CL (2000) Use of antibodies to RCC and CD10 in the differential diagnosis of renal neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology* 24:203-210
9. Baldewijns MM, van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, van Engeland M, de Bruine AP (2010) VHL and HIF signalling in renal cell carcinogenesis. *The Journal of pathology* 221:125-138
10. Barr FG (1997) Chromosomal translocations involving paired box transcription factors in human cancer. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29:1449-1461
11. Battifora H (1986) The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 55:244-248
12. Becker F, Junker K, Parr M, Hartmann A, Fussell S, Toma M, Grobholz R, Pflugmann T, Wullich B, Strauss A, Behnes CL, Otto W, Stockle M, Jung V (2013) Collecting duct carcinomas represent a unique tumor entity based on genetic alterations. *PloS one* 8:e78137
13. Bortz J and Lienert GA (2008) *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung: Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben ; mit 97 Tabellen sowie zahlreichen Formeln.* Springer Medizin, Heidelberg
14. Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubuser A, Busslinger M (2002) Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes & development* 16:2958-2970
15. Bubendorf L (2001) High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *European urology* 40:231-238
16. Buza N, Cohen PJ, Pei H, Parkash V (2010) Inverse p16 and p63 expression in small cell carcinoma and high-grade urothelial cell carcinoma of the urinary bladder. *International journal of surgical pathology* 18:94-102
17. Calzada MJ (2010) Von Hippel-Lindau syndrome: molecular mechanisms of the disease. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 12:160-165

18. Carvalho JC, Thomas DG, McHugh JB, Shah RB, Kunju LP (2012) p63, CK7, PAX8 and INI-1: an optimal immunohistochemical panel to distinguish poorly differentiated urothelial cell carcinoma from high-grade tumours of the renal collecting system. *Histopathology* 60:597-608
19. Chi N and Epstein JA (2002) Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends in genetics* : TIG 18:41-47
20. Comperat E, Camparo P, Haus R, Chartier-Kastler E, Bart S, Delcourt A, Houlgatte A, Francois R, Capron F, Vieillefond A (2006) Immunohistochemical expression of p63, p53 and MIB-1 in urinary bladder carcinoma. A tissue microarray study of 158 cases. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 448:319-324
21. Corless CL, Kibel AS, Iliopoulos O, Kaelin WG, Jr (1997) Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Human pathology* 28:459-464
22. Davenport JR and Yoder BK (2005) An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *American journal of physiology. Renal physiology* 289:F1159-69
23. Delahunt B and Eble JN (1997) Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 10:537-544
24. Dimopoulos MA, Logothetis CJ, Markowitz A, Sella A, Amato R, Ro J (1993) Collecting duct carcinoma of the kidney. *British journal of urology* 71:388-391
25. Eble JN and International Agency for Research on Cancer (2004) Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. IARC-Press, Lyon
26. Esteban-Barragan MA, Avila P, Alvarez-Tejado M, Gutierrez MD, Garcia-Pardo A, Sanchez-Madrid F, Landazuri MO (2002) Role of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in the formation of beta1-integrin fibrillar adhesions. *Cancer research* 62:2929-2936
27. Flores ER (2007) The roles of p63 in cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6:300-304
28. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C (1982) Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 6:655-663
29. Fuzesi L, Cober M, Mittermayer C (1992) Collecting duct carcinoma: cytogenetic characterization. *Histopathology* 21:155-160
30. Graziano V and De Laurenzi V (2011) Role of p63 in cancer development. *Biochimica et biophysica acta* 1816:57-66
31. Grunberger B (2011) Systemic treatment of renal cell carcinoma - recent update. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 161:382-386
32. Gruss P and Walther C (1992) Pax in development. *Cell* 69:719-722
33. Haase VH (2006) The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney international* 69:1302-1307
34. Hammerschmied CG, Walter B, Hartmann A (2008) Renal cell carcinoma 2008. *Histopathology, molecular genetics and new therapeutic options. Der Pathologe* 29:354-363
35. Hautmann R (2010) *Urologie.*
36. Herrmann E, Trojan L, Becker F, Wulfing C, Schrader AJ, Barth P, Stockle M, Hammerschmied CG, Staehler M, Stief C, Haferkamp A, Hohenfellner M, Legal W, Wullich B, Bolenz C, Klein T, Noldus J, Bierer S, Hertle L, Brenner W, Roos F, Michel MS, Walter B, Wieland W, Gerss J, Otto W, Hartmann A (2010) Prognostic factors of papillary renal cell carcinoma: results from a multi-institutional series after pathological review. *The Journal of urology* 183:460-466



37. Hu Y, Hartmann A, Stoehr C, Zhang S, Wang M, Tacha D, Montironi R, Lopez-Beltran A, Cheng L (2012) PAX8 is expressed in the majority of renal epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 223 cases using a mouse monoclonal antibody. *Journal of clinical pathology* 65:254-256
38. Jun S and Desplan C (1996) Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* (Cambridge, England) 122:2639-2650
39. Kaelin WG, Jr (2010) New cancer targets emerging from studies of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1210:1-7
40. Kafe H, Verbavatz JM, Cochand-Priollet B, Castagnet P, Vieillefond A (2004) Collecting duct carcinoma: an entity to be redefined? *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 445:637-640
41. Karakiewicz PI, Trinh QD, Rioux-Leclercq N, de la Taille A, Novara G, Tostain J, Cindolo L, Ficarra V, Artibani W, Schips L, Zigeuner R, Mulders PF, Lechevallier E, Coulange C, Valeri A, Descotes JL, Rambeaud JJ, Abbou CC, Lang H, Jacqmin D, Mejean A, Patard JJ (2007) Collecting duct renal cell carcinoma: a matched analysis of 41 cases. *European urology* 52:1140-1145
42. Kim M, Yan Y, Lee K, Sgagias M, Cowan KH (2004) Ectopic expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells and regresses tumor growth of 786-O cells in nude mouse. *Biochemical and biophysical research communications* 320:945-950
43. Kim WY and Kaelin WG (2004) Role of VHL gene mutation in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22:4991-5004
44. Klatte T, Remzi M, Zigeuner RE, Mannweiler S, Said JW, Kabbinavar FF, Haitel A, Waldert M, de Martino M, Marberger M, Belldegrun AS, Pantuck AJ (2010) Development and external validation of a nomogram predicting disease specific survival after nephrectomy for papillary renal cell carcinoma. *The Journal of urology* 184:53-58
45. Kobayashi N, Matsuzaki O, Shirai S, Aoki I, Yao M, Nagashima Y (2008) Collecting duct carcinoma of the kidney: an immunohistochemical evaluation of the use of antibodies for differential diagnosis. *Human pathology* 39:1350-1359
46. Kovacs G, Fuzesi L, Emanuel A, Kung HF (1991) Cytogenetics of papillary renal cell tumors. *Genes, chromosomes & cancer* 3:249-255
47. Kunju LP, Mehra R, Snyder M, Shah RB (2006) Prostate-specific antigen, high-molecular-weight cytokeratin (clone 34betaE12), and/or p63: an optimal immunohistochemical panel to distinguish poorly differentiated prostate adenocarcinoma from urothelial carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* 125:675-681
48. Kurban G, Duplan E, Ramlal N, Hudon V, Sado Y, Ninomiya Y, Pause A (2008) Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2. *Oncogene* 27:1004-1012
49. Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA (2007) PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical pharmacology* 73:1-14
50. Langner C, Hutterer G, Chromecki T, Rehak P, Zigeuner R (2006) Patterns of invasion and histological growth as prognostic indicators in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* 448:604-611
51. Langner C, Ratschek M, Tsybrovskyy O, Schips L, Zigeuner R (2003) P63 immunoreactivity distinguishes upper urinary tract transitional-cell carcinoma and renal-cell carcinoma even in poorly differentiated tumors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 51:1097-1099
52. Leroy X, Zini L, Leteurtre E, Zerimech F, Porchet N, Aubert JP, Gosselin B, Copin MC (2002) Morphologic subtyping of papillary renal cell carcinoma: correlation with prognosis and differential expression of MUC1 between the two subtypes. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15:1126-1130

53. Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G (2000) The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *Journal of cell science* 113 ( Pt 10):1661-1670
54. Li B and Ding Q (2012) A case report of collecting duct carcinoma of the kidney coexistent with giant adrenal myelolipoma. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada* 6:E97-E100
55. Lin F, Shi J, Liu H, Zhang J, Zhang PL, Wang HL, Yang XJ, Schuerch C (2008) Immunohistochemical detection of the von Hippel-Lindau gene product (pVHL) in human tissues and tumors: a useful marker for metastatic renal cell carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary and uterus. *American Journal of Clinical Pathology* 129:592-605
56. Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE (2007) *Biochemie und Pathobiochemie*.
57. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R (2003) c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer metastasis reviews* 22:309-325
58. MacLennan GT, Farrow GM, Bostwick DG (1997) Low-Grade Collecting Duct Carcinoma of the Kidney: Report of 13 Cases of Low-Grade Mucinous Tubulocystic Renal Carcinoma of Possible Collecting Duct Origin.
59. Mansouri A, Stoykova A, Gruss P (1994) Pax genes in development. *Journal of cell science*. Supplement 18:35-42
60. May M, Ficarra V, Shariat SF, Zigeuner R, Chromecki T, Cindolo L, Burger M, Gunia S, Feciche B, Wenzl V, Aziz A, Chun F, Becker A, Pahernik S, Simeone C, Longo N, Zucchi A, Antonelli A, Mirone V, Stief C, Novara G, Brookman-May S, Members of the CORONA and SATURN projects, and the Young Academic Urologists Renal Cancer Group (2013) Impact of Clinical and Histopathological Parameters on Disease Specific Survival in Patients with Collecting Duct Renal Cell Carcinoma: Development of a Disease Specific Risk Model. *The Journal of urology*
61. Mejean A, Roupert M, Larousserie F, Hopirtean V, Thiounn N, Dufour B (2003) Is there a place for radical nephrectomy in the presence of metastatic collecting duct (Bellini) carcinoma? *The Journal of urology* 169:1287-1290
62. Mihara M, Nimura Y, Ichimiya S, Sakiyama S, Kajikawa S, Adachi W, Amano J, Nakagawara A (1999) Absence of mutation of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer* 79:164-167
63. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ (2006) Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24:5552-5564
64. Miyake H, Haraguchi T, Takenaka A, Fujisawa M (2011) Metastatic collecting duct carcinoma of the kidney responded to sunitinib. *International journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology* 16:153-155
65. Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ (2000) Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer* 89:604-614
66. Moll R, Wu X, Lin J, Sun T (1995) Uroplakins, Specific Membrane Proteins of Urothelial Umbrella Cells, as Histological Markers of Metastatic Transitional Cell Carcinomas.
67. Nalris M, Grote D, Gaitan Y, Boualia SK, Bouchard M (2007) Pax2 and pax8 regulate branching morphogenesis and nephron differentiation in the developing kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 18:1121-1129
68. Nauli SM and Zhou J (2004) Polycystins and mechanosensation in renal and nodal cilia. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26:844-856
69. Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, Whaley JM, Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Gavin BJ, Kley N, Kaelin WG, Jr, Iliopoulos O (1998) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Molecular cell* 1:959-968
70. Ordonez NG (2012) Value of PAX2 immunostaining in tumor diagnosis: a review and update. *Advances in Anatomic Pathology* 19:401-409

71. Orsola A, Trias I, Raventos CX, Espanol I, Cecchini L, Orsola I (2005) Renal collecting (Bellini) duct carcinoma displays similar characteristics to upper tract urothelial cell carcinoma. *Urology* 65:49-54
72. Ozcan A, Shen SS, Hamilton C, Anjana K, Coffey D, Krishnan B, Truong LD (2011) PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 24:751-764
73. Park BJ, Lee SJ, Kim JI, Lee SJ, Lee CH, Chang SG, Park JH, Chi SG (2000) Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer research* 60:3370-3374
74. Perez-Montiel D, Wakely PE, Hes O, Michal M, Suster S (2006) High-grade urothelial carcinoma of the renal pelvis: clinicopathologic study of 108 cases with emphasis on unusual morphologic variants. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19:494-503
75. Pickhardt PJ, Siegel CL, McLarney JK (2001) Collecting duct carcinoma of the kidney: are imaging findings suggestive of the diagnosis? *AJR.American journal of roentgenology* 176:627-633
76. Pignot G, Elie C, Conquy S, Vieillefond A, Flam T, Zerbib M, Debre B, Amsellem-Ouazana D (2007) Survival analysis of 130 patients with papillary renal cell carcinoma: prognostic utility of type 1 and type 2 subclassification. *Urology* 69:230-235
77. Poulsen ML, Budtz-Jorgensen E, Bisgaard ML (2010) Surveillance in von Hippel-Lindau disease (vHL). *Clinical genetics* 77:49-59
78. Raman JD and Scherr DS (2007) Management of patients with upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Nature clinical practice.Urology* 4:432-443
79. Remmele W and Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe* 8:138-140
80. Riede U and Bianchi L (2004) *Allgemeine und spezielle Pathologie: 168 Tabellen*. Thieme, Stuttgart
81. Rink M, Adam M, Hansen J, Chun FK, Ahyai SA, Remzi M, Schlomm T, Engel O, Heuer R, Eichelberg C, Fisch M, Dahlem R, Shariat SF (2012) Upper tract urothelial carcinoma. An update on clinical and pathological prognostic factors. *Der Urologe.Ausg.A* 51:1228-1239
82. Rink M, Robinson BD, Green DA, Cha EK, Hansen J, Comploj E, Margulis V, Raman JD, Ng CK, Remzi M, Bensalah K, Kabbani W, Haitel A, Rioux-Leclercq N, Guo CC, Chun FK, Kikuchi E, Kassouf W, Sircar K, Sun M, Sonpavde G, Lotan Y, Pycha A, Karakiewicz PI, Scherr DS, Shariat SF (2012) Impact of histological variants on clinical outcomes of patients with upper urinary tract urothelial carcinoma. *The Journal of urology* 188:398-404
83. Rosette, Johan Jozef Maria Catharine Hubertus de la, Sternberg CN, van Poppel HPA (2008) *Renal cell cancer: diagnosis and therapy*. Springer, London
84. Saito K, Kawakami S, Okada Y, Takazawa R, Koga F, Kageyama Y, Kihara K (2006) Spatial and isoform specific p63 expression in the male human urogenital tract. *The Journal of urology* 176:2268-2273
85. Sanders ME, Mick R, Tomaszewski JE, Barr FG (2002) Unique patterns of allelic imbalance distinguish type 1 from type 2 sporadic papillary renal cell carcinoma. *The American journal of pathology* 161:997-1005
86. Schoenberg M, Cairns P, Brooks JD, Marshall FF, Epstein JI, Isaacs WB, Sidransky D (1995) Frequent loss of chromosome arms 8p and 13q in collecting duct carcinoma (CDC) of the kidney. *Genes, chromosomes & cancer* 12:76-80
87. Schraml P, Hergovich A, Hatz F, Amin MB, Lim SD, Krek W, Mihatsch MJ, Moch H (2003) Relevance of nuclear and cytoplasmic von hippel lindau protein expression for renal carcinoma progression. *The American journal of pathology* 163:1013-1020

88. Schraml P, Muller D, Bednar R, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H (2000) Allelic loss at the D9S171 locus on chromosome 9p13 is associated with progression of papillary renal cell carcinoma. *The Journal of pathology* 190:457-461
89. Seitz M, Zaak D, Knüchel-Clarke R, Stief C (2005) Urinary bladder tumours.
90. Srigley JR and Eble JN (1998) Collecting duct carcinoma of kidney. *Seminars in diagnostic pathology* 15:54-67
91. Staehler M, Haseke N, Zilinberg K, Stadler T, Karl A, Stief CG (2008) Systemic therapy of metastasizing renal cell carcinoma. *Der Urologe.Ausg.A* 47:1357-1367
92. Staehler M, Schoppler G, Haseke N, Stadler T, Karl A, Siebels M, Ihrler S, Stief CG (2009) Carcinoma of the collecting ducts of Bellini of the kidney: adjuvant chemotherapy followed by multikinase inhibition with sunitinib. *Clinical genitourinary cancer* 7:58-61
93. Stapleton P, Weith A, Urbanek P, Kozmik Z, Busslinger M (1993) Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX-9. *Nature genetics* 3:292-298
94. Stoehr R and Hartmann A (2007) Histopathology and molecular genetics of bladder cancer.
95. Stuart ET and Gruss P (1996) PAX: developmental control genes in cell growth and differentiation. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 7:405-412
96. Suarez C, Morales R, Munoz E, Rodon J, Valverde CM, Carles J (2010) Molecular basis for the treatment of renal cell carcinoma. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 12:15-21
97. Tang N, Mack F, Haase VH, Simon MC, Johnson RS (2006) pVHL function is essential for endothelial extracellular matrix deposition. *Molecular and cellular biology* 26:2519-2530
98. Tokuda N, Naito S, Matsuzaki O, Nagashima Y, Ozono S, Igarashi T, Japanese Society of Renal Cancer (2006) Collecting duct (Bellini duct) renal cell carcinoma: a nationwide survey in Japan. *The Journal of urology* 176:40-3; discussion 43
99. Tong GX, Yu WM, Beaubier NT, Weeden EM, Hamele-Bena D, Mansukhani MM, O'Toole KM (2009) Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical study. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 22:1218-1227
100. Torban E and Goodyer P (1998) What PAX genes do in the kidney. *Experimental nephrology* 6:7-11
101. Treisman J, Harris E, Desplan C (1991) The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes & development* 5:594-604
102. van der Meijden AP, Sylvester R, Oosterlinck W, Solsona E, Boehle A, Lobel B, Rintala E, EAU Working Party on Non Muscle Invasive Bladder Cancer (2005) EAU guidelines on the diagnosis and treatment of urothelial carcinoma in situ. *European urology* 48:363-371
103. Velickovic M, Delahunt B, Storkel S, Grebem SK (2001) VHL and FHIT locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. *Cancer research* 61:4815-4819
104. Verdorfer I, Culig Z, Hobisch A, Bartsch G, Hittmair A, Duba HC, Erdel M (1998) Characterisation of a collecting duct carcinoma by cytogenetic analysis and comparative genomic hybridisation. *International journal of oncology* 13:461-464
105. Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P (1987) A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *Journal of immunological methods* 103:121-129
106. Weiß C (2010) Basiswissen Medizinische Statistik.

107. Wittekind C, Meyer H, International Union against Cancer (2010) TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-Blackwell, Weinheim
108. Wright JL, Risk MC, Hotaling J, Lin DW (2009) Effect of collecting duct histology on renal cell cancer outcome. The Journal of urology 182:2595-2599
109. Yamashita S, Ioritani N, Oikawa K, Aizawa M, Endoh M, Arai Y (2007) Morphological subtyping of papillary renal cell carcinoma: clinicopathological characteristics and prognosis. International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association 14:679-683
110. Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F (2002) On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. Trends in genetics : TIG 18:90-95
111. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F (1998) P63, a P53 Homolog at 3q27-29, Encodes Multiple Products with Transactivating, Death-Inducing, and Dominant-Negative Activities. Molecular cell 2:305-316
112. Yang A and McKeon F (2000) P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. Nature reviews.Molecular cell biology 1:199-207
113. Zigeuner R, Tsybrovskyy O, Ratschek M, Rehak P, Lipsky K, Langner C (2004) Prognostic impact of p63 and p53 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. Urology 63:1079-1083

## 6. Anhang

### 6.1 Färbeprotokoll am Färbeautomat „Ventana Benchmark XT“

**Protokoll-Nr. 68 : p 63 (11.06.2010)**

**Prozedur: XT ultraView DAB v3**

**BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul**

Schritt-Nr	Protokollschritt
1	***** EZ Prep Auswählen *****
2	***** Getimete Schritte Starten *****
3	***** Mischer Aus *****
4	Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C, und für 4 Minuten inkubieren
5	EZPrep Vol. ausgleichen
6	Objektträger waschen
7	EZPrep Vol. ausgleichen
8	Objektträger waschen
9	EZPrep Vol. ausgleichen
10	Coverslip auftragen
11	Aufheizen des Objektträgers bis 76 °C, und für 4 Minuten inkubieren
12	Objektträger waschen
13	Deparaffinierung Vol. ausgleichen
14	Coverslip auftragen
15	Objektträger-Heizung ausschalten
16	***** Mischer An *****
17	[ Kurz- 8 Minuten Conditioning ]
18	Objektträger waschen
19	Cell Conditioner Nr.1 lang auftragen
20	Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
21	***** SSC Wash Auswählen *****
22	Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C, und für 8 Minuten inkubieren
23	[ Mild - 30 Minuten Conditioning ]
24	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
25	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
26	Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C, und für 4 Minuten inkubieren
27	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
28	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
29	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
30	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
31	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
32	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
33	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
34	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
35	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
36	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
37	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
38	[ Standard - 60 Minuten Conditioning ]
39	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
40	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
41	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
42	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
43	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
44	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
45	Cell Conditioner Nr.1 auftragen

\* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe

Seite 1 von 3

NexES v10.6

**Protokoll-Nr. 68 : p 63 (11.06.2010)**  
**Prozedur: XT ultraView DAB v3**  
**BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul**

Schritt-Nr	Protokollschritt
46	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
47	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
48	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
49	Cell Cond Nr.1 kurz auftragen
50	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
51	Cell Conditioner Nr.1 auftragen
52	Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
53	Objekträger-Heizung ausschalten
54	Inkubieren für 8 Minuten
55	Spülen mit Reaktionspuffer
56	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
57	Coverslip auftragen
58	Spülen mit Reaktionspuffer
59	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
60	Coverslip auftragen
61	***** Synchronisieren der Prozeduren
62	Aufheizen des Objekträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
63	Spülen mit Reaktionspuffer
64	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
65	1 Tropfen UV INHIBITOR auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
66	Spülen mit Reaktionspuffer
67	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
68	Coverslip auftragen
69	Aufheizen des Objekträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
70	Spülen mit Reaktionspuffer
71	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
72	Coverslip auftragen
73	1 Tropfen [PREP KIT 107] (Antikörper), und für [0 Stunden 32 Min] inkubieren.
74	Spülen mit Reaktionspuffer
75	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
76	Coverslip auftragen
77	Aufheizen des Objekträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
78	Spülen mit Reaktionspuffer
79	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
80	1 Tropfen UV HRP UNIV MULT auftragen, Coverslip auftragen, und für 8 Minuten inkubieren.
81	Spülen mit Reaktionspuffer
82	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
83	Coverslip auftragen
84	Spülen mit Reaktionspuffer
85	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
86	1 Tropfen UV DAB und einen Tropfen UV DAB H2O2 auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren.
87	Spülen mit Reaktionspuffer
88	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
89	1 Tropfen UV COPPER auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
90	Spülen mit Reaktionspuffer

\* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe

Seite 2 von 3

NexES v10.6

## Protokoll-Nr. 68 : p 63 (11.06.2010)

### Prozedur: XT ultraView DAB v3

#### BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul

Schritt-Nr	Protokollschritt
91	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
92	1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] ( Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
93	Spülen mit Reaktionspuffer
94	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
95	Coverslip auftragen
96	Spülen mit Reaktionspuffer
97	Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
98	1 Tropfen von [BLUING REAGENT] ( Nach-Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.
99	Spülen mit Reaktionspuffer
100	Coverslip auftragen
101	Objekträger-Heizung ausschalten
102	***** Optionalen Waschvorgang Auswählen *****
103	***** SSC Wash Auswählen *****
104	***** Getimete Schritte Starten *****
105	Spülen mit Reaktionspuffer

\* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe

Seite 3 von 3

NexES v10.6

#### Abbildung 18. Protokoll der automatisierten immunhistochemischen Färbung am Beispiel von p63

Nach dem abschließenden Spülgang entwässerte ich die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit Ethanol (70%, 100%) und Xylol und deckte sie mit Neo-Mount (Merck KGaA) ein.

Erläuterungen zu den verwendeten Reagenzien und Herstellerinformationen:

- EZ Prep Concentrate (Ventana Medical Systems, Inc., REF 950-102) ist eine Lösung, die zur Deparaffinierung der OT dient, indem sie die Oberflächenspannung erniedrigt und so das Abspülen des erwärmten Paraffins erleichtert.
- Liquid Coverslip (LCS) (Ventana, REF 650-010) ist eine ölhaltige Lösung, die vom Automaten als Schutz über die wässrigen Reagenzien, die sich direkt auf dem OT befinden, aufgetragen wird und so eine Barriere gegen die Luft bildet und ein Verdunsten der Reagenzien verhindert. Außerdem können nachträglich aufgetragene wässrige Lösung durch die LCS-Schicht hindurch in die wässrige Schicht auf dem OT gelangen, da die Dichte von LCS erheblich geringer als die von Wasser ist.
- Cell Conditioning Solution Nr. 1 (Ventana, REF 950-124) ist ein Tris-basierter Puffer, der kovalente Bindungen hydrolysieren kann. Solche Bindungen entstehen durch die Fixation mit Formalin. Werden diese entfernt, ist eine höhere Aufnahmefähigkeit für den Antikörper möglich.
- Reaction Buffer (Ventana, REF 950-300) ist eine Tris-basierte Pufferlösung mit einem pH-Wert von ca. 7,2. Sie dient der Reinigung, sorgt für eine stabile wässrige Umgebung auf den



OT, wie sie zum Beispiel bei der Inkubation der Antikörper notwendig ist und ist auch zum Abspülen der ungebundenen Reagenzien vom OT notwendig. So wird eine weitere unerwünschte Reaktion in nachfolgenden Schritten verhindert.

- Universal DAB Detection Kit (Ventana, REF 760-500) ist ein indirektes, biotinfreies System zum Nachweis von Maus-IgG, Maus-IgM und Kaninchen-Primärantikörpern. Folgende Lösungen sind im diesem Set enthalten
  - Ultravision Inhibitor ist eine dreiprozentige Wasserstoffperoxid-Lösung ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  ist ein Substrat von Peroxidasen. Wird es im Überschuss zugegeben, wird die Aktivität dieser Enzyme blockiert. Die Inhibitor-Lösung soll die im Gewebe vorhandenen, endogenen Peroxidasen blockieren, welche die eigentliche spezifische Färbung verfälschen können.
  - Universal HRP Multimer-Lösung enthält ein Gemisch aus HRP-markierten Antikörpern (Ziege-Anti-Maus-IgG, Ziege-Anti-Maus-IgM und Ziege-Anti-Kaninchen). Diese Antikörper stellen die Sekundärantikörper dar, die an den eigentlichen Detektionsantikörper binden und anschließend die Färbereaktion auslösen.
  - Universal DAB Chromogen-Lösung enthält 0,2 % 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid. Dieses zuerst farblose Chromogen wird von der Meerrettich-Peroxidase oxidiert und nimmt dann eine Braunfärbung an.
  - Universal DAB  $H_2O_2$  enthält 0,04% Wasserstoffperoxid in einer Phosphatpufferlösung. Die Lösung stellt mit Wasserstoffperoxid das Substrat der Meerrettich-Peroxidase bei der Färbereaktion zur Verfügung.
  - Universal Copper-Lösung enthält Kupfersulfat in einem Acetatpuffer. Kupfer-Ionen katalysieren die Reaktion der Meerrettich-Peroxidase und verstärken so die Färbung.
  - Hämatoxylin-Lösung (Ventana, REF 760-2021) nach Gill dient der Gegenfärbung nach der immunhistochemischen Färbereaktion. So wird der Kontrast verstärkt und die spezifischen Färbungen sind besser zu erkennen. Hämatoxylin färbt unter anderem Zellkerne, Mitochondrien, Muzin, Hämoglobin, elastische Fasern und Kollagen.
  - Bluing Reagent-Lösung (Ventana, REF 760-2037) ist eine wasserhaltige Lösung aus gepuffertem Lithiumkarbonat. Die Lithium-Ionen und die Erhöhung des pH-Werts führen zu einer verstärkten Blaufärbung des Hämatoxylins.

## 7. Publikationen und Tagungsbeiträge

Becker F, Junker K, **Parr M**, Hartmann A, Fussel S, Toma M, Grobholz R, Pflugmann T, Wullich B, Strauss A, Behnes CL, Otto W, Stoeckle M, Jung V (2013) Collecting duct carcinomas represent a unique tumor entity based on genetic alterations. PloS one 8:e78137

**Parr M**, Becker F, Junker K, Hartmann A, Füssel S, Toma M, Otto W, Grobholz R, Schmitt K, Pflugmann T, Wullich B, Strauß A, Behnes CL, Kreiner B, Stöckle M, Jung V (2011) Immunhistochemische Untersuchung von Ductus Bellini-Karzinomen zur Abgrenzung gegenüber Urothelkarzinomen, Tagungsbeitrag zum 3. Symposium „Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie“, Jena

## 8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Stöckle für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken sowie Herrn Dr. rer. nat. Volker Jung für seine Betreuung, die konstruktiven Gespräche und seine Geduld. Auch dem restlichen Team der experimentellen Urologie, allen voran aber den Damen Eva Schmitt, Helga Angeli und Maria Link, gebührt mein Dank. Sie haben mir sehr bei meinem praktischen Einstieg in die Arbeit geholfen und mich stets mit wertvollen Tipps unterstützt. Nur so war ich in der Lage, nach der Einarbeitung die Färbungen allein zu erstellen. Genauso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle, dem Direktor des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, der mir die Urothelkarzinomfälle zur Verfügung gestellt hat, ebenso wie Herrn Prof. Dr. med. Rainer Grobholz, der mittlerweile das Pathologische Institut am Kantonsspital Aarau leitet. Auch den Herren Kai Schmitt und PD Dr. med. Yoo-Jin Kim danke ich für ihre stete Bereitschaft, Fragen zur Pathologie zu diskutieren sowie den Mitgliedern des Deutschen Netzwerks Nierenzelltumoren, ohne die mir eine solche Fallsammlung von Ductus Bellini-Karzinomen nicht möglich gewesen wäre. Darüber hinaus danke ich den Herren PD Dr. med. Michael Härle und Dr. med. Axel Gauer vom Pathologischen Institut in Kaiserslautern dafür, dass ich ihren Färbeautomaten nutzen durfte um die immunhistochemischen Färbungen anfertigen zu können sowie Frau Marina Eisenach für die praktische Einarbeitung und ihre Ratschläge. Die Möglichkeit, einen Färbeautomaten zu verwenden, ist der Qualität der Arbeit sehr zugute gekommen. Auch Herrn Dr. med. Peter Pfiester, dem ehemaligen Teilhaber des Pathologischen Instituts in Kaiserslautern, bin ich sehr dankbar für die Anleitung zur selbständigen Auswertung von immunhistochemischen Färbungen anhand eines Immunreaktiven Scores sowie die Möglichkeit zur Diskussion kritischer Fälle. Nicht zuletzt gebührt mein Dank Maryse und meiner Familie, die mich immer unterstützt und motiviert haben und durch die diese Arbeit erst möglich wurde.