

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Prävalenz und klinische Relevanz von 17p Deletionen und nukleärer p53 Protein Akkumulation beim Nierenzellkarzinom.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Navid Flamiano Shadanpour

aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg 2019

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.07.2019**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Kindler

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|---|
| 1. Einleitung | 4 |
| 2. Patienten und Methoden | 12 |
| 2.1. Patienten. | 12 |
| 2.2. Fluoreszenz in-situ Hybridisierung | 14 |
| 2.3. Immunhistochemie | 15 |
| 2.4. Statistik | 16 |
| 3. Ergebnisse | 16 |
| 3.1 17p13 Deletionen | 16 |
| 3.1.1 Technische Aspekte | 16 |
| 3.1.2 17p Deletionen und Tumortyp | 16 |
| 3.1.3 17p Deletionen und Tumorphänotyp | 18 |
| 3.1.4 17p Deletionen und Prognose | 21 |
| 3.2. p53 Immunhistochemie | 23 |
| 3.2.1 Technische Aspekte | 23 |
| 3.2.2. p53 Immunhistochemie und Tumortyp | 23 |
| 3.2.3. p53 Immunhistochemie und Tumorphänotyp | 25 |
| 3.2.4 p53 Immunhistochemie Befunde und Prognose | 28 |
| 3.3. p53 Immunhistochemie Befunde und 17p Deletionen | 31 |
| 4. Diskussion | 36 |
| 5. Zusammenfassung | 43 |
| 6. Abstract | 45 |
| 7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis | 47 |
| 7.1 Tabellenverzeichnis | 47 |
| 7.2 Abbildungsverzeichnis | 47 |
| 8. Literaturverzeichnis | 48 |
| 10. Lebenslauf | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| 11. Eidesstattliche Versicherung | 59 |

1. Einleitung

Maligne Nierentumoren gehören bei Männern und bei Frauen zu den 10 häufigsten malignen Tumor Erkrankungen. Ca. 15000 Personen erkrankten im Jahr 2013 in Deutschland neu an einem Nierentumor, wobei Männer etwas häufiger befallen sind als Frauen(1). Das mittlere Erkrankungsalter lag in diesem Jahr bei Männern bei 68 und bei Frauen bei 72 Jahren(1). Neben dem Alter gelten Rauchen, Übergewicht und Bluthochdruck als Risikofaktoren(2). Ebenfalls gehäuft kommen Nierentumoren bei Patienten mit chronischem Nierenversagen vor wie auch bei hereditären Tumor Syndromen. Hier wäre das Von-Hippel-Lindau-Syndrom, Birt-Hogg-Dubé-Syndrom, die hereditäre Leiomyomatose und auch das hereditäre papilläre Nierenzellkarzinom zu nennen(2). Während sich das Nierenkarzinom früher durch die Trias Flankenschmerz, Hämaturie und palpabler Tumor zu erkennen gab ist diese Situation zumindest in Deutschland heute selten geworden. Die meisten Nierenzellkarzinome werden als Zufallsbefunde im Rahmen von Untersuchungen mit bildgebenden Verfahren diagnostiziert(2). Dementsprechend hat es auch in den letzten Jahrzehnten eine immer größere Häufigkeit von früh diagnostizierten Nierenzellkarzinomen in den Stadien pT1 und pT2 gegeben. Die Therapie des Nierenkarzinoms besteht primär in der Entfernung des Tumors. Je nach Lokalisation und Ausdehnung des Tumors kann eine Tumorektomie erfolgen oder es muss die gesamte Niere entfernt werden(2). Eine Tumornephrektomie wird häufig auch dann durchgeführt, wenn bereits Metastasen vorliegen(2). Studien haben gezeigt, dass eine Reduzierung des „Tumorloads“ dabei helfen kann, das Tumorstadium einzuschränken(3). Die entfernten Nierentumoren werden histopathologisch untersucht, wobei der Pathologe insbesondere den Tumortyp festlegt und die prognostisch relevanten Parameter wie Differenzierungsgrad, pT Stadium und den Zustand der Resektionsränder. Falls Lymphknoten mit eingesandt werden wird auch der Lymphknoten Status, ein weiterer wichtiger Prognosefaktor definiert. Die histologische Festlegung des Tumortyps ist beim Nierenzellkarzinom schwieriger als bei vielen anderen Tumorarten, zumal eine breite Palette verschiedener histologischer Nierentumortypen bekannt sind. Die derzeitige WHO Einteilung von Nierentumoren ist in Tabelle 1 dargestellt. Die wichtigsten Tumortypen sind das klarzellige Karzinom, welches knapp 70% aller Nierentumoren ausmacht und das papilläre Nierenzellkarzinom mit ca. 20%. Darauf folgt das sogenannte chromophobe Nierenzellkarzinom welches gut 5% der Fälle ausmacht. Alle anderen Nierenzellkarzinomtypen sind so selten, dass mit Ausnahme

von einzelnen Tumorarten mit außerordentlich guter Prognose wie das tubulozystische Nierenzellkarzinom oder der multilokulär zystische Nierenzelltumor mit niedrigem malignem Potential keine spezifischen Erfahrungen über die Prognose oder gar ein Ansprechen auf besondere Behandlungsmodalitäten bestehen. Studien, welche beispielsweise speziell das muzinöse tubuläre und spindelzellige Nierenzellkarzinom, das medulläre Nierenzellkarzinom, Sammelrohrzinome oder Succinat-Dehydrogenase-Defizienz assoziierte Nierenzellkarzinome einschließen fehlen.

Tabelle 1: WHO Einteilung von Nierentumoren (modifiziert nach Moch, 2016, p. 128)

| | |
|---|---|
| <p>Epitheliale Nierenzelltumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Klarzelliges Nierenzellkarzinom - Multilokuläre zystische Neoplasie mit niedrigem Malignitätspotenzial - Papilläres Nierenzellkarzinom - Hereditäre Leiomyomatose assoziiertes Nierenzellkarzinom - Chromophobes Nierenzellkarzinom - Sammelrohrkarzinom - Medulläres Karzinom der Niere - MiT-Familie der Translokationskarzinome - Succinat-Dehydrogenase-Defizienz-assoziertes Nierenzellkarzinom - Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Nierenzellkarzinom - Tubulozystisches Nierenzellkarzinom - Nierenzellkarzinom assoziiert mit einer erworbenen zystischen Nierenerkrankung - Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom - Nierenzellkarzinom, nicht weiter klassifiziert - Papilläres Adenom - Onkozytom | <p>Mesenchymale Tumoren des Erwachsenen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Leiomyosarkom - Angiosarkom - Rhabdomyosarkom - Osteosarkom - Synoviales Sarkom - Ewing Sarkom - Angiomyolipom - Epitheloides Angiomyolipom, - Leiomyom - Hämangiom - Lymphangiom - Hämangioblastom - Juxtaglomerularzelltumor - Renomedullärer interstitieller Tumor - Solitärer fibröser Tumor |
| <p>Metanephrische Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Metanephrisches Adenom - Metanephrisches Adenofibrom - Metanephrischer Stromatumor | <p>Gemischt mesenchymale und epitheliale Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adultes Zystisches Nephrom - Gemischter Epithel- und Stromatumor |
| <p>Nephroblastische und zystische Tumoren des Kindes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nephrogene Reste - Nephroblastom - Zystisches partiell differenziertes Nephroblastom - Pädiatrisches zystisches Nephrom | <p>Neuroendokrine Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - hochdifferenzierter neuroendokriner Tumor - Großzelliges neuroendokrines Karzinom - Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom - Paragangliom |
| <p>Mesenchymale Tumoren</p> | <p>Gemischte Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hämatopoetische Tumoren der Niere - Keimzelltumoren |
| <p>Mesenchymale Tumoren des Kindes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Klarzell-Sarkom - Rhabdoid-Tumor - Kongenitales mesoblastisches Nephrom - Ossifizierender renaler Tumor des Säuglingsalters | <p>Metastasen</p> |

Das klarzellige Nierenzellkarzinom ist bereits makroskopisch häufig als solches erkennbar es zeigt eine gelbe, häufig heterogene Schnittfläche mit wechselnden Mengen von Einblutungs- und Nekroseherden. Histologisch besteht der Tumor im typischen Fall aus charakteristischen gut abgrenzbaren Zellen mit hellen Zytoplasma, so dass der histologische Aspekt an Pflanzenzellen erinnert(4). Frühe zytogenetische Studien haben die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 3 (3p) als charakteristische Veränderung des klarzelligen Nierenkarzinoms beschrieben, doch wurde mittlerweile klar, dass diese Veränderungen bei den meisten, wenn nicht allen Nierenzellkarzinomtypen auftreten kann (5)

Papilläre Nierenzellkarzinome sind häufiger multifokal oder bilateral als klarzellige Karzinome. Sie treten häufig auch in Kombination mit kleineren papillären Tumoren auf, welche bis zu einer Größe von einem halben cm als Nierenrindenadenome klassifiziert werden(6). Der typische makroskopische Befund ist der eines scharf begrenzten, abgekapselt erscheinenden rotbraunem bis gelblichen Tumors. Zytogenetisch galten bei diesem Tumor die Trisomie 7 und 17 als charakteristisch(7). Das chromophobe Nierenzellkarzinome stammt im Gegensatz zum klarzelligen Karzinom vom distalen Tubulus ab(8). Auch makroskopisch unterscheiden sie sich vom klarzelligem Nierenzellkarzinom indem die Schnittfläche eher blass grau oder blass braun ist als gelb(8). Histologisch ähneln die Tumoren klarzelligen Karzinomen, wobei die Zellen im klassischen Fall aber nicht komplett „klarzellig“ sind, sondern mehr durch eine perinukleäre Aufhellung des Zytoplasmas auffallen(8). Chromophobe Nierenzellkarzinome können aus Onkozytomen entstehen, welche ebenfalls vom distalen Tubulus abstammende Nierenzelltumoren mit einem benignen Verlauf sind(8). Kommt es in einem Onkozytom zur Entwicklung eines chromophoben Karzinomes wird dann von einem „Hybrid onkozytär chromophoben Tumor“ gesprochen(9).

Ist ein Nierenzellkarzinom komplett reseziert worden und es gibt keine Hinweise auf eine Metastasierung wird meist keine weitere Therapie durchgeführt. Die Patienten müssen aber über lange Zeit überwacht werden, da klinisch erkennbare Metastasen beim Nierenzellkarzinom auch erst spät auftreten können(2). Überhaupt ist das Metastasierungsverhalten von Nierenzelltumoren enigmatisch. Einzelne Tumoren metastasieren früh diffus. Bei anderen Tumoren kommt es nach zehn oder mehr Jahren zum Nachweis vereinzelter Metastasen welche auch an Stellen auftreten können die typischerweise nicht von Tumormetastasen betroffen sind wie z.B. in der Schilddrüse (10). Dementsprechend sind die therapeutischen Optionen bei

metastasierenden Nierenzellkarzinomen breit gefächert. Gerade bei wenigen Metastasen die eher spät auftreten kann eine chirurgische Entfernung der Metastasen den Patienten helfen. In der Regel werden metastasierende Nierenzellkarzinome aber medikamentös behandelt(2). In den letzten Jahren kam es hierbei zur Zulassung einer Vielzahl von Medikamenten welche zumindest in einem Teil der Tumoren eine gute Wirkung zeigen. Die für die Behandlung metastasierender Nierenzellkarzinome zugelassenen Medikamente sind in Tabelle 2 dargestellt (2).

Tabelle 2: Therapieoptionen beim metastasierendem Nierenzellkarzinom

| |
|----------------------------------|
| Zytokine |
| – IFN- α |
| – IL-2 |
| Tyrosinkinase-Inhibitoren |
| – Axitinib |
| – Pazopanib |
| – Sorafenib |
| – Sunitinib |
| VEGF-Inhibitoren |
| – Bevacizumab |
| mTOR-Inhibitoren |
| – Everolimus |
| – Temsirolimus |

Bei vielen Tumorarten wird bei prognostisch besonders ungünstiger Situation postoperativ auch dann eine systemische Chemotherapie appliziert, wenn keine klinisch erkennbaren Metastasen vorliegen. Die Rationale für eine solche „adjuvante“ Chemotherapie liegt darin, dass die Chemotherapie dann am erfolgreichsten sein müsste, wenn nur wenige vitale Tumorzellen im Körper des Patienten verblieben sind, sodass die Chance besteht, dass diese alle durch die Chemotherapie ausgeschalten werden können(2). Beim Nierenzellkarzinom sind adjuvante Therapien, auch bei prognostisch sehr ungünstiger Situation bisher nicht die Regel. Die Entwicklung der oben genannten potenten Systemtherapien für das Nierenzellkarzinom führt diesbezüglich jetzt aber zu einer Neubewertung. Klinische Studien welche die adjuvante Anwendung verschiedener Medikamente testen sind aktuell im Gange dies gilt für Everolimus in der EVEREST-Studie mit Everolimus für 1 Jahr vs. Placebo, Pazopanib in der PROTECT-Studie mit Pazopanib für 1 Jahr vs. Placebo und Axitinib in der ATLAS-Studie mit Axitinib für 3 Jahre vs. Placebo(2,11–13). Als erstes Medikament wurde Sunitinib kürzlich in den Vereinigten Staaten für die adjuvante

Therapie von hochrisiko Nierenzellkarzinomen nach Nephrektomie zugelassen. Die Möglichkeit einer adjuvanten Therapie führt auch zu einer Neubewertung der klinischen Relevanz von Prognosemarkern beim Nierenzellkarzinom. Bisher sind die relevanten pathologischen Parameter pT, pN, R Status und der Differenzierungsgrad. Daneben gelten verschiedene klinische Parameter wie klinische Symptome, Performance Status, hämatologische Parameter (Hb-Wert, Anzahl der Thrombozyten, Neutrophile Granulozyten, das Auftreten von Metastasen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt und vom Ort und LDH) als Prognoseparameter(2).

Da das biologische Verhalten von Tumoren wesentlich durch ihre molekularen Veränderungen definiert sein dürfte ist anzunehmen, dass auch molekulare Untersuchungen prognostische relevante Informationen liefern sollten. Bisher sind allerdings keine prognostisch relevanten Parameter bekannt. Dies obwohl die beim Nierenzellkarzinom vorkommenden molekularen Aberrationen heute weitgehend bekannt sind. Vor allem die Entwicklung von Hochdurchsatzmethoden wie Next-Generation Sequencing haben dazu geführt, dass ein Katalog erstellt werden konnte welcher zumindest die genomischen Veränderungen beim Nierenzellkarzinom systematisch abhandelt. Die prognostische Bedeutung dieser Veränderungen ist vor allem deswegen nicht bekannt, weil bisher vorwiegend Tumoren untersucht wurden, von denen keine Verlaufsdaten vorlagen. Dies unter anderem deswegen, weil molekulare Hochdurchsatzuntersuchungen überwiegend an unfixierten Tumormaterial durchgeführt werden, so dass neu gewonnene Tumoren und zur Definition der möglichen molekularen Veränderungen verwendet wurden und nicht alte, eingelagerte Tumoren von Patienten mit 10-jähriger Verlaufsbeobachtung. Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf besteht eine große Sammlung an Nierentumoren. Zwischen 1994 und 2016 wurden mehr als 1800 Nierenzellkarzinome an dem Institut untersucht. Von vielen Patienten sind auch klinische Verlaufsdaten vorhanden. Dies ergibt grundsätzlich die Möglichkeit bestimmte interessierende molekulare Veränderungen auf ihre prognostische Bedeutung zu überprüfen. Von besonderem Interesse war für uns das p53 Tumorsuppressorgen.

Das p53 Tumorsuppressorgen ist das am häufigstem alterierte Tumorsuppressorgen bei menschlichen Tumoren und mit Sicherheit auch das am besten untersuchte(14). p53 ist ein Transkriptionsfaktor mit einer molekularen Masse von 53kDa, was für seine Namensgebung verantwortlich ist. Das Gen liegt auf Chromosom 17p13(14). Seine

wichtigste Funktion dürfte die Regulation von DNA Reparaturprogrammen sein welche nach DNA Schädigungen aktiviert werden und entweder die Reparatur ermöglichen oder aber, wenn eine solche nicht möglich ist, die Apoptose der nicht reparablen Zelle einleitet. p53 wurde aufgrund dieser Eigenschaft in der Literatur als „guardian of the genome“ (Wächter des Genoms) bezeichnet. Das p53 entfaltet seine Wirkung in Homotetrameren, das bedeutet, dass vier p53 Proteine über Seitenketten von Leu344, aller vier Untereinheiten in direkter Verbindung zueinander stehen und über Brücken zwischen Arg337 und Asp352 an beiden Enden der Schnittstelle der primären Dimer Helix stabilisiert sind und dann ihre Aktivität entfalten(14).

Die Halbwertszeit von p53 Protein ist normalerweise 20min. Mutationen des p53 Proteins sollen bei ca. 50% aller menschlicher Tumoren vorkommen, was p53 zum meist alterierten Tumorsuppressorgen überhaupt macht. Die p53 Mutationen lassen sich in Missense, Frameshift und Stopp-Mutationen unterteilen. Bei Stopp-Mutationen führt die p53 Mutation zu einem Abbruch der p53 Transkription im Bereich des Stopp-Codons. Bei der Frameshift-Mutationen kommt es zu einer Verschiebung der Ablesesequenz, sodass ab dem mutierten Areal ein komplett anderes Protein als p53 gebildet wird. Diese Mutationen führen somit also zum faktischen Verlust der p53 Protein Produktion eines p53 Gen Allels. Der dritte Mutationstyp führt häufig zu Mutationen welche das p53 Protein nicht nur inaktivieren, sondern auch seine Halbwertszeit deutlich erhöhen. Diese Eigenschaft führt dazu, dass p53 Protein sich in der Zelle anreichert und somit immunhistochemisch besonders einfach sichtbar gemacht werden kann. Wegen der Aktionsweise von p53 als Tetramer kommt es dazu, dass bei Mutation eines Allels und gesundem zweiten Allel aufgrund der Wahrscheinlichkeit in praktisch jedem Tetramer neben korrektem aktiven normalem p53 Protein gebildet vom nicht mutierten Allel in jedem dieser Tetramere auch mehrere mutierte p53 Proteineinheiten sind, so dass die Tetramere als Ganzes nicht mehr funktionieren. Dies führt dazu, dass eine Mutation eines Allels nicht nur zur Inaktivierung des mutierten Allels, sondern gleichzeitig auch des anderen Allels führt (sogenannte dominante Mutation). Aufgrund der beschriebenen Anreicherung von p53 Protein in einem Teil der p53 mutierten Tumoren wird die Immunhistochemie wegen ihrer einfachen Anwendbarkeit besonders oft für p53 Untersuchungen herangezogen. Für immunhistochemische Untersuchungen des p53 Proteins müssen die Protokolle so optimiert werden, dass physiologisch nachweisbares p53 Protein nicht erkannt wird, währenddem die Sensitivität aber ausreicht im Kern vermehrt vorliegendes p53 Protein

sichtbar zu machen. Die p53 Immunhistochemie ist geeignet um diejenigen Missense Mutationen zu identifizieren welche zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von p53 Protein führen. Sie kann allerdings keine Frameshift oder Stopp-Mutationen identifizieren. Um auch derartige Mutationen nachzuweisen müsste eine Sequenzierung von p53 durchgeführt werden. Die umfangreichsten Daten zu p53 Mutationen sind aus den Datenbanken von der Cancer Genome Atlas (TCGA) bzw. Internationalen Cancer Genome Consortium (ICGC) zu entnehmen. Hier werden (Stichdatum 15.11.2018) bei 283 papillären Karzinomen 2,12%, bei 512 klarzelligen Karzinomen, 2,15%, bei 146 nicht klarzelligen Karzinomen 7,53% und bei 65 chromophoben Karzinomen 32,31% p53 Mutationen beschrieben (Abb.1)(15,16).

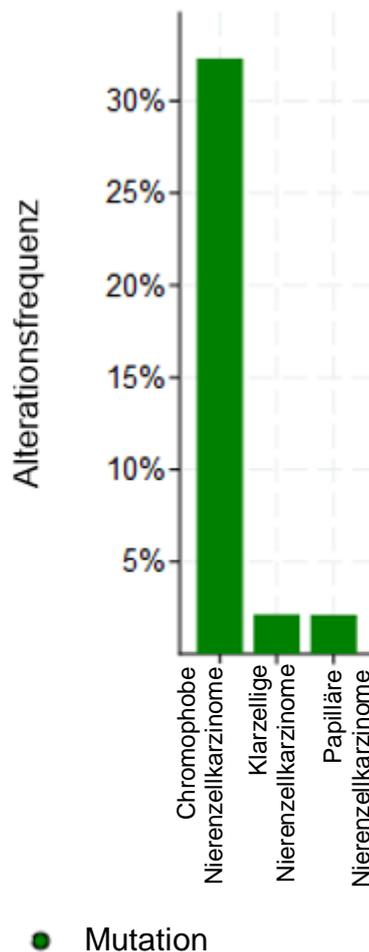


Abbildung 1: p53 Mutationsrate bei Nierenzellkarzinomen (TCGA/ICGC)

Auch chromosomale Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 17, können die Funktion von p53 beeinflussen bzw. einschränken. p53 Deletionen lassen sich mit verschiedenen Techniken wie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), Heterogenitätsverlustnachweis (loss of heterozygosity, LOH) oder verschiedenen Array Techniken nachweisen. Die ICGC/TCGA Datenbank, welche auf den Nachweis von 17p Deletionen mittels Next-Generation Sequencing beruht beschreibt 17p del bei 6,01% von 283 papillären Karzinomen, 75,38% von 65 chromophoben Karzinomen, 9,96% von 512 klarzelligen Karzinomen (Abb.2) (15,16).

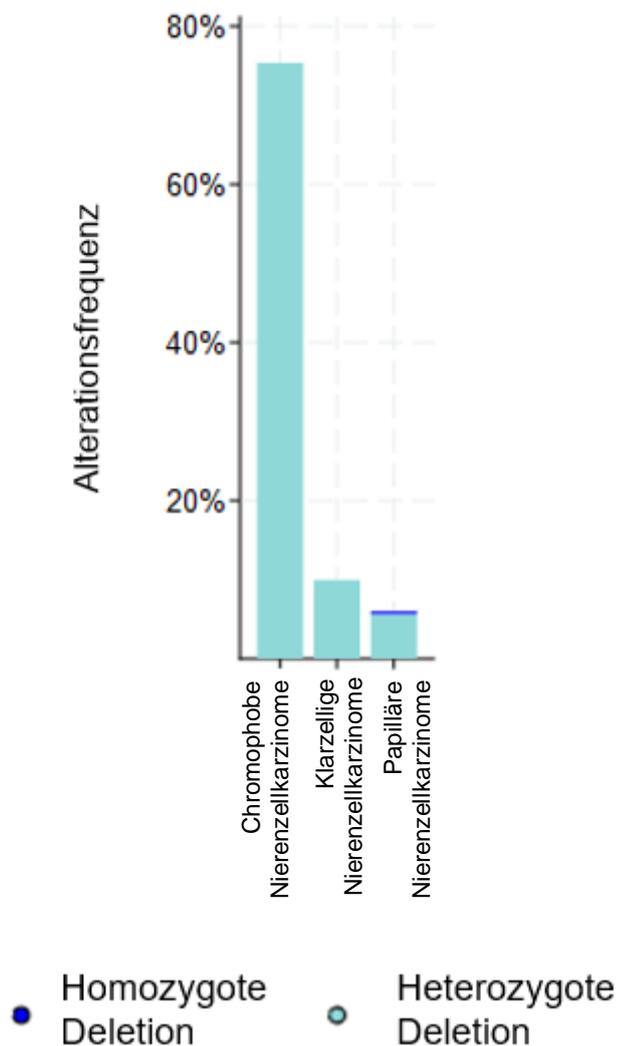


Abbildung 2: 17p Deletion beim Nierenzellkarzinom (TCGA/ICGC)

Angesichts des Vorhandenseins eines großen Kollektivs von Nierenzelltumoren am UKE untersuchten wir in dieser Arbeit die Prävalenz von nuklear p53 Akkumulation und von 17p Deletionen an mehr als 1800 Nierenzellkarzinomen. Die wichtigste Frage

war dabei, in wie weit den p53 Veränderungen klinische Relevanz zugeordnet werden könnte.

2. Patienten und Methoden

2.1. Patienten.

Es wurde ein Satz von Nierentumorgewebe-Microarrays (TMA) mit je einem Gewebekern von 1809 Nierenkrebskrankungen von Patienten, die zwischen 1994 und 2016 operiert und am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf histopathologisch untersucht wurden, benutzt. Als klinische Endpunkte wurden verwendet: Überleben, Tumorspezifisches Überleben, Zeit zur Progression. Eine Tumorprogression wurde angenommen, wenn ein Tumor in einer postoperativen Kontrolle entweder ein Lokalrezidiv, neu aufgetretene Metastasen oder im Vergleich zur unmittelbar postoperativen Situation ein Wachstum bereits bekannter Metastasen erkennen ließ. Alle Tumoren wurden nach den in der WHO-Klassifikation 2015 beschriebenen Kriterien von zwei Pathologen mit besonderem Fokus auf Urogenitalpathologie (Dr. Franziska Büscheck, Dr. Christoph Fraune) untersucht, wobei für jeden Tumor eine ISUP-Gradierung durchgeführt wurde (17). Der TMA besteht aus vier Blöcken, die TMA-Fertigung wurde bereits früher ausführlich beschrieben (18,19). Die Gewebekerngröße betrug 0,6 mm. Hämatoxylin-Eosin gefärbte TMA-Objektträger wurden auf Anwesenheit oder Abwesenheit von Krebszellen untersucht. Die klinischen und pathologischen Parameter der untersuchten Karzinome sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Verwendung von archivierten diagnostischen Restgeweben für die Herstellung von Gewebe-Microarrays und deren Analyse zu Forschungszwecken sowie die Analyse von Patientendaten erfolgte gemäß den Richtlinien des Hamburger Krankenhausgesetzes (HmbKHG, §12,1) und war durch die lokale Ethikkommission (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09 und PV3652) genehmigt worden. Alle Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Tabelle 3: Klinische und pathologischen Parameter der untersuchten Karzinome

| | Patientenanzahl |
|---------------------------|--------------------------------|
| | Kohorte TMA (n = 1809) |
| Follow up (Monate) | |
| Auswertbar (n) | 1174 |
| Mean (Monate) | 48 |
| Median (Monate) | 61,8 |
| Alter(J) | |
| <50 | 263 |
| 50-70 | 951 |
| 70->90 | 595 |
| Histologisch | |
| Klarzellige Karzinome | 1167 |
| Chromophobe Karzinome | 101 |
| Papilläre Karzinome | 270 |
| Onkozytome | 149 |
| UICC | |
| I | 733 |
| II | 131 |
| III | 175 |
| IV | 158 |
| pT Stadium | |
| pT1 | 998 |
| pT2 | 223 |
| pT3-pT4 | 408 |
| ISUP Gradierung | |
| 1 | 398 |
| 2 | 537 |
| 3 | 469 |
| 4 | 100 |
| Fuhrmann | |
| I | 72 |
| II | 851 |
| III | 480 |
| IV | 110 |
| Thoenes | |
| 1 | 497 |
| 2 | 839 |
| 3 | 177 |
| pN | |
| pN0 | 232 |
| pN+ | 49 |
| pM | |
| pM0 | 220 |
| pM1 | 148 |

2.2. Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden 4µm TMA-Schnitte verwendet. Für die proteolytische Objektträger-Vorbehandlung wurde ein kommerzieller Kit verwendet (Paraffin-Vorbehandlungs-Reagenziensatz; Abbott, Chicago, USA). TMA-Schnitte wurden entparaffiniert in 70%, 85% und 100% Ethanol, dehydriert und luftgetrocknet, gefolgt von einer Denaturierung für 5 min bei 74°C in 70% Formamid 2x SSC-Lösung. Das FISH-Sondenset bestand aus einem Spectrum Green markierten BAC-Klon (BACs RP11-89D11, RP11-404G1; Bioscience, Nottingham, UK) und einer kommerziellen Spectrum Orange markierten Zentromer 17 (CEP17) Sonde (#06J36-06; Abbott Molecular, Wiesbaden, Deutschland) als Referenz. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer. Die Objektträger wurden anschließend gewaschen und mit 0,2µmol/L 4'-6-Diamidin-2-Phenylindol in „Antifade-Lösung“ gegengefärbt. Gefärbte Objektträger wurden manuell mit einem Epifluoreszenzmikroskop interpretiert und die in Tumorzellen vorherrschenden FISH-Signalzahlen wurden für jeden Gewebespot aufgezeichnet. Homozygote Deletion von 17p wurde definiert als völlige Abwesenheit von 17p FISH-Sondensignalen in $\geq 60\%$ der Tumorkerne, bei gleichzeitigem Vorhandensein von jeweils einem oder zwei 17p FISH-Signalen in benachbarten normalen Zellen. Gewebespots mit fehlenden oder schwachen 17p -Signalen in allen (Tumor- und Normalzellen) oder fehlenden oder schwachen Signalen bei normalen Zellen (interne Kontrolle) wurden von der Analyse ausgeschlossen. Heterozygote Deletion von 17p wurde als das Vorhandensein von weniger 17p -Signalen als Zentromer-17-Sondensignalen in $\geq 60\%$ Tumorkernen definiert (Abbildung 3a-b). Diese Schwellenwerte stammen aus einer früheren Studie, in der die mittels FISH und Array CGH festgestellten *PTEN*-Deletionen, verglichen wurden und eine 100% Übereinstimmung zeigten (20).

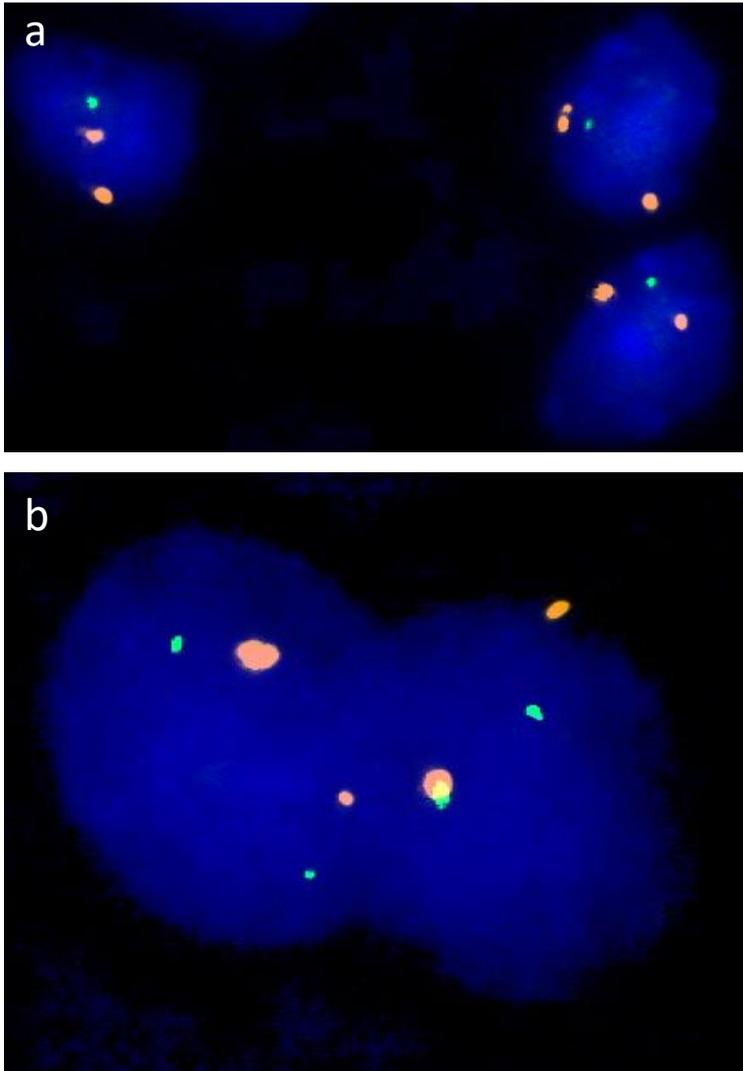


Abbildung 3: Beispiel der Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung unter der Verwendung von 17p Sonden

a) Heterozygote Deletion. Jeweils zwei orangene Zentromer 17 und nur ein grünes 17p Signal pro Zelle

b) Normaler Genstatus. Jeweils zwei orangene Zentromer 17 und zwei grüne 17p Signale pro Zelle

2.3. Immunhistochemie

Frisch geschnittene TMA-Schnitte wurden an einem Tag in einem Experiment immunhistochemisch gefärbt. Für die p53 „Epitop Freilegung“ wurden die Schnitte bei pH 7,8 (Citratpuffer) für 5 Minuten in einem Autoklaven gekocht. Der Antikörper DO1 (Oncogene, Cambridge, MA; 1:3600) wurde zum Nachweis von p53-Proteinen verwendet. Das Envision-System (DAKO, Glostrup, Dänemark) wurde zur Visualisierung der gebundenen Antikörper eingesetzt. Darmkrebs mit bekannter p53-Mutation diente als Positivkontrolle und normales Prostatagewebe als Negativkontrolle auf jedem TMA-Schnitt. Die Färbeintensität wurde in einer vierstufigen Skala bewertet (keine Färbung, 1+, 2+, 3+ Färbeintensität), und der Anteil der gefärbten Tumorzellen

wurde bewertet. Jedem Tumor wurde anhand der folgenden Kriterien ein endgültiges IHC-Ergebnis zugeordnet. Negativ: keine oder 1+/2+ Färbung in <10% der Tumorzellen; niedrig: 1+ Färbung in $\geq 10\%$, oder 2+ Färbung in $\geq 10\%$ aber $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder 3+ Färbung in <10% der Tumorzellen; hoch: 2+ Färbung in $> 70\%$ der Tumorzellen oder 3+ Färbung in $\geq 10\%$ der Tumorzellen.

2.4. Statistik

Zum Einsatz kam die Software JMP 9.0 (SAS Institute Inc., NC, USA). Kontingenztabelle und Chi-Quadrat-Tests wurden verwendet, um den Zusammenhang zwischen p53/17p Befunden und histologischer Krebsart, Tumordgrad, pT, pN und dem M-Stadium zu untersuchen. Die Beziehung zwischen der p53/17p Befunden und dem Patientenalter oder dem Tumordurchmesser wurde durch einen ANOVA Test berechnet. Kaplan Meier Kurven wurden erstellt, um Unterschiede in der Überlebenszeit oder Rezidiv-freien Zeit zu beschreiben. Der Log-Rank Test wurde angewandt, um signifikante Unterschiede zwischen diesen Gruppen zu ermitteln. p-Werte von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 17p13 Deletionen

3.1.1 Technische Aspekte

Die Untersuchung auf 17p Deletionen war in 1428 von 1809 untersuchten Tumoren erfolgreich. Nicht auswertbare Befunde waren wegen entweder ungenügender Hybridisierung mit nicht klar erkennbaren 17p oder Zentromer 17 Signalen, Fehlen von eindeutigen Tumorzellen auf dem Gewebespot oder ein vollständiges Fehlen von Gewebe an der entsprechenden Tissue Microarray Lokalisation, beispielsweise durch Abschwimmen des Gewebefragmentes während der Hybridisierungsprozedur.

3.1.2 17p Deletionen und Tumortyp

Die Häufigkeit von 17p Deletionen ist für die häufigen Tumoren klarzelliges Karzinom, papilläres Karzinom, chromophobes Karzinom, klarzelliges tubulopapilläres und das Onkozytom in Tabelle 4 dargestellt. Die Darstellung zeigt, dass 17p Deletionen ganz

überwiegend beim chromophoben Karzinom gefunden werden (33% der Fälle) währendem die Deletionen bei den anderen Neoplasien in weniger als 5% der Fälle vorkommen. Die selteneren Entitäten sind in Tabelle 5 dargestellt. Naturgemäß sind die in dieser Tabelle dargestellten 17p Deletionshäufigkeiten angesichts der geringen Fallzahlen nicht aussagekräftig. Immerhin wird sichtbar, dass 17p Deletionen in Sammelrohrkarzinomen, Translokationskarzinomen und in NOS Karzinomen vorkommen können.

Tabelle 4: 17p Deletionen bei häufigen Nierenzellkarzinomentitäten

| Entität | Auswertbar (n) | Normal (%) | 17p Deletion (%) |
|--|----------------|------------|------------------|
| Klarzelliges Karzinom | 946 | 96,30 | 3,70 |
| Papilläres Karzinom | 208 | 95,67 | 4,33 |
| Chromophobes Karzinom | 72 | 66,67 | 33,33 |
| Klarzelliges tubulopapilläres Karzinom | 24 | 100,00 | 0,00 |
| Onkozytom | 121 | 99,17 | 0,83 |

Tabelle 5: 17p Deletionen bei seltenen Nierenzellkarzinomentitäten

| Entität | Auswertbar (n) | Normal (%) | 17p Deletion (%) |
|---|----------------|------------|------------------|
| Erworbenes zystisches Nierenzellkarzinom | 1 | 100,00 | 0,00 |
| Ductus Bellini (Sammelrohr) Karzinom | 3 | 66,67 | 33,33 |
| Zystisches Nephrom/ gemischt epithelialer Stroma Tumor | 1 | 100,00 | 0,00 |
| Multilokulär zystisches Nierenzellkarzinom niedriger Malignität | 2 | 100,00 | 0,00 |
| Medulläres Nierenzellkarzinom | 1 | 100,00 | 0,00 |
| Metanephrische Tumoren | 2 | 100,00 | 0,00 |
| Muzinös tubulär und spindelzelliges Nierenzellkarzinom | 2 | 100,00 | 0,00 |
| Nephroblastom | 14 | 100,00 | 0,00 |
| Neuroendokrines Karzinom | 1 | 100,00 | 0,00 |
| Nicht anderweitig spezifizierte Karzinome | 20 | 95,00 | 5,00 |
| Reninom | 1 | 100,00 | 0,00 |
| Tubulozystisches Karzinom | 2 | 100,00 | 0,00 |
| Xp11.2 Translokations Karzinom | 7 | 85,71 | 14,29 |

3.1.3 17p Deletionen und Tumorphänotyp

Die Untersuchung der Beziehung von 17p Deletionen und Tumorphänotyp wurde auf die größte homogene Gruppe von klarzelligem Karzinomen beschränkt. Dies wegen der geringen Zahl von Deletionen. Es fand sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von 17p Deletionen und dem Differenzierungsgrad unabhängig davon ob dieser nach dem ISUP Grading, dem Fuhrmann Grading oder dem Thoenes Grading bestimmt wurde (jeweils $p < 0.0001$, Tab. 6). Auch die Beziehung zum Tumorstadium war signifikant ($p = 0.0416$). 17p Deletionen fanden sich in 2,29% von pT1 Tumoren aber bereits in 6,2% der pT3 Tumoren. p53 Deletionen waren auch signifikant mit dem Vorliegen von Fernmetastasen assoziiert. Nur 0,8% von Patienten mit klinischen M0 Stadium aber 7,37% von 95 Patienten mit M1 Stadium waren 17p deletiert.

Tabelle 6: 17p Deletionen bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen

| Parameter | Auswertbar (n) | Nomal (%) | 17p Deletiert (%) | p-Wert |
|----------------------|----------------|-----------|-------------------|---------|
| ISUP | | | | |
| 1 | 257 | 98,44 | 1,56 | <0,0001 |
| 2 | 316 | 98,10 | 1,90 | |
| 3 | 305 | 94,75 | 5,25 | |
| 4 | 60 | 85,00 | 15,00 | |
| | | | | |
| Fuhrmann | | | | |
| 1 | 47 | 100,00 | 0,00 | <0,0001 |
| 2 | 522 | 98,47 | 1,53 | |
| 3 | 307 | 95,11 | 4,89 | |
| 4 | 69 | 82,61 | 17,39 | |
| | | | | |
| Thoenes | | | | |
| 1 | 323 | 98,76 | 1,24 | <0,0001 |
| 2 | 506 | 96,84 | 3,16 | |
| 3 | 116 | 87,07 | 12,93 | |
| | | | | |
| Tumor Stadium | | | | |
| pT1 | 568 | 97,71 | 2,29 | 0,6416 |
| pT2 | 118 | 94,92 | 5,08 | |
| pT3 | 242 | 93,80 | 6,20 | |
| pT4 | 13 | 92,31 | 7,69 | |
| | | | | |
| LK Metastasen | | | | |
| pN0 | 132 | 97,73 | 2,27 | 0,6416 |
| pN1 | 8 | 100,00 | 0,00 | |
| pN2 | 19 | 94,74 | 5,26 | |
| | | | | |
| Fermetastasen | | | | |
| pM0 | 125 | 99,20 | 0,80 | 0,0077 |
| pM1 | 95 | 92,63 | 7,37 | |

Tabelle 7 zeigt die Beziehung zwischen dem Vorliegen von 17p Deletionen und der Tumorgroße. Die Darstellung zeigt, dass bei Betrachtung aller 17p deletierten Tumoren mit einem mittleren Durchmesser von 6,16cm diese etwas größer waren als nicht deletierte Tumoren mit einem mittleren Durchmesser von 5,11cm($p=0,0046$). Die separate Betrachtung der einzelnen Tumortypen zeigt, dass diese Beziehung einzig für die klarzelligen Karzinome signifikant war. Hier war der mittlere Durchmesser bei deletierten 7,1cm, aber bei nicht deletierten Tumoren nur 5,26cm($p=0,0004$). Interessanterweise fand sich bei den häufig 17p deletierten chromophoben

Nierenzellkarzinomen kein Unterschied zwischen 24 17p deletierten und 47 nicht deletierten Karzinomen.

Tabelle 7: Tumorgroße und 17p Deletionen

| Tumorgroße | 17p | Auswertbar (n) | Mittelwert | Standardabweichung | p-Wert |
|------------------------------|----------|----------------|------------|--------------------|--------|
| Alle Karzinome | Normal | 1333 | 5,11 | 0,08 | 0,0046 |
| | Deletion | 71 | 6,16 | 0,36 | |
| Klarzellige Karzinome | Normal | 898 | 5,26 | 0,10 | 0,0004 |
| | Deletion | 34 | 7,12 | 0,52 | |
| Papilläre Karzinome | Normal | 194 | 5,10 | 0,25 | 0,4142 |
| | Deletion | 9 | 6,09 | 1,18 | |
| Chromphobe Karzinome | Normal | 47 | 4,95 | 0,44 | 0,8695 |
| | Deletion | 24 | 5,08 | 0,62 | |

Die Beziehung von 17p Deletionen zum Patientenalter ist in Tab 8 dargestellt. Es fand sich keine Altersabhängigkeit der 17p Deletionen.

Tabelle 8: Patientenalter und 17p Deletionen

| Alter | 17p | Auswertbar (n) | Mittelwert | Standardabweichung | p Wert |
|------------------------------|----------|----------------|------------|--------------------|--------|
| Alle Karzinome | Normal | 1357 | 62,63 | 0,37 | 0,4396 |
| | Deletion | 72 | 61,35 | 1,61 | |
| Klarzellige Karzinome | Normal | 911 | 63,76 | 0,37 | 0,4818 |
| | Deletion | 35 | 65,11 | 1,89 | |
| Papilläre Karzinome | Normal | 199 | 61,27 | 1,00 | 0,1792 |
| | Deletion | 9 | 54,78 | 4,71 | |
| Chromphobe Karzinome | Normal | 48 | 60,27 | 1,77 | 0,6499 |
| | Deletion | 24 | 58,88 | 2,50 | |

3.1.4 17p Deletionen und Prognose

Die Beziehung zwischen 17p Deletionen und den klinischen Endpunkten Gesamtüberleben, Tumorspezifisches Überleben und Progressionsfreies Überleben ist für alle Tumoren und für die Untergruppen der klarzelligen, papillären und chromophoben Karzinome in den Abbildungen 4-6 dargestellt. Die Abbildungen machen deutlich, dass keine Beziehung zwischen 17p Deletionen und dem Gesamtüberleben bestand, dass, dass sich ausschließlich für das klarzellige Karzinom ein signifikanter Zusammenhang mit dem Tumorspezifischen Überleben nachweisen ließ ($p=0,039$, Abb. 5b), dass aber sowohl für alle Tumoren, wie auch für das klarzellige und das papilläre Karzinom ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von 17p Deletionen und einer ungünstigeren Prognose besteht. (Abb. 6, $p < 0,05$)

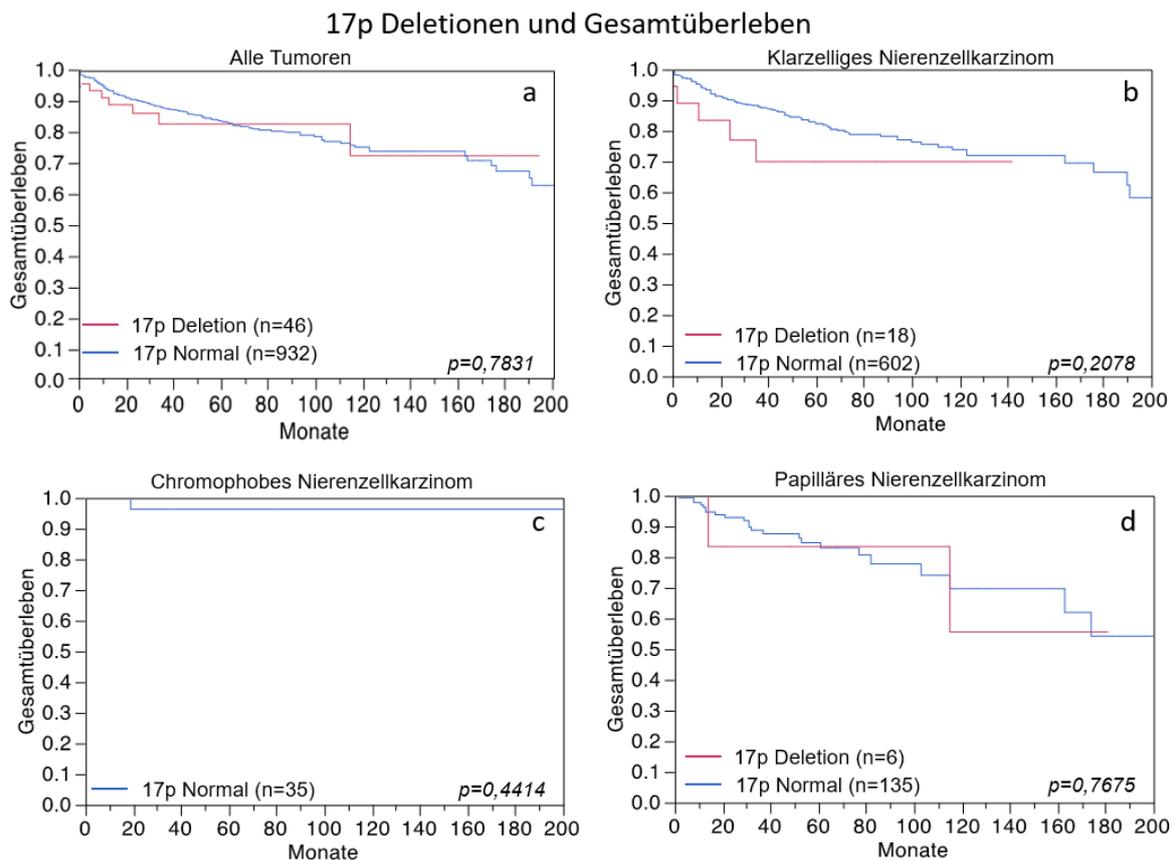


Abbildung 4: 17p Deletionen und Gesamtüberleben

17p Deletionen und Tumorspezifisches Überleben

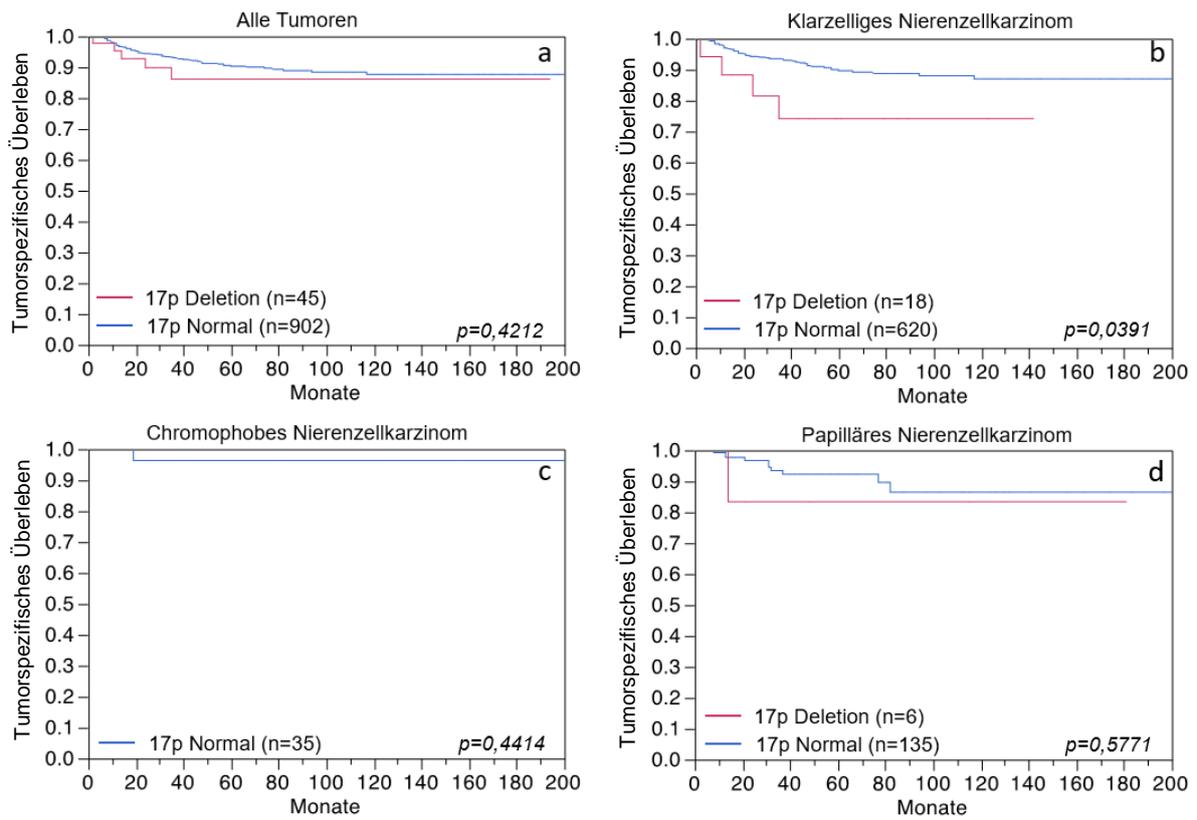


Abbildung 5: 17p Deletionen und Tumorspezifisches Überleben

17p Deletionen und Rezidivfreies Überleben

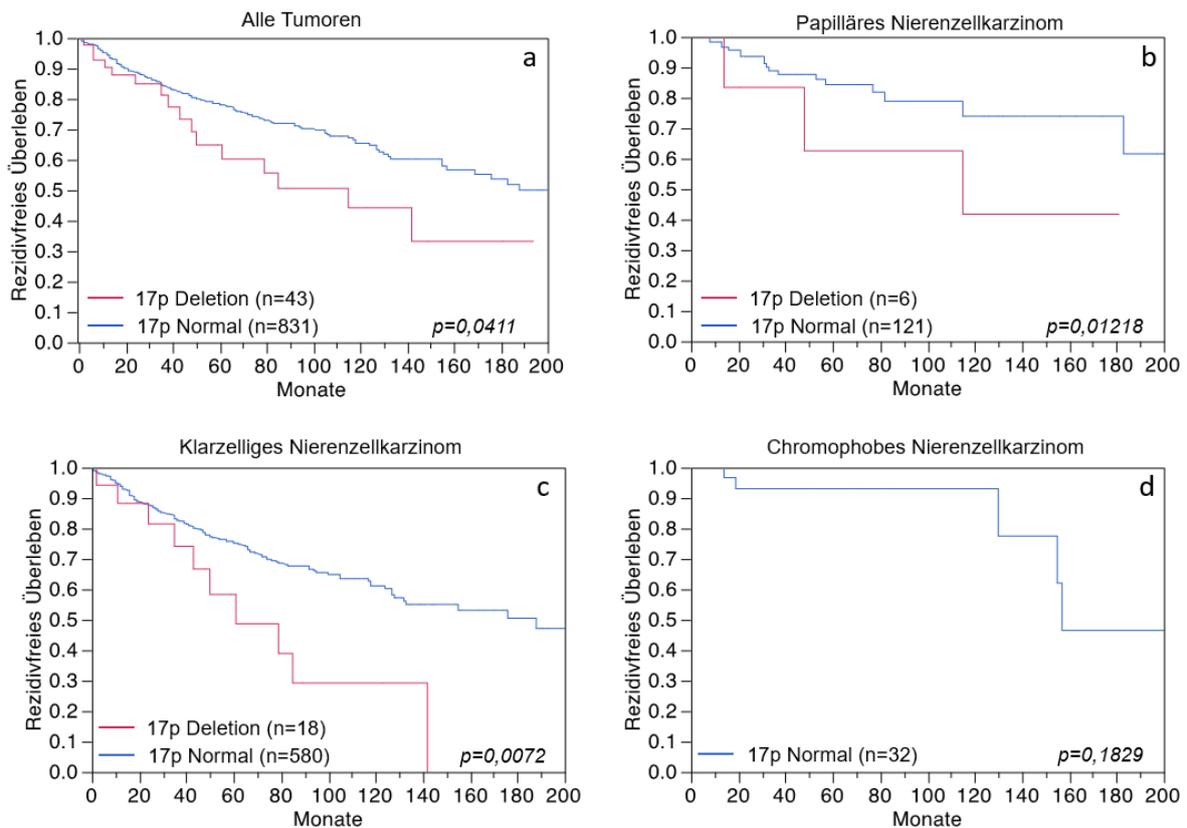


Abbildung 6: 17p Deletionen und Rezidivfreies Überleben

3.2. p53 Immunhistochemie

3.2.1 Technische Aspekte

Die p53 Immunhistochemie war in 1579 von 1809 Fällen Auswertbar (87,28%). Nicht auswertbare Fälle waren durch Fehlen von eindeutigen Tumorzellen auf dem Gewebespot oder Fehlen des Gewebespot an den entsprechenden Koordinaten bedingt.

3.2.2. p53 Immunhistochemie und Tumortyp

Beispiele von Tumoren mit fehlendem p53 Nachweis sowie von Tumoren mit geringer, mäßiger und starker p53 Positivität sind in Abb. 7 a-d dargestellt. Die Häufigkeit des immunhistochemischen p53 Nachweises ist für die häufigsten fünf Tumortypen

klarzelliges Karzinom, papilläres Karzinom, chromophobes Karzinom, klarzelliges tubulopapilläres Karzinom und Onkozytom in Tab.9. dargestellt. Die Tabelle zeigt, dass keine dramatischen Unterschiede zwischen den Entitäten bestehen. Das papilläre Karzinom zeigt allerdings im Vergleich zu den anderen Entitäten eine etwas vermehrte Häufigkeit von Tumoren mit geringer oder mäßiggradiger p53 Anfärbung.

Tabelle 9: p53 Immunhistochemischer Befund bei Nierenkarzinomen

| Entität | Auswertbar (n) | Negativ (%) | Schwach (%) | Mäßig (%) | Stark (%) |
|--|-----------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|
| Klarzelliges Karzinom | 1033 | 94,39 | 3,97 | 1,45 | 0,19 |
| Papilläres Karzinom | 232 | 71,98 | 18,53 | 8,62 | 0,86 |
| Chromophobes Karzinom | 95 | 91,58 | 5,26 | 2,11 | 1,05 |
| Klarzelliges-tubulopapilläres Karzinom | 22 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Onkozytom | 128 | 89,06 | 3,13 | 7,81 | 0,00 |

Die p53 Immunhistochemiebefunde sind für die selteneren Tumortypen in Tab.10. dargestellt. Auch hier sind die Fallzahlen zu gering um relevante Aussagen zu tätigen. Immerhin zeigen die Daten das immunhistochemisch positive Fälle bei NOS Karzinomen, Nephroblastomen und Sammelrohrkarzinomen vorkommen können

Tabelle 10: p53 Immunhistochemiefunde bei seltenen Nierenkarzinom Subtypen

| Entität | Auswertbar (n) | Negativ (%) | Schwach (%) | Mäßig (%) | Stark (%) |
|---|----------------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| Erworbenes zystisches Nierenzellkarzinom | 1 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| Ductus Bellini (Sammelrohr) Karzinom | 4 | 50,00 | 0,00 | 25,00 | 25,00 |
| Zystisches Nephrom/ gemischt epithelialer Stroma Tumor | 2 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Multilokulär zystisches Nierenzellkarzinom niedriger Malignität | 3 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Medulläres Nierenzellkarzinom | 1 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Metanephrische Tumoren | 3 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Muzinös tubulär und spindelzelliges Nierenzellkarzinom | 1 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Nephroblastom | 22 | 95,45 | 0,00 | 4,55 | 0,00 |
| Neuroendokrines Nierenzellkarzinom | 1 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Nicht anderweitig spezifiziertes Karzinom | 19 | 73,68 | 15,79 | 5,26 | 5,26 |
| Reninom | 1 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Tubulozystisches Nierenzellkarzinom | 2 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Xp11.2 Translokations Karzinom | 9 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

3.2.3. p53 Immunhistochemie und Tumorphänotyp

Die Analyse Immunhistochemie vs. Tumorigrad und Stadium ist auf die größte Gruppe der klarzelliger Tumoren limitiert (Tab 11). Hier findet sich eine signifikante Häufung von p53 Färbungen in höhergradigen Tumoren sowohl für das ISUP Grading ($p=0,0007$), als auch das Fuhrmann Grading ($p=0,0026$) und das Thoenes Grading ($p=0,0207$). Keine signifikante Beziehung besteht indessen zu pT Stadium, pN Stadium und dem M Status.

Tabelle 11: p53 Immunhistochemischer Befund bei klarzelligen Nierenzellkarzinom

| Parameter | Auswertbar (n) | Negativ (%) | Schwach (%) | Mäßig (%) | Stark (%) | p-Wert |
|----------------------|----------------|-------------|-------------|-----------|-----------|--------|
| ISUP | | | | | | |
| 1 | 270 | 97,41 | 2,22 | 0,37 | 0,00 | 0,0007 |
| 2 | 348 | 96,26 | 2,87 | 0,86 | 0,00 | |
| 3 | 332 | 91,87 | 5,12 | 3,01 | 0,00 | |
| 4 | 74 | 86,49 | 9,46 | 1,35 | 2,70 | |
| | | | | | | |
| Fuhrmann | | | | | | |
| 1 | 47 | 97,87 | 2,13 | 0,00 | 0,00 | 0,0026 |
| 2 | 564 | 96,63 | 2,48 | 0,89 | 0,00 | |
| 3 | 339 | 92,04 | 5,60 | 2,36 | 0,00 | |
| 4 | 83 | 86,75 | 8,43 | 2,41 | 2,41 | |
| | | | | | | |
| Thoenes | | | | | | |
| 1 | 340 | 97,06 | 2,06 | 0,88 | 0,00 | 0,0207 |
| 2 | 563 | 94,32 | 4,09 | 1,42 | 0,18 | |
| 3 | 130 | 87,69 | 8,46 | 3,08 | 0,77 | |
| | | | | | | |
| Tumor Stadium | | | | | | |
| pT1 | 597 | 94,64 | 3,85 | 1,51 | 0,00 | 0,6625 |
| pT2 | 123 | 94,31 | 4,88 | 0,81 | 0,00 | |
| pT3 | 292 | 94,18 | 3,42 | 1,71 | 0,68 | |
| pT4 | 14 | 92,86 | 7,14 | 0,00 | 0,00 | |
| | | | | | | |
| LK Metastasen | | | | | | |
| pN0 | 147 | 95,24 | 3,40 | 1,36 | 0,00 | 0,2863 |
| pN1 | 10 | 90,00 | 10,00 | 0,00 | 0,00 | |
| pN2 | 22 | 81,82 | 13,64 | 4,55 | 0,00 | |
| | | | | | | |
| Fermetastasen | | | | | | |
| pM0 | 130 | 93,85 | 3,85 | 2,31 | 0,00 | 0,4895 |
| pM1 | 117 | 93,16 | 5,98 | 0,85 | 0,00 | |

Die Beziehung zur Tumorgröße ist in Tabelle 12 dargestellt. Hier hat sich weder für alle Tumoren noch für die einzelnen Untergruppen ein signifikanter Zusammenhang zwischen p53 Status und Tumorgröße gezeigt. Dies gilt auch für die Beziehung zum Patientenalter, welche in Tabelle 13. dargestellt ist.

Tabelle 12: Tumorgröße und p53 Immunhistochemie Befund

| | P53 | Auswertbar (n) | Mittelwert | Standardabweichung | p-Wert |
|------------------------------|------------|-----------------------|-------------------|---------------------------|---------------|
| Alle Karzinome | Negativ | 1406 | 5,27 | 0,08 | 0,2917 |
| | Schwach | 93 | 4,94 | 0,33 | |
| | Mäßig | 48 | 4,62 | 0,45 | |
| | Stark | 7 | 6,41 | 1,19 | |
| Klarzellige Karzinome | Negativ | 962 | 5,41 | 0,10 | 0,8539 |
| | Schwach | 40 | 5,29 | 0,49 | |
| | Mäßig | 15 | 5,13 | 0,80 | |
| | Stark | 2 | 7,10 | 2,19 | |
| Papilläre Karzinome | Negativ | 165 | 5,23 | 0,28 | 0,5309 |
| | Schwach | 41 | 4,43 | 0,55 | |
| | Mäßig | 19 | 4,55 | 0,81 | |
| | Stark | 2 | 6,10 | 2,51 | |
| Chromophobe Karzinome | Negativ | 85 | 5,08 | 0,32 | 0,0750 |
| | Schwach | 5 | 7,78 | 1,31 | |
| | Mäßig | 2 | 2,55 | 2,07 | |
| | Stark | 1 | 1,60 | 2,93 | |

Tabelle 13: Alter und p53 Immunhistochemie Befund

| | P53 | Auswertbar (n) | Mittelwert | Standardabweichung | p-Wert |
|------------------------------|------------|-----------------------|-------------------|---------------------------|---------------|
| Alle Karzinome | Negativ | 1427 | 62,23 | 0,37 | 0,7385 |
| | Schwach | 97 | 63,52 | 1,41 | |
| | Mäßig | 50 | 63,42 | 1,97 | |
| | Stark | 7 | 60,14 | 5,25 | |
| | | | | | |
| Klarzellige Karzinome | Negativ | 975 | 63,65 | 0,35 | 0,2347 |
| | Schwach | 41 | 66,76 | 1,71 | |
| | Mäßig | 15 | 66,13 | 2,82 | |
| | Stark | 2 | 59,00 | 7,72 | |
| | | | | | |
| Papilläre Karzinome | Negativ | 167 | 61,86 | 1,04 | 0,8442 |
| | Schwach | 43 | 60,70 | 2,04 | |
| | Mäßig | 20 | 62,45 | 3,00 | |
| | Stark | 2 | 55,00 | 9,48 | |
| | | | | | |
| Chromophobe Karzinome | Negativ | 87 | 59,79 | 1,35 | 0,3041 |
| | Schwach | 5 | 53,40 | 5,63 | |
| | Mäßig | 2 | 46,00 | 8,91 | |
| | Stark | 1 | 53,00 | 12,60 | |
| | | | | | |

3.2.4 p53 Immunhistochemie Befunde und Prognose

Die Beziehung zwischen den p53 Färbungen und den gewählten Endpunkten Gesamtüberleben, Tumorspezifisches Überleben und Progressionsfreies Überleben ist für alle Tumoren und die größten Untergruppen der chromophoben, klarzelligen und papillären Karzinome in den Abbildungen 7-9 dargestellt. Die Abbildungen zeigen keine Beziehung der p53 Immunhistochemie zu Gesamtüberleben oder Tumorspezifischen Überleben. Es findet sich allerdings ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven p53 Anfärbung und einer frühen Tumorprogression bei klarzelligen Karzinomen (Abb 9b).

P53 Immunhistochemischer Befund und Gesamtüberleben

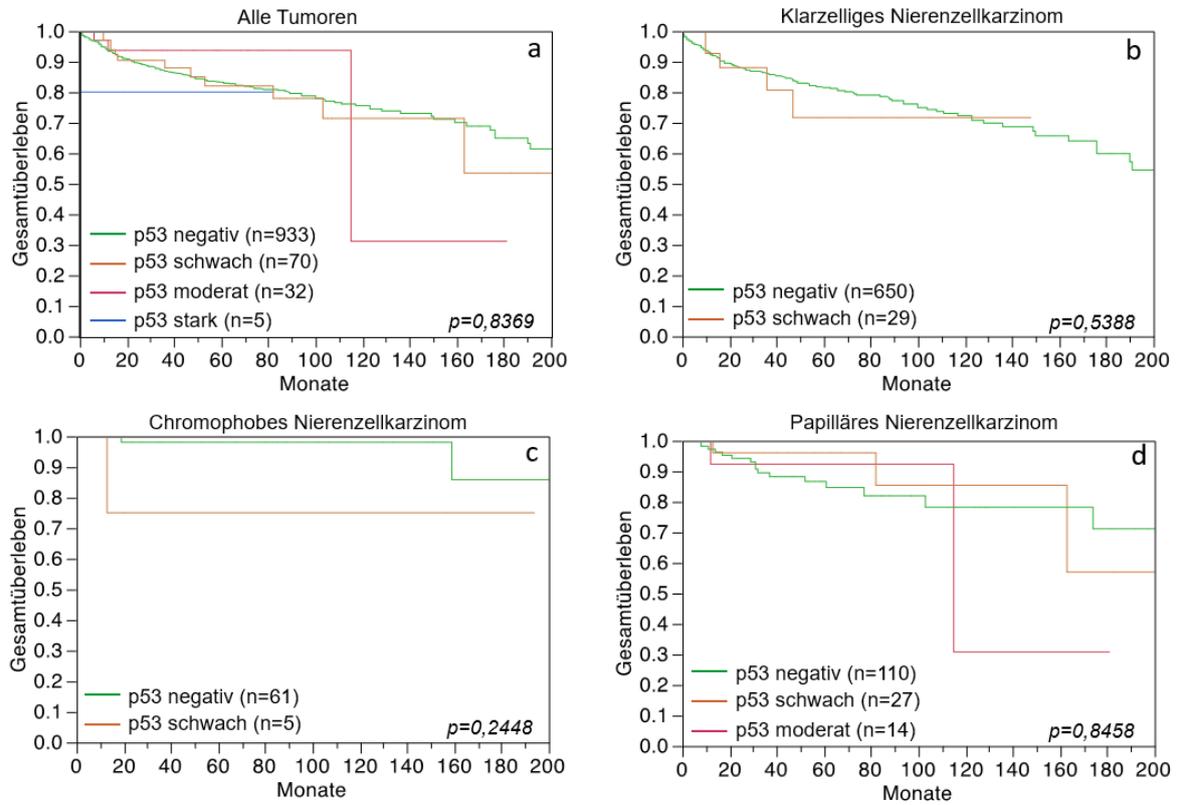


Abbildung 7: p53 Immunhistochemischer Befund und Gesamtüberleben

P53 Immunhistochemischer Befund und Tumorspezifisches Überleben

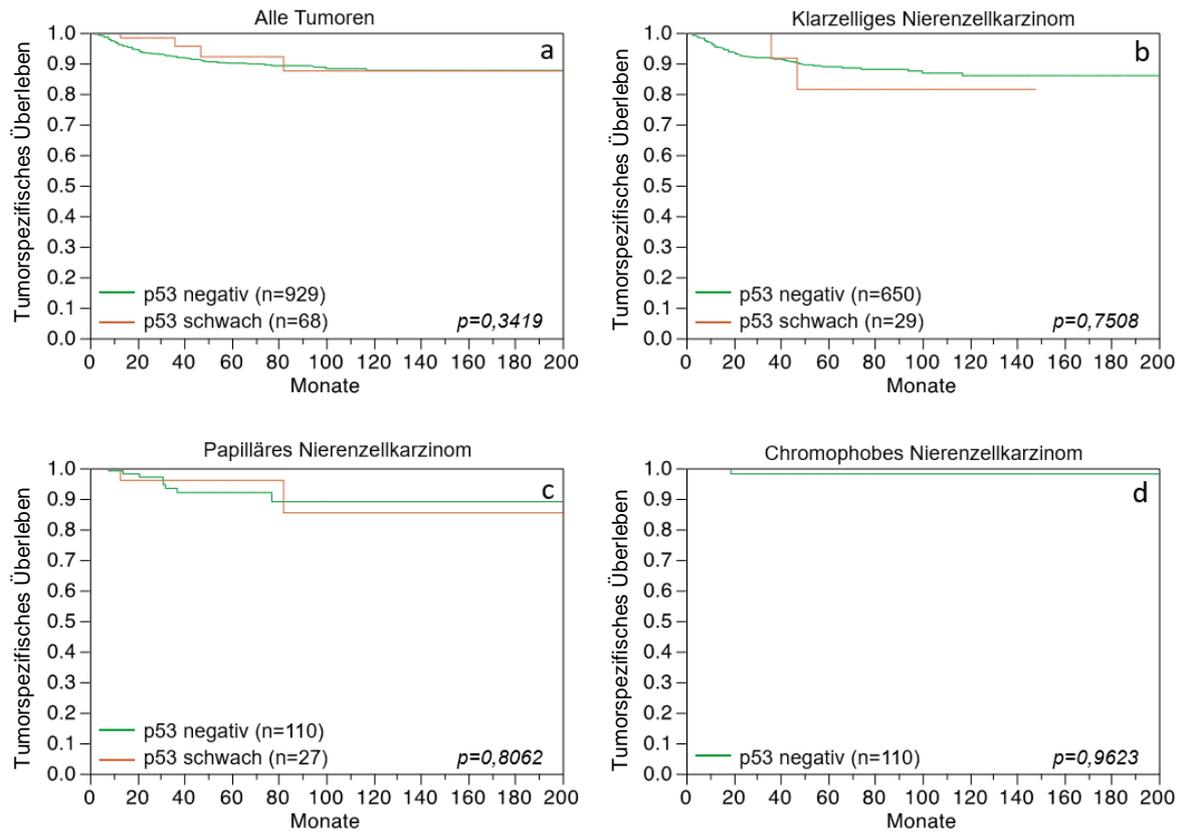


Abbildung 8: p53 Immunhistochemischer Befund und Tumorspezifisches Überleben

p53 Immunhistochemischer Befund und Rezidivfreies Überleben

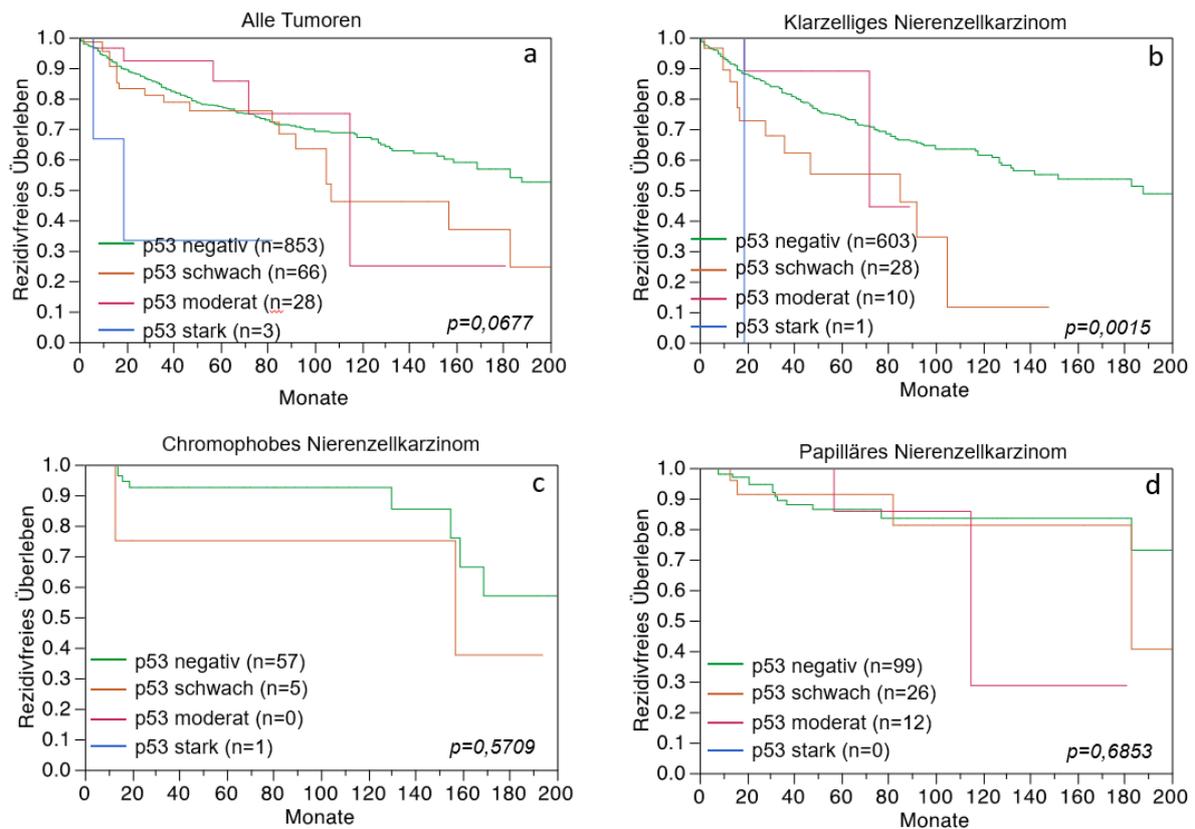


Abbildung 9: p53 Immunhistochemischer Befund und Rezidivfreies Überleben

3.3. p53 Immunhistochemie Befunde und 17p Deletionen

Die Beziehung zwischen dem Vorliegen von 17p Deletionen und den immunhistochemischen p53 Ergebnissen ist in Abbildungen 10-12 für alle Karzinome, die klarzelliges Karzinome und die chromophoben Karzinome dargestellt. Die Abbildung macht deutlich, dass zwischen diesen beiden Parametern eine gute, statistisch signifikante, aber keineswegs eine perfekte Beziehung besteht. Eine positive p53 Anfärbung fand sich nur bei ca. 20% der 17p deletierten Karzinome. Dies war immerhin signifikant häufiger als die 10% positiven Fälle bei den nicht deletierten Tumoren.

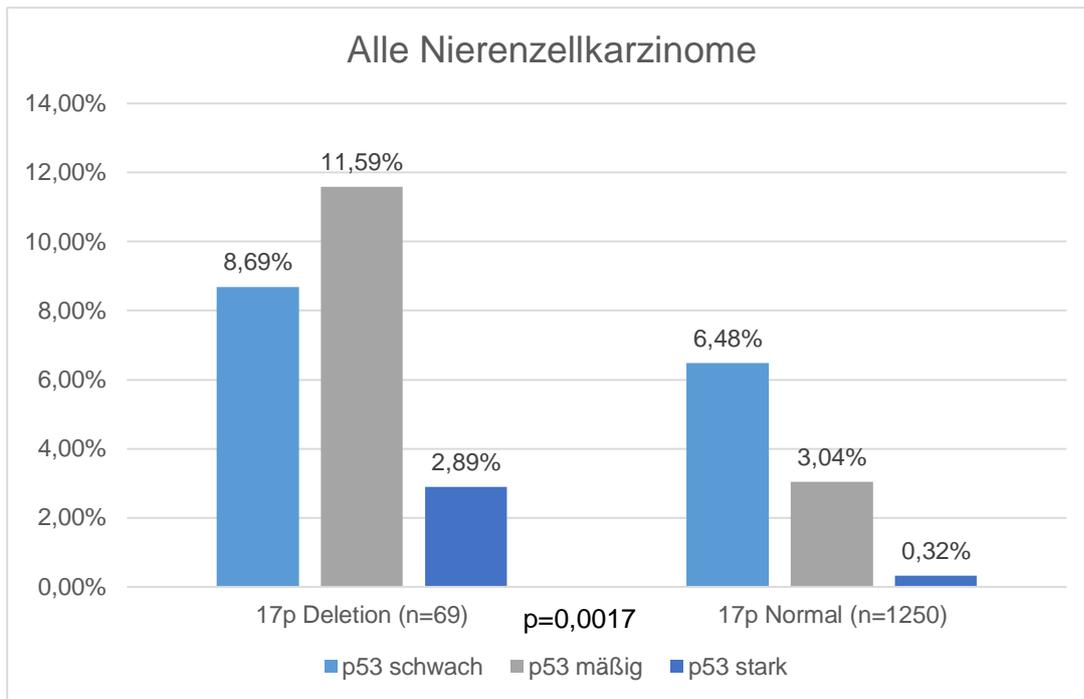


Abbildung 10: p53 Immunhistochemie Befunde und 17p Deletionen aller Nierenzellkarzinome

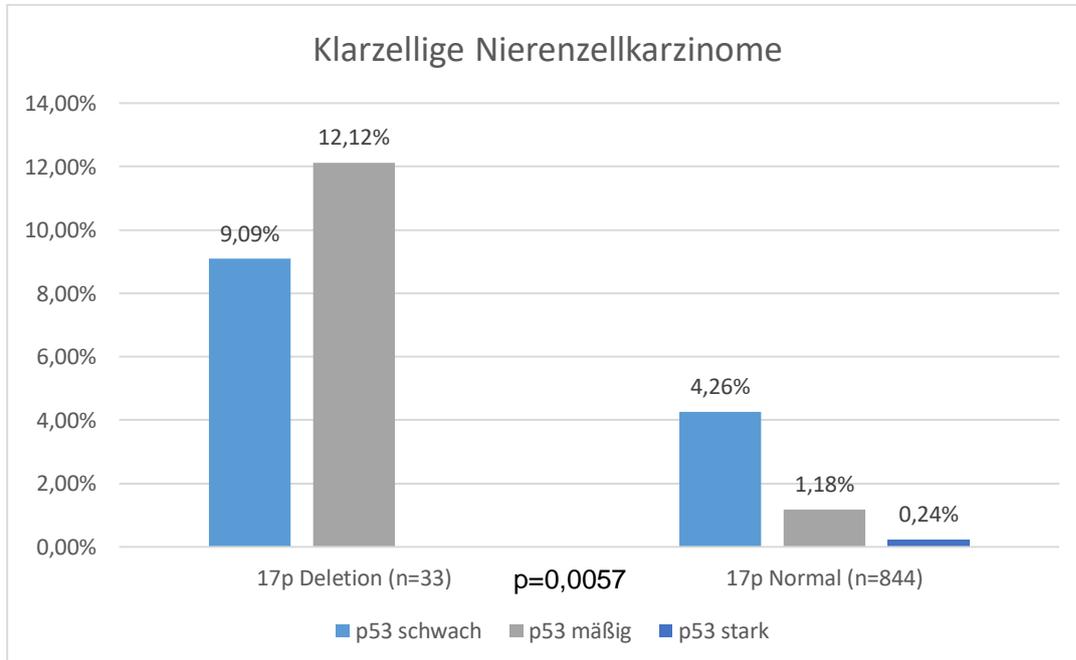


Abbildung 11: p53 Immunhistochemie Befunde und 17p Deletionen klarzelliger Nierenzellkarzinome

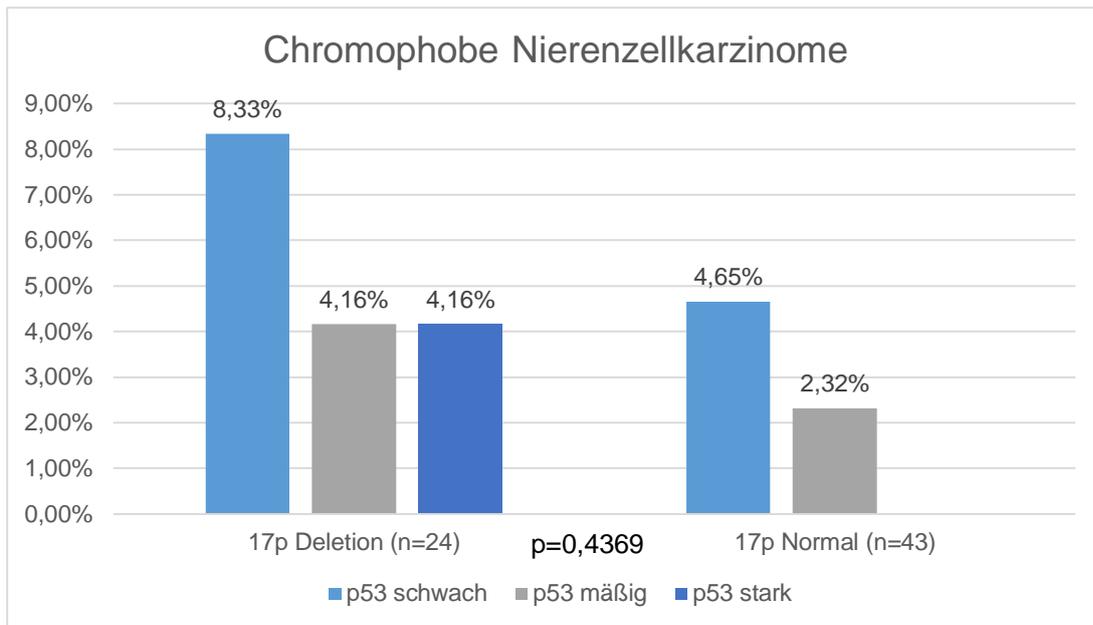


Abbildung 12: p53 Immunhistochemie Befunde und 17p Deletionen chromophober Nierenzellkarzinome

Dieser kombinierte Effekt von Deletion und immunhistochemischer Positivität auf die Tumorprogression ist in den Abbildungen 13-14 für alle Tumoren und die größte Gruppe der klarzelligen Karzinome mit den Endpunkten Tumorspezifisches Überleben, Gesamtüberleben und Progressionsfreies Überleben dargestellt. Die Darstellungen zeigen, dass für die klarzelligen Karzinome eine signifikante Beziehung zur Prognose besteht. Dabei fällt auf, bei Patienten mit weder immunhistochemischer p53 Positivität noch 17p Deletion eine besonders günstige Prognose besteht, während alle Formen der p53 Alteration mit einem ungünstigeren Verlauf assoziiert sind.

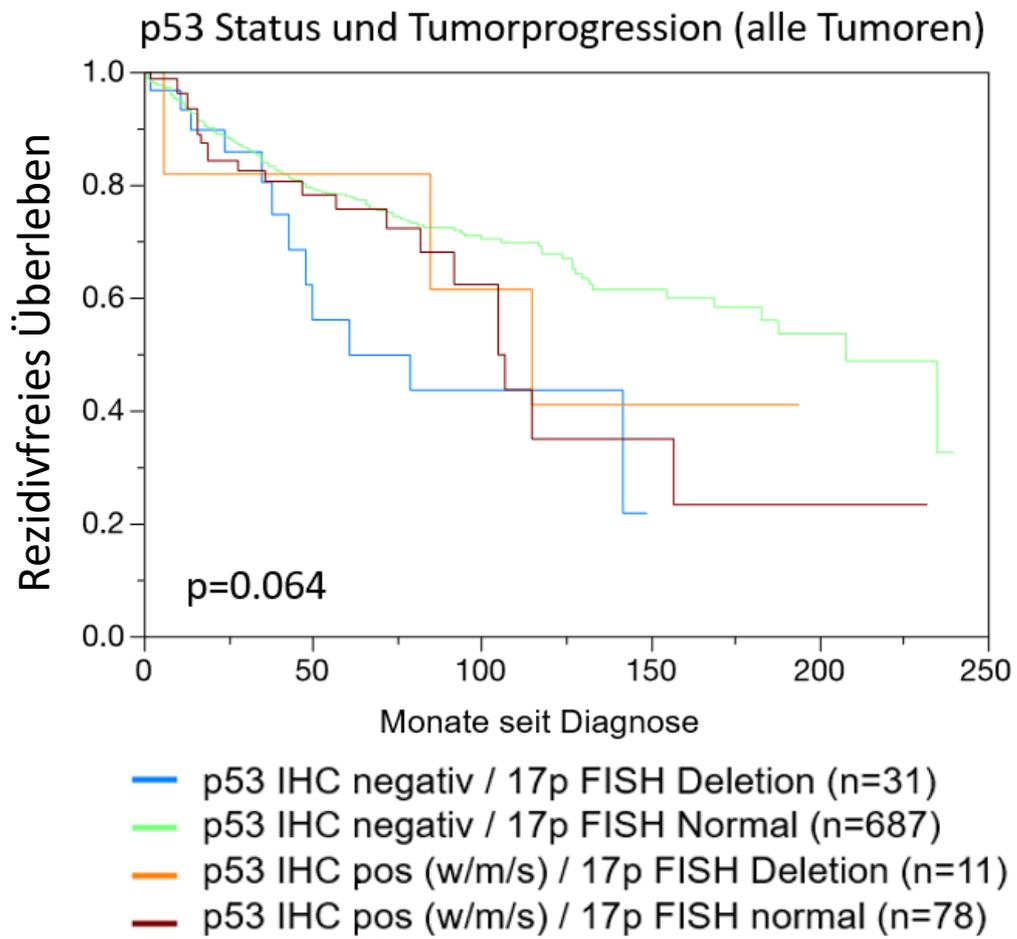


Abbildung 13: p53 Status und Tumorprogression (alle Tumoren)

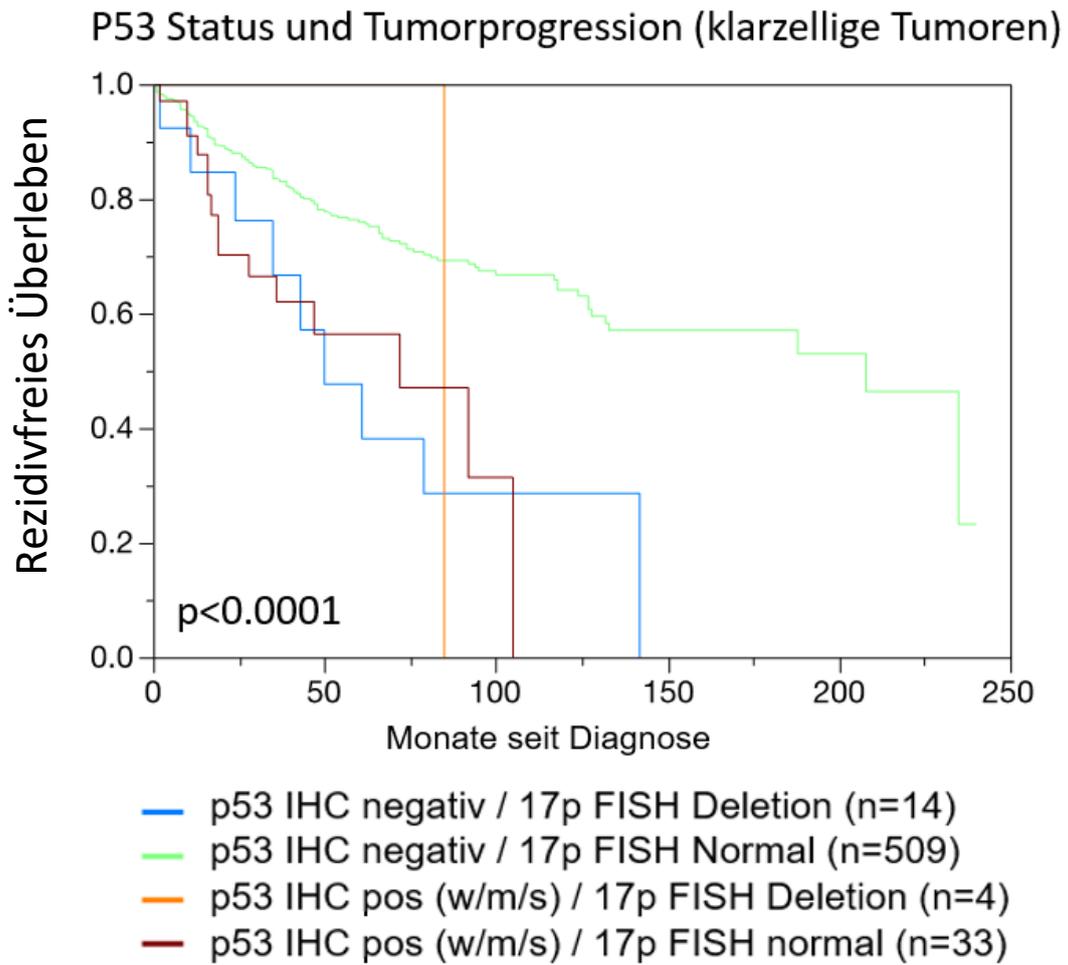


Abbildung 14: p53 Status und Tumorprogression (klarzellige Tumoren)

4. Diskussion

Die in dieser Studie vorgelegten Daten beschreiben die größte jemals durchgeführte Untersuchung zum p53 Status beim Nierenzellkarzinom. Die große Zahl der untersuchten Tumoren wurde durch die Verwendung der Tissue Microarray Technik ermöglicht welche es erlaubt auf einem einzigen Objektträger mehr als 500 Karzinome mittel Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder Immunhistochemie zu untersuchen.

Die von uns zum Nachweis von 17p Deletionen verwendete Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung repräsentiert den Goldstandard für die Bestimmung von Gen und Chromosomenkopiezahlaberrationen in Geweben (21–24). Alle anderen „konkurrierenden“ Methoden basieren auf der Extraktion von DNA aus einem Gewebefragment(21–24). Dieses Verfahren birgt zwei substantielle Nachteile gegenüber der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Nachteil Nr.1 ist, dass das Gewebestück, aus dem DNA extrahiert wurde, nicht zu 100% aus Tumor besteht, sondern dass jedes Tumorgewebsfragment auch Stroma einschließlich Entzündungszellen beinhaltet(21–24). Da diese Zellen über einen normalen DNA Gehalt verfügen können sie den Nachweis von Deletionen behindern. Nachteil Nr. 2 liegt darin, dass im Gegensatz zur FISH Untersuchung keine absoluten Genkopiezahlen gemessen werden können, sondern lediglich Unterschiede z.B. zwischen den beiden Allelen von 17p(21–24). Aufgrund dessen kann nicht immer sicher entschieden werden ob bei einer unterschiedlichen DNA Menge zwischen den mütterlichen und dem väterlichen Allel eines Gens ein Allel fehlt oder aber ein Allel überrepräsentiert(25)

Untersuchungen von Genkopiezahlveränderungen an extrahierter DNA können somit immer zu einer Unterschätzung der echten Deletionshäufigkeit (bei hoher Beimengung von Entzündungszellen) aber auch zu einer Überschätzung beim Vorliegen beispielsweise von Trisomien führen. Die in unserer Studie gefundene Häufigkeit von 17p Deletionen lag insgesamt bei 5,52%. Dies ist im untersten Bereich der bisher publizierten Studien, welche alle zusammen mit der Fallzahl und der durchgeführten Methode in Tabelle 14 zusammengefasst sind. Die Gründe für die Diskrepanzen dürften darin liegen, dass die meisten der früheren Studien mit extrahierter DNA, mit den oben genannten Problemen, gearbeitet haben. Nur zwei von 22 Studien hatten eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an allerdings nur 21 bzw. 53 Fällen durchgeführt wobei Häufigkeiten von 18% und 23,8% Deletionen beschrieben wurden. Es ist möglich, dass diese Studien durch eine Beimengung besonders hoher High

Grade Tumoren oder chromophober Karzinome höhere Deletionshäufigkeiten aufwiesen als in unserem Projekt nachgewiesen. Das unsere Deletionshäufigkeit von 5,52% nahe an der Realität liegt wird auch dadurch untermauert, dass die TCGA/ICGC Datenbank für klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome Deletionshäufigkeiten von unter 10% findet, dies obwohl auch in diesen, allerdings hochstandardisierten, Untersuchungen extrahierte DNA Ausgangsmaterial für die DNA Analyse war(15,16). Insgesamt macht unsere Untersuchung deutlich, dass 17p Deletionen bei Nierenzellkarzinomen selten sind, wenn sie aber vorkommen häufig mit einem hohen Entdifferenzierungsgrad oder aber dem Vorliegen eines chromophoben Karzinoms assoziiert sind. Tatsächlich wiesen chromophobe Karzinome in unserem Patientenkollektiv mit mehr als 30% Deletionen hochsignifikant mehr 17p Deletionen auf als andere Nierenkarzinomtypen, sodass der Nachweis einer 17p Deletion, gerade bei einem nicht „High Grade Nierenzelltumor“, als Argument für ein chromophobes Karzinom gesehen werden dürfte. Die Enge Assoziation mit dem chromophoben Karzinomtyp passt auch für die zu den ICGC/TCGA Daten wo ebenfalls 17p Deletionen bei gut 30% der chromophoben Karzinome beschrieben wurden(15,16). Insgesamt spricht auch die Konkordanz unserer Befunde mit den ICGC/TCGA Daten für die Validität der von uns applizierten Technologie. Interessanterweise war auch eines unserer Onkozytome 17p deletiert. Der Nachweis einer 17p Deletion mit dem Verlust von mindestens einem Allel des so wichtigen p53 Tumorsuppressorgens passt nur schlecht zur Annahme eines benignen Tumors. Möglicherweise wurde bei diesem Onkozytom eine falsche Diagnose gestellt.

Tabelle 14: Literaturtabelle zur Häufigkeit von 17p Deletionen beim Nierenzellkarzinom (26-46)

| Autor | Jahr | Methode | Anzahl Fälle | 17p del in % |
|------------------|-------------|--|---------------------|---------------------|
| Bi M | 2016 | LOH | 21 | 43 |
| Perrino CM | 2015 | High-density SNP array analysis | 20 | 52,9 |
| Malouf GG | 2013 | FISH, RT-PCR, Karyotyping | 21 | 23,8 |
| Chen M | 2009 | SNP-CGH array | 80 | 7,7 |
| von Knobloch R | 2002 | MSA | 53 | 26,1 |
| Rodrigo Aliaga M | 2001 | PCR-SSCP | 6 | 83,3 |
| Reutzel D | 2001 | CGH | 61 | 7 |
| Gronwald J | 1999 | CGH | 9 | 11,1 |
| Moch H | 1998 | FISH | 53 | 18 |
| Contractor H | 1997 | MSA | 100 | 14 |
| Sugimura J | 1997 | LOH | 42 | 6 |
| Dijkhuizen T | 1996 | Cytogenetic analysis | 31 | 6,4 |
| Imai Y | 1994 | direct sequencing of DNA | 53 | 15-65 |
| Brauch H | 1994 | Human recombinant DNA probes and oligolabeling | 28 | 35 |
| Presti JC Jr | 1993 | Hybridizations, and Autoradiography | 82 | 15,8 |
| Uchida T | 1993 | PCR-SSCP | 30 | 20,6 |
| Reiter RE | 1993 | RNA Extraction and Hybridization. | 31 | 48,2 |
| Kovacs A | 1992 | RFLP | 11 | 45,4 |
| Ogawa O | 1992 | Allele Deletion Analysis | 48 | 16,6 |
| Presti JC Jr | 1991 | RFLP | 50 | 16,1 |
| Morita R | 1991 | RFLP | 38 | 30 |

Das in dieser Studie verwendete Protokoll zur immunhistochemischen Darstellung von p53 Protein ist identisch mit früher verwendeten Ansätzen wo die Arbeitsgruppe der UKE Pathologie eine hohe Konkordanz mit dem Nachweis von Mutationen beim Prostatakarzinom nachweisen konnte(47). Da in früheren Studien insbesondere eine starke p53 Positivität häufig mit einer Mutation assoziiert war nehmen wir an, dass die wenigen Fälle welche eine starke p53 Positivität aufwiesen eine p53 Missense Mutation aufweisen und dass dies wohl auch für einen Teil der mäßig stark p53 positiven Tumoren zutrifft. Unter Verwendung unseres immunhistochemischen Protokolls war früher bei schwach positiven Fällen kein Mutationsnachweis möglich gewesen(47). Diese Annahme wird indirekt unterstützt durch die Daten aus der ICGC/TCGA Datenbank (Abbildung 1) wo p53 Mutationen nur in ca. 2% der klarzelligen und papillären Karzinome nachweisbar waren. Bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, dass chromophobe Karzinome gemäß TCGA und ICGC bis zu 30% p53 Mutationen aufwiesen und sich somit deutlich von den anderen Tumoren abhoben(15,16).

Eine Besonderheit bezüglich p53 Status bei chromophoben Karzinomen kommt in unserer immunhistochemischer Untersuchung allerdings nicht zur Darstellung. Auch eine erweiterte Analyse der TCGA Datenbank zeigt keine Besonderheiten bezüglich der Mutationstypen in den beiden histologischen Subgruppen. Es ist allerdings denkbar, dass beim chromophoben Nierenzellkarzinom weniger dominant-negative Mutationen vorkommen. In den TCGA/ICGC Daten findet sich zumindest ein indirekter Hinweis darauf, da sehr viele (16 von 20, 80%) der publizierten Fälle von chromophoben, p53 mutierten Karzinomen gleichzeitig auch einen Deletion des verbleibenden TP53 Genes auf dem zweiten Allel aufweisen(15,16). Die früher durchgeführten Studien zur p53 Immunhistochemie bei Nierenzellkarzinomen sind in Tabelle 15 dargestellt zusammen mit den verwendeten Antikörpern, den Kriterien für die Definition eines p53 positiven Falls und dem Anteil p53 positiver Tumoren. Die Darstellung macht deutlich, dass die von uns gefundene durchschnittliche Häufigkeit von einer positiven p53 Immunhistochemie (einschließlich schwach positive Fälle) von 10,95% im untersten Bereich der in der Literatur publizierten Daten sind. Die Tabelle macht insgesamt deutlich, wie schwierig es ist p53 Protein reproduzierbar zu messen und wie schwierig es ist Daten verschiedener Laboratorien miteinander zu vergleichen. Aufgrund der umfassenden ICGC/TCGA Befunde ist es sehr unwahrscheinlich, dass ein relevanter Teil der p53 positiven Fälle dieser Studien mutierte Tumoren

beschreiben(15,16). Das von uns verwendete Protokoll war dafür geschaffen insbesondere mutierte Fälle zu entdecken. Mit Verwendung dieses Protokolls konnte in unserer Studie keine besondere Prognoserelevanz des p53 Status gefunden werden. Es ist allerdings bemerkenswert, dass die schwach p53 positiven klarzelligen Nierenzellkarzinome einen deutlich ungünstigeren Verlauf aufwiesen als die p53 normalen. Da wir nicht davon ausgehen, dass es sich hier um mutierte Fälle handelt könnte der Befund bedeuten, dass eine physiologische Überexpression von p53 Protein (z.B. bei genetisch überdurchschnittlich instabilen Tumoren) eine gewisse prognostische Bedeutung ausübt. Es wäre möglich, dass ein sensitiveres Protokoll welches nicht darauf abzielt nur mutierte Fälle zu finden eine größere prognostische Aussagekraft haben könnte.

Tabelle 15: Literaturtabelle p53 Immunhistochemischer Befunde bei Nierenzellkarzinomen (modifiziert nach Noon et al., 2010, p. 788f)(48-74)

| Autor | Jahr | Antikörper | Anzahl Fälle | Kriterium für positiv | p53 IHC pos in % |
|------------------|------|--|--------------|-----------------------|------------------|
| Godlewski J | 2017 | DO-7 | 31 | >1% | 35,5 |
| Abolhasani M | 2015 | DO-7 | 91 | >4% | 1,1 |
| Zheng K | 2014 | p53 monoclonal antibodies (Invitrogen Biotech Corp, USA) | 1,239 | >15% | 59,8 |
| Perret AG | 2008 | DO-7 | 50 | >20% | 48 |
| Phuoc NB | 2007 | DO-7 | 119 | >10% | 53,7 |
| Kankuri M | 2006 | DO-7 | 117 | >10% | 12,8 |
| Kramer BA | 2005 | DakoCytomation | 117 | >5% | 13,6 |
| Cho DS | 2005 | ZYMED | 92 | >10% | 11,9 |
| Shvarts O | 2005 | DO-7 | 193 | Jede Anfärbung, >20% | 57,5 (7,2) |
| Zigeuner R | 2004 | DO-7 | 184 | >1% | 22,8 |
| Uchida T | 2002 | DO-7 | 112 | >1 | 13,3 |
| Olumi AF | 2001 | DO-7/PAB240/beide | 43 | >10%, beide | 51/30 |
| Ljungberg B | 2001 | DO-7 | 99 | >5% | 17,1 |
| Girgin C | 2001 | DO-1 | 50 | >20% | 32 |
| Haitel A | 2000 | DO-1 | 97 | >5% | 36 |
| Rioux-Leclercq N | 2000 | DO-7 | 66 | >20% | 16,6 |
| Vasavada SP | 1998 | DO-7 | 39 | >1% | 0 |
| Sinik Z | 1997 | DO-7 | 39 | >10% | 17,9 |
| Papadopoulos I | 1997 | DO-1 | 90 | Jeder positive Kern | 33,3 |
| Zhang XH | 1997 | Ab-6 | 70 | >10% | 22,8 |
| Gelb AB | 1997 | DO-7 | 52 | >5% | 3,8 |
| Shiina H | 1997 | DO-7 | 72 | >10% | 40,2 |
| Hofmockel G | 1996 | DO-7 | 31 | >1% | 16,1 |
| Lipponen P | 1994 | CM1 | 123 | Jeder positive Kern | 33,3 |
| Kamel D | 1994 | CM1 | 56 | >1% | 10,7 |
| Bot FJ | 1994 | DO-7 | 100 | >50% | 32 |
| Uhlman DL | 1994 | DO-7 | 175 | >1% | 28 |

Der Vergleich von p53 Immunhistochemiedaten und 17p Deletion macht deutlich, dass zwischen diesen Parametern eine signifikante aber in keiner Weise eine perfekte Beziehung besteht. Dass nur weniger als 25% der 17p deletierten Karzinome einen positiven p53 Immunbefund zeigen wovon nur ca. 15% einer mäßig starken bis starken p53 Positivität zuzuordnen sind zeigt, dass das Szenario einer p53 Inaktivierung durch

gleichzeitige Mutation und Deletion beim Nierenzellkarzinom, wenn überhaupt nur selten auftritt. Die Daten zeigen vielmehr, dass die meisten 17p Deletionen nicht mit einer Alteration des p53 Tumorsuppressorgens assoziiert sind, sondern offensichtlich andere 17p Gene betreffen. Tatsächlich gibt es einige Gene auf Chromosom 17p welche als Tumorsuppressorgene in Frage kommen. Dazu gehören HIC1, FLCN und CRK (75). HIC1 ist ein Transkriptionsrepressor(75). FLCN ist ein neuartiges Protein ohne charakteristische Domäne, die auf eine bestimmte Funktion hindeutet und CRK ist ein Signal-Adaptor Protein welches Tyrosinkinasen und kleine G-Proteine verbindet(75). Der Vergleich von 17p Deletionen und der p53 Immunhistochemie zeigt auch, dass zumindest bei Verwendung unseres p53 Immunhistochemieprotokolls die FISH Befunde mehr prognostische Bedeutung haben als die Immunhistochemiebefunde. Auch dieser Befund ist ein weiteres Argument dafür, dass andere Gene auf 17p relevanter für das biologische Verhalten von Nierentumoren sind als p53.

Zusammenfassend zeigen unsere Befunde, dass immunhistochemisch erfassbare (Missense, dominant negative) p53 Mutationen und 17p Deletionen beim Nierenzellkarzinomen selten sind. Diese Daten sind bezüglich des Deletionsnachweises „Hieb und Stichfest“. Die Verwendung der FISH-Technologie mit validierten Schwellenwerten dürfte mit hoher Wahrscheinlichkeit die reale Häufigkeit von 17p Deletionen bei Nierentumoren wiedergeben. Die Daten zeigen, dass 17p Deletionen beim klarzelligem Karzinom mit dem Grad der Entdifferenzierung stark zunehmen und auch eine ungünstige prognostische Bedeutung haben. Darüber hinaus sind 17p Deletionen stark gehäuft bei chromophoben Nierenzellkarzinomen der diagnostische Nutzen dieses Befundes ist allerdings gering, da andere, einfachere Methoden zur sicheren Abgrenzung chromophober Nierenzellkarzinome bestehen. Unsere Daten belegen das nur seltene Vorkommen von p53 Mutationen beim Nierenzellkarzinom. Die prognostische Bedeutung einer schwachen p53 Anfärbung in klarzelligem Nierenzellkarzinomen spricht aber dafür, dass auch eine vermehrte p53 Protein Expression welche nicht durch eine Mutation bedingt ist klinisch relevant sein könnte. Für die Zukunft gilt es zu klären ob bei Verwendung anderer Protokolle/Schwellenwerte der immunhistochemische p53 Nachweis beim Nierenzellkarzinom praktische/klinische Relevanz erhalte könnte.

5. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom gehört zu den zehn häufigsten Tumoren von Männern und Frauen in westlichen Gesellschaften(2). Die gängige Therapie besteht in einer Operation. Danach werden metastasenfreie Patienten klinisch nachkontrolliert(2). Nachdem neue systemische Therapieansätze in den letzten Jahren das Therapeutische Arsenal verbreitert haben stellt sich immer mehr die Frage nach einer adjuvanten Therapie und damit auch die Frage der Identifikation von Hochrisikopatienten welche von einer derartigen Therapie profitieren könnten. Da die existierenden klinisch pathologischen Prognoseparameter für individuelle Einschätzung der Patientenprognose derzeit nicht ausreichend sind stellt sich die Frage nach molekularen Tests. Von besonderem Interesse ist das p53 Tumorsuppressorgen, das am häufigste veränderte Tumorsuppressorgen beim Menschen. Die bisher bestehende Literatur beinhaltet fast nur Studien mit weniger als 200 Fällen, was angesichts der relativ geringen Häufigkeit von p53 Veränderungen beim Nierenzellkarzinom eine zu geringe Fallzahl ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehr als 1800 Nierentumoren in einem Tissue Microarray Format sowohl immunhistochemisch wie auch mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf das Vorliegen einer nukleären p53 Protein Akkumulation bzw. 17p (p53) Deletionen untersucht. Die Ergebnisse bestätigen, dass p53 Veränderungen beim Nierenzellkarzinom selten sind. Eine 17p Deletion fand sich in 71 von 1428 Interpretierbaren Tumoren mit einer deutlichen Häufung in chromophoben Karzinomen. Eine Deletion fand sich in 24 von 72 chromophoben Karzinomen (33,33%) aber nur in 35 von 946 klarzelligen Karzinomen (3,7%) und 9 von 208 papillären Karzinomen (4,33%). ($p < 0.0001$). In klarzelligen Karzinomen war der Nachweis von 17p Deletionen mit einem ungünstigen Differenzierungsgrad assoziiert ($p < 0.0001$) zudem war die Deletion sowohl beim Betrachten aller Tumoren ($p = 0.0411$) wie auch in klarzelligen Karzinomen ($p = 0.0072$) und in papillären Karzinomen ($p = 0.012$) mit dem Progressionsfreiem Überleben assoziiert.

Für den immunhistochemischen Nachweis von p53 Protein war ein Protokoll verwendet worden was früher im Falle einer starken Anfärbung eng mit dem Vorliegen von Missense Mutationen von p53 assoziiert war und bei dem auch bei mäßig starker Anfärbung noch gehäuft p53 Missense Mutationen zu finden waren, bei dem aber bei schwacher Anfärbung nur in Einzelfällen eine p53 Mutation vorliegen dürfte. Unter Verwendung dieses Protokolls fand sich eine starke p53 Positivität die in 0,44% von

1579 erfolgreich untersuchten Tumoren eine mäßig starke in 3,16% und eine schwache in 6,14%. Unsere Annahme, dass ein Teil der mäßig stark positiven Tumoren eine p53 Mutation aufweisen dürften passt zu den Befunden der ICGC/TCGA Datenbank wo eine p53 Mutation in 2,15% von 512 Untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinomen und in 2,12% von 283 untersuchten papillären Nierenzellkarzinomen beschrieben worden war(15,16).

Der Vergleich der verschiedenen Tumortypen ergab für die Gruppe der stark und mäßig stark positiven eine Häufung innerhalb der papillären Karzinome wo 9,48% der Fälle mäßig stark/ stark p53 positiv waren. Dies war deutlich höher als die 1,64% positiven Fälle in 1033 auswertbaren klarzelligen Karzinomen. Innerhalb der Gruppe der klarzelligen Karzinome war die p53 Positivität gehäuft in wenig differenzierten Tumoren. Unter Verwendung der ISUP Gradierung fand sich beispielsweise eine starke Positivität ausschließlich in Grad 4 Tumoren ($p=0,0007$) und auch bei Verwendung der Fuhrmann Gradierung war die starke p53 Positivität auf die Grad 4 Tumoren beschränkt ($p=0,0026$). Eine prognostische Bedeutung der starken oder mäßig starken p53 Positivität konnte nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis einer signifikant früheren Tumorprogression bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen mit nur schwacher p53 Positivität könnte dafür sprechen, dass eine nicht mutationsbedingte physiologische p53 Überexpression zumindest bei diesem Tumortyp eine biologische/klinische Relevanz besitzt. Der Vergleich von p53 Immunhistochemie mit dem Deletionsstatus ergibt eine gute aber nicht perfekte Korrelation. Bei Betrachtung aller Tumoren findet sich ein positiver p53 Nachweis nur in 23,18% von 69 deletierten, was immerhin deutlich häufiger ist als die 9,84% p53 positiven Fälle in den 1250 nicht deletierten Tumoren. Die Tatsache, dass die meisten p53 deletierten Fälle keinen immunhistochemischen Hinweise auf eine p53 Mutation erkennen lassen spricht dafür, dass andere Tumorsuppressorgene auf 17p möglicherweise im Zusammenspiel mit einer verminderten p53 Expression (bei Verlust eines Alleles und intaktem zweiten Allel) eine biologische Rolle beim Nierenzellkarzinom spielen.

6. Abstract

Renal cell carcinoma is one of the ten most common tumors of men and women in western societies (2). The most common therapy is surgery. Subsequently, metastasis-free patients are clinically checked (2). After new systemic therapy approaches have broadened the therapeutic arsenal in recent years, the question of adjuvant therapy, and thus the question of identifying high-risk patients who could benefit from such therapy, is becoming more and more important. Since the existing clinical pathological prognosis parameters are currently not sufficient for individual assessment of the patient prognosis, the question of molecular tests arises. Of particular interest is the p53 tumor suppressor gene, the most frequently altered tumor suppressor gene in humans. The existing literature contains almost only studies with less than 200 cases, which is too small a number in view of the relatively low frequency of p53 changes in renal cell carcinoma.

In the present study, more than 1800 renal tumors in a tissue microarray format were examined both immunohistochemically and by fluorescence in situ hybridization for the presence of nuclear p53 protein accumulation or 17p (p53) deletions. The results confirm that p53 changes in renal cell carcinoma are rare. A 17p deletion was found in 71 of 1428 interpretable tumors with a marked accumulation in chromophobe carcinomas. Deletion was found in 24 of 72 chromophobe carcinomas (33.33%) but only in 35 of 946 clear cell carcinomas (3.7%) and 9 of 208 papillary carcinomas (4.33%). ($p < 0.0001$). In clear cell carcinomas, the detection of 17p deletions was associated with an unfavorable degree of differentiation ($p < 0.0001$). Furthermore, the deletion was associated with progression-free survival in clear cell carcinomas ($p = 0.0072$) and in papillary carcinomas ($p = 0.012$) as well as in all tumors ($p = 0.0411$). For the immunohistochemical detection of p53 protein a protocol was used which was previously closely associated with the presence of missense mutations of p53 in the case of strong staining and in which p53 missense mutations were still frequently found even in moderately strong staining, but in which a p53 mutation should only be present in isolated cases in the case of weak staining. Using this protocol, a strong p53 positivity was found in 0.44% of 1579 tumors, a moderately strong positivity in 3.16% and a weak positivity in 6.14%. Our assumption that some of the moderately positive tumors may have a p53 mutation fits the findings of the ICGC/TCGA database, where

a p53 mutation was described in 2.15% of 512 clear cell renal cell carcinomas investigated and in 2.12% of 283 investigated papillary renal cell carcinomas (16,17). The comparison of the different tumor types showed an accumulation within strong and moderately positive groups of papillary carcinomas, in which 9.48% of the cases were moderately strong / strong p53 positive. This was significantly higher than the 1.64% positive cases in 1033 evaluable clear cell carcinomas. Within the clear cell carcinoma group, p53 positivity was clustered in undifferentiated tumors. Using ISUP grading, for example, a strong positivity was found exclusively in grade 4 tumors ($p=0.0007$) and even using Fuhrmann grading, the strong p53 positivity was limited to grade 4 tumors ($p=0.0026$). A prognostic significance of the strong or moderately strong p53 positivity could not be demonstrated. The detection of significantly earlier tumor progression in clear cell renal cell carcinoma with only weak p53 positivity could suggest that non-mutationally induced physiological p53 overexpression has biological/clinical relevance at least in this tumor type. The comparison of p53 immunohistochemistry with deletion status shows a good but not perfect correlation. When considering all tumors, a positive p53 detection is found only in 23.18% of 69 deleted tumors, which is significantly more frequent than the 9.84% p53 positive cases in the 1250 non-deleted tumors. The fact that most p53 deleted cases show no immunohistochemical evidence for a p53 mutation suggests that other tumor suppressor genes at 17p may play a biological role in renal cell carcinoma in combination with a decreased p53 expression (with loss of an allele and intact second allele).

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: WHO Einteilung von Nierentumoren (modifiziert nach Moch, 2016, p. 128) | 5 |
| Tabelle 2: Therapieoptionen beim metastasierendem Nierenzellkarzinom..... | 7 |
| Tabelle 3: Klinische und pathologischen Parameter der untersuchten Karzinome ... | 13 |
| Tabelle 4: 17p Deletionen bei häufigen Nierenzellkarzinomentitäten | 17 |
| Tabelle 5: 17p Deletionen bei seltenen Nierenzellkarzinomentitäten | 17 |
| Tabelle 6: 17p Deletionen bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen | 19 |
| Tabelle 7: Tumorgröße und 17p Deletionen | 20 |
| Tabelle 8: Patientenalter und 17p Deletionen | 20 |
| Tabelle 9: p53 Immunhistochemischer Befund bei Nierenkarzinomen | 24 |
| Tabelle 10: p53 Immunhistochemiebefunde bei seltenen Nierenkarzinom Subtypen | 25 |
| Tabelle 11: p53 Immunhistochemischer Befund bei klarzelligen Nierenzellkarzinom | 26 |
| Tabelle 12: Tumorgröße und p53 Immunhistochemie Befund | 27 |
| Tabelle 13: Alter und p53 Immunhistochemie Befund | 28 |
| Tabelle 14: Literaturtabelle zur Häufigkeit von 17p Deletionen beim Nierenzellkarzinom (26-47)..... | 38 |
| Tabelle 15: Literaturtabelle p53 Immunhistochemischer Befunde bei Nierenzellkarzinomen (modifiziert nach Noon et al., 2010, p. 788f)(50-84) | 41 |

7.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: p53 Mutationsrate bei Nierenzellkarzinomen (TCGA/ICGC)..... | 10 |
| Abbildung 2: 17p Deletion beim Nierenzellkarzinom (TCGA/ICGC) | 11 |
| Abbildung 3: Beispiel der Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung unter der Verwendung von 17p Sonden | 15 |
| Abbildung 4: 17p Deletionen und Gesamtüberleben | 21 |
| Abbildung 5: 17p Deletionen und Tumorspezifisches Überleben | 22 |
| Abbildung 6: 17p Deletionen und Rezidivfreies Überleben..... | 23 |
| Abbildung 7: p53 Immunhistochemischer Befund und Gesamtüberleben | 29 |
| Abbildung 8: p53 Immunhistochemischer Befund und Tumorspezifisches Überleben | 30 |
| Abbildung 9: p53 Immunhistochemischer Befund und Rezidivfreies Überleben..... | 31 |
| Abbildung 10: p53 Immunhistochemie Befunde und 17p Deletionen aller Nierenzellkarzinome | 32 |
| Abbildung 11: p53 Immunhistochemie Befunde und 17p Deletionen klarzelliger Nierenzellkarzinome | 32 |
| Abbildung 12: p53 Immunhistochemie Befunde und 17p Deletionen chromophober Nierenzellkarzinome | 33 |
| Abbildung 13: p53 Status und Tumorprogression (alle Tumoren) | 34 |
| Abbildung 14: p53 Status und Tumorprogression (klarzellige Tumoren) | 35 |

8. Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2017.
2. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) DK e. V (DKG) und DK (DKH). S3-Leitlinie Diagnostik , Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms. Leitlinienprogr Onkol. 2017;(September):1–52.
3. Chen DYT, Uzzo RG. Optimal management of localized renal cell carcinoma: surgery, ablation, or active surveillance. J Natl Compr Canc Netw. 2009 Jun;7(6):635–42; quiz 643.
4. Hsieh JJ, Purdue MP, Signoretti S, Swanton C, Albiges L, Schmidinger M, Heng DY, Larkin J, Ficarra V. Renal cell carcinoma. Nat Rev Dis Prim. 2017 Mar 9;3:17009.
5. Kovacs G, Erlandsson R, Boldog F, Ingvarsson S, Müller-Brechlin R, Klein G, Sümegi J. Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Mar;85(5):1571–5.
6. Mancilla-Jimenez R, Stanley RJ, Blath RA. Papillary renal cell carcinoma: a clinical, radiologic, and pathologic study of 34 cases. Cancer. 1976 Dec;38(6):2469–80.
7. Hes O, Šíma R, Němcová J, Hora M, Bulimbasic S, Kazakov D V., Üрге T, Reischig T, Dvořák M, Michal M. End-stage kidney disease: gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y chromosome in non-neoplastic tissue. Virchows Arch. 2008 Oct 16;453(4):313–9.
8. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt H-J. Human chromophobe cell renal carcinoma. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1985 Jan;48(1):207–17.
9. Hes O, Petersson F, Kuroda N, Hora M, Michal M. Renal hybrid oncocytic/chromophobe tumors - a review. Histol Histopathol. 2013;28(10):1257–64.
10. Kobayashi K, Hirokawa M, Yabuta T, Fukushima M, Masuoka H, Higashiyama T, Kihara M, Ito Y, Miya A, Amino N, Miyauchi A. Metastatic carcinoma to the thyroid gland from renal cell carcinoma: role of ultrasonography in preoperative diagnosis. Thyroid Res. 2015;8:4.

11. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01120249>.
12. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01235962>.
13. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01599754>.
14. Joerger AC, Fersht AR. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Jun;2(6):a000919.
15. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012 May 1;2(5):401–4.
16. The Cancer Genome Atlas. “The results <published or shown> here are in whole or part based upon data generated by the TCGA Research Network: <http://cancergenome.nih.gov/>.” [Internet]. [cited 2018 Aug 15]. Available from: www.cancergenome.nih.gov
17. Büscheck F, Fraune C, Simon R, Kluth M, Hube-Magg C, Möller-Koop C, Shadanpour N, Bannenberg C, Eichelberg C, Höflmayer D, Clauditz T, Wittmer C, Wilczak W, Sauter G, Fisch M, Rink M, Eichenauer T. Aberrant expression of membranous carbonic anhydrase IX (CAIX) is associated with unfavorable disease course in papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2018 Dec;36(12):531.e19-531.e25.
18. Mirlacher M, Simon R. Recipient block TMA technique. *Methods Mol Biol.* 2010;664:37–44.
19. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):844–7.
20. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer P-S, De Silva C, Meyer-Kornblum M, Kötschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhäuser C, Mader M, Kurtz S, Sirma H, Saad F, Steuber T, Graefen M, Plass C, Sauter G, Simon R, Minner S, Schlomm T. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol.* 2012 Aug;181(2):401–12.

21. Bayani J, Squire JA. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). In: *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2004. p. Unit 22.4.
22. Koreth J, Bakkenist CJ, McGee JO. Microsatellite Analysis in Human Disease. In: *Clinical Applications of PCR*. New Jersey: Humana Press; 1998. p. 321–40.
23. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov Today*. 2008 Sep;13(17–18):760–70.
24. Mao X, Young BD, Lu Y-J. The application of single nucleotide polymorphism microarrays in cancer research. *Curr Genomics*. 2007 Jun;8(4):219–28.
25. Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet*. 1991 May;7(5):149–54.
26. Bi M, Zhao S, Said JW, Merino MJ, Adeniran AJ, Xie Z, Nawaf CB, Choi J, Belldegrun AS, Pantuck AJ, Kluger HM, Bilgüvar K, Lifton RP, Shuch B. Genomic characterization of sarcomatoid transformation in clear cell renal cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 23;113(8):2170–5.
27. Perrino CM, Huchtagowder V, Evenson M, Kulkarni S, Humphrey PA. Genetic alterations in renal cell carcinoma with rhabdoid differentiation. *Hum Pathol*. 2015 Jan;46(1):9–16.
28. Malouf GG, Monzon FA, Couturier J, Molinié V, Escudier B, Camparo P, Su X, Yao H, Tamboli P, Lopez-Terrada D, Picken M, Garcia M, Multani AS, Pathak S, Wood CG, Tannir NM. Genomic heterogeneity of translocation renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Sep 1;19(17):4673–84.
29. Chen M, Ye Y, Yang H, Tamboli P, Matin S, Tannir NM, Wood CG, Gu J, Wu X. Genome-wide profiling of chromosomal alterations in renal cell carcinoma using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *Int J cancer*. 2009 Nov 15;125(10):2342–8.
30. von Knobloch R, Hegele A, Brandt H, Varga Z, Wille S, Kälble T, Heidenreich A, Hofmann R. High frequency of serum DNA alterations in renal cell carcinoma detected by fluorescent microsatellite analysis. *Int J cancer*. 2002 Apr 20;98(6):889–94.
31. Rodrigo Aliaga M, Payá García A, Millán Salvador JM, Hernández Martí M, Jiménez Cruz JF. [Genetic study of six chromophobic renal carcinomas]. *Actas Urol Esp*. 2002 Mar;26(3):204–8.

32. Reutzel D, Mende M, Naumann S, Störkel S, Brenner W, Zabel B, Decker J. Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 2001;93(3–4):221–7.
33. Gronwald J, Baur AS, Holtgreve-Grez H, Jauch A, Mosimann F, Jichlinski P, Wauters JP, Cremer T, Guillou L. Chromosomal abnormalities in renal cell neoplasms associated with acquired renal cystic disease. A series studied by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *J Pathol.* 1999 Feb;187(3):308–12.
34. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Richter J, Gasser TC, Mihatsch MJ, Sauter G. Intratumoral heterogeneity of von Hippel-Lindau gene deletions in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 1998 Jun 1;58(11):2304–9.
35. Contractor H, Zariwala M, Bugert P, Zeisler J, Kovacs G. Mutation of the p53 tumour suppressor gene occurs preferentially in the chromophobe type of renal cell tumour. *J Pathol.* 1997 Feb;181(2):136–9.
36. Sugimura J, Tamura G, Suzuki Y, Fujioka T. Allelic loss on chromosomes 3p, 5q and 17p in renal cell carcinomas. *Pathol Int.* 47(2–3):79–83.
37. Dijkhuizen T, Van den Berg E, Van den Berg A, Störkel S, De Jong B, Seitz G, Henn W. Chromosomal findings and p53-mutation analysis in chromophilic renal-cell carcinomas. *Int J cancer.* 1996 Sep 27;68(1):47–50.
38. Imai Y, Strohmeyer TG, Fleischhacker M, Slamon DJ, Koeffler HP. p53 mutations and MDM-2 amplification in renal cell cancers. *Mod Pathol.* 1994 Sep;7(7):766–70.
39. Brauch H, Pomer S, Hieronymus T, Schadt T, Lührke H, Komitowski D. Genetic alterations in sporadic renal-cell carcinoma: molecular analyses of tumor suppressor gene harboring chromosomal regions 3p, 5q, and 17p. *World J Urol.* 1994;12(3):162–8.
40. Presti JC, Reuter VE, Cordon-Cardo C, Mazumdar M, Fair WR, Jhanwar SC. Allelic deletions in renal tumors: histopathological correlations. *Cancer Res.* 1993 Dec 1;53(23):5780–3.

41. Uchida T, Wada C, Shitara T, Egawa S, Mashimo S, Koshiba K. Infrequent involvement of p53 mutations and loss of heterozygosity of 17p in the tumorigenesis of renal cell carcinoma. *J Urol*. 1993 Oct;150(4):1298–301.
42. Reiter RE, Anglard P, Liu S, Gnarr JR, Linehan WM. Chromosome 17p deletions and p53 mutations in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1993 Jul 1;53(13):3092–7.
43. Kovacs A, Storkel S, Thoenes W, Kovacs G. Mitochondrial and chromosomal DNA alterations in human chromophobe renal cell carcinomas. *J Pathol*. 1992 Jul;167(3):273–7.
44. Ogawa O, Habuchi T, Kakehi Y, Koshiba M, Sugiyama T, Yoshida O. Allelic losses at chromosome 17p in human renal cell carcinoma are inversely related to allelic losses at chromosome 3p. *Cancer Res*. 1992 Apr 1;52(7):1881–5.
45. Presti JC, Rao PH, Chen Q, Reuter VE, Li FP, Fair WR, Jhanwar SC. Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res*. 1991 Mar 1;51(5):1544–52.
46. Morita R, Ishikawa J, Tsutsumi M, Hikiji K, Tsukada Y, Kamidono S, Maeda S, Nakamura Y. Allelotype of renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1991 Feb 1;51(3):820–3.
47. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, Gjoni J, Haß T, Galal R, Graefen M, Haese A, Simon R, Hühne-Simon J, Koop C, Korbel J, Weischenfeld J, Huland H, Sauter G, Quaas A, Wilczak W, Tsourlakis M-C, Minner S, Schlomm T. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J Cancer*. 2014 Sep 15;135(6):1369–80.
48. Godlewski J, Krazinski BE, Kowalczyk AE, Kiewisz J, Kiezun J, Kwiatkowski P, Sliwińska-Jewsiewicka A, Wierzbicki PW, Kmiec Z. Expression and Prognostic Significance of EP300, TP53 and BAX in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2017 May 29;37(6):2927–37.
49. Abolhasani M, Salarinejad S, Asgari M. P53 and MDM2 Over-expression and Five-year Survival of Kidney Cancer Patients Undergoing Radical Nephrectomy--Iranian Experience. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(12):5043–7.

50. Zheng K, Zhu W, Tan J, Wu W, Yang S, Zhang J. Retrospective analysis of a large patient sample to determine p53 and Ki67 expressions in renal cell carcinoma. *J BUON*. 19(2):512–6.
51. Perret AG, Clemencon A, Li G, Tostain J, Peoc'h M. Differential expression of prognostic markers in histological subtypes of papillary renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2008 Jul;102(2):183–7.
52. Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, Nakano M, Yokoi S, Deguchi T, Hirose Y. Immunohistochemical analysis with multiple antibodies in search of prognostic markers for clear cell renal cell carcinoma. *Urology*. 2007 May;69(5):843–8.
53. Kankuri M, Söderström K-O, Pelliniemi T-T, Vahlberg T, Pyrhönen S, Salminen E. The association of immunoreactive p53 and Ki-67 with T-stage, grade, occurrence of metastases and survival in renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 26(5B):3825–33.
54. Kramer BA, Gao X, Davis M, Hall M, Holzbeierlein J, Tawfik O. Prognostic significance of ploidy, MIB-1 proliferation marker, and p53 in renal cell carcinoma. *J Am Coll Surg*. 2005 Oct;201(4):565–70.
55. Cho DS, Joo HJ, Oh DK, Kang JH, Kim YS, Lee KB, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 and p53 expression as prognostic indicators in conventional renal cell carcinoma. *Yonsei Med J*. 2005 Feb 28;46(1):133–40.
56. Shvarts O, Seligson D, Lam J, Shi T, Horvath S, Figlin R, Belldegrun A, Pantuck AJ. p53 is an independent predictor of tumor recurrence and progression after nephrectomy in patients with localized renal cell carcinoma. *J Urol*. 2005 Mar;173(3):725–8.
57. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue. *Urology*. 2004 Apr;63(4):651–5.
58. Uchida T, Gao JP, Wang C, Jiang SX, Muramoto M, Satoh T, Minei S, Shimura S, Irie A, Kameya T, Baba S. Clinical significance of p53, mdm2, and bcl-2 proteins in renal cell carcinoma. *Urology*. 2002 Apr;59(4):615–20.
59. Olumi AF, Weidner N, Presti JC. p53 immunoreactivity correlates with Ki-67 and bcl-2 expression in renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2001 Mar;6(2):63–7.

60. Ljungberg B, Bozoky B, Kovacs G, Stattin P, Farrelly E, Nylander K, Landberg G. p53 expression in correlation to clinical outcome in patients with renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol*. 2001 Feb;35(1):15–20.
61. Girgin C, Tarhan H, Hekimgil M, Sezer A, Gürel G. P53 mutations and other prognostic factors of renal cell carcinoma. *Urol Int*. 2001;66(2):78–83.
62. Haitel A, Wiener HG, Baethge U, Marberger M, Susani M. mdm2 expression as a prognostic indicator in clear cell renal cell carcinoma: comparison with p53 overexpression and clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1840–4.
63. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard J, Patard J, Manunta A, Moulinoux JP, Guillé F, Ramée MP, Lobel B. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology*. 2000 Apr;55(4):501–5.
64. Vasavada SP, Novick AC, Williams BR. P53, bcl-2, and Bax expression in renal cell carcinoma. *Urology*. 1998 Jun;51(6):1057–61.
65. Sinik Z, Alkibay T, Ataoglu O, Biri H, Sözen S, Deniz N, Karaoglan U, Bozkirli I. Nuclear p53 overexpression in bladder, prostate, and renal carcinomas. *Int J Urol*. 1997 Nov;4(6):546–51.
66. Papadopoulos I, Rudolph P, Weichert-Jacobsen K. Value of p53 expression, cellular proliferation, and DNA content as prognostic indicators in renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 1997;32(1):110–7.
67. Zhang XH, Takenaka I, Sato C, Sakamoto H. p53 and HER-2 alterations in renal cell carcinoma. *Urology*. 1997 Oct;50(4):636–42.
68. Gelb AB, Sudilovsky D, Wu CD, Weiss LM, Medeiros LJ. Appraisal of intratumoral microvessel density, MIB-1 score, DNA content, and p53 protein expression as prognostic indicators in patients with locally confined renal cell carcinoma. *Cancer*. 1997 Nov 1;80(9):1768–75.
69. Shiina H, Igawa M, Urakami S, Shirakawa H, Ishibe T, Kawanishi M. Clinical significance of immunohistochemically detectable p53 protein in renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 1997;31(1):73–80.
70. Hofmockel G, Wittmann A, Dammrich J, Bassukas ID. Expression of p53 and bcl-2 in primary locally confined renal cell carcinomas: no evidence for prognostic significance. *Anticancer Res*. 16(6B):3807–11.

71. Lipponen P, Eskelinen M, Hietala K, Syrjänen K, Gambetta RA. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PC10), p53 protein and c-erbB-2 in renal adenocarcinoma. *Int J cancer*. 1994 Apr 15;57(2):275–80.
72. Kamel D, Turpeenniemi-Hujanen T, Vähäkangas K, Pääkkö P, Soini Y. Proliferating cell nuclear antigen but not p53 or human papillomavirus DNA correlates with advanced clinical stage in renal cell carcinoma. *Histopathology*. 1994 Oct;25(4):339–47.
73. Bot FJ, Godschalk JC, Krishnadath KK, van der Kwast TH, Bosman FT. Prognostic factors in renal-cell carcinoma: immunohistochemical detection of p53 protein versus clinico-pathological parameters. *Int J cancer*. 1994 Jun 1;57(5):634–7.
74. Uhlman DL, Nguyen PL, Manivel JC, Aeppli D, Resnick JM, Fraley EE, Zhang G, Niehans GA. Association of immunohistochemical staining for p53 with metastatic progression and poor survival in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Oct 5;86(19):1470–5.
75. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan-Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. In: *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 1.30.1-1.30.33.

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Guido Sauter für die Vergabe dieses umfangreichen Themas bedanken. Die produktiven Gespräche und das fördernde Umfeld am Institut für Pathologie waren fortwährend eine Bereicherung.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Martina Kluth, Frau Dr. rer. nat. Claudia Hube-Magg und Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon, für die Organisation und wissenschaftliche Betreuung dieser Dissertation.

Ich bedanke mich ebenfalls bei den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, ohne die ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern Pilar Muñoz Vogel und Saeed Shadanpour, meinem Bruder Pedram Shadanpour und Vadim Rusakov, die mich mental so wie emotional bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützten.

10. Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Navid Flamiano Shadanpour