

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Prävalenz und klinische Bedeutung der 8p-Deletion beim  
Nierenkarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

David Clemens Bannenberg aus Hamburg

Hamburg 2021

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: **13.06.2022**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: **PD. Dr. Georg Rosenberger**

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	11
2.1. Patienten und Methoden	11
2.2. Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung	13
2.3. Statistik	15
3. Ergebnisse	15
3.1. Technische Aspekte	15
3.2. 8p-Deletionen und Tumortyp	16
3.3. 8p-Deletionen und Tumorphänotyp	18
3.4. 8p-Deletionen und Prognose	21
4. Diskussion	25
5. Zusammenfassung	34
6. Abstract	36
7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	38
7.1 Tabellenverzeichnis	38
7.2 Abbildungsverzeichnis	38
8. Abkürzungsverzeichnis	39
9. Eigenanteil an der Promotion	40
10. Literaturverzeichnis	41
11. Danksagung	51
12. Publikation	52
13. Lebenslauf	53
14. Eidesstattliche Versicherung	54

## 1. Einleitung

In Deutschland ist das Nierenkarzinom die achthäufigste maligne Neoplasie bei Männern und die zehnthäufigste maligne Neoplasie bei Frauen. Im Jahr 2013 sind insgesamt 15.000 Menschen in Deutschland an einem Nierentumor neu erkrankt, wobei der Tumor bei Männern deutlich häufiger auftritt. (1) Zu den etablierten Risikofaktoren an einem Nierenzellkarzinom zu erkranken gehören neben einer genetischen Prädisposition, zum Beispiel im Rahmen von genetischen Tumorsyndromen wie der tuberösen Sklerose, Rauchen, Adipositas und Hypertonie. (1) Nierenkarzinome sind morphologisch außerordentlich heterogen. In der WHO-Klassifikation von 2015 sind insgesamt 41 verschiedene Nierentumorentitäten beschrieben. (2) Am häufigsten sind die von Zellen des proximalen Tubulus entstehenden klarzelligen und papillären Karzinome. Die klarzelligen Karzinome machen etwa 70 % aller Nierenzellkarzinome aus. (3) Im klassischen Fall zeigen diese Tumoren ein charakteristisches morphologisches Bild mit wasserklarem Zytoplasma und scharfen Zellgrenzen. (3) Nicht wenige klarzellige Karzinome sind allerdings weniger klassisch aufgebaut, gelegentlich sind die Zellen auch eosinophil-granulär und nicht ohne weiteres als klarzellig zu identifizieren. (4) Auch die papillären Karzinome, welche knapp 20 % der Nierenzellkarzinome ausmachen, stammen vom proximalen Tubulus ab. (3) Ihre charakteristische Morphologie liegt in einer tubulo-papillären Wuchsform, welche häufig auf dem ersten Blick ins Auge fällt. Papilläre Karzinome sind häufiger als alle anderen Nierentumoren bilateral und multifokal. (5) Die nächsthäufigsten Tumoren stammen vom distalen Tubulus ab. Es handelt sich um das chromophobe Nierenzellkarzinom (circa 5 % der Nierentumoren) und seine benigne Variante das Onkozytom (circa 5 %). Onkozytome und chromophobe Karzinome weisen typischerweise ein granuläres Zytoplasma auf, welches bei chromophoben Karzinomen aber deutlich weniger intensiv granuliert ist und beim chromophoben Karzinom bestehen perinukleäre Aufhellungen, welche so prominent werden können, dass der Befund dem eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms nahekommt. (3) Zwei weitere Tumortypen sind von besonderem Interesse. Es handelt sich um Varianten des klarzelligen Karzinoms mit günstigerer Prognose. Dazu gehört das klarzellige tubulo-papilläre Karzinom, eine hochdifferenzierte Variante eines klarzelligen Tumors, welcher auch klarzellige papilläre Strukturen aufweist (6) und der multilokulär-zystische Tumor unklarer Dignität (früher

multilokulär-zystisches Nierenzellkarzinom). (7) Die genannten histologischen Tumortypen finden sich in Abbildung 1. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl anderer Tumorentitäten, welche allerdings so selten sind, dass es kaum Studien mit größeren Fallzahlen gibt, die gesicherte Auskunft über das besondere biologische Verhalten dieser Tumoren geben könnte. Die große morphologische Heterogenität von Nierentumoren führt dazu, dass sich das Spektrum von morphologischen Variationen, die als eigene Entität identifiziert werden dauernd vergrößert. Auch bei der letzten Neufassung der WHO-Klassifikation urogenitaler Tumoren wurden einige neue Entitäten als solche definiert. Die gegenwärtige WHO-Klassifikation von Nierentumoren ist in Tabelle 1 dargestellt. Für den Pathologen ist die morphologische Klassifizierung von Nierentumoren meist verhältnismäßig einfach, nicht selten kommt es aber zu morphologischen Phänomenen, die eine einfache Klassifizierung verunmöglichen. Somit besteht auch beim Nierenzelltumor ein Bedarf nach diagnostischen Markern, welche eine einfachere und sichere Einteilung dieser Tumoren erlauben könnte.

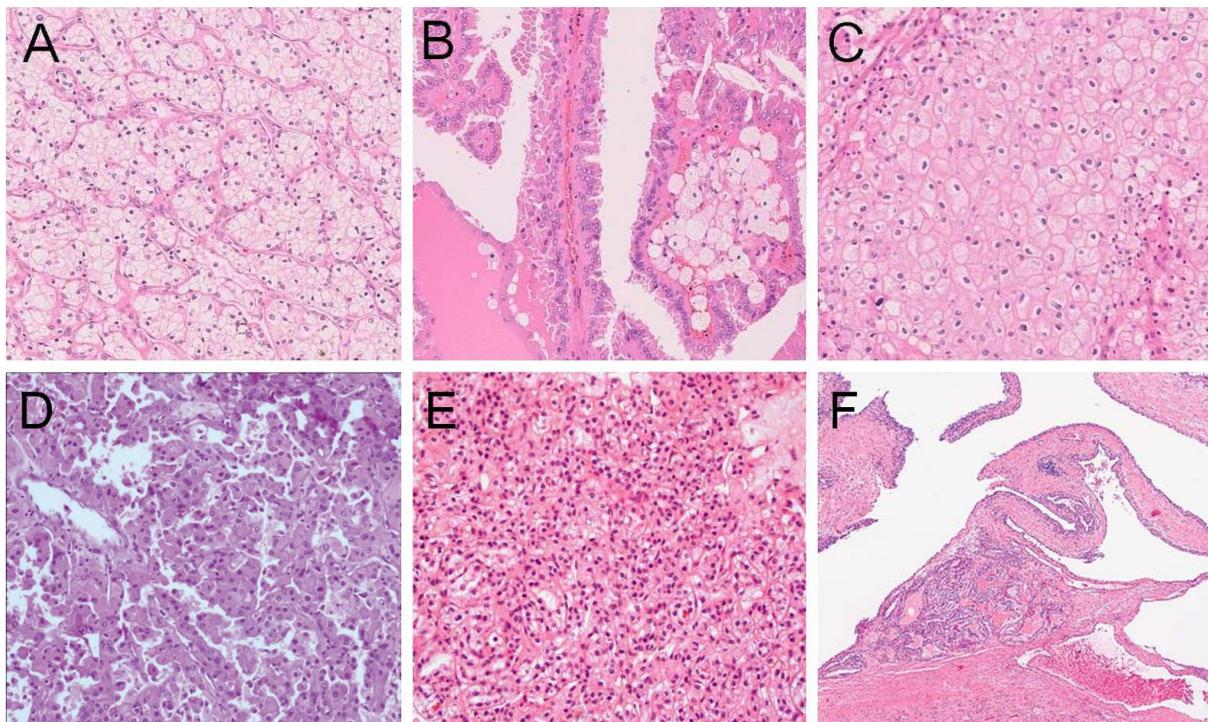


Abbildung 1: Histologische Tumortypen

A: Klarzelliges Nierenzellkarzinom B: Papilläres Nierenzellkarzinom C: Chromophobes Nierenzellkarzinom D: Eosinophile Variante des Klarzelligen Nierenzellkarzinoms E: Klarzelliges tubulo-papilläres Karzinom F: Multilokulär-zystischer Tumor unklarer Dignität (3,4,6,8)

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Nierenzelltumoren (Modifiziert nach (9))

<b>Nierenzelltumoren</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Klarzelliges Nierenzellkarzinom</li> <li>– Multilokulär zystische Neoplasie mit niedrigem Malignitätspotenzial</li> <li>– Papilläres Nierenzellkarzinom</li> <li>– Hereditäre-Leiomyomatose- und Nierenzellkarzinom-assoziiertes Nierenzellkarzinom</li> <li>– Chromophobes Nierenzellkarzinom</li> <li>– Sammelrohrkarzinom</li> <li>– Medulläres Karzinom der Niere</li> <li>– MiT-Familie der Translokationskarzinome</li> <li>– Succinat-Dehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinome</li> <li>– Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom</li> <li>– Erworbene Zystennieren-assoziiertes Nierenzellkarzinom</li> <li>– Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom</li> <li>– Nierenzellkarzinom, nicht klassifiziert</li> <li>– Papilläres Adenom</li> <li>– Onkozytom</li> </ul>	<b>Mesenchymale Tumoren des Erwachsenen</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Leiomyosarkom</li> <li>– Angiosarkom</li> <li>– Rhabdomyosarkom</li> <li>– Osteosarkom</li> <li>– Synoviales Sarkom</li> <li>– Ewing Sarkom</li> <li>– Angiomyolipom</li> <li>– Epitheloides Angiomyolipom</li> <li>– Leiomyom</li> <li>– Hämangiom</li> <li>– Lymphangiom</li> <li>– Hämangioblastom</li> <li>– Juxtaglomerulärer Tumor</li> <li>– Renomedullärer interstitieller Tumor</li> <li>– Solitär fibröser Tumor</li> </ul>
<b>Metanephrische Tumoren</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Metanephrisches Adenom</li> <li>– Metanephrisches Adenofibrom</li> <li>– Metanephrisches Stromatumor</li> </ul>	<b>Gemischt mesenchymale und epitheliale Tumoren</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Adultes zystisches Nephrom</li> <li>– Gemischter Epithel- und Stromatumor</li> </ul>
<b>Nephroblastische und zystische Tumoren im Kindesalter</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Nephrogene Reste</li> <li>– Nephroblastom</li> <li>– Zystisches partiell differenziertes Nephroblastom</li> <li>– Pediatrisches zystisches Nephrom</li> </ul>	<b>Neuroendokrine Tumoren</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor</li> <li>– Großzelliges neuroendokrines Karzinom</li> <li>– Kleinzelliges Neuroendokrines Karzinom</li> <li>– Paragangliom</li> </ul>
<b>Mesenchymale Tumoren</b>	<b>Gemischte Tumoren</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Hämatopoetische Tumoren der Niere</li> <li>– Keimzelltumoren</li> </ul>
<b>Mesenchymalen Tumoren des Kindes</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Klarzellsarkom</li> <li>– Rhabdoidtumor</li> <li>– Kongenitales mesoblastisches Nephrom</li> <li>– Ossifizierender Nierentumor des Kindesalters</li> </ul>	<b>Metastasen</b>

Die Klinik der Nierenzelltumoren hat sich in den letzten Jahrzehnten massiv gewandelt. Mit der immer größeren Dichte von Untersuchungen mittels bildgebender Verfahren werden die meisten Nierentumoren heute als Zufallsbefunde im Rahmen einer nicht primär für die Nieren geplanten Untersuchung diagnostiziert. (2) Dementsprechend haben sich auch die Tumorstadien zum Zeitpunkt der Diagnose gewandelt. Es werden immer

mehr kleinere Tumoren diagnostiziert. (2) Die früher für das Nierenzellkarzinom als klassisch empfundene Symptomtrias mit Hämaturie, Flankenschmerz und palpablem Tumor gehört der Vergangenheit an. Die primäre Behandlung des Nierenzelltumors besteht praktisch immer aus der operativen Entfernung des Tumors. Bei kleinen Tumoren, welche günstig gelegen sind, kann eine Tumorektomie mit Nierenerhalt durchgeführt werden. Bei größeren oder zentral gelegenen Tumoren kommt es in der Regel zur Tumornephrektomie. (2) Eine Tumornephrektomie wird meist auch dann durchgeführt, wenn der Tumor bereits metastasiert hat, da eine Reduzierung des „Tumorloads“ den Verlauf vieler Nierentumoren günstig zu beeinflussen scheint. (10) Für Patienten mit metastasierenden Nierenzellkarzinomen haben sich in den letzten wenigen Jahren zahlreiche zusätzliche Therapieoptionen ergeben. Vor etwa 5 bis 10 Jahren umfassten die chemotherapeutischen Optionen im Wesentlichen 5-Floururacil und Vinblastin. (2) In den letzten Jahren sind verschiedene zusätzliche, auch spezifische Tumorthérapien dazugekommen. Dazu gehört das Medikament Pazopanib, ein oraler Tyrosinkinaseinhibitor, der die VEGF-Rezeptoren 1, 2 und 3, die PDGF-Rezeptoren Alpha und Beta sowie c-KIT hemmt. (11) Auch das Medikament Sunitinib, ein weiterer Tyrosinkinaseinhibitor, der neben den VEGF-Rezeptor-Isoformen 2 und 3 auch den PDGF-Rezeptor sowie die Rezeptoren für c-kit, FLT, CSF und RET hemmt, ist auf Grund hoher Ansprechraten (47%) und einer verbesserten Lebensqualität der Patienten im Vergleich zu einer Therapie mit Alpha-Interferon besonders gut zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms geeignet. (12) Darüber hinaus haben sich Therapien mit sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren beim Nierenzellkarzinom bewährt und das Nierenzellkarzinom gehörte zu den ersten 4 Entitäten für welche eine derartige Therapie (mit Nivolumab) zugelassen wurde. (13)

Patienten welche erfolgreich operiert wurden und bei denen zum Zeitpunkt der operativen Behandlung keine Fernmetastasen diagnostiziert werden erhalten in der Folge normalerweise keine weitere Therapie. (10) Dies steht im Kontrast zu vielen anderen häufigen Tumoren bei denen adjuvante Therapien heute an der Tagesordnung sind wie beispielsweise beim Mammakarzinom oder dem Kolonkarzinom. (14,15) Die Patienten werden über einen langen Zeitraum klinisch nachverfolgt, denn es ist bekannt, dass Nierenzellkarzinompatienten auch spät (beispielsweise auch nach 10 Jahren) Fernmetastasen entwickeln können. (16) Zu einem großen Teil ist der mangelnde

Enthusiasmus der behandelnden Ärzte bezüglich adjuvanter Chemotherapien bei Nierenzellkarzinom durch relative Erfolglosigkeit der früher verwendeten systemischen Therapeutika geschuldet. (17) Allerdings muss die Frage, ob eine adjuvante Chemotherapie beim Nierenzellkarzinom sinnvoll sein könnte oder nicht, angesichts der neuen und besseren Medikamente aktuell neu bewertet werden. Tatsächlich laufen derzeit verschiedene Studien, welche die Medikamente Axitinib, Everolimus und Pazopanib in klinischen Studien auf einen adjuvanten Nutzen hin überprüfen. (11,18,19) Ein Medikament, Sunitinib, ist in den vereinigten Staaten bereits für eine adjuvante Therapie bei Hochrisikopatienten zugelassen. (20) Da systemische Chemotherapien vor allem dann kurativ sind, wenn nur kleinste Tumormengen im Patienten vorliegen, spricht vieles für die Durchführung adjuvanter Therapien und es ist anzunehmen, dass sich die potenten neuen Medikamente auch im adjuvanten Setting durchsetzen werden. (17)

Mit der Verfügbarkeit adjuvanter Chemotherapien besteht nun plötzlich ein Bedarf nach einer besseren Prognoseeinschätzung von Nierentumoren. Die Prognoseeinschätzung von Nierentumoren war über lange Jahre komplett unwichtig, weil Patienten mit operativ geheilten Tumoren ohnehin und unabhängig von der gefühlten Prognose nachverfolgt wurden. (17) Die gegenwärtig etablierten durch den Pathologen bestimmbaren Prognosefaktoren sind das pT-Stadium, der Nodalstatus (wenn Lymphknoten zur Untersuchung vorliegen), der Zustand des Resektionsrandes (R0 versus R1) und der Differenzierungsgrad. (21) Darüber hinaus kommt dem histologischen Tumortyp eine gewisse prognostische Bedeutung zu. (22)

Zwar gibt es zahlreiche Studien, welche molekulare Parameter auf ihre prognostische Bedeutung hin untersucht haben und auch zahlreiche Parameter, welche zumindest in einzelnen Studien als prognoserelevant beschrieben worden sind, doch gehören molekulare Parameter bisher nicht zur Routineuntersuchung von Nierenzelltumoren. In den letzten Jahren wurden im Bereich der molekularen Untersuchungstechniken allerdings erhebliche Fortschritte erzielt. Insbesondere die Genomsequenzierung hat sich weiterentwickelt. Die Sequenzierung der ersten Gensequenz eines Menschen wurde im Jahr 2003 abgeschlossen und hatte 3 Milliarden USD gekostet. (23) Mittlerweile, nur 16 Jahre später, kann die gleiche Untersuchung für circa 1000 USD durchgeführt werden. (24) Im Rahmen einer weltweit vorangetriebenen Studie haben Genforscher aus allen Kontinenten im Rahmen des international Cancer Genome Consortiums (ICGC) und des

amerikanischen Cancer Genome Atlas (TCGA) Projektes gemeinsam hunderte von Tumoren der wichtigsten Entitäten sequenziert und die Befunde in einer gemeinsamen Datenbank der wissenschaftlichen Welt zur Verfügung gestellt. (25) Damit ist mittlerweile bekannt, welche genomischen Veränderungen bei welcher Tumorart häufig vorkommen.

Die Deletion des kurzen Arms von Chromosom 8 (8p-Deletion) erschien uns besonders interessant zu sein, weil diese Veränderung zu den häufigsten Deletionen beim Nierenzellkarzinom gehört, bei dieser Tumorentität aber zu den wenig untersuchten Aberrationen gehört. (26) Insbesondere die prognostische Bedeutung der 8p-Deletion wurde bisher nicht schlüssig geklärt. Die bisher zum Nierenzellkarzinom publizierten Studien mit Untersuchung der Häufigkeit von 8p-Deletionen sind zusammen mit den verwendeten Methoden, der Untersuchungstechnik und der Häufigkeit von Deletionen in Tabelle 2 dargestellt. Die Abbildung macht deutlich, dass nur 4 von 17 Studien mehr als 100 Fälle untersuchen konnten, davon nur 2 mehr als 200.

Ziel der folgenden Untersuchung war deswegen, an einem möglichst großem Kollektiv von gut charakterisierten Nierenzellkarzinomen die Häufigkeit der 8p-Deletion zu klären und zu evaluieren, ob der Nachweis der 8p-Deletion für diagnostische (Bestimmung des Tumortyps) oder prognostische Zwecke in der Routinediagnostik verwendet werden könnte.

Tabelle 2: Häufigkeit der 8p-Deletion in Nierentumoren (Literatur)

Autor	Jahr	Methode	Fälle (n)	8p-Deletion (%)
Thrash-Bingham (27)	1995	Loss of heterozygosity	33	15,00%
Moch (28)	1996	Comparative genomic hybridization	41	20,00%
Schullerus (29)	1997	Loss of heterozygosity	105	33,00%
Schullerus (30)	1999	Loss of heterozygosity	96	32,00%
Yang (31)	2000	Comparative genomic hybridization	17	77,00%
Reutzel (32)	2001	Comparative genomic hybridization	61	15,00%
Gunawan (33)	2001	Comparative genomic hybridization	118	33,10%
Presti (34)	2002	Loss of heterozygosity	72	32,00%
Gunawan (35)	2003	Comparative genomic hybridization	58	33,00%
Kallio (36)	2004	Comparative genomic hybridization	20	15,00%
Nagy (37)	2004	Loss of heterozygosity	58	28,00%
Yoshimoto (38)	2007	Comparative genomic hybridization	30	31,10%
Klatte (26)	2009	G-Bands by Pancreatin using Giemsa	282	20,00%
Zhang (39)	2010	Single nucleotide Polymorphism	71	25,00%
Moore (40)	2012	Comparative genomic hybridization	763	38,10%
Kang (41)	2015	Comparative genomic hybridization	46	26,10%

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patienten und Methoden

Es wurde ein bestehender Nierentumor Tissue Microarray (TMA) benutzt mit je einem Gewebezylinder von 1809 operativ entfernten Nierentumoren von Patienten, die zwischen 1994 und 2016 am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf diagnostiziert wurden. Alle Tumoren wurden nach den in der WHO-Klassifikation 2015 beschriebenen Kriterien von zwei Pathologen mit besonderem Fokus auf Urogenitalpathologie (Franziska Büscheck, Christoph Fraune) untersucht, wobei für jeden Tumor eine Gradierung nach den Kriterien der International Society for Urologic Pathology (ISUP) durchgeführt wurde. Der TMA besteht aus vier Blöcken. Die TMA-Fertigung wurde bereits früher detailliert beschrieben (42,43). Der Zylinderdurchmesser betrug 0,6 mm. Das Vorliegen von Tumorzellen im Gewebe wurde für jeden Patienten an einem Hämatoxylin- und Eosin (HE) gefärbte TMA Objektträger validiert. 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 ist durch die lokalen Gesetze (HmbKHG, §12,1) autorisiert und zusätzlich von der lokalen Ethikkommission (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09 und PV3652) genehmigt worden. Alle Arbeiten wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Als klinische Endpunkte wurden Tod (Gesamtüberleben, unabhängig von der Todesursache), Tod am Tumor (Tumorspezifisches Überleben) und der Nachweis einer Progression (Progressionsfreies Überleben) verwendet. Eine Tumorprogression wurde dann angenommen, wenn ein Tumor in einer postoperativen Kontrolle ein Lokalrezidiv, neu aufgetretene Metastasen oder ein Wachstum bereits bekannter Metastasen aufwies.

Tabelle 3: Klinische und pathologische Parameter der untersuchten Karzinome (Aufgrund fehlender Daten ergibt die Patientenzahl in den Unterkategorien nicht immer 1809.)

	Patientenzahl
	Kohorte (n=1809)
<b>Follow up (Monate)</b>	
Auswertbar (n)	1474
Mean (Monate)	48
Median (Monate)	61,8
<b>Alter (Jahre)</b>	
< 50	263
50 - 70	951
70 +	595
<b>Histologie</b>	
Klarzellige Karzinome	1167
Chromophobe Karzinome	101
Papilläre Karzinome	270
Onkozytome	149
<b>UICC</b>	
I	733
II	131
III	175
IV	158
<b>ISUP</b>	
1	398
2	537
3	469
4	100
<b>Fuhrmann</b>	
1	72
2	851
3	480
4	110
<b>Thönes</b>	
1	497
2	839
3	177
<b>Tumor Stage</b>	
pT1	998
pT2	223
pT3-4	408
<b>LK-Metastasen</b>	
pN0	232
pN+	49
<b>Fernmetastasen</b>	
pM0	220
pM1	148

## 2.2. Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung

Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden 4,0 µm dicke TMA-Schnitte verwendet. Für die proteolytische Objektträger-Vorbehandlung wurde ein kommerzieller Kit verwendet (Paraffin-Vorbehandlungsreagenziensatz; Abbott, Chicago, USA). TMA-Schnitte wurden in 70%, 85% und 100% Ethanol entparaffiniert, luftgetrocknet und dehydriert, gefolgt von einer Denaturierung für 5 min bei 74°C in 70% Formamid 2x SSC-Lösung. Das FISH-Sondenset bestand aus einer Spektrum Orange markierten NKX3.1 (8p21-)Sonde (aus einer Kombination von BAC RP11-625E02 und BAC RP11-116M8) und einer handelsüblichen Spektrum Grün markierten Zentromer-8-Sonde (#6J37-08; Abbott, Chicago, USA) 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 vorherrschenden FISH-Signalzahlen in jedem Gewebepunkt aufgezeichnet. Eine homozygote Deletion von 8p wurde definiert als völlige Abwesenheit von NKX3.1 FISH-Sondensignalen in  $\geq 60\%$  der Tumorkerne, bei gleichzeitigem Vorhandensein von ein oder zwei NKX3.1 FISH-Signalen in benachbarten normalen Zellen (als Evidenz für eine erfolgreiche Hybridisierung). Gewebespots mit einem Mangel an NKX3.1-Signalen in allen (Tumor- und Normalzellen) oder einem Mangel an normalen Zellen als interne Kontrolle für eine erfolgreiche Hybridisierung der NKX3.1-Sonde wurden von der Analyse ausgeschlossen. Eine heterozygote Deletion von NKX3.1 wurde definiert als das Vorhandensein von weniger NKX3.1-Signalen als Zentromer-8-Sondensignale in  $\geq 60\%$  Tumorkernen (Abbildung 2). Diese Schwellenwerte stammen aus einer früheren Studie, in der die mittels FISH und Array CGH festgestellten PTEN-Deletionen von einer Untergruppe von Krebsarten, die in diesem TMA-Set enthalten sind, verglichen wurden.

(44)

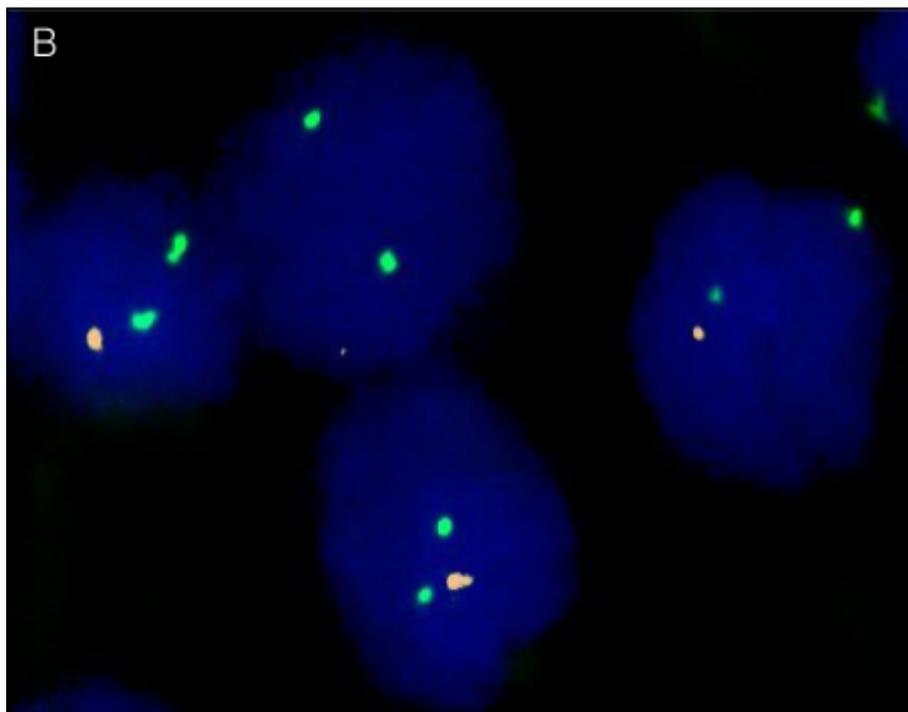
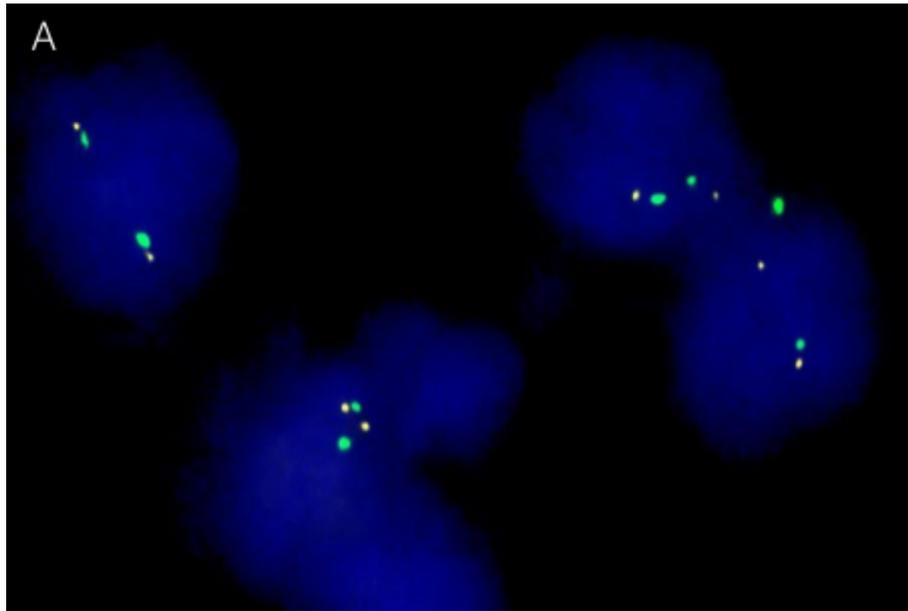


Abbildung : Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung unter Verwendung einer NKX3.1 (8p21-)Sonde (orange) und einer Zentromer-8-Sonde (grün)

- a) Normaler Genstatus: Je 2 grüne und 2 orange Signale.
- b) Heterozygote Deletion Je 2 grüne, aber nur ein oranges Signal.

## 2.3. Statistik

Die Untersuchungen erfolgten mittels der Software JMP 9.0 (SAS Institute Inc., NC, USA). Kontingenztabelle und Chi-Quadrat-Tests wurden verwendet, um den Zusammenhang zwischen 8p Befunden und dem histologischen Tumortyp, dem Differenzierungsgrad, dem cM Status und dem pT Status zu untersuchen. Die Beziehung zwischen den 8p Befunden und dem Patientenalter oder dem Tumordurchmesser wurde durch einen „Analysis of Variance“ (ANOVA) Test berechnet. Kaplan Meier Kurven wurden verwendet, um Unterschiede in der Überlebenszeit oder der Rezidiv-freien Zeit darzustellen. Der Log-Rank Test wurde dann angewandt, um signifikante Unterschiede im Krankheitsverlauf zwischen diesen Gruppen zu ermitteln.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Technische Aspekte

Von 1809 untersuchten Tumoren waren 1474 (81,48 %) bezüglich des 8p-Deletionsstatus auswertbar. Die Gründe für nicht auswertbare Gewebe waren entweder eine ungenügende Hybridisierungsqualität mit schwachen, nicht zählbaren Signalen, das Fehlen von eindeutigen Tumorzellen im Gewebespots oder das vollständige Fehlen von Gewebe an der entsprechenden Stelle des Tissue-Microarrays. Fehlendes Gewebe kann entweder durch Abschwimmen von einzelnen Gewebestücken im Färbeprozess oder aber durch die unterschiedliche Länge der in einen Tissue-Microarray eingebrachten Zylinder bedingt sein. Naturgemäß sind nicht alle in einen Tissue-Microarray eingebrachten Tumorzylinder gleich lang, auch werden sie manchmal während des Fertigungsprozesses zu tief in das vorbestehende „Loch“ im Empfängerblock eingebracht. Aus diesen Gründen (zu tiefe Einbringung des Gewebezyllinders, kurzer Gewebezyylinder) können insbesondere bei den ersten und letzten Schnitten, welche von einem TMA-Block angefertigt werden, einzelne Gewebespots fehlen.

### 3.2. 8p-Deletionen und Tumortyp

Insgesamt zeigten 145 (9,84 %) von 1474 auswertbaren Tumoren eine 8p21-Deletion.

Die Beziehung zwischen dem histologischen Tumortyp und der 8p-Deletionshäufigkeit ist für die 5 Tumorarten mit mindestens 25 auswertbaren Proben in Tabelle 4 dargestellt. Die Tabelle zeigt eine besondere Häufigkeit der 8p-Deletionen in klarzelligem Karzinomen, von denen 13,2 % von 976 auswertbaren Tumoren eine Deletion aufwies. Im Gegensatz dazu kommt die 8p-Deletion in papillären Karzinomen sehr selten vor. Nur einer (0,46 %) von 216 auswertbaren Tumoren wies eine 8p-Deletion auf.

Die 8p-Deletionsbefunde sind für die selteneren Tumoren in Tabelle 5 dargestellt. Da hier nur zwischen 1 und 18 Tumoren erfolgreich untersucht werden konnten sind die prozentualen Angaben hier ohne große Relevanz. Die Befunde zeigen allerdings, dass die 8p-Deletion bei Sammelrohrkarzinomen, multilokulär-zystischen Nierenzellkarzinomen niedriger Malignität, medullären Karzinomen, NOS-Karzinomen und Translokationstumoren zumindest vorkommen kann.

Tabelle 4: Histologischer Tumortyp und 8p-Deletion

Entität	Auswertbar (n)	8p21-Deletion (%)
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	976	13,22
Papilläres Nierenzellkarzinom	216	0,46
Chromophobes Nierenzellkarzinom	77	7,79
Klarzelliges tubulopapilläres Nierenzellkarzinom	26	0,00
Onkozytom	119	0,84

Tabelle 5: Seltene Tumorentitäten und 8p-Deletion

Entität	Auswertbar (n)	8p21-Deletion (%)
Erworbenes zystisches Nierenzellkarzinom	1	0,00
Ductus Bellini (Sammelrohr) Karzinom	4	25,00
Zystisches Nephrom/ gemischt epithelialer Stroma Tumor	1	0,00
Multilokulär-zystisches Nierenzellkarzinom niedriger Malignität	3	33,33
Medulläres Nierenzellkarzinom	1	100,00
Metanephrischer Tumor	2	0,00
Muzinös-tubulär und spindelzelliges Nierenzellkarzinom	1	0,00
Nephroblastom	15	0,00
Neuroendokrines Nierenzellkarzinom	1	0,00
NOS	18	16,67
Reninom	1	0,00
Tubulozystisches Nierenzellkarzinom	2	0,00
Xp11.2 Translokationkarzinom	10	20,00

### 3.3. 8p-Deletionen und Tumorphänotyp

Die Beziehung zum Tumorphänotyp ist für die größte homogene Tumorkategorie, die klarzelligen Karzinome, in Tabelle 6 dargestellt. Die Tabelle macht deutlich, dass die 8p21-Deletion signifikant mit einem ungünstigen Tumorphänotyp assoziiert war. Dies gilt für die Gradierung nach ISUP ( $p=0,0014$ ), die Gradierung nach Fuhrmann ( $p=0,0003$ ), die Gradierung nach Thönes ( $p=0,0033$ ), das pT-Stadium ( $p=0,0006$ ) und auch den klinischen M-Status ( $p=0,0183$ ).

Das Vorliegen einer 8p21-Deletion war auch mit der Tumormgröße assoziiert (Tabelle 7). Dies gilt bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren ( $p < 0,0001$ ) aber auch bei separater Beurteilung der Gruppen klarzelliges Karzinom ( $p=0,0019$ ) oder chromophobes Karzinom ( $p=0,0404$ ). Selbst das einzige 8p-deletierte papilläre Nierenzellkarzinom (von insgesamt 211 erfolgreich untersuchten) zeigte eine exorbitante Tumormgröße von 11,5 cm.

8p21-Deletionen waren auch mit einem hohen Patientenalter assoziiert (Tabelle 8). Das mittlere Alter von 1330 Patienten mit nicht deletierten Tumoren war 62,17 Jahre. Dies war mehr als 3 Jahre jünger als das mittlere Alter von 145 Patienten mit 8p-deletierten Tumoren (65,49 Jahre,  $p=0,0056$ ). Die statistische Signifikanz blieb auch bei separater Betrachtung der klarzelligen Karzinome erhalten ( $p=0,0346$ ).

Tabelle 6: Tumorphänotyp und 8p Deletion in klarzelligen Karzinomen

Parameter	Auswertbar (n)	8p21-Deletion (%)	P-Wert
<b>ISUP</b>			
1	260	10,77	0,0014
2	323	10,84	
3	316	14,24	
4	68	29,41	
<b>Fuhrmann</b>			
1	50	12,00	0,0003
2	528	9,66	
3	320	15,94	
4	77	27,27	
<b>Thoenes</b>			
1	330	10,30	0,0033
2	518	12,74	
3	127	22,83	
<b>Tumor Stage</b>			
pT1	582	9,79	0,0006
pT2	112	14,29	
pT3	262	20,23	
pT4	13	23,08	
<b>LK-Metastasen</b>			
pN0	140	17,86	0,2091
pN1 + pN2	30	26,67	
<b>Fernmetastasen</b>			
pM0	127	12,60	0,0183
pM1	106	24,53	

Tabelle 7: Tumorgroße und 8p Deletion

Tumorgroße					
	8p21	Auswertbar(n)	Mittelwert	SD	P-Wert
Alle Karzinome	Normal	1305	5,06	0,08	<0,0001
	Deletion	143	6,32	0,26	
Klarzellige Nierenzellkarzinome	Normal	835	5,22	0,10	0,0019
	Deletion	127	6,11	0,27	
Papilläre Nierenzellkarzinome	Normal	210	5,14	0,25	0,0815
	Deletion	1	11,50	3,63	
Chromphobe Nierenzellkarzinome	Normal	70	4,90	0,35	0,0404
	Deletion	6	7,50	1,20	

Tabelle 8: Patientenalter und 8p Deletion

Alter					
	8p21	Auswertbar(n)	Mittelwert	SD	P-Wert
Alle Karzinome	Normal	1330	62,17	0,37	0,0056
	Deletion	145	65,49	1,14	
Klarzellige Nierenzellkarzinome	Normal	847	63,52	0,38	0,0346
	Deletion	129	65,74	0,98	
Papilläre Nierenzellkarzinome	Normal	215	60,97	0,95	0,1761
	Deletion	1	80,00	13,99	
Chromphobe Nierenzellkarzinome	Normal	71	58,79	1,47	0,1220
	Deletion	6	67,00	5,04	

### 3.4. 8p-Deletionen und Prognose

Die prognostische Bedeutung der klassischen etablierten Prognoseparameter pT, pN, cM, ISUP-, Thönes und Fuhrman-Grad ist für den Endpunkt Gesamtüberleben für alle Tumoren und klarzellige Nierenzellkarzinome in den Abbildungen 3 bis 8 dargestellt.

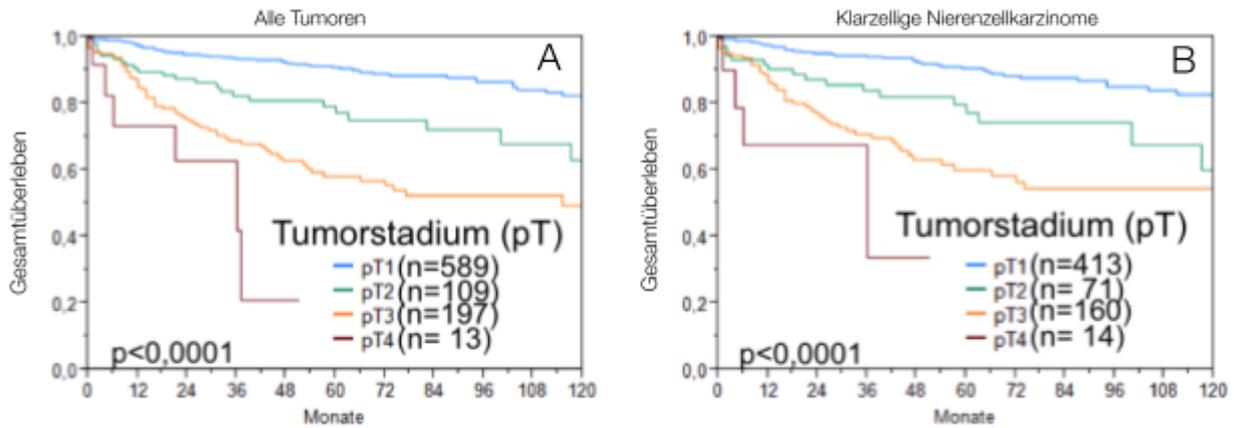


Abbildung : Tumorstadium und Gesamtüberleben

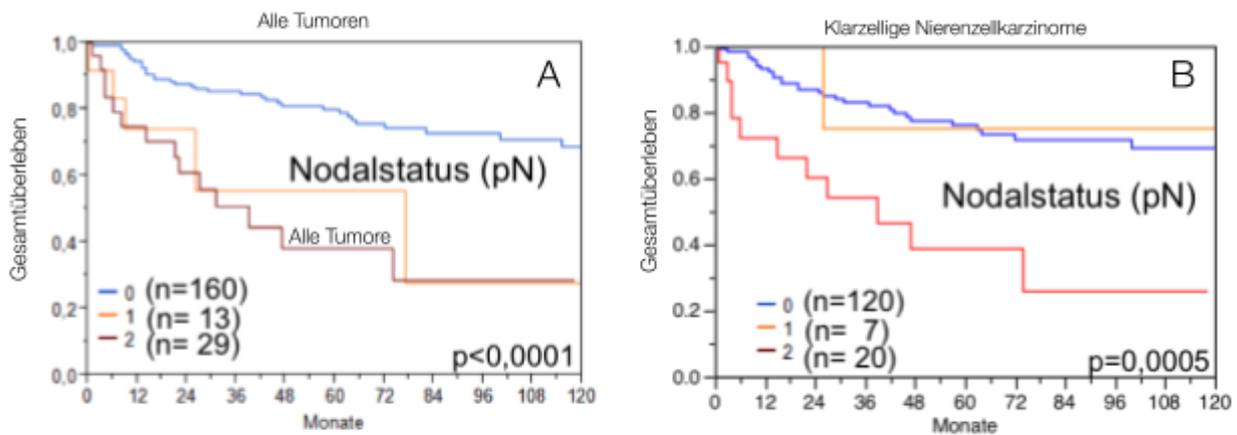


Abbildung : Nodalstatus und Gesamtüberleben

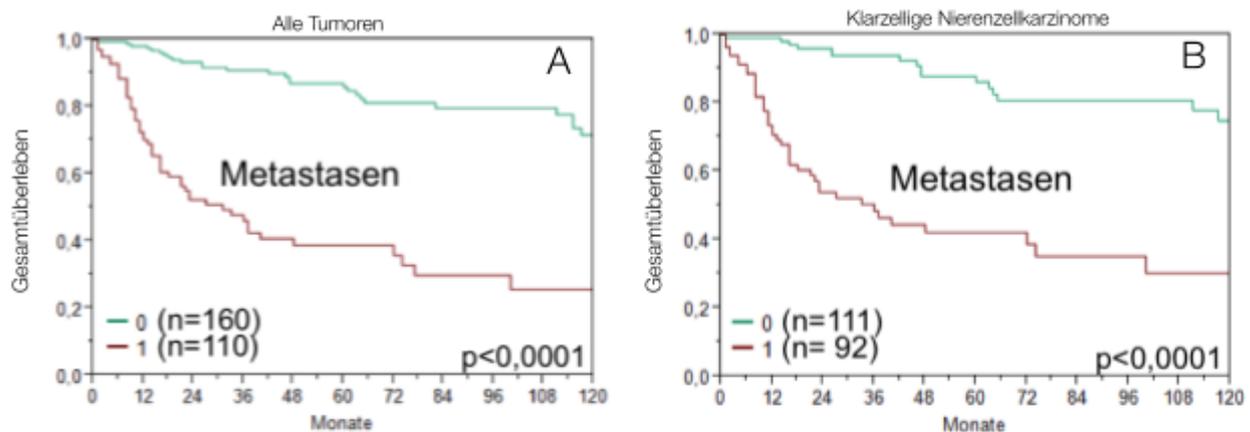


Abbildung : M-Status und Gesamtüberleben

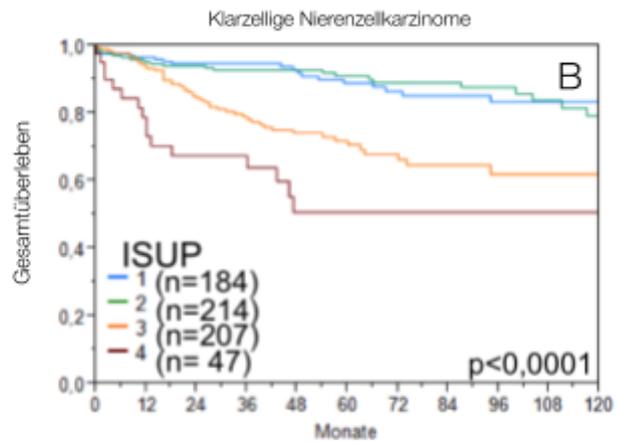
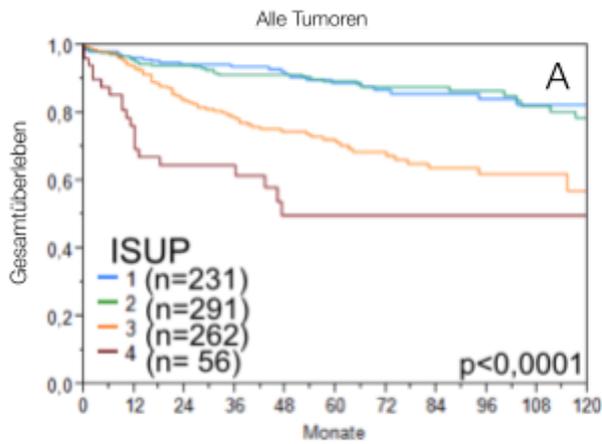


Abbildung : ISUP-Grad und Gesamtüberleben

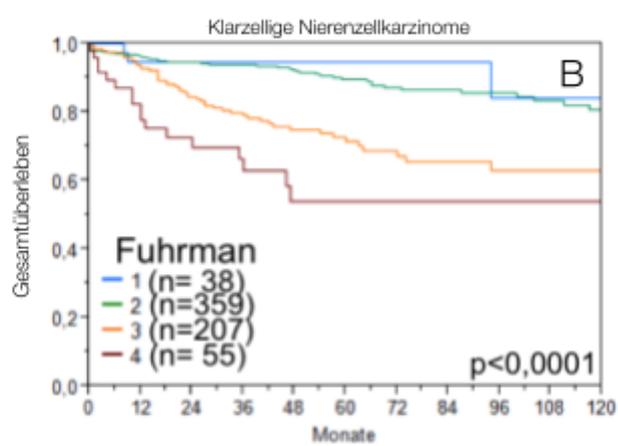
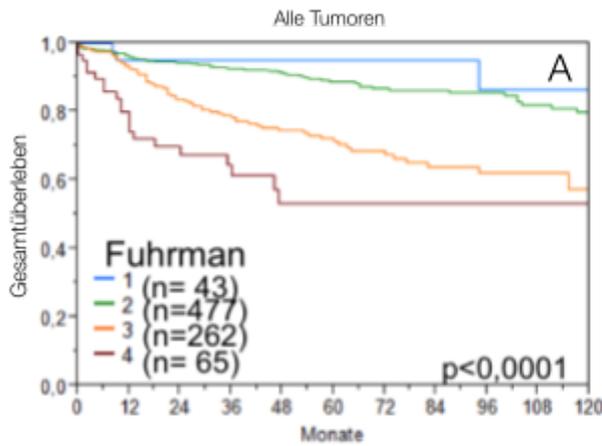


Abbildung : Fuhrmann-Grad und Gesamtüberleben

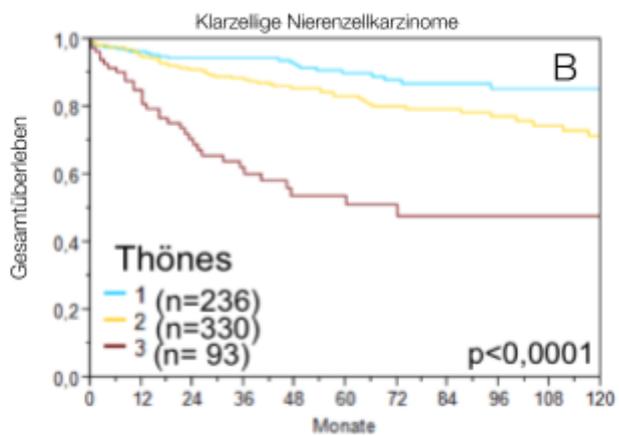
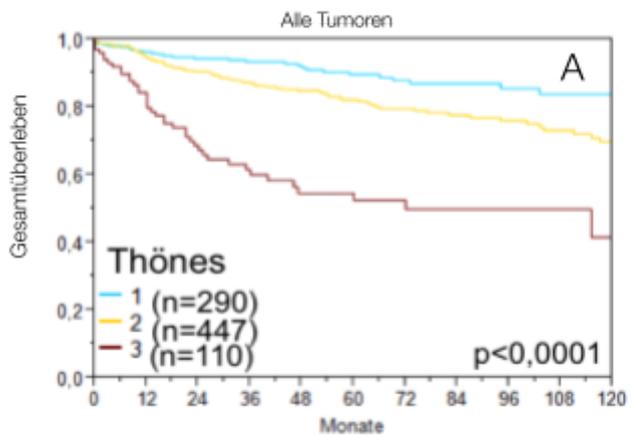


Abbildung : Thönes-Grad und Gesamtüberleben

Die Beziehung von 8p-Deletionen und den 3 gewählten klinischen Endpunkten ist für alle Tumoren, die klarzelliger Karzinome und papilläre Karzinome in den Abbildungen 9 bis 11

dargestellt. Die Daten zeigen, dass die 8p21-Deletion bei Betrachtung des Gesamtüberlebens für alle Tumoren (Abbildung 9a,  $p=0,0158$ ) und für die klarzelligen Karzinome (Abbildung 9b,  $p=0,0394$ ) prognoserelevant ist. Bei Betrachtung des Endpunktes tumorspezifischer Tod wird für alle Tumoren ein signifikanter p-Wert erreicht (Abbildung 11a,  $p=0,0158$ ), ein solcher für die Gruppe der klarzelligen Karzinome aber knapp verfehlt (Abbildung 11b,  $p=0,0645$ ). Die Untersuchung des Endpunktes rezidivfreies Überleben ergibt deutlich klarere Befunde. Hier sind die statistischen Unterschiede zwischen 8p21-deletierten und nicht deletierten Tumoren sowohl in der Gruppe aller Tumoren wie auch in der Gruppe der klarzelligen Tumoren hochsignifikant (Abbildung 10a und 10b,  $p$  jeweils  $< 0,001$ ).

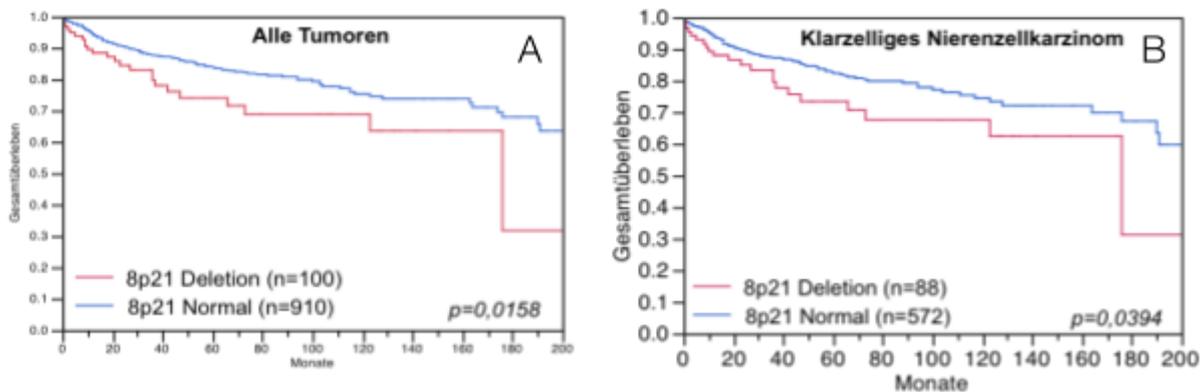


Abbildung 9: 8p-Deletion und Gesamtüberleben

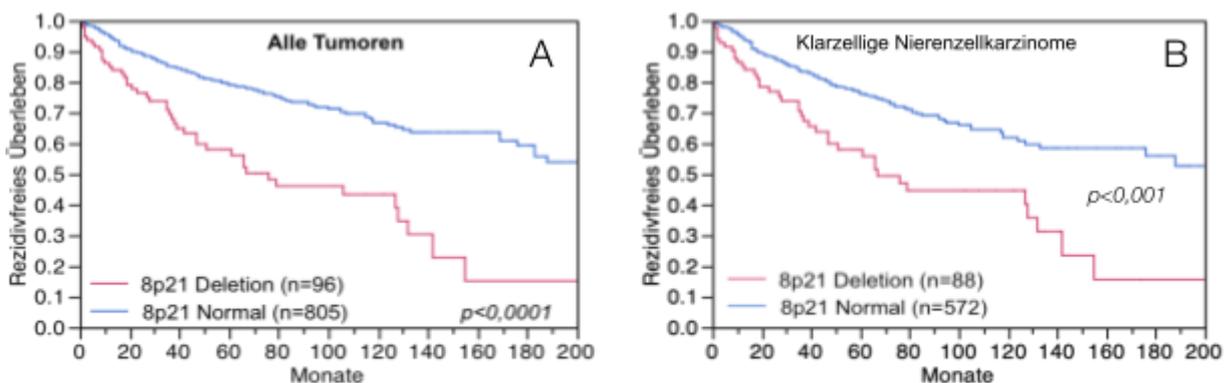


Abbildung 10: 8p-Deletion und Rezidivfreies Überleben

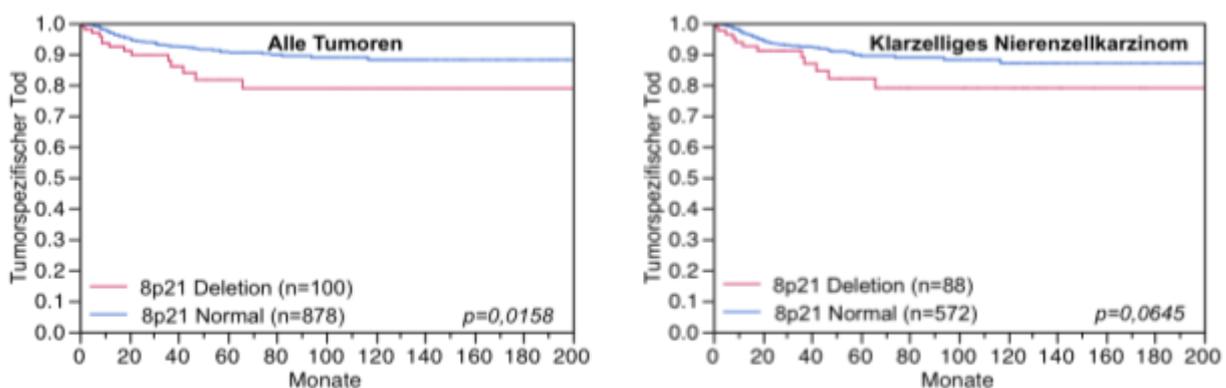


Abbildung 11: 8p-Deletion und Tumorspezifisches Überleben

### 3.5. Multivariate Analyse

In der Multivariaten Analyse unter Einschluss der Parameter pT, pN, M und ISUP-Grad erwies sich der Nachweis einer 8p-Deletion innerhalb der Gruppe der klarzelligen Karzinome nicht als unabhängiger Prognosefaktor (Tabelle 9).

Tabelle 9: Multivariate Analyse der klarzelligen Karzinome

		Gesamtüberleben	P	Tumorspezifischer Tod	P	Rezidivfreies Überleben	P
pT	3-4 vs. 2	2,7 (1,0-8,1)	0,0206	3,9 (1,0-26)	0,0159	2,2 (0,9-5,9)	0,0068
	2 vs. 1	1,3 (0,4-3,8)		1,8 (0,2-15)		1,7 (0,6-4,7)	
pN	N2 vs. N1	1,5 (0,5-5,3)	0,7345	1,3 (0,4-6,1)	0,9009	1,0 (0,5-2,4)	0,0996
	N1 vs. N0	0,9 (0,3-2,3)		0,9 (0,2-2,8)		1,8 (0,8-3,8)	
pM	M1 vs. M0	1,8 (0,9-3,8)	0,129	2,3 (0,9-6,3)	0,0839	2,6 (1,4-5,2)	0,0032
ISUP	4 vs. 3	1,0 (0,4-2,4)	0,0254	1,3 (0,5-3,5)	0,1049	1,4 (0,6-2,9)	0,2156
	3 vs. 2	1,8 (0,9-3,8)		1,5 (0,6-4,3)		1,3 (0,7-2,4)	
	2 vs. 1	2,3 (0,7-10)		3,7 (0,6-71)		0,4 (0,6-3,8)	
8p-Deletion	Del. Vs. Norm.	0,8 (0,4-1,5)	0,4827	0,8 (0,3-1,9)	0,6183	1,0 (0,6-1,8)	0,8691

## 4. Diskussion

Kernpunkt dieser Untersuchung war die Verwendung von zwei „state of the art“-Verfahren der Pathologie, welche optimal zueinander passen. Die Tissue-Microarray-Technik wurde 1998 von Kononen et al erstmals publiziert. (43) Die Methode erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 1000 verschiedenen Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger. Das Verfahren ist recht simpel. In einem leeren Paraffinblock werden mit einem Bohrer oder einer Hohlzahn Nadel Löcher angefertigt mit einem Durchmesser von 0,6 mm. Mit einer Nadel, deren innerer Durchmesser ebenfalls 0,6 mm misst, wird dann aus einem Tumorhaltigen Gewebeblock an einer definierten, repräsentativen Stelle ein 0,6 mm messender Stanzzylinder entnommen und in das vorgefertigte Loch an einer definierten Stelle eingefügt. Am UKE werden pro Tissue-Microarray-Block circa 600 verschiedene Gewebeproben von 600 verschiedenen Patienten in 600 durch ein Koordinatensystem definierte Löcher eingebracht. Somit entsteht ein System von nebeneinander „in Reih und Glied“ stehenden Gewebezylindern, die dann mit einem normalen Mikrotom gleichzeitig angeschnitten werden. Von jedem Gewebezylinder kommt dann jeweils eine 0,6 mm durchmessende und 4,0 µm dicke Scheibe auf einen Objektträger. Das Prinzip der Tissue-Microarray-Herstellung ist in der Abbildung 12 dargestellt. Die Abbildungen 13 bis 15 zeigen relevante Schritte bei der Tissue-Microarray-Herstellung im Labor des Instituts für Pathologie am UKE.

Sämtliche Methoden, welche in situ durchgeführt werden können, also beispielsweise Immunhistochemie oder Fluoreszenz in situ Hybridisierung können am Tissue-Microarray-Schnitt uneingeschränkt durchgeführt werden. Die einzige Limitierung eines Tissue-Microarrays ist, dass pro Patienten nur ein 0,6 mm messendes Gewebestück untersucht wird. Es wurde in den ersten Jahren nach Publikwerden des Verfahrens darüber diskutiert ob die Reduktion der Untersuchung auf einen so kleinen Teil des Tumors ein Repräsentativitätsproblem mit sich bringen würde. (45) Diese Befürchtung hat sich aber nicht erfüllt. (46) Sämtliche klinisch etablierten, allgemein anerkannten Prognoseparameter konnten an Tissue-Microarrays bestehend aus nur einem 0,6 mm messenden Gewebespot pro Patienten validiert werden. (45) Dies gilt beispielsweise für die prognostische Bedeutung der Östrogenrezeptor-Expression, Progesteronrezeptor-Expression, Her2-Amplifikation, Ki67-Labeling-Index oder

P53-Status beim Mammakarzinom (43,47–49), der histologische Grad beim Urothelkarzinom (50) oder etwa der Ki67-Labeling-Index oder chromosomale Deletionen beim Prostatakarzinom. (51,52).

Offensichtliche Vorteile der Tissue-Microarrays sind ökonomischer Natur. Für die Untersuchung von 600 Gewebeproben auf einem Schnitt ist der Verbrauch an Reagenzien und an Man-Power gleich groß wie mit früher üblichen Methoden für einen einzigen Tumor. (45) Gerade für die FISH-Technik sind diese Vorteile relevant, denn FISH-Untersuchungen werden an den meisten Orten nicht durch Färbeautomaten, sondern händisch durchgeführt. Zudem sind FISH-Reagenzien deutlich teurer als die für immunhistochemische Verfahren benötigten Materialien.

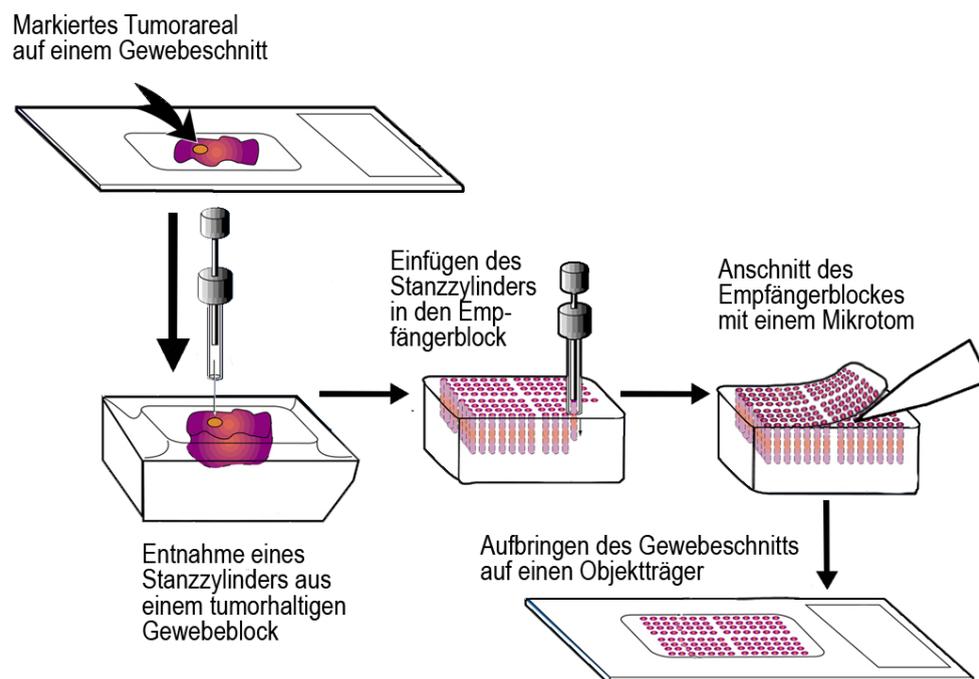


Abbildung 12: Prinzip der TMA-Herstellung (Modifiziert nach: (53))

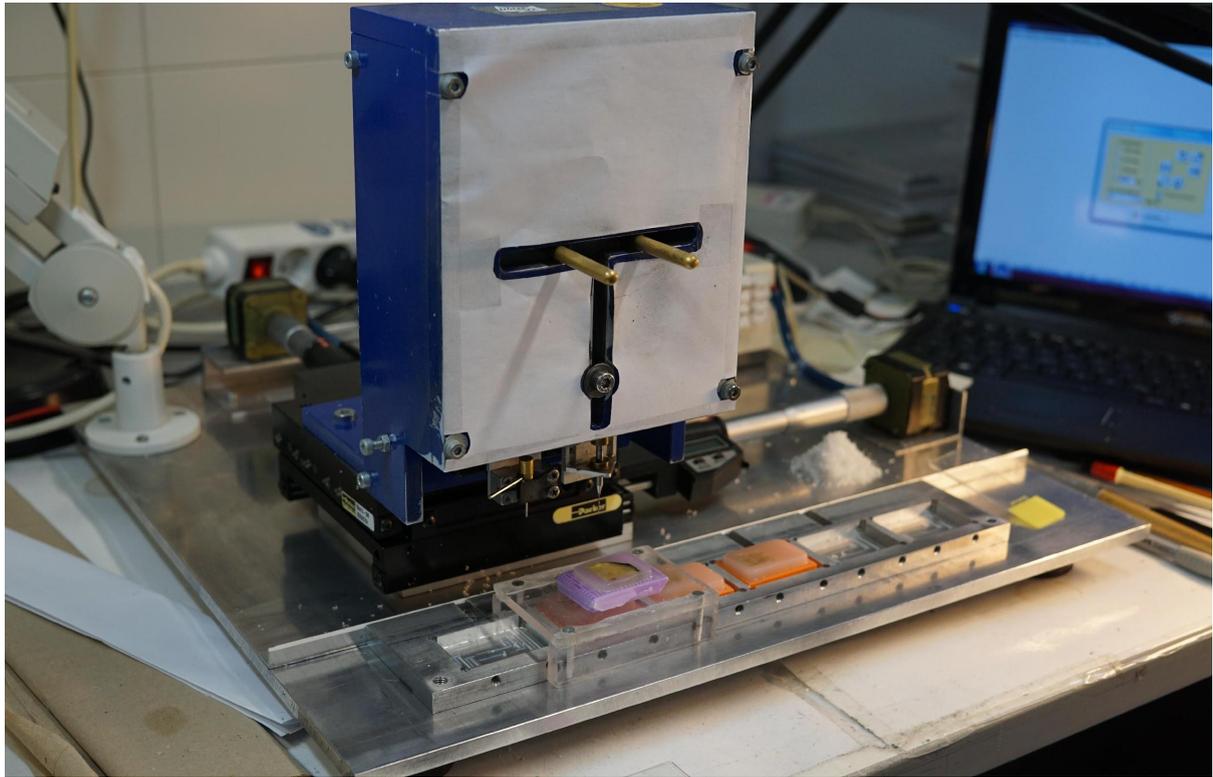


Abbildung 13: Arbeitsplatz TMA-Labor

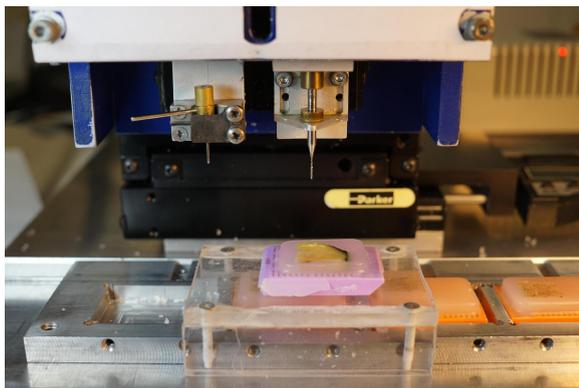


Abbildung 14: Nahaufnahme Gewebestanzentnahme aus einem markierten Tumoreal

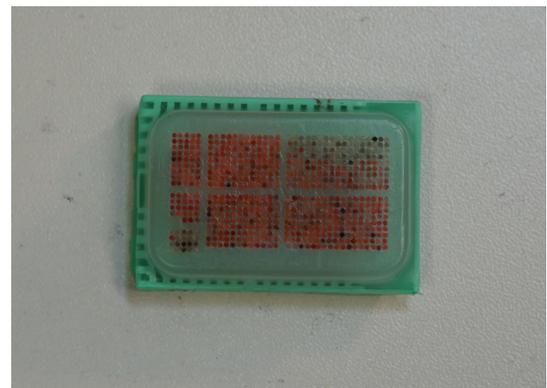


Abbildung 15: Fertiger TMA-Block

Die zweite in dieser Studie verwendete Methode ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die FISH-Technik ist die Goldstandard-Methode für die Untersuchung von Gen- und Chromosomenkopiezahlaberrationen an Geweben. FISH ist optimal dafür Chromosomengewinne, Chromosomenverluste, partielle Chromosomenverluste wie Deletionen, aber auch Genamplifikationen nachzuweisen. (54–57) Der Vorteil der Methode liegt darin, dass die interessierenden Segmente des Genoms auf Einzelzellniveau visualisiert werden und somit Zelle für Zelle quantifiziert werden können. Das Verfahren wird nicht beeinträchtigt durch das gleichzeitige Vorliegen von

Stromazellen, Endothelien oder Entzündungszellen, welche in jedem Tumor unweigerlich anzutreffen sind. Alle anderen Verfahren, welche zum Nachweis von quantitativen Genomveränderungen angewendet werden, basieren auf der Extraktion von DNA aus einem interessierenden Tumorgewebsfragment. (54–57) Diese Tumorgewebe sind nie „rein“, sondern enthalten immer auch eine Verunreinigung durch nicht-neoplastische Zellen. Ist der Anteil nicht-neoplastischer Zellen hoch, können subtile quantitative Genomveränderungen verpasst werden. (54–57) Darüber hinaus erfolgt die Quantifizierung der einzelnen Genomabschnitte nicht durch eine absolute Messung, sondern immer im Vergleich zu anderen Genomabschnitten, was dazu führt, dass in vielen Fällen zwar eine Imbalance zwischen verglichenen Arealen festgestellt wird, aber bei fehlenden Absolutwerten nicht eindeutig geklärt werden kann, ob diese Imbalance durch einen Verlust eines der beiden verglichenen Areale oder aber durch einen Gewinn des anderen verglichenen Segmentes entsteht. (58) Verfahren welche quantitative Genomveränderungen an extrahierter DNA untersuchen, können die Häufigkeit von Deletionen im Falle einer großen Verunreinigung durch normal Zellen somit unterschätzen, im Falle von polysomen Genomen mit einer ungleichen Vermehrung von mütterlichen und väterlichen Genomsegmenten aber auch überschätzen. (58)

Die Kombination von FISH und Tissue-Microarrays erlaubte die erfolgreiche FISH Untersuchung von insgesamt 1474 Tumoren. Sämtlich Studien die früher 8p-Deletionen beim Nierenzellkarzinom untersucht hatten, sind in Tabelle 2 (Seite 10) zusammen mit der Fallzahl, der verwendeten Methoden und dem prozentualen Anteil deletierter Fälle dargestellt. Dabei fällt auf, dass das Ergebnis unserer Studie mit circa 10 % deletierten Fällen bei 1474 auswertbaren Tumoren im unteren Bereich der Häufigkeiten liegen wie sie in der Literatur dargestellt sind. Da keine einzige der früheren Studien die FISH-Technik verwendet hat, nehmen wir an, dass die Variabilität der Befunde dieser Studien sowohl untereinander, als auch die Abweichung gegenüber unserem Wert durch die oben geschilderte inhärente methodische Probleme entstanden sind, welche den DNA-Extraktionsverfahren zur Genkopienzahlmessung innewohnen. Wir gehen davon aus, dass die von uns festgestellte Prävalenz der 8p-Deletion von circa 10 % der Realität sehr nahe kommt. Ein Argument hierfür ist, die am Institut für Pathologie sehr gut validierte FISH-Methode. Mit dem gleichen FISH-Verfahren und den gleichen Proben war

am Institut für Pathologie an insgesamt 7017 Prostatakarzinomen eine 8p-Deletion in 36,5 % gefunden worden. (52) Dieser Wert ist etwa dreimal höher als unsere 8p-Deletionsrate bei Nierenzellkarzinomen.

Die größte und relevanteste Datenbank zu genomischen Veränderungen bei Tumoren ist heute die Datenbank von Genome Cancer Atlas (TCGA) und des International Cancer Genome Consortiums (ICGC). Die Datenbank vereinigt die Ergebnisse einer weltweit konzertierten Sequenzierung der wichtigsten Tumorentitäten. In dieser Datenbank, welche Befunde enthält, die mittels Next Generation Sequencing (NGS) erhoben wurden sind 8p-Deletionen in Prostatakarzinomen (circa 60 %) ebenfalls etwa dreimal häufiger als bei Nierenzellkarzinomen (knapp 20 %). (59,60) Zwar sind die Absolutwerte auch in dieser Untersuchung (ebenfalls an extrahierter DNA durchgeführt worden) höher als in unseren Studien, dies trifft aber sowohl für das Prostata-, als auch für das Nierenzellkarzinom zu. Die Besonderheit der TCGA-, ICGC-Datenbank ist die standardisierte Untersuchung mehrerer Tumorentitäten mit dem gleichen Protokoll, die ebenso wie bei uns zu dreimal mehr Deletionen beim Prostatakarzinom als beim Nierenzellkarzinom führt. Die Schwellenwerte zur Definition einer Deletion, wie sie am UKE Pathologieinstitut verwendet werden, wurden im Übrigen an einer Vergleichsstudie zu PTEN-Deletionen mit anderen Verfahren vergleichend validiert (44). Die Häufigkeit von 8p-Deletionen bei verschiedenen Tumorarten ist für die Daten aus dem TCGA/ICGC-Projekt in Abbildung 16 dargestellt. Insgesamt zeigen diese Befunde, dass die 8p-Deletion beim Nierenzellkarzinom – zumindest im Vergleich zu anderen Tumorarten – verhältnismäßig selten vorkommt.

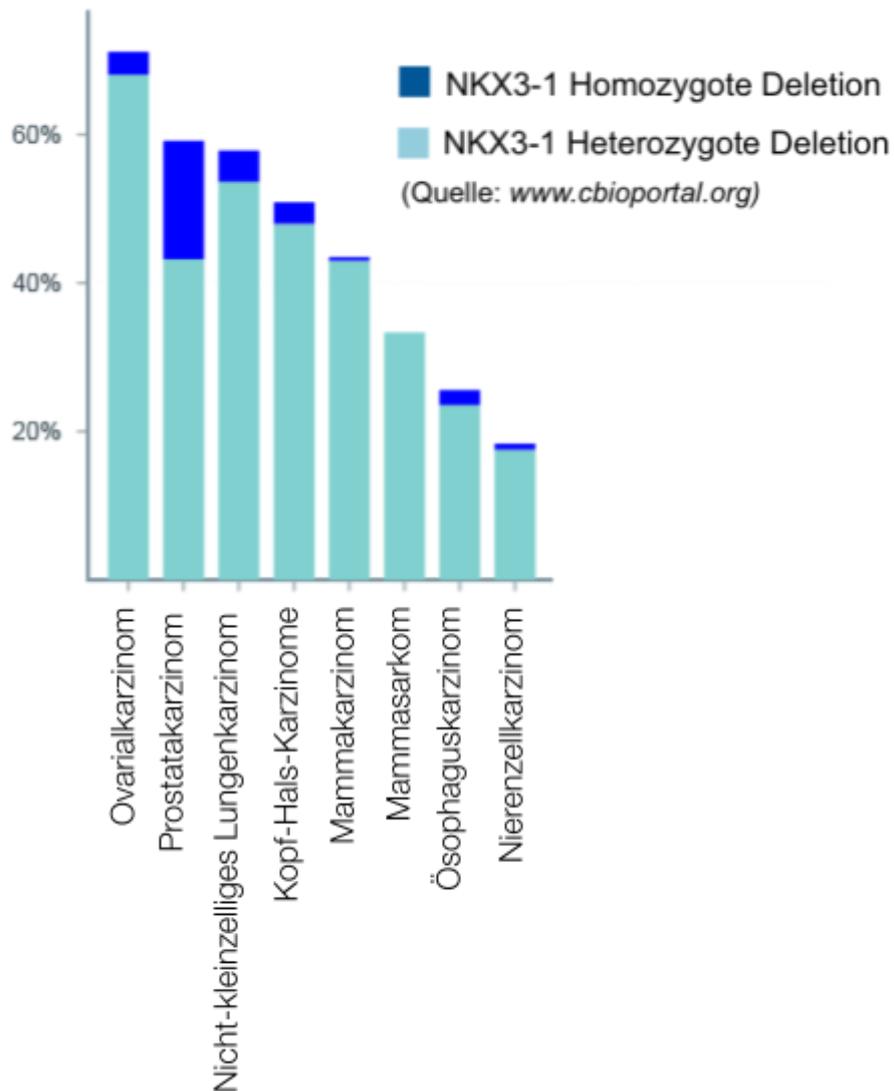


Abbildung 16: Häufigkeit der 8p-Deletion bei verschiedenen Tumorarten (59,60)

Insgesamt gehört die 8p-Deletion zu den häufigsten genomischen Veränderungen in Tumoren überhaupt. Beim Prostatakarzinom ist die 8p-Deletion nach der TMPRSS2-ERG-Fusion die zweithäufigste genomische Veränderung. (52) Die Frage nach dem Mechanismus, der der 8p-Deletion eine tumorstimulierende Wirkung zukommen lässt, ist bisher nicht beantwortet. Die ursprüngliche Annahme, dass es ein relevantes 8p-Tumorsupressorgen geben muss, welches durch die Deletion eines Allels bei gleichzeitiger Mutation des anderen Allels inaktiviert wird, musste verlassen werden, da es auf 8p keine rekurrenten Deletionen gibt. (52) Die aktuell favorisierte Hypothese ist, dass 8p-Deletionen zu einer reduzierten Expression von multiplen Genen auf 8p führen, welche dann im Zusammenspiel eine tumorfördernde Wirkung aufweisen.(52) Dieser

Mechanismus beinhaltet auch die Möglichkeit, dass es Tumorsuppressorgene gibt, die über eine verminderte Expression eine tumorfördernde Wirkung ausüben, deren komplette Inaktivierung aber nicht mit dem Überleben einer Zelle vereinbar wäre (sogenannte essenzielle Gene). (61)

Eine Liste von Genen, welche relevante „Kandidaten Tumorsuppressorgene“ auf 8p darstellen, ist in Tabelle 10 dargestellt. Für einige dieser Gene wurde zumindest in einzelnen Tumorsystemen gezeigt, dass ihre Inaktivierung zu einer gesteigerten Tumorzellproliferation führt oder zu anderen Eigenschaften, welche mit einer vermehrten Tumoraggressivität assoziiert werden, wie beispielsweise einem vermehrt invasiven Zellwachstum. (62,63)

*Tabelle 10: Relevante Kandidaten für Tumorsuppressorgene (Modifiziert nach Huret et al., 2013)*

Gen	Ort (Kb)	Bande
IDO1	39913.809	8p11.21
IDO2	39934.955	8p11.21
KAT6A	41929.479	8p11.21
ADAM9	38996.986	8p11.22
TACC1	38787.204	8p11.22
ASH2L	38105.493	8p11.23
EIF4EBP1	38030.502	8p11.23
FGFR1	38411.138	8p11.23
NSD3	38275.043	8p11.23
DUSP26	33591.330	8p12
WRN	31033.262	8p12
CLU	27596.917	8p21.1
BNIP3L	26383.007	8p21.2
NKX3-1	23678.693	8p21.2
CCAR2	22605.026	8p21.3
LOXL2	23296.897	8p21.3
LZTS1	20246.165	8p21.3
PIWIL2	22275.280	8p21.3
RHOBTB2	22999.579	8p21.3
DLC1	13083.363	8p22
MTUS1	17643.794	8p22
NAT1	18170.462	8p22
NAT2	18391.245	8p22
CTSB	11842.525	8p23.1
DEFB1	6870.576	8p23.1
MCPH1	6406.592	8p23.1
TNKS	9555.935	8p23.1

Bei zahlreichen Tumorarten scheint die 8p-Deletion von großer prognostischer Bedeutung zu sein. Dies gilt beispielsweise für das Prostatakarzinom, wo eine FISH-Untersuchung aus dem Institut für Pathologie des UKE an 7017 Fällen eine unabhängige prognostische Bedeutung der 8p-Deletion ergab (52). Eine weitere Untersuchung aus dem UKE hatte an einem Kollektiv von 2197 Mammakarzinomen eine signifikante Assoziation der 8p-Deletion mit einem höheren Tumorstadium, einem hohen BRE-Grad, einer gesteigerten Zellproliferation und einer verkürzten Überlebenszeit ergeben (64). Mehrere Studien hatten, wenn auch an deutlich kleineren Patientenkollektiven Hinweise auf eine Assoziation von 8p-Deletionen mit ungünstigem Tumorphänotyp und aggressivem Tumorverhalten beim hepatozellulären Karzinom ergeben (65–68). Beim Harnblasenkarzinom wurde eine Assoziation von 8p-Deletionen mit invasivem Tumorwachstum beschrieben (69). Angesichts dieser Befunde erstaunt es nicht, dass die 8p-Deletion auch in unserem Patientenkollektiv mit einem ungünstigem Tumorphänotyp und einer ungünstigen Prognose assoziiert war.

Auch wenn die prognostische Bedeutung in unseren Patienten sich nicht als statistisch unabhängig von den etablierten Parametern erwies, könnte die 8p-Deletion in Zukunft diagnostischen Nutzen erbringen. Ein großer Vorteil der FISH-Untersuchung liegt nämlich darin, dass besonders eindeutige Befunde erhoben werden können. Eine Deletion liegt entweder vor oder nicht. Mit der FISH-Untersuchung lässt sich die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Deletion eindeutig bestimmen. Diese Ja/Nein-Diagnostik unterscheidet die FISH-Untersuchung elementar von der Immunhistochemie, bei der die Art und Weise der Färbung im hohen Ausmaß von den angewendeten Protokollen abhängt. (70) Zudem gibt es bei immunhistochemischen Untersuchungen falsch negative Ergebnisse, nämlich dann, wenn das untersuchte Gewebe sich als „Immunhistochemie-inert“ erweist und es wegen Gewebeschädigung (beispielsweise durch ungenügende oder übertriebene Formalinfixation) zu keiner Färbung kommt. (70) Auch diese Problematik gibt es bei FISH-Untersuchungen nicht. Wenn ein Gewebe „FISH-inert“ ist und es mit FISH-Proben reagiert, wird das Fehlen von FISH-Signalen zu einer sofortigen Identifikation des Falles als „nicht auswertbar“ führen. Auch wenn die 8p-Deletion für sich alleine genommen keine prognostische Information ergibt, die interessant genug ist, dass sich der klinische Kollege dafür interessieren könnte, ist es doch möglich, dass die 8p-Deletion zusammen mit anderen molekularen Parametern in

einem „Cocktail“ eine bessere und klinisch nützliche Information geben wird. Für die Zukunft wird es interessant sein, nach Parametern zu suchen, welche die prognostische Aussagekraft der 8p-Deletion komplementieren und verbessern. Von besonderem Interesse wären in diesem Zusammenhang insbesondere andere, ebenfalls durch FISH untersuchbare Deletionen.

Ein klinisch nicht relevanter aber biologisch interessanter Befund ist die Beziehung der 8p-Deletion mit dem Alter. Eine biologische Erklärung gibt es für diesen Zusammenhang nicht. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass 8p-Deletionen während der Tumorprogression auftreten und somit bei Tumoren häufiger zu finden sind, welche bereits vor längerer Zeit entstanden sind. Es ist wahrscheinlich, dass Tumoren bei älteren Patienten im Durchschnitt etwas länger bestehen als bei jüngeren Patienten. Altersabhängige molekulare Veränderungen sind bei Tumoren selten. Zwei Beispiele hierfür sind der Y-Chromosomenverlust bei verschiedenen Tumoren und Normalgeweben und das TMPRSS2-ERG-Rearrangement beim Prostatakarzinom. Y-Chromosomenverluste kommen in praktisch jedem Tumortyp in einer Häufigkeit von 15-35 % vor (71), wobei Studien, welche größere Patientenkollektive mit klinischen Verlaufsdaten untersuchten immer zum Schluss kamen, dass dem Y-Chromosomenverlust keine prognostische Aussagekraft zukommt. (71) Da Y-Verluste auch in Normalgeweben, vor allen bei älteren Patienten, auftreten können wird angenommen, dass der Verlust dieses an sich „unnötigen“ Chromosoms (50 % der Menschen leben gänzlich ohne Y-Chromosom) die Tumorzelle nicht behindert, sodass sich gerade stark proliferierende Tumorzellen gerne die Reproduktion dieses unnötigen Chromosoms sparen. (72) Ein derartiger Verlust wegen Irrelevanz dürfte aber kaum die Erklärung für die häufigen 8p-Deletionen in Tumoren sein, auch deswegen nicht, weil die 8p-Deletion meist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist und weil der Chromosom-8p-Arm tatsächlich zahlreiche etablierte potenzielle Tumorsuppressorgene enthält. (62,63)

Die TMPRSS2-ERG-Fusion ist ein anderes Beispiel einer altersabhängigen Alteration. (73) Die TMPRSS2-ERG-Genfusion tritt ausschließlich beim Prostatakarzinom auf und wird durch einen aktiven Androgenrezeptor begünstigt. TMPRSS2-ERG-Fusionen treten vor Allem bei jungen Prostatakarzinompatienten auf, welche mutmaßlich zum Zeitpunkt der

Karzinomentstehung etwas höhere Testosteronwerte aufweisen als bei Patienten, die ihr Karzinom in höherem Patientenalter entwickeln. (73) Analog zum TMPRSS2-ERG-Modell könnte erwogen werden, dass möglicherweise ein Mechanismus, der sich mit der Patientenalterung verändert eine Rolle bei der Entstehung oder Vermeidung der 8p-Deletion spielt.

Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Arbeit, dass 8p-Deletionen beim Nierenzellkarzinom in circa 10 % der Fälle vorkommen. Somit gehört die 8p-Deletion zu den häufigen Veränderungen beim Nierenzellkarzinom, ist aber bei diesem Tumor deutlich weniger häufig anzutreffen als bei vielen anderen wichtigen Tumorarten. Die 8p-Deletion zeigt eine deutliche Prädisposition für klarzellige Nierenzellkarzinome, wo sie in circa 13 % der Fälle auftritt und ist bei diesem Tumor mit einem ungünstigem Tumorgrad, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Metastasierung und der Tumorgröße assoziiert. Dementsprechend ist die 8p-Deletion auch prognostisch relevant. Da die 8p-Deletion aber keine unabhängige prognostische Information ergibt, bestehen derzeit keine Gründe diese Untersuchung in der klinischen Routine durchzuführen. Für die Zukunft ist zu hoffen, dass die 8p-Deletion in Kombination mit anderen Markern vielleicht klinischen Nutzen ergibt.

## 5. Zusammenfassung

Das Nierenkarzinom gehört zu den 10 wichtigsten malignen Tumoren von Männern und Frauen. Bisher besteht die Therapie bei nicht metastasierten Tumoren in der operativen Tumorentfernung, gefolgt von einer klinischen Überwachung. Seit kurzem stehen allerdings deutlich potentere systemische Chemotherapien zur Verfügung als dies noch vor 5 Jahren der Fall war. Damit stellt sich auch erstmals die Frage einer adjuvanten Therapie von Hochrisikopatienten mit Nierenzellkarzinom, wodurch auch ein gesteigerter Bedarf nach molekularen Prognosefaktoren entsteht. In dieser Studie wurde die Prävalenz und prognostische Bedeutung der 8p-Deletion mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung an einem Tissue-Microarray, bestehend aus mehr als 1800 Tumoren,

untersucht. Die erfolgreiche Analyse von 1474 Tumoren ergab eine 8p-Deletion in circa 10 % der Fälle. Die Häufigkeit einer 8p-Deletion war eng mit dem histologischen Tumortyp assoziiert. Eine 8p-Deletion fand sich in 13,22 % von 976 klarzelligen Karzinomen, 7,79 % von 77 chromophoben Karzinomen sowie in je einem Fall von 119 Onkozytomen und von 216 papillären Nierenzellkarzinomen (0,46 %). Innerhalb der Gruppe der klarzelligen Karzinome war die 8p-Deletion signifikant assoziiert mit dem ISUP-Grad ( $p=0,0014$ ), dem Fuhrman-Grad ( $p=0,0003$ ), dem Thönes-Grad ( $p=0,0033$ ), dem pT-Stadium ( $p=0,0006$ ) und dem Vorliegen von hämatogenen Metastasen ( $p=0,0183$ ). Der Vergleich mit den klinischen Endpunkten dieser Studie ergab bei den klarzelligen Karzinomen einen signifikanten Zusammenhang zum Gesamtüberleben ( $p=0,0394$ ), eine grenzwertige Beziehung zum tumorspezifischen Überleben ( $p=0,0645$ ), aber eine hochsignifikante Beziehung zum progressionsfreien Überleben ( $p<0,0001$ ). Darüber hinaus war die 8p-Deletion beim klarzelligen Nierenzellkarzinom mit einem erhöhten Patientenalter assoziiert. Patienten mit nicht deletierten Tumoren waren im Mittel 63,52 Jahre alt, Patienten mit deletierten Tumoren waren mehr als zwei Jahre älter (65,74 Jahre,  $p=0,0346$ ). Die prognostische Bedeutung der 8p-Deletion war in einer multivariaten Analyse zusammen mit ISUP-Grad, pT-, pN- und cM-Status kein unabhängiger Prognoseparameter. Aus den Befunden wird gefolgert, dass die 8p-Deletion eine wichtige molekulare Veränderung beim Nierenzellkarzinom ist, vor allem beim klarzelligen Karzinom, wo sie mit ungünstigem Tumorphänotyp und ungünstiger Patientenprognose assoziiert ist. Die prognostische Bedeutung ist zwar nicht unabhängig von den etablierten klinischen Parametern, doch spricht die hohe Reproduzierbarkeit von Deletionsnachweisen mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung dafür, dass die 8p-Deletionsuntersuchung in Zukunft dennoch klinische Relevanz erlangen könnte, zum Beispiel in Kombination mit anderen Markern, welche ähnlich robust und reproduzierbar untersuchbar sind wie chromosomale Aberrationen mittels FISH.

## 6. Abstract

Renal carcinoma is one of the top 10 malignant tumors in both men and women. To date, therapy for non-metastatic tumors has been surgical tumor removal, followed by clinical monitoring. Recently, however, significantly more systemic chemotherapies have become available than it was the case 5 years ago. For the first time, this raises the question of adjuvant therapy of high-risk patients with renal cell carcinoma, which also creates a stronger need for molecular prognostic factors. In this study, the prevalence and prognostic significance of the 8p deletion was examined by fluorescence in situ hybridization on a tissue microarray consisting of more than 1,800 tumors. The successful analysis of 1474 tumors revealed an 8p deletion in approximately 10% of the cases. The frequency of an 8p deletion was closely associated with the histological tumor type. An 8p deletion was found in 13.22% of 976 clear cell carcinomas, 7.79% of 77 chromophobic carcinomas, and one case of 119 oncocytomas and 216 papillary renal cell carcinomas (0.46%). Within the group of clear cell carcinomas, the 8p deletion was significantly associated with the ISUP grade ( $p = 0.0014$ ), the Thoenes grade ( $p = 0.0033$ ), the pT stage ( $p = 0.0006$ ) and the presence of hematogenous metastases ( $p = 0.0183$ ). The comparison with the clinical endpoints of this study found a significant relationship to overall survival ( $p = 0.0394$ ) in clear cell carcinoma, a borderline relationship to tumor - specific survival ( $p = 0.0645$ ), but a highly significant relationship to progression - free survival ( $p < 0.0001$ ). In addition, the 8p deletion in clear cell renal cell carcinoma was associated with increased patient age. Patients with undeleted tumors were 63.52 years old on average, and patients with deleted tumors were more than two years older (65.74 years,  $p = 0.0346$ ). The prognostic significance of the 8p deletion was not an independent prognostic parameter in a multivariate analysis together with ISUP grade, pT, pN and M status, it is concluded that the 8p deletion is an important molecular alteration in renal cell carcinoma, especially in clear cell carcinoma, where it is associated with unfavorable tumor phenotype and unfavorable patient prognosis. Although the prognostic significance is not independent of the established clinical parameters, the high reproducibility of deletion detections by fluorescence in situ hybridization suggests that the 8p deletion assay may nevertheless gain clinical relevance in the future, for example

in combination with other markers which are similar robust and reproducible and are investigable like chromosomal aberrations using FISH.

## 7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Nierenzelltumoren	6
Tabelle 2: Häufigkeit der 8p-Deletion in Nierentumoren (Literatur)	10
Tabelle 3: Klinische und pathologische Parameter der untersuchten Karzinome	12
Tabelle 4: Histologischer Tumortyp und 8p Deletion	16
Tabelle 5: Seltene Tumorentitäten und 8p Deletion	17
Tabelle 6: Tumorphänotyp und 8p Deletion in klarzelligen Karzinomen	19
Tabelle 7: Tumorgroße und 8p Deletion	20
Tabelle 8: Patientenalter und 8p Deletion	20
Tabelle 9: Multivariate Analyse der klarzelligen Karzinome	24
Tabelle 10: Relevante Kandidaten für Tumorsuppressorgene (Modifiziert nach Huret et al., 2013)	31

### 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologische Tumortypen	5
Abbildung 2: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	14
Abbildung 3: Tumorstadium und Gesamtüberleben	21
Abbildung 4: Nodalstatus und Gesamtüberleben	21
Abbildung 5: M-Status und Gesamtüberleben	21
Abbildung 6: ISUP-Grad und Gesamtüberleben	22
Abbildung 7: Thönes-Grad und Gesamtüberleben	22
Abbildung 8: Fuhrmann-Grad und Gesamtüberleben	22
Abbildung 9: 8p-Deletion und Gesamtüberleben	23
Abbildung 10: 8p-Deletion und Rezidivfreies Überleben	23
Abbildung 11: 8p-Deletion und Tumorspezifisches Überleben	23
Abbildung 12: Prinzip der TMA-Herstellung	26
Abbildung 13: Arbeitsplatz TMA-Labor	27
Abbildung 14: Nahaufnahme Gewebestanzentnahme aus einem markierten Tumorareal	27
Abbildung 15: Fertiger TMA-Block	27
Abbildung 16: Häufigkeit der 8p-Deletion bei verschiedenen Tumorarten	30

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Array CGH: Array-based Comparative Genomic Hybridization

BRE-Graduierung: Bloom-Richardson-Grading

Del.: Deletion

DNA: Deoxyribonucleic acid

FISH: Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

HE: Hämatoxylin-Eosin

Her2: human epidermal growth factor receptor 2

HmbKHG: Hamburgisches Krankenhausgesetz

Her2: Human epidermal growth factor receptor 2

ICGC: International Cancer Genome Consortium

ISUP: International Society of Urological Pathology

Ki-67: Proliferation marker protein Ki-67

LK: Lymphknoten

NGS: Next generation sequencing

NKX3.1: Homeobox protein NKX-3.1

Norm.: Normal

NOS: Not otherwise specified

PTEN: Phosphatase and tensing homolog

P53: Tumor protein 53

SSC: Salin sodium citrate puffer

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TMA: Tissue-Microarray

TMPRSS2-ERG: TMPRSS2-ERG fusion gene

TNM: Tumor, Nodes, Metastases

UICC: Union for International Cancer Control

UKE: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

USD: US-Dollar

WHO: World Health Organisation

8p: Kurzer Arm des Chromosom 8

## 9. Eigenanteil an der Promotion

- Ich habe die für die Arbeit nötige Literaturrecherche durchgeführt.
- Ich habe bei der Datenanalyse geholfen.
- Ich habe bei der FISH-Analyse assistiert.
- Ich habe die Tabellen und Abbildungen erstellt.
- Ich habe Struktur und Inhalt der Dissertation erarbeitet.
- Ich habe die Dissertation geschrieben.

## 10. Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe. (Hrsg). Berlin, 2017.
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.2, 2017. AWMF Registernummer: 043/017OL. (Online im Internet.) URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/index.php?id=85&type=0> (Stand: 03.08.2020, 19:35).
3. Inamura, K. (2017). Renal cell tumors: Understanding their molecular pathological epidemiology and the 2016 WHO classification. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2195.
4. Ohashi, R., Schraml, P., Angori, S., Batavia, A. A., Rupp, N. J., Ohe, C., ... & Miyazaki, T. (2019). Classic chromophobe renal cell carcinoma incur a larger number of chromosomal losses than seen in the eosinophilic subtype. *Cancers*, 11(10), 1492.
5. Cancer Genome Atlas Research Network. (2016). Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 374(2), 135-145.
7. Muglia, V. F., & Prando, A. (2015). Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiologia brasileira*, 48(3), 166-174.
8. Halat, S., Eble, J. N., Grignon, D. J., Lopez-Beltran, A., Montironi, R., Tan, P. H., ... & Cheng, L. (2010). Multilocular cystic renal cell carcinoma is a subtype of clear cell renal cell carcinoma. *Modern Pathology*, 23(7), 931-936.

9. Moch, H. (2016). WHO-Klassifikation von 2016 und erste S3-Leitlinie zum Nierenzellkarzinom. *Der Pathologe*, 37(2), 127-133.
10. Ljungberg, B., Albiges, L., Abu-Ghanem, Y., Bensalah, K., Dabestani, S., Fernández-Pello, S., ... & Kuusk, T. (2019). European association of urology guidelines on renal cell carcinoma: the 2019 update. *European urology*, 75(5), 799-810.
11. Sternberg, C. N., Hawkins, R. E., Wagstaff, J., Salman, P., Mardiak, J., Barrios, C. H., ... & McCann, L. (2013). A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: final overall survival results and safety update. *European journal of cancer*, 49(6), 1287-1296.
12. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O., ... & Chen, I. (2007). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 356(2), 115-124.
13. Ochoa, C. E., & Joseph, R. W. (2018). Nivolumab in renal cell carcinoma: current trends and future perspectives. *Journal of Kidney Cancer and VHL*, 5(1), 15.
14. Chew, H. K. (2001). Adjuvant therapy for breast cancer: Who should get what?. *Western Journal of medicine*, 174(4), 284.
15. Schmiegel, W., Reinacher-Schick, A., Arnold, D., Graeven, U., Heinemann, V., Porschen, R., ... & Schmitt, W. (2008). S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ –Aktualisierung 2008. Ergebnis einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz (8.–9. Juni 2007). *Z gastroenterol*, 46(8), 799-840.
16. Kucharczyk, J., Mandalapu, K., Satti, S., & Matrana, M. R. (2017). Outcomes of patients with late-relapse metastatic renal cell carcinoma treated with targeted

- therapies: a single institution experience. *Ochsner Journal*, 17(4), 331-334.
17. Pal, S. K., & Haas, N. B. (2014). Adjuvant therapy for renal cell carcinoma: past, present, and future. *The oncologist*, 19(8), 851.
  18. Gross-Goupil, M., Kwon, T. G., Eto, M., Ye, D., Miyake, H., Seo, S. I., ... & DeBenedetto, R. (2018). Axitinib versus placebo as an adjuvant treatment of renal cell carcinoma: Results from the phase III, randomized ATLAS trial. *Annals of Oncology*, 29(12), 2371-2378.
  19. Alesini, D., Mosillo, C., Naso, G., Cortesi, E., & Iacovelli, R. (2015). Clinical experience with everolimus in the second-line treatment of advanced renal cell carcinoma. *Therapeutic Advances in Urology*, 7(5), 286-294.
  20. Staehler, M., Motzer, R. J., George, D. J., Pandha, H. S., Donskov, F., Escudier, B., ... & Ramaswamy, K. (2018). Adjuvant sunitinib in patients with high-risk renal cell carcinoma: safety, therapy management, and patient-reported outcomes in the S-TRAC trial. *Annals of Oncology*, 29(10), 2098-2104.
  21. Srigley, J. R., Hutter, R. V., Gelb, A. B., Henson, D. E., Kenney, G., King, B. F., ... & Pisansky, T. M. (1997). Current prognostic factors-renal cell carcinoma: Workgroup No. 4. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 80(5), 994-996.
  22. Patard, J. J., Leray, E., Rioux-Leclercq, N., Cindolo, L., Ficarra, V., Zisman, A., ... & Lobel, B. (2005). Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *Journal of Clinical Oncology*, 23(12), 2763-2771.
  23. Hood, L., & Rowen, L. (2013). The human genome project: big science transforms biology and medicine. *Genome medicine*, 5(9), 79.

24. Wetterstrand, K. A. (2013). DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) National Human Genome Research Institute. Bethesda, MD, USA.
25. Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., ... & Cancer Genome Atlas Research Network. (2013). The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature genetics*, 45(10), 1113.
26. Klatte, T., Rao, P. N., De Martino, M., LaRochelle, J., Shuch, B., Zomorodian, N., ... & Pantuck, A. J. (2009). Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 27(5), 746-753.
27. Thrash-Bingham, C. A., Salazar, H., Freed, J. J., Greenberg, R. E., & Tartof, K. D. (1995). Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology. *Cancer research*, 55(24), 6189-6195.
28. Moch, H., Presti, J. C., Sauter, G., Buchholz, N., Jordan, P., Mihatsch, M. J., & Waldman, F. M. (1996). Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer research*, 56(1), 27-30.
29. Schullerus, D., Herbers, J., Chudek, J., Kanamaru, H., & Kovacs, G. (1997). Loss of heterozygosity at chromosomes 8p, 9p, and 14q is associated with stage and grade of non-papillary renal cell carcinomas. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 183(2), 151-155.
30. Schullerus, D., von Knobloch, R., Chudek, J., Herbers, J., & Kovacs, G. (1999). Microsatellite analysis reveals deletion of a large region at chromosome 8p in conventional renal cell carcinoma. *International journal of cancer*, 80(1), 22-24.
31. Yang, Z. Q., Yoshida, M. A., Fukuda, Y., Kurihara, N., Nakamura, Y., & Inazawa, J.

- (2000). Molecular cytogenetic analysis of 17 renal cancer cell lines: increased copy number at 5q31-33 in cell lines from nonpapillary carcinomas. *Japanese journal of cancer research*, 91(2), 156-163.
32. Reutzel, D., Mende, M., Naumann, S., Störkel, S., Brenner, W., Zabel, B., & Decker, J. (2001). Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 93(3-4), 221-227.
  33. Gunawan, B., Huber, W., Holtrup, M., von Heydebreck, A., Efferth, T., Poustka, A., ... & Füzesi, L. (2001). Prognostic impacts of cytogenetic findings in clear cell renal cell carcinoma: Gain of 5q31–qter predicts a distinct clinical phenotype with favorable prognosis. *Cancer research*, 61(21), 7731-7738.
  34. Presti, J. C., Wilhelm, M., Reuter, V., Russo, P., Motzer, R., & Waldman, F. (2002). Allelic loss on chromosomes 8 and 9 correlates with clinical outcome in locally advanced clear cell carcinoma of the kidney. *The Journal of urology*, 167(3), 1464-1468.
  35. Gunawan, B., von Heydebreck, A., Fritsch, T., Huber, W., Ringert, R. H., Jakse, G., & Füzesi, L. (2003). Cytogenetic and morphologic typing of 58 papillary renal cell carcinomas: evidence for a cytogenetic evolution of type 2 from type 1 tumors. *Cancer research*, 63(19), 6200-6205.
  36. Kallio, J. P., Mahlamäki, E. H., Helin, H., Karhu, R., Kellokumpu-Lehtinen, P., & Tammela, T. L. J. (2004). Chromosomal gains and losses detected by comparative genomic hybridization and proliferation activity in renal cell carcinoma do they give any prognostic information in clinical practice? *Scandinavian journal of urology and nephrology*, 38(3), 225-230.
  37. Nagy, A., Buzogany, I., & Kovacs, G. (2004). Microsatellite allelotyping differentiates chromophobe renal cell carcinomas from renal oncocytomas and

- identifies new genetic changes. *Histopathology*, 44(6), 542-546.
38. Yoshimoto, T., Matsuura, K., Karnan, S., Tagawa, H., Nakada, C., Tanigawa, M., ... & Takeuchi, I. (2007). High-resolution analysis of DNA copy number alterations and gene expression in renal clear cell carcinoma. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 213(4), 392-401.
  39. Zhang, Z., Wondergem, B., & Dykema, K. (2010). A comprehensive study of progressive cytogenetic alterations in clear cell renal cell carcinoma and a new model for ccRCC tumorigenesis and progression. *Advances in Bioinformatics*, 2010.1-15.
  40. Moore LE, Jaeger E, Nickerson ML, Brennan P, De Vries S, Roy R, et al. Genomic copy number alterations in clear cell renal carcinoma: Associations with case characteristics and mechanisms of VHL gene inactivation. *Oncogenesis*. 2012;1(6):1-9.
  41. Kang, X. L., Zou, H., Pang, L. J., Hu, W. H., Zhao, J., Qi, Y., ... & Liang, W. H. (2015). Chromosomal imbalances revealed in primary renal cell carcinomas by comparative genomic hybridization. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(4), 3636.
  42. Mirlacher, M., & Simon, R. (2010). Recipient block TMA technique. In *Tissue Microarrays*. Humana Press, Totowa, NJ. 37-44.
  43. Kononen, J., Bubendorf, L., Kallionimeni, A., Bärklund, M., Schraml, P., Leighton, S., ... & Kallionimeni, O. P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine*, 4(7), 844-847.
  44. Krohn, A., Diedler, T., Burkhardt, L., Mayer, P. S., De Silva, C., Meyer-Kornblum, M., ... & Mader, M. (2012). Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative

- prostate cancer. *The American journal of pathology*, 181(2), 401-412.
45. Jawhar, N. M. (2009). Tissue microarray: a rapidly evolving diagnostic and research tool. *Annals of Saudi medicine*, 29(2), 123-127.
  46. Voduc, D., Kenney, C., & Nielsen, T. O. (2008, April). Tissue microarrays in clinical oncology. In *Seminars in radiation oncology*. WB Saunders. 18(2). 89-97.
  47. Dekker, T. J. A., Ter Borg, S., Hooijer, G. K. J., Meijer, S. L., Wesseling, J., Boers, J. E., ... & Riemersma, S. A. (2015). Quality assessment of estrogen receptor and progesterone receptor testing in breast cancer using a tissue microarray-based approach. *Breast cancer research and treatment*, 152(2), 247-252.
  48. Furrer, D., Jacob, S., Caron, C., Sanschagrin, F., Provencher, L., & Diorio, C. (2016). Tissue microarray is a reliable tool for the evaluation of HER2 amplification in breast cancer. *Anticancer research*, 36(9), 4661-4666.
  49. Muftah, A. A., Aleskandarany, M. A., Al-Kaabi, M. M., Sonbul, S. N., Diez-Rodriguez, M., Nolan, C. C., ... & Green, A. R. (2017). Ki67 expression in invasive breast cancer: the use of tissue microarrays compared with whole tissue sections. *Breast cancer research and treatment*, 164(2), 341-348.
  50. Nocito, A., Bubendorf, L., Tinner, E. M., Süess, K., Wagner, U., Forster, T., ... & Ackermann, D. (2001). Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *The Journal of pathology*, 194(3), 349-357.
  51. Green, W. J., Ball, G., Hulman, G., Johnson, C., Van Schalwyk, G., Ratan, H. L., ... & Rees, R. (2016). Ki67 and DLX2 predict increased risk of metastasis formation in prostate cancer—a targeted molecular approach. *British journal of cancer*, 115(2), 236-242.

52. Kluth, M., Ahrary, R., Hube-Magg, C., Ahmed, M., Volta, H., Schwemin, C., ... & Krech, T. (2015). Genomic deletion of chromosome 12p is an independent prognostic marker in prostate cancer. *Oncotarget*, 6(29), 27966.
53. De Marzo A., M.D., Ph.D., Fedor, H. (2010): Tissue Microarrays at Johns Hopkins. (Online im Internet.) URL:  
[http://apps.pathology.jhu.edu/blogs/pathology/wp-content/uploads/2010/05/Tissue\\_Microarray\\_Process.jpg](http://apps.pathology.jhu.edu/blogs/pathology/wp-content/uploads/2010/05/Tissue_Microarray_Process.jpg) (Stand 03.08.2020, 19:05)
54. Bayani, J., & Squire, J. A. (2004). Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Current Protocols in Cell Biology*, 23(1), 22-4.
55. Shinawi, M., & Cheung, S. W. (2008). The array CGH and its clinical applications. *Drug discovery today*, 13(17-18), 760-770.
56. Koreth, J., Christopher, J., James, O., & McGee, D. (1998). Microsatellite Analysis in Human Disease. In *Clinical Applications of PCR*. Humana Press. 321-339.
57. Mao, X., Young, B. D., & Lu, Y. J. (2007). The application of single nucleotide polymorphism microarrays in cancer research. *Current genomics*, 8(4), 219-228.
58. Trask, B. J. (1991). Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics*, 7(5), 149-154.
59. Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B. E., Sumer, S. O., Aksoy, B. A., ... & Antipin, Y. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012; 2: 401-404.
60. Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., ... & Cerami, E. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical

profiles using the cBioPortal. *Science signaling*, 6(269), p11.

61. Zhang, Z., & Ren, Q. (2015). Why are essential genes essential?-The essentiality of *Saccharomyces* genes. *Microbial cell*, 2(8), 280.
62. Xue, W., Krasnitz, A., Lucito, R., Sordella, R., VanAelst, L., Cordon-Cardo, C., ... & Zender, L. (2008). DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes & development*, 22(11), 1439-1444.
63. Bowen, C., Bubendorf, L., Voeller, H. J., Slack, R., Willi, N., Sauter, G., ... & Kallioniemi, O. P. (2000). Loss of NKX3. 1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression<sup>1</sup>, 2. *Cancer research*, 60(21), 6111-6115.
64. Lebok, P., Mittenzwei, A., Kluth, M., Özden, C., Taskin, B., Hussein, K., ... & Mahner, S. (2015). 8p deletion is strongly linked to poor prognosis in breast cancer. *Cancer biology & therapy*, 16(7), 1080-1087.
65. Steinemann, D., Skawran, B., Becker, T., Tauscher, M., Weigmann, A., Wingen, L., ... & Flik, J. (2006). Assessment of differentiation and progression of hepatic tumors using array-based comparative genomic hybridization. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(10), 1283-1291.
66. Chan, K. L., Man-Fong Lee, J., Guan, X. Y., Fan, S. T., & Oi-Lin Ng, I. (2002). High-density allelotyping of chromosome 8p in hepatocellular carcinoma and clinicopathologic correlation. *Cancer*, 94(12), 3179-3185.
67. Kusano, N., Okita, K., Shirahashi, H., Harada, T., Shiraishi, K., Oga, A., ... & Sasaki, K. (2002). Chromosomal imbalances detected by comparative genomic hybridization are associated with outcome of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 94(3), 746-751.
68. Zhang, S. H., Cong, W. M., Xian, Z. H., & Wu, M. C. (2005). Clinicopathological

significance of loss of heterozygosity and microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in China. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(20), 3034.

69. Stoehr, R., Wissmann, C., Suzuki, H., Knuechel, R., Krieg, R. C., Klopocki, E., ... & Simon, R. (2004). Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Laboratory investigation*, 84(4), 465-478.
70. Hewitt, S. M., Baskin, D. G., Frevert, C. W., Stahl, W. L., & Rosa-Molinar, E. (2014). Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 693-697.
71. Sauter, G., Moch, H., Wagner, U., Novotna, H., Gasser, T. C., Mattarelli, G., ... & Waldman, F. M. (1995). Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*, 82(2), 163-169.
72. Guttenbach, M., Koschorz, B., Bernthaler, U., Grimm, T., & Schmid, M. (1995). Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei. *American journal of human genetics*, 57(5), 1143.
73. Steurer, S., Mayer, P. S., Adam, M., Krohn, A., Koop, C., Ospina-Klinck, D., ... & Wittmer, C. (2014). TMPRSS2-ERG fusions are strongly linked to young patient age in low-grade prostate cancer. *European urology*, 66(6), 978-981.

## 11. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Guido Sauter für die Vergabe des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Martina Kluth, Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon für die wissenschaftliche Betreuung dieser Dissertation.

Abschließend bedanke ich mich noch bei meinen Eltern und Stiefeltern: Patricia Polzin, Christian Polzin, Rainer Bannenberg, Annette Bannenberg, meinen lieben Großeltern Gertrud und Pablo Rivero und meiner Frau Annabelle Bannenberg ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre.

## 12. Publikation

Titel:

Aberrant expression of membranous carbonic anhydrase IX (CAIX) is associated with unfavorable disease course in papillary and clear cell renal cell carcinoma

Autoren:

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.

Erschienen:

Urol Oncol Semin Orig Investig. 2018 Dez;36(12):531.e19-531.e25.

## 13. Lebenslauf

**Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.**

## 14. 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.

David Clemens Bannenber