

**Aus dem Institut für Medizinische Immunologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
(Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. habil. J. Langner)



**Immunhistochemische Untersuchungen apoptose- und proliferationsassoziierter  
Proteine beim klarzelligem Nierenzellkarzinom in Bezug auf klinisch-pathologische  
Parameter und prognostische Bedeutung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Mirja Wüster  
geboren am 09.03.1975 in Lübbecke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Langner, Halle
2. Prof. Dr. em. Rath, Halle
3. Prof. Dr. Wirth, Dresden

24.05.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000006967**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000006967>]

## Referat und bibliographische Beschreibung

Das Nierenzellkarzinom (NZK), dessen meistvertretenen Subtyp das klarzellige NZK darstellt, ist der häufigste maligne renale Tumor und weist eine auch nach kurativ intendierter Nephrektomie schwer abschätzbare Langzeitprognose sowie eine geringe Ansprechrate auf adjuvante Therapien auf.

Da in jüngerer Vergangenheit die im Zusammenhang mit proliferativen Prozessen zu sehende essenzielle Bedeutung der Apoptose für den Tumorprozeß bekannt wurde, widmete sich die vorliegende Untersuchung der Expression von apoptose- und proliferationsrelevanten Proteinen beim klarzelligem NZK, ihren Interrelationen sowie ihrer potentiellen prognostischen Bedeutung.

Hierzu wurden Schnittpräparate von 23 formalinfixierten, paraffineingebetteten NZK-Gewebeproben immunhistochemisch auf die Expression von Bcl-2, Ki-67, p53 und VHL sowie mittels des TUNEL-Verfahrens auf den Anteil apoptotischer Zellen untersucht. Die untersuchten Parameter wurden bezüglich ihrer Assoziationen untereinander sowie mit pT-Stadium und nukleärem Grading sowie ihren Einfluss auf das rezidivfreie Überlebensintervall ausgewertet.

Von den untersuchten NZK wiesen 43,5 % eine apoptotische Aktivität auf, wobei ein Apoptosenachweis eng mit einem höheren nukleären Grading assoziiert war. Die beobachteten Anteile Ki-67-positiver Zellen waren insgesamt vergleichsweise gering und zeigten keine Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern; es bestand jedoch eine signifikant positive Korrelation mit der p53- und VHL-Proteinexpression. Alle untersuchten NZK wiesen eine ausgeprägte Bcl-2-Expression auf, wobei das Ausmaß dieser Expression in keinem signifikanten Zusammenhang mit einem der immunhistochemischen oder klinisch-pathologischen Parameter stand. Die p53-Expression der 23 untersuchten NZK erwies als relativ hoch: 60,1 % der NZK wiesen > 1 % p53-positiver Zellen auf; 43,5 % der Fälle boten Anteile von > 5 % p53-positiver Zellen. Es bestand eine enge positive Assoziation zwischen der p53- und der VHL-Expression. Nahezu 40 % der NZK-Proben wiesen einen vollständigen VHL-Expressionsverlust auf. Eine VHL-Expression in  $\leq 20$  % der Zellen wirkte sich tendenziell nachteilig auf das rezidivfreie Überlebensintervall aus. Das nukleäre Grading und das pT-Stadium wiesen eine signifikant positive Korrelation auf.

Die erzielten Resultate weisen auf eine potentielle Verwertbarkeit der Apoptosehäufigkeit und eventuell auch der VHL-Expression als Prognosefaktoren für das klarzellige NZK hin. Außerdem scheinen angesichts der hier beobachteten Expressionsmuster p53-Alterationen beim klarzelligem NZK häufiger aufzutreten, als vielfach angenommen; in Anbetracht der positiven Korrelation der p53- und VHL-Expression stellen Alterationen der genannten Gene möglicherweise alternative Karzinogenesemechanismen für das NZK dar. Die beobachtete insgesamt hohe Bcl-2-Expression impliziert eine funktionelle Bedeutung dieses Proteins beim klarzelligem NZK und bietet einen möglichen pharmakotherapeutischen Angriffspunkt für die Behandlung des klarzelligem NZK.

Wüster, Mirja: Immunhistochemische Untersuchungen apoptose- und proliferationsassoziierter Proteine beim klarzelligem Nierenzellkarzinom in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter und prognostische Bedeutung Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2003

**Inhaltsverzeichnis**

	Seite
<b>1 Einleitung und Zielstellung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Nierenzellkarzinom: Epidemiologie, Genese, Klassifikation und Prognosefaktoren	1
1.1.1 Das klarzellige Nierenzellkarzinom	3
1.2 Die immunhistochemisch untersuchten Parameter	3
1.2.1 Apoptose	3
1.2.2 Ki-67	6
1.2.3 Bcl-2	7
1.2.4 p53	8
1.2.5 pVHL	10
1.3 Zielstellung der Arbeit	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Untersuchungsgut	13
2.1.1 Nukleäres Grading	13
2.1.2 pT-Stadium	13
2.1.3 pN-Stadium	14
2.1.4 M-Stadium	14
2.1.5 Histologie	14
2.2 Klinische Daten der Patienten	14
2.2.1 Verteilung von Geschlecht, Operationsalter und Tumorlokalisation	14
2.2.2 Medikamentöse Therapie	15
2.2.3 Klinische Nachbeobachtung	15
2.3 Methoden	16
2.3.1 Anfertigung von ultradünnen Paraffin-Gewebeschnitten	16
2.3.2 Immunhistochemische Methoden	16
2.3.3 Mikroskopische Auswertung der Färbemuster	18
2.3.4 Statistische Auswertung	18
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>20</b>
3.1 Häufigkeitsverteilungen der Anfärbungsscores für apoptotische Zellen, Ki-67-, Bcl-2-, p53- und VHL-Antigen	20
3.1.1 Apoptoseverhalten: Anfärbungsscores im TUNEL-Verfahren	20
3.1.1 Proliferationsverhalten: Anfärbungsscores im Ki-67- Nachweisverfahren mit dem monoklonalen Antikörper MIB-1	20
3.1.3 Bcl-2-Antigen: Anfärbungsscores im Nachweisverfahren mit dem Antikörper 124	20

---

3.1.4	p53-Antigen: Anfärbungsscores im Nachweisverfahren mit dem Antikörper DO-7	21
3.1.5	VHL-Antigen: Anfärbungsscores im Nachweisverfahren mit dem Antikörper Ig32	21
3.1.6	Häufigkeitsverteilungen der Anfärbungsscores für apoptotische Zellen, Ki-67-, Bcl-2-, p53- und VHL-Antigen nach Dichotomisierung	23
3.1.7	Histologisches Grading und pT-Stadium: Häufigkeitsverteilung nach Dichotomisierung	24
3.2	Zusammenhänge der immunhistochmemisch untersuchten Parameter mit Tumorgrad und pT-Stadium	25
3.2.1	Zusammenhänge zwischen Tumorgrad und pT-Stadium	25
3.2.2	Bcl-2-Expression	25
3.2.3	Ki-67-Expression	26
3.2.4	p53-Expression	26
3.2.5	Apoptosenachweis im TUNEL-Verfahren	27
3.2.6	VHL-Expression	28
3.3	Zusammenhänge der immunhistochemisch untersuchten Marker untereinander	29
3.3.1	Bcl-2-Expression und Ki-67-Expression	29
3.3.2	Bcl-2-Expression und p53-Expression	29
3.3.3	Bcl-2-Expression und Apoptosehäufigkeit	30
3.3.4	Bcl-2-Expression und VHL-Expression	30
3.3.5	Ki-67-Expression und p53-Expression	31
3.3.6	Ki-67-Expression und Apoptosehäufigkeit	31
3.3.7	Ki-67-Expression und VHL-Expression	32
3.3.8	p53-Expression und Apoptosehäufigkeit	33
3.3.9	p53-Expression und VHL-Expression	33
3.3.10	Apoptosehäufigkeit und VHL-Expression	34
3.4	Zusammenhänge der immunhistochmemisch untersuchten Parameter mit Tumorgrad und pT-Stadium nach Dichotomisierung	35
3.4.1	Zusammenhänge zwischen Tumorgrad und pT-Stadium	35
3.4.2	Bcl-2-Expression	35
3.4.3	Ki-67-Expression	36
3.4.4	p53-Expression	36
3.4.5	Apoptosenachweis im TUNEL-Verfahren	37
3.4.6	VHL-Expression	38
3.5	Zusammenhänge der immunhistochemisch untersuchten Marker untereinander nach Dichotomisierung	38
3.5.1	Bcl-2-Expression und Ki-67-Expression	38
3.5.2	Bcl-2-Expression und p53-Expression	39
3.5.3	Bcl-2-Expression und Apoptosehäufigkeit	39

---

3.5.4	Bcl-2-Expression und VHL-Expression	39
3.5.5	Ki-67-Expression und p53-Expression	40
3.5.6	Ki-67-Expression und Apoptosehäufigkeit	40
3.5.7	Ki-67-Expression und VHL-Expression	40
3.5.8	p53-Expression und Apoptosehäufigkeit	41
3.5.9	p53-Expression und VHL-Expression	41
3.5.10	Apoptosehäufigkeit und VHL-Expression	41
3.6	Prognostische Aussagekraft: Statistischer Einfluss der untersuchten Parameter auf das rezidivfreie Überlebensintervall	42
3.6.1	Histologisches Grading und pT-Stadium	42
3.6.2	Die immunhistochemisch untersuchten Parameter	43
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>46</b>
4.1	Diskussion von Material und Methoden	46
4.2	Diskussion der Ergebnisse	47
4.2.1	Färbemuster der immunhistochemischen Faktoren	47
4.2.2	Zusammenhänge zwischen klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Faktoren	49
4.2.3	Zusammenhänge der immunhistochemischen Parameter untereinander	53
4.2.4	Prognostische Relevanz der untersuchten klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Faktoren	58
4.2.5	Klinische Implikationen der erzielten Ergebnisse	63
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>77</b>
Tab. 49:	Die 23 untersuchten NZK: Klinische Daten, Nachbeobachtungszeit, Krankheitsverlauf und postoperative medikamentöse Behandlung im Rahmen von Studien	77
Tab. 50:	Klinisch-pathologische Daten und Expression der immunhistochemisch untersuchten Parameter bei den 23 untersuchten NZK	78
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>79</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Ag	Antigen
AI	Apoptoseindex
AIF	„apoptosis inducing factor“, apoptoseinduzierender Faktor
Ak	Antikörper
AS	Anfärbungsscore
AS <sub>x</sub>	Anfärbungsscore des im Index näher bezeichneten Markers
AS(d) <sub>x</sub>	dichotomisierter Anfärbungsscore des im Index näher bezeichneten Markers
d	dichotomisiert
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
Dg.	Diagnose
EFS	„event-free survival“, progressionsfreie Überlebenszeit
ER	endoplasmatisches Retikulum
G	„tumor grading“, Tumorgad
GLUT-1	Glukosetransporter-1
IAP	„inhibitor of apoptosis Proteins“, apoptoseinhibierende Proteine
IF	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
k. A.	keine Angabe
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
LI	„labelling index“, Anfärbungsindex
Lk	Lymphknoten
LW	Leitungswasser
m	männlich
M.	Musculus
mAb	monoklonaler Antikörper
Mon.	Monate
MW	Mikrowelle
NZK	Nierenzellkarzinom
OP-Alter	Alter zum Operationszeitpunkt
Pat.	PatientIn
PBS	„phosphate-buffered saline“, phosphat-gepufferte Salzlösung
PI	Proliferationsindex

postop.	postoperativ
RT	Raumtemperatur
TBS	Tris-Borat-Salzlösung
TNF-R1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TUNEL	“terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling”
UICC	“Union Internationale Contre le Cancer”, Internationale Union gegen Krebserkrankungen
uPA	“urokinase-like plasminogen activator”, urokinaseähnlicher Plasminogenaktivator
ÜZ	Überlebenszeit
VEGF	“vascular endothelial growth factor”, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
vs.	versus
w	weiblich
WHO	“World Health Organisation”, Weltgesundheitsorganisation
5-FU	5-Fluorouracil
5-JÜR	Fünfjahresüberlebensrate

## 1 Einleitung und Zielstellung

### 1.1 Das Nierenzellkarzinom: Epidemiologie, Genese, Klassifikation und Prognosefaktoren

Das Nierenzellkarzinom (NZK) stellt etwa 3 % aller malignen Tumorerkrankungen und 80% aller malignen Nierentumoren des Menschen. Es ist der dritthäufigste urologische Tumor [11, 41, 104, 106, 113]. Seine Inzidenz weist geographische, ethnische und altersspezifische Unterschiede auf und nimmt generell durch die sich verschiebende Altersstruktur in den westlichen Industrieländern zu. Dementsprechend besteht ein Nord-Süd-Gefälle, wobei das NZK in Nordeuropa und Nordamerika am häufigsten, in Südeuropa, Asien und Afrika relativ selten auftritt [105, 106, 127]. In der Bundesrepublik Deutschland werden pro Jahr etwa 10.000 Neuerkrankungen registriert [23, 104]. Die altersbezogene Inzidenz der Erkrankung steigt ab dem 35. Lebensjahr kontinuierlich und erreicht ihren Höhepunkt im 6. Lebensjahrzehnt [23, 83, 126, 127, 144, 113, 104]. Dabei erkranken Männer 1,5 - 3 Mal häufiger als Frauen [83, 104, 106, 113, 127].

Histogenetisch handelt es sich bei den NZK um eine heterogene Tumorentität. Während das klarzellige und das chromophile NZK dem proximalen Tubulusepithel entstammen, leiten sich das chromophobe NZK und das Ductus-Bellini-Karzinom – wie auch das benigne Onkozytom – vom Sammelrohrsystem her [15, 23, 126]. Bei den spindelzelligen Formen handelt es sich um stark entdifferenzierte Varianten der NZK-Grundtypen (klarzelliges, chromophiles und chromophobes NZK) [83, 132] (Tabelle 1).

Die Ätiologie des NZK ist nicht vollständig geklärt. Eine gelegentlich zu beobachtende familiäre Häufung, die zum Teil im Rahmen des relativ seltenen von-Hippel-Lindau-Krebssyndroms auftritt, legt eine genetisch determinierte Prädisposition zur Entwicklung eines NZK nahe; Mutationen des VHL-Tumorsuppressorgens (Chromosom 3) spielen offensichtlich für die Entwicklung des klarzelligen NZK eine tragende Rolle. Sporadische NZK treten in der Regel unilateral auf, während hereditäre NZK relativ häufig synchron oder metachron beide Nieren betreffen [19, 23, 29, 58, 104]. Patienten mit kongenitalen polyzystischen Nieren haben ein deutlich erhöhtes Karzinomrisiko [23].

Als nachgewiesene Risikofaktoren für die Entstehung eines NZK gelten das Rauchen, eine unausgewogene, insbesondere eiweißreiche Ernährung sowie Übergewicht. Weitere mögliche auslösende Faktoren sind chronischer Diuretikagebrauch, Analgetikaabusus, Exposition gegenüber Cadmium, Blei und petrochemischen Substanzen, Thorotrast, Teer und Holzschutzmitteln [23, 104, 144]. Etablierte, international anerkannte Prognosefaktoren für das NZK sind das Tumorstadium, das Tumorgrading und der histologische Typ. Während die Fünfjahres-Überlebensrate (5-JÜR) im TNM-Stadium I noch 98 % und im TNM-Stadium II 93 % beträgt, sinkt sie über 58 % im Stadium III auf ein Drittel im Stadium IV ab [127] (Tabelle 2).

Hinsichtlich des Tumorgradings ist darauf hinzuweisen, dass keine allgemeingültige Grading-Methode existiert.

**Tab. 1:** Zytologisch - histologische Klassifikation der epithelialen Nierentumoren

Die verschiedenen epithelialen Tumoren der Niere und ihre Häufigkeit nach der Mainz-Klassifikation (Thoenes u. Störkel 1991)	
Klarzelliges NZK	76%
Chromophiles NZK	10%
Chromophobes NZK	5%
Onkozytom	5%
Ductus-Bellini-Karzinom	1%
Spindelzelliges NZK	1%
Nicht klassifizierbares NZK	2%



Im angloamerikanischen Schrifttum wird vielfach das vierstufige histologische Grading nach Fuhrmann verwandt. Das in Deutschland überwiegend gebrauchte dreistufige nukleäre Grading in Anlehnung an die WHO [15, 104, 127, 132, 133] wurde auch auf die in dieser Arbeit untersuchten NZK angewandt. Hierbei liegt für G1-NZK die Fünfjahres-Überlebensrate bei 92%, um über 60% bei den G2-Tumoren auf 32% bei G3-NZK abzufallen [15] (Tabelle 3).

Zwischen histologischem Zelltyp und Prognose bestehen lt. *Brkovic et al.* insofern gewisse Beziehungen, als dass klarzellige NZK häufig früher metastasieren und eine höhere Letalität aufweisen als chromophobe und chromophile [15].

Der wichtigste das Überleben limitierende Faktor für das NZK ist, zumal in Anbetracht seiner geringen Strahlen- und Chemosensibilität, das Vorliegen einer Fernmetastasierung. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegen in etwa 30% der Fälle bereits Metastasen in anderen Organen vor (vornehmlich pulmonal, lymphonodulär, hepatisch, ossär, adrenal, kontralateral renal oder cerebral [23, 144]). Für diese Patienten liegt die Fünfjahresüberlebensrate unter 2%, die mediane Überlebenszeit beträgt weniger als 1 Jahr [41, 105, 144].

Ungefähr 30% der Patienten ohne primäre Metastasierung entwickeln - trotz in kurativer Absicht erfolgter Nephrektomie - im weiteren Verlauf Fernmetastasen. Dabei treten zwischen Diagnosestellung / chirurgischer Therapie und Metastasendetektion Latenzzeiten von bis zu 10 Jahren und mehr auf, in denen der Patient klinisch unauffällig erscheinen kann [6, 41, 106, 129]. Obwohl für die nicht metastasierten NZK weiterhin

Tumorstadium, -grading und -subtyp wichtige Prognosefaktoren bleiben, wurden auf Grund des relativ variablen tumorbiologischen Verhaltens des NZK in den vergangenen Jahren erhebliche Anstrengungen zur Definition

Tab. 2: Die TNM-Klassifikation des NZK

T: Primärtumor			
<b>Tx</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden		
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor		
<b>T1</b>	Tumor ≤ 7 cm in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere		
<b>T2</b>	Tumor ≥ 7 cm in seiner größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere		
<b>T3</b>	Tumor breitet sich aus bis in Hauptvenen oder infiltriert Nebenniere oder perirenale Fettgewebe, aber nicht außerhalb der Gerota'schen Faszie		
<b>T3a</b>	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenale Fettkapsel, aber nicht Gerota'sche Faszie		
<b>T3b</b>	Ausgeprägte Tumorausdehnung in Nierenvenen oder V. cava unterhalb des Zwerchfells		
<b>T3c</b>	Tumorausdehnung in V. cava oberhalb des Zwerchfells		
<b>T4</b>	Tumorausdehnung über die Gerota'sche Faszie hinaus		
N: regionäre Lymphknoten			
<b>Nx</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden		
<b>N0</b>	Kein Anhalt für regionäre Lymphknoten		
<b>N1</b>	Metastase in einem regionären Lymphknoten		
<b>N2</b>	Metastase in mehr als einem regionären Lymphknoten		
M: Fernmetastasierung			
<b>Mx</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden		
<b>M0</b>	Kein Anhalt für Fernmetastasen		
<b>M1</b>	Fernmetastasen		
TNM-Stadieneinteilung			
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3a	N0	M0
	T3a	N1	M0
	T3b	N0	M0
	T3b	N1	M0
	T3c	N0	M0
<b>IV</b>	T3c	N1	M0
	T4	Jedes N	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	N3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tab. 3: Das nukleäre Grading der NZK

<b>Grad 1</b>	Runde Zellkerne normaler Größe (wie beim Tubulusepithel) mit zartem oder kondensiertem Chromatin. Wenige kleine Nukleolen. Keine Mitosen.
<b>Grad 2</b>	Vergrößerte, hyperchromatische Zellkerne mit deutlichen 1 bis 2 Nukleolen, die zentral oder leicht exzentrisch liegen. Deutliche Anisonukleose. Wenige Mitosen.
<b>Grad 3</b>	Starke Anisonukleose, vergrößerte Kerne mit verklumptem, groben Chromatin. Tumor-Riesenzellen. Einzelne oder multiple große Nukleolen. Vermehrt Mitosen.

weiterer möglicher prognostischer Marker unternommen. Immunhistochemisch nachweisbare Faktoren wie Ki-67 [1, 20, 24, 25, 35, 47, 52, 94, 95, 110, 111, 122, 130, 131, 149, 152], p53 / mdm-2 [36, 47, 48, 55, 68, 93, 94, 99, 110, 122, 131, 139, 140], p21 / p27 [49] oder VEGF [46, 57, 87, 96], die in Proliferation und Neoangiogenese von Tumorzellen assoziiert sein sollen, erwiesen sich dabei als vielversprechende Marker, ohne dass ihre klinische Relevanz für das NZK vollständig geklärt ist.

### **1.1.1 Das klarzellige Nierenzellkarzinom**

Das klarzellige NZK stellt mit einem Anteil von etwa 76% den häufigsten NZK-Subtyp. Histogenetisch entstammt es dem proximalen Tubulusepithel. Mikroskopisch imponiert es durch ein optisch „leeres“, transparentes Zytoplasma in Folge stark gesteigerten Glykogengehaltes; die „eosinophilen“ Varianten kommen durch einen vermehrten Gehalt an Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum zustande. Das Wachstumsmuster ist in den meisten Fällen kompakt, selten kommen tubulopapilläre oder zystische Formen vor [15, 23, 104, 123, 133, 126, 127]. Zytogenetisch zeichnen sich die klarzelligen NZK, sowohl in ihrer sporadischen als auch in der familiären, im Rahmen des von Hippel-Lindau-Syndroms auftretenden Form, durch Alterationen des kurzen Arms des Chromosoms 3 aus. In dieser Region liegt das VHL-Tumorsuppressorgen, dessen Mutationen in der Entstehung und Progression des klarzelligen NZK offensichtlich eine entscheidende Rolle spielen [15, 23, 29, 58, 69, 104, 127].

Obwohl das klarzellige die häufigste Entität unter den NZK darstellt und sich genetisch und prognostisch von den anderen Vertretern dieser Tumorgruppe unterscheidet, wurde es im Rahmen der zahlreichen in den letzten Jahren betriebenen Studien zur Auffindung neuer prognostischer Marker oftmals nicht gesondert betrachtet. Die Ergebnisse der stattgehabten Untersuchungen waren vielfach widersprüchlich, so dass Existenz und Identität zusätzlicher Prognosefaktoren für das klarzellige NZK teilweise noch in Frage stehen. Dieser Kenntnislücke wendet sich die vorliegende Arbeit zu.

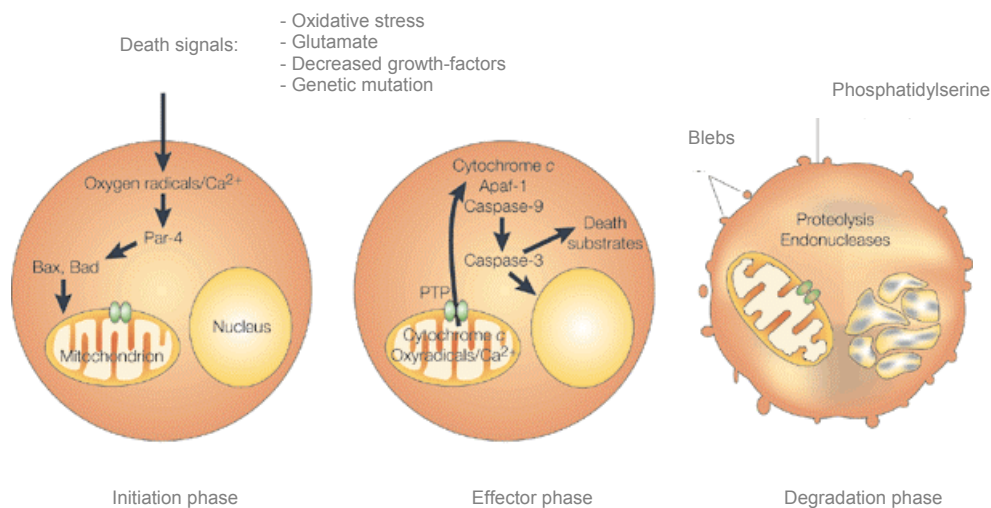
## **1.2 Die immunhistochemisch untersuchten Parameter**

### **1.2.1 Apoptose**

Die Apoptose stellt einen physiologischen Schutzprozess dar, vermittels dessen jede Zelle eine programmierte „Selbsttötung“ induzieren kann. Dieser Vorgang spielt sowohl bei der Ontogenese als auch bei der Aufrechterhaltung der genetischen Konstanz und Homöostase adulter Organismen eine tragende Rolle [2, 28, 77, 100, 137]. Sie kann durch verschiedene schädigende Einflüsse wie Sauerstoffradikale und Mutagene, ebenso aber durch Zell-Zell-Wechselwirkungen (z.B. bei der Lymphozytenreifung in Thymus und Knochenmark) ausgelöst werden. Störungen apoptotischer Prozesse sind in Entstehung und Fortschreiten verschiedenster Erkrankungen einschließlich Tumoren involviert [28, 44, 50, 59, 77, 85, 100, 137].

Die Apoptose ist ein aktiver, energieaufwendiger Prozess, der sich morphologisch in charakteristischer Weise von der Nekrose unterscheidet. Während nekrotische Zellen durch Schwellung von Zytoplasma und Organellen,

Lyse der Plasmamembran, Zufallsdegradation der DNA durch lysosomale DNAsen und letztendliche Entleerung des Zellinhaltes in die Umgebung mit konsekutiver Entzündung imponieren, kommt es im Rahmen der Apoptose zu einer Schrumpfung der betroffenen Zelle einschließlich einer Kernschrumpfung, Bläschenbildung entlang der zellulären Membranen, Chromatinkondensation an der Kernmembran, einem Anstieg der zytoplasmatischen Granularität sowie im weiteren Verlauf zur Ausbildung charakteristischer DNA-Fragmentmuster durch kontrollierte intrinsische Spaltung der genomischen DNA (Abb. 1).



**Abb. 1:** Der apoptotische Zelltod. Nach: Mattson MP: Apoptosis in neurodegenerative disorders. Nat Rev Mol Cell Biol 1 (2000) 120-129 (Graphik verfügbar unter [www.nature.com](http://www.nature.com))

Durch Abschnürungsprozesse entstehen sogenannte „apoptotic bodies“, die von einer intakten Zellmembran eingeschlossen sind und phagozytiert werden. Dementsprechend bleibt eine Entleerung des Zellinhaltes ins Interstitium und die daran gekoppelte inflammatorische Reaktion weitgehend aus. Darüber hinaus finden sich apoptotische im Gegensatz zu nekrotischen Zellen überwiegend disseminiert im Gewebe und selten in Clustern [2, 3, 44, 50, 77, 112, 135, 137].

Die am Vorgang der Apoptose beteiligten Gene blieben im Laufe der Evolution in hohem Maße erhalten [2, 77, 137, 141] und kodieren für ein komplexes Netzwerk miteinander fein abgestimmter Signalkaskaden.

Abgesehen von apoptotischen Prozessen, die während der Ontogenese im Sinne eines „programmierten Zelltodes“ auftreten und an der dreidimensionalen Ausformung von Organen bzw. Geweben beteiligt sind, dient die Apoptose beim ausdifferenzierten Organismus dazu, die Homöostase aufrechtzuerhalten, und kann vereinfachend als Gegenspieler der Mitose betrachtet werden [2, 3, 28, 44, 137, 141].

Eine zentrale Rolle bei Induktion und Ablauf der Apoptose spielt die Familie der Caspasen, Cysteinproteasen, die ihre Substrate an Aspartatresten spalten. Derzeit sind 12 humane Caspasen bekannt. In nicht-apoptotischen Zellen liegen sie in ihrer inaktiven Proenzym-Form vor; nach Spaltung in die aktive Form wird eine proteolytische Kaskade in Gang gesetzt, die den apoptotischen Zelltod herbeiführt [29, 77, 85, 112]. Im wesentlichen geht man heute von zwei Signalwegen aus, die zur Auslösung von Apoptose führen: Zum einen existiert der über „Death

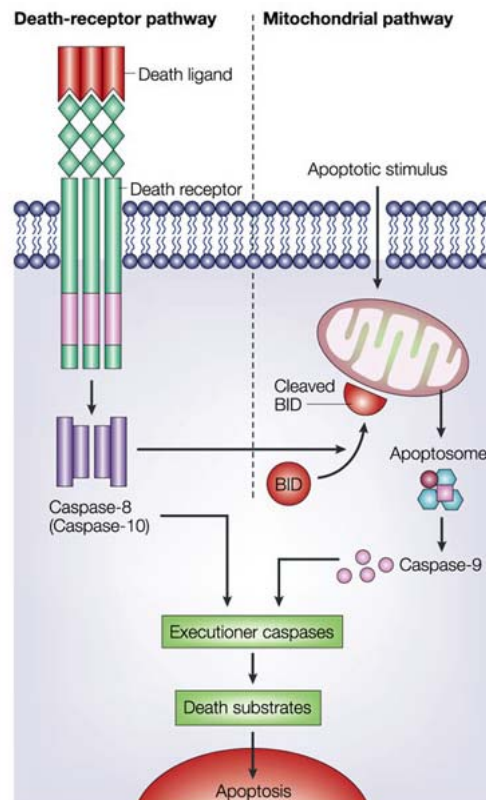
Receptors“ wie Fas und TNF-R1 vermittelte „extrinsische“ Apoptose-induktionsweg, zum anderen die mitochondriale, „intrinsische“ Aktivierung. Beide führen letztendlich zur Aktivierung von Caspasen [77, 85] (Abb. 2).

An der komplexen Regulation der Apoptose sind etliche weitere Proteine, wie die Mitglieder der Bcl-2-Superfamilie, IAPs, der Transkriptionsfaktor Myc, p53 und einige Proteinkinasen, beteiligt, die über ihre pro- bzw. antiapoptotische Potenz in die Entscheidung über Leben oder Tod der Zelle eingreifen [2, 44, 77, 85, 100, 101, 135, 141] (Abb. 3).

Der Bedeutung apoptotischer Prozesse im Rahmen der Entstehung und Progression wie auch der Therapie von Tumoren wurde in den letzten Jahren enormes Interesse zuteil. Nachdem über Jahrzehnte der proliferativen Aktivität eines Tumors als vermutetem Hauptfaktor seines Wachstums die nahezu

uneingeschränkte investigative Aufmerksamkeit gegolten hatte, rückte in den letzten beiden Jahrzehnten die Apoptose als weiterer wachstumsregulierender Faktor in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses [76, 135]. Die Vermutung, das ungebremste Wachstum von Tumorzellen könne durch einen Verlust ihrer Fähigkeit, den apoptotischen Selbsterstörungsmechanismus in Gang zu setzen, mitverursacht sein, führte zu zahlreichen Untersuchungen zur Apoptosehäufigkeit bei verschiedensten Malignomen, wobei diesbezügliche Studien am NZK allerdings im Allgemeinen ohne Berücksichtigung der histologischen Subtypisierung erfolgten. Während hierbei *Hindermann et al.* bei 66 NZK einen zum Proliferationsindex gegenläufigen Apoptoseindex definierten, der in G1-Tumoren statistisch signifikant höher lag als in G2- und G3-NZK [52] und die o.g. Vermutung zu bestätigen schien, wurden in zahlreichen weiteren Studien dazu entgegengesetzte Resultate erzielt: Die Apoptoserate wies eine signifikante positive Korrelation mit dem histologischen Grading auf [64, 131, 134, 151, 152]. *Todd et al.* [134] erarbeiteten im Gegensatz zu den übrigen genannten Studien auch eine signifikante positive Korrelation zwischen Apoptoseindex und Tumorstadium bzw. Primärtumorgroße.

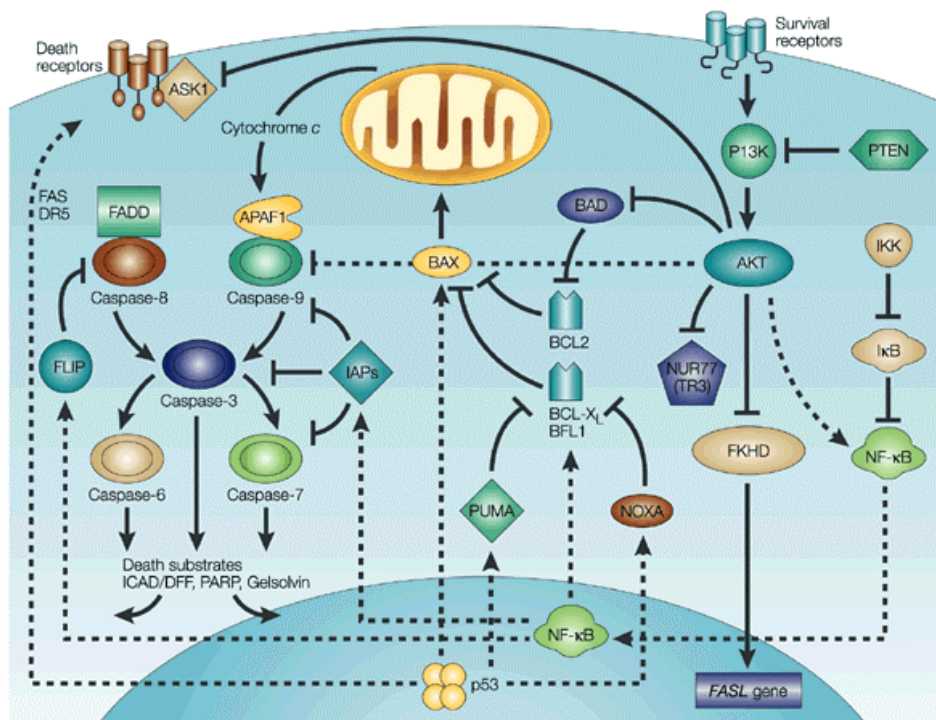
Die prognostische Wertigkeit der Apoptosehäufigkeit beim NZK ist noch ungeklärt. *Tannapfel et al.* [131] beobachteten in der univariaten Analyse eine signifikante Korrelation zwischen einem erhöhten Apoptoseindex und schlechterer Prognose, in der multivariaten Analyse stellte sich die Apoptosehäufigkeit jedoch nicht als



**Abb. 2:** Die zwei Hauptwege der Caspasen-Aktivierung. Aus: Igney FH, Kramer PH: Death and anti-death: Tumor resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 277-288 (Graphik verfügbar unter [www.nature.com](http://www.nature.com))

unabhängiger prognostischer Faktor dar. Andere Autoren fanden eine dem entgegengesetzte [149] oder keine [52] prognostische Wertigkeit der apoptotischen Aktivität beim NZK.

Darüber hinaus löste die Erkenntnis, dass die Effekte von Strahlen- und Chemotherapien – neben einer primären Nekroseinduktion – hauptsächlich durch Induktion von Apoptose vermittelt werden, und dass ein Nichtansprechen auf derartige Therapien auf einer tumorspezifischen Apoptoseresistenz beruhen kann, intensive Bemühungen um die Erforschung der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen und deren potentieller Beeinflussbarkeit aus [59, 85, 4, 145, 114, 137, 76, 135].



**Abb. 3:** Molekulare Interaktionen im Rahmen der „Death receptor“-vermittelten Apoptose. Aus: Reed JC: Apoptosis-based therapies. Nat Rev Drug Discov 1 (2002) 111-121 (Graphik verfügbar unter [www.nature.com](http://www.nature.com))

### 1.2.2 Ki-67

Als Proliferationsmarker erlaubt das Ki-67-Antigen eine Beurteilung der Wachstumsaktivität des untersuchten Gewebes. Das nukleäre Protein wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, M) exprimiert, wobei die Expression mit fortschreitendem Zellzyklus ansteigt und seinen Höhepunkt in der G2/M-Phase erreicht, so dass zu diesem Zeitpunkt bei der immunhistochemischen Darstellung die stärkste Färbintensität erzielt wird. In ruhenden Zellen (G0) hingegen fehlt das Ki-67-Antigen [15, 24, 52].

In zahlreichen Studien zum NZK konnte mittels des gegen das Ki-67-Antigen gerichteten monoklonalen Antikörpers MIB-1 eine positive Korrelation zwischen höherem histologischem Grading und höherer Ki-67-

Expression belegt werden [1, 52, 110, 130, 131, 134] – eine Beobachtung, die insofern den Erwartungen entspricht, als dass entdifferenzierte Tumoren sich durch ein enorm gesteigertes Wachstum auszeichnen. Darüber hinaus wurde von einigen Autoren über eine signifikante positive Korrelation zwischen Tumorstadium und Ki-67-Expression berichtet [131, 134].

Die prognostische Wertigkeit der Ki-67-Expression beim NZK wurde teilweise widersprüchlich beurteilt. Während beispielsweise *Gelb et al.* [36] wie auch *Papadopoulos et al.* [95] keine prognostische Aussagekraft der Ki-67-Expression nachweisen konnten, wiesen *Rioux-Leclercq et al.* [110] sowie *Tannapfel et al.* [131] sie als zusätzlichen unabhängigen Prognosefaktor aus.

### 1.2.3 Bcl-2

Das antiapoptotisch wirkende Bcl-2-Protoonkogen kodiert ein 26 kD-Protein und wurde erstmals im Zusammenhang mit der für das folliculäre Keimzentrumslymphom charakteristischen t(14;18)-Translokation beschrieben [18, 44, 76, 82, 108, 123, 137]. Unter experimentellen Bedingungen konnte nachgewiesen werden, dass Bcl-2 die Lebensdauer von B-Lymphozyten verlängert, ohne eine vermehrte Zellproliferation auszulösen. Eine derart verlängerte zelluläre Lebensspanne birgt die Gefahr des Erwerbs weiterer genetischer Alterationen und besitzt damit ein karzinogenes Potential [18, 65, 76, 82, 137]. Auch in therapeutischer Hinsicht ist das Bcl-2-Protein von Bedeutung, da es bei Überexpression z.B. die durch Chemotherapeutika oder Bestrahlung induzierte Apoptose blockieren und den entsprechenden Tumor damit therapierefraktär machen kann [108, 135].

Bcl-2 ist der erste entdeckte Vertreter einer Familie homologer Proteine, die in zum Teil konträrer Weise an der Apoptoseregulation beteiligt sind. Während z.B. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w, A1/Bfl-1 und Mcl-1 inhibitorisch auf apoptotische Prozesse wirken, funktionieren unter anderem Bax, Bik, Bak, Bad, Bid und Bcl-X<sub>S</sub> als Apoptosepromotoren. Die Mitglieder der humanen Bcl-2-Familie können untereinander homo- oder heterodimerisieren und auf diese Weise ihre Funktionen gegenseitig verstärken bzw. antagonisieren [44, 76, 77, 108].

Als integrales Membranprotein, das in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien sowie des Kerns lokalisiert ist, blockiert Bcl-2 auf noch nicht vollständig aufgeklärte Weise den apoptotischen Zelltod [53]. Verschiedene Mechanismen der Apoptoseprävention durch Bcl-2 wurden diskutiert. Mitglieder der Bcl-2-Familie zeigen strukturelle Ähnlichkeiten mit den porenbildenden Domänen bestimmter bakterieller Toxine [108]; in diesem Sinne vermuteten *Schendel et al.* die Bildung kationenselektiver Transmembrankanäle durch Di- bzw. Oligomerisierung von Bcl-2-Proteinmolekülen [117; auch: 44, 108]. Entsprechend fanden *Shimizu et al.* [123; auch: 44] Hinweise auf eine durch Bcl-2 herbeigeführte Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials mittels eines verstärkten Protoneneffluxes in Gegenwart von Stimuli, die normalerweise zu einem Verlust des Membranpotentials führen. Außerdem scheint Bcl-2 den Efflux freier Kalziumionen, die ihrerseits in die Signaltransduktion apoptotischer Prozesse eingreifen, aus dem endoplasmatischen Retikulum zu regulieren [33; 66], und die apoptoseinduzierende Freisetzung von Cytochrom c und AIF aus den Mitochondrien zu blockieren [44, 77, 108].

Das Bcl-2-Protein ist normalerweise in verschiedenen Organen des Körpers nachweisbar; wobei es sowohl in bradytopen Geweben (z.B. Neuronen) als auch in Geweben mit hohem, durch apoptotische Prozesse mit reguliertem Zellumsatz (z.B. Darmschleimhaut) vertreten ist [18].

Im Rahmen einiger immunhistochemischer Studien wurde über eine starke Bcl-2-Expression bei klarzelligem NZK berichtet [18, 56, 140]; proximale Tubulusepithelien, die heute als Ursprung des klarzelligem NZK angesehen werden, wiesen bei *Huang et al.* [56] keine oder nur geringe Anfärbung für Bcl-2 auf. *Vasavada et al.* [140] wiesen auf eine positive Korrelation zwischen Bcl-2-Expression und höherem histologischem Grading hin. Der verlockenden Folgerung, die apoptoseinhibierende Wirkung von Bcl-2 trage durch eine Verschiebung des Proliferations-Apoptose-Gleichgewichts in Richtung des Zellwachstums zur Tumorprogression bei und repräsentiere somit einen entscheidenden Beitrag zur Aggressivität klarzelliger NZK, wurde jedoch im Rahmen anderer Studien widersprochen. *Pepe et al.* [99] postulierten eine abnehmende Bcl-2-Expression im Rahmen der Tumorprogression vom euploiden, langsam wachsenden NZK hin zu aggressiveren Phänotypen; allerdings hatten NZK verschiedener histologischer Typen Eingang in diese Studie gefunden. *Sejima* und *Miyagawa* [122] fanden, ebenfalls für eine histologisch heterogene Gruppe von NZK, keinen Zusammenhang zwischen Bcl-2-Expression und pathologischen Parametern bzw. der Prognose.

Für andere Malignome fanden sich Hinweise auf eine Assoziation zwischen Bcl-2-Expression und prognostisch günstigen Parametern wie niedrigem T-Stadium und besserer histologischer Differenzierung bzw. niedrigerer Proliferationsrate [82, 128].

#### 1.2.4 p53

Das p53 - Tumorsuppressorgen ist ein auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiertes 20 kB - Gen, das für ein nukleäres 53 kD-Phosphoprotein kodiert, welches die Transkription einer Vielzahl von Genen zu regulieren vermag. Auf diese Weise inhibiert das p53-Protein das Wachstum genetisch alterierter und somit potentiell neoplastischer Zellen, indem es entweder eine Arretierung des Zellzyklus (v.a. in der G1-Phase durch transkriptionelle Aktivierung von p21, einem Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen [8, 124, 142]) zur Reparatur der geschädigten DNA herbeiführt, oder, bei irreparablen genetischen Schädigungen, die Elimination der Zelle via Apoptose induzieren kann [32, 76, 124, 137, 142]. In letzterem Zusammenhang ist auch seine Fähigkeit, die Transkription des Apoptoseinhibitors Bcl-2 herabzuregulieren, von entscheidender Bedeutung [82, 99, 76, 124]. Eine p53-vermittelte Apoptoseinduktion kann aber auch als Antwort auf eine hypoxische Zellschädigung eintreten [135]

wt p53 verhindert das Durchlaufen des Zellzyklus durch Aktivierung der cyclinabhängigen Kinase p21 und beeinflusst eventuell auch den Eintritt in den Zellzyklus aus der G0-Phase [8]; darüber hinaus ist es direkt an der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität beteiligt, indem es an der Reparatur geschädigter DNA-Sequenzen beteiligte Gene induziert. Außerdem inhibiert p53, ebenfalls vermittels Geninduktion, die Neoangiogenese [39, 124, 125, 142].

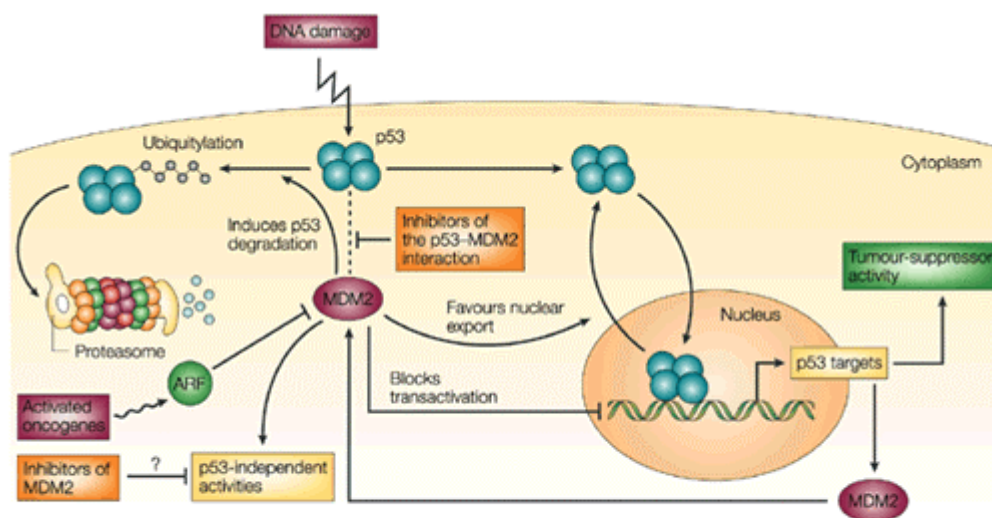
Angesichts einer derart essentiellen Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase ist es nicht

verwunderlich, dass bei einer Vielzahl humaner Neoplasmen eine p53-Inaktivierung nachweisbar ist [32, 67, 124, 142], die entweder direkt durch Genmutationen oder aber indirekt durch Bindung an virale Proteine oder Alterationen interagierender Gene (z.B. verstärkte Expression von mdm-2) verursacht ist [67, 124, 142].

p53 stellt einen Knotenpunkt in einem komplexen Netzwerk interagierender Enzyme dar, das im zellulären „Normalzustand“ inaktiv ist. Dabei wird die Menge vorhandenen p53-Proteins weniger durch das Ausmaß seiner Synthese, als durch die Geschwindigkeit seines Abbaus und durch Azetylierung bzw. Phosphorylierung im C-terminalen Bereich reguliert [75, 142].

Eine wichtige Rolle bei der Steuerung der nukleären p53-Konzentration spielt das mdm-2-Protein, dessen Expression im Rahmen einer autoregulatorischen Feedback-Schleife durch das p53-Protein stimuliert wird und das die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von p53 bewirkt [48, 67, 125, 142] (Abb. 4).

Durch drei heute bekannte Auslöser wird die Degradation des p53-Proteins gehemmt: 1.) DNA-Doppelstrangbrüche wirken über die Induktion der Proteinkinasen ATM und Chk2, 2.) aberrierende Wachstumssignale (z.B. durch Onkogene wie ras oder myc) vermitteln die p53-Aktivierung über p14<sup>ARF</sup>, und 3.) eine große Anzahl von Chemotherapeutika, UV-Strahlung, und Proteinkinase-Inhibitoren, deren Wirkungsweise offenbar weitere Kinasen involviert [32, 142] (Abb. 4).



**Abb. 4:** p53-Funktionsschema. Aus: Chene P: Inhibiting the p53-mdm2 interaction: An important target for cancer therapy. Nat Rev Cancer 3 (2003) 102-109 (Graphik verfügbar unter [www.nature.com](http://www.nature.com))

Das wt p53-Protein hat eine Halbwertszeit von weniger als 30 min und ist nur in sehr geringen Mengen im Normalgewebe vorhanden, wodurch eine IHC-basierte Detektion verhindert wird. Durch p53-Alterationen (z.B. Genmutationen, Bindung an virale oder zelluläre Proteine), wird es stabilisiert und akkumuliert; durch diese verlängerte Halbwertszeit kommt es zu einer immunhistochemisch nachweisbaren „Überexpression“ von p53 [8,124].

Während für eine Vielzahl solider Neoplasmen, wie beispielsweise Lungen-Adenokarzinome [60] oder



Blasenkarzinome [125], die Häufigkeit von p53-Mutationen wohlbekannt ist, gibt es für das NZK in dieser Hinsicht zum Teil widersprüchliche Aussagen. Viele Autoren untersuchten die Häufigkeit immunhistochemisch nachweisbarer p53-Überexpression bei den verschiedenen NZK-Subtypen. Abgesehen von der Tatsache, dass sie zu ausgesprochen divergenten Ergebnissen gelangten, ist der Rückschluss von der p53-Expression auf den genetischen Status einer Zelle nicht uneingeschränkt möglich, da, wie oben erwähnt, auch andere Ereignisse als p53-Mutationen zur Stabilisierung seines Genproduktes führen können.

Die Angaben über die Häufigkeit einer p53-Überexpression bei klarzelligem NZK sind bisher widersprüchlich [47, 48, 140]. Einige Autoren beschreiben eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einer p53-Überexpression und stärkerer histologischer Entdifferenzierung [47, 48] und z.T. mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium [68, 139]; ein statistisch unabhängiger Einfluss auf die Prognose ließ sich jedoch selten nachweisen [139].

### 1.2.5 pVHL

Das VHL-Tumorsuppressorgen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 [23, 29, 58, 69, 104, 127] und kodiert nach heutigem Kenntnisstand zwei Proteine: zum einen das „klassische“ wt pVHL (213 Aminosäuren) von ~ 24 kDa, sowie ein später entdecktes kleineres Genprodukt von 18 kDa (pVHL18), welches offenbar durch alternative Translationsinitiation an einem 2. AUG-Codon (Codon 45) entsteht. Beide Genprodukte scheinen gleiche Funktionen auszuüben [10, 23, 118].

pVHL ist ein zytosolisch lokalisiertes Protein und findet sich natürlicherweise in fast allen humanen Geweben, wobei seine Expression in epithelialen Zellen am stärksten ist [22, 23, 69]. Bei der Entstehung klarzelliger NZK spielen Alterationen des VHL-Gens eine wichtige Rolle. So ist das VHL-Gen bei Patienten mit von Hippel-Lindau- (VHL-) Syndrom durch eine Keimzellmutation inaktiviert; hierbei handelt es sich um eine zu den Phakomatosen zählende autosomal-dominant erbliche Erkrankung, die durch eine Prädisposition zur Entwicklung hochvaskularisierter Tumoren wie klarzelligem NZK, Hämangioblastomen und Phäochromozytomen sowie pankreatischer Zysten charakterisiert ist [19, 29, 23, 58, 144]. Etwa 45% aller VHL-Patienten erkranken im Laufe ihres Lebens an einem NZK [144]. Auch beim sporadischen klarzelligem NZK ist das VHL-Gen in 60 – 80 % der Fälle durch somatische Mutationen inaktiviert [23], wobei *Moch et al.* [84] darauf hinwies, dass innerhalb eines NZK unterschiedliche Zellpopulationen mit und ohne VHL-Alterationen auftreten können.

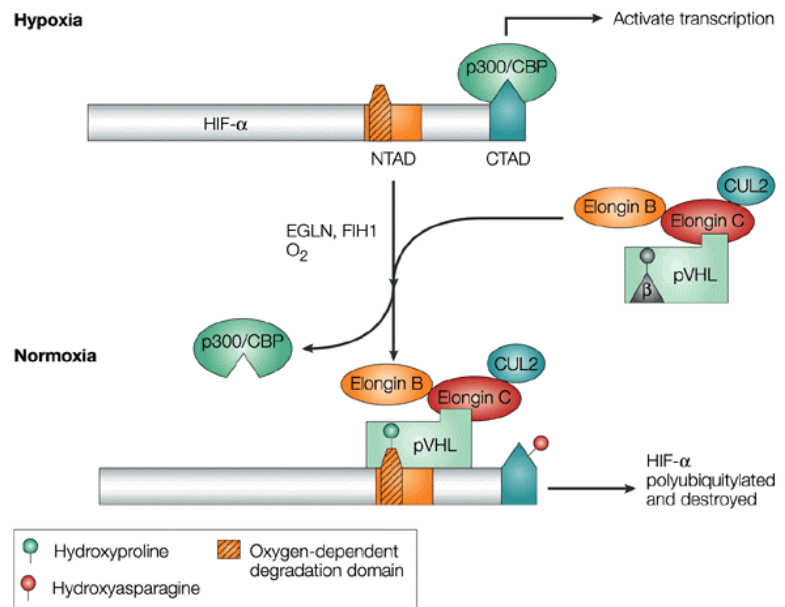
Die offenbar vielfältigen Funktionen des VHL-Proteins sind auch heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass pVHL einen Komplex mit den Elonginen B und C, den regulatorischen Untereinheiten des Transkriptions - Elongationsfaktors Elongin, bildet und so die Funktion des Elongins inhibiert. Außerdem entsteht durch Bindung von Cul2 und Rbx1 an den pVHL / Elongin B / Elongin C-Komplex der sogenannte VCBCR-Komplex, der strukturelle Ähnlichkeiten mit E3-Ubiquitinligase-Komplexen aufweist [21, 23, 29, 62, 119]. Dieser greift offenbar durch Degradation der Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$  des hypoxieinduzierbaren Faktors 1 (HIF-1) in die Regulation hypoxieinduzierbarer Gene, die an der Angiogenese beteiligt sind, ein (Abb. 5). So ist bei VHL - Patienten eine Erhöhung der hypoxieinduzierbaren mRNAs von VEGF und GLUT-1 nachweisbar [9,

21, 23, 78, 138, 146]; Gunningham *et al.* [46] zeigten eine Deregulation von VEGF-A und VEGF-C in NZK-Zellen mit mutiertem VHL-Gen auf.

Die tragende Rolle des VHL-Gens bei der Regulation der Angiogenese kann den hochvaskularisierten Phänotyp des klarzelligen NZK wie auch der weiteren für das von Hippel-Lindau - Syndrom typischen Tumoren erklären. Da Angiogenese als solche allerdings weniger für die Entstehung als für das Wachstum von Tumoren von Bedeutung ist, und zu den

charakteristischen Manifestationen des VHL-Syndroms neben hochvaskularisierten Tumoren auch schlecht vaskularisierte Zysten z.B. des Pankreas gehören, liegt die Vermutung nahe, dass das VHL-Gen direkt an der Wachstumskontrolle epithelialer Zellen beteiligt ist, die nach neueren Erkenntnissen offenbar über eine Regulation der TGF- $\alpha$ , p21- und p27-Expression [17, 97] mindestens mitgesteuert wird. *Baba et al.* [7] fanden Hinweise auf eine Beteiligung von pVHL am Phänomen der Kontaktinhibition des Zellwachstums; *Kamada et al.* [61] zeigten seine Rolle als Inhibitor der Zellmotilität durch Stabilisierung von Proteinen des Zytoskeletts auf. Außerdem scheint das VHL-Gen auch über eine Regulation der Plasmin-vermittelten Proteolyse der Extrazellulärmatrix [70] sowie des zellulären Mikromilieus [146] in den renalen Angiogenese- und Wachstumsprozess einzugreifen. Darüber hinaus übt pVHL offenbar einen Bcl-2-vermittelten apoptoseinhibitorischen Effekt als Antwort auf bestimmte proapoptotische Stimuli (UV-Exposition, Hypoxie) aus [27, 120], der bei VHL-negativen Zellen möglicherweise in einem Selektionsdruck zu Gunsten apoptoseresistenter und somit potentiell neoplastischer Zellen resultieren könnte [27].

Trotz der bekannten Häufigkeit von VHL-Alterationen beim klarzelligen NZK liegen bislang nur wenige und z.T. widersprüchliche Publikationen zu deren prognostischer Bedeutung vor [121, 147]. Zudem existieren meines Wissens keine Untersuchungen bezüglich der Bedeutung der immunhistochemisch nachweisbaren VHL-Expression bei diesen Tumoren, so dass die vorliegende Untersuchung sich u. a. dieser Frage widmet.



**Abb. 5:** Regulation von HIF- $\alpha$  durch pVHL. Aus: Kaelin Jr WG: Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 673-682 [Graphik verfügbar unter [www.nature.com](http://www.nature.com)]

### 1.3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, Auftreten und Bedeutung immunhistochemisch darstellbarer Apoptose- und Proliferationsmarker beim klarzelligen NZK zu evaluieren.

Hierzu wurden die Apoptosehäufigkeit, die Expression des Apoptoseinhibitors Bcl-2, das Proliferationsverhalten an Hand des Ki-67-Antigens, sowie die Expression der in die Regulation beider Prozesse involvierten Tumorsuppressor-Genprodukte pVHL und p53 an Gewebeproben 23 formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter klarzelliger NZK immunhistochemisch bestimmt.

Über die Bestimmung der Expressionsausmaßes der untersuchten Faktoren hinaus waren ihre Korrelationen untereinander und ihr Zusammenhang mit klassischen klinisch-pathologischen Parametern Gegenstand der Untersuchung.

Außerdem wurde der Versuch unternommen, die prognostische Relevanz der definierten Marker für das klarzellige NZK zu evaluieren, und ihre mögliche Bedeutung im Rahmen der Entwicklung neuer adjuvanter Therapiekonzepte diskutiert.

## 2 Material und Methoden

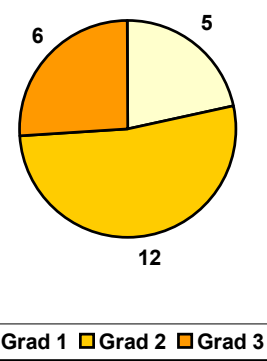
### 2.1 Untersuchungsgut

Bei den untersuchten Präparaten handelte es sich um formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe klarzelliger NZK von 23 in den Jahren 1995 und 1996 in der Urologischen Klinik der Martin-Luther-Universität Halle nephrektomierten Patienten. Für jeden Fall wurde an Hand der Originalhistologien ein repräsentativer paraffineingebetteter Tumorblock zur Untersuchung ausgewählt. Eine ausführliche Fallübersicht findet sich in den Tabellen 49 und 50 des Anhangs.

#### 2.1.1 Nukleäres Grading

Das nukleäre Grading der untersuchten NZK wurde den originalen Histologiebefunden des Institutes für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle entnommen. Bei Auftreten verschiedener Tumorgrade (Fälle 2, 6, 9, 14, 18), wurde stets der höchste Grading-Wert als maßgebend definiert. Im Fall 15, bei dem das Grading im Histologieschein nicht angegeben war, wurde die Zuordnung nachträglich eigens vorgenommen.

Insgesamt handelte es sich um 5 G1-Tumoren, 12 G2- Tumoren und 6 G3-Tumoren.

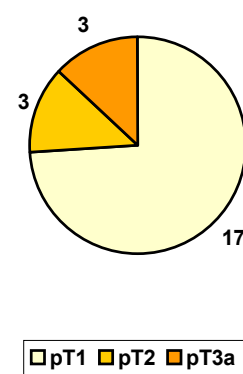


**Abb. 6:** Verteilung des histologischen Gradings der 23 untersuchten NZK

#### 2.1.2 pT-Stadium

Das pT-Stadium der untersuchten NZK wurde an Hand der Histologiescheine ermittelt und gemäß 1997'er TNM-Version der UICC neu klassifiziert.

Die Primärtumorgrößen wiesen eine Verteilung im Sinne von 17 pT1-Tumoren, 3 pT2-Tumoren und 3 pT3a-Tumoren auf.



**Abb. 7:** Verteilung des pT-Stadiums der 23 untersuchten NZK

### 2.1.3 pN-Stadium

Für 16 Fälle war die genaue Anzahl der untersuchten Lymphknoten dokumentiert, wobei in 3 Fällen keine Lymphknoten im resezierten Gewebe nachweisbar waren. In den übrigen 13 Fällen waren im Durchschnitt pro Fall 4 (1-11) tumorfreie Lymphknoten untersucht worden. Laut histopathologischer Befundung wurden alle 23 untersuchten NZK als N0-Tumoren eingestuft.

### 2.1.4 M-Stadium

Bei 19 Fällen handelte es sich um M0-Tumoren, 3 Fälle wurden klinisch mit MX bezeichnet; zwei der letzteren waren perioperativ verstorben. Bei einem Patienten lagen zum OP-Zeitpunkt bereits Fernmetastasen (ossär, pulmonal und mediastinal) vor (M1).

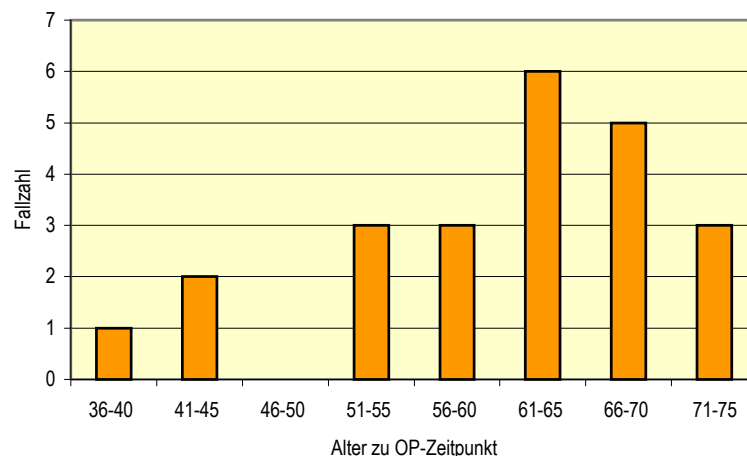
### 2.1.5 Histologie

Alle untersuchten Fälle waren histologisch NZK vom klarzelligen Typ; zwei Tumoren wiesen zusätzlich chromophile (Fälle 15 und 21) und einer onkozytäre (Fall 19) Gewebeanteile auf. In den Fällen 5, 9, 15, 16 und 20 handelte es sich um zum Teil in ihrer eosinophilen Variante ausgeprägte klarzellige NZK.

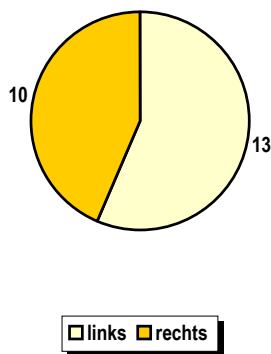
## 2.2 Klinische Daten der Patienten

### 2.2.1 Verteilung von Geschlecht, Operationsalter und Tumorlokalisierung

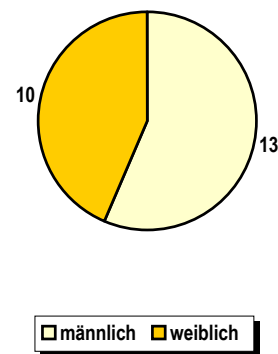
Das Geschlechtsverhältnis (männlich : weiblich) betrug 1,3 : 1; das durchschnittliche Operationsalter betrug 61 Jahre (38 - 73 Jahre). 13 der untersuchten NZK waren in der linken Niere lokalisiert, 10 in der rechten.



**Abb. 8:** Altersverteilung der 23 untersuchten Fälle zum Operationszeitpunkt



**Abb. 9:** Verteilung der Tumorkalisation der 23 untersuchten NZK – betroffene Niere



**Abb. 10:** Geschlechtsverhältnis der 23 untersuchten NZK-Patienten

### 2.2.2 Medikamentöse Therapie

Keiner der Patienten erhielt eine präoperative Therapie. Postoperativ wurde bei fünf Patienten unter Studienbedingungen eine Verabreichung des Bisphosphonates Clodronat zur Prävention von Skelettmetastasen begonnen. Nachweislich wurde in einem Fall die Einnahme des Medikamentes nach kurzer Zeit durch den Patienten selbst abgebrochen. Drei Patienten erhielten nach der Tumornephrektomie adjuvant eine autologe Tumorstabilisierung; diese hatte in der Kaplan-Meier-Analyse keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überlebensintervall (im Log Rank-Test  $p = 0,5386$ ).

### 2.2.3 Klinische Nachbeobachtung

Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 40,1 Monate (Median: 48,2 Monate) bei einer Spannweite von 65,9 Monaten (Minimum: 0 Monate; Maximum: 65,9 Monate).

Drei der Patienten verstarben perioperativ (Fall 7 am 1. postoperativen Tag, Fall 11 am 21. postoperativen Tag, Fall 23 am 7. postoperativen Tag) an nicht beherrschbaren Komplikationen; der Patient mit primär metastasiertem NZK verstarb 3,2 Monate nach der Operation an seinem Tumorleiden.

Bei den übrigen 19 Patienten trat in vier Fällen im weiteren Verlauf eine Tumorprogression auf:

- Fall Nr. 14: Metastase der kontralateralen Niere (Dg.: 41,7 Mon. postop.) Befundregredienz nach zwei Zyklen Immunchemotherapie mit  $IF\alpha 2a$ , IL-2, 5-FU.
- Fall Nr. 16: Ossäre Metastasierung (Dg.: 4,3 Mon. postop.). Tod 15 Mon. postoperativ.
- Fall Nr. 20: Lokalrezidiv (Dg.: 13 Mon. postoperativ). En-bloc-Resektion des Lokalrezidivs. Im weiteren Verlauf erneutes Lokalrezidiv (Therapie: Resektion, adjuvante Hochvolttherapie), ossäre Metastasierung (Therapie: operative Stabilisierung), Infiltration des *M. psoas*.
- Fall Nr. 22: Pulmonale Metastase (Dg.: 17,4 Mon. postop.). Metastasenresektion. Im weiteren Verlauf

erneute pulmonale Metastasierung (Therapie: Resektion, Immunchemotherapie mit IF $\alpha$ 2a, IL-2, 5-FU, Roaccutan), Progredienz der pulmonalen Metastasierung, Nebennierenmetastasen beidseits, ossäre Metastasen (Therapie: palliative Radiatio, Aredia®-Infusionen).

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Anfertigung von ultradünnen Paraffin-Gewebeschnitten

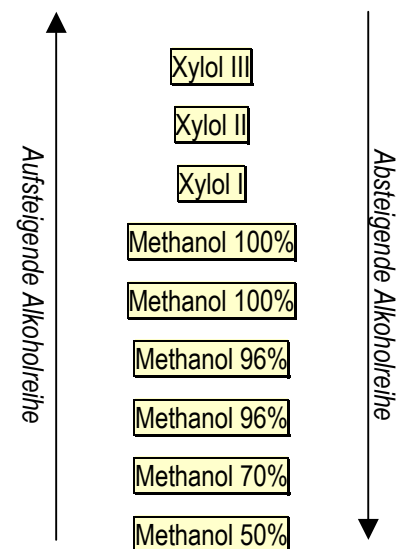
Für alle immunhistochemischen Verfahren wurden von den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken am Mikrotom 2  $\mu$ m dünne Schnitte angefertigt, auf zuvor mit 0,1-prozentiger Poly-L-Lysin-Lösung beschichteten Objektträger aufgebracht und bei 60°C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

### 2.3.2 Immunhistochemische Verfahren

Die Schnittpräparate wurden gemäß dem nebenstehenden Schema in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert.

Die Antigene VHL, p53, Ki-76 und Bcl-2 wurden mittels der Avidin-Biotin-Komplex-(ABC-)Methode dargestellt; zum Apoptosenachweis diente die „terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling“- (TUNEL-) Methode. Beide Verfahren werden im Folgenden genau beschrieben.

In allen Markierungsserien liefen Negativkontrollen, bei denen die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper bzw. beim TUNEL-Verfahren der NTP-Markierungslösung unterblieb, sowie Positivkontrollen mit bekanntermaßen positiv anfärbenden Präparaten mit.



**Abb. 11:** Schema zur auf- bzw. absteigenden Alkoholreihe

### Markierung von p53, VHL, bcl-2 und Ki-67 mit der ABC-Methode

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte 30 min in eine Lösung aus 200 ml Methanol und 6 ml 30%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingestellt, mit Aqua dest. gespült und anschließend der Mikrowellenbehandlung zugeführt. Hierbei wurden die Präparate in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) eingestellt, 5 min bei 600 Watt erhitzt und anschließend mit Citratpuffer aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde beim Ki-67-, p53- und VHL-Nachweis 2 Mal, beim Bcl-2-Nachweis 4 Mal wiederholt.

Nach 20 min Abkühlzeit wurden die Schnitte mit Tris-Borat-Puffer (TBS) gespült und der Avidin-Biotin-Blockierung (Kit: Vector Laboratories, Burlingame, USA) unterzogen. Hierbei wurden die Schnitte zunächst 15 min mit 1 ml PBS + 4 Tropfen Avidin 15 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, anschließend mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (pH 7,4) gespült und weitere 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml PBS + 4 Tropfen Biotin inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS erfolgte die unspezifische Proteinblockierung mit 1 : 10 in PBS verdünntem Pferdeserum (Vector Laboratories) für 15 min bei RT.

Nach dieser Vorbehandlung wurden die Präparate mit den jeweiligen Primärantikörpern (Verdünnungen siehe untenstehende Tabelle) 1 h bei 37°C inkubiert. Die mit Anti-Bcl-2-Antikörper behandelten Schnitte wurden nach der einstündigen Inkubation über Nacht im Kühlschrank belassen, bevor sie der weiteren Behandlung zugeführt wurden.

**Tab. 4:** Übersicht über die untersuchten Antigene und die eingesetzten Antikörper

Antigen (Ag)	Ag-Lokalisation	Klon (Ak)	Ak-Klonalität	Bezugsquelle	Ak-Verdünnung	MW-Vorbehandlung
Ki-67	Zellkern	MIB-1	mAb	Dianova (Hamburg)	1 : 30	3 x 5 min
bcl-2	Membranen	124	mAb	DAKO (Glostrup, Dänemark)	1 : 50	5 x 5 min
p53	Zellkern	DO-7	mAb	DAKO (Glostrup, Dänemark)	1 : 200	3 x 5 min
VHL	Zytoplasma	Ig32	mAb	PharMingen Europe (Hamburg)	1 : 50	3 x 5 min

Die übrigen Schnittpräparate wurden nach der Inkubation mit dem Primärantikörper sofort mit PBS gespült und 30 min bei RT mit 1 : 100 verdünntem biotinyliertem Maus-Sekundärantikörper (Vector Laboratories) inkubiert, erneut mit PBS gespült und wiederum 30 min bei RT mit Elite-ABC (Vector Laboratories; Herstellung: 20 µl Lösung A + 20 µl Lösung B in 1,0 ml PBS) inkubiert.

Nach Spülung mit PBS erfolgte die Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Hierzu wurden 0,1 g DAB in 100 ml Tris-HCl gelöst, nach Filtration der Lösung wurden 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben und unmittelbar danach die Schnitte für 5 - 7 min. eingestellt. Nach der Färbezeit wurden die Präparate in Leitungswasser (LW) gespült und in Aqua dest. eingestellt.

Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte in 1 : 4 mit AquaDest verdünntes Hämalaun 5 - 10 sec eingestellt und anschließend in LW gebläut.

Abschließend wurden die Präparate mit Aqua dest. gespült, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

### Apoptosenachweis mittels TUNEL-Verfahren

Verwandt wurde der „In Situ Cell Death Detection Kit, POD“ (Boehringer Mannheim) zum Nachweis apoptoseinduzierter DNA-Strangbrüche mittels der TUNEL- Methode.



Die Schnittpräparate wurden zunächst wie bereits beschrieben entpraffiniert und in ihrer endogenen Peroxidase-Aktivität blockiert, anschließend mit Aqua dest. abgespült, in PBS-Puffer eingestellt und zur weiteren Behandlung in eine feuchte Kammer eingebracht.

Nach Andauung mit 20 µl/ml Proteinase K in Tris/HCl für 20 min bei RT und zweimaligem Spülen mit PBS erfolgte die Permeabilisation mittels 0,1% Triton x 100 + 0,1 % Natriumcitrat-Puffer in Aqua dest. (auf 1000 µl) 2 min lang bei 4°C und wiederum zweimaliges Spülen mit PBS.

Für die Markierungsreaktion wurden für jeweils zehn Objektträger 200 µl dNTP-Markierungslösung und 100 µl Proteinlösung mit 700 µl PBS verdünnt und auf die Präparate aufgebracht. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C folgte ein dreimaliger Waschschrift mit PBS, danach eine 30-minütige Inkubation bei 37°C mit der Converter-Peroxidase "Anti-FITC-POD" unverdünnt.

Nach neuerlichem zweimaligem Spülen mit POD wurden die Präparate wie bei der ABC-Methode beschrieben der DAB-Reaktion unterzogen, mit Hämalaun gegengefärbt und nach Dehydratation mit Entellan eingedeckt.

### 2.3.3 Mikroskopische Auswertung der Färbemuster

Zur Bestimmung des Anteils bcl-2-, Ki-67-, p53- und VHL-exprimierender Zellen sowie des Anteils mittels des TUNEL-Verfahrens markierter apoptotischer Zellen in den ausgewerteten Präparaten wurde ein Mikroskop des Typs Olympus BX 50 verwandt. Die Fotografien der immunhistochemisch markierten Schnitte wurden an einem Mikroskop vom Typ Zeiss Axiophot angefertigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle distinkten Färbemuster für die jeweilige Zielstruktur (Zytoplasma bei VHL- und bcl-2-Protein-Nachweis bzw. Zellkern bei p53-Protein- und Ki-67-Nachweis sowie TUNEL-Test) unabhängig von der Intensität der Färbung als positiv gewertet. Zur Auswertung kamen die Tumorareale mit der stärksten Anfärbung. Hierbei wurde in jeweils mindestens zehn Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung der Anteil positiv angefarbter Zellen geschätzt; dem aus diesen Werten ermittelte Medianwert wurde der entsprechende Wert des nebenstehenden 5-stufigen Anfärbungsscores zugeordnet. Die Zuordnung der Präparate zu dem jeweiligen Anfärbungsscore wurde unabhängig durch einen Pathologen überprüft; hierbei traten keine Diskrepanzen in der Bewertung auf.

**Tab. 5:** Schema zur semi-quantitativen Beurteilung der Anfärbungsdichte der immunhistochemisch untersuchten Präparate

Anteil positiv angefarbter Zellen	Anfärbungsscore (AS)
≤ 1 %	0
> 1 % - 5 %	1
> 5 % - 20 %	2
> 20 % - 50 %	3
> 50 %	4

### 2.3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SPSS 9.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Angestrebt war zum Einen eine Analyse der Korrelationen zwischen Expressionsausmaß der untersuchten Antigene bzw. des Apoptoseverhaltens untereinander sowie mit

histologischem Grading und T-Stadium; zum anderen sollte die prognostische Relevanz der analysierten Faktoren beim Nierenzellkarzinom im Vergleich mit den „klassischen“ Prognosefaktoren T-Stadium und Grading untersucht werden.

Auf Grund der geringen Fallzahl war eine Untersuchung der Assoziationen zwischen immunhistochemisch untersuchten sowie klinisch-pathologischen Parametern mittels des  $X^2$ -Tests jedoch nicht zulässig (erwartete Häufigkeiten in den Kreuztabellen-Zellen z.T.  $< 5$ ); und auch für die zur Ermittlung der prognostischen Relevanz angestrebten Überlebensberechnungen erschien es zweckmäßiger, zur Erlangung verwertbarer Ergebnisse ein im Vergleich zum ursprünglichen semiquantitativen, 5-stufigen Anfärbungsscore „vergrößertes“ Einteilungsschema zu schaffen. Zu diesem Zwecke wurde eine Dichotomisierung des Anfärbungsscores an Hand des Medianwertes durchgeführt. Das heißt, es wurde für die 23 untersuchten Fälle der jeweilige Medianwert der Anfärbungsscores für Apoptosehäufigkeit im TUNEL-Verfahren, Ki-67-, Bcl-2-, p53- und VHL-Antigen berechnet und als Schwellenwert für die Dichotomisierung herangezogen. Für jeden Marker wurden diejenigen NZK, deren Anfärbungsscore den markerspezifischen Schwellenwert überstiegen, als eine Gruppe mit einem  $AS(d)_x = 1$  zusammengefasst und der Gruppe der restlichen Fälle mit einem  $AS(d)_x = 0$  gegenübergestellt. Nach dem gleichen Prinzip wurden auch histologisches Grading und pT-Stadium dichotomisiert. Teilweise wurden zu Vergleichszwecken alternative Dichotomisierungs-Schwellenwerte für einige Marker herangezogen; die Ergebnisse dieser Berechnungen sind im Ergebnisteil nicht aufgeführt, sondern finden im Rahmen der Diskussion Erwähnung.

Zur Abschätzung des prognostischen Einflusses der immunhistochemisch untersuchten Parameter sowie der klinisch-pathologischen Faktoren pT-Stadium und histologisches Grading wurde eine Kaplan-Meier-Analyse des rezidivfreien Überlebensintervalls durchgeführt, also desjenigen Zeitraums zwischen in kurativer Absicht erfolgter Nephrektomie und dem Auftreten eines Krankheitsprogress im Sinne eines Lokalrezidivs oder einer Fernmetastasierung. Von der Kaplan-Meier-Analyse ausgeschlossen wurde ein primär metastasierter Fall (Fall Nr. 13) sowie 3 perioperativ verstorbene Patienten (Fälle Nr. 7, 11 und 13). Als Einflussfaktoren auf das rezidivfreie Überlebensintervall wurden, wie gesagt, die dichotomisierten immunhistochemischen und klinisch-pathologischen Parameter untersucht. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse erfolgte mittels des *Log Rank*-Tests. Da unter den 19 für die Kaplan-Meier-Analyse zugelassenen Fällen nur ein Patient in der Nachbeobachtungszeit an den Folgen des NZK verstorben war, war eine Kaplan-Meier-Analyse der Überlebenszeit nicht durchführbar.

Eine multivariate Analyse zur Determinierung der unabhängigen prognostischen Einflussgrößen mittels der Cox-Regressionsanalyse wurde versucht, war aber auf Grund der Datenverteilung nicht möglich.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Häufigkeitsverteilungen der Anfärbungsscores für apoptotische Zellen, Ki-67-, Bcl-2-, p53- und VHL-Antigen

##### 3.1.1 Apoptoseverhalten: Anfärbungsscores im TUNEL-Verfahren

13 von 23 Fällen (56,5%) wiesen einen  $AS_{TUNEL} = 0$  auf, 6 Fälle (26,1%) einen  $AS_{TUNEL} = 1$  und jeweils 2 Fälle (8,7%) einen  $AS_{TUNEL} = 2$  bzw. 3. In keinem der untersuchten NZK wurde ein Anfärbungsscore von 4 vorgefunden. Der mediane Anfärbungsscore lag bei 0 (Mittelwert: 0,7).

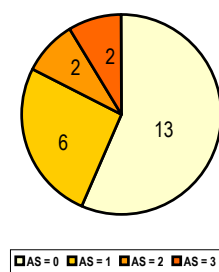


Abb. 12:  $AS_{TUNEL}$  der 23 untersuchten NZK

##### 3.1.2 Proliferationsverhalten: Anfärbungsscores im Ki-67-Nachweisverfahren mittels des mAb MIB-1

7 (30,4%) der untersuchten NZK boten einen  $AS_{Ki-67} = 0$ , jeweils 8 Tumoren (34,8%) wiesen einen  $AS_{Ki-67} = 1$  bzw. 2 auf. Kein Tumor zeigte einen Anfärbungsscore von 3 oder 4. Der mediane Anfärbungsscore belief sich auf 1,0 (Mittelwert: 1,04).

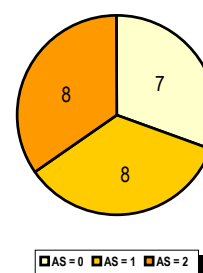


Abb. 13:  $AS_{Ki-67}$  der 23 untersuchten NZK

##### 3.1.3 Bcl-2-Antigen: Anfärbungsscores im Nachweisverfahren mittels des mAb 124

Die Anfärbungsscores verhielten sich wie folgt:  $AS_{Bcl-2} = 2$  bei 4 von 23 Tumoren (17,4%),  $AS_{Bcl-2} = 3$  bei 9 von 23 Tumoren (39,1%) sowie  $AS_{Bcl-2} = 4$  bei 10 von 23 Tumoren (43,5%). Die Anfärbungsscores 0 und 1 traten nicht auf. Der mediane Anfärbungsscore lag bei 3 (Mittelwert 3,26).

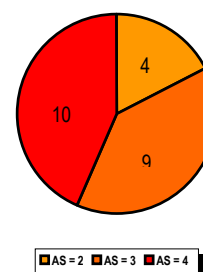
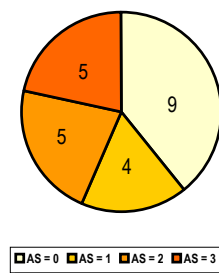


Abb. 14:  $AS_{Bcl-2}$  der 23 untersuchten NZK

### 3.1.4 p53-Antigen: Anfärbungsscores im Nachweisverfahren mittels des mAb DO-7

9 Tumoren (39,1%) präsentierten einen  $AS_{p53} = 0$ , 4 NZK (17,4%) boten einen  $AS_{p53} = 1$ , jeweils 5 Tumoren (21,7%) wiesen einen  $AS_{p53} = 2$  bzw. 3 auf. Ein Anfärbungsscore von 4 wurde in keinen der untersuchten NZK nachgewiesen. Der mediane Anfärbungsscore betrug 1,0 (Mittelwert 1,26).

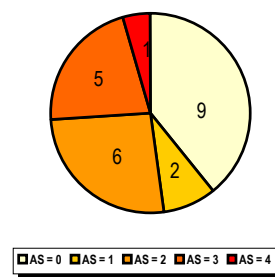


**Abb. 15:**  $AS_{p53}$  der 23 untersuchten NZK

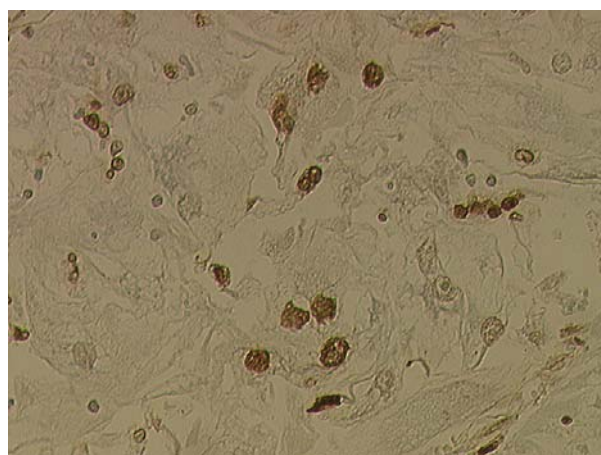
### 3.1.5 VHL-Antigen: Anfärbungsscores im Nachweisverfahren mit dem Antikörper Ig32

Die Anfärbungsscores verhielten sich im folgenden Sinne:  $AS_{VHL} = 0$  bei 9 von 23 (39,1%),  $AS_{VHL} = 1$  bei 2 von 23 (8,7%),  $AS_{VHL} = 2$  bei 6 von 23 (26,1%),  $AS_{VHL} = 3$  bei 5 von 23 (21,7%) sowie  $AS_{VHL} = 4$  bei 1 von 23 (4,3%) NZK.

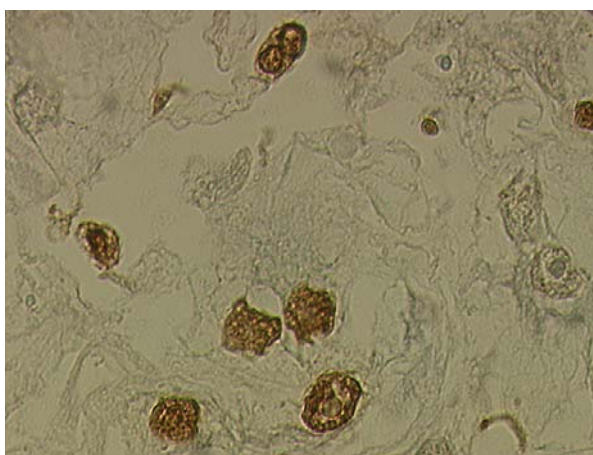
Der mediane Anfärbungsscore belief sich auf 2,0 (Mittelwert: 1,43).



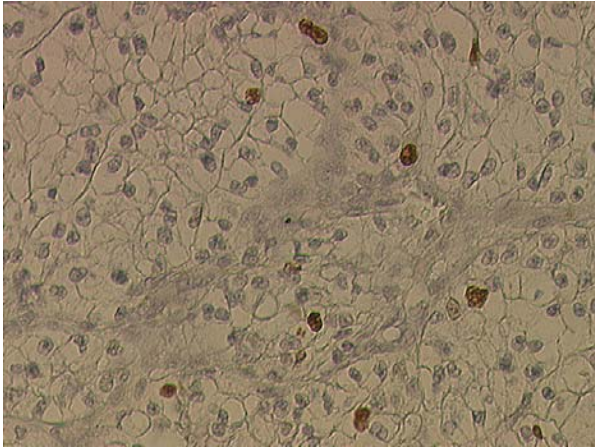
**Abb. 16:**  $AS_{VHL}$  der 23 untersuchten NZK



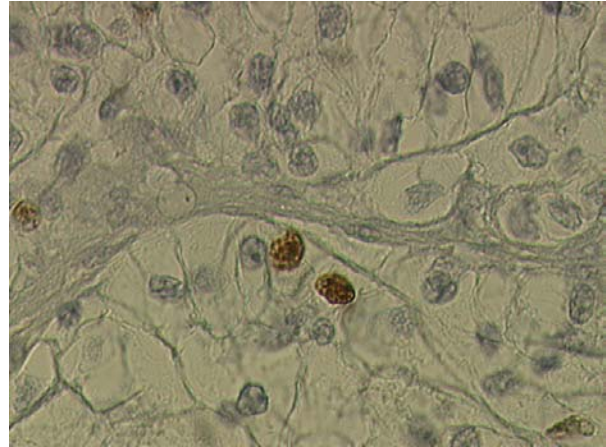
**Abb. 17:** Nachweis apoptotischer Zellen im TUNEL-Verfahren. Die Nuklei apoptotischer Zellen sind deutlich braun angefärbt. (Fall Nr. 14, 200-fache Vergrößerung)



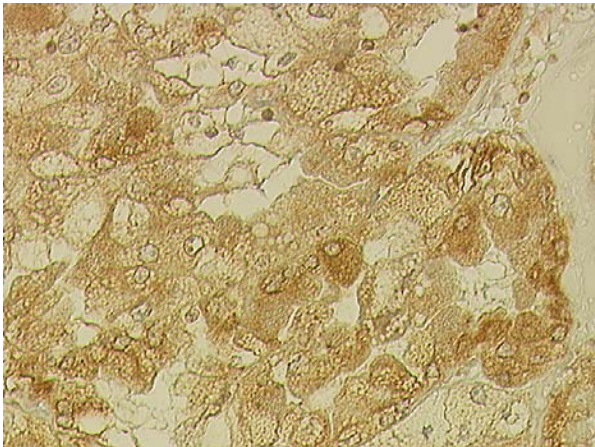
**Abb. 18:** Das gleiche Präparat wie in nebenstehender Abbildung, Vergrößerung 400-fach.



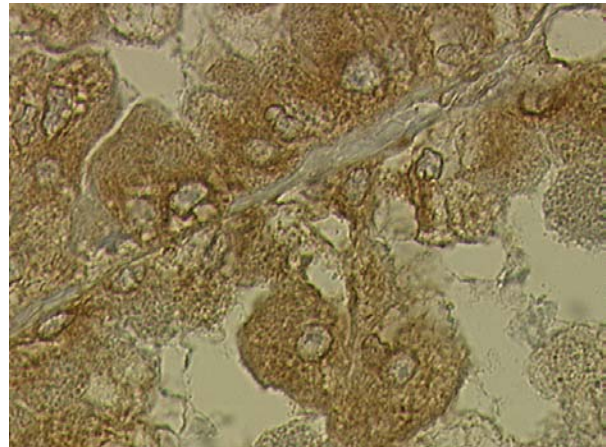
**Abb. 19:** Nachweis Ki-67-exprimierender Zellen im Nachweisverfahren mittels des mAb MIB-1. Proliferationsaktive Zellen zeigen eine nukleäre Braunfärbung unterschiedlichen Ausmaßes. (Fall Nr. 11, 200-fache Vergrößerung)



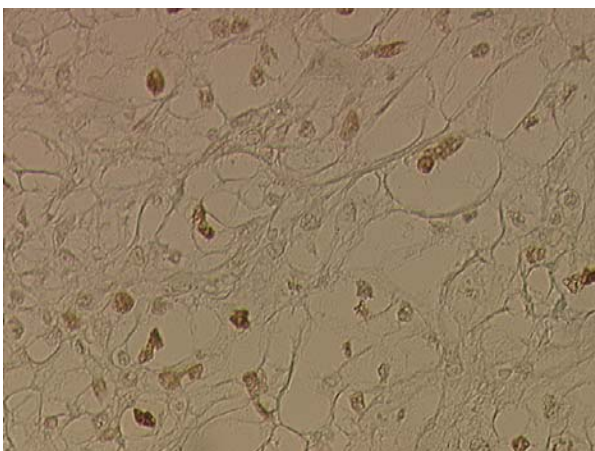
**Abb. 20:** Das gleiche Präparat wie in nebenstehender Abbildung, Vergrößerung 400-fach.



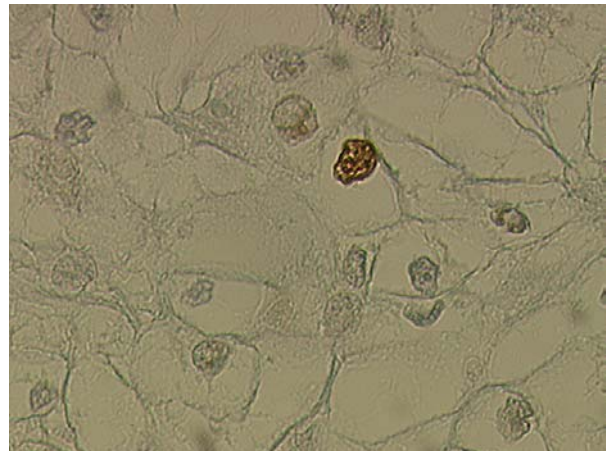
**Abb. 21:** Nachweis Bcl-2-exprimierender Zellen mittels des mAb 124. Bcl-2-positive Zellen zeigen eine granulär imponierende zytosolische Braunfärbung. (Fall Nr. 5, 200-fache Vergrößerung)



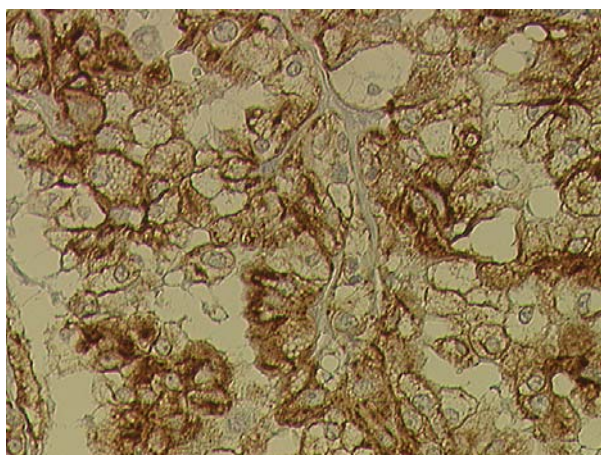
**Abb. 22:** Das gleiche Präparat wie in nebenstehender Abbildung, Vergrößerung 400-fach.



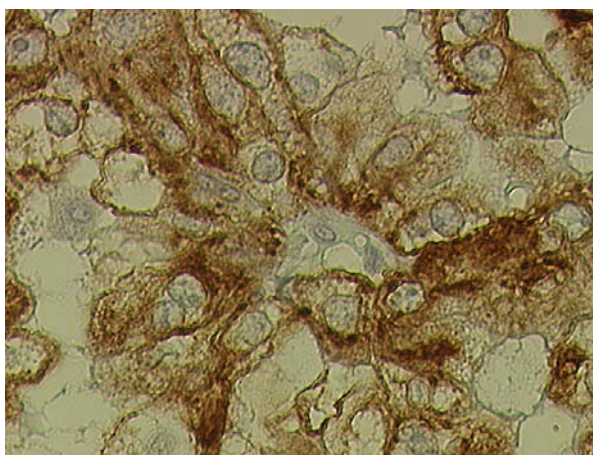
**Abb. 23:** Nachweis p53-überexprimierender Zellen im Nachweisverfahren mittels des mAb DO-7. Die nukleäre Akkumulation von p53-Protein wird durch eine Braunfärbung der Kerne sichtbar. (Fall Nr. 14, 200-fache Vergrößerung)



**Abb. 24:** Das gleiche Präparat wie in nebenstehender Abbildung, Vergrößerung 400-fach.



**Abb. 25:** Nachweis VHL-positiver Zellen im Nachweisverfahren mittels des mAb Ig23. Die zytosolische Braunfärbung zeigt das Vorliegen von pVHL an. (Fall Nr. 5, 200-fache Vergrößerung)



**Abb. 26:** Das gleiche Präparat wie in nebenstehender Abbildung, Vergrößerung 400-fach.

### 3.1.6 Häufigkeitsverteilungen der Anfärbungsscores für apoptotische Zellen, Ki-67-, Bcl-2-, p53- und VHL-Antigen nach Dichotomisierung

Für die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erschien es auf Grund der niedrigen Fallzahl und der daraus

**Tab. 6:** Schema zur Dichotomisierung der Anfärbungsscores an Hand des Medians als Schwellenwert

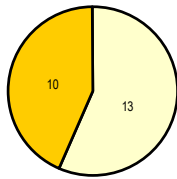
	AS(d) = 0	AS (d) = 1
<b>TUNEL-Verfahren</b>	Bis 1% angefärbter Zellen	> 1% angefärbter Zellen
<b>Ki-67-Antigen</b>	Bis 5% angefärbter Zellen	> 5% angefärbter Zellen
<b>Bcl-2-Antigen</b>	Bis 50% angefärbter Zellen	> 50% angefärbter Zellen
<b>p53-Antigen</b>	Bis 5% angefärbter Zellen	> 5% angefärbter Zellen
<b>VHL-Antigen</b>	Bis 20% angefärbter Zellen	>20% angefärbter Zellen

resultierenden geringen Gruppengrößen bei den verschiedenen AS zweckmäßig, eine Vergrößerung des Einteilungsschemas im Sinne einer Unterscheidung zwischen über- und unterdurchschnittlicher Anfärbungsdichte bei den immunhistochemischen Nachweisverfahren vorzunehmen. Hierzu wurde für jedes der untersuchten Zielantigene der mediane AS der 23 untersuchten NZK als Schwellenwert verwandt, indem alle Fälle, die einen über dem Medianwert liegenden Anfärbungsscore boten, als überdurchschnittlich stark positiv für das untersuchte Antigen gewertet wurden. Diesen Fällen wurde ein dichotomisierter Anfärbungsscore (AS(d)) von 1 zugewiesen; alle übrigen Fälle wurden einem AS(d) von 0 zugeordnet (Tab. 6).

Nach der Dichotomisierung verhielten sich die Anfärbungsscores wie folgt:

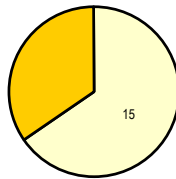
- 13 NZK (56,5%) zeigten einen  $AS(d)_{TUNEL} = 0$ , 10 NZK (43,5%) boten einen  $AS(d)_{TUNEL} = 1$  (Abb. 25).
- 15 NZK (65,2%) präsentierten einen  $AS(d)_{Ki-67} = 0$ , 8 NZK (34,8 %) zeigten einen  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  (Abb. 26).
- 13 NZK (56,5%) boten einen  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$ ; 10 Tumoren (43,5%) einen  $AS(d)_{Bcl-2} = 1$  (Abb. 27).

- 13 NZK (56,5 %) wiesen einen  $AS(d)_{p53} = 0$  auf, 10 NZK (43,5%) zeigten einen  $AS(d)_{p53} = 1$  (Abb. 28).
- 17 NZK (73,9%) präsentierten einen  $AS(d)_{VHL} = 0$ , 6 NZK (26,1 %) einen  $AS(d)_{VHL} = 1$  (Abb. 29).



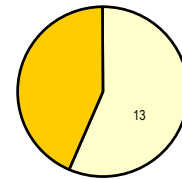
AS(d) = 0 AS(d) = 1

**Abb. 27:**  $AS(d)_{TUNEL}$  der 23 untersuchten NZK



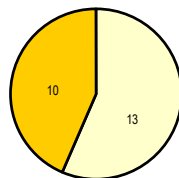
AS(d) = 0 AS(d) = 1

**Abb. 28:**  $AS(d)_{KI-67}$  der 23 untersuchten NZK



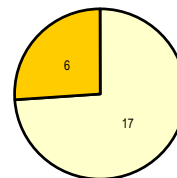
AS(d) = 0 AS(d) = 1

**Abb. 29:**  $AS(d)_{Bcl-2}$  der 23 untersuchten NZK



AS(d) = 0 AS(d) = 1

**Abb. 30:**  $AS(d)_{p53}$  der 23 untersuchten NZK



AS(d) = 0 AS(d) = 1

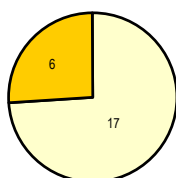
**Abb. 31:**  $AS(d)_{VHL}$  der 23 untersuchten NZK

### 3.1.7 Histologisches Grading und pT-Stadium: Häufigkeitsverteilung nach Dichotomisierung

Das histopathologische Grading und das pT-Stadium der untersuchten Tumoren wurden nach dem gleichen Prinzip wie die immunhistochemisch untersuchten Parameter nach Median dichotomisiert.

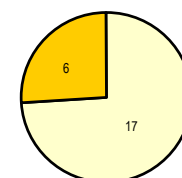
Das mediane histologische Grading lag bei Grad 2; dementsprechend wurden Grad 1- und Grad 2-Tumoren (17 der untersuchten NZK = 73,9%) zu einer Gruppe zusammengefasst und der Gruppe der Grad 3-Tumoren (6 der untersuchten NZK = 26,1%) gegenübergestellt.

Der Median für das pT-Stadium lag bei pT1. In der Konsequenz wurden 17 pT1-Tumoren (73,9% der Fälle) von der zusammengefassten Gruppe von 6 pT2- bzw. pT3a-Tumoren (26,1%) abgegrenzt.



G1+G2 G3

**Abb. 32:** Histologisches Grading der 23 untersuchten NZK nach Dichotomisierung



pT1 pT2+pT3a

**Abb. 33:** pT-Stadium der 23 untersuchten NZK nach Dichotomisierung

### 3.2 Zusammenhänge der immunhistochemisch untersuchten Parameter mit Tumorgrad und pT-Stadium

#### 3.2.1 Zusammenhänge zwischen Tumorgrad und pT-Stadium

15 von 17 pT1-NZK (88,2%) waren G1- bzw. G2-Tumoren, die G3-NZK stellten nur einen Anteil von 11,8%. Unter den 3 pT2-Tumoren fanden sich ein G1-NZK (33,3%) sowie 2 G3-NZK (66,7%); bei den 3 pT3a-NZK handelte es sich um ein G2-Karzinom (33,3%) sowie 2 G3-NZK (66,7%). Andersherum handelte es sich bei den 5 G1-NZK zu 80% und bei den 12 G2-NZK zu 91,7% um pT1-Tumoren, während sich die 6 G3-Karzinomen jeweils in 1/3 der Fälle aus pT1-, pT2- und pT3a-Tumoren rekrutierten. Fortgeschrittene pT-Stadien waren demnach mit einer stärkeren histologischen Entdifferenzierung vergesellschaftet und umgekehrt. Der Fisher-Test war auf Grund der bestehenden 3 x 3-Tabelle hier zulässig und signifikant ( $p = 0,045$ ).

Tab. 7: Kreuztabelle zu pT-Stadium und histologischem Grading

	G1	G2	G3	gesamt
pT1	4	11	2	17
pT2	1	-	2	3
pT3a	-	1	2	3
gesamt	5	12	6	23

#### 3.2.2 Bcl-2-Expression

3 von 5 (60%) G1-NZK zeigten eine mittelgradige Bcl-2-Expression ( $AS_{Bcl-2} = 3$ ); die übrigen 40 % der G1-Fälle exprimierten Bcl-2 in über 50 % der Zellen ( $AS_{Bcl-2} = 4$ ). Ein  $AS_{Bcl-2} = 2$  wurde in dieser Gruppe nicht beobachtet. Unter den 12 G2-NZK zeigten 3 (25 %) eine geringe, 3 (25 %) eine mittelgradige und 6 (50 %) eine starke Bcl-2-Expression. Demgegenüber fand sich in der Gruppe der G3-NZK bei 16,7 % (1 von 6) eine geringe, bei 50 % (3 von 6) eine mittelgradige und bei 33,3 % (2 von 6) eine starke Bcl-2-Expression. Dementsprechend ließ sich keine Assoziation ausmachen, wenngleich anzumerken ist, dass - im Gegensatz zu den G2- und G3-Karzinomen - von den gut differenzierten NZK keines eine geringe ( $AS_{Bcl-2} = 2$ ) Bcl-2-Expression zeigte.

Tab. 8: Kreuztabelle zu Bcl-2-Expression und histologischem Grading

	G1	G2	G3	gesamt
$AS_{Bcl-2} = 2$	-	3	1	4
$AS_{Bcl-2} = 3$	3	3	3	9
$AS_{Bcl-2} = 4$	2	6	2	10
gesamt	5	12	6	23

Von 17 pT1-NZK zeigten 4 (23,5 %) einen  $AS_{Bcl-2} = 2$ , 6 (35,3 %) einen  $AS_{Bcl-2} = 3$  und 7 (41,2 %) einen  $AS_{Bcl-2} = 4$ . Von 3 pT2-NZK exprimierte eines (33,3 %) Bcl-2 mittelgradig und 2 (66,7%) stark; bei den ebenfalls 3 pT3a-Fällen zeigten 2 Karzinome eine mittelgradige und eines eine starke Bcl-2-Expression. Zwar fanden sich unter den pT2- und pT3a-NZK im Gegensatz zu den pT1-Fällen also keine Tumoren mit einer Bcl-2-Expression  $\leq 20$  %; ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Bcl-2-Expression und dem pT-Stadium ließ sich dennoch nicht ausmachen.

Tab. 9: Kreuztabelle zu Bcl-2-Expression und pT-Stadium

	pT1	pT2	pT3a	gesamt
$AS_{Bcl-2} = 2$	4	-	-	4
$AS_{Bcl-2} = 3$	6	1	2	9
$AS_{Bcl-2} = 4$	7	2	1	10
gesamt	17	3	3	23



### 3.2.3 Ki-67-Expression

6 von 12 G2-Karzinomen (50%) zeigten einen  $AS_{Ki-67} = 2$  im Sinne einer hohen Proliferationsaktivität. Demgegenüber fanden sich nur bei 1 von 5 (20%) der G1-NZK sowie 1 von 6 (16,7%) der G3-NZK eine derart hohe Proliferationsaktivität. Eine mäßige proliferative Aktivität ( $AS_{Ki-67} = 1$ ) fand sich bei 25 % der G1- und jeweils 37,5 % der G2- bzw. G3-NZK. Proliferationsinaktiv (Ki-67-Expression in  $\leq 1$  % der Zellen) waren 2 von 5 (40 %) der G1-NZK, 3 von 13 (25 %) der G2-NZK und 2 von 6 (33,3 %) der G3-NZK. Ein Zusammenhang zwischen histologischem Grading und Ki-67-Expression ließ sich nicht nachweisen.

**Tab. 10:** Kreuztabelle zu Ki-67-Expression und histologischem Grading

	G1	G2	G3	gesamt
$AS_{Ki-67} = 0$	2	3	2	7
$AS_{Ki-67} = 1$	2	3	3	8
$AS_{Ki-67} = 2$	1	6	1	8
<b>gesamt</b>	5	12	6	23

Die 17 pT1-NZK waren zu 35,3 % (6 Fälle) proliferationsinaktiv (Ki-67-Expression  $\leq 1$  %); von den 11 proliferationsaktiven NZK dieser Gruppe zeigten 4 (23,5 %) eine mäßige ( $AS_{Ki-67} = 1$ ) und 7 (41,2 %) eine starke ( $AS_{Ki-67} = 2$ ) Ki-67-Expression. Von den 3 pT2-NZK war eines proliferationsinaktiv, eines zeigte eine mäßige und eines eine starke Ki-67-Expression. Alle 3 pT3a-NZK wiesen eine mäßige Proliferationsaktivität auf. Während also unter den pT1- und pT2-Karzinomen jeweils etwa ein Drittel der Fälle Ki-67-negativ waren, erwiesen sich alle pT3a-NZK als proliferationsaktiv. Eine Ki-67-Expression in  $> 20$  % der Zellen trat allerdings nur bei pT1- und pT2-NZK (in 41,2 % respektive 33,3 % der Fälle) auf.

**Tab. 11:** Kreuztabelle zu Ki-67-Expression und pT-Stadium

	pT1	pT2	pT3a	gesamt
$AS_{Ki-67} = 0$	6	1	-	7
$AS_{Ki-67} = 1$	4	1	3	8
$AS_{Ki-67} = 2$	7	1	-	8
<b>gesamt</b>	17	3	3	23

### 3.2.4 p53-Expression

3 von 5 G1-NZK (60 %) zeigten einen Anteil von  $\leq 1$  % p53-exprimierender Zellen, von den verbleibenden 2 G1-Tumoren zeigte jeweils eines einen  $AS_{p53} = 1$  bzw.  $AS_{p53} = 2$ . Die 12 G2-NZK rekrutierten sich zu 41,7 % (5 Fälle) aus p53-negativen Tumoren; 8,3 % (1 Fall) zeigte einen  $AS_{p53} = 1$ , 16,7 % (2 Fälle) einen  $AS_{p53} = 2$  und 33,3 % (4 Fälle) einen  $AS_{p53} = 3$ . Unter den 6 G3-NZK exprimierte jeweils eines p53 in  $\leq 1$  % bzw.  $> 20$  % der Zellen; jeweils 2 Karzinome zeigten einen  $AS_{p53} = 1$  bzw.  $AS_{p53} = 2$ .

**Tab. 12:** Kreuztabelle zu p53-Expression und histologischem Grading

	G1	G2	G3	gesamt
$AS_{p53} = 0$	3	5	1	9
$AS_{p53} = 1$	1	1	2	4
$AS_{p53} = 2$	1	2	2	5
$AS_{p53} = 3$	-	4	1	5
<b>gesamt</b>	5	12	6	23

Von den 10 NZK, die eine p53-Expression in  $> 5$  % der Zellen aufwiesen ( $AS = 2$  bzw.  $3$ ), handelte es sich in 90 % der Fälle um G2- und G3-Karzinome. Von den 5 G1-Tumoren zeigte nur einer (20%) eine p53-Expression in  $> 5$  % der Zellen, bei den G2- und G3-NZK war dies in jeweils 50% der untersuchten Fälle (6 von 12 G2-

Tumoren und 3 von 6 G3-Tumoren) der Fall. Die G2- und G3-NZK tendierten also zu einer höheren p53-Expression als die G1-NZK.

Eine p53-Expression in  $\leq 1\%$  der Zellen zeigten 8 von 17 pT1-NZK (47,1 %) und eines von 3 pT3a-NZK (33,3 %); unter den 3 pT2-NZK fand sich kein p53-negativer Tumor. p53-positiv ( $> 1\%$  p53-exprimierender Zellen) waren 9 von 17 pT1- (52,9 %), alle 3 pT2- und 2 von 3 pT3a-Tumoren (66,7 %). Ein Anteil von  $> 5\%$  p53-positiver Zellen fand sich bei 7 von 17 pT1- (41,2 %), 1 von 3 pT2- (33,3 %) und 2 von 3 pT3a-NZK (66,7 %); mehr als 20 % p53-exprimierender Zellen wiesen 5 pT1-NZK auf (29,4 %), während bei keinem der pT2- und pT3a-Tumoren eine derart hohe p53-Expression nachweisbar war.

Ein Zusammenhang zwischen pT-Stadium und p53-Expression ließ sich also nicht ausmachen. Zwar waren sehr stark p53-positive NZK ( $> 20\%$  p53-exprimierender Zellen) nur unter den pT1-Tumoren zu finden, aber in dieser Gruppe war auch der höchste Anteil p53-negativer Karzinome zu finden.

### 3.2.5 Apoptosenachweis im TUNEL-Verfahren

3 von 5 G1-Tumoren (60 %) wiesen keinen nennenswerten Anteil apoptotischer Zellen auf ( $< 1\%$  angefärbter Zellkerne). Dasselbe traf für 9 von 12 (75 %) G2-Karzinome zu. Demgegenüber wiesen 5 von 6 (83,3 %) G3-NZK einen Anteil von  $> 1\%$  apoptotischer Zellen auf. Bei 12 von 13 NZK (92,3 %) mit Apoptoseraten von  $< 1\%$  handelte es sich um G1- bzw. G2-Tumoren. 5 von 10 NZK (50 %) mit einem Anteil apoptotischer Zellen von  $> 1\%$

waren G3-Karzinome. Apoptoseraten von  $> 20\%$  traten bei 1 von 12 G2-NZK (8,3 %) und 1 von 6 G3-NZK (16,7 %) auf; unter den G1-NZK wurde eine apoptotische Aktivität dieses Ausmaßes nicht beobachtet. Insgesamt wiesen also die untersuchten G3-Karzinome eine höhere Apoptoseaktivität auf als die niedriggradigeren NZK.

7 von 17 der untersuchten pT1-NZK (41,2 %) zeigten einen apoptotischen Zellanteil von  $> 1\%$ . In der Gruppe der pT2-Tumoren traf dies auf 2 von 3 Fällen (66,7 %) zu; demgegenüber fanden sich nur bei 1 von 3 pT3a-NZK (33,3 %)  $> 1\%$  apoptotischer Zellen, hierbei handelte es sich um ein NZK mit einem AS = 2 ( $> 5 - 20\%$  TUNEL-positiver Zellen). Apoptoseraten von  $> 5\%$  fanden sich bei 2 pT1- (11,8 %), einem pT2- (33,3 %) und, wie bereits beschrieben, einem pT3a-NZK (33,3 %); unter den pT1- und pT2-Karzinomen wiesen jeweils ein Fall (5,9 %

Tab. 13: Kreuztabelle zu p53-Expression und pT-Stadium

	pT1	pT2	pT3a	gesamt
AS <sub>p53</sub> = 0	8	-	1	9
AS <sub>p53</sub> = 1	2	2	-	4
AS <sub>p53</sub> = 2	2	1	2	5
AS <sub>p53</sub> = 3	5	-	-	5
gesamt	17	3	3	23

Tab. 14: Kreuztabelle zu apoptotischer Aktivität und histologischem Grading

	G1	G2	G3	gesamt
AS <sub>TUNEL</sub> = 0	3	9	1	13
AS <sub>TUNEL</sub> = 1	1	2	3	6
AS <sub>TUNEL</sub> = 2	1	-	1	2
AS <sub>TUNEL</sub> = 3	-	1	1	2
gesamt	5	12	6	23

respektive 33,3 %) Apoptoseraten von > 20 % auf. An Hand dieser Daten lässt sich kein Zusammenhang zwischen apoptotischer Aktivität und pT-Stadium nachweisen.

### 3.2.6 VHL-Expression

3 von 5 G1-NZK (60 %) und 7 von 12 G2-NZK (58,3 %) zeigten eine VHL-Expression in > 5 % der Zellen. Unter den 6 G3-Tumoren traf dies nur für 2 Fälle (33,3 %) zu. Eine VHL-Expression in > 20 % der Zellen wiesen 1 von 5 G1-NZK (20 %), 4 von 12 G2-NZK (33,3 %) und 1 von 6 G3-NZK (16,7 %) auf.

Einen vollständigen VHL-Expressionsverlust (< 1 % exprimierender Zellen) zeigten 2 von 5 G1-NZK (40 %), 3 von 12 G2-NZK (25 %) und 4/6 G3-NZK (66,67 %). Das einzige NZK mit > 50 % VHL-exprimierenden Zellen wies eine mäßige histologische Differenzierung auf (G2).

Die gering differenzierten NZK wiesen also gegenüber den gut und mäßig differenzierten Karzinomen häufiger und stärkere VHL-Expressionsverluste auf.

Einen vollständigen Verlust der VHL-Expression (weniger als 1 % VHL-positiver Zellen) zeigten 66,7 % der pT3a-NZK (2 von 3 Fällen); bei den pT2-NZK war dies nur bei 1 von 3 (33,3 %) und bei den pT1-NZK bei 6 von 17 (35,3 %) Tumoren der Fall.

Ein Anteil von > 5 % VHL-exprimierender Zellen fand sich bei 9 von 17 pT1-NZK (52,9 %); bei den pT2-NZK betrug dieser Anteil mit 2 von 3 Fällen 66,7 %. Demgegenüber wies von den 3 pT3a-NZK nur eines (33,3 %) > 5 % VHL-positiver Zellen auf. Mehr als 20 % VHL-positiver Zellen fanden sich bei den pT1- und pT2-NZK in jeweils etwa einem Drittel der Fälle, nämlich bei 5 von 17 pT1-Tumoren (29,4 %) und 1 von 3 pT2-Tumoren (33,3 %), wohingegen keines der 3 pT3a-NZK eine derart hohe VHL-Expression aufwies.

Während sich also unter den pT1- und pT2-NZK auch im Expressionsausmaß vergleichbare Anteile VHL-positiver Tumoren befanden, lag die Rate VHL-exprimierender Fälle bei den pT3a-NZK deutlich niedriger. Zudem wiesen die pT3a-NZK in zwei Dritteln der Fälle einen vollständigen VHL-Expressionsverlust auf; bei den früheren Stadien betrug dieser Anteil jeweils nur etwa ein Drittel. Eine hohe VHL-Expressionsrate (> 20 % VHL-positiver Zellen) trat bei den pT3a-NZK nicht auf; bei den pT1- und pT2-NZK war dies in jeweils etwa einem Drittel der

**Tab. 15:** Kreuztabelle zu apoptotischer Aktivität und pT-Stadium

	pT1	pT2	pT3a	gesamt
<b>AS<sub>TUNEL</sub> = 0</b>	10	1	2	13
<b>AS<sub>TUNEL</sub> = 1</b>	5	1	-	6
<b>AS<sub>TUNEL</sub> = 2</b>	1	-	1	2
<b>AS<sub>TUNEL</sub> = 3</b>	1	1	-	2
<b>gesamt</b>	17	3	3	23

**Tab. 16:** Kreuztabelle zu VHL-Expression und histologischem Grading

	G1	G2	G3	gesamt
<b>AS<sub>VHL</sub> = 0</b>	2	3	4	9
<b>AS<sub>VHL</sub> = 1</b>	-	2	-	2
<b>AS<sub>VHL</sub> = 2</b>	2	3	1	6
<b>AS<sub>VHL</sub> = 3</b>	1	3	1	5
<b>AS<sub>VHL</sub> = 4</b>	-	1	-	1
<b>gesamt</b>	5	12	6	23

**Tab. 17:** Kreuztabelle zu VHL-Expression und pT-Stadium

	pT1	pT2	pT3	gesamt
<b>AS<sub>VHL</sub> = 0</b>	6	1	2	9
<b>AS<sub>VHL</sub> = 1</b>	2	-	-	2
<b>AS<sub>VHL</sub> = 2</b>	4	1	1	6
<b>AS<sub>VHL</sub> = 3</b>	4	1	-	5
<b>AS<sub>VHL</sub> = 4</b>	1	-	-	1
<b>gesamt</b>	17	3	3	23

Fälle gegeben. Bei dem einzigen der 23 NZK, das VHL in > 50 % der Zellen exprimierte, handelte es sich um einen pT1-Tumor.

### 3.3 Zusammenhänge der immunhistochemisch untersuchten Marker untereinander

#### 3.3.1 Bcl-2-Expression und Ki-67-Expression

Während von den 4 NZK mit einem  $AS_{Bcl-2} = 2$  nur 2 (50 %) eine proliferative Aktivität in  $\geq 1\%$  der Zellen aufweisen, waren 6 von 9 Karzinomen (67,7 %) mit einem  $AS_{Bcl-2} = 3$

Tab. 18: Kreuztabelle zur Bcl-2- und Ki-67-Expression

	$AS_{Ki-67} = 0$	$AS_{Ki-67} = 1$	$AS_{Ki-67} = 2$	gesamt
$AS_{Bcl-2} = 2$	2	1	1	4
$AS_{Bcl-2} = 3$	3	3	3	9
$AS_{Bcl-2} = 4$	2	4	4	10
gesamt	7	8	8	23

und 8 von 10 NZK (80 %) mit einem  $AS_{Bcl-2} = 4$  proliferationsaktiv. Ein Anteil von > 5 % Ki-67-exprimierender Zellen fand sich bei 25% der gering Bcl-2-exprimierenden NZK (1 von 4 Fällen), während dies auf 33,3 % der mäßig bzw. 40 % der stark Bcl-2-positiven Tumoren zutraf (3 von 9 bzw. 4 von 10 Fällen). Tendenziell fand sich also mit steigender Bcl-2-Expression nicht nur ein höherer Anteil proliferierender Tumoren; auch das Ausmaß der proliferativen Aktivität stieg mit dem der Bcl-2-Expression. Während unter den proliferationsinaktiven NZK der Anteil stark Bcl-2-positiver Tumoren nur 28,6 % (2 von 7 Fällen) ausmachte, betrug er sowohl unter den NZK mit einem  $AS_{Ki-67} = 1$  als auch unter den Tumoren mit einem  $AS_{Ki-67} = 2$  50 % (jeweils 4 von 8 Fällen).

#### 3.3.2 Bcl-2-Expression und p53-Expression

3 von 4 NZK (75 %) mit einem  $AS_{Bcl-2} = 2$  waren p53-negativ (p53-Expression in  $\leq 1\%$  der Zellen); das verbleibende NZK (25 %)

Tab. 19: Kreuztabelle zur Bcl-2- und p53-Expression

	$AS_{p53} = 0$	$AS_{p53} = 1$	$AS_{p53} = 2$	$AS_{p53} = 3$	gesamt
$AS_{Bcl-2} = 2$	3	-	-	1	4
$AS_{Bcl-2} = 3$	3	2	2	2	9
$AS_{Bcl-2} = 4$	3	2	3	2	10
gesamt	9	4	5	5	23

zeigte eine p53-Expression in > 20 % der Zellen ( $AS_{p53} = 3$ ). Von 9 NZK mit einem  $AS_{Bcl-2} = 3$  zeigten 66,7 % (6 Fälle) eine p53-Expression in > 1 % der Zellen, 44,4 % (4 Fälle) einen Anteil von > 5 % p53-positiver Zellen und 22,2 % (2 Fälle) einen mehr als 20%igen Anteil p53-exprimierender Zellen. Unter den 10 NZK mit einem  $AS_{Bcl-2} = 4$  betragen diese Anteile 70 % (p53 positiv in > 1 % der Zellen), 50 % (p53 positiv in > 5 % der Zellen) und 20 % (p53 positiv in > 20 % der Zellen). Der Anteil p53-negativer Fälle war also bei den NZK mit einem  $AS_{Bcl-2} = 2$  mit 3/4 der Fälle deutlich niedriger als unter den NZK mit einem  $AS_{Bcl-2} = 3$  bzw. 4, wo er jeweils etwa 1/3 der Fälle ausmachte.

Die p53-negativen NZK ihrerseits setzten sich zu je einem Drittel aus Tumoren mit einem  $AS_{Bcl-2}$  von 2, 3 bzw. 4 zusammen (jeweils 3 von 9 Fällen), während sich die p53-positiven NZK größtenteils aus Tumoren rekrutierten, die einen  $AS_{Bcl-2}$  von 3 bzw. 4 aufwiesen. Dies galt für 11 von 14 NZK mit einer p53-Expression in > 1 % der Zellen (92,9 %), 9 von 10 NZK mit > 5 % p53-positiver Zellen (90 %), bzw. für 4 von 5 NZK mit einer über

20%igen p53-Expression. Damit schienen das Ausmaß der Bcl-2- und das der p53-Expression tendenziell positiv korreliert zu sein.

### 3.3.3 Bcl-2-Expression und Apoptosehäufigkeit

2 von 4 NZK mit geringer (50 %), 5 von 9 NZK mit mäßiger (55,6 %) und 3

**Tab. 20:** Kreuztabelle zur Bcl-2-Expression und Apoptosehäufigkeit

	AS <sub>TUNEL</sub> = 0	AS <sub>TUNEL</sub> = 1	AS <sub>TUNEL</sub> = 2	AS <sub>TUNEL</sub> = 3	gesamt
AS <sub>Bcl-2</sub> = 2	2	2	-	-	4
AS <sub>Bcl-2</sub> = 3	4	1	2	2	9
AS <sub>Bcl-2</sub> = 4	7	3	-	-	10
gesamt	13	6	2	2	23

von 10 NZK mit starker Bcl-2-Expression (30 %) zeigten eine relevante Zahl apoptotischer Zellen ( $\geq 1$  % angefärbter Zellkerne). Apoptosehäufigkeiten von  $> 5$  % der Tumorzellen fanden sich ausschließlich in der Gruppe Karzinome mit medianer Bcl-2-Expression (AS<sub>Bcl-2</sub> = 3). Während also unter denjenigen NZK, die eine Bcl-2-Expression in weniger als 50 % der Zellen aufwiesen, etwa die Hälfte apoptotisch aktiv waren, traf dies nur auf 30 % der Tumoren zu, die Bcl-2 in über der Hälfte der Zellen exprimierten. Andersherum setzten sich die 13 NZK ohne nennenswerten apoptotischen Zellanteil zu 15,4 % aus gering, zu 30,8 % aus mäßig und zu 53,8 % aus stark Bcl-2-exprimierenden Tumoren zusammen (2 bzw. 4 bzw. 7 von 13 Fällen). Für die NZK mit einem AS<sub>TUNEL</sub> = 1 betragen diese Anteile jeweils 33,3 %, 16,7 % und 50 % (2 bzw. 1 bzw. 3 von 6 Fällen). Die jeweils 2 NZK mit einem AS<sub>TUNEL</sub> = 2 bzw. 3 zeigten eine mäßige Bcl-2-Expression. Mit steigender Apoptoseaktivität der untersuchten NZK sank also deren Anteil an Bcl-2-exprimierenden Zellen.

### 3.3.4 Bcl-2-Expression und VHL-Expression

Ein Anteil von  $\leq 1$  % VHL - exprimierender Zellen fand

**Tab. 21:** Kreuztabelle zu Bcl-2- und VHL-Expression

	AS <sub>VHL</sub> = 0	AS <sub>VHL</sub> = 1	AS <sub>VHL</sub> = 2	AS <sub>VHL</sub> = 3	AS <sub>VHL</sub> = 4	gesamt
AS <sub>Bcl-2</sub> = 2	2	1	-	1	-	4
AS <sub>Bcl-2</sub> = 3	4	-	3	1	1	9
AS <sub>Bcl-2</sub> = 4	3	1	3	3	-	10
gesamt	9	2	6	5	1	23

sich bei 2 von 4 NZK mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 2 (50 %), bei 4 von 9 NZK mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 3 (44,4 %) und bei 3 von 10 NZK mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 4 (30 %). Anfärbungsraten von  $\leq 5$  % für VHL fanden sich bei 3 der 4 NZK mit geringer (75 %), bei 4 der 9 NZK mit mäßiger (44,4 %) sowie bei 4 der 10 NZK mit starker Bcl-2-Expression (40 %). Einen Anteil von  $\leq 20$  % VHL-exprimierender Zellen zeigten 75 % der NZK mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 2 (3 von 4 Fällen), 77,8 % derer mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 3 (7/9 Fällen) und 70 % der NZK mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 4.

Betrachtete man die Gruppe der 14 NZK mit einer VHL-Expression in  $> 1$  % der Zellen, so rekrutierten sie sich zu 14,2 % aus Tumoren mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 2, zu 35,7 % aus solchen mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 3 und zu 50 % aus Tumoren mit einem AS<sub>Bcl-2</sub> = 4. Für die 12 NZK mit  $> 5$  % VHL-positiver Zellen betragen diese Anteile 8,3 % (AS<sub>Bcl-2</sub> = 2), 41,7 % (AS<sub>Bcl-2</sub> = 3) bzw. 50 % (AS<sub>Bcl-2</sub> = 4); unter den 6 NZK mit einer VHL-Expression in  $> 20$  % der

Zellen zeigte 1 Fall (16,7 %) eine geringe, 2 Fälle (33,3 %) eine mäßige und 3 Fälle (50 %) eine starke Bcl-2-Expression. Das einzige NZK, das einen Anteil von mehr als 50 % VHL-positiver Zellen aufwies, hatte einen  $AS_{Bcl-2} = 3$ . Tendenziell zeigten also VHL- und Bcl-2-Expression eine positive Korrelation; oder, anders ausgedrückt, wiesen die untersuchten NZK mit steigender Bcl-2-Expression quantitativ und qualitativ weniger ausgeprägte VHL-Expressionsverluste auf.

### 3.3.5 Ki-67-Expression und p53-Expression

4 von 9 p53-negativen NZK (44,4 %) zeigten auch eine proliferative Aktivität in  $\leq 1$  % der Zellen, nur eines der NZK mit einem  $AS_{p53} = 0$

Tab. 22: Kreuztabelle zu Ki-67- und p53-Expression

	$AS_{p53} = 0$	$AS_{p53} = 1$	$AS_{p53} = 2$	$AS_{p53} = 3$	gesamt
$AS_{Ki-67} = 0$	4	2	1	-	7
$AS_{Ki-67} = 1$	4	1	3	-	8
$AS_{Ki-67} = 2$	1	1	1	5	8
gesamt	9	4	5	5	23

zeigte einen Anteil von  $> 5$  % Ki-67-positiver Zellen (11,1 %). Unter den 14 NZK mit  $> 1$  % p53-positiven Zellen boten 78,6 % (11 Fälle) einen Anteil von  $> 1$  % Ki-67-exprimierender Zellen und 50 % (7 Fälle) einen Anteil von  $> 5$  % Ki-67-exprimierender Zellen.

Von den 10 NZK mit einer p53-Expression in  $> 5$  % der Zellen zeigten 90 % einen Ki-67-positiven Zellanteil von  $> 1$  %, 6 dieser Fälle (60 % der Gesamtzahl) exprimierten das Ki-67-Antigen in  $> 5$  % der Zellen. Die 5 NZK, die eine mehr als 50%ige p53-Expression aufwiesen, rekrutierten sich ausschließlich aus Tumoren, die einen Anteil von  $> 5$  % proliferationsaktiver Zellen besaßen.

Die 7 proliferationsinaktiven NZK zeigten zu 57,1 % p53-Anfärbungsraten von  $\leq 1$  %. Nur eines dieser 7 NZK (14,3 %) wies einen Anteil p53-positiver Zellen von  $> 5$  % auf; ein  $AS_{p53} = 3$  trat in dieser Gruppe nicht auf. Von 8 NZK mit einem  $AS_{Ki-67} = 1$  waren 4 (50 %) p53-negativ; von den 4 p53-positiven Fällen exprimierten 3 (37,5 % der Gesamtzahl) p53 in  $> 5$  % der Zellen; eine über 20%ige p53-Expression trat nicht auf.

Demgegenüber zeigten 6 von 8 NZK mit einem  $AS_{Ki-67} = 2$  (75 %) einen Anteil von  $> 5$  % p53-positiver Zellen, davon handelte es sich in 5 Fällen (62,5 % der Gesamtzahl) sogar um Karzinome mit einer über 20%igen p53-Expression. p53-negativ war in dieser Gruppe nur ein NZK (12,5 %).

Dementsprechend schien sich mit steigender proliferativer Aktivität der untersuchten NZK auch eine zunehmende p53-Überexpression zu finden, und umgekehrt.

### 3.3.6 Ki-67-Expression und Apoptosehäufigkeit

Von den 7 proliferationsinaktiven NZK wiesen 3 (42,9 %) einen

Tab. 23: Kreuztabelle zu Ki-67-Expression und Apoptosehäufigkeit

	$AS_{TUNEL} = 0$	$AS_{TUNEL} = 1$	$AS_{TUNEL} = 2$	$AS_{TUNEL} = 3$	gesamt
$AS_{Ki-67} = 0$	3	2	1	1	7
$AS_{Ki-67} = 1$	5	2	1	-	8
$AS_{Ki-67} = 2$	5	2	-	1	8
gesamt	13	6	2	2	23

Anteil apoptotischer Zellen  $< 1\%$  auf; von den 5 apoptotisch aktiven NZK boten 2 Tumoren (28,6 % der Gesamtzahl)  $> 5\%$  und eines davon  $> 20\%$  apoptotischer Zellen (14,3 % der Gesamtzahl). Von den jeweils 8 NZK mit einem  $AS_{Ki-67} = 1$  bzw. 2 zeigten je 62,5 % (5 Fälle) einen  $AS_{TUNEL} = 0$  und je 2 (25 %) einen  $AS_{TUNEL} = 1$ . Eines der Karzinome mit einem  $AS_{Ki-67} = 1$  bot einen  $AS_{TUNEL} = 2$ ; eines der Karzinome mit einem  $AS_{Ki-67} = 2$  einen  $AS_{TUNEL} = 3$  (jeweils 12,5 %).

Andersherum setzten sich die 13 apoptotisch inaktiven NZK zu 23,1 % (3 Fälle) aus proliferationsinaktiven Karzinomen zusammen, jeweils 38,5 % (5 Fälle) boten einen  $AS_{Ki-67} = 1$  bzw. 2. Die 10 apoptotisch aktiven NZK ( $> 1\%$  TUNEL-positiver Zellen) rekrutierten sich zu 40 % aus proliferationsinaktiven Tumoren; jeweils 30 % waren NZK mit einem  $AS_{Ki-67} = 1$  bzw. 2. Von den 4 NZK mit einem über 5 %-igen Anteil apoptotischer Zellen waren 2 (50 %) proliferationsinaktiv; je 25 % zeigten einen  $AS_{Ki-67} = 1$  bzw. 2. Von den 2 NZK mit einem apoptotischen Zellanteil von  $> 20\%$  war eines proliferationsinaktiv und eines bot eine proliferative Aktivität in  $> 5\%$  der Zellen.

Betrachtete man also diejenigen NZK, die einen apoptotischen Zellanteil  $\leq 20\%$  aufwiesen, so schien eine erhöhte Apoptoserate mit einer geringeren Proliferationsrate vergesellschaftet zu sein; die 2 Karzinome, die  $> 20\%$  apoptotischer Zellen boten, liefen diesem Eindruck jedoch zuwider, da eines von ihnen proliferationsinaktiv war, das andere aber einen Anteil von  $> 5\%$  Ki-67-positiver Zellen und damit eine hohe Proliferationsrate zeigte.

### 3.3.7 Ki-67-Expression und VHL-Expression

Von 9 VHL-negativen NZK ( $\leq 1\%$  VHL-exprimierende

**Tab. 24:** Kreuztabelle zu Ki-67- und VHL-Expression

	$AS_{VHL} = 0$	$AS_{VHL} = 1$	$AS_{VHL} = 2$	$AS_{VHL} = 3$	$AS_{VHL} = 4$	gesamt
$AS_{Ki-67} = 0$	4	1	2	-	-	7
$AS_{Ki-67} = 1$	5	-	2	1	-	8
$AS_{Ki-67} = 2$	-	1	2	4	1	8
gesamt	9	2	6	5	1	23

r Zellen) waren 4 (44,4 %) auch Ki-67-negativ; kein VHL-negativer Tumor wies eine proliferative Aktivität in  $> 5\%$  der Zellen auf. Unter den 14 VHL-exprimierenden NZK ( $> 1\%$  VHL-positiver Zellen) waren 3 (21,4 %) proliferationsinaktiv; 8 der 11 Ki-67-positiven Karzinome wiesen

Proliferationsraten von  $> 5\%$  auf (57,1 % der Gesamtzahl). Von 12 NZK mit einer VHL-Expression in  $> 5\%$  der Zellen waren 2 (16,7 %) proliferationsinaktiv; 7 Fälle (58,3 %) wiesen einen  $AS_{Ki-67} = 2$  auf. Keines der 6 NZK mit einer VHL-Expression in  $> 20\%$  der Zellen war Ki-67-negativ; 5 dieser 6 Tumoren (83,3 %) wiesen einen Anteil von  $> 5\%$  Ki-67-exprimierender Zellen auf, darunter auch das einzige NZK mit einem  $AS_{VHL} = 4$ .

Die 7 NZK mit einem  $AS_{Ki-67} = 0$  rekrutierten sich zu 57,1 % (4 Fälle) aus VHL-negativen Tumoren; 28,5 % (2 Fälle) zeigten eine VHL-Expression in  $> 5\%$  der Zellen; VHL-Expressionsraten von  $> 20\%$  traten nicht auf. Unter den 8 NZK mit einem  $AS_{Ki-67} = 1$  waren 5 VHL-negativ (62,5 %), 3 wiesen einen Anteil  $> 5\%$  VHL-exprimierender Zellen auf (37,5 %), eines davon bot sogar eine VHL-Expression von  $> 20\%$  (12,5 % der Gesamtzahl). Die ebenfalls 8 NZK mit einem  $AS_{Ki-67} = 2$  waren ohne Ausnahme VHL-positiv; 7 Tumoren (87,5 %) exprimierten das VHL-Protein in  $> 5\%$  der Zellen; 5 davon (62,5 % der Gesamtzahl) sogar in  $> 20\%$  der Zellen.

Entsprechend waren die VHL- und die Ki-67-Expression positiv miteinander assoziiert.

### 3.3.8 p53-Expression und Apoptosehäufigkeit

Von den 9 p53-negativen NZK waren 4 (44,4 %) auch TUNEL-negativ; eines der 5 TUNEL-positi-

Tab. 25 : Kreuztabelle zu p53-Expression und Apoptosehäufigkeit

	AS <sub>TUNEL</sub> = 0	AS <sub>TUNEL</sub> = 1	AS <sub>TUNEL</sub> = 2	AS <sub>TUNEL</sub> = 3	gesamt
AS <sub>p53</sub> = 0	4	4	1	-	9
AS <sub>p53</sub> = 1	2	1	-	1	4
AS <sub>p53</sub> = 2	4	-	1	-	5
AS <sub>p53</sub> = 3	3	1	-	1	5
gesamt	13	6	2	2	23

ven Karzinome zeigte einen AS<sub>TUNEL</sub> = 2 (11,1 % der Gesamtzahl).

Unter den 14 p53-positiven NZK betrug der TUNEL-negative Anteil 64,3 % (9 Fälle); von den 5 apoptotisch aktiven Tumoren boten 2 Fälle (14,3 % der Gesamtzahl) einen AS<sub>TUNEL</sub> = 1, 1 Fall (7,1 % der Gesamtzahl) einen AS<sub>TUNEL</sub> = 2 und 2 Fälle (14,3 % der Gesamtzahl) einen AS<sub>TUNEL</sub> = 3. 10 NZK boten > 5 % p53-exprimierender Zellen, davon waren 7 Tumoren (70 %) TUNEL-negativ; jeweils 1 Fall (je 10 %) zeigten einen AS<sub>TUNEL</sub> = 1, 2 respektive 3. Von 5 NZK mit einem AS<sub>p53</sub> = 3 wiesen 3 Tumoren (60 %) keine nennenswerte apoptotische Aktivität auf; jeweils 1 Fall (je 20 %) bot einen AS<sub>TUNEL</sub> = 1 bzw. 3.

Von den 13 NZK, die einen Anteil von ≤ 1 % apoptotischer Zellen aufwies, waren 33,8 % (3 Fälle) p53-negativ; 2 Fälle (15,4 %) boten einen AS<sub>p53</sub> = 1, 4 Fälle (30,8 %) einen AS<sub>p53</sub> = 2 und 3 Fälle (23,1 %) einen AS<sub>p53</sub> = 3. Die 10 TUNEL-positiven NZK setzten sich zu 50 % aus p53-negativen Tumoren zusammen; die 5 p53-positiven Fälle bestanden aus 2 NZK (20 % der Gesamtzahl) mit einem AS<sub>p53</sub> = 1, einem NZK (10 % der Gesamtzahl) mit einem AS<sub>p53</sub> = 2 und 2 NZK (20 % der Gesamtzahl) mit einem AS<sub>p53</sub> = 3. 4 NZK zeigten einen Anteil von > 5 % apoptotischer Zellen; davon war eines (25 %) p53-negativ; jeweils ein Tumor zeigte einen AS<sub>p53</sub> von 1, 2 respektive 3. Einen Anteil von > 20 % apoptotischer Zellen wiesen nur 2 NZK auf, diese setzten sich aus einem Tumor mit einem AS<sub>p53</sub> = 1 und einem weiteren mit einem AS<sub>p53</sub> = 3 zusammen.

Es zeigte sich also, dass von den p53-negativen NZK über die Hälfte TUNEL-positiv war und umgekehrt; die p53-positiven Tumoren waren in etwa 2/3 der Fälle TUNEL-negativ und die TUNEL-positiven NZK zu 50 % p53-negativ. Somit zeichnete sich tendenziell eine inverse Korrelation ab, wobei allerdings diejenigen NZK, die einen hohen Anteil apoptotischer Zellen aufwiesen (AS<sub>TUNEL</sub> ≥ 2), höhere Anteile p53-positiver Zellen boten – hierbei handelte es sich jedoch um eine sehr geringe Fallzahl (4 Fälle).

### 3.3.9 p53-Expression und VHL-Expression

Von 9 p53-negativen NZK zeigten 5 (55,6 %) einen vollständigen VHL-Expressionsverlust, von den 4 VHL-exprimierenden NZK dieser Gruppe zeigten 3 (33,3% der Gesamtzahl) > 5 % VHL-positiver Zellen; eine VHL-Expressionsrate von > 20 % wurde in dieser Gruppe nicht beobachtet.

Demgegenüber zeigten 10 der 14 p53-positiven NZK (71,4 %) > 1 % VHL-exprimierender Zellen; dabei boten



64,3 % der Gesamtzahl einen VHL-positiven Anteil von >5 % der Zellen,

**Tab. 26:** Kreuztabelle zu p53- und VHL-Expression

	AS <sub>VHL</sub> = 0	AS <sub>VHL</sub> = 1	AS <sub>VHL</sub> = 2	AS <sub>VHL</sub> = 3	AS <sub>VHL</sub> = 4	gesamt
AS <sub>p53</sub> = 0	5	1	3	-	-	9
AS <sub>p53</sub> = 1	1	-	2	1	-	4
AS <sub>p53</sub> = 2	3	-	-	2	-	5
AS <sub>p53</sub> = 3	-	1	1	2	1	5
gesamt	9	2	6	5	1	23

bei 42,9 % der Gesamtzahl handelte es sich um VHL-Expressionsraten von > 20 %. Unter den 10 NZK mit einer über 5%igen p53-Expression waren 7 Tumoren (70 %) VHL-positiv; insgesamt 6 NZK mit VHL-Expressionsraten von > 5 % und insgesamt 5 NZK mit einem VHL-exprimierenden Zellanteil von > 20 %. Die 5 NZK mit einem p53-positiven Zellanteil von > 20 % waren ausnahmslos VHL-positiv; der Anteil von Tumoren mit > 5 % VHL-Expression betrug hier mit 4 Fällen 80 %, der der NZK mit einem VHL-positiven Anteil von > 20 % der Zellen mit 3 Fällen 60 % der Gesamtzahl – auch das einzige NZK mit einem AS<sub>VHL</sub> = 4 fiel in diese Gruppe.

Einen vollständigen VHL-Expressionsverlust zeigten insgesamt 9 der untersuchten NZK. Diese rekrutierten sich zu 55,6 % aus p53-negativen Tumoren; 33,3 % (3 Fälle) zeigten VHL-Anfärbungsraten von > 5 % der Zellen, keines aber bot eine mehr als 20%ige VHL-Expression. Die 14 VHL-exprimierenden NZK waren zu 71,4 % p53-positiv (10 Fälle); insgesamt 7 NZK (50 % der Gesamtzahl) boten hier p53-Anfärbungsraten von > 5 % und 5 Tumoren (35,7 % der Gesamtzahl) von > 20 %. 12 NZK zeigten einen Anteil VHL-positiver Zellen von > 5 %; 9 von ihnen (75 %) waren gleichzeitig p53-positiv. 50 % der Gesamtzahl (6 Fälle) zeigten eine über 5%-ige p53-Expression; 33,3 % (4 Fälle) zeigten > 20 % p53-positiver Zellen. Von den 6 Fällen mit einer VHL-Expressionsrate von > 20 % war keines p53-negativ, vielmehr zeigten 83,3 % (5 Fälle) eine über 5%-ige und 50 % (3 Fälle) eine über 20%-ige p53-Expression.

Es deutete sich also eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß der p53- und dem der VHL-Expression an.

### 3.3.10 Apoptosehäufigkeit und VHL-Expression

Von den 13 NZK ohne nennenswerten apoptotischen

**Tab. 27 :** Kreuztabelle zu Apoptosehäufigkeit und VHL-Expression

	AS <sub>VHL</sub> = 0	AS <sub>VHL</sub> = 1	AS <sub>VHL</sub> = 2	AS <sub>VHL</sub> = 3	AS <sub>VHL</sub> = 4	gesamt
AS <sub>TUNEL</sub> = 0	4	2	3	3	1	13
AS <sub>TUNEL</sub> = 1	3	-	2	1	-	6
AS <sub>TUNEL</sub> = 2	2	-	-	-	-	2
AS <sub>TUNEL</sub> = 3	-	-	1	1	-	2
gesamt	9	2	6	5	1	23

Zellanteil ( $\leq 1$  % TUNEL-positiver Zellen) waren 69,2 % (9 Fälle) VHL-positiv; insgesamt 53,9 % (7 Fälle) zeigten > 5 %, 30,8 % (4 Fälle) > 20 % VHL-exprimierender Zellen.

Die 10 TUNEL-positiven Zellen ihrerseits waren nur zu 50 % auch VHL-positiv, hiervon wiesen alle Fälle eine über 5%-ige VHL-Expressionrate auf; 2 NZK (20 % der Gesamtgruppe) zeigten einen Anteil von > 20 % VHL-exprimierender Zellen. Die 4 NZK, die im TUNEL-Verfahren > 5 % apoptotischer Zellen boten, waren ebenfalls

nur zu 50 % VHL-positiv; dabei handelte es sich um 2 NZK, die > 20 % TUNEL-positive Zellen aufwiesen und einen  $AS_{VHL}$  von 2 bzw. 3 hatten.

Die 9 NZK mit einem  $AS_{VHL} = 0$  waren zu 55,6 % TUNEL-positiv (5 Fälle); 22,2 % der Gesamtzahl (2 Fälle) wiesen einen apoptotischen Zellanteil von > 5 % auf, ohne allerdings mehr als 20 % apoptotischer Zellen zu bieten. Unter den 14 VHL-exprimierenden NZK waren nur 5 (35,7 %) apoptotisch aktiv, 2 davon (14,3 % der Gesamtzahl) zeigten allerdings > 20 % TUNEL-positiver Zellen. Von den beiden letzteren fand sich eines unter den NZK mit einem  $AS_{VHL} = 2$ , das andere unter denen mit einem  $AS_{VHL} = 3$ . Die NZK mit einem  $AS_{VHL} = 1$  bzw. 4, die mit 2 bzw. einem Fall die schwächsten Untergruppen darstellten, waren alle TUNEL-negativ.

Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen VHL-Expression und apoptotischer Aktivität ließ sich nicht nachweisen. Tendenziell waren VHL-negative NZK häufiger apoptotisch aktiv.

### 3.4 Zusammenhänge der immunhistochemisch untersuchten Parameter mit Tumorgrad und pT-Stadium nach Dichotomisierung

#### 3.4.1 Zusammenhänge zwischen Tumorgrad und pT-Stadium

Von 17 pT1-NZK waren 15 (88,2 %) gut bzw. mäßig differenziert (G1 + G2), nur 2 Fälle (11,8 %) wiesen eine starke Entdifferenzierung auf (G3). Demgegenüber handelte es sich in der zusammengefassten Gruppe der pT2- und pT3a-NZK bei 4 von 6 Fällen (66,7%) um G3-Karzinome.

Die pT1-Tumoren zeigten eine signifikant geringere Entdifferenzierung als die lokal fortgeschrittenen Tumoren ( $p = 0,021$ ).

**Tab. 28:** Kreuztabelle zu pT-Stadium und histologischem Grading nach Dichotomisierung

	G1 + G2	G3	gesamt
pT1	15	2	17
pT2 + pT3a	2	4	6
gesamt	17	6	23

#### 3.4.2 Bcl-2-Expression

Unter den 17 gut bzw. mäßig differenzierten NZK (G1 + G2) fanden sich etwa gleich hohe Anteile von Karzinomen, die Bcl-2 in  $\leq 50\%$  respektive  $> 50\%$  der Zellen exprimierten. Demgegenüber zeigten von den 6 G3-NZK nur 2 Fälle (33,3 %) eine überdurchschnittliche Bcl-2-Expression.

Von 13 NZK mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$  waren 9 (69,2 %) G1- bzw. G2-Karzinome; unter den 10 NZK mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 1$  lag der Anteil der G1- und G2-Tumoren bei 80 % und somit geringfügig höher.

Tendenziell fanden sich Tumoren mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 1$  häufiger bei gut bzw. mäßig differenzierten NZK als bei entdifferenzierten, obschon dieser Zusammenhang nicht signifikant war ( $p = 0,66$ ).

**Tab. 29:** Kreuztabelle zu Bcl-2-Expression und histologischem Grading nach Dichotomisierung

	G1 + G2	G3	gesamt
$AS(d)_{Bcl-2} = 0$	9	4	13
$AS(d)_{Bcl-2} = 1$	8	2	10
gesamt	17	6	23

Unter den 17 pT1-NZK zeigten 10 (58,8%) einen  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$ , demgemäß waren bei 7 Fällen (41,2%)  $> 50\%$  der Zellen Bcl-2-positiv. Die Gruppe der pT2- und pT3a-NZK zeigte in jeweils 50 % der Fälle eine Bcl-2-Expression  $\leq$  respektive  $> 50\%$  der Zellen.

Von den insgesamt 13 NKZ mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$  waren 10 Fälle (76,9 %) pT1-Tumoren; unter den 10 NKZ mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 1$  traf dies auf 7 Fälle (70 %) zu.

Ein Zusammenhang zwischen pT-Stadium und Bcl-2-Expression ließ sich an Hand der dichotomisierten Daten nicht ersehen ( $p = 1,0$ ).

### 3.4.3 Ki-67-Expression

In der Gruppe der G1- und G2-NZK zeigten 10 von 17 Fällen (58,8 %) eine Ki-67-Expression in  $\leq 5\%$  der Fälle; entsprechend wiesen 41,2 % der Tumoren dieser Gruppe einen  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  auf. Unter den 6 G3-NZK zeigte nur eines (16,7 %) einem  $AS(d)_{Ki-67} = 1$ .

Von den 15 NKZ mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  waren 10 (66,7%) G1- und G2-Karzinome; unter den 8 Tumoren mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  betrug dieser Anteil 87,5 %.

Somit zeigten die entdifferenzierten NZK tendenziell eine niedrigere proliferative Aktivität als die gut bzw. mäßig differenzierten Tumoren, ohne dass dieser Unterschied allerdings statistische Signifikanz erreichte ( $p = 0,369$ ).

10 von 17 (58,8 %) der pT1-NZK zeigten einen  $AS(d)_{Ki-67} = 0$ ; in der Gruppe der pT2- und pT3a-NZK betrug dieser Anteil 83,3 %. Andersherum handelte es sich bei den 15 NKZ mit einer Ki-67-Expression in  $\leq 5\%$  der Zellen zu 66,7 % um pT1-NZK; unter den 8 Tumoren mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  fanden sich 7 pT1-Tumoren (87,5 %). Tendenzuell zeigten also die pT1-NZK eine höhere proliferative Aktivität als die lokal ausgedehnteren Tumoren; auch dieser Zusammenhang war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,369$ ).

### 3.4.4 p53-Expression

10 von 17 G1- und G2-NZK (58,8 %) zeigten einen  $AS(d)_{p53} = 0$ ; bei den G3-NZK betrug dieser Anteil 50 % (3 von 6 Fällen).

**Tab. 30:** Kreuztabelle zu Bcl-2-Expression und pT-Stadium nach Dichotomisierung

	pT1	pT2 + pT3a	gesamt
<b>AS(d)<sub>Bcl-2</sub> = 0</b>	10	3	13
<b>AS(d)<sub>Bcl-2</sub> = 1</b>	7	3	10
<b>gesamt</b>	17	6	23

**Tab. 31:** Kreuztabelle zu Ki-67-Expression und histologischem Grading nach Dichotomisierung

	G1 + G2	G3	gesamt
<b>AS(d)<sub>Ki-67</sub> = 0</b>	10	5	15
<b>AS(d)<sub>Ki-67</sub> = 1</b>	7	1	8
<b>gesamt</b>	17	6	23

**Tab. 32:** Kreuztabelle zu Ki-67-Expression und pT-Stadium nach Dichotomisierung

	pT1	pT2 + pT3a	gesamt
<b>AS(d)<sub>Ki-67</sub> = 0</b>	10	5	15
<b>AS(d)<sub>Ki-67</sub> = 1</b>	7	1	8
<b>gesamt</b>	17	6	23

Von den insgesamt 13 Tumoren mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$  waren 10 G1- und G2-NZK (76,9 %); unter den NZK mit einem  $AS(d)_{p53} = 1$  fand sich ein Anteil von 70 % G1- und G2-Karzinomen. Ein Zusammenhang zwischen p53-Expression und histologischem Grading ließ sich nach Dichotomisierung der Parameter also nicht feststellen ( $p = 1,0$ ).

**Tab. 33:** Kreuztabelle zu p53-Expression und histologischem Grading nach Dichotomisierung

	G1 + G2	G3	gesamt
$AS(d)_{p53} = 0$	10	3	13
$AS(d)_{p53} = 1$	7	3	10
<b>gesamt</b>	17	6	23

Auch die 17 pT1-NZK rekrutierten sich zu 58,8 % aus Tumoren, deren p53-Expressionsrate  $\leq 5$  % lag, während dieser Anteil bei den pT2- und pT3a-NZK 50 % (3 von 3) betrug. Unter den 13 Tumoren mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$  befanden sich 10 pT1-NZK (76,9 %); diese stellten unter den 10 NZK mit einem  $AS(d)_{p53} = 1$  einen Anteil von 70 %. Auch zwischen pT-Stadium und p53-Expression ließ sich nach Dichotomisierung kein Zusammenhang darstellen ( $p = 1,0$ ).

**Tab. 34:** Kreuztabelle zu p53-Expression und pT-Stadium nach Dichotomisierung

	pT1	pT2 + pT3a	gesamt
$AS(d)_{p53} = 0$	10	3	13
$AS(d)_{p53} = 1$	7	3	10
<b>gesamt</b>	17	6	23

### 3.4.5 Apoptosenachweis im TUNEL-Verfahren

Von 17 G1- und G2-NZK zeigten 5 (29,4 %) einen Anteil von  $> 1$  % TUNEL-positiver Zellen. Bei den 6 G3-NZK betrug dieser Anteil 83,3 %. Umgekehrt fanden sich unter den 13 Tumoren mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  12 G1- und

**Tab. 35:** Kreuztabelle zu apoptotischer Aktivität und histologischem Grading nach Dichotomisierung

	G1 + G2	G3	gesamt
$AS(d)_{TUNEL} = 0$	12	1	13
$AS(d)_{TUNEL} = 1$	5	5	10
<b>gesamt</b>	17	6	23

G2-NZK (92,3 %), während sich die 10 Karzinome mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 1$  sich jeweils zu 50 % aus G1- und G2- bzw. G3-NZK zusammensetzten. Unter den histologisch stark entdifferenzierten NZK fand sich also ein deutlich höherer Anteil apoptotisch aktiver Tumoren als bei G1- und G2-Karzinomen; NZK mit einem Anteil apoptotischer Zellen von  $\leq 1$  % waren ganz überwiegend G1- und G2-Tumoren. Dieser Zusammenhang war hinsichtlich der statistischen Signifikanz grenzwertig ( $p = 0,052$ ).

Von den 17 pT1-NZK zeigten 10 (58,8 %) eine apoptotische Aktivität von  $\leq 1$  %, während dieser Anteil bei den pT2- und pT3a-NZK 50 % (3 von 3) betrug. Unter den insgesamt 13 Tumoren mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  fanden sich 10 pT1-NZK

**Tab. 36:** Kreuztabelle zu apoptotischer Aktivität und pT-Stadium nach Dichotomisierung

	pT1	pT2 + pT3a	gesamt
$AS(d)_{TUNEL} = 0$	10	3	13
$AS(d)_{TUNEL} = 1$	7	3	10
<b>gesamt</b>	17	6	23

(76,9 %); diese stellten unter den 10 NZK mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 1$  einen Anteil von 70 %. Zwischen pT-Stadium und apoptotischem Zellanteil ließ sich also auch nach Dichotomisierung kein Zusammenhang darstellen ( $p = 1,0$ ).

### 3.4.6 VHL-Expression

12 von 17 G1- und G2-NZK (70,6 %) zeigten einen  $AS(d)_{VHL} = 0$ ; unter den 6 G3-NZK traf dies auf 5 Fälle (83,3 %) zu. Unter den insgesamt 17 NZK mit einer VHL-Expression in  $\leq 20$  % der Zellen handelte es sich in 70,6 % um G1- und G2-Karzinome; dieser Anteil betrug unter den 6 NZK mit einem  $AS(d)_{VHL} = 1$  83,3 %. Ein Zusammenhang zwischen histologischem Grading und VHL-Expression ließ sich nach Dichotomisierung nicht mehr erkennen ( $p = 1,0$ ).

**Tab. 37:** Kreuztabelle zu VHL-Expression und histologischem Grading nach Dichotomisierung

	G1 + G2	G3	gesamt
$AS(d)_{VHL} = 0$	12	5	17
$AS(d)_{VHL} = 1$	5	1	6
gesamt	17	6	23

Von 17 pT1-NZK exprimierten 12 (70,6 %) das VHL-Protein in  $\leq 20$  % der Zellen; bei den pT2- und pT3a-NZK betrug dieser Anteil 83,3 % (5 von 6 Fällen). Von den insgesamt 17 NZK mit einem  $AS(d)_{VHL} = 0$  rekrutierten sich 70,6 % aus der Gruppe der G1- und G2-Karzinome (12 Fälle); unter den 6 NZK mit einem  $AS(d)_{VHL} = 1$  traf dies für 83,3 % (5 Fälle) zu. Auch zwischen pT-Stadium und VHL-Expression war nach Dichotomisierung kein Zusammenhang mehr erkennbar ( $p = 1,0$ ).

**Tab. 38:** Kreuztabelle zu VHL-Expression und pT-Stadium nach Dichotomisierung

	pT1	pT2 + pT3a	gesamt
$AS(d)_{VHL} = 0$	12	5	17
$AS(d)_{VHL} = 1$	5	1	6
gesamt	17	6	23

## 3.5 Zusammenhänge der immunhistochemisch untersuchten Marker untereinander nach Dichotomisierung

### 3.5.1 Bcl-2-Expression und Ki-67-Expression

Von den 13 NZK mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$  zeigten 9 (69,2 %) einen Anteil von  $\leq 5$  % Ki-67-positiver Zellen; die restlichen 4 Tumoren (30,8 %) zeigten eine über dem Median liegende proliferative Aktivität

**Tab. 39:** Kreuztabelle zu Bcl-2- und Ki-67-Expression nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{Ki-67} = 0$	$AS(d)_{Ki-67} = 1$	gesamt
$AS(d)_{Bcl-2} = 0$	9	4	13
$AS(d)_{Bcl-2} = 1$	6	4	10
gesamt	15	8	23

(> 5 % Ki-67-exprimierender Zellen). Unter den 10 NZK mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 1$  ließ sich bei 6 Fällen (60 %) eine Ki-67-Expression in  $\leq 5$  % der Zellen nachweisen; bei den übrigen 4 Fällen (40 %) lag ein  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  vor. Andersherum setzten sich die 15 NZK mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  zu 60 % aus Tumoren zusammen, die eine Bcl-2-Expression in  $\leq 50$  % der Zellen aufweisen; bei den 8 NZK mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  lag dieser Anteil bei 50 %. Unter den NZK, deren Ki-67-positiver Zellanteil über dem Median lag, fand sich also auch ein etwas höherer Anteil von Tumoren, deren Bcl-2-Expression über dem Medianwert lag als in der Gruppe der NZK mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  und umgekehrt. Diese zahlenmäßigen Unterschiede waren jedoch gering und erreichten keine statistische Signifikanz ( $p = 0,685$ ).

### 3.5.2 Bcl-2-Expression und p53-Expression

Unter den NZK mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$  handelte es sich in 61,5 % um Tumoren, die p53 in  $\leq 5$  % der Zellen exprimierten (8 von 13 Fällen), während dieser Anteil unter den NZK mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 1$  50 % betrug (5 von 10 Fällen). Ebenso wiesen 61,5 % der Karzinome mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$  eine Bcl-2-Expression in weniger als 50 % der Zellen auf, während dies nur bei 50 % der NZK mit einem  $AS(d)_{p53} = 1$  zutraf. Obgleich also bei einem  $AS(d) = 1$  des einen Markers der Anteil von NZK, die den jeweils anderen Marker ebenfalls mit einem  $AS(d) = 1$  exprimierten, etwas höher lag als bei einem  $AS(d) = 0$ , waren diese Unterschiede geringfügig und statistisch nicht signifikant ( $p = 0,685$ ).

**Tab. 40:** Kreuztabelle zu Bcl-2- und p53-Expression nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{p53} = 0$	$AS(d)_{p53} = 1$	gesamt
$AS(d)_{Bcl-2} = 0$	8	5	13
$AS(d)_{Bcl-2} = 1$	5	5	10
gesamt	13	10	23

### 3.5.3 Bcl-2-Expression und Apoptosehäufigkeit

Unter den NZK, die Bcl-2 in  $\leq 50$  % der Zellen exprimierten, wiesen jeweils etwa die Hälfte der Tumoren einen  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  bzw. 1 auf (6 von 13 respektive 7 von 13 Fällen). Demgegenüber lag der Anteil von Tumoren mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 1$  an den NZK mit  $> 50$  % Bcl-2-positiven Zellen nur bei 30 % (3 von 10 Fällen).

**Tab. 41:** Kreuztabelle zu Bcl-2-Expression und apoptotischer Aktivität nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{TUNEL} = 0$	$AS(d)_{TUNEL} = 1$	gesamt
$AS(d)_{Bcl-2} = 0$	6	7	13
$AS(d)_{Bcl-2} = 1$	7	3	10
gesamt	13	10	23

Eine über dem Median liegende Bcl-2-Expression schien also tendenziell mit einer geringeren Apoptosehäufigkeit vergesellschaftet zu sein, ohne dass dieser Zusammenhang statistische Signifikanz erreichte ( $p = 0,402$ ).

### 3.5.4 Bcl-2-Expression und VHL-Expression

Unter den 13 NZK mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$  zeigten 10 Fälle auch einen  $AS(d)_{VHL} = 0$  (76,9 %); bei den 10 NZK mit  $> 50$  % Bcl-2-positiver Zellen traf dies für 7 Tumoren zu (70 %). 10 von insgesamt 17 Tumoren (58,8 %) mit einer VHL-Expression in  $\leq 20$  % der Zellen wiesen einen  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$  auf; dieser Anteil betrug unter den 6 Karzinomen mit einer über dem Median liegenden VHL-Expression 50 % (3 von 3 Fällen). Ein Zusammenhang zwischen dichotomisierter VHL- und Bcl-2-Expression ließ sich nicht erkennen ( $p = 1,0$ ).

**Tab. 42:** Kreuztabelle zu Bcl-2- und VHL-Expression nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{VHL} = 0$	$AS(d)_{VHL} = 1$	gesamt
$AS(d)_{Bcl-2} = 0$	10	3	13
$AS(d)_{Bcl-2} = 1$	7	3	10
gesamt	17	6	23

### 3.5.5 Ki-67-Expression und p53-Expression

11 von 15 NZK mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  zeigten auch einen  $AS(d)_{p53} = 0$  (73,3 %).

Demgegenüber wiesen 60 % der Tumoren mit einer Ki-67-Expression in  $> 5$  % der Zellen auch eine über dem Median liegende p53-

Expression auf (8 von 10 Fällen). Andersherum lag unter den insgesamt 13 NZK, die einen  $AS(d)_{p53} = 0$  aufwiesen, der Anteil von Tumoren mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  bei 84,6 % (11 von 13 Fällen), während 6 von 10 NZK mit einer über dem Median liegenden p53-Expression einen  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  aufwiesen (60 %). Auch nach Dichotomisierung bestand also eine positive Korrelation zwischen der p53- und Ki-67-Expression, die statistisch signifikant war ( $p = 0,039$ ).

**Tab. 43:** Kreuztabelle zu Ki-67- und p53-Expression nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{p53} = 0$	$AS(d)_{p53} = 1$	gesamt
$AS(d)_{Ki-67} = 0$	11	4	15
$AS(d)_{Ki-67} = 1$	2	6	8
gesamt	13	10	23

### 3.5.6 Ki-67-Expression und Apoptosehäufigkeit

Die 15 NZK mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  rekrutierten sich jeweils zu etwa der Hälfte der Fälle aus Tumoren mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  (8 Fälle = 53,3 %) respektive 1 (7 Fälle = 46,7 %); unter

den 8 NZK mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  betragen diese Anteile 62,5 % respektive 37,5 %.

Von insgesamt 13 NZK mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  wiesen 8 Tumoren einen  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  auf (61,5 %); unter den 10 NZK mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 1$  traf dies auf einen mit 70 % vergleichbaren Anteil der Fälle zu. Ein Zusammenhang zwischen proliferativer und apoptotischer Aktivität ließ sich nicht erkennen ( $p = 1,0$ ).

**Tab. 44:** Kreuztabelle zu Ki-67-Expression und apoptotischer Aktivität nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{TUNEL} = 0$	$AS(d)_{TUNEL} = 1$	gesamt
$AS(d)_{Ki-67} = 0$	8	7	15
$AS(d)_{Ki-67} = 1$	5	3	8
gesamt	13	10	23

### 3.5.7 Ki-67-Expression und VHL-Expression

14 von 15 NZK mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  wiesen auch einen  $AS(d)_{VHL} = 0$  auf (93,3 %), während dies unter den 8 Tumoren mit einem  $AS(d)_{Ki-67} = 1$  nur auf 3 Fälle (37,5 %) zutraf.

Die insgesamt 17 NZK mit einem  $AS(d)_{VHL} =$

0 rekrutierten sich zu 82,4 % (14 Fälle) aus Tumoren, die auch einen  $AS(d)_{Ki-67} = 0$  zeigten; demgegenüber betrug dieser Anteil unter den 6 Karzinomen mit einem  $AS(d)_{VHL} = 1$  nur 16,7 % (1 Fall).

Nach Dichotomisierung ergab sich also ein statistisch signifikanter positiver Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Ki-67- und dem der VHL-Expression ( $p = 0,009$ ).

**Tab. 45:** Kreuztabelle zu Ki-67- und VHL-Expression nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{VHL} = 0$	$AS(d)_{VHL} = 1$	gesamt
$AS(d)_{Ki-67} = 0$	14	1	15
$AS(d)_{Ki-67} = 1$	3	5	8
gesamt	17	6	23

### 3.5.8 p53-Expression und Apoptosehäufigkeit

Die 13 NZK mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$  setzten sich zu annähernd gleichen Teilen aus Tumoren mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  (6 Fälle, 46,2 %) und solchen mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 1$  (7 Fälle, 53,8 %) zusammen; demgegenüber rekrutierten sich die 10 NZK mit einem  $AS(d)_{p53} = 1$  zu 70 % aus Tumoren mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$ .

Die gleichen Zahlenverhältnisse galten bei Betrachtung der insgesamt 13 NZK mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  bzw. 1: Bei ersteren fand sich ein Anteil von 46,2 % an Tumoren mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$ ; bei letzteren betrug dieser 70 %. Auch nach Dichotomisierung schien also eine höhere p53-Expression mit einer niedrigeren apoptotischen Aktivität assoziiert zu sein und umgekehrt, ohne dass dieser Zusammenhang jedoch statistisch signifikant war ( $p = 0,402$ ).

**Tab. 46:** Kreuztabelle zu p53-Expression und apoptotischer Aktivität nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{TUNEL} = 0$	$AS(d)_{TUNEL} = 1$	gesamt
$AS(d)_{p53} = 0$	6	7	13
$AS(d)_{p53} = 1$	7	3	10
gesamt	13	10	23

### 3.5.9 p53-Expression und VHL-Expression

12 von 13 NZK mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$  wiesen auch einen  $AS(d)_{VHL} = 0$  auf (92,3 %); dieser Anteil betrug unter den 10 Karzinomen mit einem  $AS(d)_{p53} = 1$  nur 50 % (5 Fälle). Andersherum rekrutierten sich die insgesamt 17 NZK mit einem  $AS(d)_{VHL} = 0$  zu 70,6 % (12 Fälle) aus Tumoren mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$ , wohingegen dies unter den 6 NZK mit einem  $AS(d)_{VHL} = 1$  nur auf 16,7 % (1 Fall) zutraf.

Auch nach Dichotomisierung wiesen also diejenigen NZK mit ausgeprägteren VHL-Expressionsverlusten geringere p53-Überexpressionsraten auf als Tumoren, deren VHL-positiver Zellanteil über dem Median lag, und umgekehrt. Dieser Zusammenhang erreichte allerdings knapp keine statistische Signifikanz ( $p = 0,052$ ).

**Tab. 47:** Kreuztabelle zu p53- und VHL-Expression nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{VHL} = 0$	$AS(d)_{VHL} = 1$	gesamt
$AS(d)_{p53} = 0$	12	1	13
$AS(d)_{p53} = 1$	5	5	10
gesamt	17	6	23

### 3.5.10 Apoptosehäufigkeit und VHL-Expression

Die 13 NZK mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  wiesen in 69,2 % der Fälle (9 Tumoren) einen  $AS(d)_{VHL} = 0$  auf; unter den 10 NZK mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 1$  traf dies auf 8 Karzinome (80%) zu. Umgekehrt rekrutierten sich die insgesamt 17 NZK mit einem  $AS(d)_{VHL} = 0$  zu annähernd gleichen Teilen aus Tumoren mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 0$  respektive 1 (52,9 % vs. 47,1%), während von den 6 NZK mit einem  $AS(d)_{VHL} = 1$  nur 2

**Tab. 48:** Kreuztabelle zu apoptotischer Aktivität und VHL-Expression nach Dichotomisierung

	$AS(d)_{VHL} = 0$	$AS(d)_{VHL} = 1$	gesamt
$AS(d)_{TUNEL} = 0$	9	4	13
$AS(d)_{TUNEL} = 1$	8	2	10
gesamt	17	6	23



Tumoren (33,3 %) eine über dem Median liegende apoptotische Aktivität aufwiesen. Ein überzeugender Zusammenhang zwischen VHL-Expression und apoptotischer Aktivität bestand demnach nicht ( $p = 0,66$ ); eine schwache Tendenz bestand im Sinne einer reziproken Assoziation.

### 3.6 Prognostische Aussagekraft: Statistischer Einfluss der untersuchten Parameter auf das rezidivfreie Überlebensintervall

19 der 23 untersuchten Fälle gingen in die Kaplan-Meier-Analyse ein. Bei den ausgeschlossenen Fällen handelte es sich um die drei perioperativ verstorbenen Patienten (Fälle 7, 11 und 23) sowie um den primär metastasierten Patienten (Fall 13).

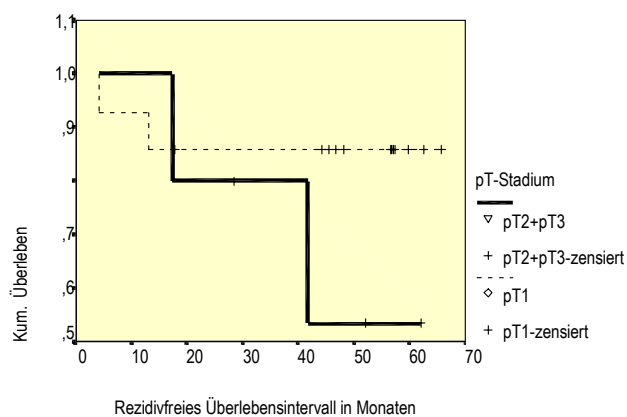
Untersucht wurde das rezidivfreie Überlebensintervall, also des Zeitraums nach primär kurativ intendierter Nephrektomie bis zur Diagnose des ersten tumorspezifischen Neuereignisses, also eines Progresses im Sinne von Lokalrezidiven bzw. Fernmetastasierung.

#### 3.6.1 Histologisches Grading und pT-Stadium

##### pT-Stadium

Von den 14 Patienten mit pT1-Tumoren erlitten 2 (14,3%) einen Tumorprogress; dabei handelte es sich in einem Fall um Fernmetastasen und im anderen Fall um ein Lokalrezidiv. In der Gruppe der 5 pT2/pT3-Tumoren traten ebenfalls 2 (40%) Progressfälle, hier jeweils im Sinne von Fernmetastasierungen, auf.

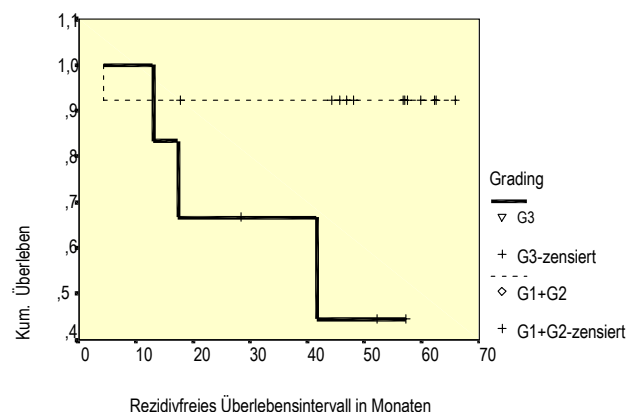
Zwar war in der Gruppe der NZK höherer Primärtumorgroße der prozentuale Anteil von Progressfällen höher als in der Gruppe der pT1-Tumoren; dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Log rank-Wert 1,17;  $p = 0,2788$ ).



**Abb. 34:** Kaplan-Meier-Analyse: Rezidivfreie Überlebensintervalle, verglichen an Hand des dichotomisierten pT-Stadiums

### Histologisches Grading

Unter den 13 G1/G2-Tumoren fand sich 1 Fall (7,7%), der in der Nachbeobachtungszeit einen Tumorprogress im Sinne einer Fernmetastasierung bot. Demgegenüber entwickelten 3 der 6 G3-Fälle (50%) einen Krankheitsprogress (1 Lokalrezidiv, 2 Fernmetastasierungen). Diese Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant (Log rank-Wert 4,17;  $p = 0,0412$ ).

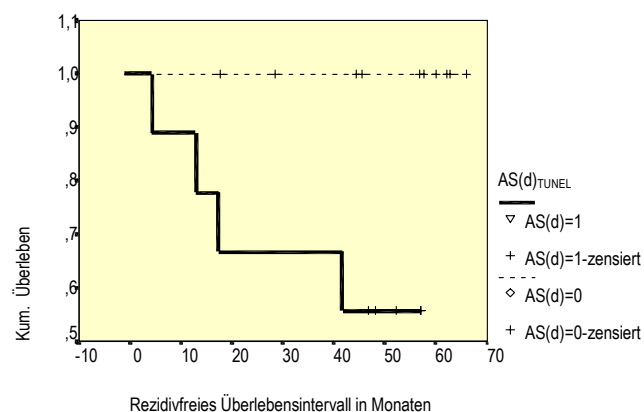


**Abb. 35:** Kaplan-Meier-Analyse: Rezidivfreie Überlebensintervalle, verglichen an Hand des dichotomisierten nukleären Gradings.

### 3.6.2 Die immunhistochemisch untersuchten Parameter

#### Apoptoseverhalten

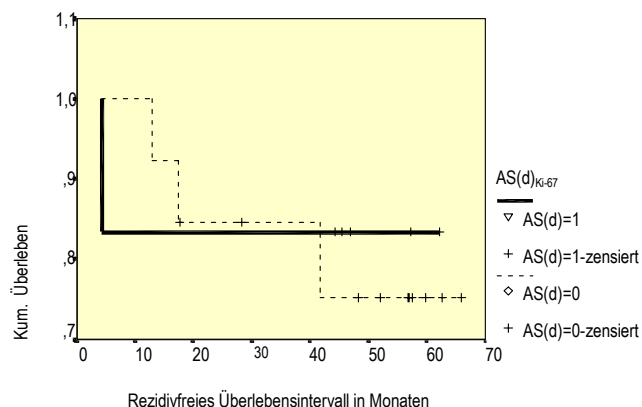
Keiner der 10 Patienten, die im Nachweisverfahren für apoptotische Zellen mit dem TUNEL-Test einen dichotomisierten Anfärbungsscore von 0 (bis 1% angefärbter Zellen) aufwiesen, entwickelte während der Nachbeobachtungszeit einen Krankheitsprogress. Demgegenüber fanden sich unter den 9 Fällen mit einem  $AS(d)_{TUNEL} = 1$  4 Patienten (44,4%), die eine Fernmetastasierung bzw. einen Lokalrezidiv erlitten; ein Unterschied, der von statistischer Signifikanz war (Log rank-Wert 5,11;  $p = 0,0238$ ).



**Abb. 36:** Kaplan-Meier-Analyse: Rezidivfreie Überlebensintervalle, verglichen an Hand des  $AS(d)_{TUNEL}$ .

### Ki-67-Expression

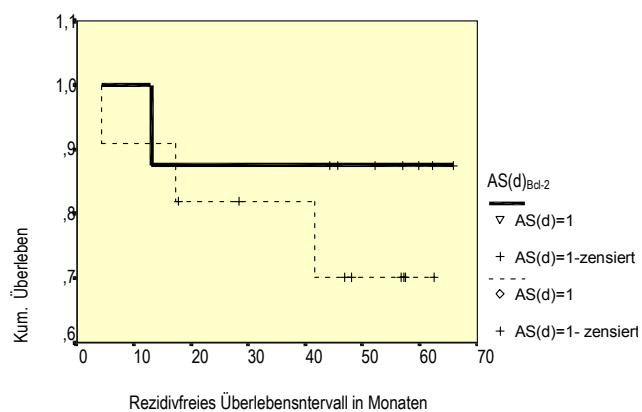
Bei 3 von 13 Patienten mit  $AS(d)_{Ki-67} = 0$ -Tumoren (23,1%) zeigte sich im Laufe der Nachbeobachtungszeit ein Krankheitsprogress; unter den 6  $AS(d)_{Ki-67} = 1$ -Fällen bot nur 1 Patient im Verlauf eine Fernmetastasierung (16,7%). Prozentual lag der Anteil der Progressfälle bei Tumoren, die eine Ki-67-Expression in bis zu 5% der Tumorzellen aufwiesen, also geringfügig höher als bei jenen NZK, deren Ki-67-Expression höher lag; dieser Unterschied erschien jedoch unerheblich und war statistisch nicht signifikant (Log rank 0,07;  $p = 0,7910$ ).



**Abb. 37:** Kaplan-Meier-Analyse: Rezidivfreie Überlebensintervalle, verglichen an Hand des  $AS(d)_{Ki-67}$

### Bcl-2-Expression

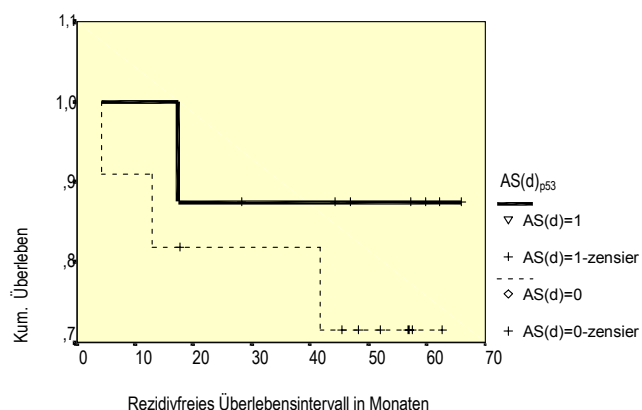
Das Anfärbungsverhalten für das Bcl-2-Antigen hatte keinen signifikanten Einfluss auf das rezidivfreie Überlebensintervall. 27,3 % (3 von 11) der Patienten, deren Primärtumor einen  $AS(d)_{Bcl-2} = 0$  (bis 50% positiv exprimierender Zellen) aufwiesen, erlitten im Laufe der Nachbeobachtungszeit eine Fernmetastasierung. Unter den 8 Fällen mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 1$  (> 50% exprimierender Zellen) trat bei 1 Patienten (12,5%) primär ein Lokalrezidiv auf. Der Log rank-Wert betrug 0,61 ( $p = 0,4330$ ).



**Abb. 38:** Kaplan-Meier-Analyse: Rezidivfreie Überlebensintervalle, verglichen an Hand des  $AS(d)_{Bcl-2}$

### p53-Expression

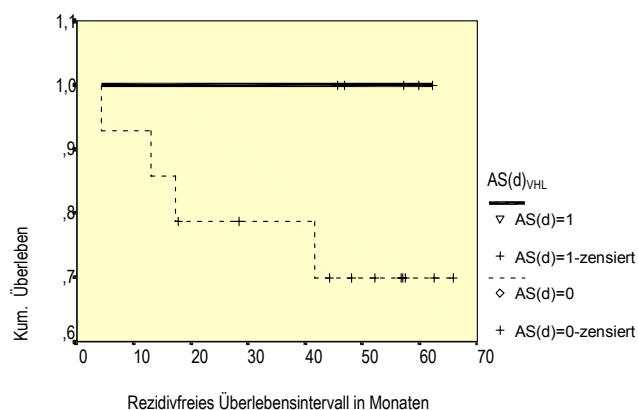
3 von 11 (27,3%) der Fälle mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$ , also einem Anteil von bis zu 5% p53-positiver Zellen, entwickelten im Beobachtungszeitraum einen Krankheitsprogress; bei den 8 Patienten mit einer p53-Expression von > 5% wies einer (12,5%) im Verlauf eine Fernmetastasierung auf. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Log rank-Wert 0,59;  $p = 0,4410$ ).



**Abb. 39:** Kaplan-Meier-Analyse: Rezidivfreie Überlebensintervalle, verglichen an Hand des  $AS(d)_{p53}$

### VHL-Expression

Unter den 14 untersuchten Fällen mit einem  $AS(d)_{VHL} = 0$  (bis 20% positiv markierter Zellen) fanden sich alle 4 Progressfälle (28,6%); dementsprechend erlitt keiner der 5 Patienten, deren Primärtumoren einen Anteil von > 20% VHL-exprimierender Zellen aufwies, im Beobachtungszeitraum ein Rezidiv respektive eine Fernmetastasierung. Nichtsdestoweniger erwies sich dieser Unterschied im DFS als nicht signifikant (Log rank-Wert 1,71;  $p = 0,1911$ ), was sich durch die starke zahlenmäßige Differenz zwischen beiden Gruppen erklären lässt.



**Abb. 40:** Kaplan-Meier-Analyse: Rezidivfreie Überlebensintervalle, verglichen an Hand des dichotomisierten Anfärbungsscores für pVHL

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion von Material und Methoden

Limitiert wurden die hier beschriebenen Untersuchungen durch die relativ geringe Fallzahl (23 klarzellige NZK). So war keine statistische Auswertung der Zusammenhänge zwischen pT-Stadium nach UICC, 3-stufigem Grading und immunhistochemisch untersuchten Markern im 5-stufigen Anfärbungsscore möglich, da der sich anbietende  $\chi^2$ -Test auf Grund der kleinen Fallzahl nicht anwendbar war.

Nach Dichotomisierung war eine statistische Auswertung der Korrelationen der o.g. Faktoren durchführbar, da bei den so entstandenen 2x2-Kreuztabellen der Fisher-Test anwendbar war. Auch die Kaplan-Meier-Analysen führten mit dichotomisiertem Datensatz zu verwertbaren Ergebnissen. Dennoch bleibt anzumerken, dass bei einem so begrenzten Untersuchungsgut nicht unbedingt von einer Repräsentativität der Fälle ausgegangen werden kann. Zwar können auch bei Studien mit größeren Fallzahlen im Vergleich zur „Gesamtpopulation“ der klarzelligen NZK Verzerrungen auftreten; generell ist aber mit zunehmenden Fallzahlen bei homogenem Untersuchungsgut auch eine größere Repräsentativität zu erwarten.

Hinsichtlich der Homogenität der hier untersuchten NZK ist anzumerken, dass der einzige primär metastasierte Fall Nr. 13 zwar von der Kaplan-Meier-Analyse ausgeschlossen, bei der Betrachtung der Zusammenhänge zwischen immunhistochemischen und klinisch-pathologischen Parametern jedoch berücksichtigt wurde. Hinsichtlich der Ermittlung des medianen Anfärbungsscores der immunhistochemisch untersuchten Marker wie auch des medianen histologischen Gradings und pT-Stadiums ergaben sich bei Ein- und Ausschluss des Falls Nr. 13 jedoch identische Resultate.

Allgemein ist zu bemerken, dass es in der Literatur keine einheitliche Vorgehensweise zur Auswertung immunhistochemisch untersuchter Parameter gibt. Einige Autoren benutzten einen semiquantitativen Ansatz ähnlich dem hier verwandten [68, 140]; vor allem in größeren Untersuchungen werden die beobachteten Expressionsraten oftmals als stetige Variablen im Sinne eines „labelling index (LI)“ erfasst [1, 20, 24, 47, 48, 49, 52, 64, 82, 94, 128, 130, 131, 149, 151, 152], eine Vorgehensweise, die bei dem begrenzten Untersuchungsgut der vorliegenden Arbeit nicht angemessen erschien. Andere Studien bedienten sich - ebenfalls dichotomer - Einteilungen im Sinne von „Expression vs. Nicht-Expression“, wobei hier vielfach unterschiedliche Auffassungen herrschten, ab welchem Anteil exprimierender Zellen die untersuchten Tumoren als positiv für einen immunhistochemischen Marker anzusehen sind.

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Dichotomisierungsverfahren geht quasi von der Existenz eines „üblichen“, meistvertretenen Expressionslevels aus, das sich im Medianwert des hier verwandten AS für den jeweils betrachteten Marker im Gesamtuntersuchungsgut ausdrückt. AS, die über dem markerspezifischen Medianwert liegen, werden als „ungewöhnlich stark“ betrachtet und den übrigen Fällen gegenübergestellt. Ganz allgemein kann aber auch hierbei auf Grund der geringen Fallzahl nicht davon ausgegangen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Expressionsmuster repräsentativ sind; in größeren Studien fänden sich möglicherweise differente mediane Anfärbungsscores. Zudem wäre bei deutlich höheren Fallzahlen auch eine Dichotomisierung an Hand des arithmetischen Mittels diskutabel.

Insbesondere hinsichtlich der VHL-Expression ist die verwandte Dichotomisierungsstrategie „Neuland“. Grundsätzlich kann von einer starken VHL-Expression in normalen proximalen renalen Tubulusepithelien ausgegangen werden [69]. Obwohl eine Vielzahl molekulargenetischer Arbeiten existieren, die Alterationen des VHL-Gens untersuchten [7, 9, 10, 14, 17, 27, 34, 43, 57, 58, 61, 84, 121, 138, 147], gibt es in der mir vorliegenden Literatur keine Studie, die an Hand des immunhistochemischen pVHL-Nachweises das Ausmaß der VHL-Expressionsverluste bei klarzelligen NZK beleuchtet hat. Da es als gesichert anzusehen ist, dass 60 - 85 % aller klarzelligen NZK VHL-Funktionsverluste durch Mutationen oder Hypermethylierungen aufweisen [23, 34, 84, 147], der VHL-Status innerhalb ein und desselben NZK aber heterogen sein kann [84], ist es m.E. jedoch durchaus naheliegend, dem Ausmaß einer VHL-„Restexpression“ innerhalb eines NZK Beachtung zu schenken. In diesem Kontext stellt die vorliegende Arbeit einen ersten Versuch dar, sich der diagnostischen und prognostischen Wertigkeit der VHL-Expression auf immunhistochemischem Wege zu nähern; inwieweit diese Vorgehensweise Bestand haben kann, bleibt in Zukunft zu evaluieren.

Auch die in dieser Arbeit auswertungsrelevanten klinisch-pathologischen Faktoren – histologisches Grading und pT-Stadium – wurden dem genannten Dichotomisierungsverfahren an Hand des Medianwertes unterzogen. Hierbei könnte insbesondere die Zusammenfassung pT2- und pT3a-Tumoren als eine den pT1-NZK gegenübergestellte Gruppe auf Skepsis stoßen. Bei den pT2- handelt es sich wie bei den pT1-NZK um organbeschränkte Primärtumoren, während das Stadium pT3a bereits eine Infiltration der Nebenniere oder der perirenenalen Fettkapsel beschreibt. Allerdings wird im letzteren Falle die Gerota'sche Faszie nicht überschritten, und auch ein makroskopischer Einbruch in die großen Gefäße hat nicht stattgefunden, so dass die Zusammenfassung der Stadien pT2 und pT3a als *per continuitatem* relativ weit fortgeschrittene Primärtumoren rechtfertigbar erscheint.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Färbemuster der immunhistochemischen Faktoren

Die beobachtete insgesamt niedrige **apoptotische** Aktivität der untersuchten NZK mit einem medianen AS = 0 und einem maximalen AS = 3 in nur 2 von 23 Fällen entspricht weitgehend den Ergebnissen anderer Autoren, die – allerdings bei NZK-Kollektiven unterschiedlicher Subtypen – ähnliche Verteilungsmuster gefunden hatten [52, 64, 134, 131]. Zu etwas anderen Resultaten kamen *Zhang* und *Takenaka* [151], die bei 70 NZK apoptotische Indices von 0,9 – 3,4 % bei einem Median von 2,13 % beobachteten.

Der im Allgemeinen vorgefundene niedrige Anteil nachweisbar apoptotischer Zellen in NZK-Proben lässt jedoch nicht auf einen geringen Anteil apoptotischer Prozesse am Zellumsatz schließen, sondern widerspiegelt vielmehr die Tatsache, dass der apoptotische Zelltod sehr rasch abläuft und durch die baldige Phagozytierung der apoptotischen Körperchen keine Spuren hinterlässt [50, 112].

Die beobachtete niedrige **Ki-67**-Expression mit nahezu einem Drittel Ki-67-negativer Fälle (< 1 % angefärbter Zellen) bei einer insgesamt niemals > 20 % überschreitenden Ki-67-Expression hebt sich deutlich von den

Funden anderer Autoren ab, die weitaus höher Spannweiten der Ki-67-Expression beim in kurativer Absicht nephrektomierten klarzelligem NZK [47, 110, 111] bzw. bei NZK unterschiedlichen Subtyps [1, 24, 130, 131] beschrieben hatten. *Rioux-Leclercq et al.* [110, 111] berichten von Ki-67-Expressionsraten von 0 – 60 % bei einem Mittelwert von 8 % ( $n = 73$ ); *Haitel et al.* [47] ermittelten eine Spannweite von 0,5 – 43,2 % bei einem Mittelwert von 12,8 % ( $n = 92$ ). Die mittleren Anfärbungsraten lagen damit bei diesen Autoren höher als die hier als Schwellenwert verwandte „übermediane“ Expression von  $> 5$  %. Abgesehen von einer zufälligen Abweichung lässt sich auch ein methodischer oder materialbedingter Fehler mit der Folge einer eingeschränkten Sensitivität des verwandten mAb MIB-1 nicht ausschließen.

Die in der vorliegenden Arbeit detektierte **Bcl-2**-Expression war insgesamt gesehen relativ hoch. Einigen Autoren zufolge ist eine Bcl-2-Expression in normalen proximalen Tubulusepithelien, die als Ursprungsgewebe des klarzelligem NZK angesehen werden, eher selten [18, 56, 136]; demgegenüber berichten andere [80, 94, 99] von einer regelmäßigen Bcl-2-Expression in diesen Strukturen. Einig sind sich diese Autoren jedoch hinsichtlich der Tatsache, dass die Bcl-2-Expression bei NZK ungeachtet des histologischen Typs deutlich über der im Normalgewebe liegt, wobei *McDonnell et al.* ausdrücklich auf eine Überexpression beim klarzelligem NZK hinweisen [80].

In den meisten immunhistochemischen Untersuchungen an histologisch inhomogenen NZK-Kollektiven waren Anteile Bcl-2-positiver Tumoren zwischen 34 und 100 % beobachtet worden [59, 122, 136, 139, 152], lediglich *Hofmockel et al.* [54] beobachteten in nur 6,5 % der Fälle eine Bcl-2-Expression.

Speziell hinsichtlich des klarzelligem NZK ist auf die Studie von *Vasavada et al.* hinzuweisen, die unter 28 klarzelligem NZK einen über 80%-igen Anteil Bcl-2-positiver Tumoren ausgemacht hatten. Diese Funde implizieren eine funktionelle Bedeutung der Bcl-2-Expression beim NZK.

Die Mehrheit (60,9 %) der untersuchten NZK wies eine **p53**-Überexpression in  $\geq 1$  %, 43,5 % in  $> 5$  % der Zellen auf. Dieser Fund geht etwa konform mit den Ergebnissen von *Haitel et al.*, die im Rahmen zweier Studien an 92 bzw. 97 klarzelligem NZK einen Anteil von  $> 5$  % p53-positiven Zellen bei etwa 35 % der Fälle entdeckten [47, 48]; bei unifokalen NZK lag dieser Anteil sogar mit 42 % über dem der multifokalen [47]. Demgegenüber konnten *Vasavada et al.* bei 28 klarzelligem NZK keine p53-Expression erkennen [140]. In die meisten Studien zur p53-Expression beim NZK hatten allerdings Tumoren unterschiedlichen histologischen Subtyps Eingang gefunden, wobei die Ergebnisse auch hier weit divergierten (Anteile p53-positiver Tumoren von 0,04 bis 33,3 %) [68, 93, 95, 99, 122, 131, 139]. Zudem ist zu beachten, dass bei diesen Untersuchungen zum Teil unterschiedliche Schwellenwerte zur Definition der p53-„Positivität“, sowie unterschiedliche anti-p53-Antikörper Verwendung gefunden hatten. Darüber hinaus kann die Aktivität normalen wie auch alterierten p53-Proteins im Rahmen einer autoregulatorischen Feedback-Schleife durch mdm-2 gesenkt werden [48, 67, 125, 139, 142], so dass auch Alterationen des mdm2-Gens die beobachtbare p53-Expression beeinflussen könnten.

Obwohl also in der Literatur oftmals angegeben wird, p53-Mutationen bzw. -Überexpressionen seien bei (klarzelligen) NZK selten [80, 99], sprechen einige Untersuchungen gegen diese These; die in der vorliegenden Arbeit beobachtete p53-Überexpression ist im Vergleich sogar relativ stark ausgeprägt.

Hinsichtlich der VHL-Expression zeigte das mit 9 NZK größte Kontingent einen vollständigen Expressionsverlust; ansonsten waren alle Anfärbungsscores in unterschiedlich niedrigen Anteilen vertreten. Auf Grund der medianbasierten Dichotomisierung wurde im Rahmen der statistischen Analyse ein Schwellenwert von 20 % VHL-positiver Zellen verwandt; inwieweit diese Betrachtungsweise angemessen ist, bleibt in Zukunft zu klären. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass 73,9 % der untersuchten NZK einen  $AS(d)_{VHL} = 0$  aufweisen, ein Anteil, der in der Literatur angegebenen Häufigkeit von VHL-Mutationen beim klarzelligen NZK entspricht [23, 34, 84, 147].

## 4.2.2 Zusammenhänge zwischen klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Faktoren

### pT-Stadium und histologisches Grading

Die signifikant positive Assoziation zwischen pT-Stadium und Grading lässt sich insofern mit den Ergebnissen anderer Studien, die die Assoziation zwischen histologischem Grading und Tumorstadium betrachteten, vergleichen, als dass die Primärtumorgröße innerhalb des hier untersuchten Patientengutes in 22 von 23 Fällen allein ausschlaggebend für die Stadienzugehörigkeit war: 16 von 17 Patienten mit pT1-NZK wiesen bei Diagnosestellung ein Erkrankungsstadium I, 3 von 3 mit pT2-NZK ein Stadium II und 3 von 3 mit pT3a-NZK ein Stadium III auf. Lediglich Fall Nr. 13 war auf Grund der primären Metastasierung dem Stadium IV zuzuordnen.

Andere Autoren hatten eine signifikante Assoziation zwischen Tumorstadium und histologischem Grading bei zumeist heterogenen NZK-Kollektiven gefunden [54, 134]; auch ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen Grading und Primärtumorgröße wurde beobachtet [30].

### Immunhistochemische und klinisch-pathologische Parameter

Wenngleich die hier ermittelte positive Assoziation zwischen **apoptotischer** Aktivität und nukleärem Grading oberhalb der Signifikanzschwellen lag ( $p = 0,052$ ), entspricht zumindest die Tendenz dem Ergebnis einiger anderer jüngerer Studien, in denen eine signifikant positive Assoziation zwischen apoptotischer Aktivität und Grading bei, wenngleich histogenetisch heterogenen, NZK gefunden worden war [64, 131, 134, 151, 152]. Allerdings bestanden etliche systematische Unterschiede zwischen diesen Studien und der vorliegenden Arbeit. So gaben die genannten Autoren die Apoptosehäufigkeit als stetige Variable an; zur Bestimmung des AI war von *Tannapfel et al.* [131] das ISEL-Verfahren eingesetzt worden, das allerdings mit der TUNEL-Technik vergleichbare Resultate erzielt [50]. Hinsichtlich des Gradings verwandten *Tannapfel et al.* [131] wie auch *Zhang* und *Takenaka* [151, 152] das 3-stufige WHO-System, während *Todd et al.* [134] die Einteilung nach Fuhrmann



benutzten. Zudem ist darauf hinzuweisen, dass *Zhang* und *Takenaka* [152] in ihrer Analyse G1-NZK mit den zusammengefassten G2- und G3-Tumoren verglichen hatten.

*Hindermann et al.* allerdings kamen zu einem den o.g. Arbeiten entgegengesetzten Ergebnis, indem sie unter Verwendung des TUNEL-Verfahrens bei 66 NZK verschiedener Subtypen sowie einem Onkozytom eine signifikant höhere Apoptoserate bei G1-NZK als bei G2- und G3-NZK vorfanden. Die Autoren begründeten dies mit der These, dass NZK mit abnehmendem Differenzierungsgrad die Fähigkeit erwürben, die Aktivierung apoptotischer Prozesse zu supprimieren [52].

Die im Rahmen der o.g. neueren Studien gewonnenen entgegengesetzten Aussagen führten jedoch zunehmend zu der Auffassung, dass Apoptose und Proliferation als zwei gekoppelte Determinanten des gesteigerten Zellumsatzes beim NZK beide mit abnehmendem Differenzierungsgrad der Tumoren anstiegen, wobei durch ein gestörtes Gleichgewicht beider Vorgänge zu Gunsten der Proliferation die Aggressivität und Progressionstendenz mit der Entdifferenzierung zunähmen [131, 134, 152]. Die vorliegende Arbeit scheint dementsprechend letztere Auffassung zu bestätigen, wobei allerdings darauf hinzuweisen ist, dass hier keine Korrelation zwischen Apoptosehäufigkeit und proliferativer Aktivität nachweisbar war; ebenso ließ sich keine erhöhte Proliferationsaktivität mit zunehmender Entdifferenzierung der NZK beobachten.

Demgegenüber war unabhängig von der verwandten Einteilung keinerlei Zusammenhang zwischen der Apoptosehäufigkeit und dem pT-Stadium erkennbar. Auch andere Autoren waren zu einem vergleichbaren Ergebnis gekommen; so fanden *Zhang* und *Takenaka* [151, 152] wie auch *Tannapfel et al.* [131] in Untersuchungen an 70 bzw. 87 NZK unterschiedlichen histologischen Subtyps zwar eine signifikante Korrelation zwischen den als stetige Variable gemessenen Apoptoseindices und dem histologischen Grading, nicht aber zwischen apoptotischer Aktivität und UICC-Stadium. Demgegenüber fanden *Todd et al.* [134] auch eine statistisch signifikante Korrelation zwischen AI und UICC-Stadium sowie Primärtumorgröße (Studie mit 47 NZK) und *Koga et al.* [64] zwischen AI und Primärtumorgröße (30 NZK). Da Grading und Stadium von NZK in der Regel allerdings eine starke positive Korrelation aufweisen, könnten letztere Resultate ggf. auch als Ausdruck der häufig stärkeren histologischen Entdifferenzierung fortgeschrittener NZK interpretiert werden.

Insgesamt scheint in Zusammenschau dieser und anderer Arbeiten ein Zusammenhang zwischen apoptotischer Aktivität und klassischen histopathologischen Prognosefaktoren in erster Linie hinsichtlich der histologischen Differenzierung, unabhängig vom verwandten Gradingssystem, zu bestehen.

Der in der vorliegenden Untersuchung mangelnde und, wenn überhaupt, eher reziproke Zusammenhang zwischen **Ki-67**-Expression und histologischem Grading widerspricht weitgehend den Beobachtungen anderer Autoren, die unter Verwendung des MIB1-Antikörpers, wenngleich in verschiedenen Konzentrationen, ganz überwiegend einen zunehmenden Anteil proliferierender Zellen mit fortschreitender Entdifferenzierung bei, allerdings histogenetisch heterogenen, NZK beobachtet hatten [1, 52, 128, 130, 131, 134, 149, 152]. Auch die alternative Dichotomisierung unter Zusammenfassung der G2- und G3-NZK führte zu keiner erkennbaren Assoziation ( $p = 0,621$ ; Kreuztabelle nicht aufgeführt).

Allerdings hatten *Cheville et al.* [20] bei ausschließlich klarzelligen sowie *Papadopoulos et al.* [95] bei NZK unterschiedlichen Subtyps keine Assoziation zwischen Ki-67-Expression und nukleärem Grading nachweisen können, wobei letztere allerdings mit Gefrierschnitten gearbeitet hatten.

Die Beobachtungen zum Zusammenhang der Ki-67-Expression mit dem pT-Stadium entsprachen denen mit dem nukleären Grading. Andere Autoren hatten eine positive Assoziation zwischen Ki-67-Expression und UICC-Stadium [134, 151] bzw. Primärtumorgroße bei NZK unterschiedlichen Subtyps [134] beobachtet, während sich in einigen weiteren Studien, wie hier, kein derartiger Zusammenhang darstellte [95, 130]. Der direkte Vergleich der hier erzielten Ergebnisse mit denen anderer Autoren in dieser Frage ist zwar insofern nur begrenzt möglich, als dass in der vorliegenden Literatur größtenteils Erhebungen an NZK-Kollektiven unterschiedlicher Subtypen durchgeführt wurden; ein in dieser Frage abweichendes Verhalten klarzelliger NZK von dem anderer histologischer Typen ist jedoch nicht bekannt.

Als mögliche Erklärung für die unerwarteten Ergebnisse kommt die mögliche Missachtung eines hypothetischen „wirklichen“ Schwellenwertes für die Ki-67-Expression in Frage: Im ursprünglichen semiquantitativen Datensatz waren die Anfärbungsscores 0, 1 und 2 nahezu gleich häufig vertreten, wodurch nach Dichotomisierung an Hand des Medians ( $AS_{Ki-67} = 1$ ) etwa 65 % der Fälle einem  $AS(d) = 0$  zugeordnet wurden. Die Verwendung des Medians als Schwellenwert für die Dichotomisierung erfolgte unter der Vorstellung, dass es ein für klarzellige NZK „normales“ Ausmaß des jeweils betrachteten Markers gebe, dessen Über- oder Unterschreitung mit weiteren tumorbiologischen bzw. prognostischen Eigenschaften der NZK in Zusammenhang stehen könnte. Angesichts der Gruppenverteilung für Ki-67 ist es aber denkbar, dass dieser hypothetische Schwellenwert in der Gruppe der  $AS_{Ki-67} = 1$ -Fälle verborgen liegt und auf Grund des präformierten semiquantitativen Einteilungsschemas nicht erfasst wurde. In diesem Kontext scheint die in der Literatur weit verbreitete Verwendung eines stetigen Ki-67-LI deutlich angemessener, um die Implikationen der Ki-67-Expression erfassen zu können; sollte in zukünftigen Arbeiten dennoch die Verwendung eines dichotomisierten Ki-67-Anfärbungsscores angestrebt werden, wäre es ratsam, die Daten dennoch zunächst als stetige Variablen zu erfassen und die Dichotomisierung auf dieser Grundlage durchzuführen.

An Hand der hier erhobenen Daten ließ sich allenfalls eine schwache, statistisch irrelevante reziproke Assoziation zwischen **Bcl-2**-Expression und nukleärem Grading, nicht aber zwischen Bcl-2-Expression und Primärtumorgroße herstellen.

In der Literatur findet sich keine klare Aussage zu dieser Frage. Verschiedene Autoren hatten zwischen Bcl-2-Expression und klinisch-pathologischen Parametern beim NZK keinen Zusammenhang beobachten können [54, 122, 139, 152]. Demgegenüber berichteten *Vasavada et al.* [140] von einer signifikanten positiven Korrelation zwischen Bcl-2-Expression und Grading bei untersuchten 28 klarzelligen NZK, während *Oudard et al.* [94] bei 30 NZK eine reziproke Korrelation zwischen Bcl-2-Expression und Primärtumorgroße sowie nukleärem Grading beobachteten, wobei allerdings eine tendenziell positive Korrelation mit dem Tumorstadium bestand. *Pepe et al.* [99] ermittelten in einer Studie an 33 NZK eine Abnahme des in normalem Nierenparenchym üblicherweise stark exprimierten Bcl-2-Protein über eine noch regelmäßige Präsenz in euploiden NZK bis hin zu einem Bcl-2-Verlust

in aneuploiden, aggressiveren Phänotypen. Einige Untersuchungen an anderen soliden Tumoren erbrachten ihrerseits eine reziproke Korrelation zwischen Bcl-2-Expression und Tumorgroße, -stadium bzw. Grading. [60, 82, 128].

Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der genannten Studien untereinander und mit der eigenen Arbeit ist erneut zu bemerken, dass hinsichtlich Material und Methodik maßgebliche Unterschiede bestanden. So wurden teils ausschließlich klarzellige, teils histogenetisch inhomogene NZK untersucht; außerdem fanden unterschiedliche Anti-Bcl-2-Antikörper Anwendung. Zudem wurde das Ausmaß der Bcl-2-Expression in einigen Untersuchungen als stetige, in anderen als ordinale oder auch kategoriale Variable erfasst, wobei in letzteren Fällen wiederum unterschiedliche Schwellenwerte zur Subgruppierung eingesetzt wurden.

Allen methodischen Differenzen zum Trotz fällt jedoch ins Auge, dass in den meisten Untersuchungen, die überhaupt einen Zusammenhang zwischen Bcl-2-Expression und Grad, Stage oder Primärtumorgroße erbrachten, dieser überwiegend reziproker Natur waren. Dies erscheint in gewisser Weise paradox, da Bcl-2 als Apoptoseinhibitor prädestiniert scheint, mit seiner Expression Malignomen einen „Wachstumsvorteil“ im Sinne einer weiteren Verschiebung des Proliferations-Apoptosegleichgewichts zu Gunsten ungehinderten Wachstums zu verschaffen. Tatsächlich aber demonstrierten *Pietenpol et al.* [103] im Rahmen einer *in vitro*-Studie an verschiedenen soliden Tumorzelllinien auch einen wachstumshindernden Teileffekt von Bcl-2. Da dieser Effekt jedoch meines Wissens bisher in der Literatur keine weiter reichende Beachtung gefunden hat, lässt sich noch keine fundierte Aussage über dessen Stellwert im Rahmen der erläuterten Zusammenhänge treffen.

Die zumindest tendenziell positive Assoziation der **p53**-Expression mit dem Grading ließ sich nach Dichotomisierung nicht mehr nachweisen; zwischen p53-Expression und pT-Stadium ließ sich weder bei der Auswertung der semiquantitativ erfassten Daten noch bei nach Dichotomisierung ein Zusammenhang ausmachen. Demgegenüber gelangten *Haitel et al.* im Rahmen ihrer Untersuchungen an klarzelligen NZK zu weitaus eindeutigeren Ergebnissen; hier war die p53-Expression, ebenfalls dichotomisiert an Hand eines 5 %-Schwellenwertes, signifikant korreliert mit höherem (nicht dichotomisiertem) nukleären Grading, nicht aber mit dem pT-Stadium [47, 48]. Die Arbeiten anderer Autoren, die jedoch an histologisch inhomogenen NZK erfolgt waren, erbrachten divergierende Resultate: *Ljungberg et al.* berichten von einer signifikant positiven Korrelation zwischen p53-Expression und Grading sowie UICC-Stadium [68], während *Papadopoulos et al.* keinen dieser Zusammenhänge nachvollziehen konnten [95]. Bei *Ushida et al.* bestand lediglich eine positive Korrelation mit dem pT-Stadium, wobei diese Autoren pT1 und pT2 gegenüber pT3 und pT4 zusammengefasst hatten [139]. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass in den genannten drei Untersuchungen die p53-Expression teils als stetige Variable, teils als kategoriale Variable mit unterschiedlichen Diskriminierungsschwellenwerten erfasst worden war.

Die lediglich tendenziell stärkeren **VHL**-Expressionsverluste bei G3- und pT3a-NZK fielen bei der statistischen Auswertung der dichotomisierten Daten nicht ausreichend ins Gewicht, als dass eine Assoziation nachweisbar gewesen wäre.

Methodisch vergleichbare Literatur zu dieser Frage existiert offensichtlich nicht. Die wenigen Erkenntnisse genetischer Analysen hierzu liefern keine einheitliche Aussage: *Brauch et al.* berichten von einer signifikanten Assoziation von VHL-Alterationen mit höherem pT-Stadium [14], derweil *Yao et al.* keinerlei Zusammenhang mit klinisch-pathologischen Parametern feststellten [147].

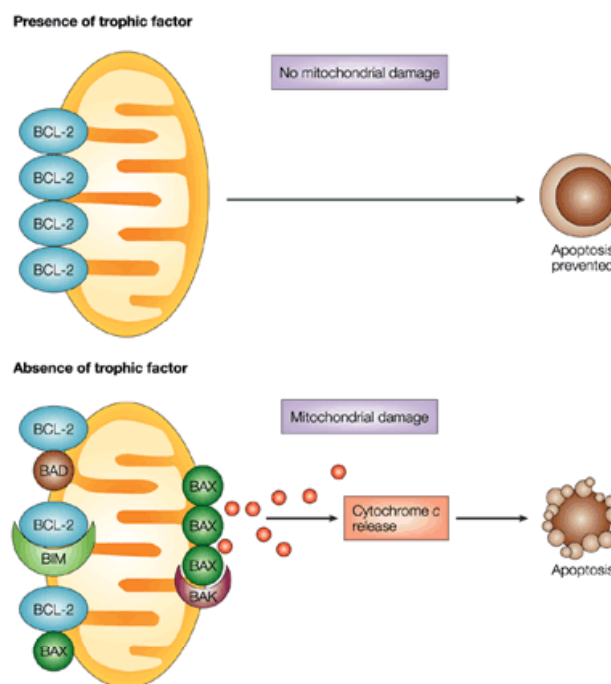
#### 4.2.3 Zusammenhänge der immunhistochemischen Parameter untereinander

Die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen **apoptotischer** und **proliferativer** Aktivität nachweisen ließ, steht in Widerspruch zu einer Reihe anderer Studien. Zwar fanden auch *Hindermann et al.* [52] im Rahmen einer Untersuchung von 66 NZK keine Assoziation zwischen AI und PI; demgegenüber beobachteten die meisten anderen Autoren eine signifikante positive Korrelation dieser beiden Parameter an ebenfalls histologisch heterogenen NZK [131, 134, 152] bzw. auch am Prostataadenom/-adenokarzinom [128]. Dies hat zu der bereits erwähnten These geführt, dass Apoptose und Proliferation, die im Normalgewebe in gegenseitiger Abhängigkeit die Gewebshomöostase steuern, auch im Rahmen der Karzinogenese nicht isoliert voneinander betrachtet werden können. Vielmehr steigt mit der erhöhten proliferativen Aktivität von Karzinomen auch deren Anteil apoptotischer Zellen, womit die Wachstumskinetik der Tumoren eher durch ein Ungleichgewicht zwischen beiden Parametern geprägt wird [131, 134, 152] als durch einen Verlust der Fähigkeit zur Apoptose, wie es von *Hindermann et al.* postuliert wurde [52]. Dies wird bestätigt durch die Beobachtung, dass negative Regulatoren des Zellzyklus und Tumorsuppressoren auch eine apoptoseinhibitorische Funktion ausüben (z.B. Rb), während positive Zellzyklusregulatoren und Onkogene eine proapoptotische Wirkung innehaben (z.B. E2F, c-myc, CDC25) [32]. In Zusammenschau der Resultate zu histologischem Grading, Apoptose und Proliferation scheint die vorliegende Arbeit keine dieser beiden Thesen zu stützen; wobei allerdings die Verwertbarkeit der hier erhobenen Ki-67-Expressionsmuster möglicherweise in Frage gestellt werden muss (vgl. 4.2.1).

Der beobachtete tendenziell inverse Zusammenhang zwischen **Apoptosehäufigkeit** im TUNEL-Verfahren und **Bcl-2-Expression** scheint angesichts der Funktion des Bcl-2-Proteins als Apoptoseinhibitor zunächst einzuleuchten. Das Nichterreichen statistischer Signifikanz kann, abgesehen von der mit der geringen Fallzahl eingeschränkten Repräsentativität und Aussagekraft dieser Arbeit, auch in den funktionellen Eigenschaften des Bcl-2-Proteins begründet liegen: So wird seine Funktion durch Heterodimerisierung mit einem seiner Homologen, wie z.B. Bax, antagonisiert bzw. verstärkt; je nach zellulärem Gleichgewicht zwischen Bcl-2 und seinen Homologen können also pro- oder antiapoptotische Impulse überwiegen [44, 76, 77, 108, 117] (Abb. 41).

In der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen hinsichtlich der Zusammenhänge zwischen Apoptosehäufigkeit und Bcl-2-Expression: *Zhang und Takenaka* [152] konnten bei 70 NZK keine Korrelation zwischen den beiden Parametern feststellen, während *Gobe et al.* [40] bei einer Untersuchung von 22 NZK eine reziproke Korrelation zwischen dem Ausmaß der Bcl-2-Expression und der Apoptosehäufigkeit beobachteten.

Auch Studien an anderen epithelialen Tumoren zeigten keine einheitlichen Resultate [83, 128]. Insgesamt ist die Literatur zu dieser Frage spärlich und liefert derzeit keine schlüssige Gesamtaussage. Angesichts des komplexen Zusammenspiels von Bcl-2 und seinen Homologen wären zur Erlangung einer differenzierteren Aussage zum Stellenwert des Bcl-2-Proteins bei der Apoptoseregulation des NZK Studien hilfreich, die an einer weitaus größeren Fallzahl die Expressionsmuster möglichst vieler Mitglieder der Bcl-2-Superfamilie untereinander und mit der beobachteten Apoptosehäufigkeit in Beziehung setzen.



**Abb. 41:** Khaled AR, Durum SK: Lymphocide: Cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2 (2002) 817-830 (Graphik verfügbar unter: [www.nature.com](http://www.nature.com))

Der hier beobachtete nicht signifikante, tendenziell reziproke Zusammenhang zwischen **apoptotischer** Aktivität und **p53**-Expression war von anderen Autoren in überzeugenderer Form nachgewiesen worden: *Tannapfel et al.* [131] hatten eine signifikant niedrigere Apoptoserate bei p53-positiven gegenüber p53-negativen NZK beobachtet, wobei diese Autoren eine p53-Expression in  $\geq 1$  % der Zellen als „positiv“ definierten. Diese Assoziation kann mit der apoptoseinduzierenden Teilfunktion von wt p53 erklärt werden: Das Tumorsuppressorgen übt seine Genom-stabilisierende Wirkung dadurch aus, dass es bei auftretenden DNA-Schäden entweder eine Arretierung des Zellzyklus zur Reparatur des Defektes, oder aber die Elimination der geschädigten Zelle durch Apoptose induziert [8, 32, 76, 124, 137, 142]. Der immunhistochemische Nachweis von p53 ist dem allgemeinen Einverständnis nach als Ausdruck seiner Inaktivierung zu werten, womit ein Verlust der p53-induzierten Apoptose in p53-defektiven Zellen zu erwarten wäre.

Dass in der vorliegenden Arbeit dennoch keine strikte Korrelation zwischen der p53-Überexpression und dem Apoptoseausmaß beobachtet werden konnte, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass neben p53 noch zahlreiche weitere Apoptoseinduktoren wie Myc, proapoptotische Vertreter der Bcl-2-Familie u.a. existieren [2, 44, 76, 77, 85, 100, 101, 135, 141]. Zum anderen ist zu bedenken, dass laut *Bellamy et al.* [8] auch eine immunhistochemisch nachweisbare wt p53-Akkumulation als Ausdruck seiner physiologischen Aktivierung möglich ist, so dass eine auf diese Weise nachgewiesene p53-Überexpression u.U. nicht ausschließlich mit dessen Funktionsverlust gleichzusetzen ist. Darüber hinaus weisen die gleichen Autoren darauf hin, dass durch p53-Mutationen nicht unbedingt alle Funktionen seines Expressionsproduktes beeinträchtigt sein müssen,

sondern auch isolierte Funktionsverluste hinsichtlich der Zellzyklusarretierung oder eben der Apoptoseinduktion vorliegen können.

Die tendenziell reziproke Assoziation zwischen **apoptotischer** Aktivität und **VHL**-Expression dieser Untersuchung war sehr schwach und statistisch irrelevant. *Devarajan et al.* [27] kamen in dieser Frage zu eindeutigeren Ergebnissen, indem sie die Apoptoseinduktion durch chemische Hypoxie an 4 VHL-negativen und 2 VHL-positiven NZK-Zelllinien untersuchten. Die VHL-positiven Zelllinien zeigten hier – anders als die VHL-defizienten – eine offenbar durch eine Bcl-2-Überexpression verursachte Apoptoseresistenz, die durch Bcl-2-Blockierung aufgehoben werden konnte. Die VHL-negativen Zelllinien ihrerseits konnten durch Reintroduktion von wt-VHL wie auch durch experimentell induzierte Überexpression von Bcl-2 gegen Apoptose geschützt werden. Auch *Schoenfeld et al.* [120] hatten einen offenbar durch Bcl-2- und Bcl-XL vermittelten Schutz gegen UV-induzierte Apoptose bei 786-O-NZK-Zellen nach Reintroduktion von wt-VHL beobachtet.

Der angedeutete reziproke Zusammenhang zwischen VHL-Expression und Apoptosehäufigkeit, der in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, kann nicht direkt mit den existierenden Literaturdaten verglichen werden. Auch hier könnte die mangelnde statistische Aussagekraft der Ergebnisse in der zu geringen Fallzahl begründet liegen; ebenso käme ein zu hoch oder zu niedrig angesetzter Schwellenwert zur Dichotomisierung einer oder beider Parameter als Erklärungsmöglichkeit in Betracht. Letzteres könnte auch den divergierenden Resultaten hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen VHL- und Bcl-2-Expression vor und nach Dichotomisierung zu Grunde liegen (siehe dort).

Unter den **Ki-67**-negativen NZK fanden sich seltener höchste **Bcl-2**-Anfärbungsraten ( $AS_{Bcl-2} = 4$ ), als unter denjenigen, die eine über 1%-ige Ki-67-Expression aufwiesen. Auch nach Dichotomisierung blieb eine schwach ausgeprägte Tendenz zu einer positiven Assoziation beider Parameter erhalten; aus statistischer Sicht war sie allerdings bedeutungslos ( $p = 0,685$ ).

Sofern man diesem Fund angesichts der o.g. Problematik hinsichtlich der Ki-67-Erfassung Bedeutung beimessen möchte, steht er eher im Gegensatz zu den Beobachtungen anderer Autoren, die den Zusammenhang zwischen Ki-67-Expression und Bcl-2-Expression an anderen epithelialen Tumoren untersucht hatten: *Ishida et al.* [60] fanden bei 114 Bronchialkarzinomen einen tendenziell niedrigeren Ki-67-LI bei Bcl-2-positiven Tumoren, als es bei Bcl-2-negativen der Fall war; *Kuwashima et al.* [65] berichteten im Rahmen einer Arbeit an 10 Endometriumkarzinomen von einer Tendenz Bcl-2-positiver Zellnester zur Beherrschung ruhender Zellen, derweil in Bcl-2-negativen Zellnestern hohe Anteile proliferierender Zellen beobachtet wurden. Diese Ergebnisse werden durch eine in vitro-Studie von *Pietenpol et al.* [103] gestützt, die bei verschiedenen soliden Tumorzelllinien eine Wachstumsinhibition durch Bcl-2 vorgefunden hatten. Allerdings verweisen diese Autoren auch auf die Möglichkeit verschiedener biologischer Bcl-2-Effekte an unterschiedlichen Zelltypen; ebenso weist *Reed* [108] darauf hin, dass Bcl-2 bei einigen Zelltypen zwar einen S-Phasen-Block hervorzurufen vermag, auf andere aber wiederum eine proliferationssteigernde Wirkung ausübt.

Die Bedeutung von Bcl-2 im Rahmen der Wachstumskontrolle beim klarzelligen NZK bedarf also auf Grund der

wenig umfangreichen derzeitigen Datenlage offensichtlich weiterer investigativer Aufmerksamkeit.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete signifikant positive Assoziation zwischen **Ki-67**-Expression und der **p53**-Expression ist im Rahmen der hier beobachteten Ki-67-Expressionsmuster dahingehend zu deuten, dass Zellen mit einer auf seine Inaktivierung hindeutenden Überexpression von p53 eine „exzessiv“ erhöhte Proliferation aufwiesen. Diese Beobachtung lässt sich durch die zellzyklusarretierende Teilfunktion von wt p53 gut erklären. Da der vorherrschenden Meinung nach der p53-abhängige Zellzyklusarrest in erster Linie der Ermöglichung der Reparatur von DNA-Schäden dient [3, 8, 124, 142], wäre bei dessen Ausfall eine Akkumulation und Replikation genetisch alterierter Zellen mit konsekutiver neoplastischer Potenz bzw., bei bereits bestehendem Malignom, aggressiverem Potential zu erwarten.

Auch *Papadopoulos et al.* [95] hatten bei 90 histologisch heterogenen, *Haitel et al.* [47] ihrerseits bei 92 klarzelligen NZK eine positive Korrelation beider Marker ermittelt, wobei in diesen Arbeiten andere Antikörper gegen Ki-67 und/oder p53 als bei uns Anwendung gefunden hatten. Einen prognostischen Einfluss wies in beiden Studien dennoch nur die Ki-67-Expression auf, wobei dieser sich in der Studie von *Haitel et al.* jedoch in der multivariaten Analyse als nicht unabhängig erwies.

Zwischen **Ki-67**- und **VHL**-Expression bestand unerwarteterweise eine deutliche positive Assoziation, die nach Dichotomisierung der Daten statistisch hochsignifikant war ( $p = 0,009$ ). Dies erscheint in der Tat paradox, da die tumorsuppressive Funktion von VHL u.a. auf einer Wachstumssuppression bzw. einer Verhinderung der Tumorbildung beruht [19, 97, 58, 62, 150], die durch Kontrolle der TGF $\alpha$ - und der Cyclin D1-Expression zumindest mitbestimmt wird [9, 63, 97, 150].

So wiesen *Baba et al.* [7] darauf hin, dass in wt VHL-tragenden NZK-Zellkulturen der VHL-Proteingehalt in subkonfluenten Kulturen deutlich gegenüber dem in logarithmisch wachsenden Kulturen erhöht ist. Hierbei ist die Induktion der VHL-Expression als kontaktinhibitorischer Effekt anzusehen, der *in vivo* am bestehenden NZK bereits eingetreten sein müsste.

Zur weiteren Klärung wären Studien mit größerer Fallzahl und ggfs. stetiger Erfassung der Ki-67- und VHL-Expressionsraten respektive der Verwendung variiert Schwelldwerte für eine kategoriale Einteilung sinnvoll.

Obschon der angedeutete positive Zusammenhang zwischen **Bcl-2**- und **p53**-Expression statistisch nicht aussagefähig ist ( $p = 0,685$ ), scheint die beobachtete Tendenz auf Grund der bekannten biologischen Wechselwirkungen beider Proteine erklärbar: Intaktes p53-Protein übt seine proapoptotische Wirkung u.a. durch Suppression der Bcl-2-Transkription aus [8, 108, 124]; dementsprechend könnte bei einem erhöhten immunhistochemischen p53-Nachweis als Ausdruck seiner Inaktivierung mit ein Anstieg der zellulären Bcl-2-Konzentrationen erwartet werden.

Andererseits konnten zahlreiche Autoren eine so geringe Frequenz von p53-Mutationen bzw. immunhistochemisch detektierbarem p53 beim NZK bei dennoch hohen Bcl-2-Niveaus [122, 136, 140] nachweisen, dass eine Korrelationsberechnung beider Parameter nicht möglich war. Diese Beobachtung spricht

dafür, dass p53-Alterationen beim NZK nicht oder nicht direkt mit den beobachteten hohen Bcl-2-Expressionsraten in Zusammenhang stehen.

Während sich bei der Auswertung der semiquantitativ erfassten Expressionsscores eine tendenziell positive Assoziation zwischen **Bcl-2**- und **VHL**-Expression andeutete, ließ sich nach Dichotomisierung der Daten kein Zusammenhang mehr feststellen ( $p = 1,0$ ).

Im Rahmen jüngerer Studien ist bekannt geworden, dass VHL renale Zellen Bcl-2-vermittelt vor der apoptotischen Reaktion auf hypoxische Verhältnisse bzw. UV-Bestrahlung schützt [27, 120]. Bisherige Studien zu dieser Frage hatten jedoch jeweils die Bcl-2-Expression in VHL-negativen und VHL-positiven Zelllinien nach Exposition mit den genannten proapoptischen Stimuli miteinander verglichen und entsprechend höhere Bcl-2-Konzentrationen bei den VHL-positiven Zelllinien vorgefunden. Arbeiten, die wie in der vorliegenden *in situ*-Expressionsanalyse beide Parameter in (semi)quantitativer Weise zueinander in Beziehung setzen, sind bisher nicht publiziert; möglicherweise könnten stetige Messungen der jeweiligen Markerexpression bzw. alternative Schwellenwerte bei einer kategorialen Erfassung eine engere Assoziation belegen. Von den in den zitierten Untersuchungen experimentell herbeigeführten Bedingungen dürfte in erster Linie die zelluläre Hypoxie für in vivo bestehende NZK von Bedeutung sein; da in diesen Tumoren jedoch nicht zwangsläufig hypoxische Bedingungen vorliegen, ist eine strikte Korrelation zwischen VHL- und Bcl-2-Expression zumindest vor diesem Hintergrund nicht unbedingt zu erwarten. Inwieweit eine VHL-vermittelte Apoptoseinhibition in Reaktion auf andere auslösende Momente hin eintritt, bleibt in Zukunft zu klären.

Die tendenziell positive Korrelation zwischen **p53**- und **VHL**-Expression im semiquantitativen Datensatz bestand auch nach Dichotomisierung fort, wobei sie allerdings mehr statistisch signifikant war ( $p = 0,052$ ). Bei ausgeprägterem VHL-Expressionsverlust zeigten sich also seltener bzw. durchschnittlich weniger stark ausgeprägte p53-Überexpressionen, und umgekehrt. Dieser Fund deutet möglicherweise darauf hin, dass Alterationen der p53- oder der VHL-Funktion alternative Entstehungs- oder Progressionsfaktoren beim klarzelligen NZK darstellen könnten.

Zwar hatten *Schoenfeld et al.* [120] im Rahmen einer *in vitro*-Studie an 786-O-NZK-Zelllinien eine äquivalente p53-Expression bei VHL-negativen und -positiven Zelllinien festgestellt; dieses Ergebnis widerspricht der o.g. Theorie jedoch nicht, da eine Mutation beider Gene bzw. eine auf anderen Mechanismen beruhende zusätzliche p53-Inaktivierung bei bestehender VHL-Mutation natürlich auftreten kann.

Dementsprechend liefert die vorliegende Studie nicht nur Hinweise darauf, dass beim klarzelligen NZK eine p53-Alterierung häufiger vorliegt, als vielfach angenommen, sondern lässt auch Raum für die Annahme, dass p53-Alterationen zumindest zum Teil in die Karzinogenese der VHL-positiven klarzelligen NZK involviert sind.



#### 4.2.4 Prognostische Relevanz der untersuchten klinisch-pathologischen und immunhistochemischen Faktoren

In der vorliegenden Arbeit wurde der weit akzeptierte Stellenwert des histologischen **Gradings** im Rahmen der prognostischen Beurteilung des NZK dahingehend bestätigt, dass die G3-NZK eine signifikant geringere rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit, verglichen mit der zusammengefassten Gruppe der G1- und G2-Tumoren, aufwies ( $p = 0,0412$ ).

In vielen vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass das histologische Grading als unabhängiger prognostischer Indikator signifikant das rezidivfreie Überlebensintervall bzw. das tumorspezifische Überleben bei in kurativer Absicht nephrektomierten NZK-Patienten unabhängig vom histologischen Karzinomtyp bestimmt [30, 31, 47, 35, 54, 96, 122., 147]. Allerdings fanden andere Autoren keine oder eine nur in der univariaten Analyse signifikante prognostische Aussagekraft [26, 68, 95, 139]. Ursächlich für diese divergierenden Ergebnisse dürfte unter anderem die Tatsache sein, dass es kein allgemein akzeptiertes Gradingssystem gibt. Im amerikanischen Schrifttum am weitesten verbreitet ist das Grading nach Fuhrmann, das 4 unterschiedliche Malignitätsgrade unterscheidet, während hierzulande häufig 3-stufige Gradingssysteme wie das nach *Thoenes* und *Störkel* bzw. das vergleichbare WHO-Grading nach *Mostofi* und *Davis* verwandt werden. Im Allgemeinen werden nukleäre Gradings wegen ihrer besseren Reproduzierbarkeit den histologisch/zytologischen vorgezogen. Nichtsdestoweniger weisen alle gebräuchlichen Gradingssysteme eine inhärente Subjektivität, verbunden mit einer hohen Inter- und Intraobserver-Variabilität auf – eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedliche Beurteilung der prognostischen Aussagekraft des Gradings. Im Allgemeinen gilt jedoch das nukleäre Grading als „klassischer“ Prognosefaktor, der in seiner Wertigkeit allerdings dem Tumorstadium untergeordnet ist [15, 16, 25, 36, 83, 104, 126, 127, 133, 144].

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit lediglich ein tendenzieller Einfluss ( $p = 0,2788$ ) des **pT**-Stadiums auf das rezidivfreie Überlebensintervall zu bestehen schien, erstaunt insofern, als dass das pT-Stadium sowohl als Komponente des UICC-Stadiums [15, 16, 25, 36, 41, 83, 104, 126, 127, 133, 144] als auch isoliert betrachtet [15, 20, 83, 104, 127] einen „klassischen“ Prognosefaktors darstellt, dessen unabhängige prognostische Wertigkeit in der Literatur vielfach bestätigt wurde [26, 30, 31, 51, 68, 96, 131, 139, 147]. Als Erklärungsmöglichkeit für dessen mangelnde prognostische Aussagekraft in dieser Untersuchung ist vor allem die geringe Fallzahl zu nennen. Ebenso war die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass durch die Subsummierung der pT2- und pT3a-Tumoren in einer Gruppe eine „falsche“ Zusammengehörigkeit konstruiert worden war, also eine eventuell bestehende prognostische Gruppe „auseinandergerissen“ wurde. Um dies zu evaluieren, wurde eine weitere Kaplan-Meier-Analyse des rezidivfreien Überlebensintervalles angestellt, die zwischen der zusammengefassten Gruppe der pT1- und pT2-Tumoren und den pT3a-NZK unterschied; diese kam jedoch zu dem nahezu identischen Ergebnis eines nur tendenziellen, nicht signifikanten Einflusses des pT-Stadiums auf das rezidivfreie Überlebensintervall ( $p = 0,2215$ ; Kaplan-Meier-Kurve nicht gezeigt).

Allerdings war auch in einigen anderen Studien kein signifikanter prognostischer Einfluss des UICC-Stadiums bzw. der Primärtumorgröße gefunden worden: So hatte in Untersuchungen von *Sejima* und *Miyagawa* [122] an

53 NZK unterschiedlicher Subtypen sowie *Haitel et al.* [47] an 92 klarzelligen NZK allein das histologische Grading einen signifikanten und unabhängigen Einfluss auf das krankheitsspezifische Überlebensintervall; bei *Papadopoulos et al.* [95] waren weder Grading noch Tumorstadium von prognostischer Relevanz.

Nach der TNM-Revision von 1997 mit ihrer Erhöhung der Unterscheidungsgrenze zwischen pT1- und pT2-NZK von 2,5 auf 7 cm hatten mehrere Autoren bemerkt, dass es durch diese sehr „großzügige“ Neudefinition offenbar zur einer Zusammenfassung hinsichtlich der Metastasierungswahrscheinlichkeit prognostisch unterschiedlicher Subgruppen innerhalb der Kategorie pT1 gekommen sei. *Gofrit et al.* [42] fanden einen signifikanten prognostischen Unterschied zwischen pT1-NZK von bis zu bzw. über 4 cm maximalem Durchmesser; *Zisman et al.* kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei einem Schwellenwert von 4,5 cm [153]. Dementsprechend wurde in einer weiteren Revision die optionale Unterteilung in pT1a ( $\leq 4$  cm) und pT1b ( $> 4$  cm) vorgeschlagen [45]. Tatsächlich handelte es sich in der vorliegenden Arbeit bei den beiden pT1-Tumoren, die im Laufe der Nachbeobachtungszeit einen Progress aufwiesen, um Primärtumoren von mehr als 4 cm maximalem Tumordurchmesser (Fall 16: 5 cm; Fall 20: 4,8 cm). Zusätzliche Kaplan-Meier-Analysen, in denen das rezidivfreie Überlebensintervall der Patienten mit Primärtumoren von bis zu 4 cm Größe mit dem von solchen über 4 verglichen wurde, erbrachten sowohl bezogen auf die Gesamtzahl der pT1-NZK als auch innerhalb des Gesamtkollektivs einen statistisch signifikanten negativen Einfluss auf das rezidivfreie Überlebensintervall ( $p = 0,0448$  bzw.  $p = 0,0300$ ; Kaplan-Meier-Kurven nicht gezeigt). Die vorliegende Arbeit bestätigte somit die Hinweise auf die Existenz prognostisch unterschiedlicher Subgruppen innerhalb der pT1-NZK, die an Hand eines Schwellenwertes von 4 cm Primärtumorgröße unterschieden werden können. Tatsächlich führte hier das Überschreiten dieses Schwellenwertes auch zu einem signifikanten und damit stärkeren Einfluss auf das rezidivfreie Überlebensintervall innerhalb des Gesamtkollektivs als das Vorliegen eines pT2- oder gar pT3a-NZK; dieses könnte allerdings durch die mit jeweils 3 Fällen geringe Prävalenz letzterer Stadien im Untersuchungsgut zumindest mitbegründet sein.

Dennoch steht außer Frage, dass durch die Kategorisierung in pT-Stadien im Allgemeinen prognostisch unterschiedliche Subgruppen erfasst werden. So untersuchten *Delahunt et al.* [26] im Rahmen einer retrospektiven Studie an 138 organbegrenzten NZK-Fällen unterschiedlichen histologischen Typs den prognostischen Einfluss der Primärtumorgröße auf das krankheitsspezifische Überlebensintervall; hierbei erbrachte sowohl der Vergleich der pT1- mit den pT2-NZK, als auch der an Hand eines 4-cm-Schwellenwertes einen statistisch signifikanten und unabhängigen prognostischen Einfluss, die signifikanteste statistische Aussagekraft jedoch erwuchs aus der Beobachtung der Primärtumorgröße als stetig erfasster Variable.

Hohe Anteile **apoptotischer** Zellen wiesen in der vorliegenden Arbeit einen signifikant negativem Einfluss auf das rezidivfreie Überlebensintervall auf ( $p = 0,0238$ ). Bei vergleichbarer Nachbeobachtungszeit ( $AS(d)_{TUNEL} = 0$ : 50,1 Monate;  $AS(d)_{TUNEL} = 1$ : 46,3 Monate) und ähnlicher Fallzahl ( $AS(d)_{TUNEL} = 0$ :  $n = 13$ ;  $AS(d)_{TUNEL} = 1$ :  $n = 10$ ) beider Gruppen fanden sich sämtliche Progressfälle bei Patienten, deren Primärtumoren  $> 1$  % apoptotischer Zellen im TUNEL-Verfahren aufwiesen. Das mittlere rezidivfreie Überlebensintervall der Patienten mit TUNEL-positiven NZK betrug 40,27 Monate.

Die prognostische Bedeutung der Apoptosehäufigkeit bei verschiedenen epithelialen Karzinomen wurde bisher widersprüchlich beurteilt [3, 135]. Auch bezüglich des NZK kamen verschiedene Autoren zu divergierenden Resultaten: So konnten *Hindermann et al.* [52] keinen Zusammenhang zwischen apoptotischer Aktivität und Auftreten einer Fernmetastasierung erkennen; *Yoshino et al.* [149] fanden bei 96 NZK-Patienten mit Interferon-Behandlung eine schlechtere Prognose bei niedrigem apoptotischem Index. Im Rahmen einer Studie zum metastasierten NZK beobachteten *Richter et al.* [109] bei Patienten, deren Primärtumoren < 6 % apoptotischer Zellen aufwiesen, eine signifikant schlechtere Prognose als bei solchen, die diesen Wert überschritten. Demgegenüber erbrachte die Untersuchung von *Tannapfel et al.* [131] an 87 potentiell kurativ resezierten NZK eine in der univariaten Analyse signifikant höhere Fünfjahresüberlebensrate (5-JÜR) für Patienten, deren Primärtumoren 1-4% apoptotischer Zellen aufwiesen als für solche, deren Apoptoseindices höher lagen; in der multivariaten Analyse allerdings war der Apoptoseindex kein unabhängiger Prognosefaktor.

Eine prognostische Wertigkeit der apoptotischen Aktivität ist somit für das NZK nicht endgültig geklärt. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete negative prognostische Einfluss einer stärkeren apoptotischen Aktivität erscheint auf den ersten Blick paradox, da bei unreflektierter Betrachtung ein erhöhter apoptotischer Zellverlust einem aggressiveren tumorbiologischen Verhalten zuwider zu laufen scheint. Da sich jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein Konsens abzeichnet, dass beim NZK erhöhte Proliferationsraten als anerkannter Marker eines aggressiveren Phänotyps auch mit erhöhten Apoptoseraten einhergehen, stellen sich die hier beobachteten Zusammenhänge als logisch dar.

Demgegenüber bleibt festzustellen, dass beim untersuchten Patientengut keinerlei Assoziation zwischen Ki-67- und TUNEL-positivem Zellanteil bestand. Insgesamt muss aber angesichts der Ergebnisse hinsichtlich der hier ermittelten Ki-67-Expressionsmuster deren Verwertbarkeit kritisch hinterfragt werden; möglicherweise könnte den mitgelaufenen Positivkontrollen zum Trotz eine fehlerhafte Ki-67-Detektion durch den verwandten mAb MIB-1 vorgelegen haben, oder aber das benutzte semiquantitative Einteilungsschema wurde der „Ki-67-Realität“ nicht gerecht, indem ein eventueller prognostisch bedeutsamer Schwellenwert seiner Expression durch die vorgenommene Kategorisierung verwischt wurde.

Ein prognostischer Einfluss der **Ki-67**-Expression hinsichtlich des rezidivfreien Überlebensintervalls konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu der weitgehend etablierten Auffassung, dass ebendieser Proliferationsmarker beim NZK einen guten prognostischen Indikator hinsichtlich der krankheitsspezifischen Überlebenszeit bzw. des rezidivfreien Überlebens darstelle [25, 36, 41].

In der Tat hatten etliche Autoren an zumeist größeren NZK-Kollektiven einen signifikant nachteiligen Einfluss erhöhter Ki-67-Reaktivität auf das krankheitsspezifische Überlebensintervall [1, 24, 110, 111, 130, 131, 149] bzw. das rezidivfreie Überlebensintervall [1, 94] beobachtet. In vielen Studien handelte es sich dabei um histogenetisch heterogene NZK [1, 24, 130, 131, 149], einige Untersucher hatten jedoch auch ausschließlich mit klarzelligen NZK gearbeitet [94, 110, 111]. In der Arbeit von *Haitel et al.* allerdings war die Ki-67-Expression bei 92 klarzelligen NZK zwar in der univariaten Analyse von prognostischer Signifikanz, erwies sich jedoch in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger Prognosefaktor [47]. Ähnliche Resultate erzielten *Cheville et al.* bei

der Untersuchung von 132 klarzelligen NZK [20]. Demgegenüber konnten *Gelb et al.* an 52 klarzelligen, *Papadopoulos et al.* sowie *Hindermann et al.* an 90 bzw. 66 NZK unterschiedlichen Subtyps keine prognostische Aussagekraft der Ki-67-Expression evaluieren [35, 52, 95].

Letzten Endes liegen zu dieser Fragestellung divergierende Ergebnisse vor, deren Vergleichbarkeit durch die unterschiedlichen Auswertungsstrategien erschwert ist. So wandten einige Autoren die Ki-67-Expression als stetige Variable an [35, 47, 52, 130, 131], andere hatten das Ausmaß seiner Expression als kategoriale Variable im Sinne einer simplen positiv/negativ-Unterscheidung [94] erfasst. In einem Teil der Arbeiten wurde zur Überlebensanalyse die Kategorisierung an Hand eines distinkten Schwellenwertes, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, vorgenommen, wobei diese Schwellenwerte völlig unterschiedlich angesiedelt waren und sich zwischen 5 % und 20 % Ki-67-positiver Zellen bewegten [1, 20, 24, 110, 111].

In Zukunft sind größere Studien gefragt, unter einheitlichen Kautelen und ggfs. Austestung verschiedener Schwellenwerte die tatsächliche Bedeutung dieses so weit verbreiteten Proliferationsmarkers für das NZK subtypenspezifisch zu bestimmen.

Ein signifikanter Einfluss der **Bcl-2**-Expression auf das rezidivfreie Überlebensintervall war in der vorliegenden Arbeit nicht nachweisbar ( $p = 0,4330$ ), wenngleich die Progressrate unter Patienten mit einem  $AS(d)_{Bcl-2} = 1$  insgesamt etwas niedriger lag als bei denen, deren Primärtumoren das Bcl-2-Antigen in  $\leq 50$  % der Zellen exprimierten. Dieses Ergebnis ist weitgehend konkordant mit den Beobachtungen anderer Autoren [54, 94, 122, 139, 140], die ebenfalls keinen prognostischen Einfluss der Bcl-2-Expression bei verschieden großen NZK-Kollektiven zumeist unterschiedlichen histologischen Typs hatten ermitteln können. Allerdings wiesen *Hofmockel et al.* [54], die unter 31 R0-resezierten NZK einen mit 6,5 % nur geringen Anteil Bcl-2-positiver Tumoren gefunden hatten, dass es sich bei diesen zwei NZK-Fällen um Patienten handelte, die im Laufe der Nachbeobachtungszeit ohne Progress blieben. Die von ihnen ermittelte ungewöhnlich niedrige Bcl-2-Expression könnte eventuell auf der Verwendung eines anderen Antikörpers (Clone 100 D5) beruhen und ist nur mit entsprechender Skepsis zum Vergleich mit den von mir ermittelten Daten geeignet. Kontrastierend dazu war in der Untersuchung von *Sejima* und *Miyagawa* [122] an 53 NZK eine Bcl-2-Positivität, die in 64 % der Fälle zu beobachten war, tendenziell assoziiert mit einer schlechteren Prognose.

Angesichts dieser Kenntnislage scheint die isolierte Betrachtung von Bcl-2 als prognostischem Marker beim NZK wenig fruchtbar. Angesichts der Komplexität der Bcl-2-Familie mit den mannigfaltigen Interaktionsmustern ihrer Mitglieder untereinander scheint es in Zukunft eher angezeigt, in größeren Studien diejenigen Bcl-2-Homologen mit der größten prognostischen Aussagekraft zu determinieren bzw. den Einfluss ihrer Expressionsverhältnisse zueinander, z.B. im Sinne der Bcl-2-/Bax-Ratio, zu beleuchten. Genauso ist zu berücksichtigen, dass die Expression der Bcl-2-Familienmitglieder abhängig ist von der anderer Proteine, die ihrerseits im Rahmen der Karzinogenese alteriert werden kann (z.B. p53), so dass ihr Beitrag zu Entwicklung und Progression von Malignomen ganz allgemein eventuell nur im Kontext „basaler“ genetischer Veränderungen gesehen werden kann.

Ein überzeugender Einfluss der **p53**-Expression auf das rezidivfreie Überlebensintervall ließ sich in der vorliegenden Arbeit nicht ersehen ( $p = 0,4410$ ), wenn auch insgesamt der Anteil an Progressfällen unter den Patienten mit einem  $AS(d)_{p53} = 1$  etwas niedriger lag als bei denen mit einem  $AS(d)_{p53} = 0$ .

In der Literatur findet sich zu dieser Frage unterschiedliche Angaben. *Haitel et al.* [47, 48] beobachteten einen in der univariaten Analyse negativen Einfluss einer p53-Expression auf das progressionsfreie Überlebensintervall, der sich jedoch in der multivariaten Analyse als nicht unabhängig erwies; *Rioux-Leclercq et al.* [110] berichten demgegenüber von einem signifikant unabhängigen prognostischen Einfluss auf das krankheitsspezifische Überleben. *Gelb et al.* [35] sowie *Ljungberg et al.* [68] hatten jedoch für das klarzellige NZK keinen prognostischen Einfluss der p53-Expression nachweisen können, wobei letztere durchaus einen signifikanten Einfluss auf das krankheitsspezifische Überleben bei chromophilen und chromophoben NZK beobachtet hatten [68]. Auch bei Untersuchungen an NZK-Kollektiven unterschiedlichen Subtyps waren die Resultate nicht einheitlich [52, 95, 139].

Dementsprechend könnten p53-Alterationen bei einzelnen klarzelligen NZK durchaus entscheidend für deren Tumorigenese sein, ohne aber – isoliert betrachtet – die Aggressivität des Karzinoms zu bestimmen. Letztere beruht möglicherweise eher auf anderen tumorbiologischen Charakteristika, die nicht oder nicht ausschließlich durch p53 gesteuert werden.

Der Einfluss der **VHL**-Expression auf das rezidivfreie Überleben war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,1911$ ), obwohl sich alle Progressfälle unter denjenigen Patienten fanden, deren Primärtumor einen  $AS(d)_{VHL} = 0$  aufwies. Dies könnte durch die sehr unterschiedliche Gruppengröße erklärt werden (14 Fälle mit einem  $AS(d)_{VHL} = 1$  gegenüber 5 Fällen mit einem  $AS(d)_{VHL} = 0$ ). Die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit lag für die Patienten mit einem  $AS(d)_{VHL} = 0$  bei 40,5 Monaten (mittlere Nachbeobachtungszeit 50,3 Monate); bei einem  $AS(d)_{VHL} = 1$  war sie mit der mittleren Nachbeobachtungszeit identisch und betrug 57,2 Monate. Die Tendenz also spricht offensichtlich für einen prognostischen Vorteil von Patienten, deren Primärtumoren eine VHL-Expression in  $> 20\%$  der Zellen aufweisen, gegenüber solchen mit NZK, die dramatischere VHL-Expressionsverluste zeigen.

Der Stellenwert des VHL-Tumorsuppressorgens in der renalen Tumorigenese und Tumorprogression steht außer Zweifel. Zudem wurde im Rahmen von Mutationsanalysen beim NZK bereits auf dessen intratumorale Heterogenität hinsichtlich des genetischen VHL-Status hingewiesen [84], die das in der vorliegenden Arbeit beobachtete unterschiedliche Ausmaß der jeweiligen VHL-Expressionsverluste erklärt. Um so erstaunlicher scheint es, dass der prognostischen Aussagekraft des so einfachen immunhistochemischen VHL-Nachweises meines Wissens bisher keine Beachtung geschenkt wurde.

Die Literatur liefert ihrerseits nur wenig Anhaltspunkte für die prognostische Wertigkeit von VHL-Alterationen bei klarzelligen NZK. Im Rahmen von Mutationsanalysen fanden *Schraml et al.* [121] in einer Untersuchung an 113 NZK eine signifikant schlechtere Prognose für Patienten mit „Loss-of-function“-VHL-Mutationen; demgegenüber berichteten *Yao et al.* [147] von einer signifikant besseren rezidivfreien und krankheitsspezifischen Überlebenszeit für Patienten mit klarzelligen NZK der UICC-Stadien I bis III, wenn VHL-Mutationen vorlagen.

Die hier ermittelte Tendenz erscheint jedenfalls einleuchtend, betrachtet man die Funktionen des VHL-Proteins für die renale Geweishomöostase: Neben der Regulation der Neoangiogenese, die v.a. im Rahmen der Tumorprogression von Bedeutung ist, kontrolliert es über TGF $\alpha$  und die zyklinabhängigen Kinasen p21<sup>waf</sup> und p27<sup>kip1</sup> die proliferative sowie Bcl-2-vermittelt die apoptotische Aktivität in renalen Tubuluszellen bzw. NZK-Zellen [17, 97, 120]. Ein VHL-Funktionsverlust geht nach Untersuchungen von *Schoenfeld et al.* [120] über die genannten Mechanismen mit einem hyperproliferativen Status sowie vermehrter Apoptose bei NZK-Zellen einher. *Los et al.* [70] hatten allerdings eine deutlich geringere Expression des für die Tumorprogression und –metastasierung relevanten uPA bei VHL-negativen im Vergleich zu VHL-positiven 786-O-Zellen beobachtet, ein Ergebnis, das einen wenig aggressiven Phänotyp VHL-negativer NZK nahelegt, angesichts der multiplen Aufgaben von pVHL jedoch nicht allein ausschlaggebend für seine prognostische Relevanz sein dürfte.

Die in dieser Arbeit vorgefundenen Zusammenhänge zwischen Apoptose und VHL-Expression ihrerseits liefern ein stimmiges Bild: Mit zunehmendem Verlust der VHL-Expression als Bcl-2-abhängigem negativen Apoptoseregulator stieg tendenziell die apoptotische Aktivität der untersuchten NZK; ein erhöhter Anteil apoptotischer Zellen hatte, wie auch ein deutlicher VHL-Expressionsverlust, einen negativen Einfluss auf das rezidivfreie Überlebensintervall, wobei letzterer Einflussfaktor allerdings keine statistische Signifikanz erreichte.

#### 4.2.5 Klinische Implikationen der erzielten Ergebnisse

Die Identifikation relativ leicht ermittelbarer, prognostisch relevanter Tumoreigenschaften dient vor allem dem Zweck einer individuellen Abschätzung des Progressionsrisikos mit entsprechenden Konsequenzen für die Nachsorge. In der vorliegenden Arbeit wiesen sich erwartungsgemäß das nukleäre Grading und die Primärtumorgöße, letztere allerdings nur bezogen auf einen Schwellenwert von 4 cm maximaler Tumorausdehnung, als prognostisch relevante Einflussfaktoren aus, die *in praxi* als sogenannte „klassische“ Prognosefaktoren wohletabliert sind.

Darüber hinaus hatte eine Apoptosehäufigkeit von > 1 % einen signifikant negativen Einfluss auf das rezidivfreie Überleben, während eine VHL-Expression von < 20 % in dieser Hinsicht knapp nicht signifikant war, jedoch eine starke Tendenz in Richtung einer nachteiligen Prognose aufwies. Dementsprechend könnte eine Einbeziehung der Apoptosehäufigkeit und (möglicherweise unter Verwendung eines anderen, noch genauer zu erforschenden Expressionsschwellenwertes) der VHL-Expression in die individuelle Risikoabschätzung von Patienten mit klarzelligem NZK einbezogen werden, um auf diese Weise bestimmte „Hochrisikopatienten“ engherigeren bzw. umfangreicheren Nachsorgeuntersuchungen zuführen zu können oder aber sie in Studien zu neuen adjuvanten Chemotherapiekonzepten zu integrieren. Es ist allerdings anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit eine multivariate Analyse nicht möglich war, so dass der Nachweis einer unabhängigen prognostischen Bedeutung der genannten Parameter noch aussteht.

Immunhistochemisch nachweisbare Genprodukte stellen neben der eventuellen prognostischen Wertigkeit ihrer Expressionsmuster oftmals auch durch ihre spezielle Funktion bedingt potentielle Therapiehebel dar. Insbesondere für das klarzellige NZK mit seiner bekannten geringen Chemo- und Strahlensensibilität und seiner

unberechenbaren Langzeitprognose sind neue Konzepte für adjuvante, aber auch palliative Behandlungsmethoden wünschenswert.

Die hier beobachtete sehr starke Bcl-2-Expression der untersuchten NZK beispielweise könnte einen derartigen Therapieansatz darstellen, indem beispielweise vornehmlich apoptoseinduzierende Chemotherapeutika in Kombination mit Bcl-2-Inhibitoren (z.B. Anti-Bcl-2-Antikörpern) verabreicht werden könnten, um eine höhere Ansprechrate zu erzielen. Andererseits wurde in diesem Kontext bereits von einer höheren Wirksamkeit primär nekroseinduzierender zytotoxischer Agenzien wie CC-313 und DiMIQ beim NZK berichtet [116].

Auch eine p53-Alteration, die nach den vorliegenden Ergebnissen beim klarzelligen NZK höher zu sein scheint, als bisher vielfach angenommen, könnte in Zukunft Ansatzpunkt neuer Therapiekonzepte sein. *Natsume et al.* [88] beispielsweise berichteten von einer relativ ausgeprägten Sensibilität p53-negativer NZK gegenüber der antimikrotubulären Substanz TZT-1027, während DNA-toxische Agenzien bei diesen Tumoren weitaus geringere Ansprechraten aufwiesen. Darüber hinaus könnten gentherapeutische Ansätze bei p53-defizienten NZK zur Reetablierung von wt p53 bzw. die pharmakologische Stabilisierung instabiler Strukturmutanten von p53 zur Wiederherstellung der Sensibilität gegenüber Zytostatika, die ihre Wirkung über p53-vermittelte Apoptose entfalten, führen.

## 5. Zusammenfassung

Das NZK ist der häufigste maligne renale Tumor, dessen Inzidenz in Deutschland bei etwa 10.000 Neuerkrankungen pro Jahr liegt. Sein Verhalten ist insofern unberechenbar, als dass etwa ein Drittel der primär lokalisierten, in kurativer Absicht nephrektomierten Fälle im weiteren Verlauf einen Progress, zumeist im Sinne einer Fernmetastasierung, aufweisen, der teilweise nach erheblichen Latenzzeiten auftritt. Außerdem weist das NZK eine ausgesprochen geringe Strahlen- und Chemosensibilität auf.

Das klarzellige NZK stellt mit etwa 76 % den meistvertretenen Subtyp dieser histogenetisch heterogenen Karzinome und weist genetische und prognostische Unterschiede gegenüber den anderen Subtypen auf. Dessen ungeachtet differenzierte der Großteil der in den letzten Jahren zahlreichen Studien zur Determinierung NZK-spezifischer Prognosefaktoren nicht nach histologischem Subtyp.

Während in der Vergangenheit primär dem Proliferationsverhalten maligner Tumoren Aufmerksamkeit geschenkt worden war, rückte in den letzten Jahren die Apoptose als die Tumordynamik maßgeblich mitbestimmender Faktor in den Mittelpunkt des Interesses.

Die durchgeführten Untersuchungen stellen den Versuch dar, die Zusammenhänge apoptotischer und proliferativer Prozesse beim klarzelligem NZK mittels immunhistochemischer Nachweismethoden genauer zu beleuchten und ihre prognostische Relevanz zu ermitteln. Zu diesem Zwecke wurde an Proben von 23 klarzelligem NZK die apoptotische Aktivität im TUNEL-Verfahren sowie die proliferative Aktivität an Hand der Ki-67-Expression bestimmt; darüber hinaus wurde die Expression des Apoptoseinhibitors Bcl-2 und der in beide Prozesse involvierten Tumorsuppressorgene p53 und VHL ermittelt. Die Anteile für den jeweiligen Parameter positiver Zellen wurden an Hand eines semiquantitativen Anfärbungsscores (AS) wie folgt erfasst: AS = 1: 0- 1 %, AS = 2: > 1 – 5 %, AS = 3: > 5 – 20 %, AS = 4: > 20 – 50 %, AS = 5: > 50 % positiver Zellen.

Zur Berechnung ihrer Assoziationen untereinander und mit klinisch-pathologischen Parametern sowie zur Erstellung von Kaplan-Meier-Analysen hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens wurden die so ermittelten Daten an Hand des medianen Anfärbungsscores dichotomisiert (AS(d)); nukleäres Grading und pT-Stadium wurden dem gleichen Dichotomisierungsverfahren unterzogen.

56,5 % der untersuchten NZK wiesen keinen nennenswerten Anteil apoptotischer Zellen auf; unter den apoptotisch aktiven NZK fanden sich überwiegend niedrige Anteile TUNEL-positiver Zellen. Dementsprechend war der mediane AS = 0. Diese Beobachtung ist als Reflexion der hohen Geschwindigkeit, mit der der apoptotische Zelltod ohne Hinterlassung nachweisbarer Residuen abläuft, zu werten.

Die beobachteten Anteile proliferierender Zellen waren erstaunlich niedrig: 30,4 % der untersuchten NZK waren Ki-67-negativ, jeweils die Hälfte der verbleibenden 16 Fälle zeigten AS = 1 bzw. 2. Es bestand ein medianer  $AS_{Ki-67} = 1$ .

Demgegenüber erwies sich die Bcl-2-Expression mit einem medianen AS = 3 als außerordentlich ausgeprägt (2 x  $AS_{Bcl-2} = 2$ ; 9 x  $AS_{Bcl-2} = 3$ ; 10 x  $AS_{Bcl-2} = 4$ ) und implizierte damit eine funktionelle Bedeutung beim klarzelligem NZK.



Eine p53-Expression in  $> 1$  % der Zellen war bei 60,1 % der untersuchten NZK nachweisbar; damit lag der Anteil p53-positiver Zellen angesichts der oft postulierten geringen p53-Alterationsfrequenz beim klarzelligen NZK erstaunlich hoch.

Die VHL-Expression als in dieser Form bisher meines Wissens nicht untersuchter Parameter wies einen medianen AS = 2 auf, wobei 39,1 % der untersuchten NZK einen vollständigen Expressionsverlust ( $AS_{VHL} = 0$ ) zeigten.

Hinsichtlich klinisch-pathologischer Parameter bestand im dichotomisierten Datensatz neben einer signifikant positiven Assoziation zwischen Grading und pT-Stadium selbst eine nur knapp nicht signifikante positive Assoziation zwischen apoptotischer Aktivität und nukleärem Grading. Gewisse tendenzielle Zusammenhänge im semiquantitativen Datensatz fielen im Sinne einer höheren p53- und niedrigeren Bcl-2-Expression mit steigendem Grading sowie einer niedrigeren VHL-Expression mit steigendem Grading und steigendem pT-Stadium auf.

Eine signifikant positive Assoziation bestand zwischen Ki-67- und p53- sowie VHL-Expression; knapp nicht signifikant war ein positiver Zusammenhang zwischen p53- und VHL-Expression.

Im Rahmen der Kaplan-Meier-Analyse zeichneten sich G3-NZK und NZK mit einem apoptotischen Zellanteil von  $> 1$  % durch ein signifikant geringeres rezidivfreies Überlebensintervall aus; überdies wurde ein tendenziell negativer Einfluss einer VHL-Expression  $\leq 20$  % auf das rezidivfreie Überleben beobachtet, der jedoch nicht signifikant war.

Diese Ergebnisse legen eine potentielle Bedeutung der Apoptosehäufigkeit als prognostischem Indikator beim klarzelligen NZK nahe; die Verwertbarkeit der VHL-Expression in diesem Zusammenhang bedarf ihrerseits weiterer investigativer Abklärung.

Der signifikant positive Zusammenhang zwischen Ki-67- und p53-Expression ist als Ausdruck der zellzyklusregulierenden Funktion von p53 einleuchtend, wohingegen die beobachtete positive Assoziation zwischen Ki-67- und VHL-Expression nach derzeitigem Kenntnisstand nicht nachvollziehbar und möglicherweise artefizieller Natur ist.

Die hier beobachtete vergleichsweise häufige p53-Überexpression sowie ihre tendenzielle Assoziation mit einem geringeren VHL-Expressionsverlust lassen auf eine häufigere Involvierung von p53-Alteration in die Entstehung klarzelliger NZK als bisher angenommen schließen; möglicherweise stellen p53- und VHL-Alterationen hier alternative Karzinogenesemechanismen dar. Ein Einfluss der p53-Expression auf die Prognose ließ sich demgegenüber nicht beobachten; dennoch verdient in Zukunft die Bedeutung des p53-Status im Rahmen pharmakologischer oder genterapeutischer Therapieansätze für das klarzellige NZK Beachtung.

Auch die hier beobachtete insgesamt starke Bcl-2-Expression der untersuchten NZK bietet mögliche Ansätze für medikamentöse Behandlungen des klarzelligen NZK, indem z.B. eine mögliche Wirkungsverstärkung primär apoptoseinduzierender Zytostatika durch die Kombination mit Bcl-2-inhibierenden Substanzen untersucht werden könnte.

**6 Literaturverzeichnis**

- 1) Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Eskelinen M, Syrjanen K: Prognostic value of Ki-67 expression in renal cell carcinomas. *Eur Urol* 31 (1997) 350-355
- 2) Abastado JP: Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res Immunol* 147 (1996) 443-456
- 3) Abend M, van Beuningen D: Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie. Teil I. *Strahlenther Onkol* 174 (1998) 156-166
- 4) Abend M, van Beuningen D: Bedeutung apoptotischer Prozesse für die Strahlentherapie. Teil II. *Strahlenther Onkol* 174 (1998) 212-216
- 5) Ananth S, Knebelmann B, Gruning W, Dhanabal M, Walz G, Stillman IE, Sukhatme VP: TGF- $\beta$ 1 is a target for the VHL tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 59 (1999) 2210-2216
- 6) Ashida S, Okuda H, Chikazawa M, Tanimura M, Sugita O, Yamamoto Y, Nakamura S, Moriyama M, Shuin T: Detection of circulating cancer cells with von Hippel-Lindau gene mutation in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 381738-22
- 7) Baba M, Hirai S, Kawakami S, Kishida T, Sakai N, Kaneko S, Yao M, Shuin T, Kubota Y, Hosaka M, Ohno S: Tumor suppressor protein VHL is induced at high cell density and mediates contact inhibition of cell growth. *Oncogene* 20 (2001) 2727-2736
- 8) Bellamy COC, Malcomson R, Wyllie AH: The roles of p53 in apoptosis and cancer. In: Martin SJ (Hrsg): *Apoptosis and cancer*. Karger Landes Systems, Basel, 1997, S. 116-140
- 9) Bindra RS, Vasselli JR, Stearman R, Linehan WM, Klausner RD: VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Res* 62 (2002) 3014-3019
- 10) Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N: Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the VHL gene with tumor suppressor activity. *Oncogene* 18 (1999) 1529-1535
- 11) Bono AV, Lovisolo JAJ: Renal cell carcinoma – diagnosis and treatment: State of the art. *Eur Urol* 3 (1997) 47-55
- 12) Boonstra JG, van der Woude FJ, Wever PC, Laterveer JC, Daha MR, van Kooten C: Expression and function of Fas (CD 95) on human renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 8 (1997) 1517-1524
- 13) Botchkarev VA, Komarova EA, Siebenhaar F, Botchkareva NV, Komarov PG, Maurer M, Gilchrist BA, Gudkov AV: p53 is essential for chemotherapy-induced hair loss. *Cancer Res* 60 (2000) 5002-5006
- 14) Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glacač D, Rödl H, Eichinger M, Feurer M, Weidt E, Puranakitstha C, Neuhaus C, Pomer S, Brenner W, Schirmacher P, Störkel S, Rotter M, Mašera A, Gugeler N, Decker H-J: VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res* 60 (2000) 1942-1948
- 15) Brkovic D, Waldherr R: Histogenese, Pathologie und prognostische Faktoren des Nierenzellkarzinoms. In: Staehler G, Pomer S: *Nierentumoren*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997, S. 50-194

- 16) Brussel van JP, Mickisch GHJ: Prognostic factors in renal cell and bladder cancer. *BJU Int* 83 (1999) 902-909
- 17) Caldwell MC, Hough C, Furer S, Linehan WM, Morin PJ, Gorospe M: Serial analysis of gene expression in renal carcinoma cells reveals VHL-dependent sensitivity to TNFalpha cytotoxicity. *Oncogene* 31 (2002) 929-936
- 18) Chandler D, El-Naggar AK, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ: Apoptosis and expression of the bcl-2 proto-oncogene in the fetal and adult human kidney : Evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. *Hum Pathol* 25 (1994) 789-795
- 19) Chen F, Kishida T, Duh F-M, Orcutt ML, Schmidt L, Zbar B: Suppression of growth of renal cell carcinoma by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 55 (1995) 4804-4807
- 20) Cheville JC, Zincke H, Lohse CM, Sebo TJ, Riehle D, Weaver AL, Blute ML: pT1 clear cell renal cell carcinoma. A study of the association between MIB-1 proliferative activity and pathologic features and cancer specific survival. *Cancer* 94 (2002) 2180-2184
- 21) Clifford SC, Astuti D, Hooper L, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Maher ER: The pVHL-associated SCF ubiquitin ligase complex: Molecular genetic analysis of elongin B and C, Rbx1 and HIF-1α in renal cell carcinoma. *Oncogene* 20 (2001) 5067-5074
- 22) Corless CL, Kibel AS, Iliopoulos O, Kaelin WG: Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Hum Pathol* 28 (1997) 459-464
- 23) Decker J, Brauch H: Nierenzellkarzinome. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg): Nicht-hereditäre Tumorerkrankungen. Springer, Berlin, Heidelberg, 2002, S. 257-289
- 24) Delahunt B, Bethwaite PB, Thornton A, Ribas JL: Proliferation of renal cell carcinoma assessed by fixation-resistant polyclonal Ki-67 antibody labeling. Correlation with clinical outcome. *Cancer* 75 (1995) 2714-2719
- 25) Delahunt B: Histopathologic prognostic indicators for renal cell carcinoma. *Sem Diagn Pathol* 1 (1998) 68-76
- 26) Delahunt B, Kittelson JM, McCredie MR, Reeve AE, Stewart JH, Bilous AM: Prognostic importance of tumor size for localized conventional (clear cell) renal cell carcinoma: Assessment of TNM T1 and T2 tumor categories and comparison with other prognostic parameters. *Cancer* 94 (2002) 658-664
- 27) Devarajan P, De Leon M, Talasazan F, Schoenfeld AR, Davidowitz EJ, Burk RD: The von Hippel-Lindau gene product inhibits renal cell apoptosis via Bcl-2-dependent pathways. *J Biol Chem* 276 (2001) 40599-40605
- 28) Drexler HCA: Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 855-860
- 29) Duan DR, Humphrey JS, Chen DYT, Wenig Y, Sukegawa J, Lee S, Gnarr JR, Linehan WM, Klausner RD: Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: Localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (1995) 6459-6463

- 30) Ficarra V, Righetti R, Martignoni G, D'Amico A, Pilloni S, Rubilotta E, Malossini G, Mobilio G: Prognostic value of renal cell carcinoma nuclear grading: multivariate analysis of 333 cases. *Urol Int* 67 (2001) 130-134
- 31) Ficarra V, Righetti R, Pilloni S, D'Amico S, Maffei N, Novella G, Zanolla L, Malossini G, Mobilio G: Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. *Eur Urol* 41 (2002) 190-198
- 32) Fotedar R, Diederich L, Fotedar A: Apoptosis and the cell cycle. In: Martin SJ (Hrsg): Apoptosis and cancer. Karger Landes Systems, Basel, 1997, S. 43-63
- 33) Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley WL, Tschopp J, Lew DP, Demaurex N, Krause K-H: Bcl-2 decreases the free Ca<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 5723-5728
- 34) Gallou C, Joly D, Méjean A, Staroz F, Martin N, Tarlet G, Orfanelli MT, Bouvier R, Droz D, Chrétien Y, Maréchal JM, Richard S, Junien C, Béroud C: Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: Definition of a risk factor for VHL patients to develop an renal cell carcinoma. *Hum Mutat* 13 (1999) 464-475
- 35) 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* 80 (1997) 1768-1775
- 36) Gelb AB: Renal cell carcinoma. Current prognostic factors. *Cancer* 89 (1997) 981-986
- 37) Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, Papadimitriou C, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI: Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 86 (1999) 1421-1430
- 38) Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, Oren M: Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 9979-9983
- 39) Girnita L, Girnita A, Brodin B, Xie Y, Nilsson G, Drieu A, Lundeberg J, Wejde J, Bartolazzi A, Wiman KG, Larsson O: Increased expression of insulin-like growth factor I receptor in malignant cells expressing aberrant p53: Functional impact. *Cancer Res* 60 (2000) 5278-5283
- 40) Gobe G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R: Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinoma. *Cancer Invest* 20 (2002) 324-332
- 41) Godley PA, Taylor M: Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol* 13 (2001) 199-203
- 42) Gofrit ON, Shapiro A, Kovalski N, Landau EH, Shenfeld OZ, Pode D: Renal cell carcinoma: Evaluation of the 1997 TNM system and recommendations for follow-up after surgery. *Eur Urol* 39 (2001) 669-675
- 43) Gorospe M, Egan JM, Zbar B, Lerman M, Geil L, Kuzmin I, Holbrook NJ: Protective Function of von Hippel-Lindau Protein against Impaired Protein Processing in Renal Carcinoma Cells. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 1289 - 1300
- 44) Granville DJ, Carthy CM, Hunt DWC, McManus B: Apoptosis : Molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78 (1998) 893-907

- 45) Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, Novick A: TNM staging of renal cell carcinoma. Workgroup No. 3. *Cancer* 80 (1997) 992-993
- 46) Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Turner K, Scott PAE, Robinson BA, Harris AL, Fox SB: Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas: Regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *Cancer Res* 61 (2001) 3206-3211
- 47) Haitel A, Wiener HG, Blaschitz U, Marberger M, Susani M: Biologic behaviour of and p53 overexpression in multifocal renal cell carcinoma of clear cell type: An immunohistochemical study correlating grading, staging, and proliferation markers. *Cancer* 85 (1999) 1593-1598.
- 48) 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* 6 (2000) 457-465
- 49) Haitel A, Wiener HG, Neudert B, Marberger M, Susani M: Expression of the cell cycle proteins p21, p27, and PRB in clear cell renal cell carcinoma and their prognostic significance. *Urology* 58 (2001) 477-481
- 50) Hall PA: Assessing apoptosis: A critical survey. *Endocr Relat Cancer* 6 (1999) 3-8
- 51) Helpap B, Knüpfner J, Essmann S: Histologisches und zytologisches (nukleoläres) Grading von Nierenzellkarzinomen. *Verh Dtsch Ges Pathol* 73 (1989) 400-404
- 52) Hindermann W, Berndt A, Wunderlich H, Katenkamp D, Kosmehl H: Quantitative evaluation of apoptosis and proliferation in renal cell carcinoma. Correlation to tumor subtype, cytological grade according to the Thoenes-classification and the occurrence of metastasis. *Pathol Res Pract* 193 (1997) 1-7
- 53) Hockenberry D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348 (1990) 334-336
- 54) 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 (1996) 3807-3811
- 55) Hofmockel G, Theiß M, Groß A, Langer W, Frohmüller H: Immunchemotherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms mit Interleukin-2, Interferon- $\alpha$  und 5-Fluorouracil. *Urologe A* 36 (1997) 45-49
- 56) Huang A, Fone PD, Gandour-Edwards R, White RW, Low RK: Immunohistochemical analysis of bcl-2 protein expression in renal cell carcinoma. *J Urol* 162 (1999) 610-613
- 57) Igarashi H, Esumi M, Ishida H, Okada K: Vascular endothelial growth factor overexpression is correlated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inactivation in patients with sporadic renal cell carcinoma. *Cancer* 95 (2002) 47-53
- 58) Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, Kaelin Jr WG: Tumor suppression by the von Hippel-Lindau gene product. *Nature Med* 1 (1995) 822-826
- 59) Inoue M, Yano H, Kojiro M: Expression of Fas and anti-Fas-mediated apoptosis in human renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 9 (1996) 49-56

- 60) Ishida H, Irie K, Itoh T, Furukawa T, Tokunaga O: The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with ki-67 growth fraction. *Cancer* 80 (1997) 1034-1043
- 61) Kamada M, Suzuki K, Kato Y, Okuda H, Shuin T: Von Hippel-Lindau protein promotes the assembly of actin and vinculin and inhibits cell mobility. *Cancer Res* 61 (2001) 4184-4189
- 62) Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin Jr WG: Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to elongin B and C. *Science* 269 (1995) 1444-1446
- 63) Knebelmann B, Ananth S, Cohen HT, Sukhatme VP: Transforming growth factor  $\alpha$  is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* 58 (1998) 226-231
- 64) Koga F, Arai K, Kamai T, Abe H, Yoshida K-I: Fas labeling status does not correlate with apoptosis of renal cell carcinoma in vivo. *Anticancer Res* 21 (2001) 3193-3198
- 65) Kuwashima Y, Kobayashi Y, Kurosumi M, Tanuma J, Shiromizu K, Kishi K: Inverse correlation between bcl-2 expression and cell growth fraction in human endometrial adenocarcinoma tissue. *Anticancer Res* 17 (1997) 3773-76
- 66) Lam M, Dubyak G, Chen L, Nunez G, Miesfeld R, Distelhorst CW: Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated  $Ca^{2+}$  fluxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 6569-6573
- 67) Levine AJ: The p53 tumor suppressor gene. <http://www.molbio.princeton.edu/faculty/levine.html>
- 68) Ljungberg B, Bozoky B, Kovacs G, Stattin P, Farelly E, Nylander K, Landberg G: p53 Expression in correlation to clinical outcome in patients with renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2001 35 (2001) 15-20
- 69) Los M, Jansen GH, Kaelin WG, Lips CJM, Blijham GH, Voest EE: Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab Invest* 75 (1996) 231-238
- 70) Los M, Zeamari S, Foekens JA, Gebbink MFBG, Voest EE: Regulation of the urokinase-type plasminogen activator system by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 59 (1999) 4440-4445
- 71) Lotem J, Sachs L: Differential suppression by protease inhibitors and cytokines of apoptosis induced by wild-type p53 and cytotoxic agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 12507-12512
- 72) Lotem J, Sachs L: Cytokine suppression of protease activation in wild.type p53-dependent and p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 9349-9353
- 73) Lowe SW: Activation of p53 by oncogenes. *Endocr Relat Cancer* 6 (1999) 45-48
- 74) Luciani LG, Cestari R, Tallarigo C: Incidental renal cell carcinoma – age and stage characterization and clinical implications: Study of 1092 patients (1982-1997). *Urology* 56 (2000) 58-62
- 75) Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W: Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 408 (2000) 377-81
- 76) Martin SJ: Apoptosis and cancer: An overview. In: Martin SJ (Hrsg): *Apoptosis and cancer*. Karger Landes Systems, Basel, 1997, S. 1-8

- 77) Martin SJ: Apoptosis: An introduction. In: Martin SJ (Hrsg): Apoptosis and cancer. Karger Landes Systems, Basel, 1997, S. 9-24
- 78) Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ: The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399 (1999) 271-275
- 79) McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA: Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 22 (1993) 355-360
- 80) McDonnell TJ, Hewitt SM, Saunders GF: Cell death regulation in the kidney and in renal neoplasms. In: Martin SJ (Hrsg): Apoptosis and cancer. Karger Landes Systems, Basel, 1997, S. 181-191
- 81) Mertins SD, Myers TG, Hollingshead M, Dykes D, Bodde E, Tsai P, Jefferis CA, Gupta R, Linehan WM, Alley M, Bates SE: Screening for and identification of novel agents directed at renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7 (2001) 620-633
- 82) Mikami T, Yanakisawa N, Baba H, Koike M, Okayasu I: Association of bcl-2 protein expression with gallbladder carcinoma differentiation and progression and its relation to apoptosis. *Cancer* 85 (1999) 318-25
- 83) Mikuz G, Studler G, Vilits P, Tomschi W, Maier U, Sedlmayer F, Albrecht W, Kozak W, Vierhapper H, Hörtl W: AUO-Manual. 4. Nierenzellkarzinom, Nebennierentumoren. <http://www.nierenzellkarzinom.de>
- 84) 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* 58 (1998) 2304-2309
- 85) Mow BMF, Blajeski AL, Chandra J, Kaufmann SH: Apoptosis and the response to anticancer therapy. *Curr Opin Oncol* 13 (2001) 453-462
- 86) Müller M: Das Nierenzellkarzinom. <http://www.uniduesseldorf.de/WWW/MedFak/Urologie/Urologisches/Krankheitsbilder/Nierenkarzinom/rcc.htm>
- 87) Nativ O, Sabo E, Reiss A, Wald M, Madjar S, Moskovitz B: Clinical significance of tumor angiogenesis in patients with localized renal cell carcinoma. *Urology* 51 (1998) 693-696
- 88) Natsume T, Kobayashi M, Fujimoto S: Association of p53 gene mutations with sensitivity to TZT-1027 in patients with clinical lung and renal carcinoma. *Cancer* 92 (2001) 386-394
- 89) Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devillee P, Glover T, Collins FS, Weston A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 342 (1989) 705-708
- 90) Nonomura N, Nishimura K, Ono Y, Fukui T, Harada Y, Takaha N, Takahara S, Okuyama A: Soluble Fas in serum from patients with renal cell carcinoma. *Urology* 55 (2000) 151-155
- 91) Nonomura N, Miki T, Yokoyama M, Imazu T, Takada T, Takeuchi S, Kanno N, Nishimura K, Kojima Y, Okuyama A: Fas-/APO-1-mediated apoptosis of human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 229 (1996) 945-951

- 92) Oberneder R, Kriegmair M, Staehler M, Hofstetter A: Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms. *Urologe A* 36 (1997) 130-137
- 93) Oda H, Nakatsuru Y, Ishikawa T: Mutations of the p53 gene and p53 overexpression are associated with sarcomatoid transformation in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 55 (1995) 658-662
- 94) Oudard S, Levalois C, Andrieu J-M, Bougaran J, Validire P, Thiounn N, Poupon M-F, Fourmé E, Chevillard S: Expression of genes involved in chemoresistance, proliferation and apoptosis in clinical samples of renal cell carcinoma and correlation with clinical outcome. *Anticancer Res* 22 (2002) 121-128
- 95) Papadopoulos Ilias, Rudolph P, Weichert-Jacobsen K: Value of p53 expression, cellular proliferation, and DNA content as prognostic indicators in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 32 (1997) 110-117
- 96) Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoit G, Jardin A, Bedossa P: Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 436 (2000) 351-356
- 97) De Paulsen N, Brychzy A, Fournier M-C, Klausner RD, Gnarr JR, Pause A, Lee S: Role of transforming growth factor- $\alpha$  in von Hippel-Lindau (VHL) -/- clear cell renal carcinoma cellproliferation: A possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 1387-1392
- 98) Pause A, Lee S, Lonergan KM, Klausner KD: The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 993-998
- 99) Pepe S, Ruggiero A, D'Aquisto M, De Laurentiis M, De Placido S, Sandomenico C, Staibano S, De Rosa G, Lucariello A, D'Armiento M, Bianco AR: Nuclear DNA content-derived parameters correlated with heterogeneous expression of p53 and bcl-2 proteins in clear cell renal carcinomas. *Cancer* 89 (2000) 1065-1075
- 100) Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO: Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 12736-12737
- 101) Peter ME, Krammer PH: Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10 (1998) 545-551
- 102) Pietenpol JA, Tokino T, Thiagalingam S, El-Deiry WS, Kinzler KW, Vogelstein B: Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (1994) 1998-2002
- 103) Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B: Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl-2. *Cancer Res* 54 (1994) 3714-3717
- 104) Pomer S: Nierenzellkarzinom – Grundlagen, Symptomatik, Prognose. In: Staehler G, Pomer S (Hrsg): Nierentumoren. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997, S. 21-49
- 105) Pomer S: Das metastasierte Nierenzellkarzinom. In: Staehler G, Pomer S (Hrsg): Nierentumoren. Springer, Berlin, Heidelberg, 1997, S. 195-250
- 106) Pomer S, Schubert J, Schmitz-Dräger B, Voges G, Fischer R, Hermanek P, Huber C, Huland H, Jocham D, Kauffmann G, Müller R-P, Müller-Wiefel H, Sauer H, Störkel S, Wirth M, Richter-Reichhelm M,



- Schalkhäuser K, Ludwig G, Stockamp K: Leitlinien zur Diagnostik und Therapie des Nierenparenchymkarzinoms. [http://dgu.springer.de/leit/3\\_98.htm](http://dgu.springer.de/leit/3_98.htm)
- 107) Pulkkanen KJ, Laukkanen MO, Naarala J, Yla-Herttuala: False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis* 5 (2000) 329-333
- 108) Reed JC: Bcl-2 family proteins: Role in dysregulation of apoptosis and chemoresistance in cancer. In: Martin SJ (Hrsg): *Apoptosis and cancer*. Karger Landes Systems, Basel, 1997, S. 64-97
- 109) Richter EN, Oevermann K, Buentig N, Störkel S, Dallmann I, Atzpodien J: Primary apoptosis as a prognostic index for the classification of metastatic renal cell carcinoma.
- 110) Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard J-Y, Patard J-J, Manunta A, Moulinoux J-P, Guillé F, Ramée M-P, Lobal B : Value of immunohistochemical ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 55 (2000) 501-505
- 111) Rioux-Leclercq N, Epstein JI, Bansard JY, Turlin B, Patard JJ, Manunta A, Chan T, Ramee MP, Lobel B, Moulinoux JP: Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2001 Nov; 32(11): 1209-1215
- 112) Riss TL: Apoptosis as a biomarker in chemoprevention trials. *Urology* 57 Suppl. (2001) 141-142
- 113) Roigas J: Nierenzellkarzinom. [http://www.charite.de/ch/uro/f\\_erkrank.html](http://www.charite.de/ch/uro/f_erkrank.html)
- 114) Ross GM: Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer* 6 (1999) 41-44
- 115) Russo P: Renal cell carcinoma: Presentation, staging, and surgical treatment. *Semin Oncol* 27 (2000) 160-176
- 116) Scheltema JM, Romijn JC, van Steenbrugge GJ, Schroder FH, Mickisch GH: Inhibition of apoptotic proteins causes multidrug resistance in renal carcinoma cells. *Anticancer Res* 21 (2001) 3161-3166
- 117) Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC: Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 5113-5118
- 118) Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD: A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 8817-8822
- 119) Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD: Elongin BC complex prevents degradation of von Hippel-Lindau tumor suppressor gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 8507-8512
- 120) Schoenfeld AR, Parris T, Eisenberger A, Davidowitz EJ, De Leon M, Talasazan F, Devarajan P, Burk RD: The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene protects cells from UV-mediated apoptosis. *Oncogene* 19 (2000) 5851-5857
- 121) Schraml P, Struckmann K, Haetz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ, Moch H: VHL mutations and their correlation with tumor cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 196 (2002) 186-193
- 122) Sejima T, Miyagawa I: Expression of bcl-2, p53 oncoprotein, and proliferatin cell nuclear antigen in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 35 (1999) 242-248

- 123) Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Funahashi Y, Mignon A, Lacronique V, Matsuda H, Tsujimoto Y: Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 1455-1459
- 124) Sidransky D, Hollstein M: Clinical implications of the p53 gene. *Annu Rev Med* 47 (1996) 285-301
- 125) Slaton JW, Benedict WF, Dinney CPN: p53 in bladder cancer: Mechanism of action, prognostic value, and target for therapy. *Urology* 57 (2001) 852-859
- 126) Störkel S, Jacobi GH: Systematik, Histogenese und Prognose der Nierenzellkarzinome und des renalen Onkozytoms. *Verh Dtsch Ges Pathol* 73 (1989) 400-404
- 127) Störkel S: Tumoren der Niere. In: Remmele W (Hrsg): *Pathologie*. Springer, xxx, 1997, S. 173-192
- 128) Tanji N, Yokoyama M, Sugamoto T, Takeuchi M, Terada N: Apoptosis in prostatic adenocarcinomas; a study of relationship to ki-67 and bcl-2 protein expression. *Anticancer Res* 18 (1998) 1111-1116
- 129) Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Haab BB, The BT: Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: Gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (2001) 9754-9759
- 130) Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kühn R, Wittekind CW: Prognostic value of ploidy and proliferation markers in renal cell carcinoma. *Cancer* 77 (1996) 164-171
- 131) Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kühn R, Wittekind CW: Incidence of apoptosis, cell proliferation and p53 expression in renal cell carcinomas. *Anticancer Res* 17 (1997) 1155-1162
- 132) Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ, Jacobi GH: Das Nierenzellkarzinom – eine Systematik auf Grund zytomorphologischer Merkmale. *Zentralbl allg Pathol pathol Anat* 132 (1986) 503-513
- 133) Thoenes W, Störkel S: Die Pathologie der benignen und malignen Nierenzelltumoren. *Urologe A* 30 (1991) 41-50
- 134) Todd D, Yang G, Brown RW, Cao J, D'Agati V, Thompson TS, Truong LD: Apoptosis in renal cell carcinoma : Detection by in situ end-labelling of fragmented DNA and correlation with other prognostic factors. *Hum Pathol* 27 (1996) 1012-1017
- 135) Toft NJ, Arends AJ: Apoptosis and necrosis in tumors. In: Martin SJ (Hrsg): *Apoptosis and cancer*. Karger Landes Systems, Basel, 1997, S. 25-42
- 136) Tomita Y, Bilim V, Kawasaki T, Takahashi K, Okan I, Magnusson KP, Wiman KG: Frequent expression of bcl-2 in renal cell carcinomas carrying wild-type p53. *Int J Cancer* 66 (1996) 322-325
- 137) Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 (1995) 1456-1462
- 138) Turner KJ, Moore JW, Jones A, Taylor CF, Cuthbert-Heavens D, Han C, Leek RD, Gatter KC, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Cranston D, Harris AL: Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation. *Cancer Res* 62 (2002) 2957-2961
- 139) Ushida T, Gao JP, Wang C, Jiang SX, Muramoto M, Satoh T, Mirei S, Irie A, Kameya T, Baba S: Clinical significance of p53, mdm2, and bcl-2 proteins in renal cell carcinoma. *Urology* 59 (2002) 615-620

- 140) Vasavada SP, Novick AC, Williams BRG: p53, bcl-2, and bax expression in renal cell carcinoma. *Urology* 51 (1998) 1057-1061
- 141) Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci* 93 (1996) 2239-2244
- 142) Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408 (2000) 307-310
- 143) Voigtmann R, Kirstein A: Clodronat in der Behandlung der Tumorosteopathie. Anwendungsbeobachtung bei Tumorpatienten mit Knochenmetastasen oder Hyperkalzämien. *Fortschr Med* 122 (1994) 43-46
- 144) Wagner H, Oberneder R, Busch M, Weiss M, Schmeller N, Petrides M: Nierenzellkarzinom. <http://www.krebsinfo.de/ki/empfehlung/uro/S74.HTM>
- 145) Wu X-X, Mizutani Y, Kakehi Y, Yoshida O, Ogawa O: Enhancement of Fas-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells by adriamycin. *Cancer Res* 60 (2000) 2912-2918
- 146) Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL: Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 60 (2000) 7075-7083
- 147) Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K, Miura T, Moriyama M, Nagashima Y, Nakatani Y, Kubota Y, Kondo K-I: VHL tumor suppressor alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 94 (2002) 1569-1575
- 148) Yip SKH, Cheng WS: Incidental renal cell carcinoma. *Urology* 57 (2001) 206
- 149) Yoshino S, Kato M, Okada K: Clinical significance of angiogenesis, proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 20 (2000) 591-594
- 150) Zatyka M, Fernandes da Silva N, Clifford SC, Morris MR, Wiesener MS, Eckardt K-U, Houlston RS, Richards FM, Latif F, Maher ER: Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as a modifier in von Hippel-Lindau disease. *Cancer Res* 62 (2002) 3803-3811
- 151) Zhang XH, Takenaka I: Incidence of apoptosis and metallothionein expression in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 81 (1998) 9-13
- 152) Zhang X, Takenaka I: Cell proliferation and apoptosis with bcl-2 expression in renal cell carcinoma. *Urology* 56 (2000) 510-15
- 153) Zisman A, Pantuck AJ, Chao D, Dorey F, Said JW, Gitlitz BJ, de Kernion JB, Figlin RA, Belldegrun AS: Reevaluation of the 1997 TNM classification for renal cell carcinoma: T1 and T2 cutoff point at 4,5 rather than at 7 cm. better correlates with clinical outcome. *J Urol* 166 (2001) 54-58

## 7 Anlagen

**Tab. 49:** Die 23 untersuchten NZK: Klinische Daten, Nachbeobachtungszeit, Krankheitsverlauf und postoperative medikamentöse Behandlung im Rahmen von Studien

Fallnummer	Geschlecht	OP-Alter in Jahren	betroffene Niere	UZ in Monaten	Censor	Rezidivfreie ÜZ in Monaten	Censefs	Vacc	Clo
1	m	38	l	62,2	0	62,2	0	0	0
2	w	68	r	65,9	0	65,9	0	0	0
3	w	67	l	62,6	0	62,6	0	0	0
4	w	55	l	56,7	0	56,7	0	0	0
5	w	59	l	59,9	0	59,9	0	0	0
6	w	73	l	52,2	0	52,2	0	1	1
7	w	66	r	0,0	3	0,0	0	0	0
8	m	65	l	57,5	0	57,5	0	0	0
9	m	71	r	57,2	0	57,2	0	0	0
10	m	43	l	57,0	0	57,0	0	0	0
11	m	66	r	0,7	3	0,7	0	0	0
12	m	59	l	46,8	0	46,8	0	0	1
13	m	63	l	3,2	2	3,2	3	0	0
14	w	65	l	52,7	1	41,7	2	0	1
15	m	57	r	28,4	3	28,4	0	1	1
16	m	65	r	15,0	2	4,3	2	0	0
17	m	52	r	44,3	0	44,3	0	0	1
18	w	61	l	17,7	3	17,7	0	0	0
19	m	66	l	48,2	0	48,2	0	0	0
20	m	45	r	48,3	1	13,0	1	0	0
21	m	64	r	45,6	0	45,6	0	0	0
22	w	54	r	39,4	1	17,4	2	1	0
23	w	72	l	0,5	3	0,5	0	0	0

**Legende:**

**m** männlich  
**w** weiblich  
**l** linke Niere  
**r** rechte Niere

**Vacc** autologe Tumervaccination:  
0 nein  
1 ja

**Clo** Clodronatbehandlung:  
0 nein  
1 ja

**UZ** Nachbeobachtungszeit

**Censor** Status am Ende der Nachbeobachtungszeit:  
0 Patient lebt, kein Krankheitsprogreß  
1 Patient lebt, Krankheitsprogreß  
2 Tod durch NZK  
3 Tod durch andere Ursache

**Censefs** Status am Ende der rezidivfreien Nachbeobachtungszeit:  
0 Patient lebt, kein Krankheitsprogreß  
1 Lokalrezidiv  
2 Fernmetastasierung  
3 primäre Fernmetastasierung

**Tab. 50:** Klinisch-pathologische Daten und Expression der immunhistochemisch untersuchten Parameter bei den 23 untersuchten NZK

Fall	UICC-Stadium	pT-Stadium	pT dichotomisiert	Tumorgroße in cm	Grading	Grading dichotomisiert	AS <sub>VHL</sub>	AS(d) <sub>VHL</sub>	AS <sub>Ki-67</sub>	AS(d) <sub>Ki-67</sub>	AS <sub>Bcl-2</sub>	AS(d) <sub>Bcl-2</sub>	AS <sub>p53</sub>	AS(d) <sub>p53</sub>	AS <sub>TUNEL</sub>	AS(d) <sub>TUNEL</sub>
1	II	pT2	1	8,0	G1	0	3	1	2	1	4	1	2	1	0	0
2	I	pT1	0	3,5	G2	0	0	0	0	0	4	1	2	1	0	0
3	I	pT1	0	1,2	G1	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0
4	I	pT1	0	5,0	G2	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0
5	I	pT1	0	2,5	G2	0	3	1	1	0	4	1	2	1	0	0
6	II	pT2	1	9,8	G3	1	0	0	1	0	4	1	1	0	1	1
7	I	pT1	0	4,4	G1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	1
8	I	pT1	0	3,2	G1	0	2	0	0	0	3	0	1	0	0	0
9	I	pT1	0	3,0	G3	1	3	1	2	1	2	0	3	1	1	1
10	I	pT1	0	5,0	G1	0	2	0	1	0	4	1	0	0	1	1
11	I	pT1	0	3,5	G2	0	4	1	2	1	3	0	3	1	0	0
12	I	pT1	0	2,5	G2	0	3	1	2	1	3	0	3	1	3	1
13	IV	pT1	0	5,5	G2	0	1	0	2	1	4	1	3	1	0	0
14	II	pT2	1	8,0	G3	1	2	0	0	0	3	0	1	0	3	1
15	III	pT3	1	6,0	G3	1	0	0	1	0	3	0	2	1	0	0
16	I	pT1	0	5,0	G2	0	2	0	2	1	3	0	0	0	1	1
17	I	pT1	0	2,5	G2	0	2	0	2	1	4	1	3	1	0	0
18	I	pT1	0	5,5	G2	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0
19	I	pT1	0	3,5	G2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1
20	I	pT1	0	4,8	G3	1	0	0	0	0	4	1	0	0	1	1
21	I	pT1	0	3,7	G2	0	3	1	2	1	4	1	1	0	0	0
22	III	pT3	1	9,5	G3	1	0	0	1	0	3	0	2	1	2	1
23	III	pT3	1	2,8	G2	0	2	0	1	0	4	1	0	0	0	0

## 8 Thesen

1. Das klarzellige NZK weist einen an Hand „klassischer“ Prognosefaktoren oft schwer vorhersehbaren klinischen Verlauf auf, so dass die Ermittlung zusätzlicher Prognosefaktoren zur individuellen Risikoabschätzung der betroffenen Patienten von großer Bedeutung ist.
2. Auf Grund einer hohen Strahlen- und Chemoresistenz ist das klarzellige NZK bisher etablierten adjuvanten und palliativen Therapiestrategien gegenüber schwer zugänglich.
3. Das nukleäre Grading beeinflusst gemäß den vorliegenden Ergebnissen signifikant das rezidivfreie Überlebensintervall.
4. Ein Schwellenwert von 4 cm maximaler Tumorausdehnung ist möglicherweise von größerem prognostischem Wert für die Prognose primär kurativ nephrektomierter NZK-Patienten als das pT-Stadium nach UICC.
5. Höhere Apoptoseraten sind tendenziell mit einem höheren nukleären Grading assoziiert.
6. Primärtumoren mit  $> 1\%$  apoptotischer Zellen weisen ein signifikant schlechteres rezidivfreies Überleben auf als solche mit  $\leq 1\%$  apoptotischer Zellen.
7. Eine p53-Überexpression beim klarzelligem NZK ist nach den vorliegenden Ergebnissen offensichtlich häufiger als bisher angenommen.
8. Eine p53-Überexpression beim klarzelligem NZK geht mit einer vermehrten Proliferationsrate einher.
9. Alterationen des p53- und des VHL-Gens stellen möglicherweise alternative Entstehungsmechanismen des klarzelligem NZK dar.
10. Ein Einfluss einer p53-Überexpression auf die Prognose des klarzelligem NZK ist an Hand der vorliegenden Daten nicht nachweisbar.
11. Der p53-Status klarzelliger NZK ist bei der Entwicklung neuer medikamentöser Therapiekonzepte zu berücksichtigen.
12. Klarzellige NZK weisen eine starke Bcl-2-Expression auf.

13. Isoliert betrachtet ist eine prognostische Bedeutung der Bcl-2-Expression für das klarzellige NZK bisher nicht eindeutig nachweisbar; weitere Studien unter Mitberücksichtigung seiner Homologen sind für die Zukunft wünschenswert.
14. Die Kombination apoptoseinduzierender Zytostatika mit Bcl-2-Antagonisten könnte zu einer erhöhten Wirksamkeit beim klarzelligem NZK führen.
15. Die beobachtete positive Assoziation zwischen VHL- und Ki-67-Expression ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand nicht erklärbar.
16. Das Ausmaß der zellulären VHL-Expression ist möglicherweise als Prognosefaktor für das klarzellige NK geeignet, wobei zur Ermittlung aussagefähiger Schwellenwerte weitere Untersuchungen benötigt werden.
17. Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Malignomen sind oftmals nicht miteinander vergleichbar, da zum Teil erhebliche Differenzen bestehen. Eine Standardisierung hinsichtlich labortechnischer Verfahrensweisen sowie markerspezifischer Schwellenwerte ist für die Zukunft dringend erforderlich.
18. Ebenso limitieren die, wie auch hier, oftmals geringen untersuchten Fallzahlen die Aussagekraft eines dieser immunhistochemischen Studien erheblich ein.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Mirja Wüster  
Wohnort: Bronsartstraße 7  
30161 Hannover  
Geburtstag und –ort: 09/03/1975 in Lübbecke (Westfalen)  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch  
Mutter: Karola Aussieker (geborene Knickmeier, geschiedene Wüster)  
Vater: Dipl.-Ing. Hans-Jürgen Wüster (verstorben 14/10/1989)

### Schulbildung

08/1981 – 07/1985 Grundschule Lübbecke  
08/1985 – 06/1994 Wittekind-Gymnasium Lübbecke  
09/06/1994 Abitur, mit Auszeichnung (Note: 1,5)

### Medizinische Ausbildung

Ab 10/1994 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle  
19/03/1997 Ärztliche Vorprüfung (Note: „gut“)  
24/03/1998 1. Staatsexamen (Note: „gut“)  
29/03/2001 2. Staatsexamen (Note: „gut“)  
16/04/2001 – 05/08/2001 1. Abschnitt des Praktischen Jahres/Klinik für Innere Medizin, Klinikum Kröllwitz, Halle  
06/08/2001 – 25/11/2001 2. Abschnitt des Praktischen Jahres/Universitäts-Frauenklinik Halle  
26/11/2001 – 17/03/2002 3. Abschnitt des Praktischen Jahres/Allgemeine, abdominale und endokrine Chirurgie, Hôpital Civil, Université Louis Pasteur, Strasbourg  
23/04/2002 3. Staatsexamen (Note : „gut“)

### Arbeitsstellen

Seit 15/07/2002 ÄiP in der Frauenklinik Neu-Bethesda des Henriettenstiftes Hannover  
(Schwemannstraße 17, 30559 Hannover)

Hannover, den 18/08/2003

Mirja Wüster



## Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Mirja Wüster

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, nur einen Antrag für diese Arbeit auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht zu haben. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mirja Wüster

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. habil. J. Langner danke ich für die Vergabe des Themas sowie die immer motivierende Unterstützung bei der Ausarbeitung.

Außerdem danke ich dem Institut für Pathologie und namentlich Herrn Prof. Dr. em. F. W. Rath für sein förderliches Interesse an der Thematik und die logistische Unterstützung bei der Herstellung und Dokumentation der immunhistochemischen Präparate.

Ebenso danke ich Herrn Dr. A. Meye, Frau Dr. B. Göhring, Herrn Dr. H. Taubert und Herrn Dr. U. Bilkenroth für ihre tatkräftige Unterstützung und Beratung im Rahmen der Durchführung und Interpretation der immunhistochemischen Untersuchungen.

Frau Bauer möchte ich für die immer freundliche Einarbeitung in die technische Durchführung der immunhistochemischen Färbungen danken.

Und natürlich gilt mein besonderer Dank Herrn W. Nöding, Frau D. Michaelis und meiner Mutter für die kontinuierliche psychosoziale Unterstützung bei der Verfassung dieser Dissertation.